



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ANANINDEUA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS



KELLY COSTA ALVES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS FARMACÊUTICOS BASEADOS
EM HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR (HDL) INTERCALADO COM NIMESULIDA E
ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E INSATURADOS**

ANANINDEUA

2023

KELLY COSTA ALVES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS FARMACÊUTICOS BASEADOS
EM HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR (HDL) INTERCALADO COM NIMESULIDA E
ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E INSATURADOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM), do *Campus* Universitário de Ananindeua (CANAN), da Universidade Federal do Pará (UFPA), como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre(a) em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Ferreira de Sousa.

Área de concentração: Caracterização, Desenvolvimento e Aplicação de Materiais.

Linha de pesquisa: Materiais Nanoestruturados

ANANINDEUA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474s Alves, Kelly Costa.
 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS
 FARMACÊUTICOS BASEADOS EM HIDRÓXIDO DUPLO
 LAMELAR (HDL) INTERCALADO COM NIMESULIDA E
 ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E INSATURADOS / Kelly
 Costa Alves. — 2023.
 86 f. : il. color.

 Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Ferreira de Sousa
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
 Campus Universitário de Ananindeua, Programa de Pós-Graduação
 em Ciência e Engenharia de Materiais, Ananindeua, 2023.

 1. nimesulida. 2. HDL. 3. ácido graxo. 4. co-precipitação.
I. Título.

CDD 620.11



**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS
FARMACÊUTICOS BASEADOS EM HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR
(HDL) INTERCALADO COM NIMESULIDA E ÁCIDOS GRAXOS
SATURADOS E INSATURADOS”**

KELLY COSTA ALVES

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS - PPGCEM/UFPA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Data de aprovação: 28/06/2023

Aprovada por:

Documento assinado digitalmente
gov.br FRANCISCO FERREIRA DE SOUSA
Data: 28/06/2023 12:03:35-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

PRESIDENTE: _____
Prof. Dr. Francisco Ferreira de Sousa
Orientador – PPGCEM/UFPA

MEMBROS: _____

Prof. Dr. Waldeci Paraguassu Feio
Examinador Interno – PPGCEM/UFPA

Documento assinado digitalmente
gov.br CRISTIANE BARBIERI RODELLA
Data: 28/06/2023 15:52:38-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profª. Drª. Cristiane Barbieri Rodella
Examinadora Externa – CNPEM

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Ferreira de Sousa pela orientação deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Christiane Barbieri Rodella e Prof. Dr. Waldeci Paraguassu, pela disponibilidade e, principalmente, pelas grandiosas contribuições durante a avaliação deste trabalho;

Ao Professor Dr. Marcos Allan Leite dos Reis, coordenador do Laboratório de Nanoestruturação 3D, Campus Belém, da Universidade Federal do Pará, que compartilhou generosamente os seus conhecimentos em contribuição para o desenvolvimento desta pesquisa e cedeu cordialmente o laboratório para execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Gabriel Adolfo Cabrera Pasca que contribuiu para a realização de alguns experimentos na UFPA, campus de Abaetetuba.

Ao Prof. Dr. Adenilson Oliveira dos Santos, da Universidade Federal de Imperatriz, no Maranhão, pela realização das análises de difração de raio x.

Ao Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Altas Pressões da UFPA (LEVAP/UFPA), coordenado pelo Prof. Dr. Waldeci Paraguassu Feio, pela realização das análises de espectroscopia raman e FT-IR.

Ao Laboratório de Infravermelho, do Centro de Geociências da Universidade Federal do Pará, coordenado pelo Prof. Dr. Rômulo Simões Angélica, que gentilmente colaborou com a realização das análises de densidade.

Aos meus grandes amigos, em especial aos colegas Dhonata Oliveira, Leandro Sena, Luciano Quaresma, Luíza Ferreira, Renata Viana e Natália Valente pelos inúmeros ensinamentos, incentivo, companheirismo e principalmente, por todas as generosas contribuições para o desenvolvimento dessa pesquisa;

Aos pesquisadores e amigos do Programa de Pós-Graduação em Física Profa. Doutoranda Adrya Cordeiro e o Prof. Doutorando Elder Mota pelo apoio incondicional nas análises experimentais e teóricas.

A todos os membros do laboratório Laboratório de Nanoestruturação 3D, pelo incentivo e colaboração diária durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

A Universidade Federal do Pará pela oportunidade de realização deste curso de Pós-Graduação.

Ao meu esposo Filipe Alves Nobre pelo companheirismo, compreensão, apoio e total incentivo durante esta jornada.

Aos meus pais (João Costa Filho e Neusa Miranda Costa) e ao meu irmão (Kleby Miranda Costa) pela torcida, incentivo e força.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

A nimesulida é fármaco não-esteróides (AINES) e apresenta atividade biológica baseada na inibição da enzima Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) durante o processo de inflamação. Todavia, a longo prazo, o uso desse medicamento pode acarretar sérios distúrbios gástricos além de, alta toxicidade em tecidos normais. Para amenizar esses possíveis efeitos, e pensando especificamente para a região amazônica, outras moléculas com propriedades não-esteróides, tem sido buscada, a partir dos óleos amazônicos. Entre elas, estão os ácidos graxos (saturados e insaturados) que podem ser obtidos a partir de óleos amazônicos. Além disso, sistemas de liberação controlada de fármacos têm sido outra alternativa para amenizar os efeitos colaterais além de, aumentar a biodisponibilidade permitindo que dosagens efetivas permaneçam na corrente sanguínea por um intervalo de tempo maior, reduzindo assim, o número de administrações medicamentosa ao paciente. Nesses sistemas, a taxa de liberação do princípio ativo ocorre a partir da matriz que o transporta até seu alvo biológico. Dentro desse contexto, está a matriz híbrida de Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL), obtida por método de coprecipitação. Por essas razões, nesta pesquisa, a nimesulida foi comparada com as propriedades de alguns ácidos graxos saturados e insaturados, isolados. A comparação ocorreu a partir dos estudos de docagem molecular, utilizando moléculas de ácidos graxos como potenciais inibidores da COX-2. Os melhores resultados encontrados para ácidos graxos, foram intercaladas em HDL bem como, a nimesulida, buscando avaliar a partir de suas caracterizações estruturais (DRX), vibracionais (RAMAN) e morfológicas (MEV e MEV-FEG) o mecanismo de ação estrutural-molecular dos ácidos graxos selecionados como possíveis agentes anti-inflamatórios. Os resultados demonstram a influência direta da saturação sobre a intercalação dos ácidos graxos na matriz de HDL. Entre os complexos obtidos, o HDL-ácido mirístico apresentou desempenho estrutural semelhante ao do HDL-nimesulida. E com base em todos os resultados experimentais e teóricos obtidos, propõem-se três novos e inéditos complexos: HDL-Nimesulida, HDL-ácido mirístico e HDL-ácido linoleico como potenciais agentes anti-inflamatórios que precisam ser investigados em testes *in vitro*.

Palavras-chave: nimesulida, HDL, ácido graxo, co-precipitação.

ABSTRACT

Nimesulide is a non-steroidal drug (NSAID) and presents biological activity based on the inhibition of the enzyme Cyclooxygenase-2 (COX-2) during the inflammation process. However, in the long term, the use of this drug can cause serious gastric disorders, in addition to high toxicity in normal tissues. To mitigate these possible effects, and thinking specifically for the Amazon region, other molecules with non-steroidal properties have been sought, from Amazonian oils. Among them are the fatty acids (saturated and unsaturated) that can be obtained from Amazonian oils. In addition, controlled drug release systems have been another alternative to mitigate side effects, in addition to increasing bioavailability, allowing effective dosages to remain in the bloodstream for a longer period of time, thus reducing the number of drug administrations to the patient. In these systems, the release rate of the active principle occurs from the matrix that transports it to its biological target. Within this context, there is the hybrid matrix of double hydroxide layered (HDL), obtained by the coprecipitation method. For these reasons, in this research, nimesulide was compared with the properties of some isolated saturated and unsaturated fatty acids. The comparison was based on molecular docking studies, using fatty acid molecules as potential COX-2 inhibitors. The best results found for fatty acids were intercalated in HDL as well as nimesulide, seeking to evaluate from its structural (DRX), vibrational (RAMAN) and morphological (SEM and SEM-FEG) characterizations the structural-molecular mechanism of action of selected fatty acids as possible anti-inflammatory agents. The results demonstrate the direct influence of saturation on the intercalation of fatty acids in the HDL matrix. Among the complexes obtained, HDL-myristic acid presented a structural performance similar to that of HDL-nimesulide. And based on all the experimental and theoretical results obtained, three new and unprecedented complexes are proposed: HDL-Nimesulide, HDL-myristic acid and HDL-linoleic acid as potential anti-inflammatory agents that need to be investigated in in vitro tests.

Keywords: nimesulide, HDL, fatty acid, co-precipitation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura tridimensional do domínio interlamelar.....	21
Figura 2 – (a) Estrutura química da nimesulida e em (b) identificação dos graus de liberdade da nimesulida responsáveis pelo polimorfismo conformacional da molécula sendo em (c) possibilidade de duas conformações para a forma polimórfica I (azul e rosa) e uma conformação (vermelha) para a forma polimórfica II.....	24
Figura 3 –14 redes de Bravais.....	28
Figura 4 – Representação de uma rede cristalina.....	28
Figura 5 – Plano-polarizado da radiação eletromagnética de comprimento de onda λ propagado no eixo x.....	29
Figura 6 – Espectro eletromagnético identificando os processos de absorção da luz por região.....	30
Figura 7 – Espalhamento da radiação eletromagnética: (a) espalhamento elástico (Rayleigh), (b) espalhamento inelástico (região Stokes) e (c) espalhamento inelástico (região anti Stokes).....	32
Figura 8 –Método de Coprecipitação à pH Constante utilizado para a síntese de HDL.	41
Figura 9 – Método de intercalação para a síntese de HDL-Nimesulida.....	42
Figura 10 – Difrátômetro de raio-x modelo EMPYREAN, da Panalytical.....	44
Figura 11 – LabRAM HR Evolution, Horiba Scientific.....	45
Figura 12 – Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo VEGA 3, da TESCAN Brasil.....	46
Figura 13 – Microscópio Eletrônico De Varredura De Alta Resolução (MEV-FEG), Do Modelo MIRA 3, Da TESCAN.....	47
Figura 14 – Melhores conformações obtidas por cálculos de docagem molecular para o inibidor NPS ((2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid).....	49
Figura 15 – Melhores conformações obtidas por cálculos de docagem molecular para (a) inibidor cristalográfico NPS (re-docagem), (b) nimesulida, (c) ácido mirístico e (d) ácido láurico.....	52
Figura 16 – Melhores conformações obtidas por cálculos de docagem molecular para (e) ácido esteárico, (f) ácido linoleico, (g) ácido linolênico e (h) ácido oleico.....	53
Figura 17 – Padrão de difração de raios X (cristalino) obtido para as amostras de HDL puro, nimesulida pura e o complexo inédito de HDL-nimesulida.....	55

Figura 18 – Padrão de difração de raios X (cristalino) obtido para as amostras de HDL puro, ácido tetradecanóico puro e o complexo inédito de HDL- tetradecanóico...	56
Figura 19 – Padrão de difração de raios X (cristalino) obtido para as amostras de HDL puro, HDL-Ácido Linolênico, HDL-Ácido Linoleico e HDL-Ácido Oleico.....	58
Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em (a) Superfície da matriz cerâmica de HDL-Mg/Al; (b) Nimesulida formando placas irregulares; (c) HDL-Nimesulida formando aglomerados elípticos e filamentos alongados irregulares.....	60
Figura 21 – (a) Fotografia do complexo HDL-Ácido Tetradecanóico (b), identificação dos aglomerados de fios alongados e muito finos, em ampliação de 814x (c) novelos de fios aglomerados em 726x (d) novelos de fios recobertos pela camada de HDL, em 1,47kx (e) região de transição tracejada identificando a camada de HDL recobrindo os fios, em 561x (f) ampliação da região tracejada em (e), com ampliação de 2,80kx.....	61
Figura 22 – (a) Fios alongados superficiais presentes na amostra HDL- Ácido Linolênico ($\omega 3$) (b), identificação do comprimento de fio alongado e fino presente na superfície do HDL- $\omega 3$; (c) crescimento do fio a partir do bulbo presente na superfície da amostra de HDL- $\omega 3$	62
Figura 23 – (a) Ausência de fios alongados superficialmente na amostra HDL- Ácido Linolênico ($\omega 3$) (b), identificação de morfologia interna diferente da sua superfície do HDL- $\omega 3$; (c) presença de formas arredondadas, quadradas e tubulares presentes na morfologia interna do HDL- $\omega 3$; (d) superfície irregular e morfologicamente heterogênea.....	63
Figura 24 – FEG da amostra HDL- Ácido Linolênico ($\omega 3$) (a) em magnificação de 1,38kx, com formas quadradas de diferentes dimensões (b) em 4,07kx, identificação de formas quadradas entre 8 e 9 μm ; (c) formas quadradas em ampliação de 2,77kx com variações de 12,37 μm e fio tubular; (d) superfície irregular e morfologicamente heterogênea com forma retangular de comprimento.....	64
Figura 25 – FEG da amostra HDL-ácido linoleico ($\omega 6$) (a) em magnificação de 1,38kx, evidenciando aglomerados finos distribuídos uniformemente em toda sua superfície (b) em 2,77kx, distribuição homogênea de formas tubulares.....	65
Figura 26 – MEV da amostra HDL-ácido oleico ($\omega 9$) (a) em magnificação de 1,38kx, evidenciando aglomerados finos distribuídos uniformemente em toda sua superfície (b) em 2,77kx, distribuição homogênea de formas tubulares.....	66

Figura 27 – Espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor laranja) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor verde).....	67
Figura 28 – (a) Identificação dos modos vibracionais RAMAN da primeira região dos espectros de 40 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} , obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor laranja) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor verde).....	68
Figura 29 – Ampliação (b) dos modos vibracionais RAMAN da primeira região dos espectros de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} , obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor laranja) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor verde).....	69
Figura 30 – Identificação (c) dos modos vibracionais RAMAN da segunda região dos espectros de 2800 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} , obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor verde) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor laranja).....	70
Figura 31 – Espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), ácido mirístico (cor preta) e o complexo inédito de HDL-ácido mirístico (cor vermelho).....	71
Figura 32 – Espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), ácido linoléico (cor preta) e o complexo inédito de HDL-ácido linoleico (cor vermelha).....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura dos ácidos graxos utilizados nesta pesquisa.....	25
Tabela 2 – Estruturas dos ácidos graxos utilizados nesta pesquisa.....	26
Tabela 3 – Valores de energia de afinidade (kcal/mol) para as moléculas de ácidos graxos saturados e insaturados.....	50

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

HDL	Hidróxidos Duplos Lamelares
AINES	Fármacos antiinflamatórios não-esteróides
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase -2
PGE	Prostaglandinas
DRX	Difração de Raio-X
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
Raman	Espectroscopia Vibracional Raman
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Alta Resolução
HDL NMs	Nanomateriais hidróxidos duplos lamelares
AGs	ácidos graxos
MVD	<i>Molegro Virtual Docker</i>
DE	Evolução Diferencial
PLP	potencial linear por partes
PDB	Protein Data Bank
NPS	(2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid
VMD	Visual Molecular Dynamics
$\omega 3$	ácido Linolênico
$\omega 6$	ácido linoleico
$\omega 9$	Ácido Oleico
ARG	arginina
ASP	aspartato
TYR	tirosina
CYS	cisteína
ASN	asparagina
LYS	lisina
GLU	glutamato
GLN	glutamina
LEU	leucina

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	09
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Objetivos.....	19
1.1.1 Objetivo Geral.....	19
1.1.2 Objetivos Específicos.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL).....	20
2.2 Moléculas intercaladas na matriz HDL.....	22
2.2.1 Nimesulida.....	22
2.2.2 Ácidos Graxos.....	24
2.3 Técnicas de Caracterização – Fundamentação Teórica.....	27
2.3.1 Difração de raio x.....	27
2.3.2 Espectroscopia Vibracional.....	29
2.3.3 Microscopia Eletrônica.....	33
2.3.4 Docagem Molecular (<i>Molecular Docking</i>).....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Síntese de Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) pelo método de coprecipitação a pH constante.....	39
3.2 Intercalação de Nimesulida em Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) pelo método de coprecipitação a pH constante.....	41
3.3 Intercalação dos Ácidos Graxos em Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) pelo método de coprecipitação a pH constante.....	42
3.4 Técnicas de caracterização.....	43
3.4.1 Difração de raio x (DRX).....	43
3.4.2 Espectroscopia Vibracional Raman.....	44
3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	46
3.4.4 Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG).....	47

3.4.5 Docagem Molecular (<i>Molecular Docking</i>).....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Docagem Molecular (<i>Molecular Docking</i>).....	49
4.2 Difração de raio x.....	54
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Alta Resolução (MEV-FEG).....	59
4.4 Espectroscopia Vibracional Raman.....	66
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXO A	85
ANEXO B	86

1 INTRODUÇÃO

Materiais compósitos apresentaram maior visibilidade comercial a partir dos anos de 1980, com crescente aumento no desenvolvimento de pesquisa de ponta, por suas propriedades de funcionamento conservadas e distintas de seu precursor mesmo após execução de etapas do processamento. Com isso, indústrias tem explorado cada vez mais aspectos de adesão entre os componentes desses produtos uma vez que, as cargas presentes podem ser transferidas para elementos de maior resistência mecânica, como a matriz de um compósito (FERRANTE, 2013).

A compreensão de material compósito permeia-se no entendimento de um material multifásico, obtido a partir da mistura de dois ou mais materiais de natureza distinta, os quais podem exibir propriedades únicas, a partir da combinação de ambas as propriedades de seus constituintes individuais (TANG, 2017).

Um compósito apresenta ao menos duas fases quimicamente diferentes denominadas de matriz e reforço. A matriz é a fase contínua e possui a função de aglutinar reforços e distribuir ou transferir carregamentos ou tensões aplicadas ao material onde essas matrizes podem ser metálicas, cerâmicas ou poliméricas.

As matrizes cerâmicas por sua vez, são materiais inorgânicos, usados pelo homem desde os tempos pré-históricos. Um material cerâmico pode ser um sólido cristalino com propriedades dependentes do arranjo estrutural, dimensão, orientação dos grãos, e dos poros presentes em seus componentes, por exemplo (BIASOTTO, 1991).

A compreensão estrutural de materiais cerâmicos, do tipo hidrotalcita, tem sido alvo de pesquisas relacionadas às diversas aplicações como em sistemas biológicos de liberação controlada (CAVANI, 1991). Esses sistemas de liberação sustentada de fármacos permitem que uma dosagem efetiva permaneça na corrente sanguínea por um intervalo de tempo maior, reduzindo assim, o número de administrações medicamentosa ao paciente. Isto requer uma baixa liberação do princípio ativo a partir da matriz que o transporta (GUNAWAN & XU, 2008).

Nesse contexto, hidróxidos duplos lamelares (HDL) vêm sendo utilizado como matrizes híbridas para alojar moléculas com atividade farmacológica objetivando sua proteção e, conseqüentemente, sua indesejada degradação rápida e descontrolada (BI, ZHANG, & DOU, 2014). Trata-se de materiais constituídos por camadas positivamente carregadas por hidróxidos mistos de metais divalentes e trivalentes com ânions hidratados intercalados no domínio interlamelar (LIU, & ZHANG. 2014).

Esses nanomateriais hidróxidos duplos lamelares (HDL NMs) modificados e funcionalizados como nanoestruturas bio-inorgânicas apresentam aplicabilidade em sistemas

“*drug delivery*”, podendo carrear biomoléculas fotoativas, com consequente aumento de estabilidade sistêmica e biodisponibilidade (REJINOLD, *et al.*, 2022). Além disso, mostram-se cada vez mais eficazes na engenharia de tecidos possibilitando a fabricação de biomateriais biocompatíveis, com diminuição de efeitos citotóxicos especialmente, quando comparado ao uso de medicamentos puros (ZANIN, *et al.*, 2022).

No caso de fármacos não-esteróides (AINES), a combinação com matrizes híbridas nanocarreadoras possibilitaria o controle na liberação além da possibilidade de aumento da solubilidade do fármaco, independente do valor de pH, quando comparado com a solubilidade do fármaco puro (PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; DI NAUTA, L. *et al.*, 2011).

O aumento da solubilidade aquosa de fármacos, pouco solúveis em meio aquoso, é um dos fatores importantes para a melhoria da absorção e a obtenção de uma biodisponibilidade oral adequada (JAGDALE; JADHAV1 & KUCHEKAR, 2012). Além disso, estudos mostram que misturar o fármaco com o HDL aumenta a solubilidade do fármaco, quando comparado à solubilidade do mesmo puro, independentemente do valor de pH. Isso torna-se interessante a fim de observar a ação da intercalação sobre a solubilidade do fármaco num meio gástrico (pH 1,2) (PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; DI NAUTA, L. *et al.*, 2011).

A nimesulida possui nome químico de 4-nitro-2-fenoximetano-sulfonânida e, é um fármaco não-esteróides (AINES) apresentando ação anti-inflamatória, sendo sua atividade biológica baseada na inibição da enzima Ciclooxygenase de ácidos graxos (COX) bem como, na redução da atividade dos neutrófilos. Enzima esta, que contém duas isoformas comuns: Ciclooxygenase-1 e Ciclooxygenase -2 (COX-1 e COX-2, respectivamente) (VANE; BOTTING, 2001).

Porém, nos últimos anos, tem-se questionado o uso prolongado de AINEs como inibidores seletivos da prostaglandinas PGE2-, especialmente COX-2, em razão de efeitos adversos importantes na mucosa gástrica e na fisiologia renal, podendo culminar com o aparecimento de úlcera gástrica e disfunção renal, o que levou à retirada de alguns desses fármacos do mercado (BATLOUNI, 2010). Além disso, evidências também apontam aumento do risco cardiovascular, insuficiência renal, acidente vascular cerebral, e hipertensão arterial (DANNHARDT; KIEFER, 2001).

Como solução para este problema, sugere-se a obtenção de um novo complexo HDL-nimesulida, onde a escolha da matriz de HDL do tipo hidrotalcita, baseou-se em resultados *in vitro* que comprovaram propriedades antiácidas superiores da combinação dos metais de magnésio e alumínio quando comparada a outros materiais, sendo justificada pela elevada

capacidade de ligação com o ácido biliar taudesoxicólico; o qual é um ácido biliar lipofílico associado à toxicidade celular (MIEDERER, *et al.*, 2003).

Dessa forma, ao intercalar a nimesulida em HDL, é possível que ocorra uma melhora de solubilidade, o que pode acarretar um papel chave na eficácia terapêutica de liberação, absorção e biodisponibilidade do fármaco, pois, matrizes de HDL como esta, são capazes de atuar como carreadora de fármaco/molécula para o alvo biológico sendo responsável pela sua proteção e atuando especificamente em sistemas de liberação controlada (*Controlled Drug Delivery Systems*) o que possibilita aumento de biodisponibilidade proporcional ao efeito farmacológico e diminuição de citotoxicidade (RADU, 2023).

Por isso, este trabalho sugere que essa matriz poderia proteger a nimesulida de degradação rápida e descontrolada, quando em contato com o ácido biliar taudesoxicólico uma vez que, complexos sintetizados de forma semelhante demonstraram resultados satisfatórios tanto no controle de liberação quanto na diminuição de lesões gástricas, etc (BINI, *et al.*, 2019).

Até o momento, não existe na literatura nenhum trabalho que demonstre a intercalação de da nimesulida em matrizes híbridas de Magnésio e Alumínio (Mg/Al-HDL) na rota sintética de intercalação por coprecipitação proposta nesse trabalho. Além disso, não há um estudo comparativo do complexo intercalado HDL-nimesulida com outros complexos contendo moléculas com propriedades não-esteróides (AINES) como óleos amazônicos.

Por isso, esta pesquisa buscou moléculas com propriedades não-esteróides dentro do contexto da região Amazônica, onde se encontra a maior biodiversidade do mundo. Dentre essa diversidade animal e vegetal vários frutos dessa região fornecem uma diversidade gigantesca de óleos ricos em ácidos graxos (AGs). Os AGs são provenientes em grande quantidade, principalmente, de óleos vegetais e gorduras animais e o consumo desses óleos acarreta em forte impacto na economia local (AMARAL, *et al.*, 2011).

Os ácidos graxos podem ser saturados e insaturados e estudos apontam que muitos óleos amazônicos, com propriedades medicinais anti-inflamatórias, contêm ácidos graxos (SILVA, *et al.*, 2009). Por essa razão, esta pesquisa comparou as propriedades de alguns ácidos graxos saturados e insaturados, com a nimesulida, a partir dos estudos de docagem molecular, como potenciais inibidores da enzima ciclooxigenase – COX2. E a partir dos melhores resultados encontrados entre os ácidos graxos, estas moléculas foram intercaladas em matrizes de hidróxidos duplos lamelares (HDL) bem como, a nimesulida, buscando avaliar a partir de suas caracterizações estruturais, vibracionais e morfológicas o mecanismo de ação estrutural-molecular dos ácidos graxos selecionados como possíveis agentes anti-inflamatórios.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Produção de complexos farmacêuticos intitulado HDL-nimesulida, HDL-ácido mirístico e HDL-ácido linoleico obtido a partir da intercalação das moléculas puras na matriz cerâmica de hidróxido duplo lamelar (HDL).

1.1.2 Objetivos Específicos

Realizar cálculos de Docagem molecular na nimesulida e comparar com os resultados obtidos com as moléculas de ácidos graxos saturados (ácido láurico, ácido esteárico e ácido mirístico) e insaturados (ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico), como potenciais inibidores para a enzima ciclooxygenase – COX2.

Sintetizar Hidróxido Duplos Lamelares (HDL) em fração molar $x = \text{Al}/(\text{Mg}+\text{Al})$ equivalente a 0,333 e intercalar o fármaco nimesulida, bem como as moléculas de ácido mirístico e ácido linoleico na matriz de HDL, no tempo de 16 horas e em pH constante 10, utilizando o método de coprecipitação.

Caracterizar morfológica, estruturalmente e vibracionalmente os sistemas híbridos HDL-nimesulida, HDL-ácido mirístico e HDL-ácido linoleico por meio de técnicas de Difração de Raio-X (DRX), Espectroscopia Raman e Microscopia Eletrônica de varredura e de Alta Resolução (MEV-FEG).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL)

Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs), são um tipo de material cerâmico inorgânico híbrido, com estrutura semelhante à brucita $[Mg(OH)_2]$ e que apresenta notável propriedade, dentre elas, a capacidade de intercalação/liberação de fármacos (CREPALDI; PAVAN; VALIM, 2000; KHAN; LEI; NORQUIST, *et al*, 2001).

Trata-se de matrizes cerâmicas híbridas inorgânicas que, atuam como sistemas de liberação controlada de fármacos (*drug delivery systems*). Quando sintetizadas organizam-se formando estruturas capazes de alojar moléculas com atividade farmacológica, o que aumenta a proteção do princípio ativo possibilitando o seu redirecionamento clínico para local alvo com proporcionando maior biodisponibilidade e baixa toxicidade, oportunizando assim, uma diminuição dos efeitos colaterais nos pacientes (SHIRIN; SANKAR; JOHNSON, *et al.*, 2021).

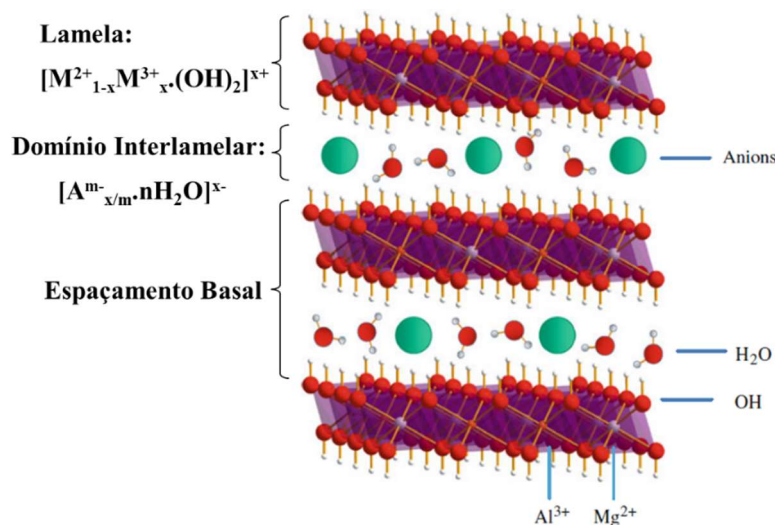
O aumento da biodisponibilidade ocorre em razão dessas matrizes permitirem a liberação controlada da droga em uma dosagem efetiva na corrente sanguínea, por um intervalo de tempo maior, assim, permitindo assim a redução do número de administrações medicamentosas durante o tratamento (GUNAWAN, XU, 2008).

Nesses materiais a substituição dos cátions divalentes por trivalentes possibilita um rearranjo estrutural lamelar capaz de intercalar no espaço interlamelar ânions e moléculas de água (Figura 1). Trata-se um arranjo estrutural lamelar ordenado formado ligações de hidrogênio, por forças fracas do tipo van der Waals, e ligações eletrostáticas pois, as lamelas são carregadas positivamente e negativamente por ânions. Nesse contexto, tais propriedades elétricas permitem a intercalação apenas de moléculas carregadas (MILLS *et al.*, 2012).

As lamelas são unidas por interações fracas de van der Waals e a área de interações fracas entre as lamelas é denominada espaço interlamelar ou lacuna de van der Waals (MARANGONI, 2009). Por esta razão, espécies como íons, átomos ou moléculas podem ser intercaladas neste espaço interlamelar (RAJAMATHI, THOMAS & KAMATH, 2001; ARIZAGA, MANGRICH, GARDOLINSKI & WYPYCH, 2008).

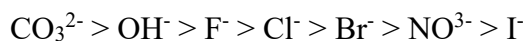
Dessa forma, o sistema passa adquirir eletroneutralidade necessária pela presença de ânions entre as lamelas, que juntamente com moléculas de água promovem o empilhamento das camadas do hidróxido duplo no domínio interlamelar. Neste caso, as lamelas são mantidas juntas não apenas por ligações de hidrogênio, mas pela atração eletrostática entre as lamelas positivamente carregadas e os ânions interlamelares (CREPALDI; PAVAN & VALIM, 2000).

Figura 1. Estrutura tridimensional do domínio interlamelar



Fonte: Hesse, Badar, Bleich, *et al.*, 2013.

Tais ânions facilmente demonstram capacidade de estabilizar a estrutura lamelar seguindo uma sequência de interação com a camada lamelar e consequente, facilidade de intercalação:



Essa sequência demonstra a ordem de prioridade de intercalação no processo de troca iônica. Com isso, os materiais que possuem como ânion interlamelar o carbonato, no caso da hidrotalcita, não apresentam tanta eficiência nos processos de troca iônica, uma vez que estes tornam as lamelas estáveis. Já os HDL's intercalados com nitrato ou cloreto, são satisfatoriamente, empregados objetivando facilitar o processo de troca aniônica durante o processo de intercalação (TSUJI; MAO; TAMAURA, 1992).

Regularmente, a capacidade total de troca iônica é superior quanto maior a densidade de carga e melhor for a cristalinidade do HDL (CAVANI, 1991). Porém, a escolha do método afeta diretamente na formação das matrizes de HDL uma vez que fatores como a velocidade de titulação na precipitação dos metais podem induzir na formação de óxidos. Bem como, as concentrações das soluções influenciam nas propriedades morfológicas (forma, porosidade e área superficial do material)". (BENÍCIO, *et al.* 2015).

O pH é um parâmetro importante para a troca iônica, uma vez que a camada lamelar do HDL precisa ser estável a um determinado pH, sendo, compatível com a faixa de estabilidade do HDL precursor e com o ânion. Assim, o pH da solução favorece ou não a troca iônica na solução (MIYATA, 1983).

Dentro desse contexto, as matrizes híbridas de hidróxidos duplos lamelares (HDL) são cerâmicas inorgânicas que vêm sendo cada vez mais utilizadas como sistemas de liberação

controlada de fármacos, pois são capazes de alojar moléculas com atividade farmacológica, o que aumenta sua proteção possibilitando um redirecionamento clínico para local alvo com maior biodisponibilidade e baixa toxicidade, oportunizando assim, uma diminuição dos efeitos colaterais nos pacientes (Shirin, *et al*, 2021).

Essas matrizes permitem o transporte de um fármaco e são responsáveis pela liberação controlada do princípio ativo, permitindo que uma dosagem efetiva seja estabelecida na corrente sanguínea por um intervalo de tempo maior, assim, reduzindo o número de administrações medicamentosas (Gunawan, *et al*, 2008).

Além disso, matrizes inorgânicas de HDL intercaladas com fármacos não-esteróides (AINES) têm mostrado resultados promissores quanto ao aumento de solubilidade do fármaco, independente do valor de pH, quando comparado com a solubilidade do fármaco puro. Esse incremento do critério avaliativo de solubilidade é atribuído à uma provável perda de cristalinidade do fármaco quando associado com uma matriz de HDL porém, mesmo estando amorfo, o produto sintetizado tem uma maior solubilidade quando comparado com o mesmo na fase cristalina (Perioli, *et al*, 2011).

Esse aumento de solubilidade aquosa de fármacos, antes pouco solúveis em meio aquoso, é um dos fatores mais importantes para a melhoria da absorção e obtenção de uma biodisponibilidade oral adequada (Jagdale, *et al*, 2012).

Em princípio, a biodisponibilidade de um determinado fármaco no local de ação desejado é diretamente proporcional à intensidade do efeito farmacológico (DONG, *et al*, 2015).

É nesse aspecto que sistemas de liberação controlada de fármacos (*Controlled Drug Delivery Systems*) utilizando materiais cerâmicos inorgânicos, como os HDLs, têm sido utilizado. Trata-se de materiais lamelares constituídos de camadas positivamente carregadas a partir de um hidróxido misto de metais di e trivalentes, com unidades aniônicas hidratadas intercaladas no domínio interlamelar (BARAHUIE, *et al*, 2014).

2.2 Moléculas intercaladas na matriz HDL

2.2.1 Nimesulida

Nimesulida (N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida) é um medicamento do grupo das metanossulfonilida prescrito como anti-inflamatório não-esteroidal, possui baixa solubilidade, alta permeabilidade e biodisponibilidade oral variável devido à sua baixa solubilidade. Trata-se de um medicamento com atividade antiinflamatório, antiproliferativa e

capaz de induzir apoptose celular (VUNNNAM, *et al.*, 2023). Além disso, sua atividade biológica também está baseada na inibição da enzima Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (GÜLSÜN, *et al.*, 2013).

A Ciclooxigenase (COX) é a enzima alvo do processo inflamatório, de curto ou longo período, em resposta a proteção do organismo contra infecções (CARTER *et al.*, 2014; WINDISOR *et al.*, 2014). Trata-se de uma enzima responsável pela formação de importantes mediadores biológicos chamados prostanóides: que incluem prostaglandinas, e tromboxanos. Dentre esses, as prostaglandinas (PGs) são originadas a partir do ácido araquidônico e caracterizam a COX-2 como uma enzima indutível, pois, sua expressão é aumentada em processos inflamatórios (KLIPPEL *et al.*, 2001).

A inibição da COX2 pela produção e liberação de mediadores com propriedades anti-inflamatórias reduz o processo inflamatório (PINHEIRO *et al.*, 2013). Para isso, quantidades significativas de AINES, vem sendo administrados objetivando reduzir a síntese das PGs e consequentemente diminuir a intensidade do processo inflamatório (DUGGAN *et al.*, 2010). De acordo com as funções fisiológicas da COX, indica-se que possíveis AINES inibidores específicos da COX-2 impedem o processo inflamatório sem causar os efeitos colaterais gástricos resultantes da inibição da COX-1 reduzindo o processo de inflamação (DUGGAN *et al.*, 2010).

Estudos demonstram que a atividade da COX -2 é inibida pelos glicocorticóides, o que explicaria os seus efeitos anti-inflamatórios (VECCHIO *et al.*, 2011).

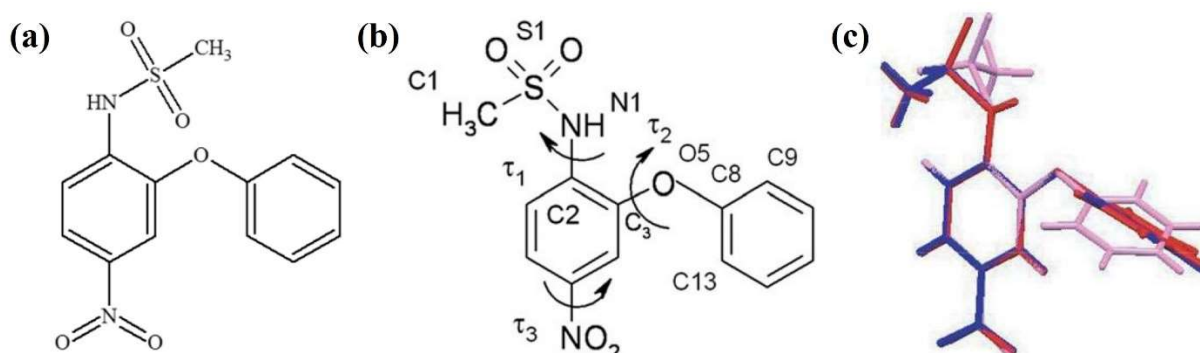
Trata-se de um inibidor seletivo da COX onde ações anti-inflamatórias, antipirética e analgésica decorrem da inibição sobre a COX-2, enquanto os efeitos indesejáveis são resultantes da inibição da COX-1. Seus principais efeitos colaterais são disfunção plaquetária, comprometimento renal, dispepsia, dor abdominal, sangramento, úlcera e perfuração gástrica ou duodenal e broncoespasmo (KULKARNI, *et al.*, 2000).

Sua estrutura química (figura 2) apresenta registro de duas formas polimórficas distintas: Forma I e Forma II (RUELA, *et al.*, 2009; SANPHUI, *et al.*, 2011). Com destaque para a importância em sua investigação uma vez que, alterações polimórficas podem afetar a velocidade de dissolução de uma droga, com consequências diretas no teor de biodisponibilidade e estabilidade do material comercializado (REJINOLD, *et al.*, 2022; SILVEIRA, *et al.*, 2019).

Até o momento, não existe na literatura nenhum trabalho que demonstre a intercalação da nimesulida em matrizes híbridas de Magnésio e Alumínio (Mg/Al-HDL), na rota sintética de intercalação por coprecipitação, em um tempo de maturação de cristais em 16 horas, conforme proposta nesse trabalho. Além disso, não há um estudo comparativo do complexo intercalado

HDL-nimesulida com outros complexos contendo moléculas com propriedades não-esteróides (AINES) como óleos amazônicos.

Figura 2 – (a) Estrutura química da nimesulida e em (b) identificação dos graus de liberdade da nimesulida responsáveis pelo polimorfismo conformacional da molécula sendo em (c) possibilidade de duas conformações para a forma polimórfica I (azul e rosa) e uma conformação (vermelha) para a forma polimórfica II.



Fonte: RUELA, *et al.*, 2009; SANPHUI, *et al.*, 2011.

2.2.2 Ácidos Graxos

Esta pesquisa buscou investigar moléculas com propriedades não-esteróides dentro do contexto da região Amazônica, onde se encontra a maior biodiversidade do mundo. Dentre essa diversidade animal e vegetal vários frutos dessa região fornecem uma diversidade gigantesca de óleos ricos em ácidos graxos (AGs). Os AGs são provenientes em grande quantidade, principalmente, de óleos vegetais e gorduras animais e o consumo desses óleos acarreta em forte impacto na economia local (AMARAL, *et al.*, 2011).

Ácidos graxos (AG) são substâncias orgânicas formadas por cadeias carbônicas longas, contendo um grupo metílico (CH₃) ocupando uma das extremidades da cadeia e um grupo carboxílico (COOH) (monocarboxílico) disposto na outra. Os ácidos graxos podem ser saturados (ligações simples, ou seja, ligações σ ou sp^3) e insaturados (ligações duplas, isto é, ligações π ou sp^2), podendo ser classificados como monoinsaturados (oléico) e polinsaturados (linoléico e linolênico) (SOUSA, *et al.*, 2016). Os ácidos graxos insaturados, por sua vez, podem ser monoinsaturados (contém apenas uma insaturação em sua cadeia carbônica) ou poli-insaturados (possuir duas ou mais insaturações). Por essa razão, todos os ácidos graxos saturados apresentam

cadeia linear enquanto que, os ácidos graxos insaturados podem mostra-se com isomeria cis-trans em suas ligações (GUNSTONE, 2005).

A nomenclatura adotada, para esses compostos, pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (UIQPA), do inglês IUPAC (International Union Pure Applied Chemistry), em alguns casos, não revela informações estruturais dos AG. Por essa razão, a identificação desses compostos baseia-se geralmente, no Comprimento Equivalente da Cadeia (CEC), do inglês ECL (*Equivalent Chain Length*) (VISENTAINER, *et al.*, 2006). Dessa maneira, a diferença entre eles pode ser representada de forma simplificada pelo número de átomos de carbono e pelo grau de insaturação, indicando o número de duplas ligações presentes em sua cadeia. Com isso, especificamente, para ácidos graxos insaturados, a posição da dupla ligação é indicada, na cadeia, pela numeração a partir do grupo carboxila, estando numerado apenas o átomo de carbono de número mais baixo de cada par de carbonos que constituem a dupla ligação. Assim, as posições das duplas são identificadas pelo menor número e, em seguida, sobrescritas após a quarta letra do alfabeto grego delta (Δ) (RUSTAN, *et al.*, 2005)

A grande maioria desses compostos compõem unidades fundamentais de lipídios, onde lipídios, por definição, são substâncias oleosas (líquidos) e ou gorduras (sólidos) de origem animal ou vegetal, sendo que os óleos são oriundos de ácidos graxos insaturados e as gorduras de ácidos graxos saturados (VISENTAINER, *et al.*, 2006).

Nesta pesquisa os ácidos graxos saturados e insaturados que foram utilizados estão dispostos na tabela 1, abaixo relacionada.

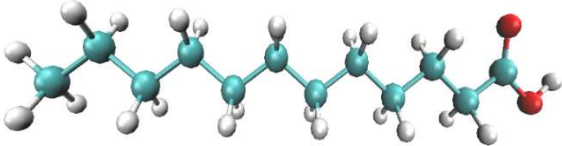
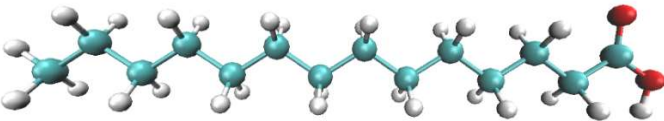
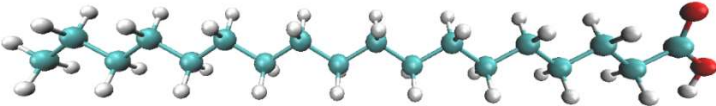
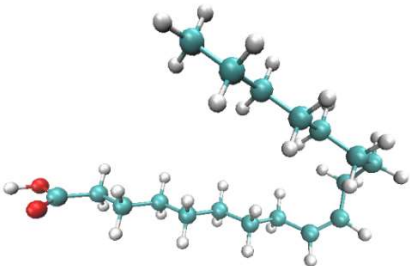
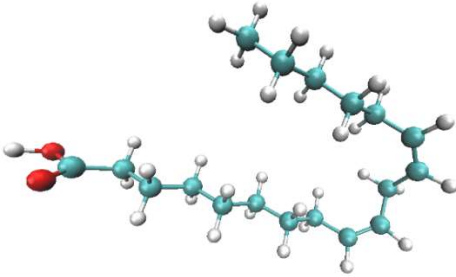
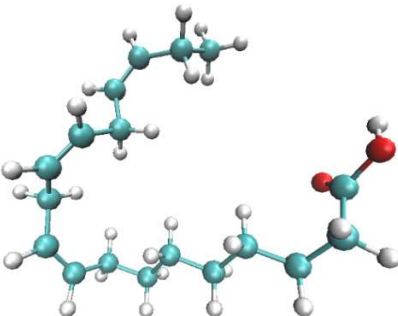
Tabela 1 - Nomenclatura dos ácidos graxos utilizados nesta pesquisa.

Δ - Característica	Fórmula molecular	Ponto de Fusão (°C)	Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual
12:0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	44,2	Ácido dodecanóico	Ácido Láurico
14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	53,9	Ácido tetradecanóico	Ácido Mirístico
18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	69,6	Ácido octadecanóico	Ácido Estearico
18:1n-9 ; ω -9	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	16	Ácido 9-octadecanóico	Ácido Oleico
18:2n-6 ; ω -6	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	5,0	Ácido 9,12- octadecadienóico	Ácido Linoléico (LA)
18:3n-3 ; ω -3	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-5,0	Ácido 6,9,12- octadecatrienóico	Ácido α - Linolênico

Fonte: Adaptada de Scrimgeour e Harwood, 2007; MAHAN, *et al.*, 2005; GUNSTONE, 2005.

A estrutura de cada um desses ácidos está representada na Tabela 2.

Tabela 2 - Estruturas dos ácidos graxos utilizados nesta pesquisa.

Nomenclatura usual	Estrutura
Ácido Láurico	
Ácido Mirístico	
Ácido Estearico	
Ácido Oleico	
Ácido Linoléico (LA)	
Ácido Gama-Linolênico	

Fonte: Próprio autor.

2.3 Técnicas de Caracterização – Fundamentação Teórica

2.3.1 Difração de raio x

Um cristal é um arranjo estrutural de átomos combinados e, organizados de maneira periódica infinita (no espaço tridimensional), de uma unidade básica. Sendo que a palavra “periódico” está relacionada com “intervalos de repetição regulares”. E essa repetição regular é baseada em padrões periódicos que se repetem tridimensionalmente (GIROLAMI, 2016). Assim, os cristais estão arranjados seguindo um padrão repetido, pelo interior do cristal, em três dimensões (MEYERS, 1982).

Tal repetição tridimensional ocorre em razão da coordenação atômica presente no interior do material, a qual, em alguns materiais pode influenciar na forma externa como esse cristal se apresenta. É o caso da simetria hexagonal presente em flocos de neve (VAN VLACK, 2015).

No que tange a designação de “unidade básica”, já mencionada anteriormente, estas podem ser além de átomos individuais, grupos de átomos, moléculas, íons etc (ASCROFT, 2011). E a forma como esses arranjos estruturais se posicionam em um padrão tridimensional repetitivo, ao longo de grandes distâncias atômicas (periodicidade; ordem de longo alcance) define a especificidade de sua rede cristalina, que por sua vez, é oriunda da maneira que cada átomo está ligado à sua vizinhança (CALLISTER, 2016).

Dessa forma, o conceito de rede cristalina consiste em um conjunto estrutural ou arranjo atômico de grupamentos de cristais onde, cada cristal é uma repetição infinita de grupos idênticos de átomos, moléculas, íons etc. Já o conceito de retículo faz referência apenas a repetição de pontos do retículo onde cada ponto corresponde a átomos (MEYERS, 1982; KITELL, 2016; ASCROFT, 2011). Sendo que, o tipo de rede pode ser definido por seus vetores de translação (a_1 , a_2 e a_3) de tal forma que no cristal um ponto r pode ser visto de igual forma em um ponto r' transladado em relação ao a de um múltiplo inteiro de vetores translação (KITELL, 2016; ASCROFT, 2011):

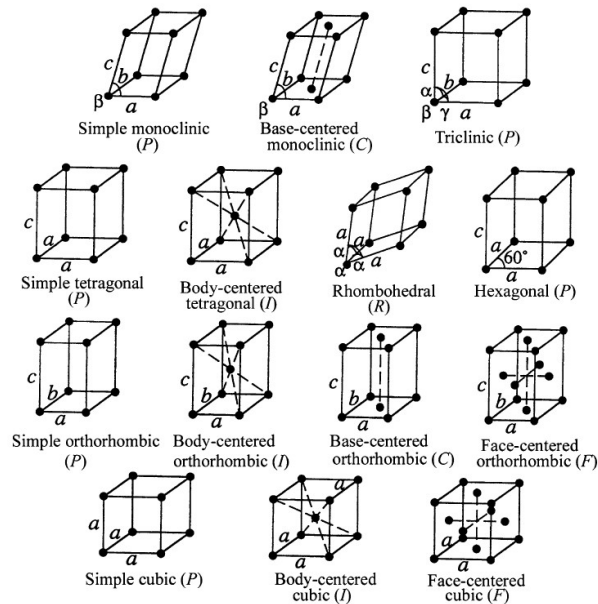
$$r' = r + u_1 a_1 + u_2 a_2 + u_3 a_3$$

* Constantes u_1, u_2, u_3 são números inteiros quaisquer (KITELL, 2016).

Com isso, a rede cristalina é definida por um conjunto de pontos r' e, definidos por translações determinadas pelos vetores; para todos os valores possíveis de u_1, u_2, u_3 (KITELL, 2016). Dentro desse contexto, existem 14 formas de arranjar esses pontos de rede em três

dimensões: são as 14 redes de Bravais; que recebem esse nome em homenagem a Auguste Bravais (1811-1863) e estão mencionada na figura 3 (ASKELAND, 2016).

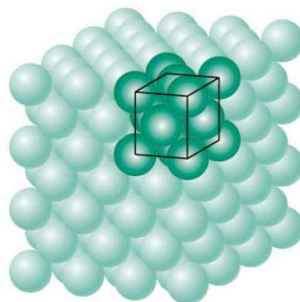
Figura 3 - 14 redes de Bravais.



Fonte: Waseda, 2011.

Assim, cada ponto da rede apresenta a mesma quantidade de vizinhos próximos, e por conta de sua natureza periódica, esse número (valor) transforma-se em uma propriedade sendo chamada de número de coordenação da rede. Além disso, o volume de espaço transladado por todos os vetores da rede capaz de representar a menor porção periódica, de uma estrutura cristalina, é denominado de célula unitária. Com isso, quando essa menor unidade de repetição individual for transladada e duplicada, por exemplo, ela irá ser capaz de reproduzir a estrutura cristalina completa e isso pode ser melhor apresentado na Figura 4 (ASCROFT, 2011; ASKELAND, 2016).

Figura 4 – Representação de uma rede cristalina.



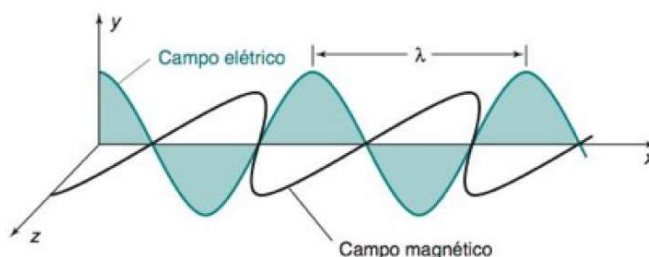
Fonte: CALLISTER, 2016.

Nessa figura 4, os átomos são representados por esferas sólidas iguais. Nesse exemplo, átomos próximos se tocam e juntos formam uma rede cristalina arranjada tridimensionalmente, onde em destaque está a representatividade de uma célula unitária de um cristal por ser um padrão repetitivo.

2.3.2 Espectroscopia Vibracional

A luz pode ser caracterizada tanto como partícula quanto como onda constituídas por campos magnéticos e elétricos oscilantes, perpendicularmente orientados (Figura 5). Nessa figura, o campo elétrico está no plano xy e o campo magnético no plano xz. O comprimento de onda por sua vez, entende-se como a distância entre os máximos. Assim, a frequência será o número de oscilações completas realizadas por segundo pela onda (HARRIS, 2012).

Figura 5 – Plano-polarizado da radiação eletromagnética de comprimento de onda λ propagado no eixo x.

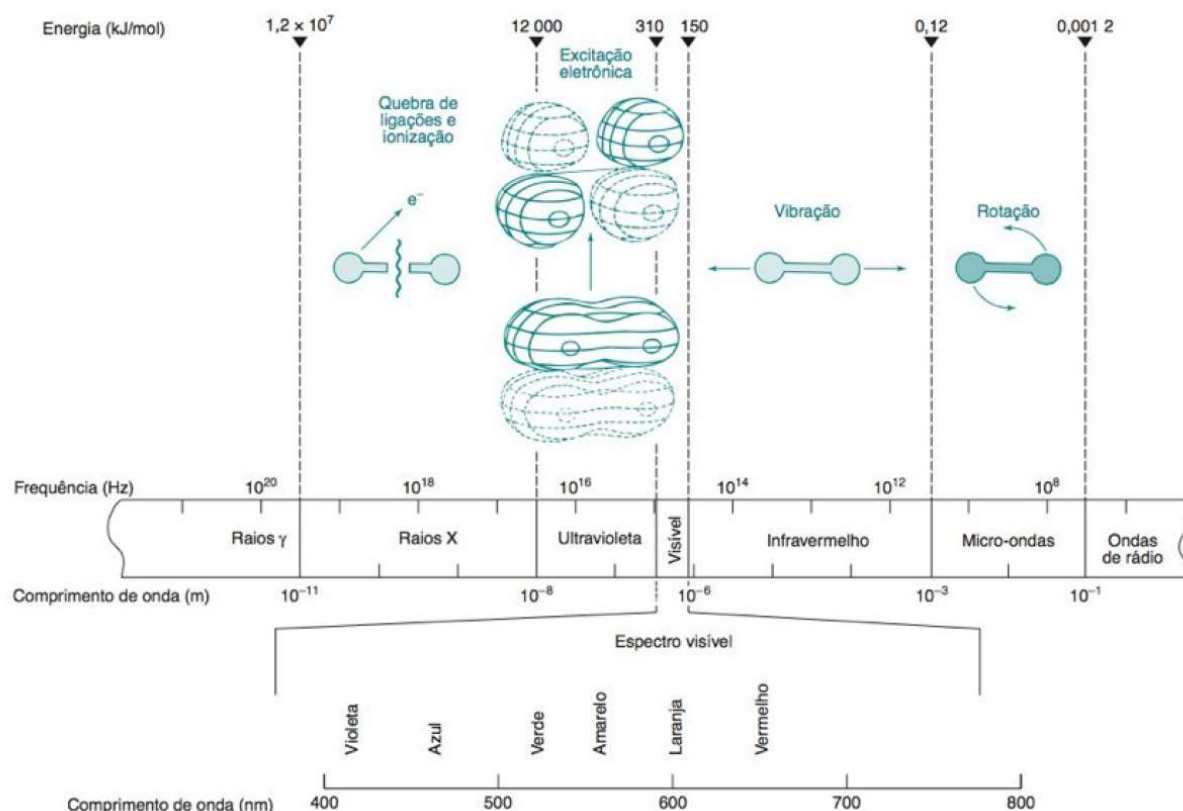


Fonte: HARRIS, 2012.

A relação entre frequência e comprimento de onda é expressa por: $\nu\lambda = c$, sendo c a velocidade da luz onde, ao considerar um meio diferente do vácuo, a velocidade da luz passa a ser $\frac{c}{n}$, sendo n o índice de refração do meio. Trata-se de um fator determinante na interação da luz com a matéria e dependente da intensidade da radiação. Com isso, para comprimentos de onda na região do visível $n > 1$ e, para os casos em que a luz se propaga em dois diferentes meios, com índices de refração diferentes, a radiação permanece constante, porém, com mudança no comprimento de onda (PAIVA, LAMPAN, KRIZ & VYVYAN, 2015).

A figura 6, ilustra justamente o processo de absorção da luz em diferentes regiões de frequência eletromagnética. Lembrando que o comprimento de onda (λ) é inversamente proporcional à frequência (ν), e que em termos de energia, esta é diretamente proporcional à frequência $E = h\nu$, em que h = constante de Planck (HARRIS, 2012).

Figura 6 – Espectro eletromagnético identificando os processos de absorção da luz por região.



Fonte: HARRIS, 2012.

Além disso, é importante mencionar que a frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos. Já o número de onda ν^- (posições das bandas no espectro de infravermelho) é o inverso dos comprimentos de ondas ($\text{cm}^{-1} = \frac{10^4}{\mu\text{m}}$) e é igual a $1 \times \frac{10^4}{\lambda}$ em μm (SILVERSTEIN, 2012).

Em termos circunstanciais, a luz visível é composta por comprimento de onda que vão de 400 a 800 nm, mas menores que as microondas, as quais são maiores que 1 nm. Já a radiação infravermelha, apresentada na figura 2, situa-se entre a região do visível e das microondas, precisamente entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} (PAIVA, LAMPMAN, KRIZ & VYVYAN, 2015).

A radiação na região de microondas estimula o movimento de rotação das moléculas. A infravermelha estimula as vibrações moleculares e a luz visível e a radiação ultravioleta causam transferência de elétrons para orbitais de maior energia. Os raios x e a radiação ultravioleta de comprimento de onda curto, provocam o rompimento de ligações químicas além de ionizarem as moléculas (SKOOG, 2002).

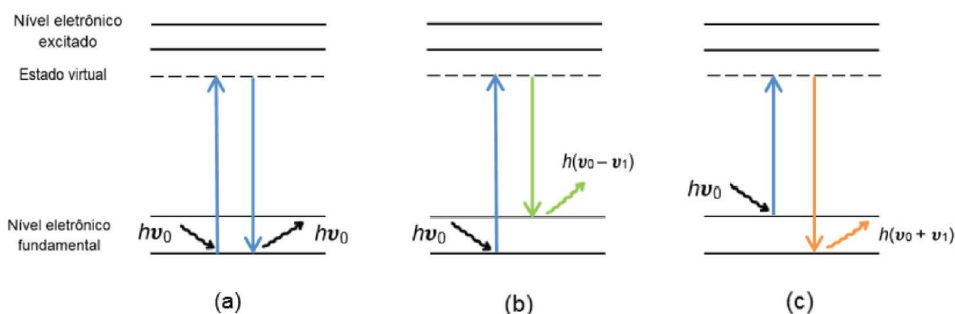
A partir desses conceitos, é possível inferir que a interação da radiação eletromagnética com a matéria, estudada pela espectroscopia, determina níveis energéticos atômicos e moleculares possibilitando ainda, elucidação de transições entre eles dependendo dos níveis envolvidos (eletrônicos, vibracionais ou rotacionais). As transições eletrônicas envolvem uma estrutura vibracional e rotacional; as vibracionais envolvem vibracionais e rotacionais e; somente as transições rotacionais são de um mesmo estado vibracional e eletrônico (SALA, 1996).

Nesse contexto, as energias de transições eletrônica situam-se na região do ultravioleta ou visível; as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região microondas. Lembrando que, é a partir da interação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos que se origina o espectro vibracional no infravermelho enquanto que, na espectroscopia Raman esta interação é mediada por elétrons (SALA, 1996).

O fenômeno denominado espalhamento, ocorre quando a luz monocromática eletromagnética incide em um meio material. Nessa interação, os fótons incidentes excitam a molécula, que está inicialmente em um nível vibracional do estado eletrônico fundamental para um estado virtual (intermediário), do qual ela se recupera imediatamente de três formas distintas: parte dela é refletida, parte é transmitida e somente uma pequena parte participa do espalhamento. Por sua vez, a parte que participa do espalhamento gera luz de mesma energia (princípio da conservação da energia, onde fóton é espalhado sem sofrer alteração em seu valor de comprimento de onda, ou seja, a energia do fóton é a mesma antes e após sua interação com a matéria). Com isso, a parte do espalhamento que gerou luz de mesma energia é chamado de espalhamento elástico ou espalhamento Rayleigh – figura 7(a).

Por conseguinte, no caso da molécula retornando do estado virtual ao estado fundamental, e alterando seu nível energético e com energia diferente da incidente, à exemplo, da molécula receber energia da sua interação com o fóton incidente; ocorrerá do fóton espalhado perder a mesma porção energética, logo, o fóton espalhado possui energia menor que a do incidente sendo caracterizado como espalhamento do tipo Raman Stokes, figura 7 (b). Além disso, nos casos envolvendo condições ambientes, onde as moléculas que estavam vibracionalmente excitadas e, que ao interagirem com a radiação eletromagnética, perderam energia, ocorrerá de o fóton espalhado adquirir a energia dissipada pelas moléculas, caracterizando como espalhamento do tipo Raman anti-Stokes (figura 7c). (SANTOS, MENEZES, ELLENA & ANDRADE, 2019).

Figura 7- Espalhamento da radiação eletromagnética: (a) espalhamento elástico (Rayleigh), (b) espalhamento inelástico (região Stokes) e (c) espalhamento inelástico (região anti Stokes).



Fonte: SANTOS, MENEZES, ELLENA & ANDRADE, 2019.

Em resumo, por denominação, a parte do espalhamento que gerou luz de mesma energia é chamado de espalhamento elástico ou espalhamento Rayleigh, enquanto que, a parte que gerou luz de energia diferente é o espalhamento inelástico, o qual pode resultar tanto em um fóton de menor energia, quanto em um fóton de maior energia, já mencionados anteriormente (NEUVILLE, LIGNY & HENDERSON, 2014).

Ainda por definição, em relação ao espalhamento inelástico uma pequena parte da radiação é espalhada com frequência (ou comprimento de onda visível) diferente do incidente ($E = h\nu$ ou $E = h.c.\lambda^{-1}$). Trata-se de um fenômeno observado experimentalmente em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia, sendo este o motivo que foi chamado de efeito Raman (RAMAN & KRISHNAN, 1928).

Assim, a espectroscopia Raman possibilita investigar diversos modos vibracionais de um material, porém, nem todos os modos de vibração de uma molécula podem ser acessados em razão das regras de seleção, a qual define se determinado comprimento de onda (com energia igual ao modo vibracional do material) será ativo em espectroscopia Raman ou na técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho. Tipicamente, durante a vibração, se o momento de dipolo da molécula for alterado, a molécula será ativa em infravermelho. Por outro lado, se o momento de dipolo for induzido pela radiação eletromagnética do campo elétrico, levando à alteração na polarizabilidade com um pequeno deslocamento da coordenada q em torno da posição de equilíbrio, a molécula será ativa no Raman (SALA, 1996).

Nesse sentido, uma molécula só será capaz de absorver radiação infravermelho caso sofra uma variação no momento de dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional, pois, a radiação Infravermelho não possui energia suficiente para produzir transições eletrônicas (SKOOG, 2002).

2.3.3 Microscopia Eletrônica

A compreensão morfológica de qualquer tipo de material baseia-se nos resultados da interação de um feixe de elétrons com a amostra a ser analisada. Assim, no instante em que um feixe eletrônico, ou feixe primário, atinge a superfície de uma amostra, ocorrerá uma interação com os átomos da amostra, gerando vários padrões excitatórios (PADILHA, *et al.*, 1985).

Quando isso acontece, a velocidade inicial da trajetória do elétron pode sofrer modificação direcional ou tanto direcional quanto modular. Nos casos de mudança na trajetória do elétron, sem variação de energia cinética, ou seja, havendo conservação de energia e levando em consideração o momento dos elétrons e a interação Coulumbiana com o núcleo atômico, bem como de todos os elétrons ao redor dela; as interações são denominadas elásticas e, quando há transferência de energia do elétron primário para os átomos da amostra são chamadas de interações inelásticas (WATT, 1997).

Há ainda casos de penetração do elétron no átomo, ao ponto de alcançar o núcleo atômico, onde o potencial coulumbiano carregado positivamente influencia diretamente na velocidade do elétron e, a força atuante é diretamente proporcional a carga do núcleo, ou seja, ao número atômico Z (força de Coulomb). Trata-se de mecanismo de interação clássico, baseado na interação entre elétron e núcleo, onde há conservação do momento e da energia, conhecido como uma interação do tipo elástica ou espalhamento Rutherford (DEDAVID, *et al.*, 2007).

Contudo, quando um feixe de elétron penetra no átomo e interage também com os elétrons ao redor do átomo resultando em transferência de energia para o átomo, o espalhamento será inelástico. De maneira geral, a maioria dos elétrons das camadas externas dos átomos sofrem interações tipo inelásticas pois, estes elétrons requerem pouca energia para serem removidos (MANNHEIMER, 2002).

Assim, tomando como base esses conceitos, pode-se concluir que a composição do material influencia diretamente na profundidade de penetração dos elétrons e, consequentemente, no tipo de espalhamento resultante da interação do feixe de elétrons com o material. Por isso, materiais com alto número atômico resultarão em um espalhamento inelástico, com baixa profundidade de penetração de elétrons (DEDAVID, *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o produto resultante das interações elásticas e inelásticas, oriundos das colisões entre elétron e átomos, presentes no material analisado serão os elétrons secundários e elétrons retroespalhados (ERE). Além disso, o núcleo atômico é atingido por elétrons, pode ocorrer a produção de espectro de raio-X contínuo ou *Bremsstrahlung* (radiação de fredda) ou raios-X característico pela desaceleração dos elétrons incidentes no campo de Coulumbiano do

núcleo atômico. Porém, quando o elétron perde energia entre zero podendo chegar ao valor da energia elétron incidente, a produção será de raios-X contínuo ou *Bremsstrahlung* (radiação de desaceleração dos elétrons incidentes no campo de Coulumbiano do núcleo do átomo) na amostra. Lembrando que, no que tange o elétron primário interagindo com os elétrons presentes na eletrosfera; conforme mencionado anteriormente, o produto resultante são interações tipo inelástica pois, a colisão pode excitar as partículas presentes no átomo as quais, poderão percorrer o material e colidir com outras partículas de forma inelástica. Por essa razão, poucos elétrons que colidiram com o material irão ser liberados (GOLDSTEIN, *et al.*, 2018).

Agora em casos em que haja excesso de energia, quando ocorre o ganho energético resultando na ejeção de um elétron de uma camada atômica interna, ou seja, ocorra transferência de um elétron de outra camada; havendo emissão de um fóton, liberando energia ou emissão de um elétron da camada mais externa, o produto resultante é a formação de um elétron com energia característica do material pois, o átomo fica em estado ionizável ou excitado, e esse desbalanço de carga gera raios X característicos (raios X característicos e a emissão de elétrons é conhecida como efeito Auger). Essa energia pode ser liberada de duas formas: por emissão de fóton raios X com energia característica específica para determinada transição para um elemento específico. Logo, esses fótons liberados permitem a detecção de informações sobre a composição elementar da amostra. E o segundo modo é a liberação por chamado elétrons Auger. Esses elétrons possuem energia máxima de cerca de 2 keV e são chamados de elétrons Auger (WILLIAMS, *et al.*, 2009).

Logo, tanto a energia do fóton como a do elétron emitido são características dos elementos geradores levando as informações características químicas. Em resumo, o processo ocorre quando há interação do feixe de elétrons com o núcleo gerando uma onda eletromagnética durante a desaceleração e raios X são produzidos com energia ou comprimento de onda variando de zero até o valor da radiação característica. Esta radiação de desaceleração (*Bremsstrahlung*) é conhecida como raio X contínuos (GOLDSTEIN, *et al.*, 2018).

Por outro lado, a partir de um bombardeamento eletrônico, onde um elétron incidente se espalha inelasticamente para fora do átomo, ocorrendo transições da banda de condução para a banda de valência, ou vice-versa, gerando vacâncias em uma das bandas (*gaps*) em bandas específicas do próprio material; fazendo com que pares elétron-lacuna se recombinem e emitam energia na forma de luz visível, ultravioleta e infravermelha. Esse processo de emissão de luz, que é chamado de catodoluminescência (WILLIAMS, *et al.*, 2009).

Percebe-se então, que todas essas interações causam aquecimento na amostra e podem ser captadas em forma de elétrons espalhados inelasticamente (elétrons secundários, raios X característicos, raios X *Bremstrahlung* (contínuos), etc) e elétrons espalhados elasticamente

(elétrons retroespalhados - ERE, elétrons Auger). Sendo que nos casos em que está se analisando a morfologia do material, geralmente, faz-se uso do detector de elétrons secundários. Já quando se analisa o contraste de número atômico, os elétrons retroespalhados é que são foco de análise. Porém, quando almeja-se analisar a composição química do material o detector usado vai captar raios X característicos (GOLDSTEIN, *et al.*, 2018).

Em resumo, elétrons espalhados elasticamente saem com energia equivalente ao do feixe incidente. Elétrons espalhados inelasticamente já sofrem variações durante a interação e são espalhados com um espectro de energia menor que a energia do feixe (MANNHEIMER, 2002).

Assim, detectores são responsáveis por captar os diferentes sinais dos elétrons após incidirem na amostra e serem refletidos. Paralelamente, os elétrons são atraídos para o interior do detector devido à voltagem positiva da grade localizada na frente do detector, ou seja, a partir de uma diferença de potencial eletrostático que atrai as partículas até o detector. E dentro do detector, os elétrons são acelerados para um cintilador que percorrem o guia de luz até o fotomultiplicador, que por sua vez, produzirá uma corrente de elétrons, a qual será interpretada por um software que irá gerar a micrografia (DEDAVID, *et al.*, 2007).

2.3.4 Docagem Molecular (*Molecular Docking*)

A docagem molecular é um método de simulação computacional que busca prever o modo de interação da molécula (ligante) no sítio ativo de um alvo molecular (receptor) de modo eficaz, em sistemas biológicos e, como resultado, coordenadas atômicas dos ligantes que simulam computacionalmente a posição de um ligante na estrutura de uma proteína são obtidas (LENGAUER, *et. al.*, 1996).

Com isso, as potenciais interações das estruturas obtidas dos possíveis ligantes, com os resíduos catalíticos, presentes no sítio ativo, devem ser avaliados usando como critério de seleção, a aplicação de uma função de pontuação empregada no sistema da enzima alvo (MONTANARI, 2011). Essa função mede a energia potencial ou a energia livre de interação como resultante da somatória de todas as contribuições específicas das interações hidrofóbicas, de Van Der Waals, ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas (MONTANARI, 2011).

Com isso, dentre as conformações obtidas, a função de pontuação busca os valores mais baixos de energia, elegendo-o como o inibidor energeticamente mais favorável para interagir com alvo biológico (THOMSEN, *et al.*, 2006). Assim, é possível distinguir as melhores conformações geradas e eleger um conjunto de candidatos qualificados com base nas interações

intermoleculares de interesse envolvidas no processo de reconhecimento molecular (MONTANARI, 2011).

De maneira geral, os estudos de docagem molecular conduzem a uma amostragem das coordenadas espaciais do ligante no sítio de ligação da macromolécula alvo, com um concomitante uso da função de pontuação para cada encaixe gerado, levando assim a uma classificação do modo de ligação de cada composto (ALVAREZ, 2004). Dessa forma, o processo de encaixe (docagem) é referente às orientações no sítio ativo do alvo biológico de uma mesma molécula, enquanto a função de pontuação refere-se a diferentes moléculas de acordo com a afinidade de ligação com alvo molecular (MONTANARI, 2011).

Existem diversos programas que realizam a simulação de docagem molecular, no entanto, para esse estudo foi utilizado o programa *Molegro Virtual Docker* (MVD), pois sua função de pontuação (*MolDock Score*) combinada com a acurácia do seu algoritmo de busca, apresentou maior eficácia quando comparado a outros programas de docagem (MVD: 87%, GLIDE: 82%, Surflex: 75%, FlexX: 58%) (THOMSEN, *et al.*, 2006).

O algoritmo empregado no MVD é o *MolDock* que consiste em um algoritmo de busca que combina Evolução Diferencial (DE) com um algoritmo de predição da cavidade catalítica (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O DE foi desenvolvido por Storn e Price em 1995 e tem demonstrado eficácia no método de docagem molecular (STORN, *et al.*, 1995).

A função de pontuação é o *MolDock Score* (E_{score}) e é baseada em um potencial linear por partes (PLP) introduzido por Gehlhaar e aperfeiçoada por Yang (GEHLHAAR, *et al.*, 1995; YANG, *et al.*, 2004). A função é expressa pela seguinte equação:

$$E_{\text{score}} = E_{\text{inter}} + E_{\text{intra}} \quad (1)$$

Onde: E_{score} é a soma dos termos de energias E_{inter} e E_{intra} ;

E_{inter} é a energia de interação entre ligante e proteína;

E_{intra} é a energia do ligante

Sendo E_{inter} determinado pela seguinte equação:

$$E_{\text{inter}} = \sum_{i=\text{ligante}} \sum_{j=\text{pro}} \sum_{\text{ina}} \left[E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (2)$$

A equação representa a somatória dos termos energéticos de todos os átomos presentes no ligante e todos átomos presentes na proteína, incluindo quaisquer átomos de cofactor e de todos os átomos de moléculas de água que podem estar presentes. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre os átomos carregados. Esta é a descrição do potencial de Coulomb com distância dielétrica constante dada por $D(r) = 4r$. O valor numérico de 332,0 fixa as unidades de energia eletrostática a kcal / mol. E_{PLP} é o termo que representa a função de potencial linear por partes que usa dois diferentes parâmetros sendo um desses termos usados para determinar o valor das interações de Van der Waals entre os átomos e o outro termo que trata das interações de hidrogênio (THOMSEN, *et al.*, 2006).

E E_{intra} calculado pela seguinte equação:

$$E_{intra} = \sum_{i=\text{ligante}} \sum_{j=\text{proteína}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A [1 - \cos(m\theta - \theta_0)] E_{conflito} \right] \quad (3)$$

Dessa forma, a dupla soma calcula todos os termos energéticos que envolvem pares de átomos do ligante, exceto aqueles ligados por duas ligações. A segunda soma calcula a energia de torção, onde θ é o ângulo de torção de ligação. O último termo, $E_{conflito}$, atribui uma penalidade de 1000, se a distância entre dois átomos (mais de duas distância de ligações) for inferior a 2,0 Å. Assim, o termo $E_{conflito}$ marca as inviáveis conformações ligadas (THOMSEN, *et al.*, 2006).

Um aspecto importante a ser mencionado é que para o início dos cálculos as variáveis (raio do espaço tridimensional, hibridização dos átomos, presença de moléculas de água no espaço de busca, etc.) e os parâmetros utilizados pelo programa para os cálculos de *docking* precisam ser testadas. Por isso, é realizado um processo de *redocking*, como forma de reconstruir o complexo cristalográfico original. Para isso, a estrutura cristalográfica de entrada é desfeita, separando-se a proteína (receptor) do ligante complexado (VERDONK, *et al.*, 2003).

Posteriormente, cálculos de *docking* são realizados utilizando as coordenadas de entrada das duas estruturas separadas (proteína e ligante). E finalmente, os resultados são comparados com o complexo cristalográfico original. Ao término, considera-se como adequados e validados, os parâmetros utilizados, quando os resultados obtidos conseguem recriar a orientação e conformação do ligante inserido na estrutura do complexo cristalográfico com RMSD (equação 4) (*Root Mean Square Deviation*) inferior ou igual a 2,0 Å (ONODERA; 2007; ARMEN, 2009).

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{ci} - x_{di})^2 + (y_{ci} - y_{di})^2 + (z_{ci} - z_{di})^2} \quad (4)$$

Onde x_c , y_c , z_c referem-se às coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica e x_d , y_d , z_d referem-se às coordenadas atômicas da estrutura obtida por simulação de *docking*, N é o número de átomos no ligante. E a somatória é feita sobre todos esses átomos (THOMSEN, *et al.*, 2006).

Após a realização dos cálculos de *docking*, é necessário que os complexos formados (saídas do programa) possam ser avaliados graficamente. Essa avaliação tem por objetivo a busca e o entendimento do modo de ligação do complexo no sítio de ligação e as interações intermoleculares envolvidas (LI, *et al.*, 2010).

Considera-se nessa busca, os escores obtidos nos cálculos, a complementaridade atômica entre ligante e sítio de ligação, a percentagem de repetição de uma pose nos cálculos de *docking* e a representatividade da mesma para a série de compostos da família estudada (VEGA, *et al.*, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse estudo, foram investigadas as moléculas isoladas dos ácidos graxos saturados (ácido láurico, ácido esteárico e ácido mirístico) e os insaturados (ácido linolênico - $\omega 3$; ácido Linoleico - $\omega 6$; e o ácido oleico - $\omega 9$) como potenciais inibidores da enzima Ciclooxygenase (COX). Como referência comparativa, o fármaco comercial nimesulida foi utilizado pois, trata-se de um inibidor seletivo da COX. Assim, um estudo teórico por meio de cálculos computacionais de Docagem Molecular (*Molecular Docking*) foram realizados para averiguar a possibilidade utilização dessas moléculas como potenciais inibidores com ação anti-inflamatória.

Posteriormente, os melhores resultados obtidos, dessas moléculas foram individualmente, complexadas à uma matriz cerâmica de Hidróxido Duplo Lamelar (HDL) objetivando aumentar a solubilidade aquosa dessas moléculas, antes pouco solúveis em meio aquoso, e assim, melhorar suas respectivas absorções bem como, suas biodisponibilidades.

Dessa forma, os sistemas obtidos foram sintetizados para atuarem como sistemas de liberação controlada de fármacos (*Controlled Drug Delivery Systems*) utilizando materiais cerâmicos inorgânicos, como os HDLs, como matriz inorgânica.

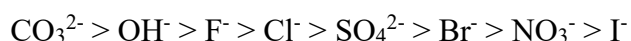
3.1 Síntese de Hidróxido Duplo Lamelar (HDL) pelo método de coprecipitação a pH constante

A matriz cerâmica do HDL foi sintetizada pelo método de coprecipitação a partir da preparação de duas soluções. Para o preparo da solução A foi utilizado $9,009 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de nitrato de magnésio hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), adquirido pela empresa Sigma-Aldrich, com teor de pureza de 98% e $4,504 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de nitrato de alumínio nonahidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), adquirido pela empresa Sigma-Aldrich, com teor de pureza de 98%. No preparo da solução B foi utilizado 10 mL de hidróxido de sódio 2M (NaOH).

O preparo das soluções obedeceu condições de controle rigorosas, quanto a razão molar $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}=2$, representando uma concentração de 0,33 mol.L das soluções e baseando-se no método de coprecipitação à pH constante, proposto por Reichle, que também utilizou como base da matriz cerâmica de HDL, os metais di e trivalentes magnésio e alumínio (REICHLER, 1986). Todavia, algumas adaptações foram realizadas respaldando-se em estudos mais recentes os quais demonstram que, concentrações menores dos sais metálicos e da solução alcalina obtiveram resultados ainda mais satisfatórios (MENDIETA, 2012). Além disso, todos os quantitativos mencionados foram solubilizados em água deionizada decarbonatada ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$).

O processo de coprecipitação ocorreu na etapa 1 (figura 8) adicionando, lentamente, a solução A sob agitação vigorosa na solução B. O pH 10 em solução foi mantido constante por sucessivas adições de NaOH. Ao final da adição, a mistura foi mantida sob agitação vigorosa na temperatura de 60 °C por 16 horas (Figura 8 – Etapa 2).

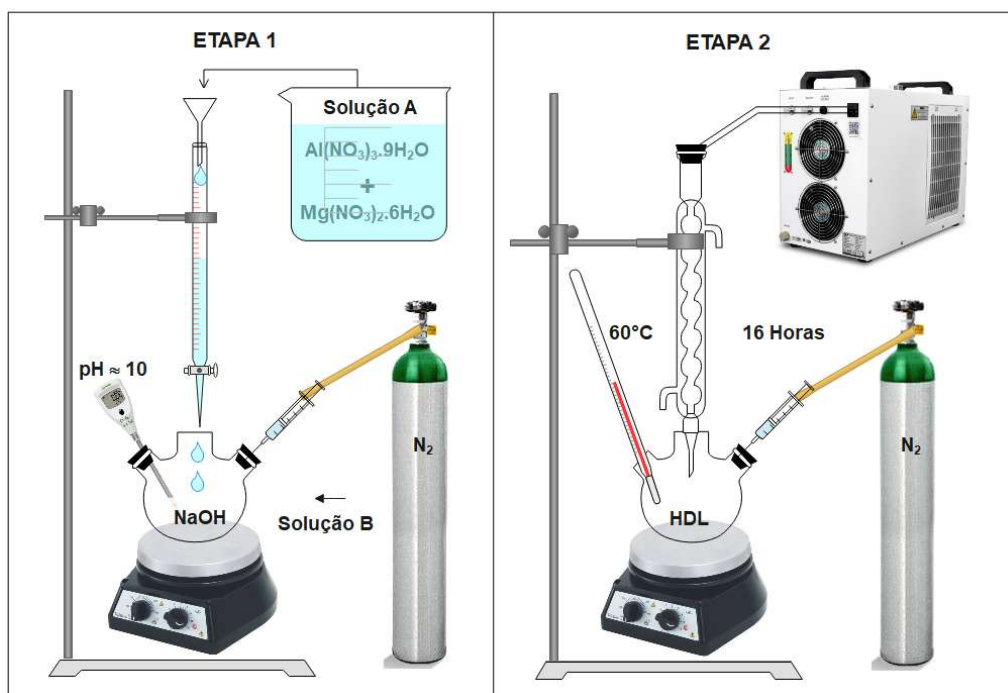
O método proposto nesse trabalho para obtenção de matriz de HDL a partir de hidróxidos, di e trivalentes, respectivamente, magnésio e alumínio intercalados com ânions nitratos, levou em consideração a lista comparativa de seletividade iônica, baseada apenas nos termos de termodinâmica de troca iônica (MIYATA, 1983):



Em termos termodinâmicos de seletividade iônica, a presença do ânion carbonato (CO_3^{2-}), em solução, tornaria o processo de coprecipitação proposto, mais difícil de ocorrer pois, os interstícios das lamelas de HDL estariam ocupados pelo ânion carbonato e a troca iônica de substituição do carbonato pelo ânion nitrato (NO_3^-) não seria favorecida (MIYATA, 1983). Ou seja, pH básico a que se processa a coprecipitação é favorável à formação do ânion carbonato, o qual, é facilmente incorporado na região interlamelar. Por isso, para a síntese de HDL com ânions nitratos intercalados foi realizado em atmosfera de nitrogênio. Além disso, ao longo de todas as etapas do procedimento foi realizada a descarbonatação prévia da água para evitar a contaminação por CO_2 , em temperatura sempre inferior a 303 K e sob fluxo de refrigeração nos condensadores objetivando para manter estequiometria do sistema (CREPALDI, VALIM, 1998).

Decorrido o tempo de 16 horas de sínteses, a suspensão era centrifugada à 5000 RPM por dez minutos e o sólido obtido, lavado gradativamente, com aproximadamente 500 ml de água deionizada e descarbonatada, envolvendo sucessivos procedimentos de centrifugação até um ponto em que o sobrenadante se apresentou com um valor constante de pH igual a 7. Posteriormente, o material obtido foi seco em estufa a 60°C por 24 horas, triturado manualmente e por fim armazenado para caracterização. Um resumo das etapas do método de coprecipitação à pH constante, utilizado para a síntese de HDL está apresentado na figura 8.

Figura 8 - Método de Coprecipitação à pH Constante utilizado para a síntese de HDL.

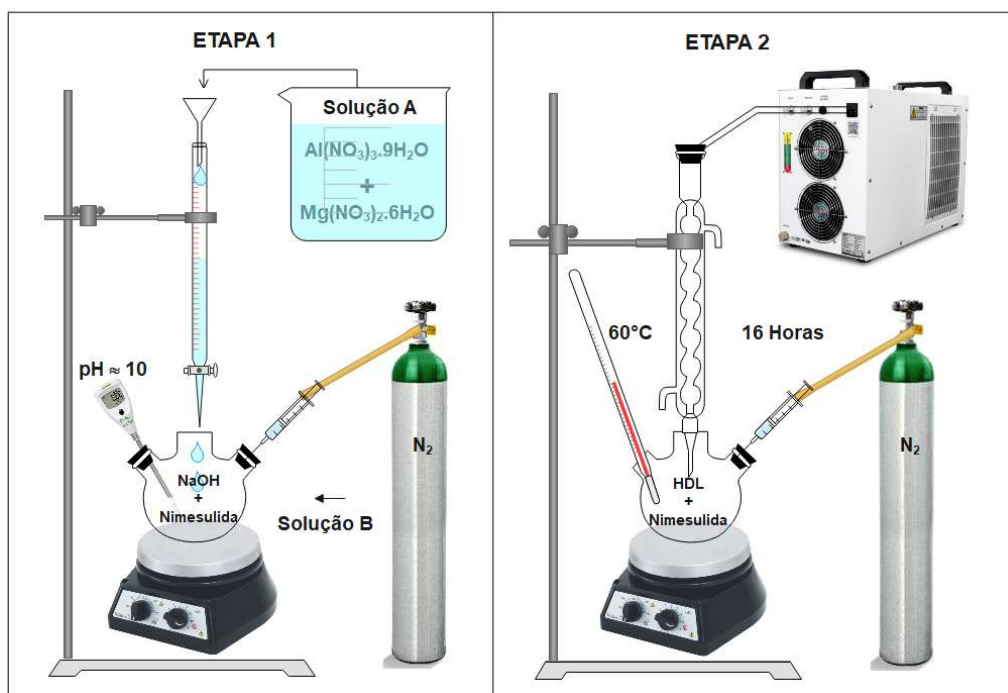


Fonte: própria

3.2 Intercalação de Nimesulida em Hidróxido Duplo Lamelar (HDL) pelo método de coprecipitação a pH constante

O híbrido HDL-Nimesulida (figura 9) foi sintetizado na proporção de HDL:Nimesulida (2:1), obedecendo condições de controle rigorosos quanto a razão molar de $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}=2$, em uma concentração de 0,33 mol.L da solução A de HDL (figura 9 – etapa 1) e baseando-se no método de coprecipitação à pH constante de forma semelhante, a metodologia da seção 3.1 descrito anteriormente. Porém, foram acrescentadas algumas adequações referentes à solução B para adaptação do método utilizado. Na solução B (figura 9 – etapa 1) foi utilizado 0,224 mols/L de nimesulida sendo esta uma solução hidroalcoólica (50% v/v). Em seguida, a mistura das soluções, foi mantida sob agitação vigorosa na temperatura de 60 °C por 16 horas (figura 9 – etapa 2). Posteriormente, todo o protocolo experimental foi realizado conforme mencionado acima, na seção 4.1, para a síntese de HDL puro.

Figura 9 - Método de intercalação para a síntese de HDL-Nimesulida.



Fonte: própria

3.3 Intercalação dos ácidos graxos em Hidróxido Duplo Lamelar (HDL) pelo método de coprecipitação a pH constante

O processo de obtenção dos complexos farmacêuticos baseados em um hidróxido duplo lamelar (HDL) e ácido graxos, ocorreram de forma semelhante ao método descrito anteriormente. O método também consiste inicialmente no preparo de duas soluções: A primeira solução aquosa contendo os sais metálicos de nitrato de magnésio hexahidratado ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) (bivalente) e de nitrato de alumínio nonahidratado $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (trivalente) os quais, foram dissolvidos em água ultrapura tipo I e descarbonatada; sob o fluxo contínuo de nitrogênio e mantida desde os primeiros momentos, sob agitação magnética de 150 rpm, por um intervalo de tempo que pode variar de 15 a 30 minutos, até a completa homogeneização. Em seguida, a segunda solução deve ser composta por um ácido graxo, hidróxido de sódio, álcool etílico e água ultrapura tipo I e descarbonatada (item obrigatório no preparo desses complexos). A solubilização deve ocorrer sob o fluxo contínuo de nitrogênio e mantida desde os primeiros momentos, em agitação magnética, por um intervalo de tempo que pode variar de 15 a 35 minutos, entre 100 e 200 rpm; até tornar-se uma solução homogênea; o que varia conforme a saturação e do tamanho da cadeia carbônica.

Por conseguinte, para obtenção dos complexos HDL-ácidos graxos da primeira solução, correspondente à solução dos sais, deve ser gotejada sob a segunda solução (solução hidroalcóolica contendo o ácido graxo) em uma vazão que varia de 1 a 3 mL por minuto. Esse processo deve ocorrer com monitoramento do pH do sistema, em torno de 10 e para isso, adições constantes de hidróxido de sódio devem ser realizadas. É imprescindível que todo esse processo aconteça sob o fluxo contínuo de nitrogênio e agitação constante.

Ao término da precipitação das soluções, o precipitado obtido também permaneceu sob o fluxo de nitrogênio e em agitação entre 100 e 200 rpm, sob temperatura de 60 °C, por 16 horas. Decorrido esse período, o material deve ser centrifugado a 5000 rpm, entre 30 a 45 minutos, e, em seguida, o decantado deve ser lavado gradativamente com água ultrapura tipo I e descarbonatada, envolvendo sucessivos procedimentos de centrifugação e lavagem até que o sobrenadante apresente um valor de pH entre 7 e 8. Posteriormente, o complexo passou por um processo de secagem, em estufa, com uma temperatura podendo ser variada entre 60 °C a 65°C, por um período de 16 a 24 horas dependendo da saturação e do tamanho da cadeia de ácido graxo.

3.4 Técnicas de caracterização

Os materiais sintetizados foram caracterizados por técnicas de Difração de Raio-X (DRX), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Microscopia Eletrônica De Varredura De Alta Resolução (MEV-FEG), e Espectroscopia RAMAN. Além disso, cálculos computacionais de Docagem Molecular foram realizados como primeiro passo para investigar as possíveis interações biológicas do fármaco comercial nimesulida e dos ácidos graxos saturados e insaturados com os resíduos catalíticos presentes no sítio ativo da enzima COX-2 como possível alvo biológico.

3.4.1 Difração de raio x (DRX)

As amostras foram analisadas em condições ambiente, na Unidade de preparação e caracterização de materiais, no Laboratório de DRX, da Universidade Federal do Maranhão, localizado em Imperatriz-MA.

Os difratogramas serão gerados a partir de uma fonte de cobre com radiação monocromática de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), usando uma tensão de 40 KV, resultando em uma corrente de 40mA. As amostras foram digitalizadas na faixa de intervalo angular dois theta (2θ),

variando de 2-50°, em um tempo de permanência de 0,02° por segundo. O instrumento utilizado nas medições foi um difratômetro de raio-x modelo EMPYREAN, da Panalytical (figura 10).

Figura 10 - Difratômetro de raio-x modelo EMPYREAN, da Panalytical.



Fonte: própria

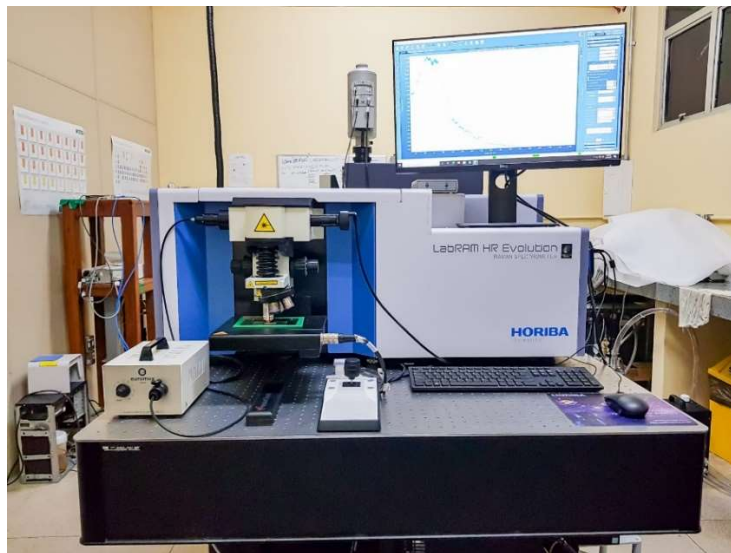
3.4.2 Espectroscopia Vibracional Raman

As medidas de Espectroscopia Raman foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Altas Pressões da UFPA (LEVAP/ UFPA), coordenado pelo Prof. Dr. Waldeci Paraguassu Feio, utilizando o espectrômetro Raman de alta resolução, modelo LabRAM HR Evolution, Horiba Scientific (figura 11). O LabRAM foi utilizado com grade de difração com densidade de 1800 (450-850) linhas/mm, sendo o diâmetro do feixe < 2 mm e uma resolução de 3.5 cm⁻¹.

Neste equipamento, o detector *Sincerity* emprega um dispositivo de resfriamento Peltier de vários estágios sendo acoplado termicamente à CCD dentro de uma câmara evacuada e à medida que a corrente passa pelo Peltier, o calor é retirado da superfície da matriz CCD. O processo de transferência de calor continua em sucessão através dos estágios Peltier para um

dissipador de calor localizado no lado atmosférico do detector, onde é então refrigerado a ar através de um ventilador.

Figura 11 – LabRAM HR Evolution, Horiba Scientific



Fonte: própria autora.

Trata-se de um instrumento equipado com um monocromador Czerny–Turner, um detector CCD e um microscópio confocal Olympus, equipado com diferentes lentes objetivas usadas para focalizar o laser no ponto desejado da amostra de silício para detectar a radiação espalhada e calibrar o equipamento.

Para a focalização dos feixes nas amostras de HDL, nimesulida e HLD-nimesulida foi utilizada uma lente objetiva de 20x, com 0,25 de abertura numérica (AN), distância de trabalho (DT) 25 mm, da série SLMPLN e da marca Olympus.

Os espectros Raman das amostras foram coletados utilizando como parâmetros um comprimento de onda 633 nm (laser), uma potência do laser 9.46 mW e utilizando um filtro de potência de 50% para evitar possíveis efeitos de degradação da amostra.

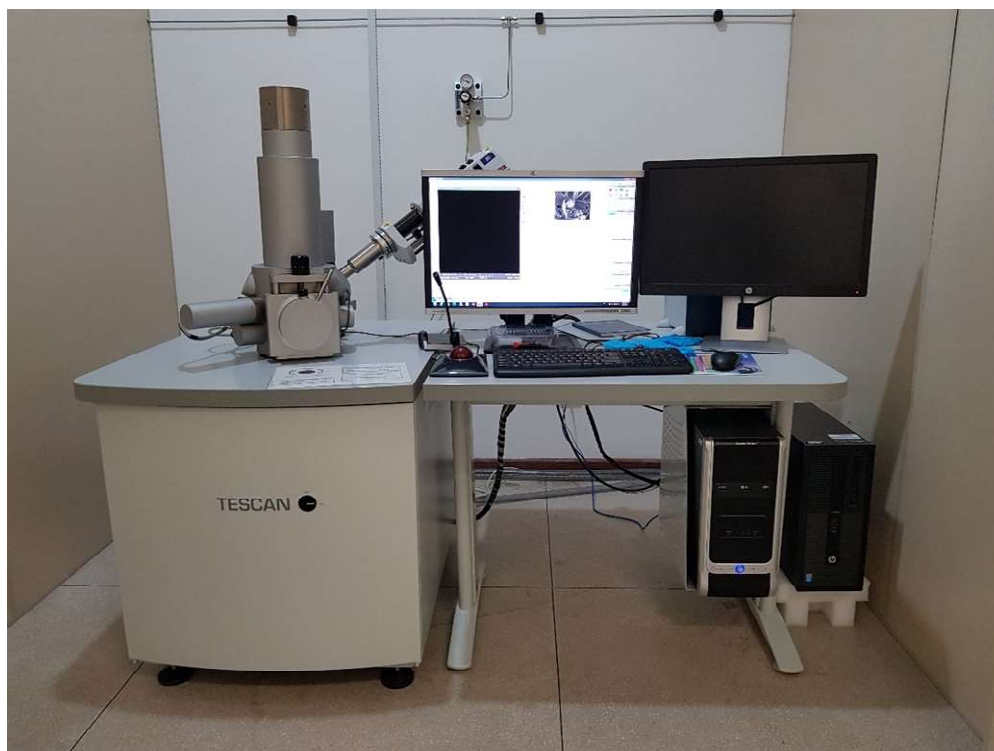
Na amostra de nimesulida pura foram medidas duas regiões. A primeira região correspondente à 40-1800 cm^{-1} , foi empregado um número de duas acumulações, com tempo de 30 segundos (s) e a segunda região (2650-3300 cm^{-1}) foi medida com quatro acumulações e 60s.

O software LabSpec6 (Horiba Scientific) foi empregado na operação do equipamento e na aquisição dos espectros. Todos os espectros Raman experimentais foram comparados com a literatura. O ajuste da linha de base, a remoção do background e a normalização dos espectros ocorreu por meio do software LabSpec6 (Horiba Scientific).

3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise superficial morfológica das amostras foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (SEM), modelo VEGA 3, da TESCAN Brasil. (figura 12).

Figura 12 – Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo VEGA 3, da TESCAN Brasil.



Fonte: Própria autora.

Como preparação das amostras uma cobertura de ouro foi aplicada na superfície das amostras objetivando melhor condutividade elétrica necessária no processo de formação das imagens. Para isso, utilizou-se uma Metalizadora (QUORUM TECHNOLOGIES, SC7620), em uma voltagem de aceleração de 5,0 kV em um tempo de 15 segundos, à uma corrente de feixe de elétrons de 15 mA e uma distância de 35 cm⁻¹ foram utilizadas.

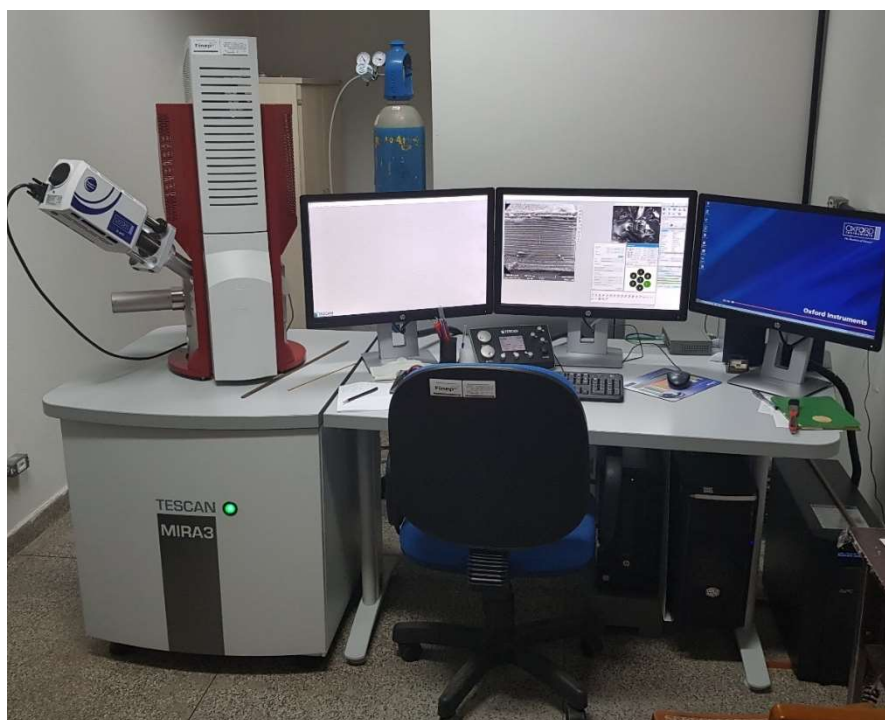
Para o processo de metalização as amostras foram colocadas sob uma fita de carbono e em seguida, durante o processo de metalização uma fina camada de uma liga, ouro/paládio de 20 nm, é pulverizada sobre as amostras.

3.4.4 Microscopia Eletrônica De Varredura De Alta Resolução (MEV-FEG)

A análise superficial morfológica das amostras por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (MEV-FEG), do modelo MIRA 3, da TESCAN Brasil. (figura 13), localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Museu Paraense Emílio Goeldi (LME).

A preparação das amostras ocorreu de maneira semelhante citado na seção 3.4.4.

Figura 13 – Microscópio Eletrônico De Varredura De Alta Resolução (MEV-FEG), Do Modelo MIRA 3, Da TESCAN.



Fonte: Própria autora.

3.4.5 Docagem Molecular (*Molecular Docking*)

As estruturas 3D da COX-2 complexada com o inibidor cristalográfico (2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid (COX2-NPS) de (código PDB: 3NT1) (DUGGAN, *et al.*, 2010) foram obtidas a partir do banco de dados de estruturas biológicas macromoleculares, o Protein Data Bank (PDB) (PDB - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e foram utilizadas como pontos iniciais para cálculos de docagem molecular. A fim de validar a metodologia utilizada pelo programa Molegro Virtual Docker (MVD) (THOMSEN, *et al.*, 2006), um procedimento de re-docagem foi realizado utilizando as coordenadas do ligante (2S)-2-(6-

methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid (NPS) como referência no complexo com estrutura cristalina da COX-2.

Posteriormente, as moléculas de nimesulida, ácido láurico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico otimizadas com o método *Hartree-Fock* (B3LYP/6-31G*) (PARR, 1983; SHAH, *et al.*, 2011), utilizando o programa Gaussian03 (FRISCH, *et al.*, 2004) foram complexadas a enzima COX-2 e submetidas aos cálculos de docagem molecular utilizando o MVD.

Os parâmetros utilizados no MVD foram os seguintes: *population size* = 50; *crossover rate* = 0,90; *scaling factor* = 0,50 e *max evaluations* = 100000.

A visualização e análise dos resultados fez-se uso do programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (HSIN, *et al.*, 2008). Os resultados obtidos nos estudos de docagem molecular para os todos complexos obtidos foram comparados com os obtidos para o complexo cristalográfico (COX2-NPS) levando em consideração a conservação das principais interações presentes no sítio ativo dos complexos receptor-ligante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

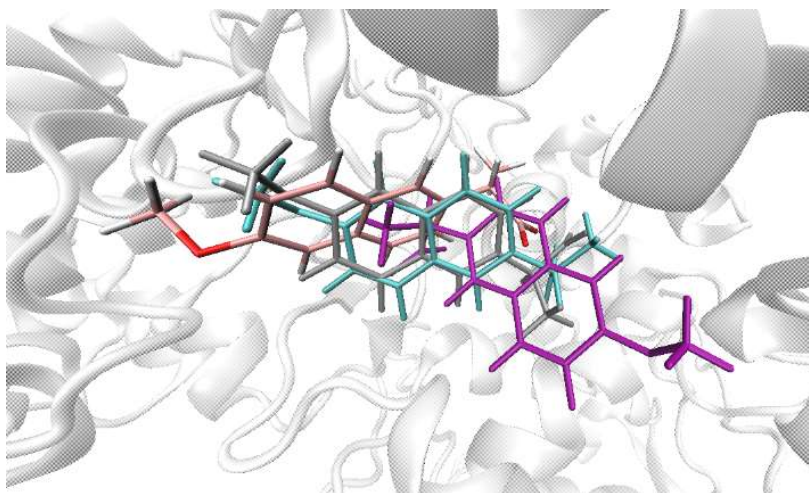
4.1 Docagem Molecular (*Molecular Docking*)

A estrutura da enzima COX-2, obtida no banco de dados *Protein Data Bank*, sob o código PBD: 3NT1, com resolução de 1,73Å e, complexada com o inibidor cristalográfico NPS ((2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid), foi utilizada como ponto de partida para os cálculos de docagem molecular. A validação do programa Molegro Virtual Docker (MVD) foi realizada por meio do método de re-docagem. Para isso, o ligante cristalográfico foi removido do receptor e o programa foi desafiado a docar o ligante mais próximo possível da conformação experimental.

Dessa forma, o ligante NPS foi re-docado na enzima COX-2 e o inibidor comercial nimesulida bem como, os potenciais inibidores ácidos saturados (ácido láurico, ácido esteárico e ácido mirístico) e ácidos insaturados (ácido linolênico ω 3, ácido linoleico ω 6 e ácido Oleico ω 9) foram docados no sítio catalítico da enzima COX-2.

Os resultados da re-docagem (figura 14) do inibidor cristalográfico NPS ((2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid) mostram que as poses obtidas pelo programa MVD estão sobrepostas a conformação experimental. Logo, o programa reproduziu bem a conformação experimental dentro do sítio catalítico da COX-2.

Figura 14 - Melhores conformações obtidas por cálculos de docagem molecular para o inibidor NPS ((2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid).



Fonte: Própria autora.

Além disso, o estudo de docagem foi empregado para determinar a energia de afinidade dos ácidos graxos saturados e insaturados como potenciais candidatos à inibidores da enzima COX-2. Para isso, levou-se em consideração um comparativo dos resultados de energia de afinidade do inibidor cristalográfico NPS e do fármaco comercial nimesulida bem como, a interação com os principais resíduos cristalográficos presentes no sítio catalítico da COX-2. O resultado dessa comparação encontra-se resumida na Tabela 3.

A tabela 3 mostra que dos valores de energia de afinidade (kcal/mol) encontrados para as moléculas de ácidos graxos saturados e insaturados, a molécula de ácido esteárico apresentou menor valor, porém, a molécula de ácido mirístico apresentou maior número de interação com resíduos catalíticos presentes no sítio ativo do receptor.

Tabela 3 - Valores de energia de afinidade (kcal/mol) para as moléculas de ácidos graxos saturados e insaturados.

Ligantes	Moldock Score	Interação com resíduos cristalográficos
NPS	-74.08	ARG120, TYR355
Nimesulida	-129.89	Arg44, Cys41
Ácido Láurico	-104.17	ASN43, ARG44, ARG469
Ácido Esteárico	-130.26	ASN43, CYS47, TYR130
Ácido Mirístico	-116.09	ARG44, ARG469, ASP125, ASN43, LYS468
Ácido Linolênico $\omega 3$	-134.81	ARG44, ARG469, GLU465, CYS41, CYS47, GLN461, LEU152
Ácido Linoleico $\omega 6$	-135.79	ARG44, ARG469, ASP 125, GLU 465, GLY 45
Ácido Oleico $\omega 9$	-130.68	ASN43, ARG44, LYS468, GLU465, CYS41

Fonte: Própria autora.

Já entre as moléculas de ácidos graxos insaturados, a molécula de ácido linoleico ($\omega 6$) foi a que apresentou menor energia de afinidade. Porém, tanto a molécula de ácido Linolênico ($\omega 3$), quanto a molécula de ácido linoleico ($\omega 6$) apresentaram o mesmo número de interações entre resíduos catalíticos presentes no sítio catalítico da COX-2.

Esses resultados podem ser melhor visualizados na figura 15 (a), (b), (c) e (d) e figura 16 (e), (f), (g) e (h); ao examinar os resultados da aplicação da função de pontuação *MolDock Score*, nos cálculos de docagem molecular, pelo programa *Molegro Virtual Docker*, para os ácidos graxos saturados e insaturados.

A figura 15 (a) mostra a melhor conformação obtida por cálculo de docagem molecular para o inibidor cristalográfico NPS redocado, que apresentou *Moldock Score* de -74.08 (kcal/mol) e interação com os resíduos de arginina (ARG120) em 3,74Å e 2,46Å com a tirosina (TYR355). O fármaco comercial nimesulida figura 15 (b), evidencia a interação de 2,54Å com o resíduo da arginina (ARG44) e de 2,98Å com a cisteína (CYS41). A energia de afinidade de -129.89 (kcal/mol) é bem menor quando comparada com o inibidor cristalográfico NPS.

Já a figura 15 (c) mostra o ácido mirístico faz interação com a ARG44 em 3,09Å e com a ARG469 em 2,39Å, por ligação de hidrogênio; interações eletrostáticas com a ARG44 em 3,90Å, com o aspartato (ASP125) em 1,78Å e com ARG469. Interações estéricas são encontradas ainda com os resíduos de asparagina (ASN43) em 3,07Å e lisina (LYS468) em 3,13Å. A figura 15 (d) por sua vez, mostra a ligação de hidrogênio entre o ácido láurico e os resíduos de ASN43 em 3,25Å e com a ARG44 em 3,03Å, bem como interação estérica com o resíduo de ARG469 em 2,90Å. E na figura 16 (e) já mostra a melhor conformação obtida para o ácido esteárico onde nota-se a ligação de hidrogênio com os resíduos de CYS47 e TYR130, respectivamente em 2,81Å e 2,64Å; e, interação estérica com o resíduo de ASN43 em 3,01Å.

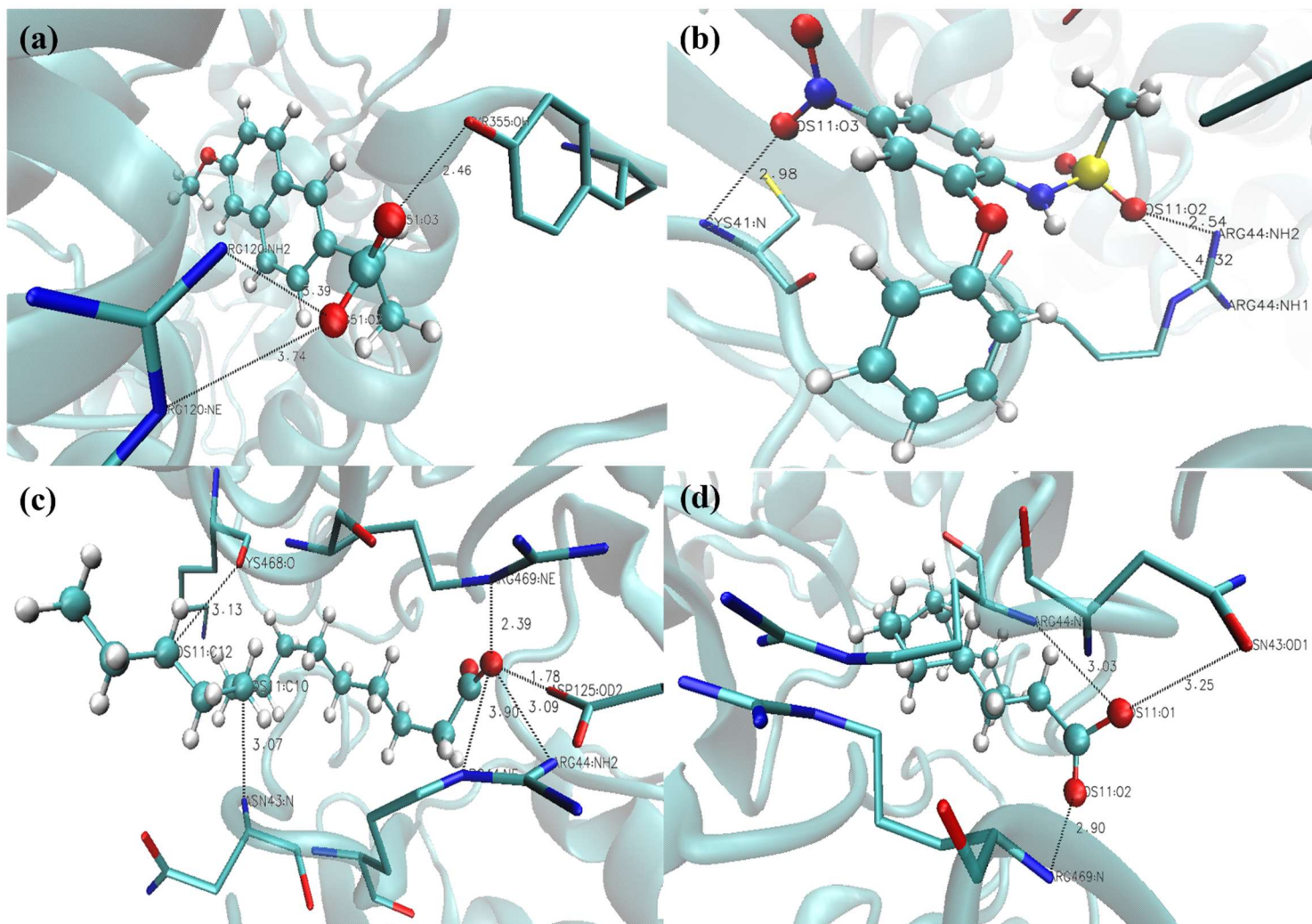
Para os ácidos insaturados a figura 16 (f) evidencia uma ligação de hidrogênio do ácido linoleico com o resíduo ARG44 em 2,37Å; interações eletrostáticas com o aspartato (ASP125) em 2,79Å e, interação estérica com os resíduos de GLU465, GLY 45, e ARG469. Quando ao ácido linolênico, a figura 16 (g) mostra uma ligação de hidrogênio com o resíduo de glutamato (GLU465), e interações estéricas com os resíduos de ARG44, ARG469, CYS41, CYS47, glutamina (GLN461) e leucina (LEU152).

A figura 16 (h) ácido oleico já mostra uma ligação de hidrogênio com o resíduo de ASN43, e interações estéricas com os resíduos de ARG44, LYS468, GLU465 e CYS41.

Por fim, analisando os resultados da Tabela 3, conclui-se que, dos complexos de ácidos graxos saturados, a molécula de ácido mirístico, foi a molécula que apresentou uma energia de afinidade maior que a do ácido esteárico, porém, dentre os ácidos graxos saturados, suas interações são as únicas que se assemelham com as interações obtidas para os ácidos graxos insaturados, quando simulados computacionalmente, como presentes no sítio ativo da COX-2. Além disso, dentre os ácidos graxos insaturados, a molécula de ácido linoleico (**ω6**), foi a que apresentou menor energia de afinidade.

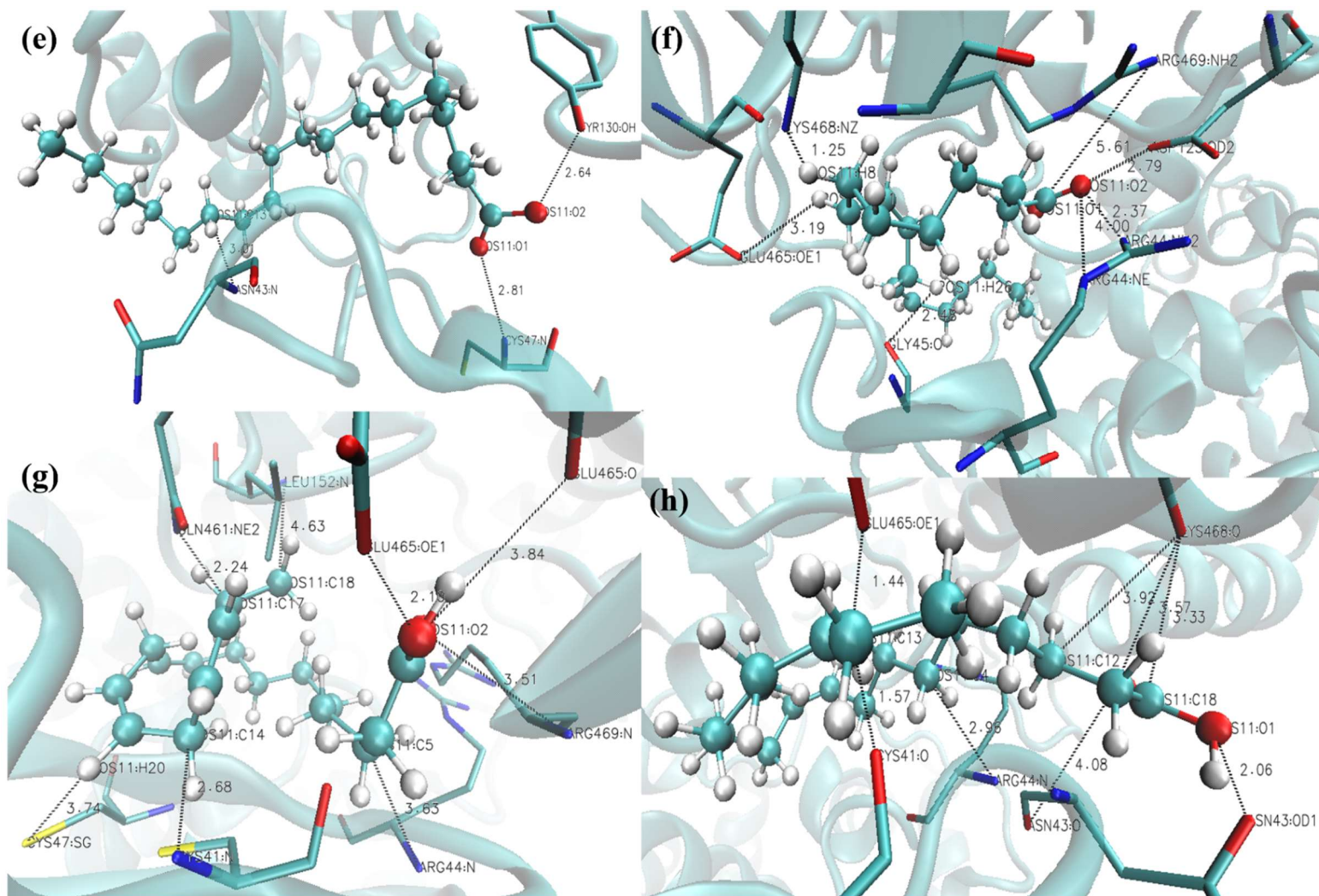
Por essa razão, verificou-se a necessidade de uma investigação mais profunda das moléculas de ácido mirístico e ácido linoleico, complexadas na matriz de HDL formando os complexos de HDL-Ácido Mirístico e HDL- Ácido Linoleico (**ω6**), objetivando comparar suas potencialidades estruturais, morfológicas e vibracionais, com o complexo HDL-Nimesulida.

Figura 15 – Melhores conformações obtidas por cálculos de docagem molecular para (a) inibidor cristalográfico NPS (re-docagem), (b) nimesulida, (c) ácido mirístico e (d) ácido láurico.



Fonte: Própria autora.

Figura 16 – Melhores conformações obtidas por cálculos de docking molecular para (e) ácido esteárico, (f) ácido linoleico, (g) ácido linolênico e (h) ácido oleico.



Fonte: Própria autora.

4.2 Difração de raio x

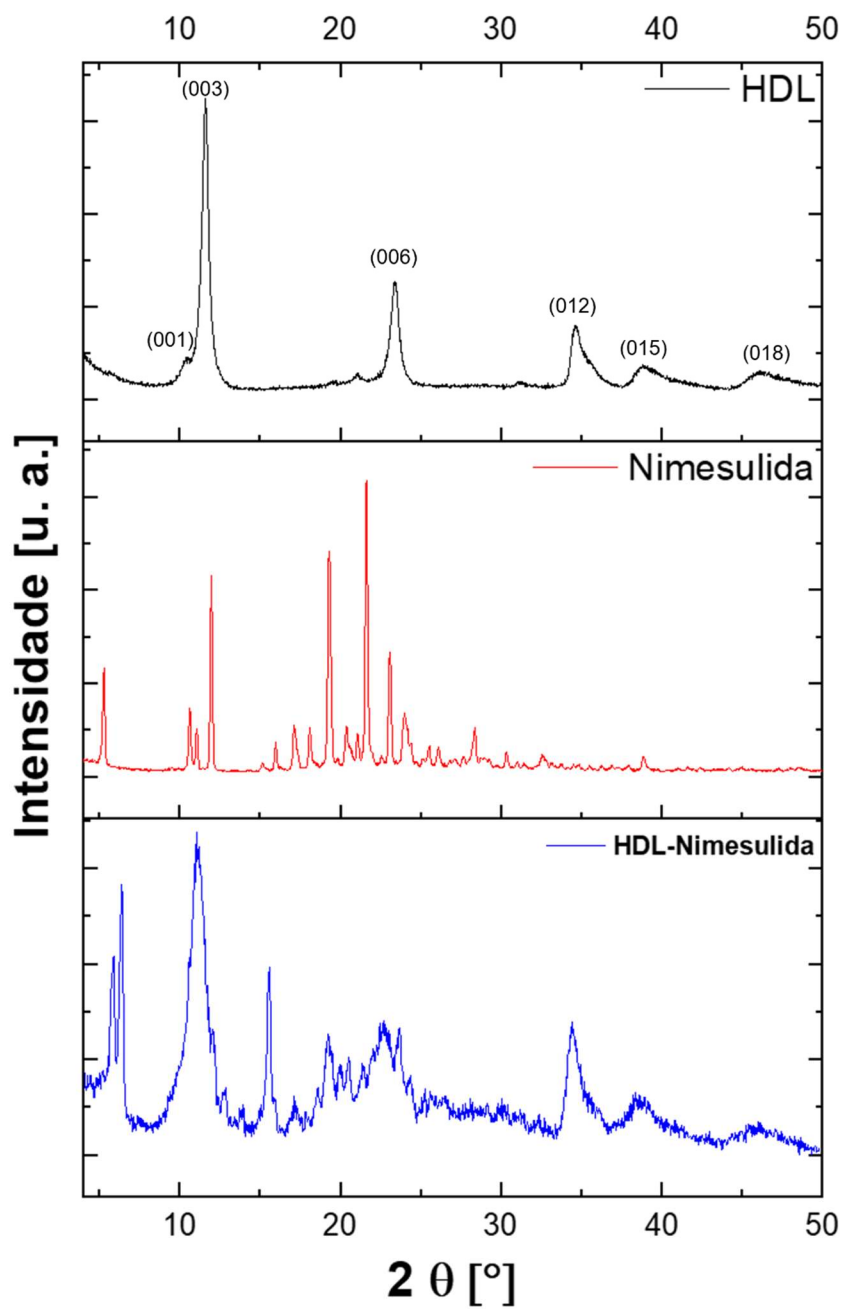
O padrão de difração de raios x (cristalino) obtido, e reportados no desenho (figura 17), apresenta perfil com características semelhantes quando comparado ao HDL puro e à nimesulida pura. Todavia, é possível notar que o plano (001) em HDL puro se deslocou para mais baixos ângulos no complexo HDL-nimesulida em 5,8° e 6,3°, respectivamente, o que comprova a presença de nimesulida no complexo HDL-nimesulida.

Ainda em relação ao desenho (figura 17), quando comparado, o plano (003), em HDL puro, este deslocou de 11,5° para 11,0° em HDL-Nimesulida seguido de consequente alteração da distância interplanar (d) de 7,6Å para 8,0Å; o que sugere, fortemente, a intercalação da nimesulida na matriz de HDL, uma vez que, o valor de “ d ” é modificado, quando ocorre mudança no tamanho do ânion presente na região interlamelar. Dessa forma, pode-se sugerir que a presença da nimesulida nos interstícios interlamelares aumentaram o valor do espaçamento basal.

No complexo HDL-nimesulida (desenho – figura 17), nota-se ainda a presença de picos entre os ângulos de 15,5° à 23,6° sendo que na amostra de HDL puro ocorre apenas um pico em 23,4°, o qual é relativo ao plano (006). Tais picos caracterizam a presença da molécula de nimesulida acomodada de maneira diferente ao ânion nitrato quando presente na matriz HDL.

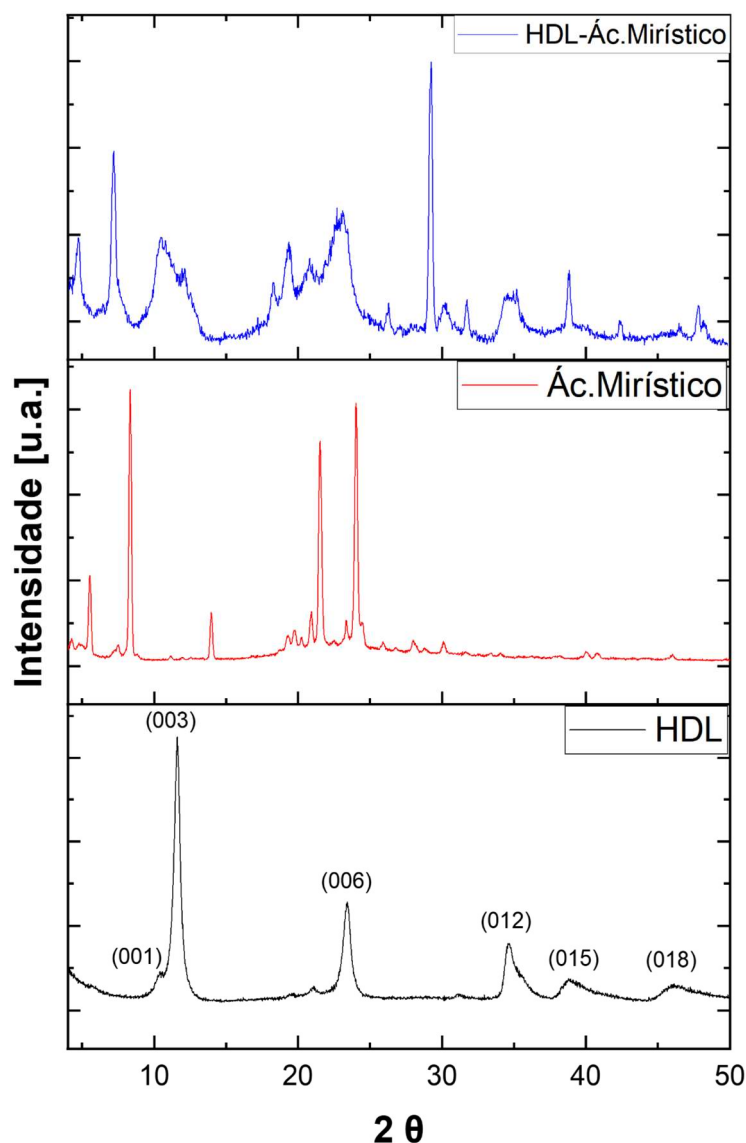
A alteração na distância interplanar não evidencia uma total mudança estrutural pois, os planos (012), (015) e (018) característicos na amostra de HDL puro permaneceram evidenciados no complexo de HDL-nimesulida além de não ter ocorrido deslocamento significativo dos picos.

Figura 17 - Padrão de difração de raios X (cristalino) obtido para as amostras de HDL puro, nimesulida pura e o complexo inédito de HDL-nimesulida.



Em relação as características estruturais do complexo HDL-ácido tetradecanóico, estas podem ser analisadas observando o difratograma de raio X de pó (DRX) mostrado na figura 18, a qual identifica ainda, o DRX do HDL puro e do ácido mirístico puro (C14).

Figura 18 - Padrão de difração de raios X (cristalino) obtido para as amostras de HDL puro, ácido tetradecanóico puro e o complexo inédito de HDL- tetradecanóico.



Nesta figura 18, O material HDL-ácido tetradecanóico demonstra característica de complexação obtida a partir de seus precursores (HDL e ácido tetradecanóico puros) uma vez que, o ácido tetradecanóico, quando puro, apresenta picos em 2θ ; em torno de 5.5° e 8.3° respectivamente, porém, após o processo de intercalação entre o HDL e o ácido mirístico, houve um deslocamento desses dois picos para baixos ângulos: em torno de 4.6° e 7.3° em 2θ , respectivamente. Nesses picos a distância interplanar (d) do complexo mede 18.9nm e 12.4nm respectivamente. Nesses picos a largura total e meia altura (FWHM do inglês, *full-width-at-half-maximum*) desses picos são largas e medem 0.25° e 0.29° o que caracteriza a presença do ácido mirístico na estrutura do HDL.

O plano refratado (003) presente na estrutura do HDL, identificado na figura 18, em 2θ , por volta de 11.5° , com FWHM de 0.2° ; quando comparado ao complexo HDL-ácido tetradecanóico, também sofreu um leve deslocamento para 10.4° em 2θ e, um alargamento FWHM de 1.2° . A distância basal nesse plano (003) passou de 8.4nm no HDL puro para 8.6nm no complexo intercalado. O espaçamento de 8.4nm do HDL puro é semelhante aos resultados reportados na literatura, o qual atribui esse elevado valor, a partir de 8nm de espaçamento basal, à presença do ânion nitrato na estrutura (MIYATA,1983). Assim, quando o quando nitrato foi substituído pelo ácido tetradecanóico, um novo arranjo estrutural foi adotado pela nova estrutura favorecendo o empacotamento do ácido mirístico e, ocasionando um aumento do espaçamento basal para melhor acomodar a molécula do ácido tetradecanóico e por conseguinte, melhor distribuir de cargas nas lamelas no complexo formado HDL-C14.

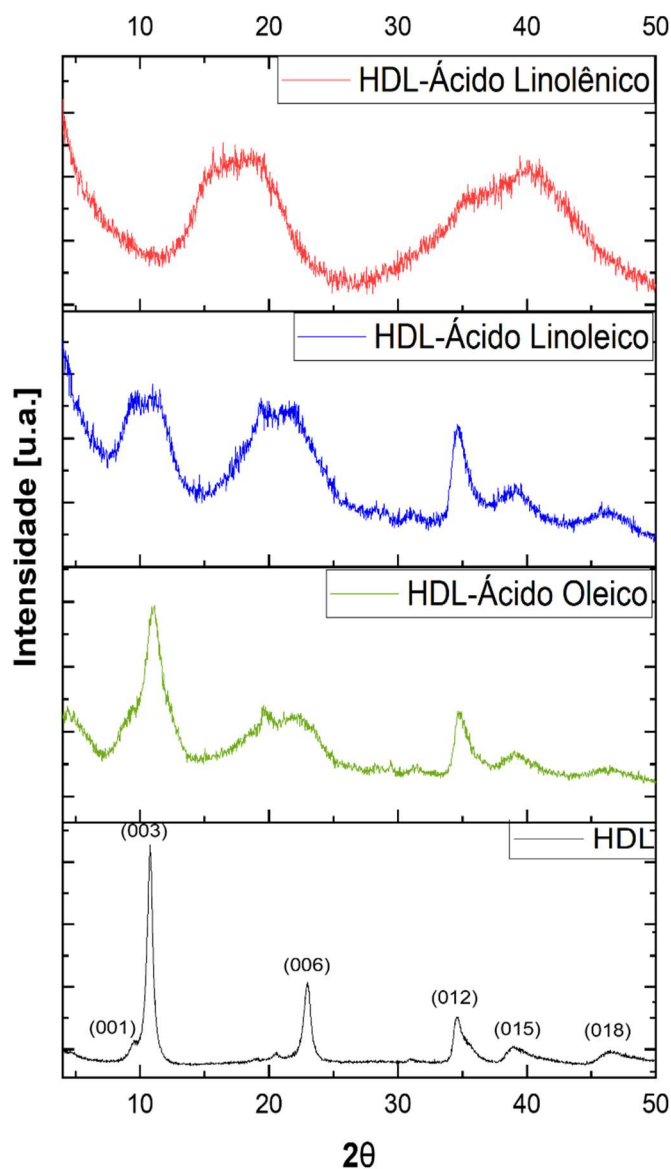
A figura 18 identifica, ainda, o ácido mirístico puro em 2θ , na faixa entre 19° e 21° com três picos de baixa intensidade. Contudo, após o processo de intercalação o pico menor em 20.2° se funde com o pico 20.9° para formar no novo complexo uma sobreposição desses picos, identificada pelo pico 20.8° em 2θ , no complexo formado; caracterizando assim, a interação dos íons bi e trivalentes (Mg^{+2}/Al^{+3}) do HDL com ácido tetradecanóico. Por conseguinte, os outros dois picos do ácido mirístico em 2θ : 19.2° e 19.7° aumentaram de intensidade pelas mesmas razões, porém, ambos se deslocaram para ângulos mais baixos. O pico 19.2° deslocou para 18.1° e o pico 19.7° para 19.3° . A reflexão basal de menor intensidade, em $20,9^\circ$ (já mencionado anteriormente do ácido tetradecanóico), e a de maior intensidade $2\theta=21.5^\circ$ ambas são reportadas na literatura como sendo os planos (40-2) e (31-1), respectivamente (MIRANDA, J.R.S., *et al.*, 2019).

As reflexões do ácido tetradecanóico de 23.3° e 23.9° ficaram sobrepostas ao plano (006) do HDL no complexo formado HDL-ácido tetradecanóico dando origem a um largo e intenso pico em 2θ em torno de 23.1° . E o plano (11-2) em cerca de $2\theta=26^\circ$ mais intenso no complexo HDL-tetradecanóico confirmando a intercalação lamelar no HDL bem como os planos (012), (015) e (018) do HDL fazem-se presentes na estrutura complexada HDL-ácido tetradecanóico.

Com relação aos ácidos graxos insaturados, intercalados com HDL, a figura 19 mostra os difratogramas correspondentes as amostras de HDL puro e, dos ácidos graxos insaturados, ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico, respectivamente, complexadas na matriz de HDL. Esse comparativo foi realizado em razão das amostras fazerem referência as moléculas insaturadas, de menor e maior energia de afinidade, obtidas nos resultados de docagem molecular, correspondente aos complexos HDL-Ácido Linoleico e HDL-Ácido Oleico, respectivamente. O

complexo HDL-ácido linolênico foi investigado pois, o resultado de docagem molecular apresentou uma energia de afinidade muito próxima do valor encontrado para o ácido linoleico.

Figura 19 - Padrão de difração de raios X (cristalino) obtido para as amostras de HDL puro, HDL-Ácido Linolênico, HDL-Ácido Linoleico e HDL-Ácido Oleico.



Nesta figura 19, observa-se que tanto o complexo de HDL-ácido linoleico quanto o complexo HDL-ácido oleico, demonstram características semelhantes ao difratograma obtido para a matriz de HDL puro. Porém, o plano refratado (003) presente na estrutura do HDL, identificado na figura 19, em 2θ , por volta de 11.5° , com FWHM de 0.2° ; quando comparado ao complexo HDL-ácido linoleico, sofreu um alargamento significativo, sugerindo uma possível complexação do ácido linoleico na matriz de HDL. O mesmo aconteceu com relação ao plano

(006). Os planos (012), (015) e (018), presentes na estrutura de HDL puro, mantiveram-se perceptíveis quanto no complexo de HDL-ácido oleico quanto em HDL-ácido linoleico.

Já o complexo HDL-ácido linolênico evidencia uma forte tendência de amorfização estrutural. E quando se compara os três complexos percebe-se claramente a influência da insaturação sob as estruturas formadas, ou seja, quanto maior o número de insaturações presentes nas moléculas de ácidos graxos, maior será a tendência de amorfização estrutural, mediante à tentativa de complexação na matriz de HDL-Magnésio/Alumínio, ou seja, quanto maior o número de insaturações presentes na molécula a ser complexada na estrutura do HDL, maior será a tendência de deformação estrutural do complexo a ser formado.

Além disso, sugere-se que há um limite de insaturação permitido na molécula a ser complexada. A figura 19 sugere que até duas insaturações presentes em ácidos graxos insaturados, o complexo a ser formado com HDL poderá complexar a molécula, porém, já irá apresentar alargamento dos planos (001), (003) e (006), quando presentes em baixos ângulos theta. Com isso, a partir de três insaturações presentes na molécula, de ácido graxo insaturado, haverá uma tendência de amorfização estrutural do complexo formado. Logo, o teor de cristalinidade presente nos complexos diminui conforme aumenta o número de insaturações presentes nas moléculas de ácidos graxos.

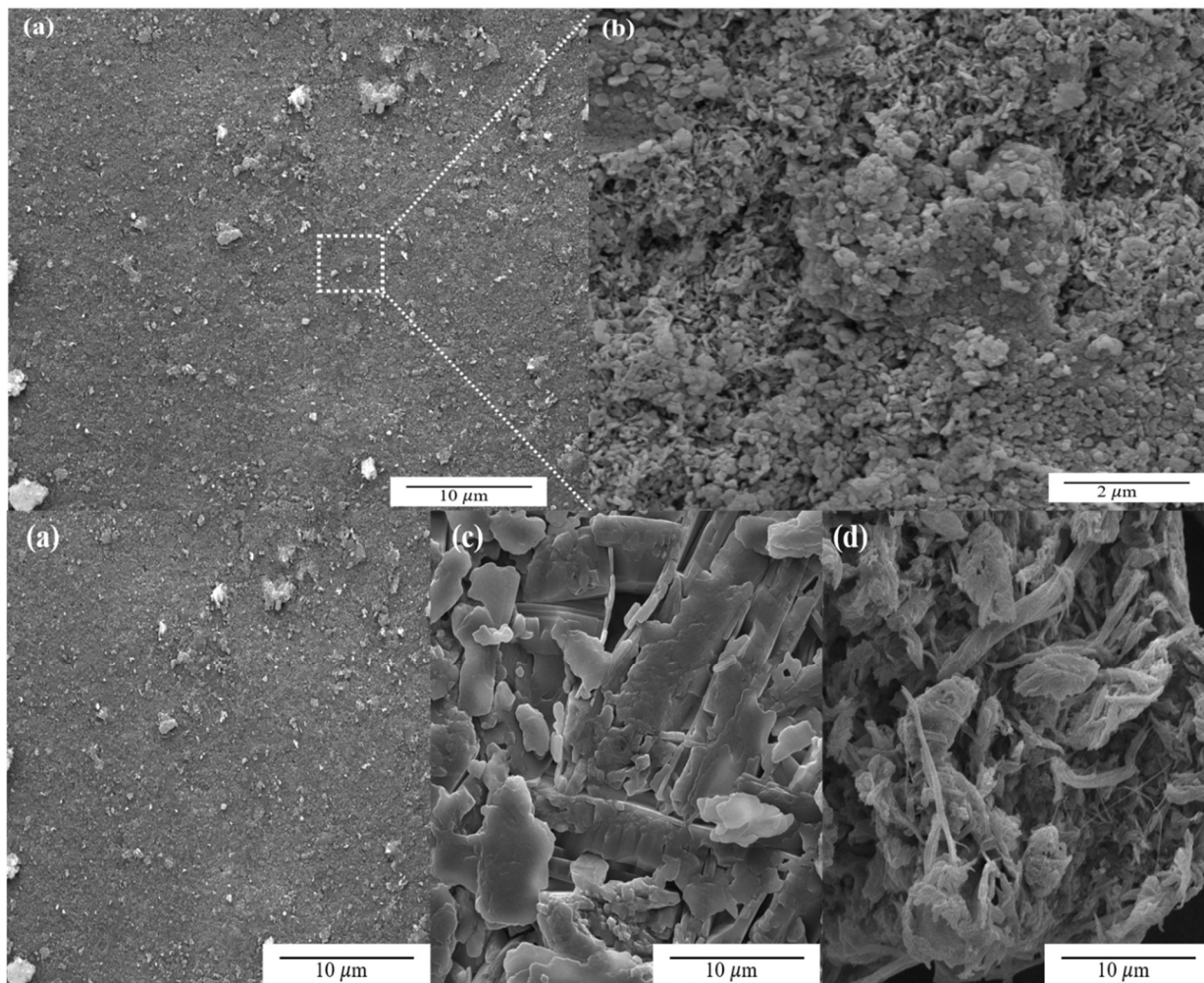
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Alta Resolução (MEV-FEG)

As análises de FEG para as amostras de HDL, nimesulida e HDL-nimesulida, foram realizadas com uma tensão de 10kV, a uma distância de trabalho de 12mm para o HDL e 9mm para o nimesulida pura e HDL-Nimesulida, respectivamente. As amostras estão identificadas na figura 20, a qual mostra em (a) a superfície da matriz cerâmica de HDL em ampliação 5,54kx, formada por regiões com maiores destaques de aglomerados e uma superfície com rugosidade característica, típica de hidróxidos duplos lamelares.

A figura 20 (b), já mostra uma ampliação da região tracejada (em branco), contida na figura 20 (a). Tal ampliação foi realizada em uma magnificação 27,7kx, onde é possível observar aglomerados esféricos da ordem, possivelmente nanométrica, caracterizando que os HDL são formados por aglomerados de plaquetas esféricas.

A figura 20 (c) apresenta a nimesulida pura, em uma magnificação de 5,54kx, apresentando-se como placas irregularidades em suas formas superficiais e em figura 20 (d) a amostra intercalada de HDL-nimesulida, ampliada em 7,13kx contendo uma superfície rugosa com aglomerados de formas elípticas e filamentos alongados, sendo ambos irregulares.

Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em (a) Superfície da matriz cerâmica de HDL-Mg/Al; (b) ampliação da região tracejada (em branco), presente na figura 20 (a); (c) Nimesulida pura formando placas irregulares; (d) HDL-Nimesulida formando aglomerados elípticos e filamentos alongados irregulares.



Fonte: Própria autora.

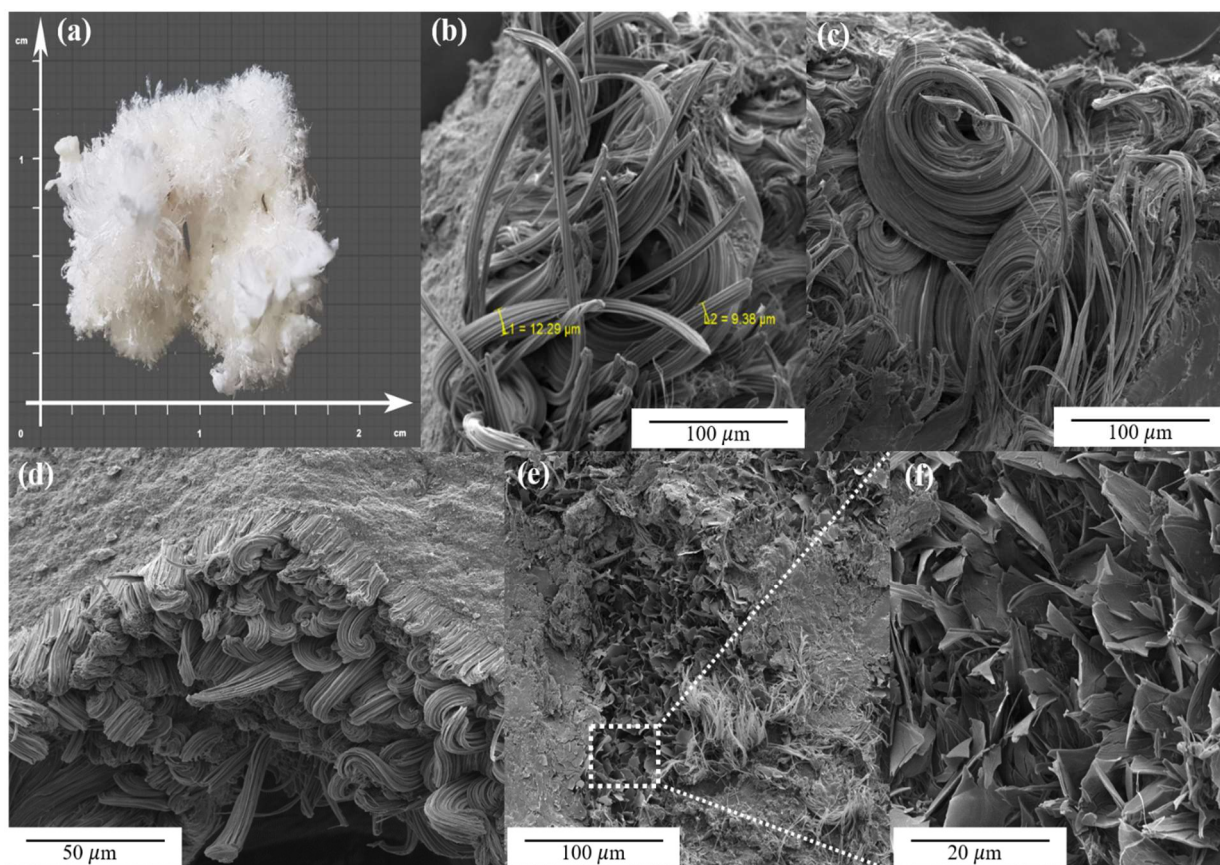
A síntese de HDL-ácido tetradecanóico obtida está identificada na figura 21 (a). A análise de FEG dessa amostra foi realizada em uma voltagem de 5kv, a uma distância de trabalho de 12mm e em magnificações de 814x, 726x, 1,47kx, 561x e 2,80kx correspondentes às micrografias da figura 21 (b), (c), (d), (e) e (f)), respectivamente.

Dessa forma, a figura 21 (a) consiste em uma fotografia do complexo HDL-ácido tetradecanóico com vista superior e disposto em uma placa de Petri, onde fica evidente, de forma macro, a formação de fios alongados e muito finos no complexo formado.

A figura 21 (b) mostra uma micrografia obtida por microscopia eletrônica de alta resolução (FEG), em ampliação de 814x, onde é possível identificar que os fios observados na

figura 21 (b) são formados por aglomerados de fios alongados e muito finos. Esses aglomerados de fios apresentam dimensões variadas com larguras entre $9.38\ \mu\text{m}$ e $12.29\ \mu\text{m}$. Dimensões individualizadas desses fios podem chegar a especificações nanométricas menores que 500nm onde, em aglomerados de fios mais finos e alongados podem crescer facilmente, com capacidade de formar, superficialmente, fios enovelados, visíveis em uma ampliação de $726\times$, como mostrado na figura 21 (c).

Figura 21 – (a) Fotografia do complexo HDL-Ácido Tetradecanóico (b), identificação dos aglomerados de fios alongados e muito finos, em ampliação de $814\times$ (c) novelos de fios aglomerados em $726\times$ (d) novelos de fios recobertos pela camada de HDL, em $1,47\times$ (e) região de transição tracejada identificando a camada de HDL recobrindo os fios, em $561\times$ (f) ampliação da região tracejada em (e), com ampliação de $2,80\times$.



Fonte: Própria autora.

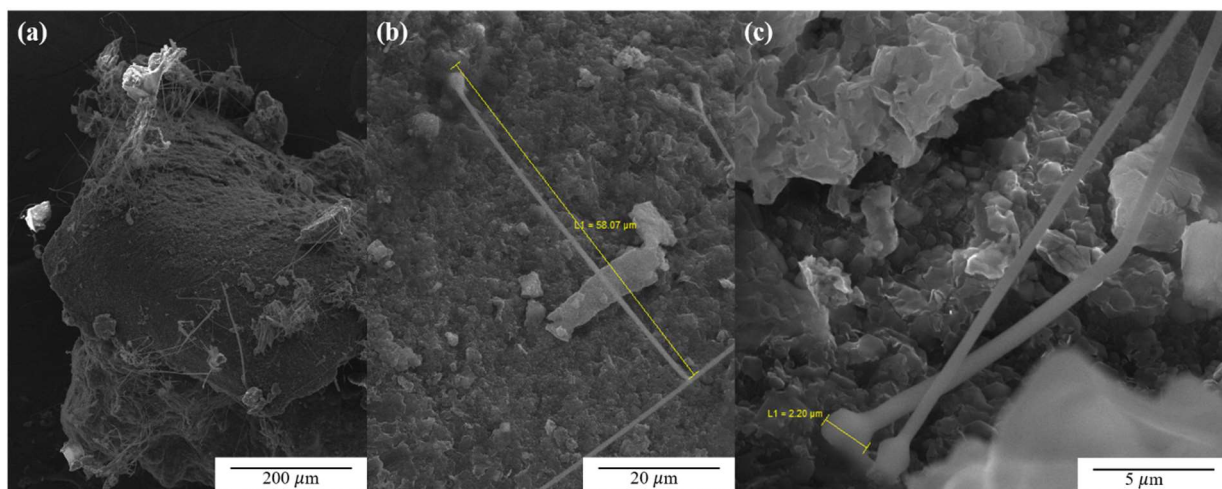
Esses novelos de fios, mostradas na figura 21 (d), são recobertos uniformemente por finas camadas aglomeradas de HDL sendo perceptíveis na região de fratura transversal do material, com ampliação $1.47\times$.

As camadas aglomeradas, presentes na superfície dessa amostra, podem ser identificadas na região tracejada da figura 21 (e), com ampliação de 561x recobrimdo os fios. Sendo que em ampliações menores como em 2.80kx, observa-se na figura 21 (f), que as camadas aglomeradas superficiais são folhas lamelares muito finas, de formato irregular e, de superfície parcialmente rugosa, as quais são possivelmente são as camadas de HDL, responsáveis estruturação lamelar nanoestruturada do complexo HDL-ácido mirístico.

Por conseguinte, essas camadas de HDL são responsáveis pelo empacotamento do ácido tetradecanóico além de facilitar o crescimento dos fios por aglomerados nanométricos. Assim, no âmbito morfológico, o complexo é caracterizado pela capacidade de formação de fios longos, finos, capazes de formar novelos, o que minimiza a energia e melhora a distribuição das cargas do sistema.

Em relação a microscopia eletrônica de varredura da amostra de HDL- Ácido Linolênico ($\omega 3$) esta foi realizada em uma tensão de 20kV, a uma distância de trabalho de 15mm (figura 22). A figura 22 (a) está com uma magnificação de 240x e identifica alguns fios alongados presentes na superfície dessa amostra. A figura 22 (b) está em uma ampliação de 2,00kx e, mostra o comprimento em torno de 58,07 μm , desses fios presentes na superfície da amostra de HDL- $\omega 3$. E a figura 22 (c) é possível notar que em uma magnificação de 7,00kx, os fios presentes nessas amostras crescem a partir de uma espécie de bulbo, com dimensão em torno de 2,20 μm , presente na superfície da amostra.

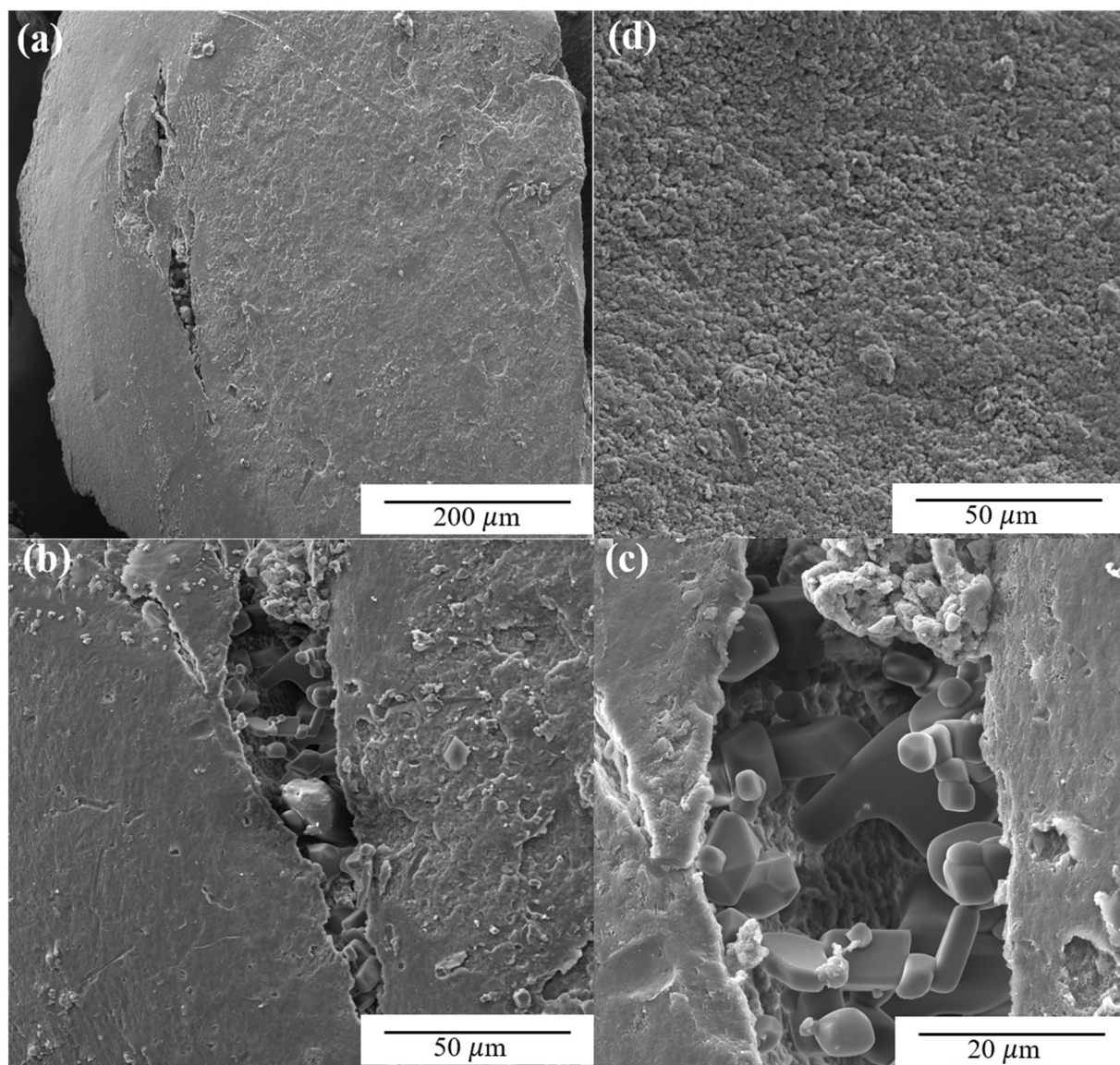
Figura 22 – (a) Fios alongados superficiais presentes na amostra HDL- Ácido Linolênico ($\omega 3$) (b), identificação do comprimento de fio alongado e fino presente na superfície do HDL- $\omega 3$; (c) crescimento do fio a partir do bulbo presente na superfície da amostra de HDL- $\omega 3$.



Fonte: Própria autora.

A microscopia eletrônica de alta resolução da amostra de HDL- Ácido Linolênico ($\omega 3$) foi realizada em uma tensão de 10kV e, em uma distância de trabalho de 12mm e estão identificadas na figura 23.

Figura 23– (a) Ausência de fios alongados superficialmente na amostra HDL- Ácido Linolênico ($\omega 3$) (b), identificação de morfologia interna diferente da sua superfície do HDL- $\omega 3$; (c) presença de formas arredondadas, quadradas e tubulares presentes na morfologia interna do HDL- $\omega 3$; (d) superfície irregular e morfologicamente heterogênea.



Fonte: Própria autora.

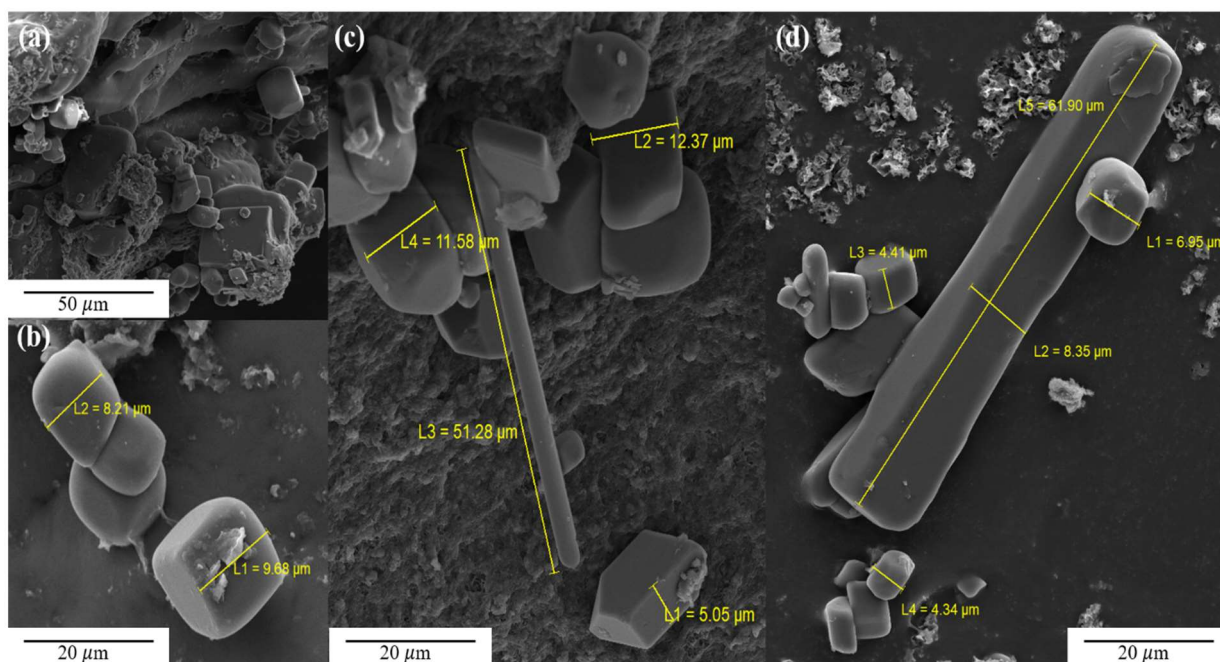
Os resultados da análise de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG), para a amostra de HDL- $\omega 3$, identificação na figura 23 (a) não identifica, em magnificação de 302x, a

presença dos fios alongados e finos na superfície da amostra. Provavelmente, isso deve ter ocorrido em razão deste serem poucos e muito finos, o que pode ter resultado em quebras durante o transporte e preparo da amostra.

Todavia, percebe-se ainda na figura 23 (a) a presença de uma abertura na superfície analisada. Essa abertura pode ser mais bem analisada em uma ampliação de 1,38kx da figura 23 (b), a qual mostra um material com características internas diferentes de sua superfície.

Ao magnificar para 4,15kx, essa mesma região, percebe-se em figura 23 (c), que internamente o material é formado arredondadas, quadradas e tubulares. Ainda na figura 23 em (d) torna-se evidente uma superfície totalmente irregular e morfologicamente heterogênea. Por isso, houve a necessidade de investigar um pouco mais, a morfologia interna da amostra de HDL- ω 3. O resultado dessa investigação está identificado na figura 24.

Figura 24 – FEG da amostra HDL- Ácido Linolênico (ω 3) (a) em magnificação de 1,38kx, com formas quadradas de diferentes dimensões (b) em 4,07kx, identificação de formas quadradas entre 8 e 9 μ m; (c) formas quadradas em ampliação de 2,77kx com variações de 12,37 μ m e fio tubular; (d) superfície irregular e morfologicamente heterogênea com forma retangular de comprimento.



Fonte: Própria autora.

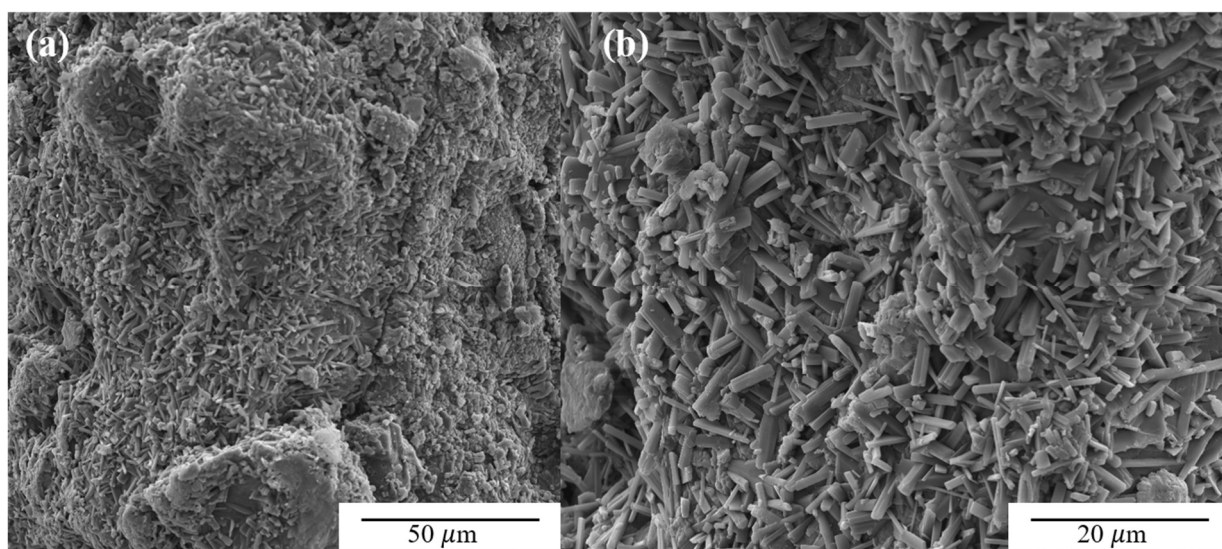
Na figura 24, foi possível encontrar uma morfologia de formas quadradas e tubulares de diferentes comprimentos, onde na figura 24 (a) em magnificação de 1,38kx, nota-se a presença de uma morfologia aglomerada de formas quadradas de diferentes dimensões.

Já na figura 24 (b) em 4,07kx, as formas quadradas apresentam dimensões similares variando entre 8 e 9 μm . E na figura 24 (c), na ampliação de 2,77kx observa-se que as formas quadradas podem ser encontradas com variações ainda maiores como 12,37 μm e ainda, nessa ampliação foi possível visualizar a presença de um fio tubular de 51,28 μm de comprimento.

Ainda na figura 24 (d) nota-se a presença de uma forma retangular de comprimento 61,90 μm e com 8,35 μm de largura; levemente arredondada das extremidades além de, outras formas quadradas, em sua maioria.

Para a amostra de HDL-ácido linoleico ($\omega 6$) a microscopia eletrônica de alta resolução (FEG), foi realizada em uma tensão de 10kV e em uma distância de trabalho de 12mm onde, observa-se na figura 25 (a), em uma magnificação de 1,38kx, que houve uma alteração na superfície morfológica. É visível a presença de aglomerados mais finos e distribuídos de forma homogênea em toda sua superfície. E em figura 25 (b) confirma-se uma distribuição mais homogênea de formas tubulares, provavelmente ocasionada em decorrência do menor número de insaturações presentes no ácido graxo ($\omega 6$ – 2 insaturações) intercalado no HDL quando comparado com o ácido graxo ($\omega 3$ – 3 insaturações).

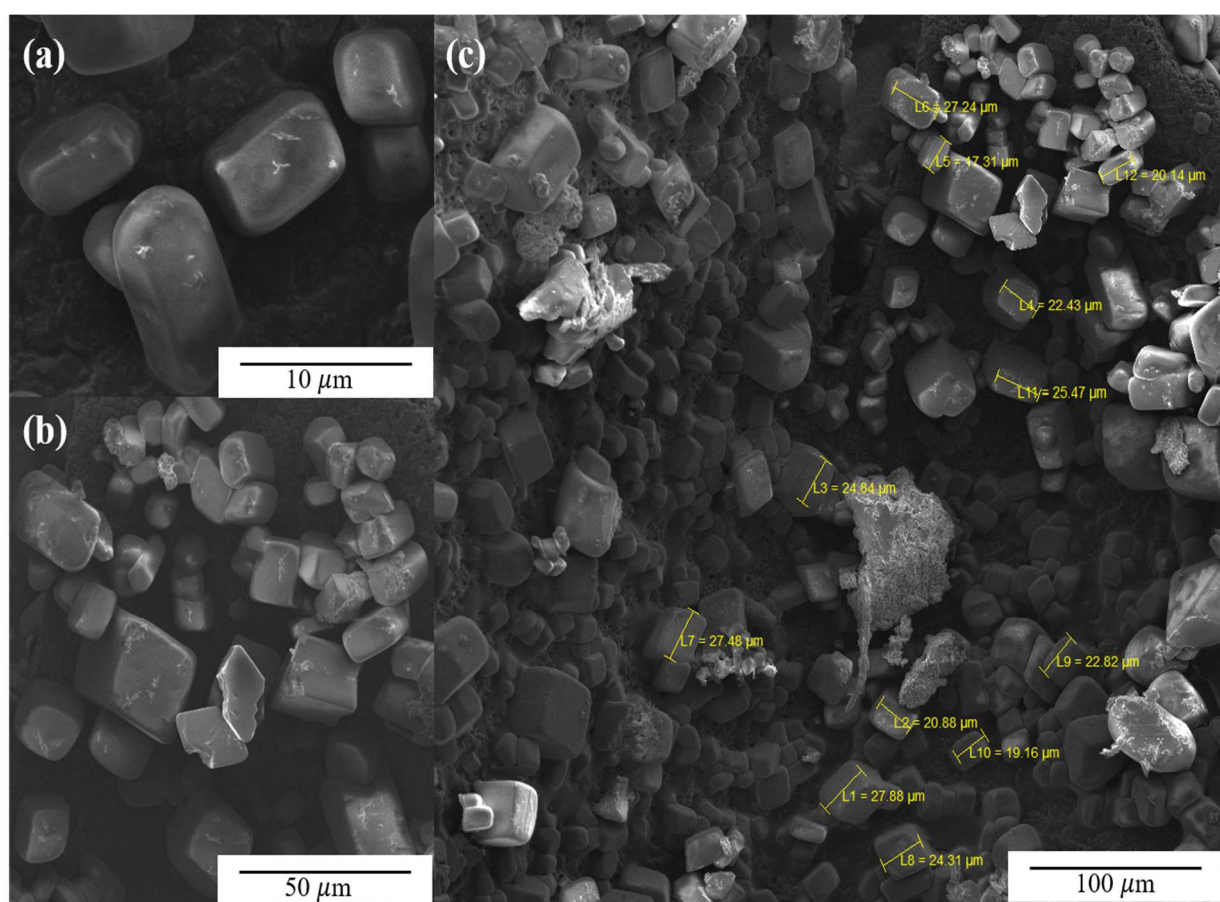
Figura 25 – FEG da amostra HDL-ácido linoleico ($\omega 6$) (a) em magnificação de 1,38kx, evidenciando aglomerados finos distribuídos uniformemente em toda sua superfície (b) em 2,77kx, distribuição homogênea de formas tubulares.



Fonte: Própria autora.

Essa observação tornou-se mais relevante quando comparamos estes resultados de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG) dos ácidos graxos $\omega 3$ e $\omega 6$ intercalados com o HDL, com os resultados de microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtidos para o HDL intercalado com o ácido oleico ($\omega 9$) – correspondentes à figura 26. O MEV da amostra de HDL-ácido oleico foi realizado utilizando uma tensão de 5kV, em uma distância de trabalho de 12mm.

Figura 26 – MEV da amostra HDL-ácido oleico ($\omega 9$) (a) em magnificação de 1,38kx, evidenciando aglomerados finos distribuídos uniformemente em toda sua superfície (b) em 2,77kx, distribuição homogênea de formas tubulares (c) na magnificação de 528x, destacando uma variação das dimensões distribuídas, predominantemente, em torno de $19,16\mu\text{m}$ à $27,88\mu\text{m}$.



Fonte: Própria autora.

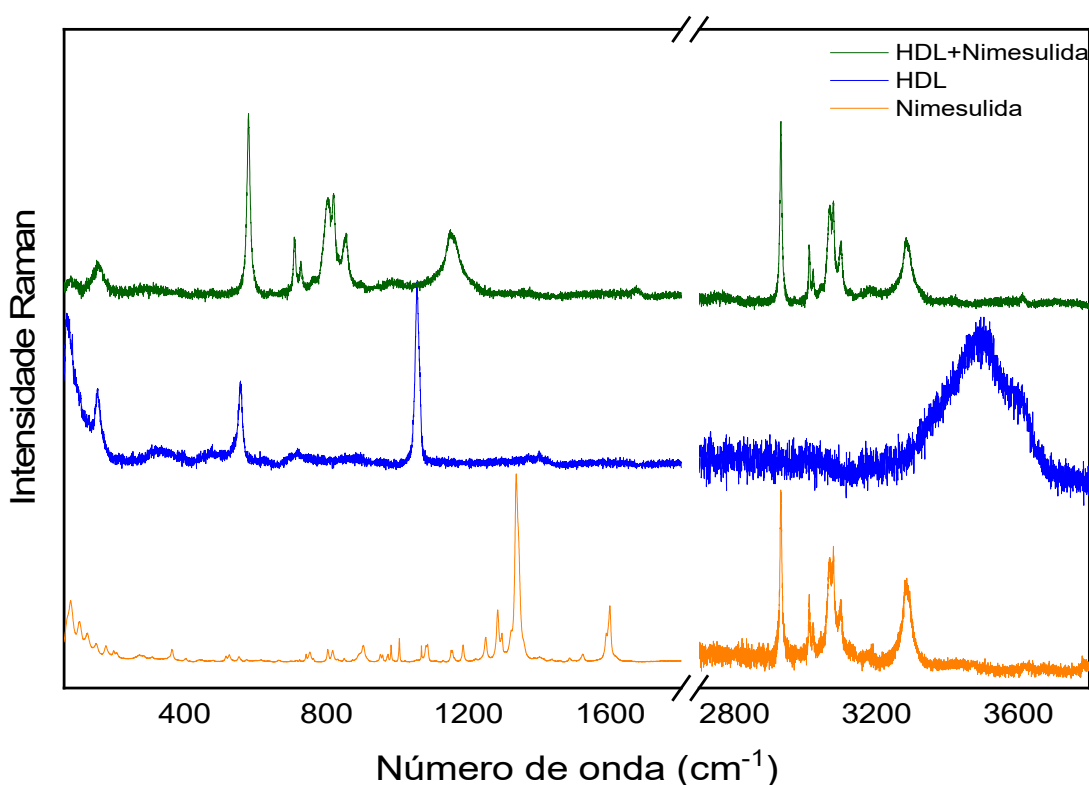
A figura 26 (a) está em uma magnificação de 4,43kx e mostra a presença de formas regulares quadradas, levemente arredondadas; já em uma ampliação de 1,07kx em figura 26 (b) observa-se uma uniformidade de distribuição superficial e em figura 26 (c) na magnificação de 528x, há destaque para uma variação das dimensões distribuídas, predominantemente, em torno de $19,16\mu\text{m}$ à $27,88\mu\text{m}$. Dessa forma, é possível sugerir que quanto maior o grau de insaturação

presente no ácido graxo, a ser intercalado na matriz de HDL, maior será o grau de variação morfológica das formas obtidas superficialmente.

4.4 Espectroscopia Vibracional Raman

A figura 27 mostra os espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor laranja) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor verde), as quais foram medidas em condições de pressão e temperatura ambiente.

Figura 27 - Espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor laranja) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor verde).

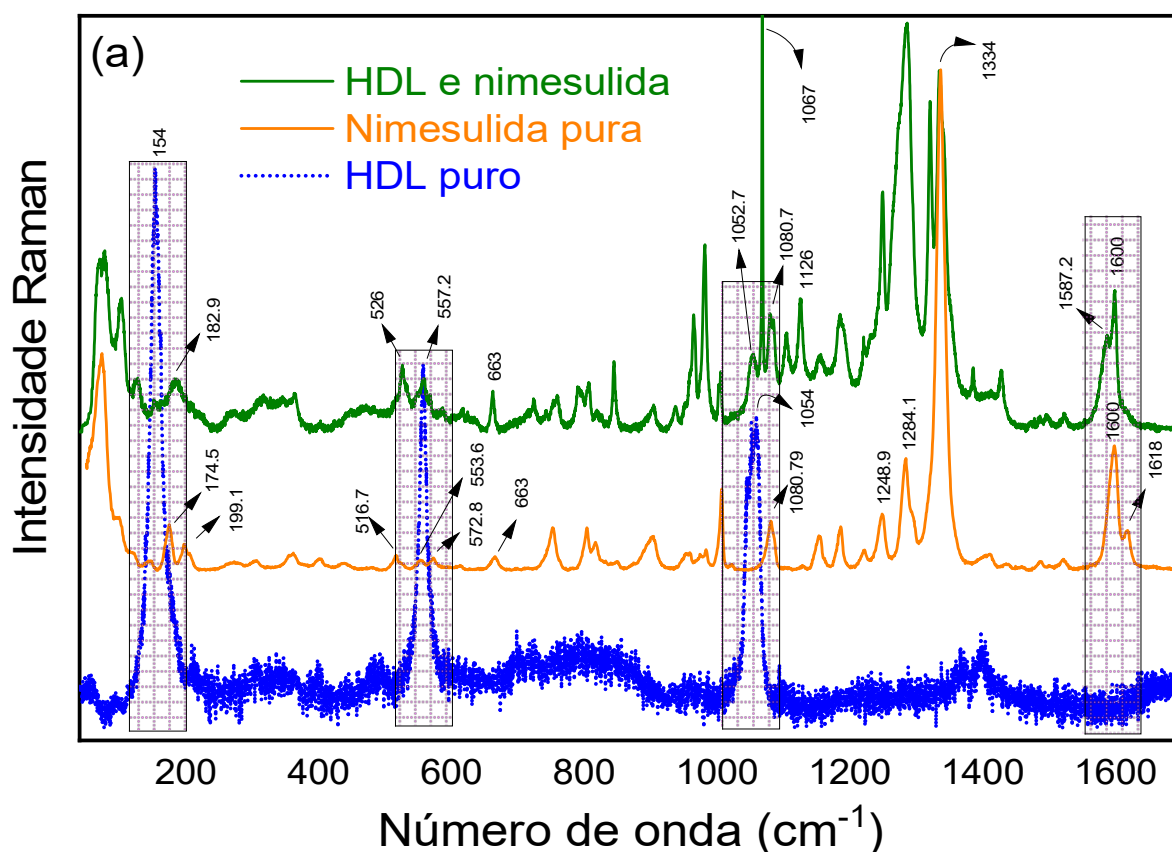


Nesses espectros é possível notar intensidades relativas, simétricas e assimétricas, divididas em duas faixas de número de onda: a primeira região dos espectros mostra modos normais de vibração de 40 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} e a segunda região do espectro de 2800 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} .

Para uma melhor avaliação desses modos vibracionais, as duas faixas espectrais foram separadas em três outras figuras (figura 28, figura 29 e figura 30): A figura 28 (a) correspondente à região espectral de 40 cm^{-1} à 1800 cm^{-1} e a figura 29 (b), é uma ampliação dos modos

vibracionais RAMAN da primeira região dos espectros de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} . Já a figura 30 (c) mostra a segunda região do espectro de espectro de 2800 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} .

Figura 28 – (a) Identificação dos modos vibracionais RAMAN da primeira região dos espectros de 40 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} , obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor laranja) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor verde).



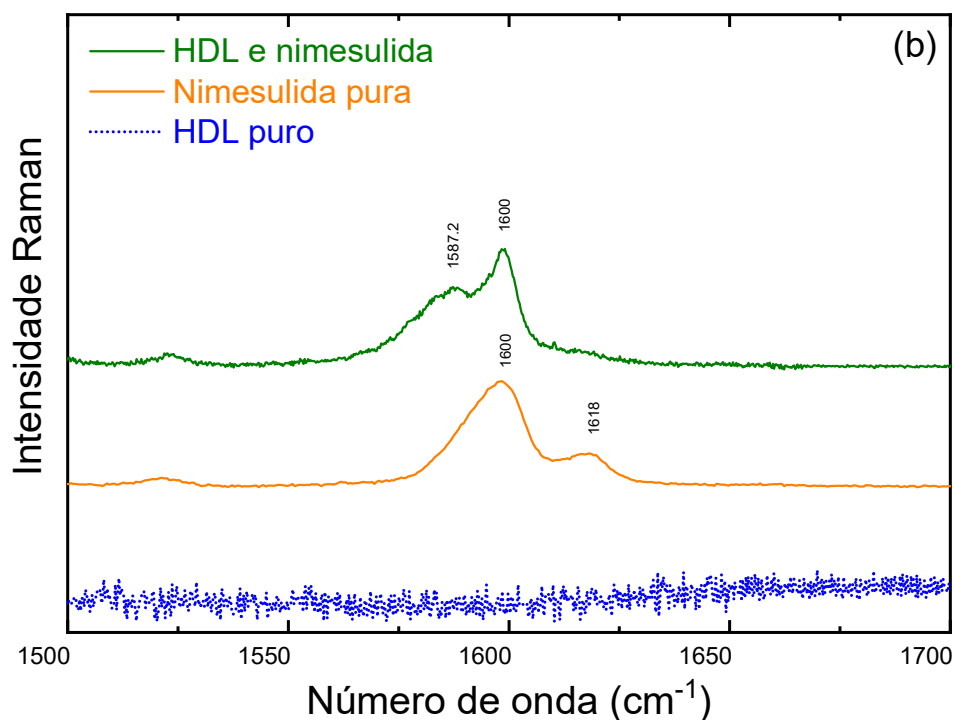
Nessa primeira região, correspondente à figura 28 (a) os espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos na faixa de 40 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor laranja) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor verde) mostram modos vibracionais encontrados abaixo de 200 cm^{-1} referentes aos modos da rede presentes em todas as amostras. Esses são os modos que apresentam baixa energia, conhecidos por modos externos ou modos intramoleculares, os quais fazem referência as vibrações relativas da perturbação dos íons catiônicos e aniônicos, que interagem concomitantemente; com destaque para um modo simétrico a cerca de 154 cm^{-1} no espectro de HDL, já mencionado na literatura como modo translacional de ligação mais curta entre metal hidroxila (Mg-OH e Al-OH) devido ao aumento de atração eletrostática dentro da rede onde em alguns lugares há presença de cátions de alumínio ao invés cátions de magnésio (KAGUNYA, *et al.*, 1998).

Outros modos simétricos e intensos são encontrados no espectro de HDL. A vibração de baixa frequência em 557 cm^{-1} é o modo vibracional de ligação entre metais e o oxigênio *O-M-O* contidos na estrutura lamelar, sendo possivelmente, um modo de estiramento MgAl-OH semelhante aos já encontrados em matrizes de cerâmicas. Já o modo 1059 cm^{-1} é o modo de estiramento simétrico de nitrato (NO_3) (KLOPROGGE & FROST, 1999).

No complexo HDL-nimesulida o destaque é para o modo simétrico e intenso em 1067 cm^{-1} atribuída ao modo de estiramento simétrico N-O; e em 1080 cm^{-1} atribuída a uma deformação assimétrica característica de CH_3 ; e estiramento N-C perto de 1285 cm^{-1} (SOCRATES, 2001). O modo em 1334 cm^{-1} mesma intensidade presente na nimesulida pura e no espectro do complexo HDL-nimesulida é referente ao estiramento simétrico SO_2 o que confirma a intercalação da nimesulida na matriz de HDL.

A região de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} , contendo modos vibracionais RAMAN, das amostras de HDL puro, nimesulida pura e o complexo inédito de HDL-nimesulida foi ampliada para melhor visualizar a região de destaque e essa ampliação está demonstrada na figura 29 (b), na qual, está o HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor laranja) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor verde).

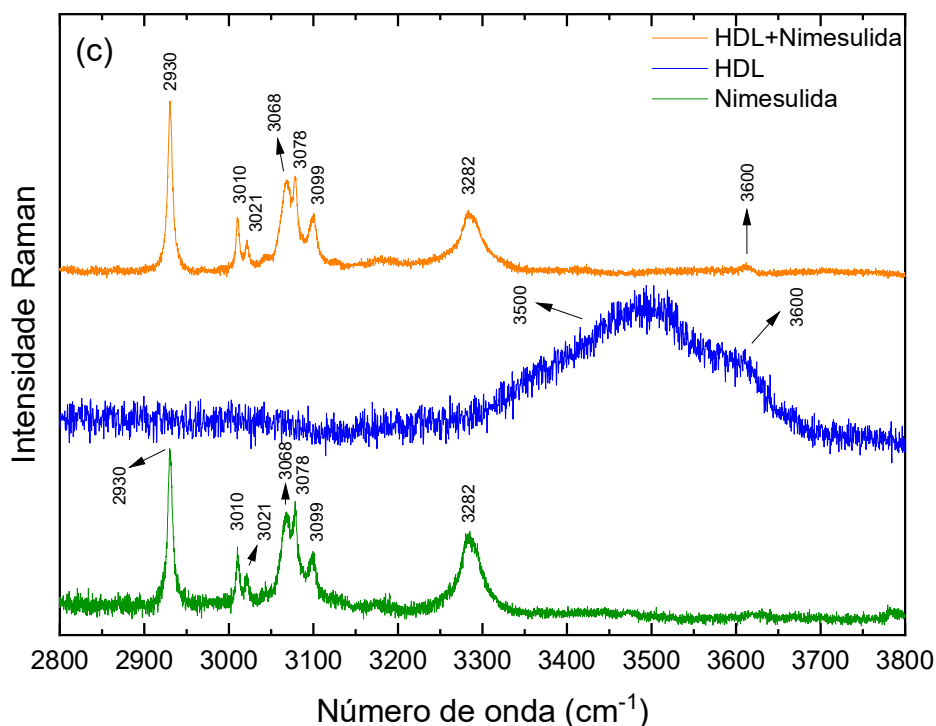
Figura 29 – Ampliação (b) dos modos vibracionais RAMAN da primeira região dos espectros de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} , obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor laranja) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor verde).



Nessa figura, é possível observar modos vibracionais em 1600 cm^{-1} , tanto para o espectro de nimesulida pura quanto para o espectro do complexo HDL-nimesulida, mencionado em literatura específica como referente à deformação vibracional da α -saturação $\text{NH}\cdot\text{CH}_3$, presente no grupamento $-\text{SO}_2\text{-NH-CH}_3$, da nimesulida pura e presente no complexo (SOCRATES, 2001). Além disso, quando se compara os espectros nimesulida pura e HDL-nimesulida, nota-se um deslocamento e/ou uma inversão de modos para baixas frequências de 1618 cm^{-1} para 1587 cm^{-1} , confirmando assim uma complexação e uma possível transição de fase.

A figura 30 (c) mostra modos vibracionais RAMAN da segunda região dos espectros, de 2800 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} , obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor verde) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor laranja).

Figura 30 – Identificação (c) dos modos vibracionais RAMAN da segunda região dos espectros de 2800 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} , obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), nimesulida pura (cor verde) e o complexo inédito de HDL-nimesulida (cor laranja).

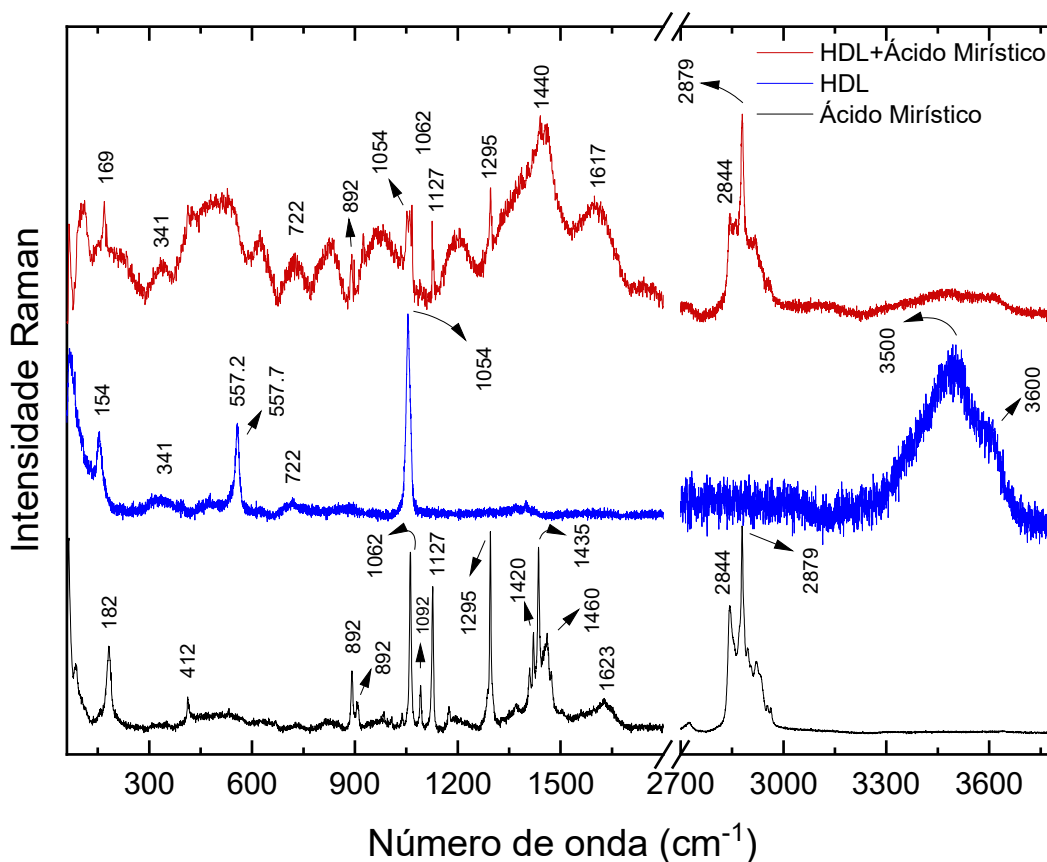


Para o espectro de HDL puro, a faixa de 3200 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} identifica apenas modos característicos de estiramento do grupamento OH^- , presentes possivelmente nas moléculas de água de hidratação, dos grupos hidroxilas distribuídos nas lamelas da matriz cerâmica, sendo comuns em todos os HDL (XU, *et al.*, 2001). Já no complexo intercalado HDL-nimesulida houve uma diminuição desse modo, porém, ainda se manteve presente mesmo em baixa intensidade.

O modo vibracional 2930 cm^{-1} é decorrente da vibração de estiramento simétrico de $-\text{CH}_3$ com intensidade alta, presente no grupamento metil ($-\text{SCH}_3$) da nimesulida; e apresentou similaridade de modo no complexo intercalado, o que confirma a complexação da nimesulida na matriz de HDL. A faixa de 3229 cm^{-1} a 3282 cm^{-1} , por sua vez, presente nos espectros tanto da nimesulida pura quanto no complexo HDL-nimesulida, refere-se a estiramentos assimétricos de N-H, relacionados com ligação de hidrogênio (SOCRATES, 2001).

A figura 31 mostra os espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), ácido mirístico (cor preta) e o complexo inédito de HDL-ácido mirístico (cor vermelho). Nesses espectros modos simétricas e assimétricas podem ser observados divididas em duas faixas de número de onda: a primeira região dos espectros mostra modos normais de vibração de 40 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} e a segunda região do espectro de 2800 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} .

Figura 31 - Espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), ácido mirístico (cor preta) e o complexo inédito de HDL-ácido mirístico (cor vermelho).



Os modos vibracionais encontrados abaixo de 200 cm^{-1} são modos da rede presentes nos três espectros. Desses, o modo 154 cm^{-1} do espectro de HDL, é modo translacional, de ligação mais curta, entre metal hidroxila (Mg-OH e Al-OH) em razão do aumento de atração eletrostática dentro da rede, onde em alguns lugares há presença de cátions de alumínio ao invés cátions de magnésio (KAGUNYA, *et al.*, 1998).

Ainda para os espectros de HDL, modos simétricos e intensos são encontrados em baixa frequência em 557 cm^{-1} como ligação entre metais e o oxigênio *O-M-O* contidos na estrutura lamelar, sendo possivelmente, um modo de estiramento MgAl-OH semelhante aos já encontrados em matrizes de cerâmicas. Já o modo 1054 cm^{-1} é o modo de estiramento simétrico de nitrato (NO_3) (KLOPROGGE & FROST, 1999).

No espectro de ácido mirístico puro dois modos encontrados em 182 cm^{-1} e em 412 cm^{-1} fazem referência ao dobramento $\delta(\text{CCC})$ (MIRANDA, *et al.*, 2019). Já no complexo HDL-ácido mirístico, um único modo assimétrico em 169 cm^{-1} fica evidenciado no modo da rede, decorrente possivelmente de uma sobre posição de modos de HDL e do ácido mirístico nessa região. Sendo que os modos entre de 400 cm^{-1} à 750 cm^{-1} , tanto para o espectro de ácido mirístico puro quanto para o espectro intercalado, estão associados à modos internos de deformação (CCC) referentes às vibrações de ligações entre carbonos.

Na região próxima a cerca de 890 cm^{-1} , a literatura reporta um estiramento dos carbonos (C13 e C14 , $\nu(\text{C13C14})$) (MIRANDA, *et al.*, 2019). Esse modo se faz presente em HDL-ácido mirístico. Já a vibração em 892 cm^{-1} presente no espectro de ácido mirístico puro e intercalado HDL-ácido mirístico, é do tipo *rocking* do CH_2 $\rho(\text{CH}_2)$. E o modo translacional em cerca de 154 cm^{-1} , reportado ao espectro de HDL como modo simétrico, faz-se presente em HDL-ácido mirístico, porém de forma assimétrica e de forma menos intensa. A definição de simetria e intensidade do modo pode estar sendo influenciada pela aproximação do modo 1062 cm^{-1} , de estiramento $\nu(\text{CC})$ do ácido mirístico, em relação ao modo 1054 cm^{-1} do espectro do complexo, ou seja, quando ocorreu a intercalação da molécula de ácido mirístico no HDL, ocorreu uma redistribuição de cargas na matriz de HDL para melhor acomodar a molécula causando assim, possíveis sobreposições de modos e consequentemente alterando a intensidade dos modos de simetria.

Consequentemente, o alargamento estrutural dos interstícios lamelares, já demonstrados nos difratograma de raio x, podem ser relacionados em espectroscopia, por exemplo, quando comparadas as faixas de 1200 cm^{-1} à 1800 cm^{-1} do espectro de ácido mirístico puro com a mesma faixa de HDL-ácido mirístico. Observa-se claramente, nessa faixa que modos dessa faixa antes simétricos passaram a ser assimétricos. É o caso das frequências correspondentes aos seguintes

comprimentos de onda: 1295 cm^{-1} ($tw(\text{CH}_2)$); 1420 cm^{-1} – 1440 cm^{-1} ($sc(\text{CH}_2)$). Todavia, no espectro de ácido mirístico puro, a frequência 1623 cm^{-1} , referente ao modo $\nu(\text{C-O})$ apresentou um leve deslocamento para um comprimento de onda mais baixo em 1617 cm^{-1} , de maior intensidade e assimétrico quando o complexo foi formado. Esse comportamento indica provavelmente um alargamento, seguindo de um aumento no número de lamelas durante a formação das lamelas do complexo para acomodar a molécula de ácido mirístico, pois a medida que há um aumento da participação de cátions trivalente, neste caso, do alumínio interagindo com hidroxilas, há um deslocamento para baixo número de onda desses modos $\nu(\text{C-O})$, e esse deslocamento já foi mencionado na literatura, porém, nunca antes mencionado quando complexado HDL-ácido mirístico (KLOPROGGE & FROST, 1999).

O modo vibracional 2844 cm^{-1} e 2879 cm^{-1} presente na molécula de ácido mirístico é decorrente da vibração de estiramento simétrico do CH_2 vs(CH_2); e apresentou similaridade de modo no complexo intercalado, o que confirma a complexação da molécula de ácido mirístico na matriz de HDL.

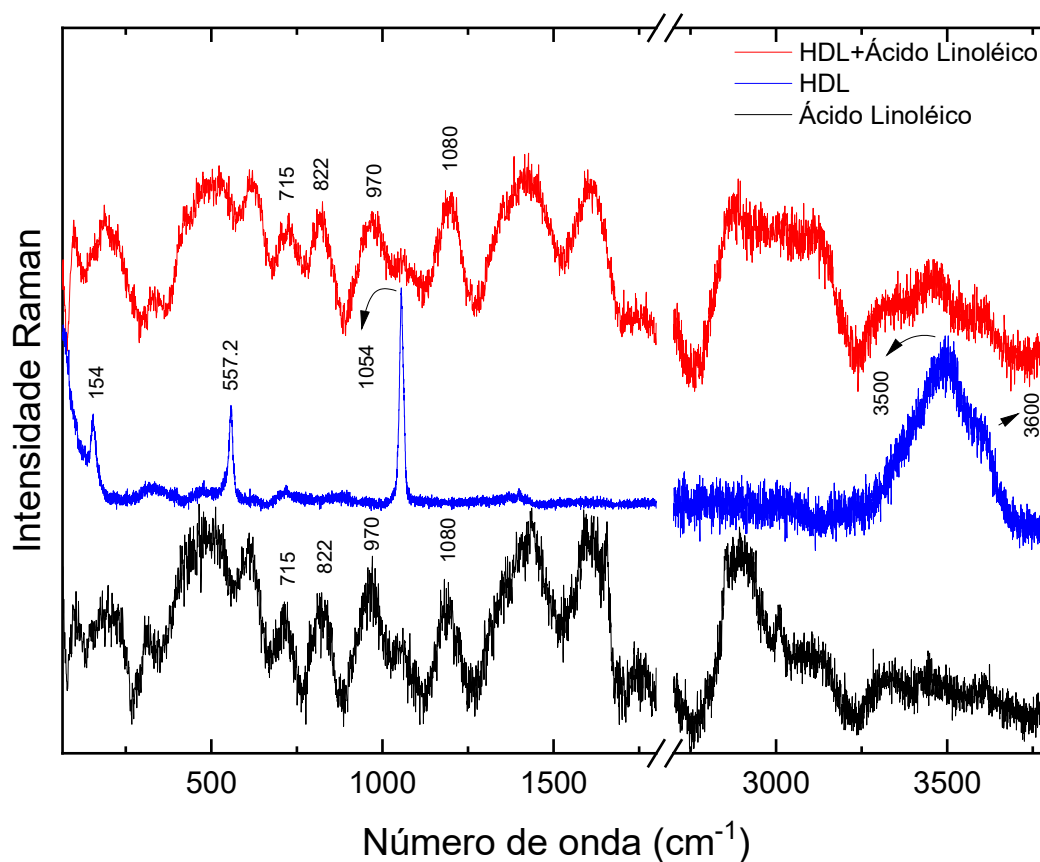
Já a segunda região dos espectros, correspondente à faixa de 3200 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} , de alto número de onda, por sua vez, presente nos espectros tanto do ácido mirístico quanto no complexo HDL-ácido mirístico bem como de HDL, ou seja, nos três espectros indicam modos característicos de estiramento do grupamento OH^- , das moléculas de água, dos grupos hidroxilas distribuídos nas lamelas da matriz cerâmica, sendo comuns em todos os HDL (XU, *et al.*, 2001). Sendo que no complexo intercalado HDL-ácido mirístico houve uma diminuição desse modo, porém, ainda se manteve presente mesmo em baixa intensidade.

A figura 32 mostra os espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), ácido linoleico (cor preta) e o complexo inédito de HDL-ácido linoleico (cor vermelha). Nessa figura, os espectros observados estão divididos em duas faixas de comprimento de onda: a primeira região dos espectros mostra modos normais de vibração de 40 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} e a segunda região do espectro de 2800 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} .

Os modos vibracionais encontrados abaixo de 200 cm^{-1} são modos da rede presentes nos três espectros. No espectro da matriz de HDL puro, o modo a cerca de 154 cm^{-1} é o modo translacional, do metal hidroxila (Mg-OH e Al-OH) (KAGUNYA, *et al.*, 1998).

Ainda para os espectros de HDL, modos simétricos e intensos são encontrados em baixa frequência em 557 cm^{-1} como ligação entre metais e o oxigênio O-M-O contidos na estrutura lamelar, sendo possivelmente, um modo de estiramento MgAl-OH semelhante aos já encontrados em matrizes de cerâmicas. Já o modo 1059 cm^{-1} é o modo de estiramento simétrico de nitrato (NO_3) (KLOPROGGE & FROST, 1999).

Figura 32 - Espectros dos modos vibracionais RAMAN obtidos para as amostras de HDL puro (cor azul), ácido linoléico (cor preta) e o complexo inédito de HDL-ácido linoleico (cor vermelha).



Quando se compara os espectros de ácido linoleico puro com o do complexo HDL-ácido linoleico, observa-se características muito semelhantes assimétricas nos modos de rede e uma sutil diferença apenas a cerca de 822 cm^{-1} pois, no espectro de ácido linoleico puro há uma separação desse modo e no espectro complexado não há mais separação. Esse fato pode estar relacionado a uma acomodação da molécula nas camadas de HDL. Esse fato é inédito na literatura uma vez que apenas há relatos de mudanças nos espectros de ácido graxos insaturados a partir da região de 1000 cm^{-1} .

Um modo em torno de 1080 cm^{-1} é atribuído a estiramento C-C e um modo assimétrico entre 1200 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} são deformações *scissoring* de $\delta(\text{CH}_2)_{sc}$. E os modos vibracionais presentes no espectro de ácido linoleico de 2800 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} são característicos das vibrações de estiramento assimétrico de CH, CH_2 e CH_3 vas(CHCH_2CH_3).

Na segunda região a faixa de 3200 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} , presente no espectro HDL, indicam modos característicos de estiramento do grupamento OH^- , das moléculas de água, dos grupos hidroxilas distribuídos nas lamelas da matriz cerâmica, sendo comuns em todos os HDL (XU, et

al., 2001). Tais modos tiveram reprodutibilidade de baixa intensidade no complexo de HDL-ácido linoleico, confirmando a presença de moléculas de água no complexo intercalado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de docagem molecular, obtidos para os complexos de ácidos graxos saturados e insaturados mostram que a molécula de ácido esteárico (ácido graxo saturado) apresentou resultado de energia de afinidade muito semelhante a nimesulida, porém a molécula de ácido mirístico, foi a molécula que apresentou maior número de interação com os resíduos catalíticos presentes no sítio ativo da COX-2. Esse resultado influenciou na escolha da intercalação do ácido mirístico na matriz de HDL. Já entre os ácidos graxos insaturados, a molécula de ácido linoleico foi a que apresentou menor *Moldock Score* entre todos os ácidos graxos e muito superior quando comparada a nimesulida.

Por essa razão, verificou-se a necessidade de uma investigação mais profunda das moléculas de ácido mirístico e ácido linoleico, complexadas na matriz de HDL formando os complexos de HDL-Ácido Mirístico e HDL- Ácido Linoleico (**ω6**), objetivando comparar suas potencialidades estruturais, morfológicas e vibracionais, com o complexo HDL-Nimesulida.

Os resultados das caracterizações apresentadas de difração de raio x mostraram a organização estrutural do complexo HDL-ácido mirístico, apresentando deslocamento e alargamento de picos em baixos ângulos, decorrentes do processo de intercalação. Esse processo, desencadeou a formação de novelos de fios nanoestruturados, recobertos uniformemente por finas camadas aglomeradas de HDL, evidentes nos resultados de microscopia. A espectroscopia vibracional raman comprovou a influência direta da insaturação sobre a intercalação dos ácidos graxos insaturados dentro da matriz de HDL.

Entre os complexos obtidos, o HDL-ácido mirístico apresentou desempenho estrutural semelhante ao do HDL-nimesulida. Assim, os resultados analisados, reportam com precisão as interações efetivas entre uma matriz de HDL, com característica hidrofílica, intercalada com os ácidos graxos saturados e insaturados, além de comparar estes com o complexo HDL-nimesulida.

Esses dados tornam destes complexos farmacêuticos únicos e com propriedades distintas de todos materiais existentes no mercado farmacêutico. E com base em todos os resultados experimentais e teóricos obtidos, propõem-se três novos e inéditos complexos: HDL-Nimesulida, HDL-ácido mirístico e HDL-ácido linoleico como potenciais agentes anti-inflamatórios que precisam ser investigados em testes *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, J. C. **High-Throughput docking as a source of novel drug leads.** Curr. Op. Chem. Biol., v. 8, p. 365-370, 2004.
- F.P. DO AMARAL, F. BROETTO, C.B. BATISTELLA, S.M.A. JORGE, **Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de macaúba. *Acrocomia aculeata* (jacq) lodd. Ex mart coletada na região de BOTUCATU - SP,** Rev. Energ. Na Agric. v. 26, p. 12, 2011.
- ARMEN, R. S.; CHEN, J.; BROOKS III, C. L. **An evaluation of explicit receptor flexibility in molecular docking using molecular dynamics and torsion angle molecular dynamics.** Journal of Chemical Theory and Computation, v. 5, n. 10, p. 2909-2923, 2009.
- ARIZAGA, G. G. C.; MANGRICH, A. S.; GARDOLINSKI, J. E. F. DA C.; WYPYCH, F. **Chemical modification of zinc hydroxide nitrate and Zn–Al-layered double hydroxide with dicarboxylic acids.** Journal of Colloid and Interface Science, v. 320, p. 168-176, 2008.
- BARAHUIE, F.; HUSSEIN, M. Z.; FAKURAZI, S.; ZAINAL, Z. **Development of Drug Delivery Systems Based on Layered Hydroxides for Nanomedicine.** Int. J. Mol. Sci. v. 15, p. 7750-7786, 2014.
- BAUER, J. F. **Polymorphism – a critical consideration in pharmaceutical development, manufacturing, and stability.** Journal of Validation Technology, p. 15-23, 2008.
- BENÍCIO, *et al.* **Layered double hydroxides: nanomaterials for applications in agriculture.** Revista Brasileira de Ciência do solo, v. 39, n.1, p. 1-13, 2015.
- BIASOTTO, Eloisa Mano. **Polímeros como Materiais de Engenharia.** SP. 51-52 p. 1991.
- BINI, M., *et al.*, **Hybrid compounds for improving drugs solubility: Synthesis, physicochemical and pharmaceutical characterization of Nimesulide-LDH.** Journal of Solid State Chemistry, v. 272, 131-137, (2019).

BI, X., ZHANG, H., & DOU, L. **Layered Double Hydroxide-Based Nanocarriers for Drug Delivery.** *Pharmaceutics* v. 6, p. 298-332, 2014.

CAVANI, F.; TRIFIRÒ, F.; VACCARI, A. **Hydrotalcite-type anionic clays: preparation, properties and applications.** *Catalysis Today*, v. 11, p. 173-301, 1991.

CARTER G.T. , V. DUONG, S. HO, K.C. NGO, C.L. GREER, D.L. **Weeks Side effects of commonly prescribed analgesic medications.** *Phys Med Rehabil Clin* v. 25, pp. 457-470, 2014.

CREPALDI, E. L.; PAVAN, P. C.; VALIM, J. B. **Comparative study of the Coprecipitation methods for the preparation of layered Double hydroxides.** *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 11, Nº 1, p. 64-70, 2000.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. **Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, p. 109–126, 2001.

DEDAVID, B. A., *et al.* **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras: Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DEL ARCO, M. *et. al.*, **Mg, Al layered double hydroxides with intercalated indomethacin: Synthesis, Characterization, and Pharmacological study.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 23, No. 6, 2004.

DUGGAN, K. C., *et al.* **Molecular Basis for Cyclooxygenase Inhibition by the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Naproxen.** *The Journal Of Biological Chemistry*. v. 285, Nº. 45, p. 34950–34959, 2010

FERRANTE, Maurizio. **Seleção de Materiais.** 3ª. Ed. SP. 287 p. 2013.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B. *et al.* **Gaussian 03**, Revision C.02, Gaussian, Inc.. Wallingford, CT 2004.

GEHLHAAR, D. K.; VERKHIVKER, G.; REJTO, P. A. **Docking Conformationally Flexible Small Molecules into a Protein Binding Site through Evolutionary Programing.** Proceedings of the Fourth International Conference on Evolutionary Programming, p. 615-627, 1995.

GOLDSTEIN, J. I., *et al.* **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis.** Fourth Edition, Springer Science+Business Media LLC, 2018

F.D. GUNSTONE. **Bailey's Industrial Oil & Fat Products: Edible Oil & Fat Products Chemistry, Properties & Health Effects.** 6. edition. New Jersey: Wiley Interscience, v.1. Cap. 6, p. 213-268, 2005.

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, p. 4367-78, 2008.

GÜLSÜN, T.; BUDAK, Ç.; VURAL, I.; SAHIN, S.; ÖNER, L. **Preparation and characterization of nimesulide containing nanocrystal formulations.** Pharmaceutical Development and Technology, v. 18, n. 3, p. 653–659, 2013.

HESSE, D., *et al.*, **Layered double hydroxides as eficiente drug delivery system of ciprofloxacin in the middle ear: an animal study in rabbits.** J Mater Sci: Mater Med. 24, p. 129-136, 2013.

HSIN, J., ARKHIPOV, A., YIN, Y., STONE, J. E., SCHULTEN, S. **Using VMD: An Introductory Tutorial.** Current Protocols in Bioinformatics. 2008.

JAGDALE, S.C.; JADHAVI, V.N.; CHABUKSWAR, A.R.; KUCHEKAR, B.S. **Solubility enhancement, physicochemical characterization and formulation of fast-dissolving tablet of nifedipine-betacyclodextrin complexes.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 48, n. 1, p. 131-145, 2012.

KHAN, A. I., LEI, L.; NORQUIST, A. J.; O'HARE, D. **Intercalation and controlled release of pharmaceutically active compounds from a layered Double hydroxide.** Chem. Commuun., p. 2342-2343, 2001.

KLIPPEL, J.H.; WEYAND, C.M.; WORTAMANN, R.L. **Primer in the rheumatic diseases**. Ed Arthritis Foudation, Georgia v.3. n.3, p.583-91, 2001

KULKARNI SK, JAIN NK, SINGH A - **Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors**. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, v. 22, p. 291-298, 2000.

LENGAUER, T.; RAREY, M. **Computational methods for biomolecular docking**. *Curr. Opin. Struct. Biol.* v. 6, p. 402 – 406, 1996.

LI, H.; WU, W. K. K.; ZHENG, Z.; CHE, C. T.; LI, Z. J.; XU, D. D.; WONG, C. C. M.; YE, C. G.; SUNG, J. J. Y.; CHO, C. H.; WANG, **M3,3',4,5,5'-Pentahydroxy-Trans-Stilbene, A Resveratrol Derivative, Induces Apoptosis In Colorectal Carcinoma Cells Via Oxidative Stress**. *European Journal Of Pharmacology*, v. 637, N. 1-3, P. 55-61, 2010.

LIU, J.; ZHANG, G. **Recent advances in synthesis and applications of clay-based photocatalysts: a review**. *Phys. Chem. Phys.*, v. 16, p. 8178-8192, 2014.

KAGUNYA, W., BADDOUR-HADJEAN, R., KOOLI, F., JONES, W. **Vibrational modes in layered double hydroxides and their calcined derivatives**. *Chemical Physics*, v. 236, p. 225–234, 1998.

KLOPROGGE, JTT, FROST, RL. **Fourier transform infrared and Raman spectroscopic study of the local structure of Mg-, Ni-, and Co-hydrotalcites**. *J Solid State Chem* v. 146, p. 506-515, 1999.

MANNHEIMER, W. A. **Microscopia dos materiais. Uma introdução**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços editoriais, 2002.

MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP S. KRAUSE: **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 11^a ed. São Paulo: Roca; 2005.

MARANGONI, R.; BOUHENT, M.; TAVIOT-GUÉHO, C.; WYPYCH, F.; LEROUX, F.; **Zn₂Al layered double hydroxides intercalated and adsorbed with anionic blue-dyes: A**

physico-chemical characterization. Journal of Colloid and Interface Science, v. 333, p. 120–127, 2009.

MEYERS, MARC ANDRÉ; CHAWLA, KRISHAN K. **Princípios de metalurgia mecânica.** São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 1982.

MIEDERER, S. E.; WIRTZ, M.; FLADUNG, B. **Acid neutralization and bile acid binding capacity of hydrotalcite compared with other antacids: An *in vitro* study.** *Chin. J. Digestive Diseases*, v. 4, p. 140, 2003.

MILLS, S. J. *et al.* **Nomenclature of the hydrotalcite supergroup: natural layered double hydroxides.** Mineralogical Magazine, v. 76, n. 5, p. 1289-1336, 2012.

MIRANDA, J.R.S., *et al.*, **Phase transformation in the C form of myristic-acid crystals and DFT calculations,** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 208, 97-108, 2019.

MIYATA, S. **Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds.** Clays & Clay Minerals, v. 31, n. 4, p. 305-311, 1983.

MONTANARI, C. A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos.** EDUSP, SP, 2011.

ONODERA, K.; SATOU, K.; HIROTA, H. Evaluations of molecular docking programs for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 4, p. 1609-1618 2007.

PADILHA, A.F. *et al.* **Técnicas de Análise Microestrutural.** Hemus editora limitada. São Paulo. 1985.

PARR, R. G. **Density Functional Theory.** Ann. Rev. Phys. Chem., v. 34, p. 631-656, 1983.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; DI NAUTA, L.; NOCCHETTI, M.; ROSSI, C. **Effects of hydrotalcite-like nanostructured compounds on biopharmaceutical properties and release of BCS class II drugs: the case of flurbiprofen.** Appl. Clay Sci., v. 51, p. 407-413, 2011.

PINHEIRO, S.B.; FERNANDES, C.E.; FINGOLO, F; BOYLAN, P.D. FERNANDES. **Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves.** J.Ethnopharmacol, v. 146, p. 324-330, 2013.

RADU, E.R. **Preparation and Characterization of Chitosan/LDH Composite Membranes for Drug Delivery.** Application, *Membranes*, v. 13, N° 179, 2023.

RAJAMATHI, M.; THOMAS, G.; KAMATH, P. V. **The many ways of making anionic clays.** *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, v. 113, N° 5 e 6, p. 671–680, 2001.

REJINOLD, N. S.; CHOI, G.; CHOY, J. Review **Bio-Inorganic Layered Double Hydroxide Nanohybrids in Photochemotherapy: A Mini Review.** International Journal of Molecular Sciences, v. 23, 11862, 2022.

RUELA, A. L. M., Araújo, M. B., Pereira, G. R. **Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação in vitro.** Quim. Nova, v. 32, No. 1, 165-168, 2009.

RUSTAN, A. C., CHRISTIAN, A. D. **Fatty Acids: Structures and Properties.** Encyclopedia of life sciences, John Wiley & Sons, LTD, p. 1-7, 2005.

SANPHUI, P. SARMA, B., NANGIA, A. **Phase transformation in conformational polymorphs of nimesulide.** Journal of Pharmaceutical sciences, v. 100, No. 6, 2011.

C. Scrimgeour, J. Harwood, **Fatty Acid and Lipid Structure**, in: F.D. Gunstone, J.L. Harwood, A.J. Dijkstra (Eds.), Lipid Handb. Third Ed., 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, Filadelfia, p. 1–v. 36, 2007.

SCHUTZ, A.; Biloen, P.; *J. Solid State Chem.*, v. 68, 360, 1987.

SILVA, S. M., SAMPAIO, T. TAHAM, S.A. ROCCO, R. CERIANI, A.J.A. MEIRELLES, **Characterization of Oil Extracted from Buriti Fruit (*Mauritia flexuosa*) Grown in the Brazilian Amazon Region.** J. Am. Oil Chem. Soc. v. 86, p. 611–616, 2009.

SHAH, F.; MUKHERJEE, P.; GUT, J.; et al. **Identification of novel malarial cysteine protease inhibitors using structure-based virtual screening of a focused cysteine protease inhibitor library.** Journal of Chemical Information and Modeling, v. 51, p. 852-864, 2011.

SHIRIN, V. K. A.; SANKAR, R.; JOHNSON, A. P.; GANGADHARAPPA, H. V.; PRAMOD, K. **Advanced drug delivery applications of layered double hydroxide.** Journal of Controlled Release, v. 330, p. 398-426, 2021.

SOUSA, F. DE F., NOGUEIRA, C. E. S., FREIRE, P. T. C., MOREIRA, S. G. C., TEIXEIRA, A. M. R., MENEZES, A. S. DE, FILHO, J. M., SARAIVA, G. D. **Conformational change in the C form of palmitic acid investigated by raman spectroscopy and X-ray diffraction.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. v. 161, p. 162-169, 2016.

SOCRATES, G. **Infrared and Raman: Characteristic Group Frequencies - Tables and Charts.** Ed. 3. p. 94, JOHN WILEY & SONS, LTD, 2001.

STORN, R.; PRICE, K. **Differential Evolution – A Simple and Efficient Adaptive Scheme for Global Optimization over Continuous Spaces; Technical Report;** International Computer Science Institute: Berkley, CA, 1995.

TANG, Z.; ZHANG, H.; SUN, M.; ZHAO, X. **Advanced composite materials manufacturing technology.** Materials Science: Advanced Composite Materials. p. 1-6, 2017.

THOMSEN, R., CHRISTENSEN, M. H. **MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking.** Journal of Medicinal Chemistry. v. 49, No. 11, 2006.

TSUJI, M., MAO, G., TAMAURA, Y. **On the thermodynamic treatment for anion exchange in hydrotalcitelike compounds.** Clays and Clay Minerals, v. 40, n. 6, p. 742- 743, 1992.

VALCHEVA-TRAYKOVA, M. L.; DAVIDOVA, N. P.; WEISS, A. H.; J. Mater. Sci., v. 28, 2157, 1993.

VEGA-TEIJIDO, M.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. **Conformational Analyses And Docking Studies Of A Series Of 5-Nitrofuran- And 5-Nitrothiophen-Semicarbazone Derivatives In Three Possible Binding Sites Of Trypanothione And Glutathione Reductases.** Journal Of Molecular Graphics And Modeling, v. 24, N. 5, P. 349-355, 2006.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. **Improved Protein–Ligand Docking Using Gold.** Proteins, v. 52, N. 4, P. 609-623, 2003.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras: Identificação e quantificação.** São Paulo: Varela, 2006

VUNNAM, N.; YOUNG, M. C.; LIAO, E. E.; LO, C. H.; HUBER, E.; BEEN, M.; THOMAS, D. D.; SACHS, J. N. **Nimesulide, a COX-2 inhibitor, sensitizes, pancreatic cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by promoting DR5 clustering.** CANCER BIOLOGY & THERAPY, v. 24, NO. 1, 2023.

XU, Z. P. AND ZENG, H. C. **Abrupt Structural Transformation in Hydrotalcite-like Compounds $Mg_{1-x}Al_x(OH)_2(NO_3)_x \cdot nH_2O$ as a Continuous Function of Nitrate Anions.** J. Phys. Chem. B, v. 105, p. 1743-1749, 2001.

ZANIN, J. P.; GIL, G. A.; GARCÍA, M. C.; ROJAS, R. **Drug-containing layered double hydroxide/alginate dispersions for tissue engineering.** CHEMENGINEERING, v. 6, 70, 2022.

YANG, J. M.; CHEN, C. C. **GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking.** Proteins, v. 55, p. 288-304, 2004.

WATT, I. M. **The principles and practice of electron microscopy.** Cambridge University Press, 2nd ed. New York, 1997.

WILLIAMS, D. B., *et al.* **Transmission Electron Microscopy. A textbook for Materials Science.** Springer Science+Business Media, LLC, 2009.

WINDSOR MA, HERMANSON DJ, KINGSLEY PJ, XU S, CREWS BC, HO W, KEENAN CM, BANERJEE S, SHARKEY KA, MARNETT LJ. **Substrate-Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2: development and evaluation of achiral profen probes.** *Acs Med. Chem. Lett.* Vol.3 .p. 759–763, 2014.

ANEXO A - PATENTE DEPOSITADA



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 011790 2

Dados do Depositante (71)

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPLEXO FARMACÊUTICO NANOESTRUTURADO HDL-ÁCIDO TETRADECANÓICO E SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO

Resumo: A presente invenção se refere a um complexo farmacêutico nanoestruturado HDL- ácido tetradecanóico constituído por hidróxidos duplos lamelares (HDL) intercalados por ácido tetradecanóico, ácidos mirístico (C14), formado por estruturas filamentosas nanométricas (1) e, constituída por feixes de fios alongados e finos (2), que crescem formando emaranhamento de feixes (3), que em grande densidade se apresentam como emaranhados empacotados (4) recobertos por um revestimento uniforme (5) composto por camadas de aspecto lamelar (6) típico do HDL, formando os interstícios lamelares. O processo de obtenção acontece por coprecipitação de HDL-C14 em solução de nitratos de magnésio e alumínio em pH igual a 10. O complexo HDL- C14 pode atuar como um sistema de liberação controlada, sendo o HDL um carreador de ácido mirístico capaz de carrear essa molécula até ao alvo biológico.

Figura a publicar: Fig.4

ANEXO B – Perspectivas futuras

- 1) Patente em processo de depósito via co-titularidade Universidade Federal Do Maranhão e Universidade Federal Do Pará: **“MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM COMPLEXO FARMACÊUTICO BASEADO EM UM HIDRÓXIDO DUPLO LAMELAR (HDL) E NIMESULIDA E COMPLEXO FARMACÊUTICO”**.
- 2) **Publicação de dois artigos em periódicos internacionais, referentes as patentes citadas nessa dissertação.**