



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM MOLECULAR

AMARÍLIS ARAGÃO DIAS

**SÍNTESE, INTERCALAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
ANÁLISE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULA CARREADORA DE
ÁCIDO KÓJICO**

Belém
2017

AMARÍLIS ARAGÃO DIAS

**SÍNTESE, INTERCALAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
ANÁLISE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULA CARREADORA DE
ÁCIDO KÓJICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular como requisito para a obtenção do grau de Mestra em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves

Coorientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva

Belém

2017

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

- D541s Dias, Amarílis Aragão
 Síntese, Intercalação, Caracterização Estrutural e Análise Biológica de Nanopartícula
 Carreadora de Ácido Kójico / Amarílis Aragão Dias. — 2017
 48 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem
 Molecular (PPGQM3), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém,
 2017.
 Orientação: Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves
 Coorientação: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva.
1. Química Medicinal . 2. Nanopartículas. 3. Ácido Kójico. 4. Anti-leishmania. I. Alves, Cláudio
 Nahum, *orient.* II. Título

CDD 540

AMARÍLIS ARAGÃO DIAS

**SÍNTESE, INTERCALAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
ANÁLISE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULA CARREADORA DE
ÁCIDO KÓJICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular como requisito para a obtenção do grau de Mestra em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves

Coorientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva

Data da Apresentação: 30 de Novembro de 2017.

Conceito: _____

Banca Examinadora

Dr. Jerônimo Lameira Silva
ICB-UFPA-CoCoorientador

Dr. Agnaldo da Silva Carneiro
ICEN-UFPA-Membro

Dra. Carla Carolina Ferreira Meneses
Membro Externo

Dra. Edilene Oliveira Silva
ICB-UFPA-Suplente

Àqueles que deram o seu melhor por mim, meus pais.

AGRADECIMENTOS

Àquele que me possibilitou o fôlego da vida durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação, Deus.

Aos meus pais Reinaldo Dias e Maria José Aragão, e minha irmã Hortência Dias pelo apoio irrevogável destinados a mim durante toda a minha jornada acadêmica.

Ao meu querido Francisco Alves, pelo incentivo e companheirismo nesta etapa da minha vida.

À Universidade Federal do Pará pela oportunidade de realizar um curso de pós-graduação.

Ao professor Dr. Cláudio Nahum pela orientação e confiança para que eu desempenhasse esta dissertação.

Ao professor Dr. Jerônimo Lameira pela oportunidade dispensada a mim para a realização deste curso de pós-graduação.

Ao Dr. Paulo Robson Monteiro de Sousa, por todos os ensinamentos creditados que foram essenciais para a realização desta dissertação.

A todos os colegas do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos -LPDF pela amizade e entusiasmo fundamentais para um cotidiano saudável na vida científica, em especial: Robson Monteiro, Carla Meneses, Beatriz Alves, Gracimery Reis, Guelber Cardoso, Clauber Henrique e Alberto Monteiro.

Ao Laboratório de Parasitologia – ICB/UFGA, nas pessoas da Profa. Dra. Edilene Silva e ao Msc. Bruno Rodrigues e demais colaboradores

Ao Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia da Amazônia (LABNANO-AMAZON), pelas análises de DRX, IR e FT-Raman, coordenado pelos Professores Doutores Cláudio Márcio Rocha Remédios e Waldeci Paraguassu Feio.

Ao Prof. Dr. José Augusto Martins Corrêa, pela Análise de TG.

Às técnicas Graziela Telles, Kelly Oliveira e Liliane da Silva, pela prestatividade e responsabilidade nas análises das amostras;

Aos membros da banca examinadora pelo convite aceito positivamente.

Às instituições e autoridades que concederam autorizações para a realização das pesquisas de laboratório e documentais.

À CAPES pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de estudo.

*“A inteligência e o caráter são o objetivo
da verdadeira educação.”*

Martin Luther King

RESUMO

A intercalação de espécies com atividade farmacológica em Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs) é um crescente campo na pesquisa acadêmica e industrial, estes compostos são capazes de promover a liberação controlada de fármacos. Neste trabalho buscamos intercalar o ácido kójico em nanopartículas de HDL de Mg^{2+}/Al^{3+} pelo método de coprecipitação. Esta substância possui diversas aplicações nos mais variados campos de pesquisa, entretanto apresenta a foto-oxidação o que ocasiona modificações organolépticas e químicas de sua estrutura. Recentemente o ácido kójico foi apresentado como um potente inibidor em culturas de leishmania, acreditamos que as propriedades particulares do HDL, como por exemplo a fotoproteção, e a estabilização do intercalado favoreçam a produção de um material resistente com possíveis aplicações para a saúde. Todas as amostras foram preparadas pelo método de coprecipitação, posteriormente foram caracterizadas por difração de raio-X, Raman, Infravermelho, Espectroscopia de UV-vis e Termogravimetria, além de avaliações biológicas sobre culturas de leishmania. Nossos resultados demonstram que o HDL-AK possui 53,018% de ácido kójico intercalado e é capaz de resistir a altas temperaturas, além de possuir um potencial anti-leishmania.

Palavras-chave: hidróxidos duplos lamelares, nanopartículas, ácido kójico, anti-leishmania.

ABSTRACT

Intercalation of species with pharmacological activity in layered double hydroxides (LDHs) is a growing field in academic and industrial research, these compounds are capable of promoting the controlled release of drugs. In this work we merge the kojic acid in LDH nanoparticles of Mg^{2+}/Al^{3+} by co-precipitation method. This substance has many applications in various fields of research, however it is easily susceptible to photo-oxidation which causes organoleptic and chemical modifications of its structure. Recently kojic acid was introduced as a potent inhibitor of Leishmania cultures, we believe that the particular properties of HDL, such as photoprotection, and stabilization of the interleaved facilitate the production of a material resistant to possible applications for health. All samples were prepared by the co-precipitation method, were further characterized by X-ray diffraction, Raman, IR, UV-vis spectroscopy, thermogravimetry, and biological evaluations of Leishmania cultures. Our results demonstrate that HDL has 53.018% AK intercalated kojic acid and is able to withstand high temperatures, in addition to having an anti-leishmania potential.

Keywords: layered double hydroxides nanoparticles, kojic acid, anti-leishmania.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01 - Representação esquemática da estrutura da brucita	-15
Figura 02 – Representação esquemática da estrutura da Brucita (Mg(OH) ₂)	16
Figura 03 – Estrutura do HDL	17
Tabela 01 – Combinações de cátions divalentes com trivalentes que produziram HDL	18
Tabela 02 – Ânions intercalados em HDL	18
Tabela 03 – Comparação das propriedades de várias nanopartículas inorgânicas	20
Figura 04 – Vantagens dos HDLs para sistemas biológicos	21
Figura 05 – Representação esquemática das duas formas utilizadas para o AK	24
Figura 06 – Esquema de síntese de HDLs intercalados com ácido kójico	28
Figura 07 – Difratoograma de Raio X	32
Tabela 04 - Dados obtidos através dos padrões de DRX das amostras obtidas	33
Tabela 05 – Valor médio e Desvio padrão das medidas em triplicata	34
Figura 08 – Espectros de absorção e representação gráfica do ácido kójico livre e coeficiente de relação	34
Figura 09 – Espectros na região do infravermelho	36
Figura 10 – Análises Termogravimétricas	38
Figura 11 – Avaliação Biológicas <i>In Vitro</i>	40

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

AK	Ácido Kójico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de pó de Raio X
EtOH	Etanol
HDL-AK	HDL intercalado com ácido kójico
HDLs	Hidróxidos Duplos Lamelares
IR	Infravermelho
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
TG-DSC	Termogravimetria - <i>Differential scanning calorimetry</i>
UV-vis	Ultravioleta no visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1	Hidróxidos Duplos Lamelares – HDLs	14
3.1.1	Estrutura dos Hidróxidos Duplos Lamelares – HDLs	16
3.1.2	Método de Síntese Sal-Base ou Coprecipitação	19
3.2	Propriedades dos HDLs como carreadores de moléculas bioativas	20
3.2.1	Estabilidade Térmica	21
3.2.2	Área Superficial e Porosidade	22
3.2.3	Efeito de Memória	23
4	Ácido Kójico	24
5	Potencial anti-leishmania do HDL-AK	25
6	Material e Métodos	26
6.1	Material	26
6.2	Síntese e intercalação do Ácido Kójico	27
6.3	Caracterização dos HDLs	27
6.3.1	Difratometria de Raio – X	27
6.3.2	Espectroscopia no Ultravioleta – visível	28
6.3.3	Espectroscopia no Infravermelho	28
6.3.4	Análise Térmica	29
6.4	Testes <i>In Vitro</i>	29
6.4.1	Atividade Antipromastigota	29
6.4.2	Atividade Antiamastigota	30
6.4.3	Teste de Viabilidade	30
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
7.1	Análises de Difratometria de Raio-X	31
7.2	Análises de Espectroscopia no Ultravioleta-visível	33
7.3	Análises de Espectroscopia no Infravermelho	35
7.4	Análises de Termogravimétricas	37

7.5	Análises dos Testes <i>in vitro</i>	39
8	CONCLUSÃO	41
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1- INTRODUÇÃO

O uso da nanotecnologia nos últimos anos tem desempenhado um papel importante em diferentes áreas, e principalmente na saúde. A capacidade de direcionar e dosar a quantidade de fármaco a ser entregue no alvo-específico proporciona uma alta especificidade para biomoléculas ou componentes celulares. Em aplicações biomédicas as nanopartículas desempenham importantes funções, como: cápsulas de armazenamento e carreadores de espécies biológicas de interesse farmacológico (CHEN et al., 2017; BARAHUIE et al., 2014 ; CUNHA et al., 2010), estas características apontam as nanopartículas como excelentes estruturas para desempenhar este papel inovador para saúde.

As principais vantagens conhecidas para o uso de nanopartículas como nanocarreadores são: manipulação do tamanho e da superfície da partícula e sua ativação através de marcadores; administrar a liberação e manutenção da droga durante o transporte o que pode alterar a distribuição da droga e aumentar a eficácia e ainda reduzir os efeitos colaterais. Além destas vantagens, o controle da degradação de partícula, bem como modelagem dos constituintes de sua matriz, são interessantes por norteiam a capacidade de adequação ao meio desejado.(YU et al., 2017; MOHANRAJ; CHEN, 2006).

Dentre as diversas estruturas nanoparticuladas descritas na literatura, este trabalho destaca o uso dos hidróxidos duplos lamelares (HDLs), nanocompostos lamelares que apresentam propriedades interessantes para aplicações biomédicas e biotecnológicas como: alta biocompatibilidade, bons trocadores aniônicos, alta estabilidade química para a substância intercalada e dependência da variação de pH para a liberação da substância intercalada (LIANG et al., 2014 ; KUTHATI; KANKALA; LEE, 2015). Estes compostos são formados pela inserção de um ânion na região interlamelar da estrutura inorgânica, sem alterações na estrutura lamelar, este processo é chamado de intercalação (CREPALDI; VALIM, 1998).

Diante do exposto, este trabalho visou a intercalação da molécula de ácido kójico (AK), o 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (HMP), metabólito secundário produzida por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (BENÍCIO et al., 2014), em trabalhos recentes este metabólito demonstrou um alto potencial como agente anti-leishmanial, no trabalho de (RODRIGUES et al., 2014), o ácido kójico inibiu o

crescimento de *L. amazonensis*, em 62% (IC50 34mg/ml) para a forma promastigota e de 79% (IC50 27,84 mg/ml) para a forma amastigota.

Por se tratar de uma molécula sensível à luz, e por facilmente sofrer foto-oxidação, esta molécula necessita de um mecanismo de proteção a fim de evitar as modificações organolépticas. Diante disto, propomos a intercalação do KA em hidróxidos duplos lamelares (HDLs), a fim de proteger esta molécula, da foto-sensibilidade, aumentar sua durabilidade em sítio e ainda propor uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de leishmanioses.

Portanto, para este estudo, a molécula de ácido kójico (AK) foi intercalada em MgAl-HDL-NO₃⁻, através do método de coprecipitação, em pH constante igual a 10. O material obtido foi caracterizado por diferentes técnicas analíticas, tais como difração de raio-X em pó, análise termogravimétrica, espectroscopia UV-visível, infravermelho e Raman. Além destes, foram realizados ensaios in vitro sobre a *Leishmania amazonensis*, para avaliar o potencial do material intercalado de HDL-AK.

2- OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Estudo de nanomaterial híbrido de Hidróxido Duplo Lamelar (HDL) intercalado com ácido kójico (AK), a fim de contribuir com o planejamento de um novo fármaco para a terapia de leishmanioses.

2.2- Objetivos Específicos

- Sintetizar o hidróxido duplo lamelar (HDL) e promover a intercalação do fármaco ácido kójico (AK) através do método de coprecipitação, utilizando os sais $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ e $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, razão molar Mg^{2+}/Al^{3+} igual a 2;
- Caracterizar os materiais por Difractometria de raio X em pó (DRXP), espectroscopia vibracional no infravermelho (IV) e FT-Raman e UV-Visível e análise térmica por termogravimetria (TGA/DTA);
- Avaliar *in vitro* o potencial anti-leishmanial do composto intercalado de HDL-AK, sob as formas evolutivas de amastigota e promastigota.

3- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 – Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs)

Os minerais pertencentes ao grupo das argilas aniônicas são relatados por mineralogistas, desde o início do século XX (CAVANI; TRIFIRÒ; VACCARI, 1991; BOTT, 1992; CREPALDI; VALIM, 1998). Nos últimos anos o termo hidróxido duplo lamelar tem sido mais utilizado, referindo-se a uma ampla classe de compostos inorgânicos lamelares de caráter básico, com alta capacidade de intercalar ânions com às características estruturais similares a argila aniônica natural, hidrotalcita (RIVES; DEL ARCO; MARTÍN, 2014; BENÍCIO et al., 2015).

Descrita pela primeira vez na Suécia em 1842, como um hidroxicarbonato de magnésio e alumínio que ocorre na natureza em placas folheadas e torcidas (BARAHUIE et al., 2014). Simultaneamente, a descoberta da hidrotalcita, uma outra mistura de hidroxicarbonato magnésio e ferro foi encontrada, a qual foi chamado piroaurita, devida a semelhança ao ouro aquecido, sendo reconhecido como isoestrutural a hidrotalcita e outros minerais contendo diferentes elementos e características semelhantes (CAVANI; TRIFIRÒ; VACCARI, 1991; CREPALDI; VALIM, 1998)

A primeira fórmula exata para hidrotalcita $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ e outros materiais isomorfos foi apresentada por E. Manasse, professor de mineralogia da Universidade de Florença (Itália), que também foi o primeiro a reconhecer que os íons carbonato foram essenciais para este tipo de estrutura (CAVANI; TRIFIRÒ; VACCARI, 1991). Posteriormente Aminoff e Broome realizaram investigações de difração de raios - X e identificaram dois politipos de hidrotalcite, o primeiro tendo uma simetria romboétrica e o segundo contendo simetria hexagonal, o qual foi chamado manasseite em homenagem ao professor Manassés (CAVANI; TRIFIRO; VACCARI, 1991).

Em 1933 Feitknecht sintetizou um grande número de compostos do tipo hidrotalcita a que deu o nome "Doppelschichtstrukturen " (estruturas de folha dupla), por meio de uma reação de precipitação controlada de sais metálicos em solução aquosa com meio básico, a ideia de Feitknecht era que os compostos sintetizados seriam constituídos por uma camada de hidróxidos de um tipo de cátion, intercalados com uma camada de hidróxidos de um outro tipo de cátions, propondo

a seguinte estrutura (Figura 1) (CAVANI; TRIFIRO; VACCARI, 1991).

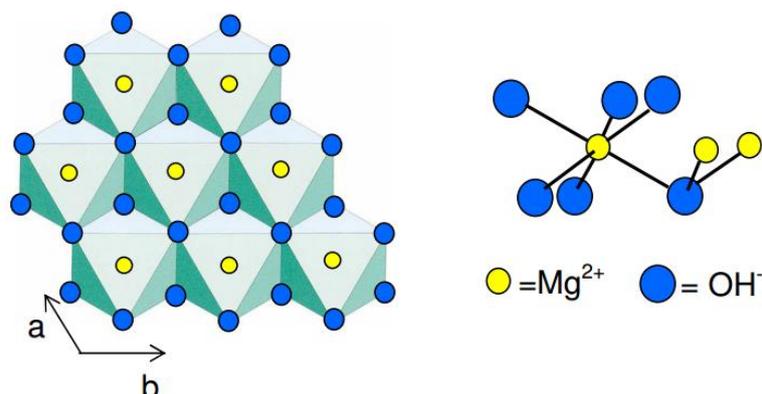


Figura 1. Representação esquemática da estrutura da brucita. Fonte: CUNHA, 2007.

Estudos mais recentes apontam a biocompatibilidade de compostos duplo lamelares com a composição da hidrotalcita, como um importante aliado nas áreas medicinal, farmacológica, ambiental e como novos materiais (LADEWIG et al., 2010), pois a intercalação de espécies orgânicas em HDL tem recebido atenção expressiva devido às diversas aplicações possíveis para esses materiais híbridos orgânico-inorgânicos, devido propriedades dos HDL como trocadores de ânions, catalisadores, precursores ou suporte para catalisadores, adsorventes, na síntese de materiais cerâmicos avançados, na preparação de eletrodos modificados e também em aplicações medicinais, como antiácidos (DEL HOYO, 2007; GOH; LIM; DONG, 2008; (ET AL., CUNHA, 2016; YU et al., 2017).

3.1.1- Estrutura dos Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs)

O HDL mais investigado é a hidrotalcita, constituída principalmente de hidróxido duplo lamelar de magnésio e alumínio intercalado por carbonato, e seus similares sintéticos, sendo resultante do agrupamento de camadas do tipo brucita β -M(OH)₂ (Figura 2) (KOVANDA et al., 2005; DEL HOYO, 2007). As lamelas da brucita são neutras, os cátions M^{2+} localizam-se em coordenação octaédrica e no vértice de cada octaedro encontra-se uma hidroxila, as quais são mantidas empilhadas através de ligações de hidrogênio (CAVANI; TRIFIRO; VACCARI, 1991; (CREPALDI; VALIM, 1998).

Quando os cátions divalentes são substituídos por cátions trivalentes, a lamela torna-se positivamente carregada, permanecendo com estrutura análoga a da lamela da brucita, para que o sistema se estabilize o espaço interlamelar é ocupado por um ânion de compensação, sendo o íon carbonato CO_3^{2-} o mais comum, conjuntamente com moléculas de água, promovendo um domínio interlamelar pouco ordenado (Figura 3) (PAUSCH, 1986; MILLS ET AL., 2012).

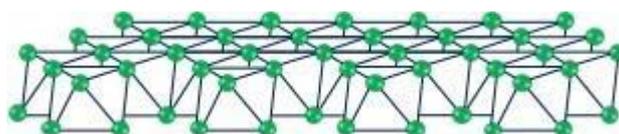


Figura 2. Representação esquemática da estrutura da Brucita ($\text{Mg}(\text{OH})_2$). (Fonte: Benício et al., 2015).

As lamelas passam a ser mantidas juntas não apenas por pontes de hidrogênio, mas também por ligações eletrostáticas entre as lamelas positivamente carregadas e os ânions interlamelares (LAL; HOWE, 1980; RIVES; ANGELES ULIBARRI, 1999; LADEWIG et al., 2010), essa forte ligação eletrostática faz com que o HDL, diferentemente das argilas catiônicas, não apresente propriedades de expansão para intercalar moléculas neutras e grandes quantidades de água (CUNHA et al., 2010b; MILLS ET AL., 2012). As características físicas do HDL, como propriedades de troca iônica, mudanças no estado de hidratação e propriedades elétricas apontam para seu estado desordenado, levando alguns autores a considerar o domínio interlamelar como um estado 'quase líquido' (LAL; HOWE, 1980).

A fórmula geral do HDL é expressa como $[\text{M}^{2+}_{1-x} \text{M}^{3+}_x (\text{OH})_2]^{x+} [\text{A}^{m-}]_x \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Onde M^{2+} e M^{3+} , são cátions de metais bivalentes e trivalentes, o A^{m-} é um ânion e x é a $[\text{M}^{3+}] / ([\text{M}^{2+}] + [\text{M}^{3+}])$ fração molar (CAVANI; TRIFIRÒ; VACCARI, 1991).

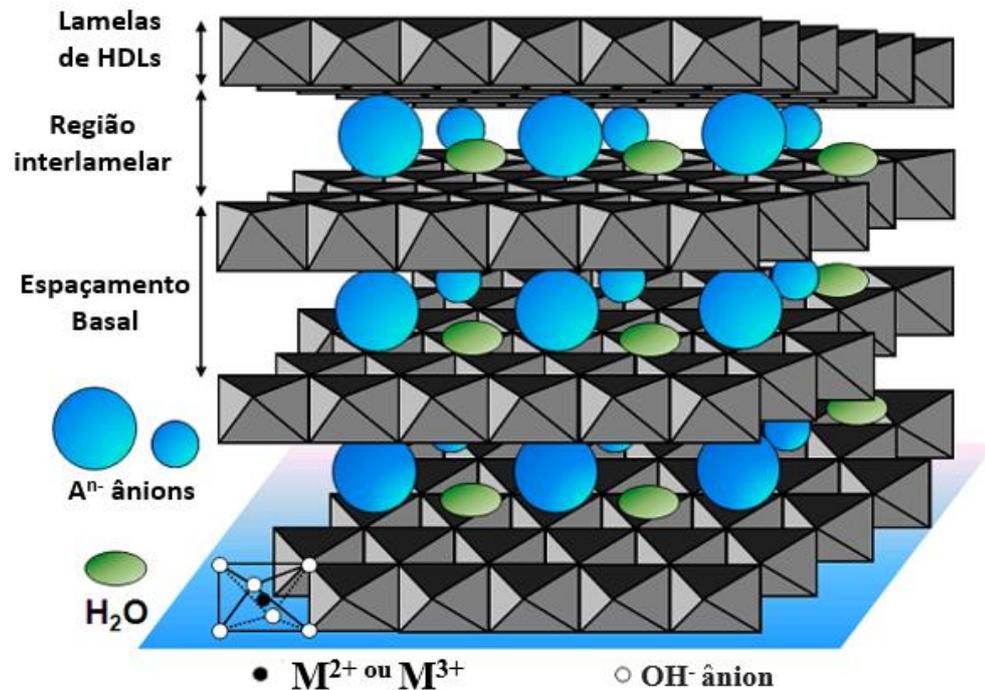


Figura 3. Estrutura do HDL. Adaptado de: Bi et al., 2014.

Estruturalmente, os HDL podem ser constituídos pela mistura entre dois cátions metálicos divalentes e um trivalente, contudo, estes cátions devem apresentar coordenação octaédrica e raio iônico na faixa de 0,5 - 0,74 Å (ROY et al., 1992). A razão entre os cátions di e trivalentes (M^{2+}/M^{3+}), pode variar em uma faixa de 1 a 8, o que corresponde a uma faixa de x (na fórmula geral) de $0,5 > x > 0,141$ (CREPALDI; VALIM, 1998). O valor de x correspondente à faixa de $0,20 \leq x \leq 0,33$ influencia diretamente a propriedades do material de cristalinidade e troca iônica (MIYATA, 1983). Através da fórmula geral, pode-se prever infinitas combinações de cátions que poderiam originar HDL. A Tabela 1 mostra várias combinações de cátions, que já foram estudadas e produziram argilas aniônicas.

Tabela 1. Combinações de cátions divalentes com trivalentes que produziram HDL (**Fonte:** CAVANI; TRIFIRO; VACCARI, 1991).

Cátions Trivalentes	Divalentes								
	Mg	Ni	Zn	Cu	Co	Mn	Fe	Ca	Li*
Al	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fe	X	X					X		
Cr	X	X	X	X					
Co		X			X				
Mn						X			
Ni		X							
Sc	X								
Ga							X		
Ti**					X				

*monovalente ** tetravalentes

Na preparação do nanomaterial um fator de grande importância é a capacidade de estabilização da estrutura lamelar pelo ânion intersticial, isto é, a capacidade de estabilização propiciará a formação do HDL (BOTAN et al., 2011). Outro fator importante, é a ocorrência de troca iônica, o que possibilita a formação de novos compostos através da troca do ânion interlamelar, portanto, os ânions intercalados do material precursor devem apresentar interações eletrostáticas fracas com as camadas, considerando essa necessidade, os ânions inorgânicos possuem uma sequência de interação com a camada lamelar e, portanto, facilidade de intercalação (MIYATA, 1983) $\text{CO}_3^- > \text{OH}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$. Na literatura encontra-se a intercalação de inúmeras espécies aniônicas, entre as quais estão listadas na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Ânions intercalados em HDL (**Fonte:** TRONTO, 2006).

Ânios	Exemplos
Haleto	F^- , Cl^- , Br^- , I^-
Oxo-ânions	CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , CrO_4^{2-} , silicatos
Ânions complexos	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $[\text{NiCl}_4]^{2-}$, $[\text{IrCl}_6]^{2-}$, $[\text{PtCl}_6]^{2-}$
Polioxo-metalatos	Vanadatos, molibidatos, tungstos
Carboxilatos	Tereftalato, benzoato
Tensoativos	Dodecil-sulfato, octil-sulfato, dodecilbenzeno-sulfonato
Fosfatos e Fosfonatos	H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_3\text{H}^-$
Polímeros aniônicos	Poli(acrilato), poli(estireno-sulfonato)

3.1.2 - Método de síntese sal-base ou Coprecipitação

O método de coprecipitação a pH variável consiste na adição de uma solução contendo os sais dos cátions divalente e trivalente sobre uma solução contendo hidróxido e o ânion a ser intercalado, a precipitação deve ocorrer em temperatura relativamente baixa para evitar a precipitação de hidróxidos simples. Para o pH ser mantido constante, uma solução alcalina é adicionada de maneira controlada, sob forte agitação à temperatura ambiente, realiza-se a síntese de coprecipitação adicionando uma solução contendo os sais dos cátions sobre a solução contendo o ânion a ser intercalado (CREPALDI; VALIM, 1998).

3.2 – Propriedades dos HDLs como carreadores de moléculas bioativas

As nanopartículas inorgânicas são as principais apostas da nanotecnologia no campo da medicina, estes compostos estão sendo utilizados como vetores para a entrega de drogas devido as suas propriedades físicas particulares, tais como: elevada área superficial por unidade de volume, as suas singularidades ópticas, magnéticas e a capacidade de serem funcionalizadas através de ligantes que aumentam a sua afinidade com moléculas alvo (OJEA-JIMENEZ et al., 2012). O uso de nanopartículas inorgânicas para a entrega de fármacos é capaz de disponibilizar concentrações mais elevadas no local alvo do que quando comparadas a outros métodos de entrega de droga (NAAHIDI et al., 2013), o que aumenta a eficiência global do fármaco utilizado, pois existe uma maior biodisponibilidade. Estas nanopartículas podem ser definidas como partículas de óxido de metal ou de composição metálica, mostrando uma forte interseção entre a química a física e a biologia (SAFARI; ZARNEGAR, 2014). E nos últimos anos as nanopartículas inorgânicas aparecem como uma nova estratégia terapêutica, como por exemplo, a entrega de drogas anticâncer, peptídeos, proteínas e mais recentemente (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

As nanopartículas utilizadas como carreadoras de fármacos, são partículas que variam de 100-1000 nm, sendo projetadas por meio de metodologias que controlam os atributos físicos e químicos e ainda podem ser combinados para

formarem estruturas maiores (THE NATIONAL NANOTECHNOLOGY, 2001). Estas características estão diretamente ligadas a administração sistemática destas estruturas *in vivo*. Partículas com diâmetros menores que 10 nm são rapidamente removidos através do processo de extravazamento e depuração renal (VINOGRADOV; BRONICH; KABANOV, 2002), partículas com diâmetros entre 10 a 70 nm, podem penetrar até capilares muito pequenos (HAWLEY; DAVIS; ILLUM, 1995), partículas com diâmetros que variam entre 70 a 200 nm apresentam um maior tempo de circulação (ISHIDA et al., 1999), e partículas com diâmetros superiores a 200 nm são normalmente sequestrado para baço e, eventualmente, removido por fagócitos (STOLNIK; ILLUM; DAVIS, 2012). Existe uma ampla variedade de tamanhos, formas e composições de nanopartículas.

Tabela 3- Comparação das propriedades de várias nanopartículas inorgânicas. Fonte: CUNHA et al., 2010.

Tipo	Tamanho (Nm)	Forma	Citotoxicidade (mg/mL)	Biodegradação	Eliminação ^(A)
<i>Au</i>	1-100	esférica/bastão	>0,05	Não	A, C ou M
<i>C_n</i> (nanotubos)	1-10	tubular	>0,05	Não	A, C ou M
<i>C_{60,70,80}</i>	~1	esférica	~500 ^(b)	Não	A, C ou M
<i>HDL</i>	30-200	lamelar	~1	Sim	Dissolução
<i>SiO₂</i>	5-100	esférica	~1	Não	A, C ou M
<i>Fe₃O₄</i>	1-50	esférica	0,5-2,0	Não	A, C ou M

(a) A = acumulação; C = circulação; M = metabolização; (b) em unidades de mg/kg de camundongos.

Estes nanocompostos podem receber moléculas em sua região interlamelar, este processo é chamado de “intercalação”, preferencialmente estas moléculas intercaladas devem conter grupos funcionais com regiões de alta densidade eletrônica, a fim de alcançar a eletroneutralidade do sistema híbrido, visto que as lamelas do HDL são carregados positivamente (BI; ZHANG; DOU, 2014). Os HDLs são materiais inorgânicos que podem ser utilizados como nanocarreadores para a construção de nanocompostos orgânico-inorgânico com nanocamadas bidimensionais e oferecem aplicações em diversas áreas como: trocadores de ânions, catalisadores, adsorventes, antiácidos entre outros (CUNHA et al., 2010; BARAHUIE et al., 2014).



Figura 04 – Vantagens dos HDLs para sistemas biológicos. BARAHUIE et al., 2014.

Os HDLs apresentam propriedades importantes para o seu uso em diferentes áreas, em sistemas biológicos, estes se apresentam como excelentes reservatórios e carreadores de fármacos, genes e outros tipos de moléculas que podem ser biofuncionalizadas, devido as suas propriedades particulares. (OH et al., 2012). A composição de HDLs com íons metálicos de baixa toxicidade como por exemplo o Mg^{2+} , corrobora com a sua capacidade de dissolução em ambientes ácidos, tornando-os facilmente biodegradáveis a nível sistêmico (OH et al., 2012).

3.2.1- Estabilidade Térmica

A caracterização térmica do HDL geralmente é feita através da análise termogravimétrica e análise térmica diferencial. A decomposição térmica do HDL pode ocorrer em três etapas: 1) a primeira etapa de decomposição térmica corresponde a

eliminação de moléculas de água adsorvidas e água de hidratação. Esta eliminação ocorre geralmente em uma faixa 50-100°C para moléculas de água adsorvidas e acima desta temperatura até aproximadamente 200°C são eliminadas as moléculas de água de hidratação, 2) a segunda corresponde a eliminação de grande parte dos grupos hidroxila presentes nas folhas inorgânicas e também a perda do ânion interlamelar. Os grupos hidroxila são decompostos por condensação com formação de moléculas de água. Esta etapa pode ocorrer entre temperaturas de 300°C à 500°C, 3) ocorre a temperaturas superior à 500°C, corresponde ao colapso da estrutura lamelar, geralmente com a formação de um óxido ou óxi-hidróxido. A decomposição de grupos hidroxila residuais ocorrerá até cerca de 600°C à 700°C (TRONTO, 2006; BENÍCIO et al., 2015; DOMINGUINI et al. 2015).

3.2.2- Área superficial específica e Porosidade

A área superficial e a porosidade são propriedades associadas a capacidade do HDL em atuar como absorventes e catalisadores (PAVAN; GOMES; VALIM, 1998). Dados na literatura indicam os valores de área superficial para os HDL na faixa de 50 a 80 m²g⁻¹ (CREPALDI; VALIM, 1998), entretanto, Reichle (1986) reportou a obtenção de um HDL do tipo Mg-Al-CO₃ com área superficial de 200 m²g⁻¹, o qual foi tratado hidrotermicamente a 65°C, mesmo com a maior área superficial para o composto tratado hidrotermicamente (RAJAMATHI et al., 2000) observou que o tratamento hidrotérmico aumenta a cristalinidade do material.

Outros fatores, tais como velocidade de adição (coprecipitação e sal- óxido) e a concentrações das soluções utilizadas também influenciam na forma e na porosidade do composto, e conseqüentemente, a área superficial do produto (BENÍCIO et al., 2015).

O desenvolvimento de materiais porosos com alta capacidade de adsorção e que possam ser reutilizados ou reciclados vem se tornando um grande desafio, principalmente quando os conceitos envolvidos na Química Verde são levados em conta. Assim, haverá economia de matérias-primas e energia e, ainda, redução da quantidade de resíduos gerados (FERREIRA et al., 2007).

3.2.3- Efeito Memória

As argilas aniônicas constituem uma das principais classes de trocadores aniônicos devido ao seu efeito memória (FERREIRA et al., 2007). O efeito memória refere-se a capacidade de reconstrução lamelar dos compostos a partir do precursor calcinado, ocorre quando um HDL perde seu ânion interlamelar por decomposição térmica.

O material calcinado é colocado em uma solução aquosa, contendo os ânions passíveis de serem intercalados, sendo os mesmo originalmente presentes no HDL irá regenerar a mesma estrutura, ou a intercalação de íons distintos através da adição do material calcinado em uma solução contendo os íons de (TICHIT; COQ, 2003). A reconstrução também pode ocorrer pelo contato do material calcinado com água, ocorrendo intercalação de grupos hidroxila (VACARRI, 1998) ou pela exposição ao CO₂ atmosférico onde o íon carbonato é intercalado (VACARRI, 1998; RAJAMATHI et al., 2000). De acordo com Rajamathi et al. (2000) HDLs com composição Mg-Al e Zn-Al são os únicos que apresentem esse efeito.

4- Ácido Kójico

O ácido kójico (AK), um dos agentes clareadores de pele mais utilizados, quimicamente conhecido como 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona, é um derivado fúngico hidrofílico obtido dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, popularmente empregado para o tratamento de melasma (DRAELOS, 2007), devido à sua forte capacidade quelante de metais, o ácido kójico tem sido considerado como um inibidor potente da tirosinase e aplicado amplamente nas indústrias de cosméticos e alimentos (BURNETT et al., 2010). O ácido kójico é um cristal incolor, prismático que sublima no vácuo, sem nenhuma alteração em sua morfologia, este ácido é solúvel em água, etanol e acetato de etila (CIMERMAN, 1995). Seu peso molecular 142,1, e é determinado pelo método crioscópico através da fórmula C₆H₆O₄ (BEARD; WALTON, 1969), para análises no ultravioleta os espectros máximos de absorção são detectados em 280 nm – 284 nm (KANG et al., 2009).

Considerando as aplicações terapêuticas, o AK é amplamente utilizado em preparações cosméticas como agente clareador (LIM, 1999), por possuir uma

atividade inibitória na formação da melanina e por sua atividade protetora contra os raios ultravioleta. Sendo o princípio ativo de diversos cosméticos para o tratamento de sardas, manchas de pele decorrentes da idade, e ainda para produtos odontológicos para o clareamento dentário (ROSFARIZAN et al., 2010).

A fim de avaliar a segurança com relação a toxicidade e genotoxicidade na utilização do AK, o trabalho de (NOHYNEK et al., 2004) concluiu que a utilização de AK pela via tópica não oferece riscos aos indivíduos usuários deste composto em formulações cosméticas. E ainda, que o AK possui atividade antioxidante contra as espécies reativas de oxigênio liberados no meio extracelular (NIWA; AKAMATSU, 1991). Outras atividade do AK também são relatadas na literatura: cicatrizante em feridas (MOHAMMADPOUR et al., 2013), antitumoral (MOTO et al., 2006), agente radioprotetor (EMAMI et al., 2007), ação microbicida em *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Trichophyton rubrum*, considerados importantes patógenos humanos (CIZEIKIENE et al., 2013) e agente leishmanicida (RODRIGUES et al., 2014)

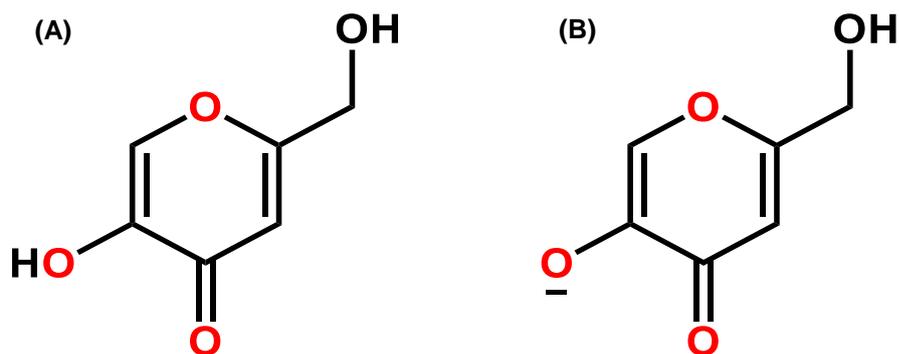


Figura 05 – Representação esquemática das duas formas utilizadas para o AK: (A) Forma reduzida (B) Forma oxidada.

5 - Potencial anti-leishmania do HDL-KA

A busca por novos alvos terapêuticos é um campo crescente na pesquisa acadêmica e na indústria farmacêutica, existindo a necessidade de compostos fármaco-específicos capazes de atuar em células ou em componentes celulares de forma precisa e eficaz, diminuir a toxicidade e custos também são parte do objetivo

na produção de novos fármacos, com base nisso os fármacos intercalados em nanopartículas se mostram como potenciais veículos para o tratamento de diversas doenças como a leishmaniose.

Doenças endêmicas ainda afetam fortemente a América latina e outras regiões do globo, estima-se que cerca 1000 pacientes morram todos os anos por causa de doenças como a Leishmaniose (LACERDA et al., 2016). A disseminação desta doença é principalmente atribuída aos insetos que através de sua saliva ou fezes, atingem inúmeras pessoas em poucas horas (MORAES et al., 2015), além disso, em muitos casos o animal pode ser o reservatório do protozoário, e com isto também se tornar um disseminador. A grande problemática sobre esta doença é que a maioria dos tratamentos disponíveis como quimioterápicos, e outras substâncias que possuem um alto custo, além de serem altamente tóxicas (MONTRIEUX et al., 2014; MORAES et al., 2015).

Recentemente, um estudo demonstrou que o ácido kójico é um potente inibidor de leishmania, este metabólito secundário fúngico, foi utilizado em culturas de *L. amazonensis*, e demonstrou uma eficácia de 62% na diminuição de culturas de promastigota e uma eficácia maior de 79% em culturas de amastigotas, ambas formas evolutivas de leishmania (RODRIGUES et al., 2014). Em outros trabalhos, o ácido kójico é indicado como um estimulador de macrófagos, aumentando a atividade fagocitária e a organização do citoesqueleto (RODRIGUES et al., 2011), isto é um indício para o seu uso no combate a leishmania, visto que há um estímulo da atividade fagocítica o que pode favorecer o combate ao parasita.

6- MATERIAL E MÉTODOS

6.1- Material

Todos os reagentes utilizados neste trabalho de dissertação apresentavam grau de pureza analítica e foram empregados sem purificação antecedente. Os reagentes higroscópicos foram previamente secos em presença de sílica gel ativada. Em geral, toda a água utilizada neste trabalho foi destilada, mas sempre que necessário utilizou-se água deionizada.

6.2- Síntese e Intercalação do Ácido Kójico

Para a síntese de HDL (Mg/Al-NO₃) intercalado com ácido kójico (AK), utilizamos o método de coprecipitação, a fim de obtermos o complexo AK-HDL. De início, foram utilizados 10 ml de água deionizada decarbonatada para a solubilização de 0,90141g dos nitratos metálicos Mg/Al, na razão molar estabelecida de 2:1. Para a solubilização do AK, preparamos outra solução de EtOH/DMSO (4:1 v/v) contendo 26,3464 mmol de sódio metálico (EtOH/DMSO/Na). Desta solução retiramos 25 mL para a solubilização de 10,57026 mmol de AK puro.

Posteriormente, 10mL da solução aquosa dos sais de Mg/Al foram gotejados lentamente num balão de três bocas contendo 25mL da solução contendo AK dissolvido em solução de (EtOH/DMSO/Na). Este gotejamento foi realizado sob vigorosa agitação e um contínuo fluxo de gás nitrogênio (N₂) com o intuito de diminuir a contaminação por CO₂. Durante este processo de adição dos sais sobre a solução contendo o fármaco, controlamos o pH constante através da adição contínua de solução de NaOH 2mol/L. O material resultante deste processo se assemelha a um “gel”, o mesmo permaneceu sob forte agitação e um fluxo constante de N₂ a 40 ±2°C por 24h. O material formado foi isolado por centrifugação, e posteriormente filtrado e lavado cuidadosamente com solução de EtOH/DMSO, em seguida o material foi transferido para estufa a 70 °C por 24 h. Na sequência, este material foi pulverizado para a realização de posteriores análises.

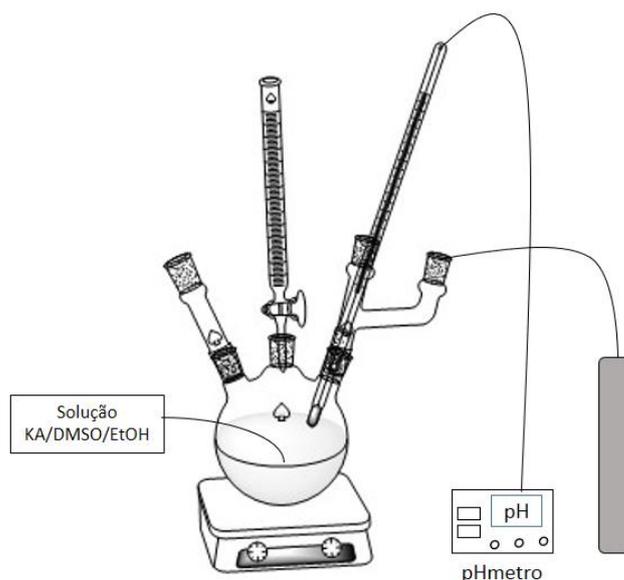


Figura 06- Esquema de síntese de HDLs intercalados com ácido kójico. Método de coprecipitação.

6.3- Caracterização dos HDLs

Análises físico-químicas foram realizadas para caracterizar e ratificar as propriedades inerentes as estruturas dos HDLs. A partir desses resultados podemos constatar a existência de um hidróxido duplo lamelar, e assim prosseguirmos com os testes *in vitro*.

6.3.1- Difratometria de Raio-X

A determinação das propriedades estruturais dos materiais lamelares e a determinação das fases cristalinas foram identificadas pelas análises de difratometria de raio-x. A partir dos difratogramas obtidos, caracterizamos a intercalação do fármaco no HDL, o grau de cristalinidade, os espaçamentos basais e tamanho das partículas. As condições utilizadas foram: radiação Cu ($K\alpha_1=1,540598 \text{ \AA}$), faixa angular ($^{\circ}2\theta$) = $1.5-80^{\circ}$, voltagem do tubo = 40 kV, corrente do tubo = 40 mA, fenda divergente = 0,6mm, fenda soller = $2,5^{\circ}$, filtro $K\beta$ de Ni, a coleta dos difratogramas foi realizada com passo angular de $0,01^{\circ}$ e o tempo por passo 1 segundo, num tempo

total de coleta = 7975s, essas análises foram realizadas no difretometro D8 Advance da Bruker, estas análises foram realizadas no Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia da Amazônia (LABNANO-AMAZON) – UFPA.

6.3.2- Espectroscopia no Ultravioleta-visível

As curvas analíticas de ácido kójico em solução tampão (pH=7,00 \pm 0,002) foram obtidas através da preparação de uma solução estoque na concentração de 1,0 g.L⁻¹ num volume de 50mL. Foram realizadas diluições seriadas a partir da solução estoque nas seguintes concentrações: 0,1 g.L⁻¹, 0,2 g.L⁻¹, 0,3 g.L⁻¹, 0,4 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹, 0,6 g.L⁻¹, 0,7 g.L⁻¹, 0,8 g.L⁻¹ e 0,9 g.L⁻¹. Um volume de 3 mL de cada solução foram adicionados em uma cubeta de quartzo, sendo estas submetidas a leitura no espectrofotômetro UV-vis (modelo Shimadzu UV2600, pertencente ao LPDF-UFPA/Brasil), o comprimento de onda utilizado (λ) foi de 265 nm. A partir das análises do equipamento, plotamos um gráfico relacionando as concentrações com os valores de absorbância do ácido kójico no pH= pH=7,00 \pm 0,002. Assim, utilizando os valores experimentais, obtivemos a equação da reta através da regressão linear dos dados, com isto foi possível realizar a quantificação do fármaco intercalado em HDL. Para fins de comparação, analisamos o HDL puro, bem como o HDL-AK, para ambos pesamos 1 mg de cada amostra e estas foram diluídas num volume final de 10 mL, sendo submetidas ao seguinte tratamento obedecendo a ordem: 2mL de EtOH puro e 1 mL de HCL 0,1 M, para completar o volume final adicionamos 7mLde solução tampão pH 7,00. O objetivo de submeter as amostras de HDL ao EtOH e HCL é exclusivamente para os fins de desestruturação da matriz de HDL e assim, liberar o fármaco intercalado no meio. Os espectros de absorção das amostras de HDL-AK foram medidos sob um comprimento de onda de λ 265 nm na faixa de 200-400 nm.

3.3.3- Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram registrados em um aparelho BURKER, modelo VERTEX 70v. Os espectros foram obtidos na região entre

4000-400 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} . Estas análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia vibracional e altas pressões (PPGF/ UFPA).

3.3.4- Análise Térmica

As análises termogravimétricas (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram executadas no equipamento TG/DSC modelo STA PCLux, marca Netzsch, acoplado a um espectrômetro de massas QMS 403 Aelos e um injetor de gases PulseTA, ambos também da marca Netzsch. As curvas TG/DSC e os espectros de massas dos principais gases formados (H_2O e CO_2) foram registrados em atmosfera de ar sintético ou nitrogênio (20 mL/min) com uma taxa de aquecimento de 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$ até a temperatura de 1000 $^\circ\text{C}$. As massas das amostras (~ 5 mg) foram pesadas em cadinho de alumina (Instituto de Geologia - UFPA).

6.4- Testes *in vitro*

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/26361) foram obtidas em meio NNN provenientes do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, e mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) em estufa B.O.D (*Biological Oxygen Demand*) à 27 $^\circ\text{C}$.

6.4.1- Atividade Antipromastigota

As promastigotes de *Leishmania amazonensis* (MHOM / BR / 26361) foram obtidas do Instituto Evandro Chagas do Setor de Leishmaniose e mantidos em RPMI 1640 médio suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS) a 27 $^\circ\text{C}$. Para ensaios antipromastigotas, foram cultivadas as promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase de crescimento exponencial e foram tratadas com diferentes concentrações de HDL-KA (10-100 $\mu\text{g / mL}$) por 96 horas e incubadas a 25 $^\circ\text{C}$. A cada 24 h, as alíquotas foram colhidas e as promastigotas foram incubadas durante 4 horas com 20 μL de brometo de MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio) (solução-mãe de 2 mg / mL). Após a incubação, a solubilização dos cristais de

formazan foi adicionada a 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução resultante foi lida em um leitor de microplacas (Leitor de Microplacas BIO-RAD Modelo 450) a um comprimento de onda de 570 nm. Promastigotas tratadas com AMP-B (0,5 µg / mL) foram utilizados como controle positivo. Foi utilizado o controle dos promastigotas quando comparado ao controle não tratado.

6.4.2- Ensaio Antiamastigota

Os macrófagos (células 5×10^3 por placa) foram infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase de crescimento estacionário (sete dias), relação hospedeiro-parasita de 1:10 durante 3 horas a uma temperatura de 37 ° C em atmosfera de 5% de CO₂. As células infectadas foram tratadas por 72 horas com 20, 50 e 100 µg / mL de LDH-KA. Após o tratamento, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído / PBS pH 7,2 durante 30 minutos. As células foram coradas com Giemsa (Sigma®), montadas em lâminas de vidro e contadas no microscópio Axio Scope.A1- Zeiss como descrito por Da Silva et al. 18. O índice endocítico foi realizado com contagem de 200 células por lamínula conforme relatado por da Silva et al. 18. A concentração inibitória (IC₅₀) de formas de promastigotas e amastigotas foi determinada usando SigmaPlot (versão 12). Foi utilizado o controle dos amastigotas tratados com DMSO e / ou LDH por 96 horas e não foi observado redução de parasitas quando comparado ao controle não tratado.

6.4.3 – Teste de Viabilidade

A linhagem celular de macrófagos de rato, J774 foi cultivada em placas de 96 poços (células 5×10^3 para placas) e tratadas com diferentes concentrações de HDL-AK (20-400 µg / mL). Após o tratamento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7,2 e incubadas com MTT 0,5 mg / mL durante 3 horas a 37 ° C, 5% de CO₂. Posteriormente, os cristais de formazan formados pelas células viáveis foram solubilizados em DMSO e lidas em um leitor de microplacas (BIO-RAD Modelo 450 Microplate Reader, Cidade de Pais) sobre a absorvância a 570 nm. A concentração de citotoxicidade (CC₅₀) foi determinada usando SigmaPlot (versão 12) e o índice de seletividade (SI) foi determinado pela razão CC₅₀ e IC₅₀.

7- RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1- Análises de Difractometria de Raio-X

A partir da análise de difração de raios-X no pó, podemos avaliar o potencial das amostras sintetizadas, pois em posse dos dados obtidos é possível determinar informações únicas e precisas do material submetido à análise, como por exemplo: espaçamentos basais (d), grau de cristalinidade, organização do material no que se refere ao empilhamento das lamelas, número de camadas (NC), tamanho da partícula (t) e os parâmetros de rede (a e c), todos estes dados são obtidos através de análises matemáticas correspondentes a intensidade e largura dos picos obtidos por difração de raio x no pó.

A Figura 7 mostra os padrões de difração de raios X das amostras sintetizadas pelo do método de coprecipitação. O espaçamento basal d (003) e d (006) do HDL (Mg / Al-NO₃), correspondente ao espaçamento basal da camada intercalar de 0,90 nm e 0,45 nm, que são característicos de produtos bem cristalizados, típicos da estrutura de hidrotalcita com $c = 2,7$ nm correspondente ao empilhamento de 3 camadas de brucita (MILLS ET AL., 2012). A reflexão d (003) 0,9 nm corresponde ao valor típico encontrado para o HDL intercalado com ânions de nitrato (XU; ZENG, 2001; XU; ZENG, 2001). Além disso, a AK intercalado na galeria de HDL é claramente diferente. Por exemplo, o seu primeiro e mais alto pico está localizado em ângulos inferiores ($\sim 7,71^\circ 2\theta$), indicando um espaçamento basal muito maior de cerca de 1,15 nm, cerca de 1,29 nm relatado em estudo prévio para o ácido kójico intercalado em ZnAl-HTlc-KOJ (AMBROGI et al., 2012).

Considerando que o tamanho da camada de HDL do tipo brucita é de cerca de 0,48 nm (23), a altura da galeria (1,15 nm) do híbrido LDH-KA é de cerca de 0,67 nm. Com base nessa informação, acreditamos que as moléculas de AK se entrelaçam na região de camada intermediária de HDL como monocamada, com os ânions de AK intercalados apontam os grupos 2-hidroximetil em direção às camadas de hidrotalcita, com imobilização através de ligações de hidrogênio, como sugerido anteriormente por (AMBROGI et al., 2012).

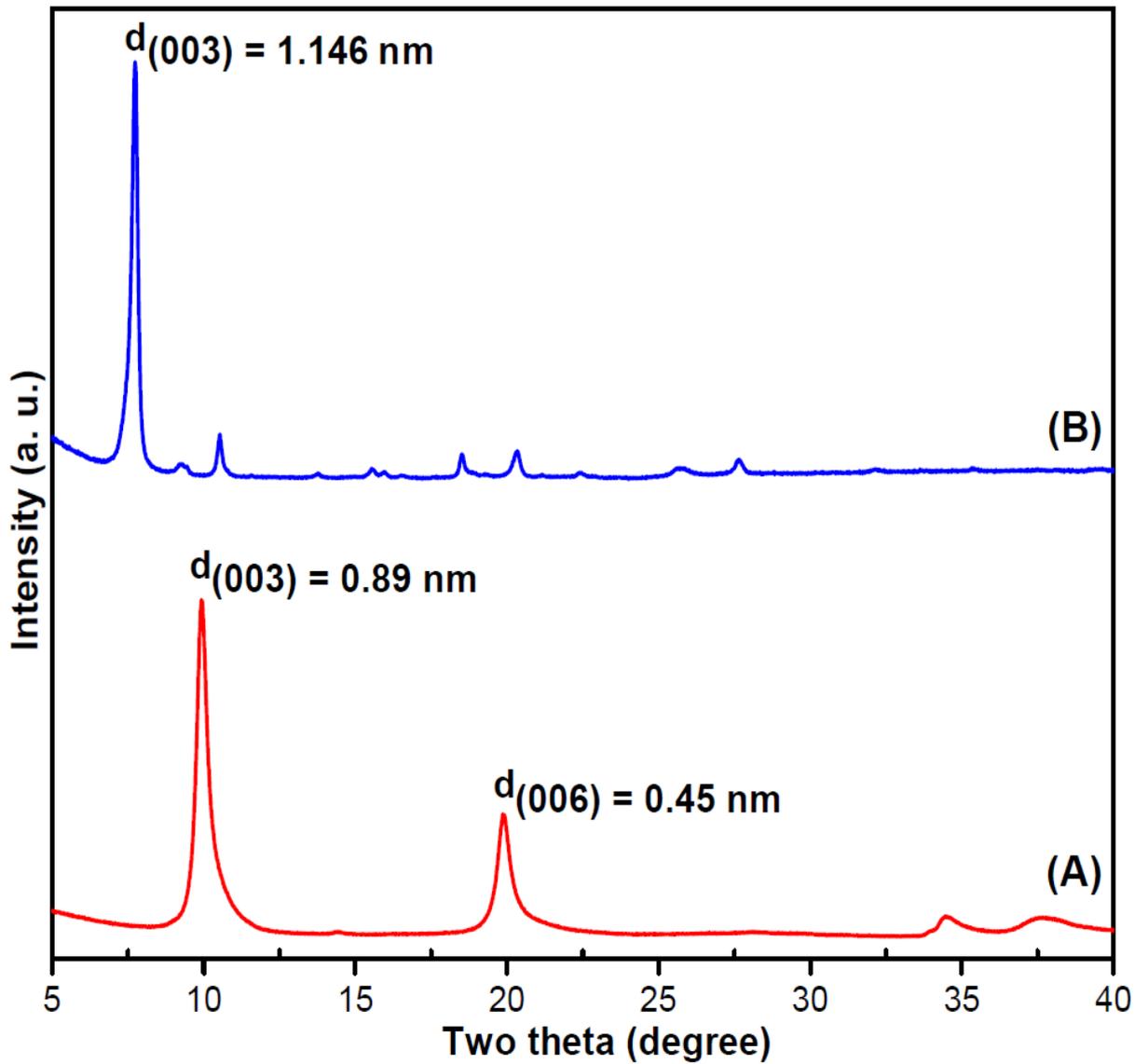


Figura 7 – Difratoograma de raio x (A) HDL (MgAl-NO_3) e (B) HDL-AK.

Tabela 4- Dados obtidos através dos padrões de DRX das amostras obtidas.

AMOSTRAS	ÍNDICE DE MILLER	2 θ (°)	D _{SPACING} (Å)	FWHM (°)	T (Å)	Nº CAMADAS	C (Å)	A (Å)
HDL (MA-NO ₃)	003	9.930	8.899	0.427	207.04	23.26	26.697	-
	006	19.884	4.461	0.503	-	-	-	-
	110	60.719	1.524	0.730	-	-	-	3.0481
	113	61.700	1.502	0.844	-	-	-	-
HDL-AK	003	7.7112	11.45560	0.39873	222.487	19.421	34.366	-
	006	-	-	-	-	-	-	-
	110	-	-	-	-	-	-	-

7.2- Análises de Espectroscopia no Ultravioleta-visível

Os valores de absorvância e os desvios padrões correspondentes a cada concentração da curva analítica de calibração do AK livre são apresentados na Tabela 05, estes resultados foram obtidos através do espectrofotômetro na região do UV-visível com o comprimento de onda fixo em 265 nm.

Tabela 05- Valor médio e *Desvio padrão das medidas em triplicata.

Amostras	Conc. (mg L ⁻¹) [†]	Abs. (a. u.) [*]
C1	4,099 ± 0,1143	0,269 ± 0,114
C2	8,198 ± 0,2286	0,423 ± 0,228
C3	12,297 ± 0,3429	0,749 ± 0,342
C4	16,396 ± 0,4572	0,926 ± 0,457
C5	20,495 ± 0,5715	1,121 ± 0,700
C6	24,594 ± 0,6853	1,427 ± 0,685
C7	28,693 ± 0,7996	1,720 ± 0,979

C8	32,792 ± 0,9139	1,912 ± 0,913
C9	36,891 ± 1,0282	2,096 ± 1,028
C10	40,990 ± 1,1425	2,312 ± 1,399

Diante dos espectros obtidos para cada amostra de AK em diferentes concentrações, observamos que o método foi preciso, visto que não houve interferência dos solventes (Figura 08). A curva analítica também foi calculada por regressão linear, baseando-se na equação da reta sendo: $y = a + bx$, onde o coeficiente de correlação de Pearson, $r^2 = 0,9963$, mostrando uma boa linearidade (Figura 08). Com as quantificações realizadas para a amostra V, podemos acreditar que V possui $(53,018 \pm 1,081)$ % de fármaco intercalado em suas lamelas, o que supera o trabalho realizado por (AMBROGI et al., 2012), onde o HDL de $Zn_2-Al-NO_3$ possui aproximadamente 25% de AK intercalado em suas lamelas.

A partir da curva obtida podemos inferir que o resultado foi diretamente proporcional a concentração do analito, com isto quantificamos o fármaco presente nas lamelas de HDL.

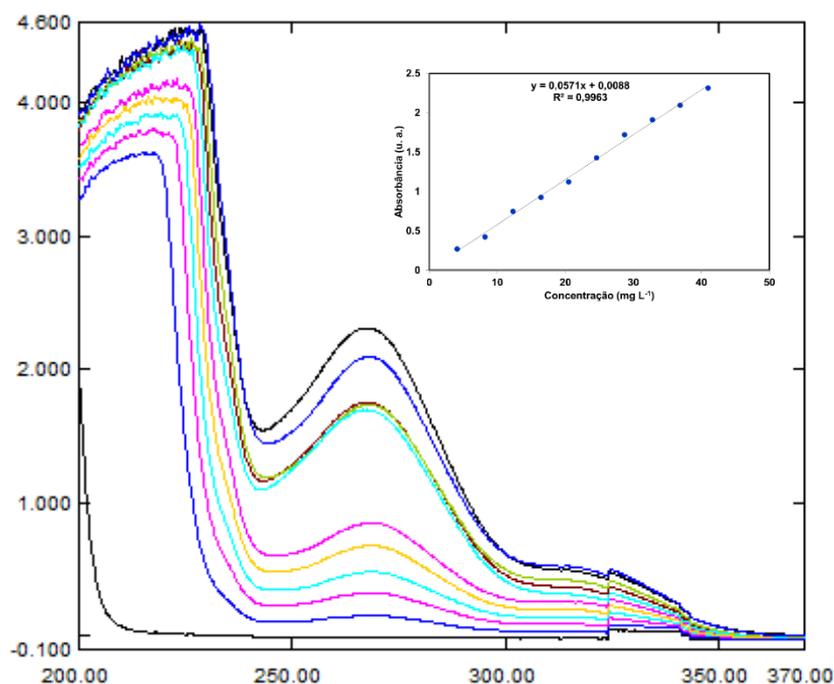


Figura 08- Espectros de absorção e representação gráfica para ácido fólico livre e coeficiente de relação

7.3- Análises de Espectroscopia no Infravermelho

Os modos vibracionais para as amostras de HDL (MgAl-NO₃) e HDL-AK foram analisados por espectroscopia de infravermelho Figura 09 . Os resultados obtidos estão de acordo com os dados da literatura para esses tipos de materiais (HUSSEIN-ALI ET AL., 2014). Por exemplo, na Figura 09 podemos ver o modelo vibracional correspondente ao HDL, onde a absorção a 1650 cm⁻¹ é originária da vibração de flexão O-H de grupos hidroxilo (XU AND ZENG, 2001). Da mesma forma, a presença de NO₃ ânions evidenciado por um pico característico afiado a 1355 cm⁻¹ atribuído ao seu modo vibratório (XU AND ZENG, 2001). O desaparecimento da banda de ânions NO₃ é garantido graças à troca aniônica obtida através do método de co-precipitação, confirmando por novos modos de vibração, tais como, as bandas a 1610 cm⁻¹ C = O, 1541 cm⁻¹ e 1585 cm⁻¹ C = C e 1149 cm⁻¹ e 1158 cm⁻¹ refere-se às moléculas de COC de KA no híbrido LDH-KA. Esses modos de vibração foram decorrentes de que o fármaco é intercalado na estrutura do hospedeiro de HDL, talvez estabilizado através de ligações de hidrogênio conforme proposto anteriormente. Além disso, bandas a 445 cm⁻¹ e 552 cm⁻¹ são atribuídas aos modos de vibração da rede atribuídos a M-OH (KLOPROGGE ET AL., 2004).

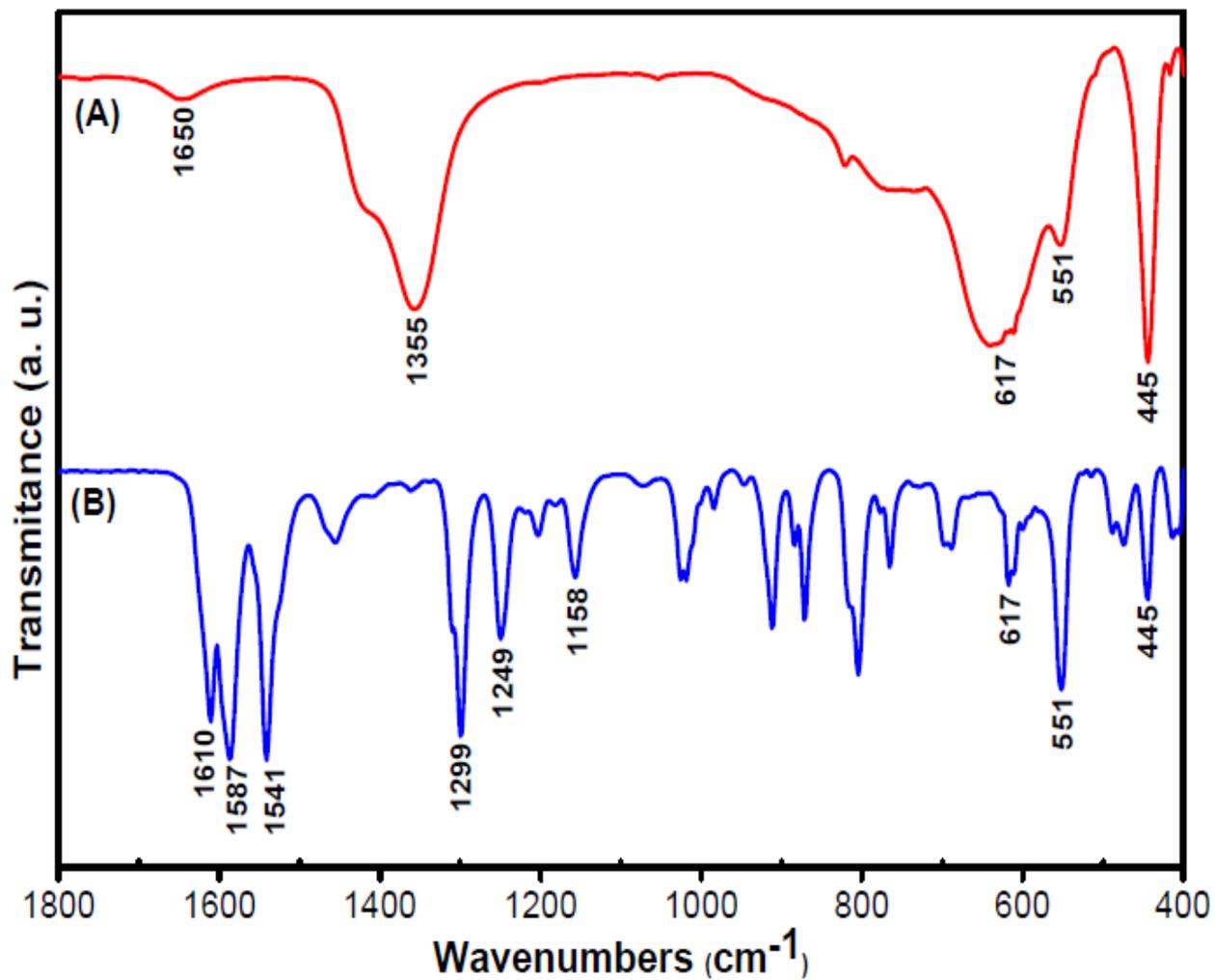


Figura 09- Espectros na região do infravermelho para: ácido kójico (KOJ), MgAl-NO₃ (MA) e KOJ-MA (V)

7.6- Análises de Termogravimétricas

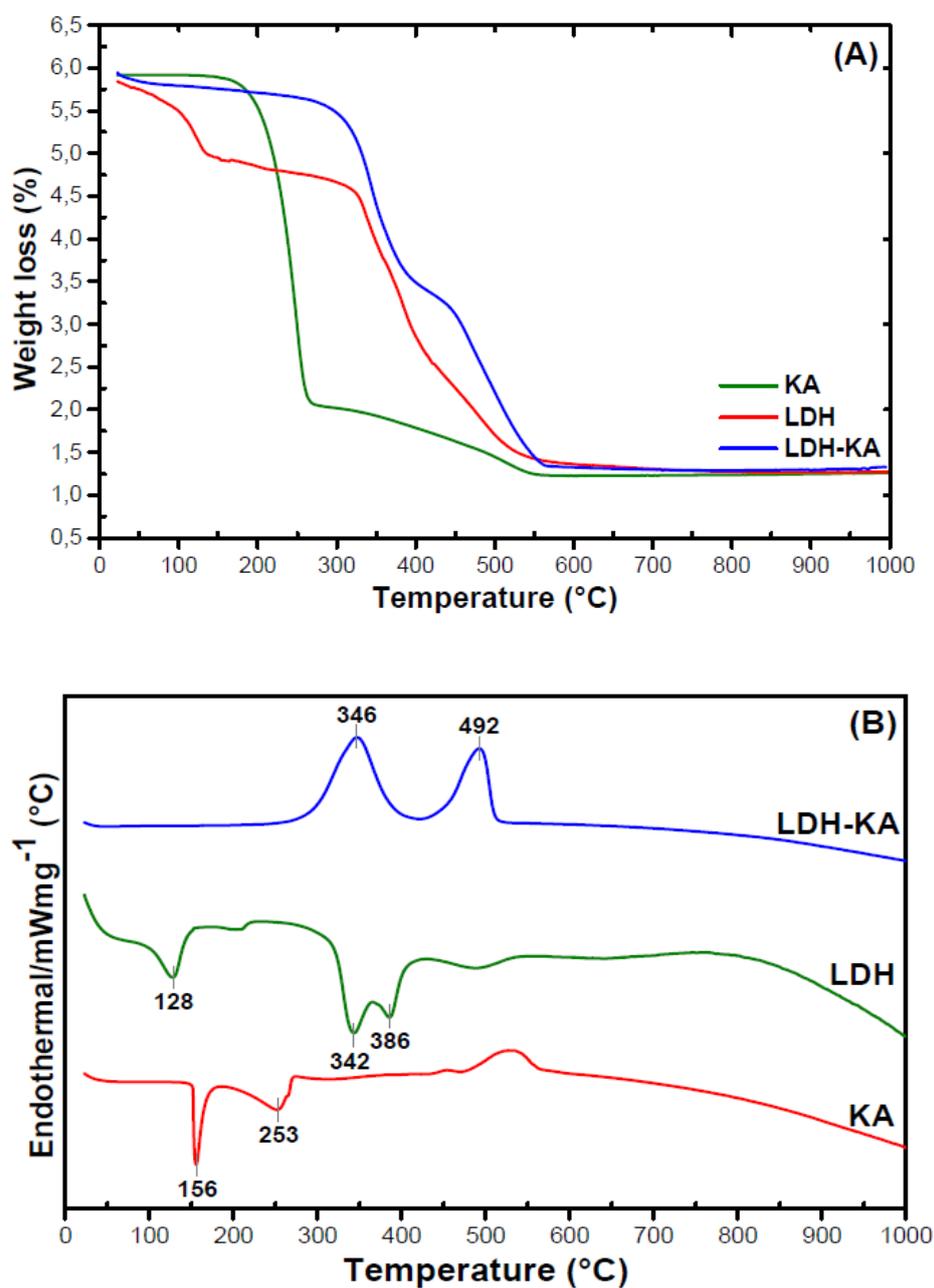


Figure 10. (A) TG and (B) DSC curvas de ácido kójico livre (KA), HDL (MgAl-NO_3) e LDH – AK (amostra híbrida).

A estabilidade térmica das amostras foi analisada por termogravimetria e o resultado é mostrado na Figura 10a e 10b que exibem a perda de peso em função da

temperatura para AK puro, HDL (Mg / Al-NO₃) e HDL-AK obtidas por TG / DSC curvas. Para KA livre, um pico endotérmico a 156 ° C na sua curva DSC, surgiu do processo de fusão da substância cristalina pura (AMBROGI et al., 2012) e a decomposição térmica completa foi alcançada em torno de 253 ° C. Para HDL (MgAl-NO₃), a decomposição térmica passou por duas etapas (XU AND ZENG, 2001). Em primeiro lugar, um pico endotérmico a 128 ° C é devido à remoção da água intercalada parcialmente. O segundo entre 200 ° C e 600 ° C é atribuído à desidratação das camadas semelhantes a brucita e à decomposição dos ânions de nitrato, com dois picos endotérmicos a 342 ° C e 386 ° C.

Para a amostra de HDL-AK, a perda de peso provém de 200 ° C a 1000 ° C, que são atribuíveis à decomposição de moléculas de KA, ânions de nitrato e perda de água provenientes de camadas inorgânicas de dihidroxilação (AMBROGI et al., 2012), enquanto o padrão da amostra aquecida a 1000 ° C é característico da presença de MgO e Mg_{1-x}Al_xO_{1 + (x / 2)} 20,21. Também na Figura 10a e 10b, observamos que o KA complexado na LDH é mais termicamente estável do que na sua forma livre, o que demonstra a propriedade protetora do material inorgânico para o composto orgânico.

7.7- Análises dos Testes *in vitro*

No presente estudo, mostramos pela primeira vez que LDH-KA apresenta ação biológica *contra L. (L.) amazonensis in vitro*. A atividade antipromastigota pelo método MTT foi realizada para verificar se HDL-AK apresenta ação *contra L. (L.) amazonensis* promastigotas. A HDL-AK promoveu uma diminuição de 19,6% (10 µg / mL), 24,9% (20 µg / mL), 27,1% (50 µg / mL) e 35,7% (100 µg / mL) de *L. (L.) amazonensis* promastigotas (IC₅₀ ≥ 140 µg / mL) após o tratamento durante 96 horas (Figura 11A). Em contraste, o índice de sobrevivência mostrou que HDL-AK parece ser mais eficaz *contra amastigotas de L. (L.) amazonensis* (forma intracelular encontrada em lesões de leishmaniose cutânea) (IC₅₀ = 54,80 µg / mL). Observou-se redução de 29,4% (20 µg / mL), 58,6% (50 µg / mL) e 78,7% (100 µg / mL) de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* após tratamento por 72 horas com LDH-KA (Figura 11B). O AMP-B foi utilizado como controle positivo e promoveu redução de 100% para *L. (L.) amazonensis* promastigotas e de 81% para *L. (L.) amazonensis* amastigotas. Além disso, LDH-KA não causou efeito citotóxico (CC₅₀ = 2246,98 µg / mL) (Figura 11C) para macrófagos peritoneais e apresentou um SI de 15,8 para promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e de 41,0 para amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

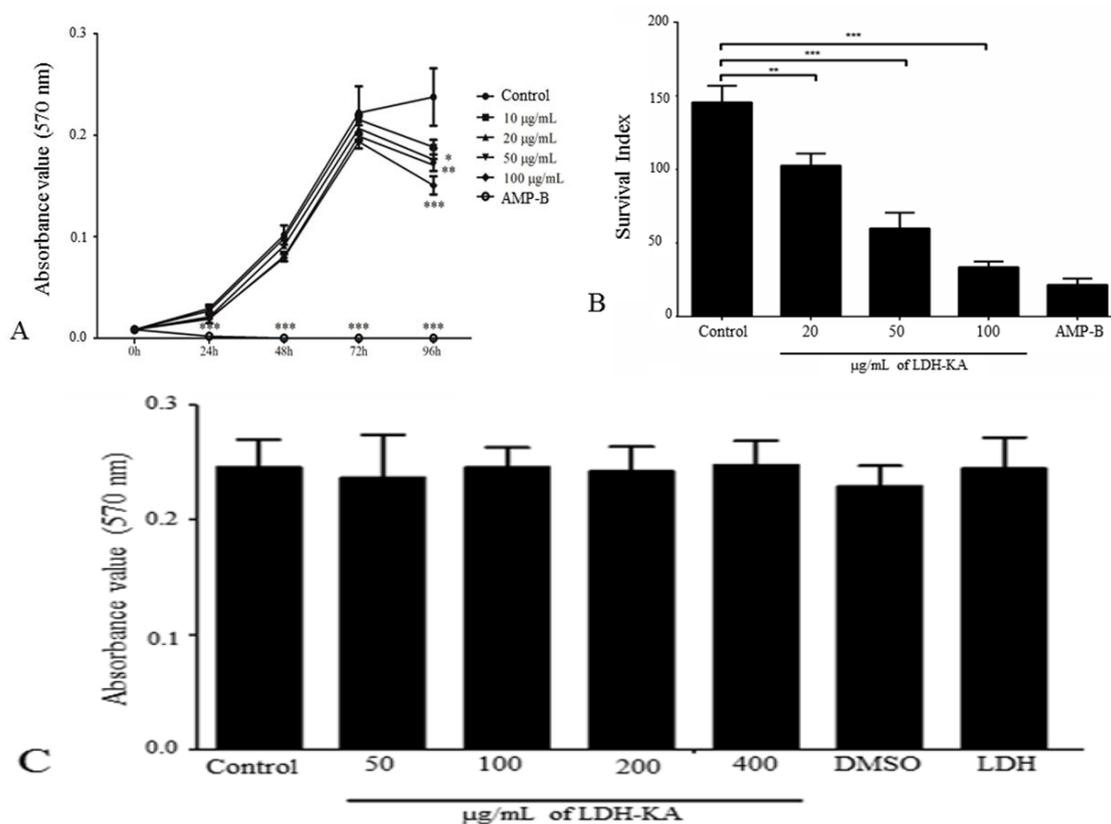


Figura 11 - Atividade de HDL-AK contra espécies de *L. (L.) amazonensis in vitro*. A) atividade antipromastigota de HDL-AK contra *L. (L.) amazonensis*. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas com diferentes concentrações de HDL-AK (10-100 µg / mL). B) Efeito HDL-AK em amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O tratamento de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* foi realizado por 72 horas com diferentes concentrações de HDL-AK (20-50 µg / mL). C) Ensaio de viabilidade. HDL-AK não apresentou efeito citotóxico para macrófagos peritoneais após 72 horas de tratamento. ANOVA, seguido do teste de Tukey, * p <0,001, * p <0,05, *** p <0,001.

Rodrigues et al. (2014) mostraram o efeito do ácido kójico no protozoário *L. (L.) amazonensis in vitro* e *in vivo*. Foi demonstrado que a AK promoveu uma redução de 62% das formas promastigotas e 79% das formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. No presente estudo, observou-se que a HDL-AK é ligeiramente ativo contra a ação leishmanicida quando comparada à substância KA pura. No entanto, as substâncias

intercaladas têm inúmeras vantagens quando comparadas as não intercaladas, como baixa toxicidade, distribuição seletiva e liberação controlada dos compostos (KURA et al., 2014). Além disso, as nanopartículas HDL interagem facilmente com a membrana plasmática, facilitando sua internalização (XU et al., 2008). Em compartimentos com pH ácido, como a vacúola parasitófora, os HDLs são facilmente desintegrados e liberam seus conteúdos para esse compartimento (COSTANTINO et al., 2008). Acredita-se que o HDL liberte o AK dentro da vacúola parasitófora e promova a morte de *Leishmania* sem causar a célula hospedeira.

O uso de nanopartículas é atraente e tem sido utilizado para o desenvolvimento de medicamentos contra o protozoário *Leishmania* (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). A nanotecnologia apresenta uma nova metodologia para o tratamento da leishmaniose, um sistema de administração de drogas que direciona a droga para uma região alvo, promovendo a redução de possíveis efeitos adversos. Com base nos resultados observados no presente estudo, o HDL-AK apresentou atividade biológica contra as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* sem causar danos aos macrófagos, características favoráveis para o desenvolvimento de um agente leishmanicida. Além disso, será importante realizar estudos in vivo no modelo de leishmaniose cutânea usando HDL-AK como uma formulação tópica para confirmar a ação leishmanicida observada neste estudo.

8- CONCLUSÃO

O método de coprecipitação foi utilizado para o ácido kójico intercalado (AK) em hidróxidos duplos em camadas contendo Mg e Al (HDL-MgAl) por único passo de síntese. Os íons KA incorporados no espaço de intercalação HDL (HDL-AK) foram analisados através de diferentes técnicas analíticas, como por exemplo, a difração de raio X, que confirmou o aspecto estrutural do material híbrido, bem como os modos vibracionais dos compostos foram avaliados por infravermelho e Raman. A análise de UV-vis mostra que 53% do ácido kójico foi intercalado em camadas de LDH, o que é um resultado muito encorajador em comparação com os resultados da literatura. Também a análise térmica revelou maior estabilidade do composto orgânico quando complexada com o material inorgânico.

Além disso, também foi demonstrado que o híbrido HDL-KA pode ser usado como um biomaterial Leishmanicida eficiente contra formas amastigotas de *Leishmania (L. (L.) amazonensis)*.

Assim, HDL-AK poderia ser útil para o tratamento seletivo da leishmaniose cutânea e pode ter um grande potencial como agente anti-leishmania. Para o nosso melhor conhecimento, este trabalho demonstra, pela primeira vez, a ação de HDL-AK em *L. (L.) amazonensis in vitro*.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. **Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review** *Acta Tropica*, 2017.

AMBROGI, V. et al. Immobilization of kojic acid in ZnAl-hydrotalcite like compounds. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 73, n. 1, p. 94–98, 2012.

BARAHUJE, F. et al. Development of drug delivery systems based on layered hydroxides for nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 7750–7786, 2014.

BEARD, R. L.; WALTON, G. S. Kojic acid as an insecticidal mycotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 14, n. 1, p. 53–59, 1969.

BENÍCIO, L. P. F. et al. Skin delivery of kojic acid-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 3165–3196, 2014.

BENÍCIO, L. P. F. et al. Defect-Rich Ultrathin ZnAl-Layered Double Hydroxide Nanosheets for Efficient Photoreduction of CO₂ to CO with Water. **Advanced Materials**, v. 88, n. June, p. n/a-n/a, 2015.

BI, X.; ZHANG, H.; DOU, L. **Layered double hydroxide-based nanocarriers for drug delivery** *Pharmaceutics*, 2014.

BOTAN, R. et al. Síntese e caracterização de Nanocompósitos Esfoliados de Poliestireno: Hidróxido Duplo Lamelar via polimerização in situ. **Polímeros**, v. 21, n. 1, p. 34–38, 2011.

BOTT, R. **Expanded Clays and Other Microporous Solids**. [s.l.: s.n.].

BURNETT, C. L. et al. **Final report of the safety assessment of Kojic acid as used in cosmetics**. [s.l.: s.n.]. v. 29

CAVANI, F.; TRIFIRÒ, F.; VACCARI, A. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. **Catalysis Today**, v. 11, n. 2, p. 173–301, 1991.

CHEN, H. et al. Rethinking cancer nanotheranostics. **Nature Reviews Materials**, v. 2, n. 7, p. 17024, 2017.

CIMERMAN, A. Aspergillus toxins. **Alpe Adria Microbiol J**, v. 4, n. 3, p. 181–188, 1995.

CIZEIKIENE, D. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 539–545, 2013.

COSTANTINO, U. et al. Hydrotalcite-like compounds: Versatile layered hosts of molecular anions with biological activity. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 107, n. 1–2, p. 149–160, 2008.

CREPALDI, E. L.; VALIM, J. B. Hidróxidos duplos lamelares: Síntese, estrutura, propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 300–311, 1998.
CUNHA, V. R. R. et al. Revisão. v. 33, n. 1, p. 159–171, 2010a.

CUNHA, V. R. R. et al. **Hidróxidos duplos lamelares: Nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico** **Química Nova**, 2010b.

DEL HOYO, C. Layered double hydroxides and human health: An overview. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1–3, p. 103–121, 2007.

DRAELOS, Z. D. **Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy** **Dermatologic Therapy**, 2007.

EMAMI, S. et al. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 45–48, 2007.

ET AL., CUNHA, V. R. R. Delivery system for mefenamic acid based on the nanocarrier layered double hydroxide: Physicochemical characterization and evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive potential. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 629–638, 2016.

FERREIRA, O. P. et al. **Ecomateriais: Desenvolvimento e aplicação de materiais porosos funcionais para proteção ambiental** **Química Nova**, 2007.

GOH, K. H.; LIM, T. T.; DONG, Z. **Application of layered double hydroxides for removal of oxyanions: A review** **Water Research**, 2008.

HAWLEY, A. E.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 17, n. 1, p. 129–148, 1995.

HUSSEIN-AL-ALI ET AL. Novel kojic acid-polymer-based magnetic nanocomposites for medical applications. p. 351–362, 2014.

ISHIDA, O. et al. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 190, n. 1, p. 49–56, 1999.

KANG, S. S. et al. Synthesis of tyrosinase inhibitory (4-oxo-4H-pyran-2-yl)acrylic acid ester derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 188–191, 2009.

KLOPROGGE ET AL. FT-Raman and FT-IR spectroscopic study of synthetic Mg/Zn/Al-hydrotalcites. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 35, n. 11, p. 967–974, nov. 2004.

KOVANDA, F. et al. Crystallization of synthetic hydrotalcite under hydrothermal conditions. **Applied Clay Science**, v. 28, n. 1–4 SPEC. ISS., p. 101–109, 2005.

KURA, A. U. et al. Layered double hydroxide nanocomposite for drug delivery systems; bio-distribution, toxicity and drug activity enhancement. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 47, 2014.

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

LACERDA, A. F. et al. Anti-parasitic Peptides from Arthropods and their Application in Drug Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. February, p. 1–11, 2016.

LADEWIG, K. et al. Controlled preparation of layered double hydroxide nanoparticles and their application as gene delivery vehicles. **Applied Clay Science**, v. 48, n. 1–2, p. 280–289, 2010.

LAL, M.; HOWE, A. T. **High proton conductivity in pressed pellets of zinc?chromium hydroxide** *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1980.

LIANG, R. et al. Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 50, n. 91, p. 14071–81, 2014.

LIM, J. T. E. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **Dermatologic Surgery**, v. 25, n. 4, p. 282–284, 1999.

MILLS ET AL. Nomenclature of the hydrotalcite supergroup: natural layered double hydroxides. **Mineralogical Magazine**, v. 76, n. 5, p. 1289–1336, 2012.

MOHAMMADPOUR, M. et al. Wound healing by topical application of antioxidant iron chelators: Kojic acid and deferiprone. **International Wound Journal**, v. 10, n. 3, p. 260–264, 2013.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. June, p. 561–573, 2006.

MONTRIEUX, E. et al. In vitro and in vivo activity of major constituents from *Pluchea carolinensis* against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 8, p. 2925–2932, 2014.

MORAES, L. et al. Leishmanicidal Activity of (+)-Phyllanthidine and the Phytochemical Profile of *Margaritaria nobilis* (Phyllanthaceae). **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22157–22169, 2015.

MOTO, M. et al. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 5, p. 299–304, 2006.

NAAHIDI, S. et al. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 2, p. 182–194, 2013.

NIWA, Y.; AKAMATSU, H. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating

leukocyte functions including free radical generation. **Inflammation**, v. 15, n. 4, p. 303–315, 1991.

NOHYNEK, G. J. et al. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 93–105, 2004.

OH, J.-M. et al. LDH Nanocontainers as Bio-Reservoirs and Drug Delivery Carriers. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 6, n. 3, p. 200–217, 2012.

OJEA-JIMENEZ, I. et al. Engineered inorganic nanoparticles for drug delivery applications. **Curr Drug Metab**, p. 518–530, 2012.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147–166, 2012.

PAUSCH, I. Syntheses of Disordered and Al-rich Hydrotalcite-Like Compounds. **Clays and Clay Minerals**, v. 34, n. 5, p. 507–510, 1986.

PAVAN, P. C.; GOMES, G. D. A.; VALIM, J. B. Adsorption of sodium dodecyl sulfate on layered double hydroxides. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 21, n. 4–6, p. 659–665, 1998.

RAJAMATHI, M. et al. Reversible thermal behavior of the layered double hydroxide of Mg with Al: mechanistic studies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 10, n. 12, p. 2754–2753, 2000.

RIVES, V.; ANGELES ULIBARRI, M. Layered double hydroxides (LDH) intercalated with metal coordination compounds and oxometalates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 181, n. 1, p. 61–120, 1999.

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

RODRIGUES, A. P. D. et al. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. **Cell biology international**, v. 35, n. 4, p. 335–343, 2011.

RODRIGUES, A. P. D. et al. A novel function for kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* fungi, as antileishmanial agent. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–8, 2014.

ROSFARIZAN, M. et al. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 5, n. 2, p. 24–37, 2010.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2014.

THE NATIONAL NANOTECHNOLOGY. **National Nanotechnology Initiative** *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 2001.

TICHIT, D.; COQ, B. Catalysis by hydrotalcites and related materials. **CATTECH**, v. 7, n. 6, p. 206–217, 2003.

VINOGRADOV, S. V.; BRONICH, T. K.; KABANOV, A. V. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: Preparation, properties and interactions with cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 135–147, 2002.

XU, Z. P. et al. Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 1, p. 86–94, 2008.

XU, Z. P.; ZENG, H. C. Decomposition pathways of hydrotalcite-like compounds $Mg_{1-x}Al_x(OH)_2(NO_3)_x \cdot nH_2O$ as a continuous function of nitrate anions. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 12, p. 4564–4572, 2001.

XU AND ZENG. Decomposition Pathways of Hydrotalcite-like Compounds $Mg_{1-x}Al_x(OH)_2(NO_3)_x \cdot nH_2O$ as a Continuous Function of Nitrate Anions. v. 2, n. 3, p. 4564–4572, 2001.

YU, J. et al. Preparation of two dimensional layered double hydroxide nanosheets and their applications. **Chem. Soc. Rev.**, v. 46, p. 5950–5974, 2017.