

SUZY SAYURI SASSAMOTO KUROKAWA

**Obtenção e estudo de supra-anfifílicos derivados de ácidos
carboxílicos-meglumina em fase aquosa no desenvolvimento de
biomateriais**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Química

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro
Coorientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Araraquara
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

K95o Kurokawa, Suzy Sayuri Sassamoto
Obtenção e estudo de supra-anfifílicos derivados de ácidos carboxílicos-meglumina em fase aquosa no desenvolvimento de biomateriais / Suzy Sayuri Sassamoto Kurokawa. – Araraquara : [s.n.], 2018
147 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Clóvis Augusto Ribeiro
Coorientador: Hernane da Silva Barud

1. Química supramolecular. 2. Ácidos graxos. 3. Cristais líquidos. 4. Planejamento experimental. 5. Forças intermoleculares. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Obtenção e estudo de supra-anfifílicos derivados de ácidos carboxílicos-meglumina em fase aquosa no desenvolvimento de biomateriais"

AUTORA: SUZY SAYURI SASSAMOTO KUROKAWA

ORIENTADOR: CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO

COORIENTADOR: HERNANE DA SILVA BARUD

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. JORGE MANUEL VIEIRA CAPELA
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. FERNANDO LUIS FERTONANI
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto


Prof. Dr. PEDRO PAULO CORBI
Departamento de Química Inorgânica / Instituto de Química - UNICAMP – Campinas


Prof. Dr. ÉDER TADEU GOMES CAVALHEIRO
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 14 de setembro de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Suzy Sayuri Sassamoto Kurokawa

Nome em citações bibliográficas: Kurokawa, S. S. S.

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 28 de Agosto de 1990

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Sorocaba – SP

Filiação: Neide Shigueko Sassamoto Kurokawa e Hideo Kurokawa

Estado Civil: Solteira

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Câmpus Avançado São Miguel Paulista

Rua Tenente Miguel Délia, 105 – São Miguel Paulista – São Paulo/SP

CEP: 08021-090

Telefone: (11) 2032-5389

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2014 – 2015: Programa Especial de Formação Pedagógica de Docentes – Licenciatura em Química – Universidade de Franca, Polo Araraquara-SP.

2012 – 2014: Mestrado em Química – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (IQ-UNESP/Araraquara). Bolsista CNPq.

2008 – 2011: Bacharel em Química com opção Tecnológica – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2017 – atual: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Câmpus Avançado São Miguel Paulista. Professora na área de Química. Dedicção exclusiva.

2017: Escola Estadual Professor José Reginato, Sorocaba/SP. Professora efetiva em Química. Regime 10 aulas.

2016 – 2017: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Câmpus São Roque. Professora Substituta na área de Química. Regime 40h.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

Cassimiro, D. L.; Ferreira, L. M. B.; Souza, A. L. R.; Fonseca, M.; Kurokawa, S. S. S.; Alonso, J. D.; Sarmiento, V. H. V.; Ribeiro, C. A. On the influence of fatty acid chain unsaturation on supramolecular gelation of aminocarbohydrate-based supra-amphiphiles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7333-5>, 2018.

Ferreira, L. M. B.; Kurokawa, S. S. S.; Alonso, J. D.; Cassimiro, D. L.; Souza, A. L. R.; Fonseca, M.; Sarmiento, V. H. V.; Regasini, L. O.; Ribeiro, C. A. Structural and thermal behavior of Meglumine-based supra-amphiphiles in bulk and assembled in water. *Langmuir*, v. 32, p. 11878-11887, 2016.

Kurokawa, S. S. S.; Ferreira, L. M. B.; Souza, A. L. R.; Fonseca, M.; Alonso, J. D.; Sarmiento, V. H. V.; Ribeiro, C. A. Maleated ricinoleic acid-meglumine supra-amphiphiles: preparation, characterization and self-assembly behavior in water. Artigo em fase de submissão.

Souza, A. L. R.; Fonseca, M.; Ferreira, L. M. B.; Kurokawa, S. S. S.; Kiill, C. P.; Ferreira, N. N.; Pyrrho, A. S.; Sarmiento, V. H. V.; Silva, A. M.; Gremião, M. P. D.; Ribeiro, C. A. Self-assembly of meglumine-based supra-amphiphiles in liquid crystals to be used as topical drug delivery – influence of the state of water on bioadhesive properties. Em fase de redação.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

14º Congresso Brasileiro de Polímeros

Local e ano: Águas de Lindoia, SP; 2017.

Trabalho apresentado: Kurokawa, S. S. S.; Alonso, J. D.; Oyafuso, M. H.; Ferreira, N. N.; Souza, A. L. R.; Fonseca, M.; Ferreira, L. M. B.; Barud, H. S.; Ribeiro, C. A. Sistemas supra-anfifílicos com meglumina como plataforma de liberação de dexametasona.

XIII Brazilian MRS Meeting

Local e ano: João Pessoa, PB; 2014.

Trabalho apresentado: Fonseca, M.; Souza, A.L.R.; Miziara, L.; Kurokawa, S.S.S.; Ribeiro, C.A. DSC studies of water behavior in liquid crystal systems from meglumine-based supra-amphiphile.

41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society

Local e ano: Chicago, IL; 2014.

Trabalhos apresentados:

1. Souza, A.L.R.; Fonseca, M.; Miziara, L.; Kurokawa, S.S.S.; Cassimiro, D.L.; Kiill, C.P.; Jakubic, M.; Gremião, M.P.D.; Sarmiento, V.H.V.; Ribeiro, C.A. Development of liquid crystal systems from meglumine-based supra-amphiphiles for topical delivery of drugs.
2. Souza, A.L.R.; Kiill, C.P.; Miziara, L.; Kurokawa, S.S.S.; Fonseca, M.; Cassimiro, D.L.; Jakubic, M.; Gremião, M.P.D.; Ribeiro, C.A. Mechanical and bioadhesive behavior of hexagonal liquid crystals from meglumine-based supra-amphiphile for topical drug delivery systems.

12º Congresso Brasileiro de Polímeros

Local e ano: Florianópolis, SC; 2013.

Trabalho apresentado: Fonseca, M.; Miziara, L.; Kurokawa, S.S.S.; Cassimiro, D.L.; Crespi, M.S.; Ribeiro, C.A. Polímeros supramoleculares óleo de mamão-maleinizado meglumine: caracterização espectroscópica e térmica.

Apresentações de trabalho e/ou palestra

XIII Brazilian MRS Meeting

Local e ano: João Pessoa, PB; 2014.

Trabalho apresentado em forma oral: Kurokawa, S.S.S.; Miziara, L.; Fonseca, M.; Souza, A.L.R.; Ribeiro, C.A. Development and characterization of supra-amphiphiles based on meglumine and ricinoleic acid maleinized as a precursor of supramolecular polymers.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

Aluna: Patrícia Maria Ferreira Pinto

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFSP - Câmpus São Roque)

Trabalho de Conclusão de Curso: Aplicação de artesanato colaborativo como instrumento para sustentabilidade.

Data: 13 de dezembro de 2016.

Aluna: Amanda Bonicontró Paglione

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCFAR-UNESP/Araraquara)

Trabalho de Conclusão de Curso: Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo anfifílicos a base de meglumina para administração de fármacos

Data: 10 de dezembro de 2015

ORIENTAÇÕES

Trabalho de Conclusão de Curso

Aluna: Ediléia Rodrigues Fernandes

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFSP - Câmpus São Roque)

Trabalho de Conclusão de Curso: Análise da fonte de água do bairro Jardim Suíça Paulista no município de São Roque/SP

Data: 27 de junho de 2017.

Supervisões científicas

Aluno: Jovan Duran Alonso

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (IQ-UNESP/Araraquara)

Trabalho: Supra-anfifílicos baseados em meglumina como estratégia para modulação de interações com a pele: uma nova abordagem para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas

Período: Maio/2015 – Dezembro/2015

Aluno: Nicóle Pedroso

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (IQ-UNESP/Araraquara)

Trabalho: Síntese e avaliação de supra-anfifílicos obtidos da reação entre ácido ricinoléico maleinizado e meglumina

Período: Abril/2014 – Janeiro/2015

OUTROS

Bolsista didático – Departamento de Química Analítica – IQ/UNESP

Disciplina: Química Analítica Quantitativa (aulas práticas)

Curso: Farmácia e Bioquímica

Período: Março a Julho/2015

Estágio-docência – Departamento de Química Analítica – IQ/UNESP

Disciplina: Química Analítica Quantitativa (aulas práticas)

Curso: Bacharelado em Química

Período: Março a Julho/2014

Dedico este trabalho a Deus, por me ensinar todos os dias o lado bom da vida.

À minha família, pelo apoio e esforço sem medidas para a realização de todos os meus planos e sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Clóvis Augusto Ribeiro, por ser fonte de inspiração, paciência, conhecimento, compreensão e incentivo ao longo de todos esses anos.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Hernane da Silva Barud, pela disponibilidade em me auxiliar a qualquer hora, correções, suporte, incentivo nos momentos complicados e amizade.

Aos professores e colegas do Laboratório de Análise Térmica de Materiais / GRESCO, em especial à professora Doutora Marisa Spirandeli Crespi, pelas conversas, trocas de conhecimento e por manter a convivência entre os colegas tão agradável.

À Professora Doutora Maria Palmira Gremião, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara, pelos ensaios de bioadesão e de liberação in vitro.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) de Campinas, pelas análises de espalhamento de raios X a baixo ângulo.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Aos amigos pesquisadores Leonardo, Charlene, Ana Luiza, Natália e Márcia, pelo auxílio nos experimentos, discussões de resultados e reuniões tão enriquecedoras.

À amiga Paty, exemplo de profissional e ser humano, me inspirando a ser uma professora cada vez melhor, uma amiga sempre presente e sincera, com quem partilho um carinho e um respeito infinito.

Aos amigos de Araraquara, Lilian, Mari, Amanda, Cadu e Laís, por tornarem o convívio em Araraquara mais feliz e agradável com nossas jantas, festinhas e programas de TV.

Às amigas de infância, Amandinha e Mirella, pelos boas e nostálgicas brincadeiras no condomínio.

Às amigas da faculdade, Karine, Letícia, Paulinha, Erika, Maria e Fernanda. Não importa a distância, o tempo que passe ou o momento da vida de cada uma, sempre estamos torcendo pela felicidade umas das outras.

Aos amigos do IFSP – São Roque, com quem aprendi que é possível uma convivência saudável, prazerosa e enriquecedora no ambiente de trabalho.

À amiga de São Roque, Mari, por ser tão atenciosa com nossa amizade dentro e fora da sala de aula, pela confiança e apoio semanal, mesmo em tão pouco tempo de amizade. E a Cristiane, uma colega de trabalho incrível e uma amiga com uma energia contagiante.

Aos amigos do Aggêo, Mah, Su, Ana e Felipe, pelo conforto que trazem quando estamos juntos, em especial a Ingrid, com quem partilho tantas coisas há tantos anos, desde sua defesa até o casamento. Da escola para a vida!

Aos colegas do IFSP - São Miguel Paulista, pela compreensão e apoio durante a fase final do Doutorado, em especial a Greice e Silas, tão queridos e companheiros. E a Altair, com quem tenho compartilhado tantas angústias, conquistas e aprendizados, desde que nos conhecemos, seja no âmbito profissional ou pessoal.

À minha família, por todo o apoio, confiança e orações, em especial às primas Mara e Ninha, pelos cafés, conversas de madrugada e amizade tão sincera.

Ao namorado-amigo, Roberto, por acreditar em mim e me incentivar a conquistar todos os meus sonhos. Em meio a tantas crises e estresse, você tem permanecido ao meu lado com todo o carinho, amor e otimismo possível. Acredito que são os momentos difíceis que nos mostram quem realmente está ao nosso lado.

Aos meus pais, Hideo e Neide, que incansavelmente sempre nos ofereceram o que há de melhor, tanto no âmbito material, como no exemplo de persistência, honestidade, resiliência, otimismo, dignidade, generosidade e tolerância. Vocês são o maior modelo de união, força e inteligência que existem. Sem vocês eu não existiria e minha vida não teria sentido. Toda a gratidão e amor do mundo não são capazes de retribuir o que fazem pela gente.

À minha irmã, Sara, que por vezes fez meu papel de irmã mais velha, me ensinando a ser uma pessoa melhor e mais esforçada, acreditando em mim como profissional e amiga. Mais do que um laço de sangue, uma amiga com quem posso contar e confiar para sempre!

“É Ele o autor da fé
Do princípio ao fim
De todos os seus momentos”
José Carlos Papae

RESUMO

Supra-anfifílicos são moléculas com capacidade de auto-organização em variadas estruturas mantidas por interações não-covalentes e, por isso, muitas vezes são desenvolvidas mimetizando sistemas biológicos. Inicialmente, este trabalho descreve o estudo comparativo de dois ácidos graxos homólogos, ácido esteárico e ácido oleico interagindo com o carboidrato meglumina (AOMEG e AEMEG), formando supra-anfifílicos mantidos por interações eletrostáticas, preparados em diferentes razões molares, 1:1, 1:1,5 e 1:2 do ácido graxo em relação a meglumina, com diferentes proporções de solventes e com adição de 60% de água a diferentes temperaturas, 65, 72 e 80°C. Um delineamento experimental foi realizado para otimizar a síntese, usando como respostas a bioadesão *in vitro*, anisotropia em microscópio de luz polarizada e temperatura de fusão da água por DSC. Pelas superfícies de resposta, sistemas de AOMEG são influenciados pela quantidade de solvente e pela razão molar, enquanto apenas este último gera respostas diferentes para sistemas de AEMEG. Em seguida, nove sistemas de cada ácido graxo nas proporções molares 1:1 e 1:2 foram sintetizados em ausência de solvente, contendo de 10 a 90% de água adicionada à 65°C e estudados quanto aos tipos de água, bioadesividade e organização estrutural, cujos resultados indicaram que em baixas concentrações de supra-anfifílicos (inferior a 30%) não é possível a organização dos sistemas, visto que estes são mantidos por ligações de hidrogênio. Acima de 40% de supra-anfifílicos, todos os sistemas apresentam bioadesividade superior a um material comercial, além da adição crescente de água alterar seu comportamento, partindo de água ligada a água livre, mudança notada em sistemas contendo acima de 50% de supra-anfifílico. Por esses resultados, sistemas sintetizados com 50% de supra-anfifílico apresentam características interessantes para aplicações biomédicas. Por esse motivo, incorporou-se 0,1% do fármaco dexametasona nos quatro sistemas de ambas proporções molares de ácido oleico e ácido esteárico em relação a meglumina, estudando a liberação do fármaco em pH 7,4 e 5,0, com o intuito de verificar a responsividade dos sistemas ao pH. Os resultados indicaram baixa liberação do fármaco no sistema de AEMEG (1,6% após 24h) e quase nula para sistemas de AOMEG. De qualquer forma é importante ressaltar que os sistemas a base de meglumina e ácidos graxos são exemplos de aplicações dos conceitos da Química Supramolecular podendo ser usados como materiais responsivos a estímulos.

Palavras-chave: Química supramolecular. Ácidos graxos. Cristais líquidos. Planejamento experimental. Forças intermoleculares.

ABSTRACT

Supra-amphiphiles are molecules capable of self-assembling in various structures maintained by non-covalent interactions and often are developed by mimicking biological systems. This work describes the comparative study of two homologous fatty acids, stearic acid and oleic acid interacting with the carbohydrate meglumine (AOMEG and AEMEG), forming supra-amphiphiles maintained by electrostatic interactions, prepared in different molar ratios, 1:1, 1:1.5 and 1:2 of the fatty acid to meglumine, with different proportions of solvents followed by the addition of 60% of water at different temperatures, 65, 72 and 80 °C. An experimental design was performed to optimize the synthesis, using in vitro bioadhesion study, anisotropy under a polarized light microscope and water melting temperature obtained by DSC. By the response surfaces, the amount of solvent and the molar ratio influenced AOMEG systems, whereas only the molar ratio generates different responses to AEMEG systems. Then, nine systems of each fatty acid prepared in 1:1 and 1:2 molar ratios (fat acid-meglumine) were synthesized in the absence of solvent, containing from 10 to 90% of water added at 65 °C and studied according to water types, bioadhesiveness and structural organization. The results indicated that in low concentrations of supra-amphiphiles (less than 30%) the systems did not show organization, since these are maintained by hydrogen bonds. Above 40% of supra-amphiphiles, all systems present high bioadhesiveness compared to a commercial material, besides the increasing addition of water alter its behavior, starting from bound water to free water, a change noticed in systems containing above 50% of supra-amphiphiles. These results indicate that systems synthesized with 50% supra-amphiphiles present interesting properties for biomedical applications. For this reason, 0.1% of the drug dexamethasone was incorporated in the four systems of both molar proportions of oleic acid and stearic acid related to meglumine, studying the release of the drug at pH 7.4 and 5.0, in order to verify the response of the systems to pH. The results indicated low drug releasing in the AEMEG system (1.6% after 24h) and almost no releasing for AOMEG systems. However, it is important to emphasize that the systems based on meglumine and fatty acids are examples of Supramolecular Chemistry concepts applications and can be used as materials stimuli responsive.

Key-words: Supramolecular chemistry. Fat acids. Liquid crystals. Experimental planning. Intermolecular forces.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Moléculas de água formando redes de ligações de hidrogênio em estruturas de hidratos de clatrato formando (a) quadrados, (b) pentágonos e (c) hexágonos	28
Figura 2 - Modelo para C_8K mostrando o empilhamento de camadas de grafite e de potássio proposto por Rüdorff e Schulze em 1954.....	29
Figura 3 – Representação estrutural da α -ciclodextrina	30
Figura 4 - O número de isômeros esperados para as possíveis geometrias para um complexo com número de coordenação 6	31
Figura 5 - Esquema do mecanismo de encaixe induzido. (a) substrato e enzima dissociados. (b) substrato com mudança induzida para alinhamento de A e B. (c) adição de um grupo volumoso impede o alinhamento. (d) a exclusão de um grupo impede o alinhamento apropriado.....	32
Figura 6 - (a) Esquema bidimensional de compostos de inclusão, com um hospedeiro (linha) podendo adotar diferentes orientações. (b) Definição de espécies hospedeiras em diferentes compostos de inclusão de ureia	33
Figura 7 - Representação esquemática de uma molécula entre dois sistemas quinol:molécula	34
Figura 8 – Fórmula estrutural de [2,2]paraciclofano.....	34
Figura 9 – Fórmula estrutural da vitamina B_{12}	35
Figura 10 - Proposta estrutural de complexo por transferência de carga de paraciclofano com tetracianoetileno. R pode ser anel benzênico ou grupos metileno.....	36
Figura 11 - Sistemas macrocíclicos sintetizados pelos grupos de (a) Curtis, (b) Busch, (c) Jager e (d) Pederson.....	37
Figura 12 - Fórmula estrutural do receptor aniônico obtido por Park e Simmonds, em que $n = 9$ ou 10	38
Figura 13 - Fórmula estrutural do primeiro criptando sintetizado por Lehn e colaboradores.....	38
Figura 14 - Fórmula estrutural do “ <i>spherand</i> ” ciclohexametafenileno demonstrando a estrutura octaédrica organizada	39
Figura 15 - Fórmula estrutural de “ <i>Lariat</i> ” éter com “braço” lateral de oligo-(oxietileno)....	40
Figura 16 - Fórmula estrutural do fulereno C_{60}	41
Figura 17 - Diferentes representações de nós de Borromeu.....	41
Figura 18 - Célula eucariótica; Insetos: citoesqueleto com microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos actina; membrana plasmática com proteínas transmembranas; estruturas cristalina do ribossomo eucariótico.....	42
Figura 19 - O desenvolvimento de um sistema supramolecular a partir de blocos de construção (sítios de ligação representados por círculos): (a) complexação hóspede-hospedeiro; (b) inclusão em grade; (c) auto-organização de moléculas complementares	45
Figura 20 - Ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas adenina e timina e de guanina com citosina compondo o DNA.	46
Figura 21 - Fórmula estrutural da 2-butilureido-6-metil pirimidona.....	47
Figura 22 - (a) Unidade anfifílica bis-ureia e (b) Agregação das unidades em diferentes solventes	48
Figura 23 - Características básicas dos materiais supramoleculares	49

Figura 24 - Exemplos de moléculas anfifílicas mais comuns (a) não iônicas, (b) aniônicas, (c) catiônicas e (d) zwitterionicas	51
Figura 25 - Representação esquemática da polaridade das moléculas de água e as ligações de hidrogênio na água.....	54
Figura 26 - A substituição das moléculas de água da cavidade hidrofóbica é responsável pelo efeito hidrofóbico entálpico.....	55
Figura 27 -Duas moléculas orgânicas criando um buraco com uma fase aquosa, dando origem ao efeito hidrofóbico entrópico – um buraco é mais estável do que dois.....	56
Figura 28 - Fórmula estrutural da meglumina.....	57
Figura 29 - Fórmula estrutural química de (a) meglumina, (b) flunixinina e (c) ligação de hidrogênio do aduto flunixinina-meglumina	58
Figura 30 - Representação de monômeros e seus polímeros supramoleculares, (a) ureidopirimidinona em (b) espiral, (c) anfifílico peptídico (d) compondo um cilindro torcido, (e) fluoróforo originando (f) fita torcida e (g) hexabenzocoroneno gerando (h) um nanotubo	61
Figura 31 - Polímeros supramoleculares sob uma nova ótica dos materiais poliméricos e comparados ao conceito macromolecular.....	62
Figura 32 - Ilustração esquemática da formação das vesículas supramoleculares e a liberação de fármaco controlada pelo pH.....	66
Figura 33 – Fórmula estrutural do ácido oleico.....	69
Figura 34 - Fórmula estrutural do ácido esteárico.....	70
Figura 35 - Reação ácido-base entre o grupo carboxilato-meglumina.....	85
Figura 36 - Curvas TG dos supra-anfifílicos AOMEG e AEMEG em presença de solvente .	86
Figura 37 - Ilustração dos sistemas binários de AOMEG e AEMEG em diferentes proporções de água, 10 a 90%, estudados por microscopia de luz polarizada.....	88
Figura 38 - (a) Fotomicrografia de AOMEG11S-50% (b) AEMEG11S-50% exemplificando os sistemas anisotrópicos apresentando estrias. (c) Representação de cristais líquidos de forma hexagonal	89
Figura 39 - Perfis de SAXS para AOMEG11S, AOMEG11, AOMEG12S e AOMEG12 contendo 10%, 50% e 90% de supra-anfifílico em água	90
Figura 40 - Representação esquemática do parâmetro α	91
Figura 41 - Perfis de SAXS para AEMEG11S, AEMEG11, AEMEG12S e AEMEG12 contendo 10%, 50% e 90% de supra-anfifílico em água	93
Figura 42 - Representação esquemática da estrutura lamelar com o parâmetro espacial d	94
Figura 43 - Curvas de resfriamento e aquecimento da água destilada	98
Figura 44 - Curvas DSC de resfriamento e de aquecimento de sistemas de AOMEG contendo 40% de ácido oleico em água, variando temperatura, molaridade e solvente durante a síntese	99
Figura 45 - Curvas DSC de resfriamento e de aquecimento de sistemas contendo 40% de ácido esteárico em água variando temperatura, molaridade e solvente durante a síntese	103
Figura 46 - Curva de superfície de resposta de AEMEG com respostas de temperatura <i>onset</i> de fusão e influência da razão molar e presença de solvente	111
Figura 47 - Curva de superfície de resposta de AOMEG com respostas de temperatura <i>onset</i> de fusão e influência da razão molar e presença de solvente	112
Figura 48 - Curva de superfície de resposta de AOMEG com respostas de trabalho de bioadesão e influência da razão molar e temperatura.....	114
Figura 49 - Comparação do trabalho de adesão dos sistemas AEMEG e AOMEG variando de 10 a 90% de água comparado ao Carbopol® 5%.....	117

Figura 50 - Curvas de (a) resfriamento e de (b) aquecimento de sistemas AEMEG11 e AEMEG12 contendo de 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água	119
Figura 51 - Curvas de resfriamento e de aquecimento de sistemas AOMEG11 e AOMEG12 contendo de 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água	120
Figura 52 - Representação dos tipos de água e suas respectivas quantidades nos sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 contendo de 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água	122
Figura 53 - Representação da quantidade de água em massa em relação a quantidade de água adicionada nos sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 contendo 10 a 90% de água.....	124
Figura 54 - Comparação das variações de entalpia obtidas pelas curvas de resfriamento em relação às curvas de aquecimento dos sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 contendo 10 a 90% de água	125
Figura 55 - Comparação das temperaturas <i>onset</i> de congelamento e de fusão dos sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 contendo 10 a 90% de água.....	126
Figura 56 - Fórmula estrutural da dexametasona	129
Figura 57 - Caracterização por MLP e SAXS dos sistemas AOMEG11F, AOMEG12F, AEMEG11F e AEMEG12F com 50% de água, contendo 0,1 % de dexametasona.....	129
Figura 58 - Curva analítica de dexametasona em tampão fosfato de potássio 0,01 mol L ⁻¹ pH 7,4 contendo 0,5% Procetyl®	136
Figura 59 - Perfil de liberação <i>in vitro</i> de DEX incorporada nas formulações AEMEG11F e AEMEG12F contendo 0,1 % de dexametasona (n=6) em pH 7,4 e pH 5,0	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Energias das principais interações não-covalentes envolvidas em anfifílicos auto-organizados	53
Tabela 2 - Síntese de amostras de ácido oleico (AO) e meglumina para estudos preliminares	70
Tabela 3 - Síntese de amostras de ácido esteárico (AE) e meglumina para estudos preliminares	71
Tabela 4 - Composição das misturas binárias de AOMEG e água	71
Tabela 5 - Composição das misturas binárias de AEMEG e água	72
Tabela 6 - Sistemas diluídos de AOMEG11 e AEMEG11 sem solvente, dispersos em água	72
Tabela 7 - Visão geral do experimento visando avaliar a influência da temperatura, solvente e razão molar nas formulações	73
Tabela 8 - Configuração dos 27 experimentos efetuados para avaliar os parâmetros temperatura, solvente e razão molar codificados em níveis (baixo, médio e alto) na formulação de ácido oleico e ácido esteárico com meglumina em água (60%)	74
Tabela 9 – Comparação dos supra-anfifílicos de ácido oleico e meglumina para delineamento experimental	76
Tabela 10 - Sistemas formados por 40% de supra-anfifílico AOMEG com água em diferentes temperaturas.....	77
Tabela 11 - Supra-anfifílicos de ácido esteárico e meglumina para delineamento experimental	77
Tabela 12 - Sistemas preparados com 40% de supra-anfifílico AEMEG com água em diferentes temperaturas.....	78
Tabela 13 - Sistemas em duas razões molares compostos por 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água, adicionada à 65°C	79
Tabela 14 - Resultados obtidos por SAXS para sistemas de 10 a 90% de ácido oleico-meglumina contendo água	92
Tabela 15 - Resultados obtidos por SAXS para sistemas de 10 a 90% de ácido esteárico-meglumina em água.....	94
Tabela 16 - Medidas de tamanho, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta e respectivos desvios padrão (DP) dos sistemas de ácido esteárico diluídos	96
Tabela 17 - Medidas de tamanho, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta e os respectivos desvios padrões (DP) dos sistemas de ácido oléico diluídos.....	97
Tabela 18 - Porcentagem de água ligada em sistemas de ácido esteárico e ácido oléico (genericamente representados por AG, ácido graxo) contendo 40% de supra-anfifílico	107
Tabela 19 - Resultados de temperatura <i>onset</i> de fusão obtida por DSC as 27 amostras realizados, com ponto central em triplicata	109
Tabela 20 - Trabalho de adesão (N s) avaliado por bioadesão em pele de porco para as 27 amostras de AEMEG e AOMEG, com ponto central em triplicata.....	113
Tabela 21 - Ensaios de bioadesão para sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 com porções de 10 a 90% de água	116
Tabela 22 – Estudo da anisotropia dos sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 contendo 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água.....	127
Tabela 23 - Razão entre picos q_n/q_1 e parâmetros de rede, espaciais e distancias entre cilindros para as formulações AOMEG11F, AOMEG12F, AEMEG11F e AEMEG12F	130

Tabela 24 - Concentrações das soluções padrão de dexametasona usadas para a construção de curvas analíticas e os respectivos valores da área sob a curva (ASC) obtida por HPLC no comprimento de onda a 241 nm, com n = 3	132
Tabela 25 - Valores do intercepto no eixo Y, inclinação da curva de regressão linear a partir das diferentes concentrações de dexametasona	132
Tabela 26 - Resultados obtidos para o estudo da precisão por repetibilidade (n = 3)	133
Tabela 27 - Resultados obtidos para o estudo da precisão intermediária (n = 3)	134
Tabela 28 - Cálculos de exatidão para a validação do método de quantificação de dexametasona por HPLC	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE ácido esteárico

AEMEG11 supra-anfifílico de ácido esteárico sintetizado em proporção equimolar na ausência de solvente

AEMEG11,5 supra-anfifílico de ácido esteárico sintetizado na proporção 1:1,5 de ácido oleico-meglumina na ausência de solvente

AEMEG11,5-0,5S supra-anfifílico de ácido esteárico sintetizado na proporção 1:1,5 de ácido oleico-meglumina com adição parcial de solvente

AEMEG11,5-S supra-anfifílico de ácido esteárico sintetizado na proporção 1:1,5 de ácido oleico-meglumina com solvente

AEMEG11-0,5S supra-anfifílico de ácido esteárico sintetizado em proporção equimolar com adição parcial de solvente

AEMEG11F sistemas de ácido esteárico-meglumina na proporção 1:1 sem solvente com 50% de água, com adição de 0,1% de dexametasona

AEMEG11-S supra-anfifílico de ácido esteárico sintetizado em proporção equimolar com adição de solvente

AEMEG12 supra-anfifílico de ácido esteárico sintetizado na proporção 1:2 de ácido oleico-meglumina na ausência de solvente

AEMEG12-0,5S supra-anfifílico de ácido esteárico sintetizado na proporção 1:2 de ácido oleico-meglumina com adição parcial de solvente

AEMEG12F sistemas de ácido esteárico-meglumina na proporção 1:2 sem solvente com 50% de água, com adição de 0,1% de dexametasona

AEMEG12-S supra-anfifílico de ácido esteárico sintetizado na proporção 1:2 de ácido oleico-meglumina com solvente

AG ácido graxo

AO ácido oleico

AOMEG11 supra-anfifílico de ácido oleico sintetizado em proporção equimolar na ausência de solvente

AOMEG11,5 supra-anfifílico de ácido oleico sintetizado na proporção 1:1,5 de ácido oleico-meglumina na ausência de solvente

AOMEG11,5-0,5S supra-anfifílico de ácido oleico sintetizado na proporção 1:1,5 de ácido oleico-meglumina com adição parcial de solvente

AOMEG11,5-S supra-anfifílico de ácido oleico sintetizado na proporção 1:1,5 de ácido oleico-meglumina com solvente

AOMEG11-0,5S supra-anfifílico de ácido oleico sintetizado em proporção equimolar com adição parcial de solvente

AOMEG11F sistemas de ácido oleico-meglumina na proporção 1:1 sem solvente com 50% de água, com adição de 0,1% de dexametasona

AOMEG11-S supra-anfifílico de ácido oleico sintetizado em proporção equimolar com adição de solvente

AOMEG12 supra-anfifílico de ácido oleico sintetizado na proporção 1:2 de ácido oleico-meglumina na ausência de solvente

AOMEG12-0,5S supra-anfifílico de ácido oleico sintetizado na proporção 1:2 de ácido oleico-meglumina com adição parcial de solvente

AOMEG12F sistemas de ácido oleico-meglumina na proporção 1:2 sem solvente com 50% de água, com adição de 0,1% de dexametasona

AOMEG12-S supra-anfifílico de ácido oleico sintetizado na proporção 1:2 de ácido oleico-meglumina com solvente

AOT bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sódio

ASC área sob a curva

C_c concentração da amostragem anterior

CGI Compostos de grafite intercalados

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMD Concentração média determinada

C_t concentração obtida referente ao tempo t

CTAB brometo de cetiltrimetilamônio

CV% coeficiente de variação

DEX dexametasona

DP desvio padrão

D_{Pa} desvio padrão do intercepto com o eixo Y

DPR desvio padrão relativo

DSC Calorimetria Exploratória Diferencial, do inglês *Differential scanning calorimetry*

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IC inclinação da curva de calibração

LD limite de detecção

LLC cristais líquidos liotrópicos, do inglês *lyotropic liquid crystals*

LNLS Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LQ limite de quantificação

mAU miliunidades de absorbância

MEG meglumina

MLP Microscopia de Luz Polarizada

PA adesão do pico

PdI índice de polidispersividade

PEI polietilenoimina

pH potencial hidrogeniônico

$Q_{real,t}$ quantidade real permeada referente ao tempo t

RMN Ressonância Magnética Nuclear

SAXS Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo, do inglês *Small-Angle X-ray Scattering*

TA trabalho de adesão

Tc temperatura de congelamento

Tf temperatura de fusão

TG/DTG Termogravimetria / Termogravimetria derivada

To temperatura onset

UPy ureidopiridiminona

v1 variável 1

v2 variável 2

v3 variável 3

V_c volume amostrado (coletado + limpeza)

V_r volume da solução receptora

W_F quantidade de água livre

ΔH_c variação de entalpia de cristalização

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1 A linha do tempo da química supramolecular	28
2.2 Conceitos básicos da química supramolecular	41
2.2.1 Supra-anfifílicos	50
2.2.2 Supra-anfifílicos formados por meglumina	57
2.2.3 Polímeros supramoleculares	59
2.3 Sistemas de liberação responsivos ao pH	63
2.4 Planejamento experimental	66
3 OBJETIVOS	68
3.1 Objetivo Geral	68
3.2 Objetivos específicos	68
4 MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1 Reagentes	69
4.2 Estudos preliminares de preparação de supra-anfifílicos de ácido oleico e ácido esteárico com meglumina	69
4.2.1 Síntese de AOMEG	69
4.2.2 Síntese de AEMEG	70
4.2.3 Diagramas de fase de AOMEG e AEMEG e água	71
4.2.4 Síntese dos sistemas de ácido oleico e ácido esteárico a 80 °C	72
4.2.5 Preparação de sistemas diluídos de ácido oleico-meglumina e de ácido esteárico-meglumina equimolares em ausência de solventes orgânicos	72
4.3 Delineamento experimental	73
4.3.1 Preparação de ácido oleico e meglumina (AOMEG) para delineamento fatorial	75
4.3.2 Preparação de ácido oleico-meglumina com 60% de água em diferentes temperaturas	76
4.3.3 Preparação de ácido esteárico e meglumina (AEMEG) para o delineamento experimental	77
4.3.4 Preparação de sistemas de ácido esteárico-meglumina com 60% de água em diferentes temperaturas	78
4.4 Aplicação de sistemas supra-anfifílicos como plataforma de liberação de fármaco modelo	78
4.4.1 Síntese de AOMEG	78
4.4.2 Síntese de AEMEG	78

4.4.3 Obtenção de sistemas de AOMEG e AEMEG em água	79
4.4.4 Desenvolvimento de sistemas contendo 0,1% de dexametasona (DEX)	80
4.5 Caracterização dos supra-anfifílicos	80
4.5.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersividade (Pdl) das partículas	80
4.5.2 Determinação do potencial zeta	80
4.5.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	80
4.5.4 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)	81
4.5.5 Avaliação da bioadesão <i>in vitro</i> dos sistemas	81
4.5.6 Caracterização por Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	81
4.5.7 Termogravimetria / Termogravimetria derivada (TG/DTG)	82
4.5.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	82
4.5.9 Desenvolvimento do método e sua validação da metodologia analítica para quantificação de dexametasona nos estudos de retenção <i>in vitro</i> , utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	82
4.5.9.1 Condições cromatográficas.....	83
4.5.9.2 Metodologia analítica para quantificação da dexametasona (DEX) nos estudos de liberação <i>in vitro</i> , utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	83
4.5.10 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	84
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
5.1 Estudos preliminares de preparação de supra-anfifílicos de ácido oleico e ácido esteárico com meglumina	85
5.1.1 Tamanho da partícula, polidispersividade e potencial zeta.....	95
5.2 Planejamento experimental.....	97
5.3 Desenvolvimento de sistemas preparados na ausência de solvente com adição de água a 65°C avaliados por Bioadesão, DSC e MLP	115
5.3.1 Avaliação estrutural de sistemas de ácido oleico e de ácido esteárico com 50% de água contendo 0,1% de dexametasona	128
5.3.2 Desenvolvimento e validação do método para quantificação de dexametasona nos estudos de liberação <i>in vitro</i> , utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	131
5.3.3 Metodologia analítica para quantificação de dexametasona nos estudos de liberação <i>in vitro</i> , utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	135
6 CONCLUSÃO.....	138
REFERÊNCIAS.....	139

1 INTRODUÇÃO

O uso dos conceitos de Química Supramolecular como estratégia intelectual no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados pode contribuir efetivamente para ajudar a fechar a lacuna existente entre o desenvolvimento tecnológico e a modulação de interações biológicas pois, em ambos os casos, se tem uma clara manifestação da química de interações não covalentes. A Química Supramolecular é definida como a “química além da molécula” (LEHN, 2007) e engloba interações não-covalentes, tais como forças de van der Waals, efeito hidrofóbico, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas para a construção de nanoestruturas por meio de uma rota de síntese conhecida como auto-organização (MENGER, 2002; NGUYEN et al., 2001).

Com base em agregados supramoleculares biológicos, a exemplo do ácido nucléico, proteínas multiméricas e complexos de ácido nucléico-proteína e vírus promovem uma variedade de superestruturas solúveis em escala mesoscópica, isto é, entre 10 e 1000 nm, que se unem espontaneamente em meio aquoso por interações não-covalentes (KIMIZUKA, 2002), possibilitando o desenvolvimento de supra-anfifílicos sintéticos para aplicações médicas.

Supra-anfifílicos são moléculas que apresentam uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica ligadas por uma interação não-covalente. O crescente interesse pelos supra-anfifílicos se concentram na auto-organização controlada e na fácil quebra-regeneração das interações não-covalentes. Outro aspecto que desperta interesse em sua aplicação é que, dependendo da natureza dos blocos de construção e de suas forças dirigíveis, os supra-anfifílicos podem ser responsivos a estímulos como a irradiação, pH, oxidação ou redução, por exemplo (ZHANG; WANG, 2011).

Além disso, uma das maiores vantagens da síntese não-covalente é a ausência dos longos procedimentos sintéticos covalentes tediosos, permitindo a obtenção de supra-anfifílicos de diferentes topologias e funções, visto que são classificados de acordo com a força dirigível envolvida (ZHANG; WANG, 2011), o que converge diretamente com os conceitos da Química Verde, que prega o desenvolvimento de produtos e processos químicos com a menor emissão de substâncias prejudiciais ao meio ambiente (ANASTAS & EGHBALI, 2010; CLARK, 1999).

De qualquer modo, o desenvolvimento de arranjos supramoleculares requiere forças associativas apropriadas entre as moléculas auto-organizadas. Por exemplo, a força dirigível das interações do tipo ácido-base entre o ácido esteárico e di ou triaminas geram hidrogéis mantidos por uma organização supramolecular do sal orgânico. O gel obtido apresenta arranjo lamelar do pacote tridimensional que é estabilizado por forças de van der Waals, interações

eletrostáticas, e ligações de hidrogênio (BASIT et al., 2008). Em outro trabalho deste grupo foi reportada a formação de um hidrogel supramolecular usando ácido litocólico em solução aquosa contendo amina, na qual, variando o tipo de amina, foi possível controlar a rede morfológica do material (PAL et al., 2009).

Recentemente, nosso grupo desenvolveu sistemas poliméricos supramoleculares a partir da reação ácido-base dos fármacos flunixinina e diclofenaco com a meglumina, cujos resultados indicaram que a meglumina está diretamente envolvida na polimerização. Inicialmente, interações eletrostáticas mantêm o grupo carboxila do fármaco com o grupo amino da meglumina, compondo supra-anfifílicos. Em seguida, os supra-anfifílicos se organizam em nanoestruturas mantidas por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila da meglumina (CASSIMIRO et al., 2012, 2013).

A partir deste trabalho, o grupo iniciou os estudos voltados a interação de diferentes ácidos graxos com meglumina em presença de água, como os supra-anfifílicos desenvolvidos pela combinação da meglumina com o óleo de rícino maleinizado, mantidos por interações iônicas. A adição de água gera cristais líquidos liotrópicos, dependentes da concentração de meglumina adicionada, capazes de se organizar na forma lamelar e reter água ligada ao sistema, indicando a possibilidade de estudo desses sistemas como biomateriais pela manipulação das proporções de porções hidrofílicas e hidrofóbicas (FERREIRA et al., 2016).

Em outro trabalho, iniciou-se os estudos com dois ácidos graxos homólogos, ácido esteárico e ácido oleico, ambos com dezoito carbonos na cadeia, diferenciando-se apenas por uma dupla ligação no carbono nove do ácido oleico. Nesse sentido, obteve-se novamente supra-anfifílicos com características de um gel em sistemas diluídos de ácido esteárico (4% *m/m* de supra-anfifílico-água), cuja estrutura mais compacta permite uma estruturação lamelar pelo alinhamento de grupos hidroxila em ligações de hidrogênio. Os sistemas de ácido oleico, no entanto, requerem adição de maior concentração de supra-anfifílico (30% *m/m*) em relação ao seu homólogo (CASSIMIRO et al., 2018).

O uso de ácidos graxos saturados e insaturados vem sendo estudado com o objetivo de aumentar a permeação de fármacos na pele demonstrando que,1 quanto maior o comprimento da cadeia do ácido graxo (contendo de 9 a 10 átomos de carbono), maior o efeito de permeação dérmica ou transdérmica do fármaco (TANOJO et al., 1997). Por isso, neste trabalho, foram estudadas variáveis de síntese (solubilização em solvente e proporção molar dos reagentes e temperatura), dos sistemas com a incorporação de diferentes porções de água (10 a 90% *m/m*) em supra-anfifílicos compostos por ácido esteárico e ácido oleico com meglumina. Os estudos tiveram como base os resultados dos trabalhos anteriores, que indicaram a capacidade de

conduzir a formação de sistemas com organizações estruturais diferentes. O sistema de ácido esteárico produziu um material na forma de gel lamelar, enquanto, o sistema de ácido oleico-meglumina foi capaz de produzir géis líquido cristalinos de fase hexagonal.

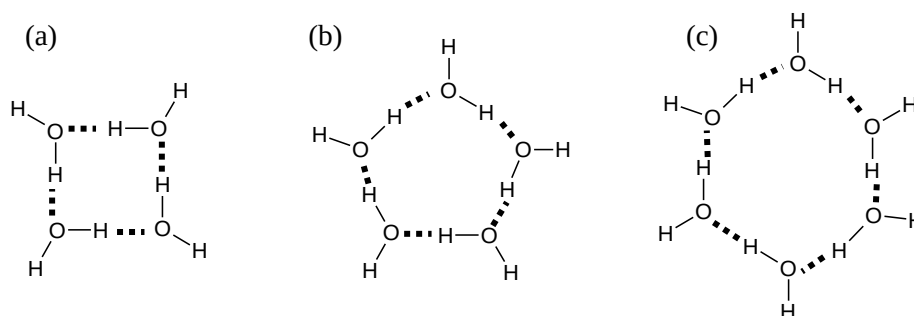
Em seguida, após a otimização da síntese dos sistemas, buscou-se uma formulação adequada para a incorporação de um fármaco modelo que pudesse atuar como um biomaterial responsivo ao pH, a fim de liberar o fármaco em resposta a alteração da estrutura, tendo como base as teorias da Química Supramolecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A linha do tempo da química supramolecular

O histórico da Química Supramolecular teve início em julho de 1810, quando o químico britânico Sir Humphrey Davy enunciou que o gás cloro seria um corpo elementar que se combina com o hidrogênio em ácido muriático. Ele propôs o termo “cloro”, do grego “*chloros*” traduzido como “verde”, “esverdeado”, “verde amarelado”, em alusão à cor do gás. As conclusões de Sir Davy foram aceitas pela maioria (BALDWIN, 1927) e, desde então, historicamente e industrialmente, os hidratos de clorato (Figura 1) representam uma classe amplamente estudada. Como o próprio nome sugere, os claratos são formados por moléculas de água com aberturas capazes de receber espécies neutras (STEED; TURNER; WALLACE, 2007).

Figura 1 - Moléculas de água formando redes de ligações de hidrogênio em estruturas de hidratos de clorato formando (a) quadrados, (b) pentágonos e (c) hexágonos

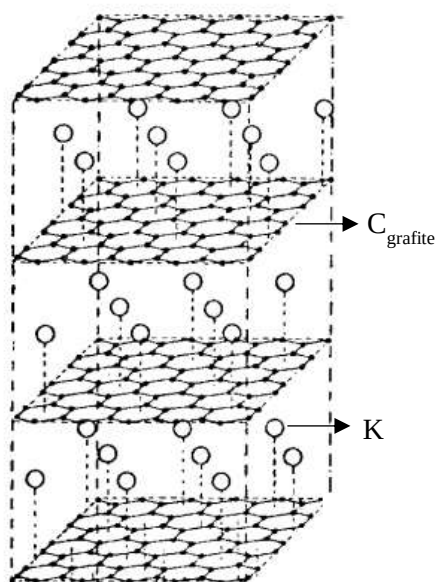


Fonte: Adaptado de ROTELLO, 2007.

Em março de 1823, Faraday, ainda trabalhando com hidratos de cloro em tubo selado, notou que uma matéria oleosa se dispersava quando o tubo era aberto, passando para a forma líquida (BALDWIN, 1927). Faraday ainda reportou uma análise estrutural correspondendo à fórmula $C_{12}.10H_2O$, mas percebeu que algo estava incoerente. Estudos posteriores indicaram que a composição se aproximava a $C_{12}.8H_2O$. Desde então, a determinação da estrutura do gelo e o desenvolvimento e compreensão da natureza das ligações de hidrogênio sugeriram que essas substâncias são compostas de clorato com uma estrutura tetraédrica de ligações de hidrogênio entre moléculas de água, apresentando cavidades suficientes para comportar outras moléculas (PAULING; MARSH, 1952).

A história dos compostos de grafite intercalados (CGI) inicia-se em 1841, quando Schaffäutl publicou um trabalho usando H_2SO_4 e CGI (INAGAKI, 1989). No entanto, os primeiros estudos sistemáticos desses compostos foram realizados a partir de 1930, pela introdução de técnicas de difração de raios X. Os CGI são formados pela inserção de camadas atômicas ou moleculares de espécies químicas diferentes entre camadas de grafite, que atuam como hospedeiros (Figura 2). Os compostos de intercalação ocorrem em estruturas altamente anisotrópicas, nas quais as forças de ligação intraplanares são elevadas quando comparadas com as forças de ligação interplanares, em que um grande número de reagentes podem ser intercalados, classificados como doadores ou aceitadores de elétrons (DRESSELHAUS; DRESSELHAUS, 1981).

Figura 2 - Modelo para C_8K mostrando o empilhamento de camadas de grafite e de potássio proposto por Rüdorff e Schulze em 1954

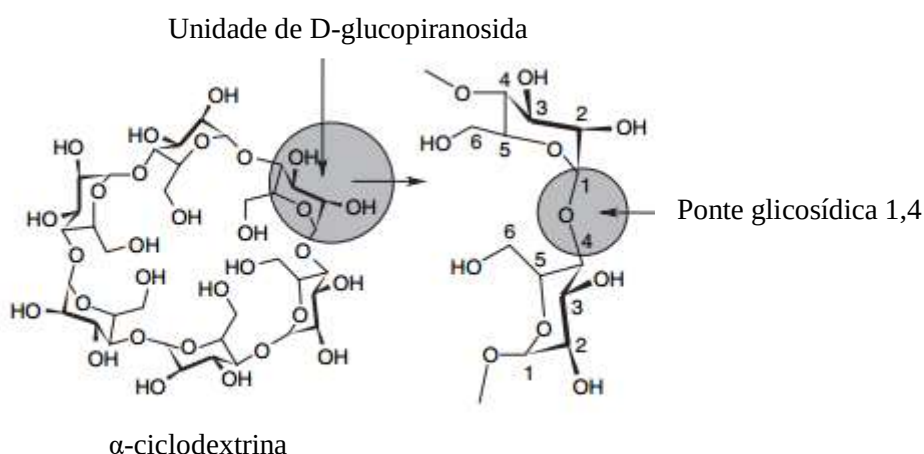


Fonte: Adaptado de DRESSELHAUS; DRESSELHAUS, 1981.

Já os complexos de inclusão começaram a ser observados em alguns objetos da natureza, devido à sua forma, construção e capacidade em agir como “caixas” para outros objetos (MÜLLER, 2003). O primeiro composto molecular a ser apresentado na literatura foi a *p*-benzoquinona, por Wöhler, em 1844, que notou uma coloração diferente do obtido normalmente (Herbstein, 2005). Continuando os estudos, ele mesmo, em 1849, durante o desenvolvimento da estereoquímica, obteve o primeiro complexo de inclusão preparando complexos de hidroquinona, como hospedeiro, e ácido sulfídrico, como hóspede (MÜLLER, 2003), que compõem uma estrutura do tipo hóspede-hospedeiro (BHATNAGAR, 1963).

Em 1891, Villiers e Hebd descreveram compostos de inclusão denominados ciclodextrinas (Figura 3), um grupo de carboidratos macrocíclicos naturais compostos por unidades de *D*-glucopiranosose unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ formando um ciclo com formato de um cone com uma cavidade interna (POPR et al., 2015), mantida por uma rede de ligações de hidrogênio (STEED; TURNER; WALLACE, 2007), relativamente hidrofóbica, criando um meio próprio para a encapsulação de uma grande gama de moléculas orgânicas e inorgânicas. Devido a essas características, a indústria farmacêutica tem utilizado as ciclodextrinas tanto para a solubilização quanto para a liberação de fármacos (POPR et al., 2015).

Figura 3 – Representação estrutural da α -ciclodextrina

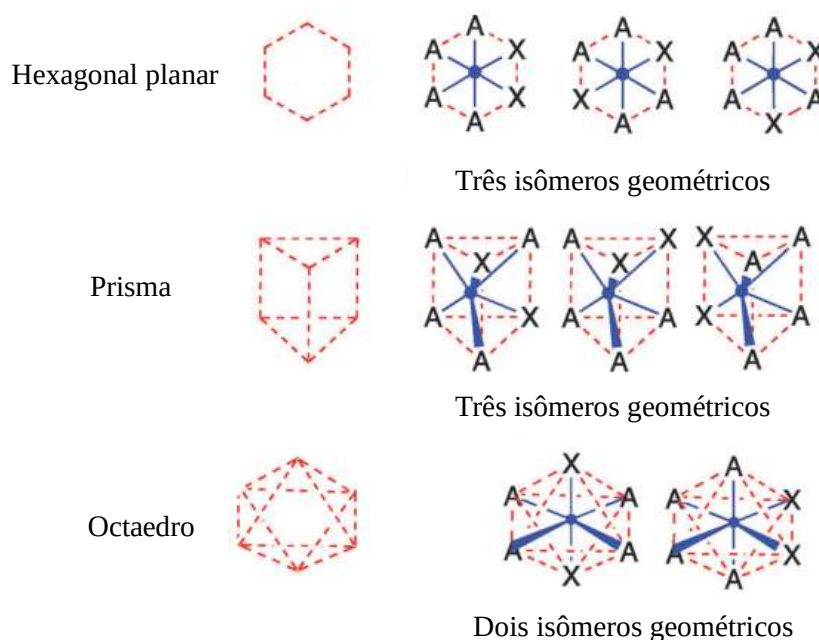


Fonte: Adaptado de ROTELLO, 2007.

Em 1893, o primeiro vencedor do Nobel de Química na área Inorgânica, Alfred Werner, revolucionou os estudos em Química de Coordenação com trabalhos voltados ao conceito do arranjo espacial de elementos diferentes do carbono, que apresentavam habilidade de se ligarem tridimensionalmente. Como professor de Química Orgânica, Werner pôde estudar compostos de coordenação em que a amônia ou aminas orgânicas circundavam centros metálicos. Então, postulou que cada elemento apresenta um número de coordenação fixo em um estado de oxidação particular, a exemplo do que hoje conhecemos como $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, com número de coordenação 6 e estado de oxidação +3. Além disso, ao estudar complexos, especialmente compostos por cobalto e platina, Werner percebeu que o número de coordenação mais frequente para o cobalto era 6 e para o de platina, 4, permitindo a proposição de possíveis geometrias espaciais, bem como identificar qual representava, na prática, os complexos no espaço, a exemplo da Figura 4, com número de coordenação 6. Para este último, hoje sabe-se que a

geometria observada corresponde à octaédrica. Esse conhecimento permitiu ainda que Werner investigasse metais de transição e identificasse diversos lantanídeos e gases nobres em 1905 (CONSTABLE; HOUSECROFT, 2013).

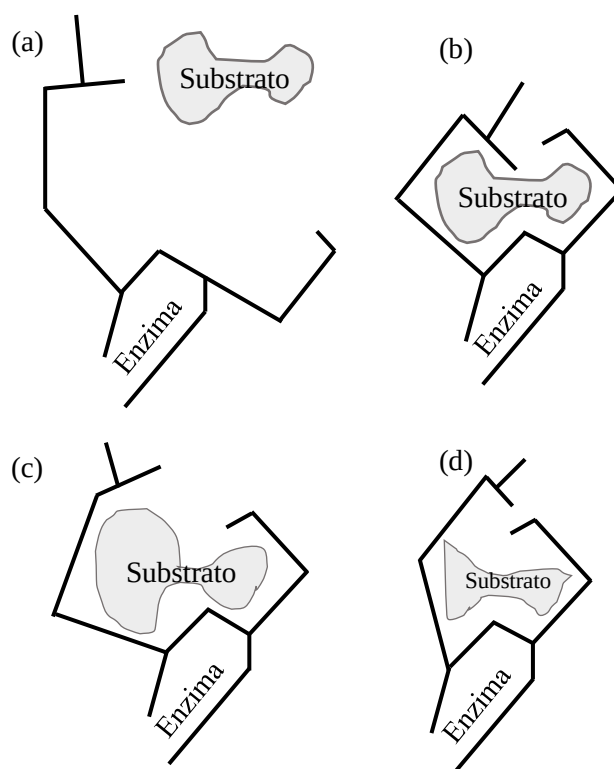
Figura 4 - O número de isômeros esperados para as possíveis geometrias para um complexo com número de coordenação 6



Fonte: Adaptado de CONSTABLE; HOUSECROFT, 2013.

Em 1894, através da síntese de glucose e manose a partir de arabinose e HCN, Fischer introduziu a teoria da chave-fechadura da especificidade enzimática, cujos grupos catalíticos requerem precisão da orientação para a ação enzimática, o substrato leva a uma mudança apreciável na relação tridimensional dos aminoácidos no sítio ativo e as alterações na estrutura da proteína geradas pelo substrato, alinham os grupos catalíticos (Figura 5). Na Figura 5, as linhas indicam cadeias proteicas contendo grupos catalíticos A e B e o grupo ligante C.

Figura 5 - Esquema do mecanismo de encaixe induzido. (a) substrato e enzima dissociados. (b) substrato com mudança induzida para alinhamento de A e B. (c) adição de um grupo volumoso impede o alinhamento. (d) a exclusão de um grupo impede o alinhamento apropriado



Fonte: Adaptado de KOSHLAND. 1995.

No ramo da medicina científica, uma das teorias básicas, proposta no século XX, foi o conceito de receptor. Receptores podem ser descritos como pequenas áreas discretas localizadas na membrana celular ou no interior da célula, com as quais as moléculas ou complexos moleculares podem interagir. Paul Ehrlich, em 1905, foi um dos primeiros cientistas a propor parte desse conceito, ao examinar as relações entre as toxinas e antitoxinas bacterianas e se esforçar no combate a doenças infecciosas contemporâneas (PRÜLL, 2003).

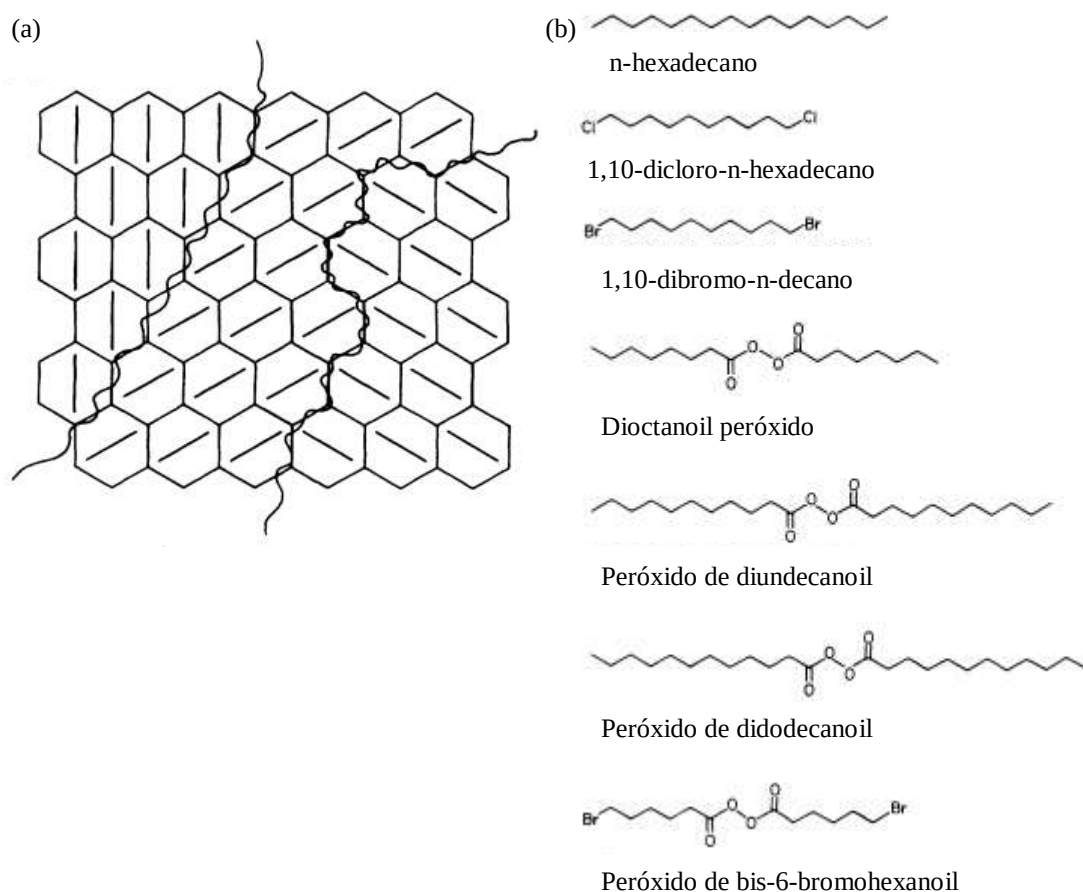
Ainda em relação às interações não covalentes, apesar de em 1920, Latimer e Rodebush sugerirem que um par de elétrons livres numa molécula de água era capaz de exercer força suficiente em um hidrogênio mantido por um par de elétrons em outra molécula de água, ligando-as, somente em 1937 o termo “*Übermoleküle*” foi usado para descrever entidades organizadas de espécies coordenativamente saturadas, a exemplo do dímero de ácido acético (KRISCHE; LEHN, 2000).

Nesse contexto, em 1939, Pauling editou o livro “*Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals: An Introduction to Modern Structural Chemistry*”, um clássico na história da Química, por auxiliar o estudo de diversos fenômenos, seja na teoria ou

na prática. De acordo com Pauling, se a distância entre dois átomos que interagem for menor ou igual à soma dos raios atômicos de van der Waals, é possível afirmar que os átomos estão quimicamente ligados. A partir desse critério, foi possível definir que as interações intermoleculares ocorriam, a exemplo dos complexos de hidrogênio (OLIVEIRA; ARAÚJO; RAMOS, 2010).

Em 1940, Bengen descobriu por acaso que a ureia forma um clatrato cristalino com o octanol. Desde então, os complexos de inclusão com ureia são estudados devido às suas propriedades físico-químicas interessantes. À temperatura ambiente, a ureia apresenta estrutura tetragonal com extensas ligações de hidrogênio. Além disso, a ureia forma clatratos com compostos orgânicos lineares contendo seis ou mais átomos de carbono, sob condições normais. Na estrutura convencional de compostos de inclusão de ureia, as moléculas de ureia são ligadas umas às outras por ligações de hidrogênio entre os átomos de nitrogênio e oxigênio (Figura 6).

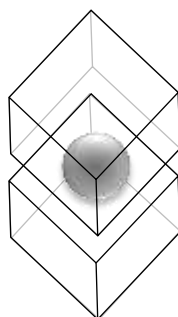
Figura 6 - (a) Esquema bidimensional de compostos de inclusão, com um hospedeiro (linha) podendo adotar diferentes orientações. (b) Definição de espécies hospedeiras em diferentes compostos de inclusão de ureia



Fonte: Adaptado de HARRIS; THOMAS, 1990.

As ligações de hidrogênio reapareceram com a descoberta de compostos cristalinos de fórmula 3-quinol: 1 molécula M, a exemplo de SO₂, MeOH ou HCl (Figura 7), por Palin e Powell (1948) por difração de raios X, apresentando um componente estrutural de unidades de quinol ligadas por hidrogênio para formar duas moléculas interpenetrantes independentes que, unidas, envolvem pequenas moléculas M. Ligeiras alterações na forma gaiola de quinol, sem alteração nas dimensões das unidades de quinol ou dos grupos OH, que mantém os hexágonos ligados por ligações de hidrogênio, são feitas de modo que as cavidades podem acomodar as diferentes moléculas M. Essas mudanças estruturais foram correlacionadas com as variações na fraca birrefringência na série (PALIN, POWELL, 1948).

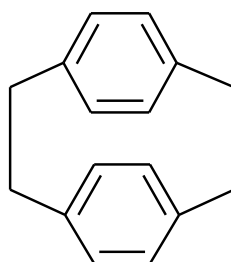
Figura 7 - Representação esquemática de uma molécula entre dois sistemas quinol:molécula



Fonte: Adaptado de PALIN; POWELL, 1948.

Em 1949, Brown e Farthing reportaram o isolamento de di-p-xileno a partir da pirólise a 900°C de p-xileno, cuja estrutura é formada por anéis benzeno paralelos (Figura 8), que exibem repulsão π - π resultando na distorção do anel aromático nas conformações “barco” ou “cadeira”. Como resultado, eles promovem modelos para o estudo da tensão molecular e sua relação com reatividade (DYSON; JOHNSON; MARTIN, 1998).

Figura 8 – Fórmula estrutural de [2,2]paraciclofano



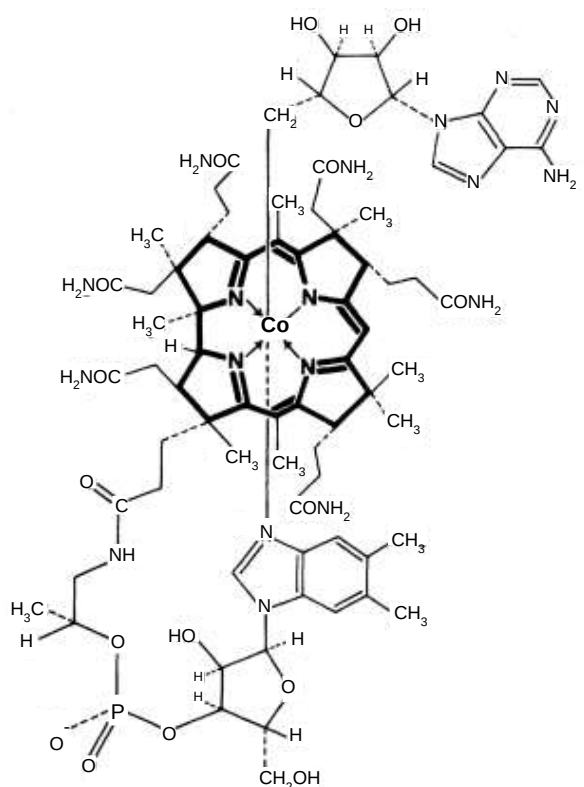
Fonte: Adaptado de DYSON; JOHNSON; MARTIN, 1998.

Poucas moléculas cativam tanto os cientistas como o DNA, cuja estrutura foi descoberta em 1953, por James Watson e Francis Crick, que a descreveram como duas fitas de ácido desoxirribonucleico emaranhadas, permitindo a compreensão do dano e reparo, replicação e herança de material genético, além da diversidade e evolução das espécies. Eles propuseram que as duas cadeias eram mantidas por bases púricas e pirimídicas, unidas em pares por ligações de hidrogênio (DENNIS; CAMPBELL, 2003).

Nessa linha biológica, em 1953, Perutz e colaboradores estudaram a estrutura da hemoglobina, que, em 1962 lhe conferiu o prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina dividido com outro biólogo. A hemoglobina apresenta uma estrutura física única, composta por quatro proteínas globulares que rodeiam um grupo heme contendo ferro, o que o torna eficiente tanto no transporte de oxigênio como no de gás carbônico (STEENSMA; SHAMPO; KYLE, 2015).

Entre 1955 e 1956, o grupo de Hodgkin refinou o conhecimento acerca da estrutura da vitamina B12 (Figura 9) (HODGKIN et al., 1956). Este composto apresenta grande significado para a bioquímica, já que sua arquitetura molecular é complexa e não havia sido encontrada em produtos naturais anteriormente. Além disso, abriu portas para a síntese orgânica de produtos naturais de baixa massa molecular.

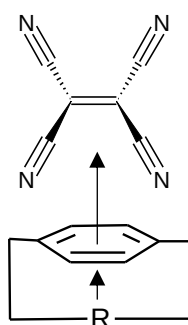
Figura 9 – Fórmula estrutural da vitamina B₁₂



Fonte: Adaptado de ESCHENMOSER; WINTNER, 2016.

Em 1959, alguns anos após o desenvolvimento de 18 paraciclofanos semelhantes aos sintetizados em 1949, o grupo de Cram, com a descoberta da habilidade do tetracianoetileno em formar complexos por transferência de carga com hidrocarbonetos aromáticos, reportaram estruturas em que o anel benzênico ocupa um plano paralelo ao plano ocupado pelo tetracianoetileno, como apresentado na Figura 10 (CRAM; BAUER, 1959).

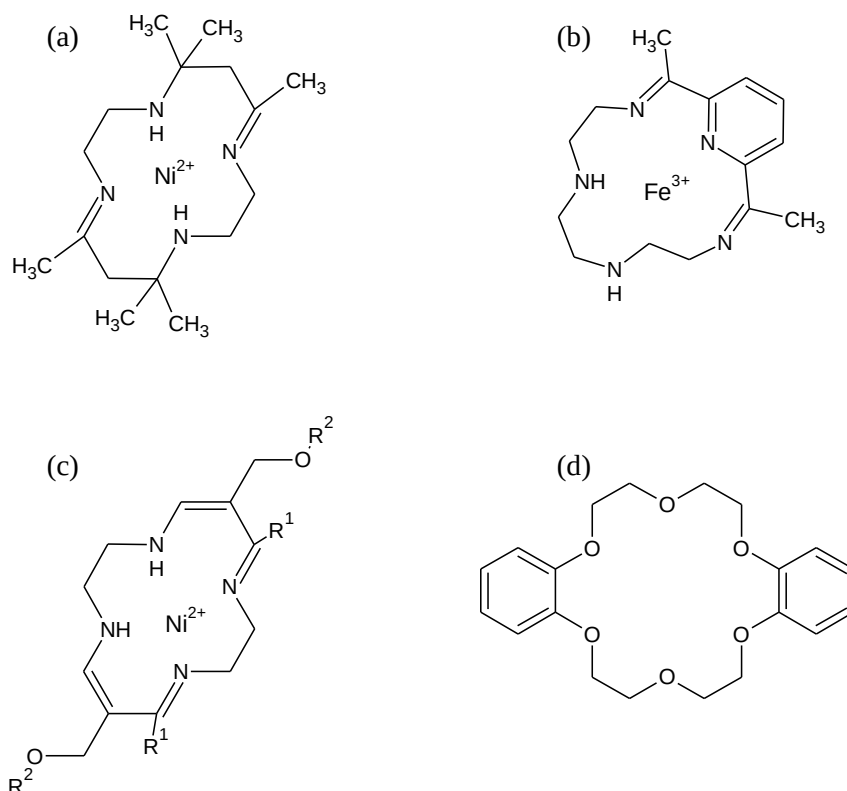
Figura 10 - Proposta estrutural de complexo por transferência de carga de paraciclofano com tetracianoetileno. R pode ser anel benzênico ou grupos metileno



Fonte: Adaptado de CRAM; BAUER, 1959.

Depois dos estudos com ciclodextrinas em 1891, os ligantes macrocíclicos só voltaram a ser estudados mais de 100 anos depois. Estes são definidos como sistemas polidentados contendo átomos doadores como parte do esqueleto de hidrocarbonetos cíclicos. Normalmente eles apresentam pelo menos três átomos doadores, com o anel macrocíclico contendo no mínimo nove átomos. O íon de metal coordenado, ou íons, é mantido no interior do anel macrocíclico por ligações de coordenação. O principal impulso de muitos estudos tem sido investigar as propriedades incomuns frequentemente associadas aos complexos de ligantes cíclicos, como, em particular, seus aspectos espectrais, eletroquímicos e estruturais, cinéticos e termodinâmicos. A chave da reação de condensação da base de Schiff envolve simplesmente a reação de uma amina com o aldeído para eliminar a água e gerar uma imina. Esse nome foi dado após Hugo Schiff, relatar este tipo de reação em 1964. Quatro sistemas de importância fundamental podem ser identificados, três dos quais utilizaram reação de condensação da base de Schiff de um aldeído e uma amina para compor uma imina (Figura 11) (REZAEIVALA; KEYPOUR, 2014).

Figura 11 - Sistemas macrocíclicos sintetizados pelos grupos de (a) Curtis, (b) Busch, (c) Jager e (d) Pederson

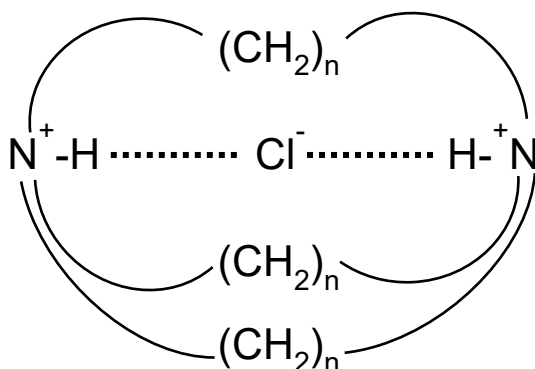


Fonte: Adaptado de REZAEIVALA; KEYPOUR, 2014.

Em 1960, Pedersen voltou seus estudos para a Química de Coordenação, a fim de estudar os efeitos de ligantes fenólicos bi e multidentados nas propriedades catalíticas do grupo vanádil, VO. Durante a síntese do ligante multidentado bis[2-(o-hidroxifenoxi)etil]éter, um de seus materiais de partida, o 1,2-di-hidroxibenzeno estava contaminado com aproximadamente 10% de catecol livre, mas sabendo da necessidade de purificação ao final da reação, ele o utilizou. Após a purificação, Pedersen obteve um produto lateral com rendimento de 0,4% na forma de cristais brancos, que chamaram atenção por serem brilhantes, de estrutura fibrosa e aparente insolubilidade em solventes hidroxilados. Durante alguns testes, ele percebeu que a adição de sais de sódio alteravam a solubilidade do material em metanol, descobrindo então um novo composto, o éter coroa atualmente conhecido como dibenzo 18-coroa-6 (Figura 11d), o qual permitia o encaixe do íon sódio em seu interior por interações eletrostáticas (PEDERSEN, 1988).

Em 1968, Park e Simmonds sintetizaram o primeiro receptor aniônico macrocíclico na forma de gaiolas macrobíclicas contendo íons amônio (Figura 12), que poderiam se coordenar com íons haleto através de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. De acordo com estudos por RMN e análise cristalográfica, os íons haleto são ligados à gaiola entre dois átomos de nitrogênio protonados (BEER; GALE, 2001).

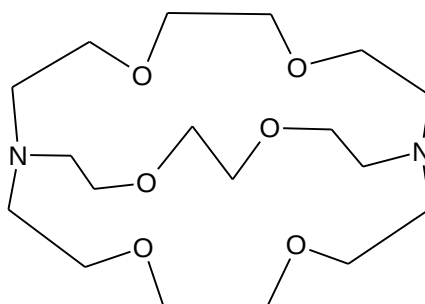
Figura 12 - Fórmula estrutural do receptor aniônico obtido por Park e Simmonds, em que $n = 9$ ou 10



Fonte: Adaptado de BEER; GALE, 2001.

No mesmo ano, Lehn e colaboradores prepararam o primeiro criptando (Figura 13), podendo ser obtido a partir da reação de 2, 3 ou 5 moléculas de materiais de partida diferentes. O interesse nesses sistemas se deve à possibilidade de formarem fortes complexos com uma variedade de metais, íons metálicos e cátions amoniacais. Com isso, eles poderiam ser aplicados em separações isotópicas, desintoxicação, transporte de cátions, aminas e sais de amônio orgânicos, além de catalisarem algumas reações orgânicas e bioquímicas, como compostos fotoativos e na separação de uma variedade de íons (KRAKOWIAK; BRADSHAW, 1992).

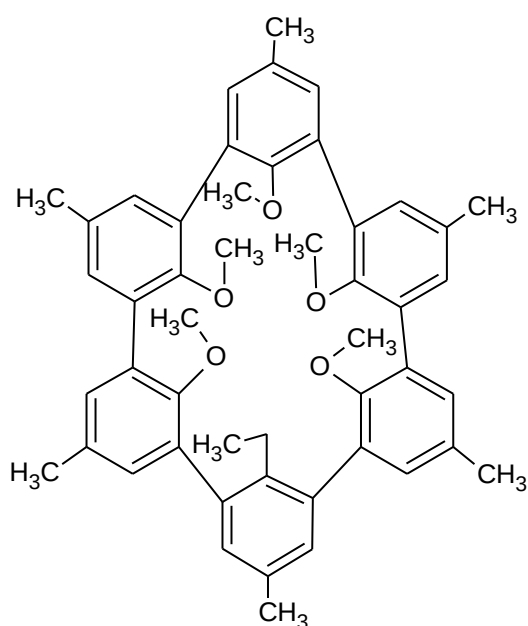
Figura 13 - Fórmula estrutural do primeiro criptando sintetizado por Lehn e colaboradores



Fonte: Adaptado de KRAKOWIAK; BRADSHAW, 1992.

As coroas e criptandos detêm suas propriedades de ligação com íons metálicos devido a vários graus de organização dos grupos funcionais contendo oxigênio e nitrogênio. Nestes hospedeiros, os pares de elétrons não compartilhados atraem cátions durante a complexação. O “*spherand*” (Figura 14), por outro lado, desenvolvido pelo grupo de Cram, compõe um sistema ligante na forma de uma casca de oxigênio cuja cavidade poderia ser ocupada somente por entidades esféricas, tais como átomos individuais ou íons monoatômicos, mas não por partes de hospedeiros ou solventes.

Figura 14 - Fórmula estrutural do “*spherand*” ciclohexametafenileno demonstrando a estrutura octaédrica organizada



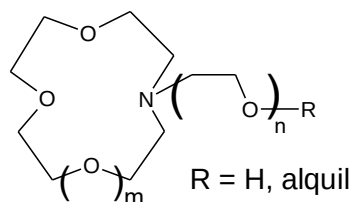
Fonte: Adaptada de CRAM et al., 1979.

A exemplo do ciclohexametafenileno (Figura 14), é possível observar uma estrutura contendo átomos de oxigênio de seis grupos metoxilo em um arranjo octaédrico perfeito, a partir de suas ligações com os grupos arila nas seis posições convergentes (CRAM et al., 1979).

De acordo com Lehn, após 150 anos da síntese da ureia por Wöhler em 1828, a química molecular havia desenvolvido um vasto arranjo de métodos para a obtenção de estruturas moleculares complexas, levando ao estabelecimento da química molecular que utiliza ligações covalentes. Por isso, o mesmo deveria acontecer para as forças não covalentes, introduzindo o termo “Química Supramolecular” definida como “a química além da molécula”, cujas estruturas de alta complexidade são resultado da associação de duas ou mais espécies químicas mantidas por interações intermoleculares (LEHN, 1995).

Depois da síntese acidental do éter coroa por Pedersen, uma vez que eles apresentam fortes interações com cátions metálicos e íons amônio, com comportamentos característicos, muitos estudos acerca de suas habilidades de complexação, catálise, transporte de cátion metálico e análises de cátions metálicos vinham sendo reportados. Como o anel da coroa atua como um hidrófilo, alguns compostos coroa com substituintes lipofílicos também foram sintetizados, os quais apresentavam propriedades interessantes como agentes de superfície não iônicos. Porém, como os anéis em coroa consistem em um número limitado de unidades oxietileno e não possuem grupo hidroxila, a hidrofiliabilidade deste tipo de surfactante era considerado baixo quando comparado a surfactantes não iônicos convencionais. Por isso, Gokel e colaboradores, em 1979, reportaram a síntese do “*Lariat*” éter, que apresenta uma cadeia de oxietileno em um “braço” lateral, em que a estrutura (Figura 15) não só apresenta um aumento da hidrofiliabilidade, como a habilidade de complexação pela introdução do grupo oligo-(oxietileno) (IKEDA; EMURA; OKAHARA, 1984).

Figura 15 - Fórmula estrutural de “*Lariat*” éter com “braço” lateral de oligo-(oxietileno)



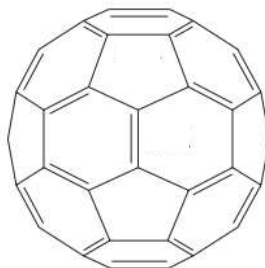
Fonte: Adaptado de IKEDA; EMURA; OKAHARA, 1984.

Em 1981, Weber e Vögtle, em continuidade com os estudos voltados aos éteres cora, apresentaram os “*podands*”, coroas de cadeia aberta, além de proporem nomenclaturas para essa classe de compostos (WEBER; VÖGTLE, 1981).

Então, em 1987, o prêmio Nobel de Química foi dividido por Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn e Charles J. Pedersen devido ao desenvolvimento e uso de moléculas com interações específicas e de alta seletividade (NOBELPRIZE.ORG, 2014a).

Quase 10 anos depois, em 1996, Robert F. Curl Jr, Harold W. Kroto e Richard E. Smalley o prêmio Nobel de Química lhes foi concedido em virtude da descoberta dos fulerenos (Figura 16), uma estrutura cíclica contendo 60 átomos de carbono, conhecida como C₆₀ (GOROFF, 1996) (NOBELPRIZE.ORG, 2014b).

Figura 16 - Fórmula estrutural do fullereno C_{60}

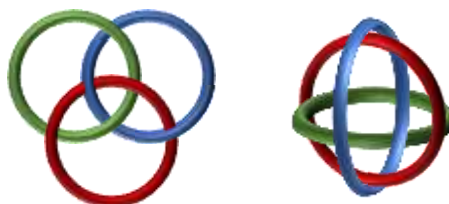


Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2010.

Já em 2003, Peter Agre e Roderick MacKinnon receberam o prêmio Nobel de Química pelos estudos sobre os canais em membranas celulares, como a descoberta de canais de água por Agre e pelos estudos estruturais e mecânicos de canais de íons por MacKinnon (NOBELPRIZE.ORG, 2014C).

No ano seguinte, Stoddart desenvolveu a primeira molécula sintética conhecida como nó Borromeu, uma arquitetura de coordenação contendo 18 componentes pela formação de 12 ligações imina e 30 ligações dativa, associadas com a coordenação de três macrociclos, na forma de três anéis, em que quando um se quebra, os outros também se desfazem. Essa estrutura foi obtida pelo uso da Química de Coordenação, Supramolecular e Covalente Dinâmica, por múltiplos processos de auto-organização cooperativos (Figura 17) (CHICHAK et al., 2004).

Figura 17 - Diferentes representações de nós de Borromeu



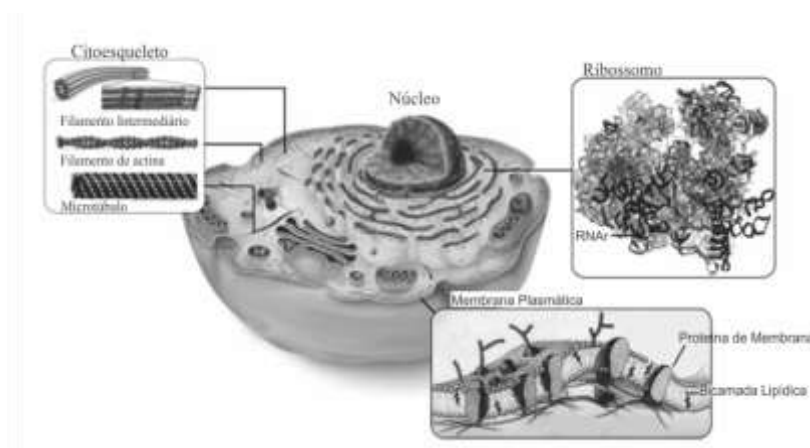
Fonte: Adaptado de CHICHAK et al., 2004.

2.2 Conceitos básicos da química supramolecular

Quando um substrato se liga a uma enzima, uma droga atinge seu alvo ou sinais se propagam entre as células, são observadas interações extremamente seletivas entre as unidades para o controle do processo (LEHN, 1993). Esses sistemas tem sido fonte de inspiração para os químicos supramoleculares (UHLENHEUER; PETKAU; BRUNSVELD, 2010), que se concentram no estudo das características básicas dessas interações. São inúmeras as

quantidades de modelos de arranjos encontrados na natureza resultantes da auto-montagem de unidades biomoleculares antes desorganizadas. Como exemplos, tem-se a auto-organização de proteínas e RNA que formam o ribossomo, a rápida agregação-desagregação da actina e filamentos microtubulares, bem como a possibilidade da auto-montagem dos fosfolipídios para formar as membranas celulares (Figura 18). Os insetos, por exemplo, apresentam o citoesqueleto com os três maiores polímeros supramoleculares citoplasmáticos, os microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos actina. Já a membrana plasmática apresenta proteínas transmembranosas, enquanto o ribossomo eucariótico confere um agregado altamente complexo com mais de 50 subunidades proteicas e inúmeros RNAs. Além disso, frequentemente a auto-montagem é utilizada em eventos de reconhecimento, caso da membrana celular, uma barreira semipermeável formada por uma bicamada lipídica, essencial para a sobrevivência e funcionamento celular (PETKAU-MILROY; BRUNSVELD, 2013).

Figura 18 - Célula eucariótica; Insetos: citoesqueleto com microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos actina; membrana plasmática com proteínas transmembranosas; estruturas cristalina do ribossomo eucariótico



Fonte: Adaptado de PETKAU-MILROY; BRUNSVELD, 2013.

O estabelecimento da Química Supramolecular é recente (VICENS; VICENS, 2011), mas apresentou grande avanço desde o prêmio Nobel de Lehn, Cram e Pedersen em 1987, pelo desenvolvimento de uma estrutura hóspede-hospedeiro mantida por interações não covalentes (ARIGA et al., 2012). Então, o que seria a Química Supramolecular? Esta foi descrita como a “Química além da molécula”, em que uma supramolécula é formada por duas ou mais espécies mantidas por interações não-covalentes. Também podemos defini-la como a “química do Lego®”, na qual cada peça de Lego® representa um bloco de construção molecular e esses blocos são mantidos por interações intermoleculares, de natureza reversível para formar um

agregado supramolecular (STEED; TURNER; WALLACE, 2007). A partir desse conhecimento, esta foi considerada uma ciência básica com um conceito avançado para lidar com complexos moleculares formados através de interações não-covalentes, tais como ligação de hidrogênio, coordenação metálica, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, interações π - π e efeitos eletrostáticos (ARIGA et al., 2012).

Apesar de a inspiração inicial da Química Supramolecular advir da biologia, grande parte das aplicações são observadas na Ciência dos Materiais. Isso porque os conceitos da Química Supramolecular permitiram o controle da organização e propriedades dos materiais sem precedentes (UHLENHEUER; PETKAU; BRUNSVELD, 2010), que se devem a reversibilidade das interações não-covalentes, sua sensibilidade ao meio, adaptação e resposta a estímulos (RYBTCHINSKI, 2011). Dentre essas propriedades, destacam-se:

- Fácil preparação: Para a síntese não-covalente de materiais supramoleculares, múltiplas dessas interações podem atuar cooperativamente com grande especificidade. Essa metodologia contrasta com a ideia do “uma ligação por etapa”, aplicada na maior parte das sínteses covalentes. Por exemplo, a simples mistura de diferentes blocos de construção pré-montados em solução à temperatura ambiente, promove a formação eficiente de materiais supramoleculares. Este método é fácil, de baixo custo e pouco poluente, considerando as múltiplas etapas da síntese covalente e os processos de purificação que aqui são dispensáveis (LIU et al., 2013), que coincide com os princípios da Química Verde (ANASTAS & EGHBALI, 2010).

- Boa reversibilidade: Interações não-covalentes são normalmente mais fracas e mais dinâmicas quando comparadas às ligações covalentes. Além disso, elas podem ser construídas e destruídas facilmente sem a aplicação de muita energia. Isto resulta em boa reversibilidade aos materiais supramoleculares, que podem ser facilmente reciclados e são capazes de se auto-regenerarem após um dano mecânico.

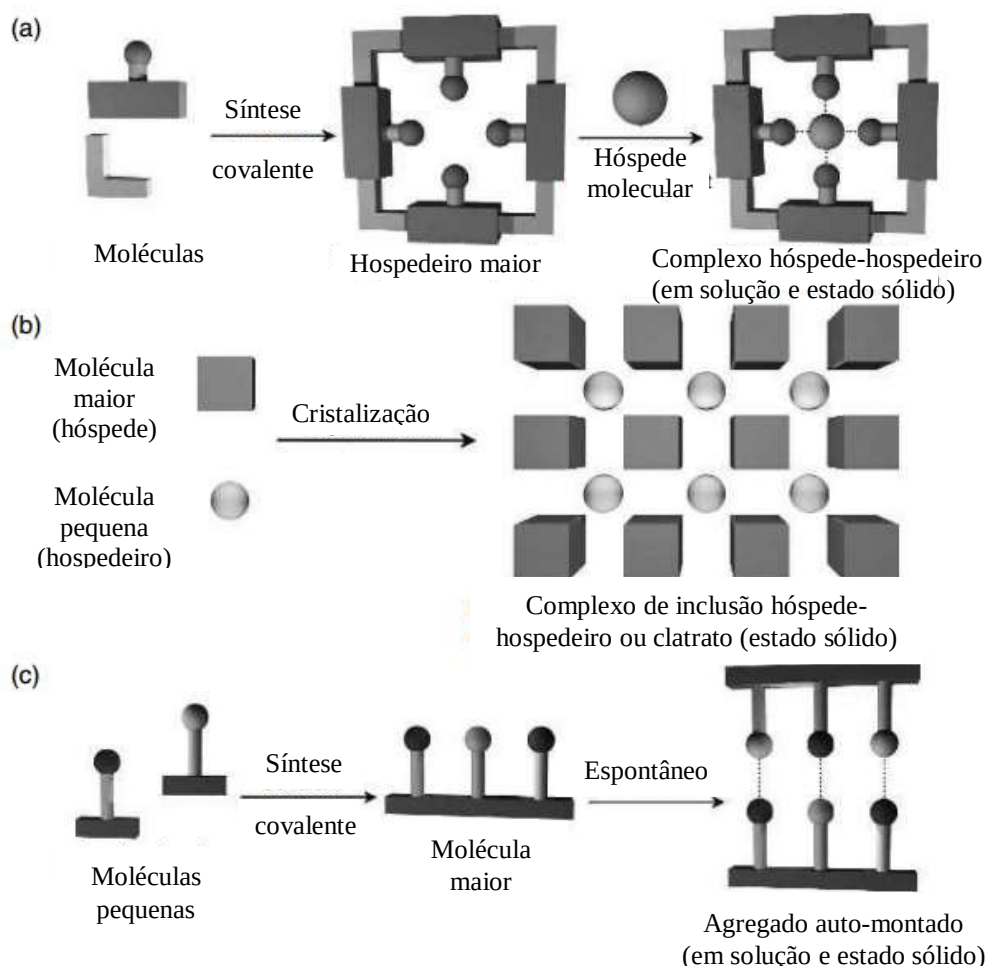
- Propriedade adaptativa: Está relacionada às propriedades que podem responder a estímulos externos pela mudança na estrutura e de funções. Quando expostos a estímulos externos, os materiais supramoleculares podem encontrar automaticamente seu estado mais estável com a menor energia livre, pelo ajuste das interações não-covalentes para se adaptarem ao meio.

- Alta ordenação em escala nanométrica: A missão da Química Covalente está na construção de moléculas em escala atômica, enquanto que o processamento do material bruto promove um método para controlar a ordem macroscópica. Havia uma lacuna entre o mundo microscópico e macroscópico antes da Química Supramolecular ser estabelecida. O controle

racional da ordem molecular em escala nanométrica é crucial para a engenharia supramolecular dos nanomateriais funcionais. Além disso, mesmo para os materiais macroscópicos, as incorporações de nanoestruturas podem resultar em novas e importantes funções (LIU et al. 2013).

A Química Supramolecular pode ser dividida em duas grandes categorias, química do hóspede-hospedeiro e da auto-organização. A diferença entre essas duas áreas é encontrada no tamanho e formato. Se uma molécula é significativamente maior do que outra e pode aprisioná-la, esta é conhecida como “hospedeiro” enquanto a menor molécula é conhecida como “hóspede”, podendo ser envelopada pelo hospedeiro (Figura 19). Donald Cram definiu o hospedeiro como uma molécula orgânica ou íon cujos sítios de ligação convergem em um complexo, enquanto o hóspede pode ser qualquer molécula ou íon cujos sítios de ligação divergem no complexo. Um sítio de ligação é a região em que o hóspede e o hospedeiro de tamanho, geometria e natureza química adequados interagem um com o outro. É possível verificar, por exemplo, na Figura 19a que o hospedeiro apresenta quatro sítios de ligação que convergem em um bolso central de ligação para o hóspede. Complexos hóspedes-hospedeiros incluem sistemas biológicos, como enzimas (hospedeiros) e seus substratos (hóspedes). Na Química de Coordenação é possível encontrar complexos metal-ligante, em que grandes ligantes (geralmente macrocíclicos) atuando como hospedeiros de cátions metálicos. Se o hospedeiro apresenta uma cavidade molecular permanente, contendo sítios de ligação específicos aos hospedeiros, atuará então como hospedeiro tanto em solução como no estado sólido. Por outro lado, a classe de inclusão de compostos no estado sólido só exhibe comportamento de hóspede-hospedeiro como sólido cristalino desde que o hóspede seja ligado a uma cavidade formada por um buraco no empacotamento do hospedeiro (Figura 19b). Quando não há diferença significativa no tamanho e nenhuma espécie atua como hospedeira da outra, a interação não-covalente entre duas ou mais espécies ocorre por auto-organização, para a produção de um agregado com uma estrutura dependendo da informação contida nos blocos de construção químicos (Figura 19c) (STEED; TURNER; WALLACE, 2007).

Figura 19 - O desenvolvimento de um sistema supramolecular a partir de blocos de construção (sítios de ligação representados por círculos): (a) complexação hóspede-hospedeiro; (b) inclusão em grade; (c) auto-organização de moléculas complementares



Fonte: Adaptado de ROTELLO, 2007.

O desenvolvimento de novas arquiteturas supramoleculares de complexidade e funcionalidade similar ao observado na natureza é o sonho de diversos cientistas. É evidente que, inicialmente, os sistemas supramoleculares sintéticos eram pequenos e compostos por blocos de construção relativamente simples, no entanto, o aumento do conhecimento acerca das interações intermoleculares culminou no controle da auto-organização desses sistemas. Com isso, a síntese de múltiplas arquiteturas supramoleculares apresentando diversas formas, composições e funcionalidades são reais em diferentes condições, seja em solvente orgânico ou em estado sólido. Esta afirmação é contrária aos sistemas biológicos (UHLLENHEUER; PETKAU; BRUNSVELD, 2010), já que é de conhecimento geral que a água é considerada um solvente universal, além de promover, mediar e regular diversos processos na natureza (OSHOVSKY; REINHOUDT; VERBOOM, 2007) e, justamente por ser indispensável nos

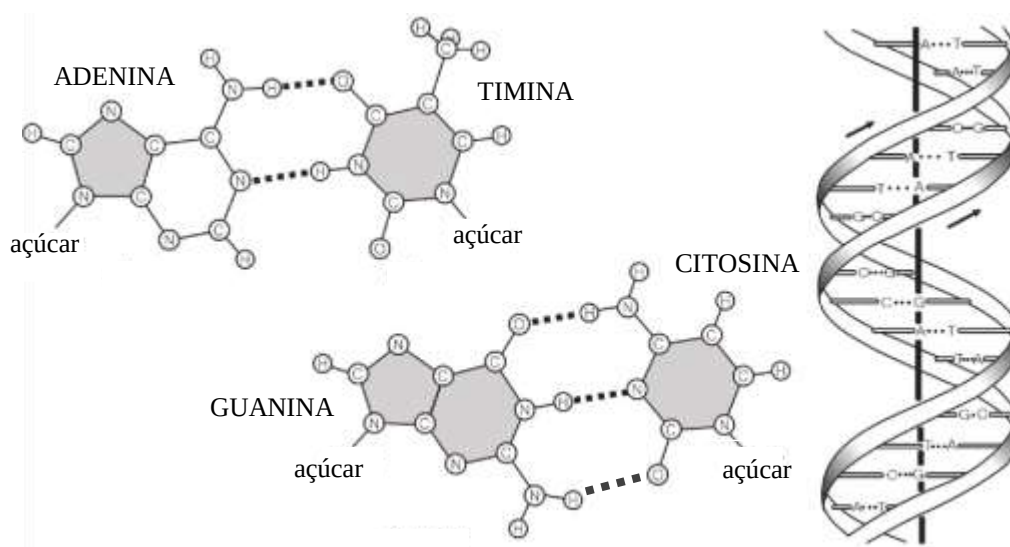
processos biológicos, a maioria dessas auto-organizações ocorrem em meio aquoso (LIM; MOON; LEE, 2009).

Por isso, um dos objetivos da Química Supramolecular é criar receptores sintéticos que exibam afinidade e seletividade aos ligantes em água. Receptores naturais, como as enzimas e anticorpos, apresentam complexação hóspede-hospedeiro forte e seletiva por meio de múltiplas interações não-covalentes entre os grupos funcionais com seus pares de ligação. Esses sistemas naturais inspiram o desenvolvimento racional de receptores sintéticos com o intuito de compreender as forças de ligação que contribuem para a formação de tais sistemas. Como a maior parte dos receptores foram estudados em solventes orgânicos, o desafio dos cientistas inclui a necessidade de o ligante ser solúvel em água e depois requerer o controle da competição entre o sistema e a água (OSHOVSKY; REINHOUDT; VERBOOM, 2007).

A principal força da auto-agregação em água da maior parte dos sistemas supramoleculares, sejam eles naturais ou sintéticos, advém do efeito hidrofóbico. Além disso, as ligações de hidrogênio, interações íon-íon e íon-dipolo podem reforçar e direcionar as interações (UHLENHEUER; PETKAU; BRUNSVELD, 2010), atuando individualmente ou em conjunto para a obtenção de nanoestruturas auto-organizadas (LIM; MOON; LEE, 2009).

As ligações de hidrogênio se manifestam tanto em estado sólido, como em solução, e é possível encontrá-las nas bases nitrogenadas sugeridas por Crick e Watson na formação do DNA (Figura 20), permitindo o reconhecimento de outras moléculas biológicas (ATWOOD; STEED, 2004).

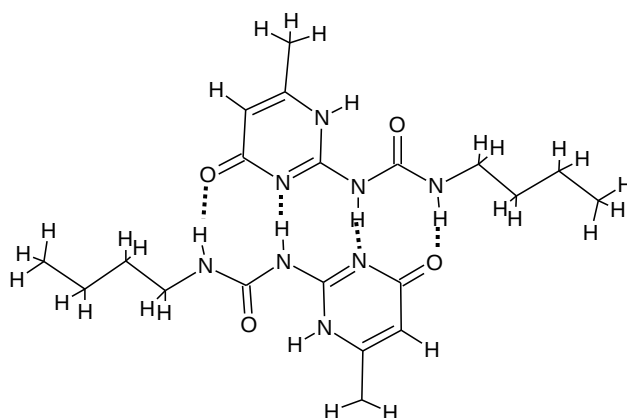
Figura 20 - Ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas adenina e timina e de guanina com citosina compondo o DNA.



Fonte: Adaptado de THIEMANN, 2003.

As ureidopiridiminonas (UPy) sintéticas (Figura 21), por exemplo, mantidas por ligações de hidrogênio mimetizam os pares de ácido nucleico no DNA. Em solventes orgânicos, esses sistemas apresentam constante dimerização devido à natureza cooperativa das quatro interações de hidrogênio. Essas interações, no entanto, são enfraquecidas por competição quando o sistema é adicionado a meio apolar ou aquoso. De qualquer maneira, por se tratar de um sistema sintético, é possível ajustar as interações durante o seu desenvolvimento pela introdução de funcionalidades que podem tanto reforçar como desestabilizar o sistema (ZAYED et al., 2010).

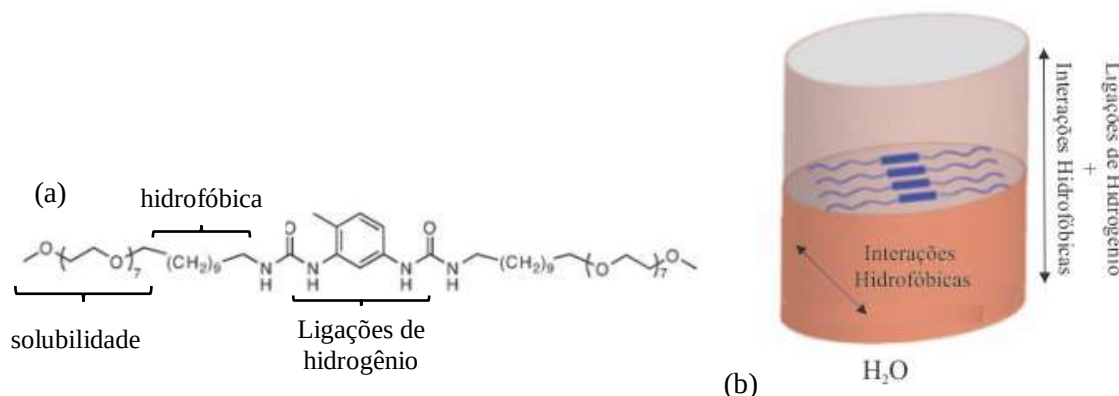
Figura 21 - Fórmula estrutural da 2-butilureido-6-metil pirimidona



Fonte: Adaptado de SIJBESMA, 1997.

Nesse sentido, Obert e colaboradores (OBERT et al., 2007), desenvolveram unidades anfifílicas de bis-ureia capazes de se organizar tanto em solventes orgânicos como em água (Figura 22). A adição de cadeias alquílicas e do etilenoglicol aumentam a solubilidade das espécies orgânicas em água, protegendo ainda o grupo ureia. Em água, o efeito hidrofóbico predomina pelo empacotamento lateral das bis-ureas aromáticas, além da interação por empilhamento vertical através das ligações de hidrogênio.

Figura 22 - (a) Unidade anfifílica bis-ureia e (b) Agregação das unidades em diferentes solventes



Fonte: Adaptado de OBERT et al., 2007.

De acordo com essa ideia, a estratégia para construir agregados mantidos por ligações de hidrogênio que superem a competição e a natureza dinâmica do meio aquoso se baseia na criação de uma proteção formada pelo efeito hidrofóbico, fortalecendo ainda mais as ligações e inibindo a exposição das unidades às moléculas de água (ZAYED et al., 2010).

As propriedades dos materiais dependem tanto da natureza dos constituintes, como das interações. É por isso que a Química Supramolecular apresenta impacto na Ciência dos Materiais pela manipulação das forças não-covalentes que mantêm os constituintes unidos, permitindo o controle da construção dos materiais. A primeira característica dos materiais supramoleculares é a dinâmica, devido a reversibilidade das ligações e a espontaneidade relacionada à montagem/desmontagem em determinadas condições. Além disso, devido à possibilidade de troca dos constituintes, esses materiais são instruídos, combinatoriais e dinâmicos, permitindo a seleção dos constituintes para a promoção de materiais adaptáveis (Figura 23) (LEHN, 2000).

Figura 23 - Características básicas dos materiais supramoleculares

MATERIAIS SUPRAMOLECULARES	
INSTRUÍDOS	• Programados, capazes de efetuar reconhecimento e auto-montagem de componentes
DINÂMICOS	• combinação reversível de componentes adaptáveis, com reação a fatores ambientais
COMBINATORIAIS	• capacidade de seleção de componentes e amplificação de combinações preferenciais

Fonte: Adaptado de LEHN, 2000.

É inquestionável a importância da Química Molecular na criação de novos materiais, mas a auto-organização promove uma rota alternativa devido ao controle das estruturas durante o desenvolvimento e fabricação de materiais e agregados supramoleculares funcionais (WANG; XU; ZHANG, 2009). A auto-montagem se baseia na organização autônoma dos componentes, produzindo padrões ou estruturas em uma dada escala. Em escala nanométrica, ela reflete a informação das moléculas individuais, tais como a forma, carga, polarizabilidade, que determinam as interações atrativas ou repulsivas. Hoje em dia, essas características estruturais estão bem estabelecidas e podem ser controladas para a introdução de propriedades funcionais a uma gama de aplicações. Dentre elas, destacam-se nanomateriais implementados na biomedicina, tecnologia da informação e em ciências ambientais (BUSSERON et al., 2013).

Recentemente, as propriedades físicas e químicas dos nanomateriais tem chamado a atenção de cientistas para a criação de dispositivos capazes de interagir com sistemas biológicos. Apesar de recente, a nanotecnologia já impactou no campo da nanobiotecnologia tanto em aplicações diagnósticas como terapêuticas, mais especificamente no carreamento de fármacos. Isso se deve ao tamanho, alta capacidade de retenção e caráter reversível para a liberação controlada dos fármacos. Além disso, tanto biomoléculas como biopolímeros podem ser usados no desenvolvimento de tais materiais a fim de conferir biocompatibilidade e propriedades bioativas. Nos últimos anos, quatro principais classes de biomoléculas, englobando peptídios, lipídios, ácidos nucleicos e açúcares tem sido estudados como blocos de construção para a formação de nanoestruturas de alta complexidade e de possível aplicação como agentes terapêuticos (BUSSERON et al., 2013).

2.2.1 Supra-anfifílicos

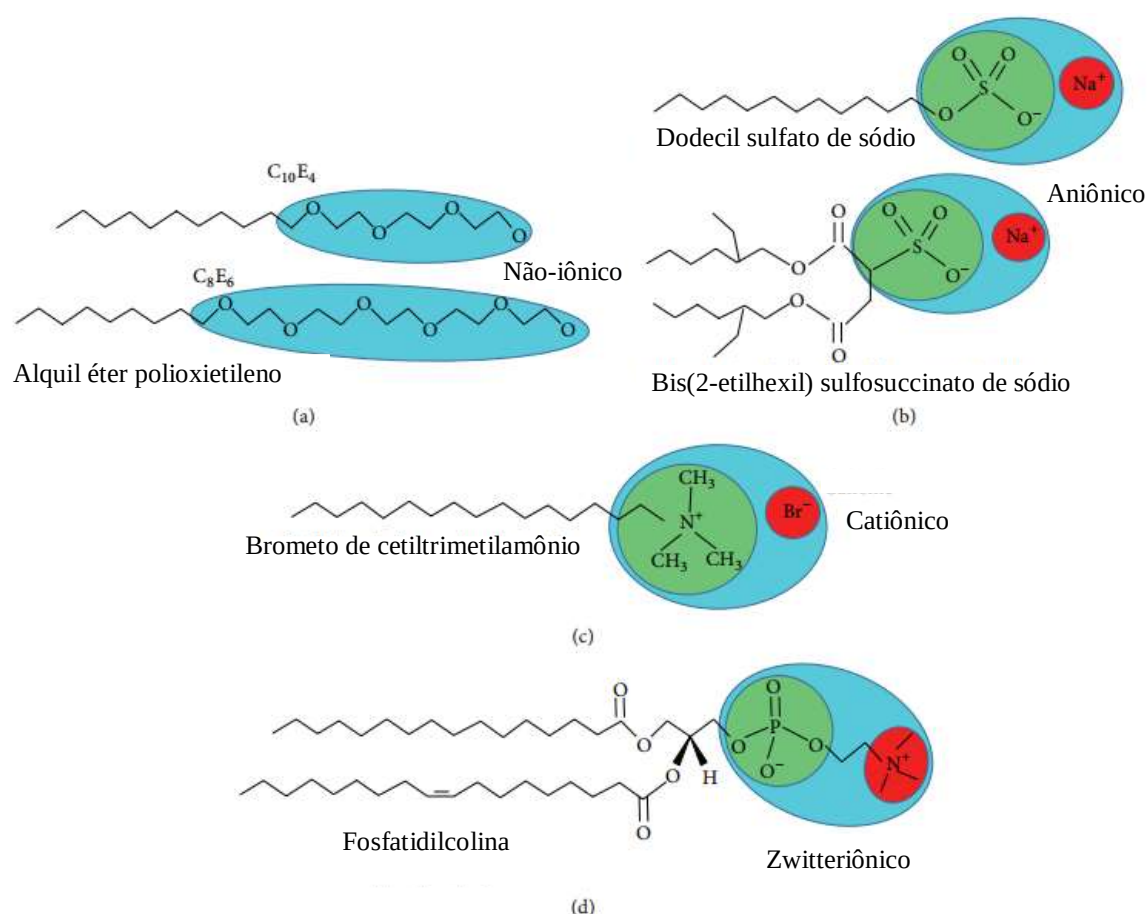
O conhecimento acerca da auto-organização dos sistemas biológicos, em que agregados de várias moléculas apresentam funções tão interessantes quanto compostos moleculares, a pesquisa por materiais formados por moléculas biológicas como proteínas, ácido nucleico, sacarídeos e lipídios vem sendo desenvolvida. Desses exemplos, os lipídios apresentam as estruturas mais simples e tem sido amplamente investigados, mas suas propriedades também podem ser estendidas às moléculas análogas, conhecidas como anfifílicos. Pode-se dizer que o estudo da auto-organização de anfifílicos é precursora ao desenvolvimento da nanotecnologia envolvendo avançadas funções inspiradas em sistemas bioquímicos (RAMANATHAN et al., 2013).

O termo anfifílico foi introduzido por Hartley em 1936 e deriva da palavra grega “*amphi*”, que significa “dos dois lados” e “*philon*”, que significa “amigo, apreciador” (RAMANATHAN et al., 2013). Por isso, anfifílicos são moléculas que contêm tanto a porção hidrofílica quanto hidrofóbica (lipofílica) e normalmente, essas porções são mantidas por ligações covalentes. Em circunstâncias apropriadas, os anfifílicos podem se auto-agregar em solventes polares ou apolares para formarem organizações bem definidas, cuja maioria é dirigida pela entropia. A estrutura molecular dos anfifílicos está estritamente relacionada à morfologia das auto-organizações subsequentes, assim como outras propriedades físico-químicas, que lhes conferem aplicações específicas (KANG et al., 2016).

Nos anfifílicos convencionais de cabeça/cauda(s), a parte lipofílica consiste geralmente em uma cadeia de hidrocarboneto longa (saturada ou insaturada), enquanto a cabeça hidrofílica pode ser iônica ou não-iônica. Os tensoativos não iônicos possuem unidades de poliéter ou polihidroxila como o grupo hidrofílico. Uma grande variedade de surfactantes não-iônicos convencionais geralmente consistem em uma cadeia hidrofílica de poli(óxido de etileno), denominado etoxilato, ligada a uma cadeia alquílica hidrofóbica, normalmente utilizada em aplicações de limpeza com agentes tensoativos aniônicos. Por exemplo, os alquil éteres de polioxietileno, C_nE_m , são tensoativos não-iônicos constituídos por m unidades de oxietileno hidrofílicas e uma cadeia alquílica com n grupos metileno (Figura 24a). Os tensoativos aniônicos, amplamente utilizados como detergentes e sabões de limpeza, consistem em grupos cabeça carregados negativamente e contra-íons carregados positivamente (como íons sódio, potássio ou amônio). Carboxilato, sulfato, sulfonato e fosfato são os grupos polares comumente usados (Figura 24b). Os surfactantes catiônicos consistem em grupos principais carregados positivamente, tais como o amônio quaternário e um íon haleto como contra-íon. O brometo de

cetiltrimetilamônio (CTAB) e o bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sódio (AOT) são os anfifílicos catiônicos mais utilizados (Figuras 24b e 24c). Finalmente, em anfifílicos zwitterionicos, os grupos principais possuem uma carga positiva e negativa, como acontece, por exemplo, na fosfatidilcolina de fosfolípido na forma de vesícula (Figura 24d). Por exemplo, se os zwitterion contém um carboxilato e um íon amônio protonado, ele pode se comportar como um ânion (a pH elevado) ou como cátion (a pH baixo) assumindo, então, um caráter anfótero. Algumas moléculas anfifílicas tradicionais estão apresentadas na Figura 24 (LOMBARDO et al., 2015).

Figura 24 - Exemplos de moléculas anfifílicas mais comuns (a) não iônicas, (b) aniônicas, (c) catiônicas e (d) zwitterionicas



Fonte: Adaptado de LOMBARDO et al., 2015.

Devido à sua anfifilicidade (ou atividade superficial), o grupo cabeça polar dos anfifílicos interage com a água, enquanto a cadeia lipofílica apolar irá migrar acima da interface (seja no ar ou no líquido apolar). Como as moléculas anfifílicas apresentam capacidade de reduzir a tensão superficial, muitas vezes são chamadas de surfactantes (isto é, agentes tensoativos). Por esta razão, os anfifílicos desempenham um papel importante como

emulsionantes, detergentes, dispersantes, agentes molhantes e espumantes em várias aplicações (LOMBARDO et al., 2015), nos ramos farmacêutico, alimentício, cosmético, catálise e síntese controlada de materiais nanoestruturados. Como exemplos, tem-se a recuperação do óleo, dispersões de herbicida, descoloração de tinta de papéis e filmes plásticos, filtração de partículas ultrafinas, estabilização de suspensões de particulado e detergentes de limpeza. Além dessas aplicações industriais, existem outras numerosas possibilidades de uso dos anfifílicos em alta tecnologia. A partir de um ponto de vista fundamental, este campo mantém uma importante fonte de inspiração para pesquisadores de diferentes áreas científicas (RAMANATHAN et al., 2013).

Ao contrário dos anfifílicos convencionais, o campo dos supra-anfifílicos é formado por interações não-covalentes e ligações covalentes dinâmicas. Os supra-anfifílicos estabelecem uma nova ponte entre a Ciência Coloidal e a Química Supramolecular, visto que enriquecem a primeira, bem como possibilitam a auto-organização e desagregação controlada, permitindo a obtenção de materiais supramoleculares com arquiteturas e funções sob medida (KANG; LIU; ZHANG, 2014).

Tanto para os anfifílicos convencionais como para os supra-anfifílicos, diferentes topologias podem gerar diferentes propriedades físico-químicas e uma variedade de aplicações (KANG; LIU; ZHANG, 2014). O método de preparo mais simples envolve a mistura de todos os blocos de construção em água ou outro solvente simultaneamente. Como as interações não-covalentes apresentam dinâmicas rápidas, os supra-anfifílicos podem formar espontaneamente e se auto-agregarem em pouco tempo (KANG et al., 2016). As vantagens dos supra-anfifílicos incluem, portanto, a redução da síntese química, bem como possibilita a aquisição de determinadas topologias especiais. Além disso, é possível introduzir porções funcionais aos sistemas, podendo torná-los sensíveis a estímulos externos. À princípio, a preparação dos supra-anfifílicos pode ser considerada uma agregação primária e esses supra-anfifílicos podem ser usados como blocos de construção de agregados hierárquicos, podendo promover outras possibilidades para uma modulação de arquiteturas e funções (KANG; LIU; ZHANG, 2014).

A auto-organização de biomoléculas, por exemplo, é consequência das interações não-covalentes específicas e locais, que incluem ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Desde que a natureza intrínseca da auto-organização é o ponto de partida para a construção de estruturas altamente ordenadas a partir de blocos de construção monoméricos, o agregado final é estabilizado por diversas interações não covalentes relativamente fracas espalhadas por todo o volume molecular (PETKAU-MILROY; BRUNSVELD, 2013). Apesar da aparente fraqueza das forças envolvidas na auto-organização dos anfifílicos, o número

relevante dessas interações pode produzir um efeito geral que é forte o suficiente para manter diferentes moléculas anfifílicas unidas, garantindo sua estabilidade em solução. Além disso, esta suposta fraqueza das interações tornam a estrutura mais flexível, permitindo que o sistema resista a pequenas perturbações, preservando a reversibilidade da estrutura auto-montada. As principais forças não covalentes que atuam na auto-organização de anfifílicos são as ligações de hidrogênio, os efeitos hidrofóbicos, a interação eletrostática e as forças de van der Waals. A força dessas interações, que são muito menos intensas do que as ligações covalentes (400 kJ mol^{-1}), varia de menos de 5 kJ mol^{-1} para forças van der Waals até um máximo de 120 kJ mol^{-1} para ligação de hidrogênio (ou até 400 kJ mol^{-1} para interações metal-ligante). Um resumo dessas interações é apresentado na Tabela 1 (LOMBARDO et al., 2015).

Tabela 1 - Energias das principais interações não-covalentes envolvidas em anfifílicos auto-organizados

Força de atração	Energia (kJ mol^{-1})
Íon-íon	200-300
Íon-dipolo	50-220
Dipolo-dipolo	5-50
Ligação de hidrogênio	4-120
Cátion- π	5-80
π - π	0-50
van der Waals	$< 5 \text{ kJ mol}^{-1}$, mas varia com a área superficial

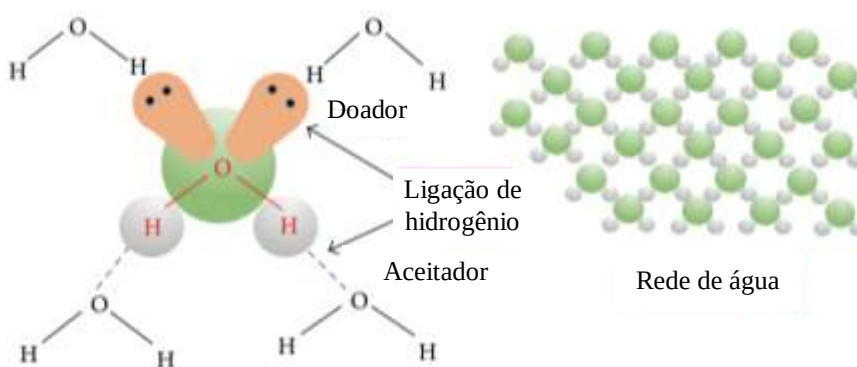
Fonte: Adaptado de LOMBARDO et al., 2015.

A estabilidade em solução dos anfifílicos dentro dos agregados se deve tanto à hidratação dos grupos cabeça hidrofílicos quanto à inserção da(s) cauda(s) hidrofóbica(s) no solvente. À princípio, ocorre um ganho entálpico na solvatação devido à formação da ligação de hidrogênio, seguida do efeito hidrofóbico, que é um ganho na entropia da água pura (LOMBARDO et al., 2015).

A ligação de hidrogênio é a interação não covalente mais importante no processo de auto-organização, devido à sua direcionalidade e força (TOKSOZ; ACAR; GULER, 2010). Além disso, as ligações de hidrogênio são essenciais em importantes funções nos sistemas biológicos, pois são fortes o suficiente para unir as biomoléculas, mas fracas o bastante para se desfazerem, quando necessário, dentro das células vivas. Para isso, as biomoléculas, apresentam aceitadores e doadores de ligações de hidrogênio dentro deles em virtude da presença de dipolos moleculares de átomos de hidrogênio (H) ligados a átomos eletronegativos (como oxigênio, nitrogênio ou flúor). Na água, os elétrons não ligados são os aceitadores de

ligações de hidrogênio e os átomos de hidrogênio são os doadores de ligação de hidrogênio. Conforme mostrado na Figura 25, a polaridade das moléculas de água resulta na atração da porção negativa (oxigênio) e das cargas parciais positivas (hidrogênio), e justamente essas ligações de hidrogênio da água apresentam implicações importantes nas propriedades da água e suas funções relevantes em sistemas biológicos (LOMBARDO et al., 2015).

Figura 25 - Representação esquemática da polaridade das moléculas de água e as ligações de hidrogênio na água



Fonte: Adaptado de LOMBARDO et al., 2015.

As forças das ligações de hidrogênio podem ser bem diferentes nos variados sistemas e não precisam ser necessariamente correlacionadas com a acidez do doador de próton. Isso depende do tipo de átomo eletronegativo ao qual o átomo de hidrogênio está ligado e a geometria que a ligação de hidrogênio adota na estrutura. Tipicamente, as forças variam de 4 a 120 kJ mol⁻¹, com uma vasta maioria abaixo de 60 kJ mol⁻¹ (STEED; TURNER; WALLACE, 2007).

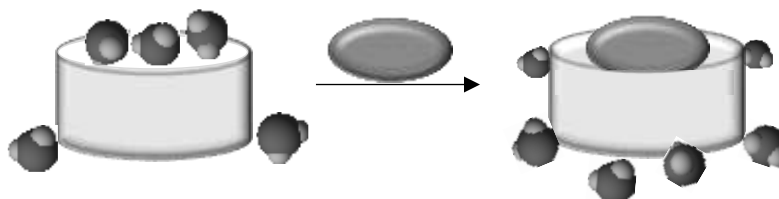
Juntamente com a ligação de hidrogênio, o efeito hidrofóbico é a segunda força de direção principal da auto-organização dos anfífilicos em diversas estruturas supramoleculares. O efeito hidrofóbico desempenha um papel importante em muitos sistemas, pois regula a tendência das moléculas apolares em se auto-agregarem. Quando um composto hidrofóbico é inserido em água, observamos a ruptura da rede de ligações de hidrogênio, que favorece o rearranjo das moléculas de água em torno das moléculas apolares (LOMBARDO et al., 2015). Esta situação é mais favorável energeticamente porque as moléculas de água interagem com elas mesmas ou com outros grupos ou moléculas polares, preferencialmente (STEED; TURNER; WALLACE, 2007). Quando diferentes moléculas apolares são introduzidas em água, a ruptura da rede de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água favorece a criação de cavidades maiores para acomodarem um agregado de moléculas apolares (soluto). Neste

caso, as estruturas de moléculas de água, que são distorcidas pela presença do soluto, farão novas ligações de hidrogênio, induzindo assim a uma estrutura semelhante ao gelo em torno das moléculas hidrofóbicas (LOMBARDO et al., 2015).

As interações hidrofóbicas apresentam um papel importante na Química Supramolecular, a exemplo da ligação de moléculas orgânicas de ciclofanos (apresentam anéis aromáticos ligados em ponte) e ciclodextrinas (oligossacarídeos cíclicos quirais com cavidades moleculares) em água. Os efeitos hidrofóbicos podem ser divididos em dois componentes energéticos, chamados de efeito hidrofóbico entálpico e efeito hidrofóbico entrópico (STEED; TURNER; WALLACE, 2007).

As interações hidrofóbicas entálpicas ocorrem quando um hóspede substitui a água em uma cavidade. Isto ocorre quase imediatamente quando a água não interage fortemente com a cavidade hidrofóbica da molécula hospedeira e a energia do sistema é elevada. Uma vez que a água é substituída pelo hóspede, a energia diminui (Figura 26). Também há um efeito entrópico nesse processo, no qual a água antes organizada com a cavidade torna-se desordenada ao deixá-la. Um aumento na entropia também favorece o processo (STEED; TURNER; WALLACE, 2007).

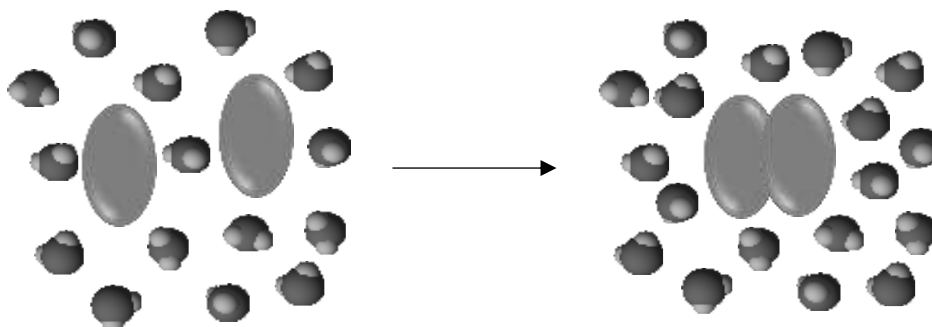
Figura 26 - A substituição das moléculas de água da cavidade hidrofóbica é responsável pelo efeito hidrofóbico entálpico



Fonte: Adaptado de ROTELLO, 2007.

As interações hidrofóbicas entrópicas aparecem quando duas ou mais moléculas orgânicas em solução aquosa se combinam criando um buraco na água para formar um complexo supramolecular (Figura 27). Há menos interrupção (um buraco na fase aquosa em vez de furos múltiplos) e, portanto, um ganho entrópico, à medida que a energia livre total do sistema é abaixada (STEED; TURNER; WALLACE, 2007). Este processo corresponde a uma atração mútua e efetiva entre as moléculas apolares na água (interação hidrofóbica), enquanto que as estruturas agregadas mais favoráveis entropicamente são geradas para minimizar a ruptura da estrutura da água (LOMBARDO et al., 2015).

Figura 27 -Duas moléculas orgânicas criando um buraco com uma fase aquosa, dando origem ao efeito hidrofóbico entrópico – um buraco é mais estável do que dois



Fonte: Adaptado de ROTELLO, 2007.

Mais importante ainda é que várias interações não-covalentes responsivas a estímulos podem ser facilmente introduzidas em anfifílicos supramoleculares para a obtenção de nanomateriais. As características relevantes incluem sensibilidade ao pH, potencial redox, sensibilidade a enzima, foto-sensibilidade e multi-sensibilidade. A auto-organização de supra-anfifílicos sensíveis ao estímulo pode ser uma alternativa para a construção de nanoveículos supramoleculares disponíveis, podendo satisfazer demandas nanomédicas (XU et al., 2014). Nesse contexto, arquiteturas supramoleculares sintéticas em água podem encontrar diversas aplicações, desde a imagem até o diagnóstico, do transporte de fármaco até a engenharia tecidual. As vantagens da organização dos ligantes não-covalentes comparados a disposição dos ligantes covalentemente ligados incluem a natureza responsiva dos processos de auto-organização, facilidade da síntese supramolecular e a possibilidade de incorporar um arranjo múltiplo de diferentes ligantes através da mistura dos blocos de construção (PETKAU-MILROY; BRUNSVELD, 2013).

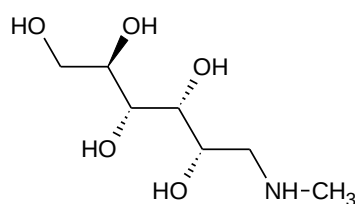
É importante ressaltar que a quantidade de moléculas anfifílicas influencia a morfologia das estruturas auto-organizadas. Embora em concentrações muito baixas, as moléculas serão dispersas aleatoriamente sem qualquer ordem, em concentrações mais altas dos anfifílicos, as nanoestruturas auto-organizadas, podem se organizar da mesma forma que os cristais líquidos termotrópicos. O principal pré-requisito para o aparecimento de fases líquido cristalinas é a anisotropia. Enquanto nos cristais líquidos termotrópicos não é necessária adição de solvente, para os cristais líquidos liotrópicos (LLC) formados por moléculas anfifílicas em solventes seletivos, a anisotropia baseia-se principalmente nas diferentes propriedades de solubilidade das diferentes extremidades dos anfifílicos e um sutil balanço das interações intermoleculares. As variadas classes de fases de cristais líquidos liotrópicos dos sistemas surfactantes têm sido amplamente investigadas em todas as concentrações, enquanto os diferentes parâmetros de

ordem de suas estruturas têm sido classificados por meio de padrões de difração de raios X e estudadas pelo deslocamento químico em espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).

2.2.2 Supra-anfifílicos formados por meglumina

A meglumina (Figura 28), (2R,3R,4R,5S)-6-metilaminoexano-1,2,3,4,5-pentol, mais conhecida como N-metilglucamina, é um carboidrato derivado do sorbitol, no qual o grupo hidroxila da posição 1 é substituído por um grupo metilamino.

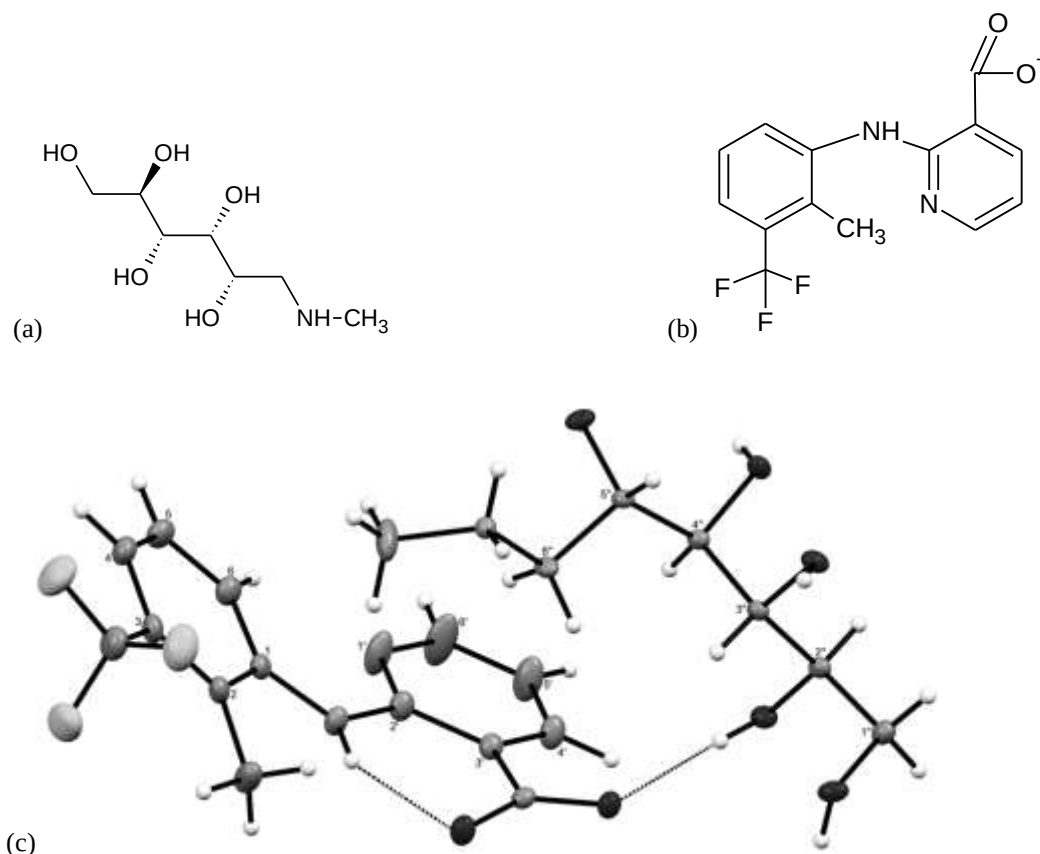
Figura 28 - Fórmula estrutural da meglumina



Fonte: Autor.

A maior aplicabilidade da meglumina está na formação de sais de ácidos orgânicos altamente solúveis em meio aquoso com o intuito de aumentar a solubilidade de fármacos, através da formação de supra-anfifílicos, como em fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (BUUR et al., 2006) e complexos de antimônio (ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998). Recentemente, identificamos a formação de supra-anfifílicos a partir da reação ácido-base dos fármacos flunixinina (Figura 29) e diclofenaco com meglumina, cujos resultados de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) mostraram que a meglumina está diretamente envolvida na formação de um polímero supramolecular. Medidas de espalhamento de luz evidenciaram um material de elevada massa molecular em torno de 290 ± 88 MDa. A formação desse material supostamente compreende duas etapas. Primeiramente, ocorre a transferência do hidrogênio ácido entre o grupo carboxila e o grupo amino da meglumina gerando supra-anfifílicos estabilizados por ligações eletrostáticas. Em um segundo momento, tais supra-anfifílicos se auto-organizam em nanoestruturas com complexidade hierárquica crescente e que são possivelmente estabilizadas por ligações de hidrogênio provenientes da meglumina (CASSIMIRO et al., 2012).

Figura 29 - Fórmula estrutural química de (a) meglumina, (b) flunixinina e (c) ligação de hidrogênio do aduto flunixinina-meglumina



Fonte: Adaptado de CASSIMIRO et al., 2012.

Os resultados obtidos nesse estudo inicial foram tão promissores que encorajaram nosso grupo a tentar estudar o papel da meglumina na formação de outros sistemas supramoleculares utilizando um triglicerídio, o óleo de rícino maleinizado, usado como espécie hidrofóbica durante a reação do tipo ácido-base com a meglumina. Esta reação gerou um produto amarelado com aspecto de gel. Além disso, este material foi estudado com adição de diferentes porções de água, formando cristais líquidos (FERREIRA et al., 2016). Em seguida, estes materiais foram comparados aos supra-anfifílicos compostos por ácido ricinoléico maleinizado, o ácido graxo majoritário do óleo de rícino, diretamente em contato com a meglumina. Os resultados apresentaram formação de supra-anfifílicos de aspecto semelhante a um gel viscoso, formando cristais líquidos em fase hexagonal, lamelar e mistura dessas fases. Além disso, o estudo da adição de diferentes porções de água demonstrou que há um limite de interação com o supra-anfifílico próximo a 18%, tornando-os interessantes em aplicações como biomateriais (KUROKAWA, 2014).

2.2.3 Polímeros supramoleculares

Os materiais avançados, a exemplo dos polímeros sintéticos tiveram um grande impacto em nossa vida (YAN et al., 2012) e tornaram-se indispensáveis nos últimos 50 anos. Sua ampla gama de propriedades personalizáveis, altos níveis de processamento e baixo custo levaram ao uso abundante de materiais poliméricos em aplicações que vão desde sacos plásticos descartáveis e embalagens de alimentos, até componentes complexos utilizados nas indústrias eletrônica, automotiva e aeronáutica. Invariavelmente, a exposição ao ataque ambiental resultante de estresses químicos, mecânicos, radiativos e térmicos faz com que os materiais poliméricos se degradem ao longo do tempo, os quais, por serem mantidos por ligações covalentes, impedem a reciclagem e promovem uma alteração indesejável das propriedades dos materiais sob estímulos externos (HART et al., 2013; YAN et al., 2012).

Devido a degradação decorrentes de diversos fatores externos e a impossibilidade de reciclagem, o campo da química supramolecular avançou para um nível em que é possível selecionar blocos de construção que se auto-organizem em estruturas interessantes que vão desde sistemas hóspede-hospedeiro simples baseados no reconhecimento molecular até materiais supramoleculares funcionais altamente complexos. Como uma parte altamente ativa e significativa da Química Supramolecular, os polímeros supramoleculares, que podem ser definidos como sistemas poliméricos que se estendem para além da molécula e utilizam interações não-covalentes para direcionar sua montagem, controlar suas conformações e/ou para definir seu comportamento, chamam cada vez mais a atenção da comunidade científica. O uso de interações não-covalentes unidirecionais (Figura 32) reversíveis e fortes entre monômeros supramoleculares pode não só alcançar algumas das propriedades importantes dos polímeros convencionais (por exemplo, viscosidade), mas também realizar algumas funcionalidades fascinantes que não são encontradas em polímeros convencionais, como processamento, reciclagem, e auto-regeneração (HUANG; SCHERMAN, 2012).

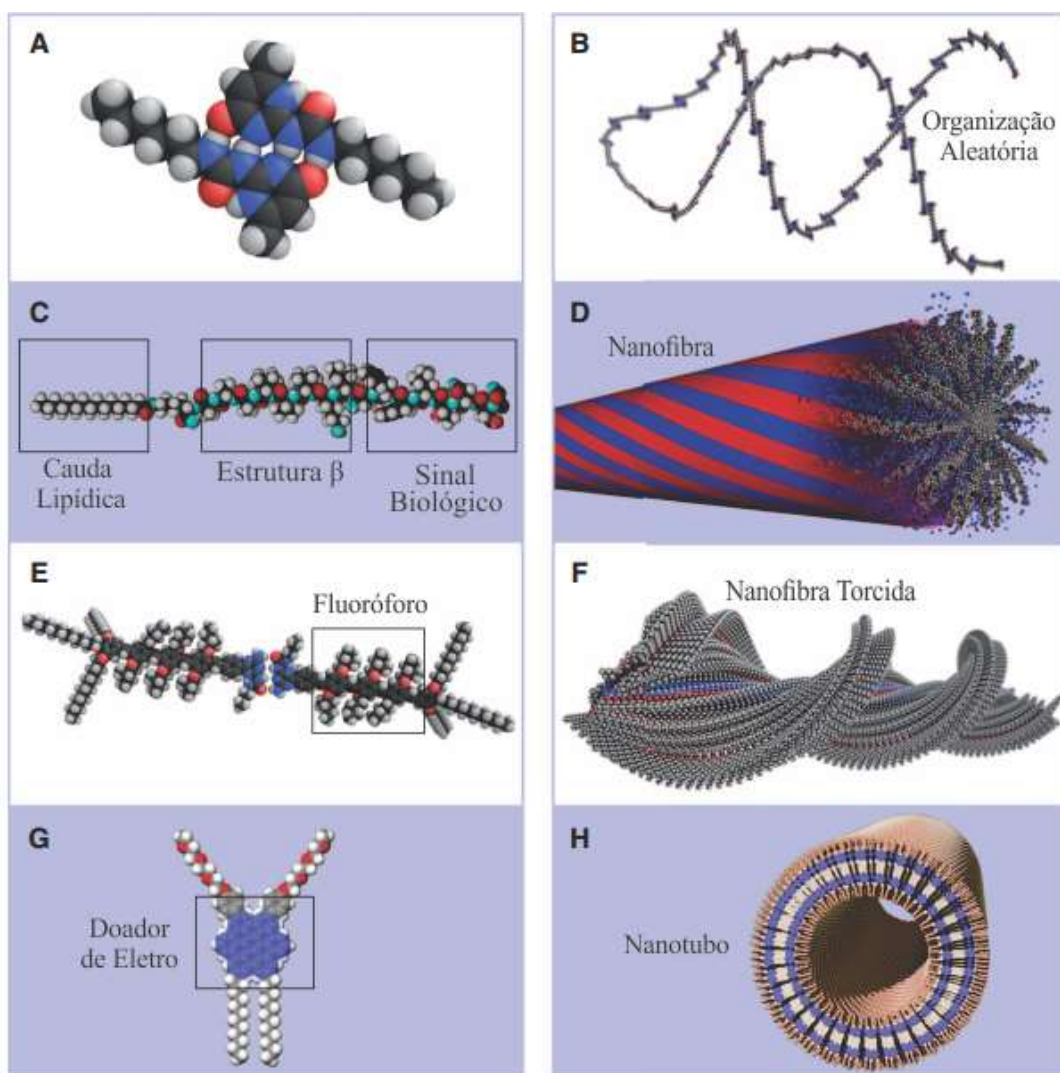
Os sistemas vivos utilizam o conceito de polímero supramolecular extensivamente, a exemplo do citoesqueleto celular em que longos filamentos de proteínas monoméricas ordenadas formam e se despolimerizam dinamicamente para as funções celulares vitais. Uma plataforma sintética de polímeros supramoleculares funcionais poderia ser uma fonte extraordinária de inovação com impacto em áreas como energia, medicina ou sustentabilidade ambiental. A partir da estrutura desenvolvida por Lehn, uma série de estruturas variando desde sistemas hospedeiros simples baseados em reconhecimento molecular a complexos supramoleculares auto-organizados, redes cristalinas e monocamadas foram sintetizados. Na

química de polímeros, essas interações controladas têm sido usadas para criar materiais líquido cristalinos e intrigantes arquiteturas em conjuntos de copolímeros em bloco (AIDA; MEIJER; STUPP, 2012).

Inicialmente, em 1878, Louis Henry propôs a ideia de polimerização molecular por interações associativas, mas foi (FOUQUEY; LEHN; LEVELUT, 1990) que projetou e sintetizou o primeiro polímero supramolecular linear mantido por ligações de hidrogênio entre moléculas pequenas. Mais recentemente, algumas estratégias foram desenvolvidas para criar grandes e ordenados conjuntos de moléculas bidimensionais e outros objetos em nanoescala.

O interesse em polímeros supramoleculares não envolve apenas o desenvolvimento de agregados moleculares unidimensionais, mas lhes atribuem funções. A Figura 30 apresenta unidades moleculares formando arquiteturas supramoleculares com funcionalidades mecânicas, biológicas, óticas e eletrônicas (AIDA; MEIJER; STUPP, 2012). As Figuras 30a e 30b representam o monômero ureidopirimidinona capaz de formar quatro ligações de hidrogênio e se agregar como um polímero em forma de uma espiral aleatória. Já as Figuras 30c e 30d demonstram um anfifílico monomérico peptídico composto por três domínios, uma sequência formada por um sinal biológico, um domínio contendo aminoácidos com uma forte tendência em formar β folha e uma cauda alquílica hidrofóbica, compondo um agregado cilíndrico torcido. As Figuras 30e e 30f representam o fluoróforo oligo(fenileno vinileno), substituído por grupos alquila, em que um dos terminais é capaz de formar quatro ligações de hidrogênio compondo o polímero em fita torcida. Por fim, as Figuras 30g e 30h apresentam o monômero hexabenzocoroneno que pode atuar como doador de elétron, substituído por cadeias de feniltrietilenoglicol e dodecil, gerando um nanotubo com uma parede espessa.

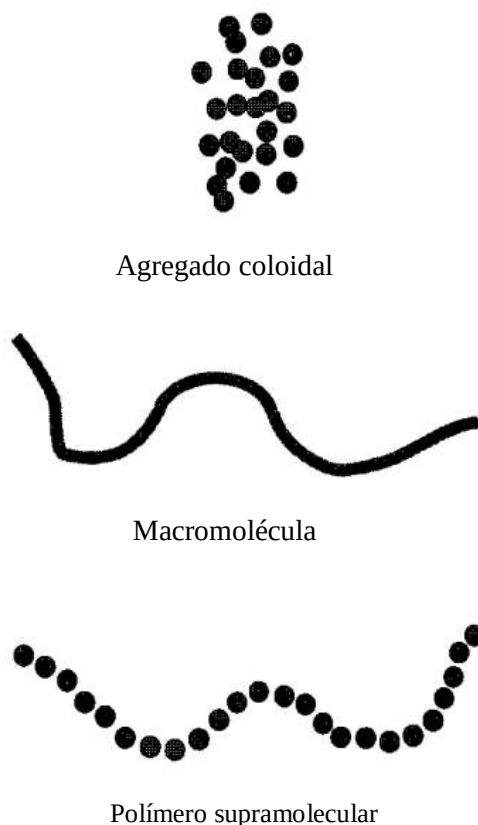
Figura 30 - Representação de monômeros e seus polímeros supramoleculares, (a) ureidopirimidinona em (b) espiral, (c) anfifílico peptídico (d) compondo um cilindro torcido, (e) fluoróforo originando (f) fita torcida e (g) hexabenzocoroneno gerando (h) um nanotubo



Fonte: Adaptado de AIDA; MEIJER; STUPP, 2012.

A par disso, os polímeros supramoleculares (Figura 31) possuem uma responsividade térmica muito sensível. Uma pequena alteração na temperatura pode levar a uma grande variação na viscosidade, o que torna os polímeros supramoleculares muito mais fáceis de processar do que os polímeros convencionais. Além disso, a reversibilidade derivada das interações não-covalentes confere aos polímeros supramoleculares potencial para serem recicláveis e auto-regenerativos (LIU; WANG; ZHANG, 2012). A possibilidade de resposta aos estímulos externos pode proporcionar uma variedade de aplicações potenciais em áreas que vão desde materiais inteligentes/adaptativos até energia e medicamentos ou voltados a sustentabilidade. Definitivamente, é uma área de grande interesse e desafio (HUANG; SCHERMAN, 2012).

Figura 31 - Polímeros supramoleculares sob uma nova ótica dos materiais poliméricos e comparados ao conceito macromolecular



Fonte: Adaptado de BOSMAN et al., 2003.

Em geral, os polímeros supramoleculares são divididos em duas classes, os polímeros supramoleculares de "cadeia principal" em que o esqueleto polimérico é construído a partir de monômeros de baixo peso molecular por ligação não-covalente e o polímero supramolecular de "cadeia lateral", em que o esqueleto polimérico já foi construído por ligações covalentes (ou ligações não-covalentes, ocasionalmente) e a "cadeia lateral" é construída por grupos funcionais que não são ligados covalentemente. As interações secundárias envolvidas na construção de polímeros supramoleculares incluem ligação de hidrogênio, coordenação metal-ligante, empilhamento π - π , interação iônica, interação hóspede-hospedeiro, etc. Cada uma dessas interações não-covalentes possui uma força de ligação e vantagens únicas. A maior parte dos polímeros supramoleculares emprega uma dessas interações não-covalentes, enquanto na natureza, é possível encontrar a combinação de múltiplas interações não-covalentes de maneira eficiente e que sustentam as estruturas tridimensionais e desenvolvem os processos biológicos (LI et al., 2012).

2.3 Sistemas de liberação responsivos ao pH

A forma em que os fármacos são administrados tem chamado a atenção nas últimas décadas. Em geral, o fármaco é ministrado em uma dose alta, a qual precisa ser repetida após algumas horas ou dias depois. Além de não ser um método econômico, ainda pode resultar em efeitos danosos ao organismo e é por isso que os métodos de controle de liberação, a exemplo do uso de polímeros para liberação controlada tem ganhado visibilidade nas áreas farmacêutica, alimentícia, agricultura, cosmética e em produtos de uso doméstico. A liberação de fármaco cobre uma extensa variedade de técnicas usadas para a liberação de agentes terapêuticos no corpo humano e as estruturas supramoleculares são interessantes em virtude da sua habilidade em solubilizar moléculas hidrofóbicas em água (ATWOOD; STEED, 2004).

A resposta a estímulos existe de forma onipresente na natureza. Por exemplo, os pepinos do mar encolhem seus corpos e aumentam sua rigidez imediatamente após se depararem com o perigo. As plantas carnívoras fecham suas folhas para capturar insetos quando seus pelos são estimulados. No mundo biológico microscópico, a resposta aos estímulos externos desempenha um papel essencial na manutenção de funções normais e na realização de atividades avançadas, que geralmente são acompanhadas pela transformação estrutural de sistemas auto-organizados em diferentes escalas desde o nível molecular e celular até o nível macroscópico (ZHANG; GAO, 2017).

A nível molecular, algumas biomacromoléculas fundamentais (por exemplo, proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), etc.) podem implementar funções biológicas específicas por alterações estruturais induzidas por estímulos, chamadas "transformações supramoleculares". Por exemplo, sob estímulo de algumas moléculas reguladoras (como prótons e dióxido de carbono), a hemoglobina sofre mudanças estruturais das subunidades através da regulação alostérica, onde o equilíbrio entre duas conformações quaternárias com baixa e alta afinidade com o oxigênio é deslocado (ZHANG; GAO, 2017).

A nível subcelular, as organelas são capazes de alterar suas conformações em resposta a estímulos fisiológicos, o que é crítico para alcançar funções biológicas e manter a vitalidade celular. Por exemplo, os microfilamentos podem mudar sua forma de ondulada para uma morfologia fibrosa a fim de auxiliar o movimento das células; e os complexos de Golgi podem modificar suas morfologias auto-organizadas (túbulos, vesículas, cilindros ou esferas) para executar funções, como pós-modificação e transporte de proteínas. A nível celular, as citomembranas podem alterar a curvatura interagindo com várias macromoléculas, como

polímeros sintéticos e proteínas durante os processos celulares de exocitose e endocitose, etc (ZHANG; GAO, 2017).

Inspirados nesses comportamentos biológicos de transformação responsivos a estímulos, os sistemas supramoleculares artificiais foram fabricados gerando nanoestruturas bem definidas, adaptáveis e funcionais através do controle de transformações estruturais em auto-organizados a partir de estímulos externos. Estes sistemas são geralmente baseados em materiais supramoleculares inteligentes, permitindo a incorporação de componentes, cujas estruturas mantidas por interações não-covalentes podem ser moduladas por mudanças físicas ou químicas, em resposta a variações de temperatura, pH, luz, redox e dióxido de carbono (CO₂) (ZHANG; GAO, 2017).

Entre os vários estímulos externos que controlam nanomateriais supramoleculares inteligentes, o estímulo por pH representa uma abordagem fácil e conveniente que fornece controle específico por perturbação de prótons. No processo de ajuste, os ácidos ou bases prontamente disponíveis são usualmente utilizados e o pH da solução pode ser medido quantitativamente. Em geral, as principais estratégias para a construção de materiais responsivos ao pH podem ser classificadas em duas categorias: a incorporação de grupos ionizáveis nos materiais, tais como grupos amina ou carboxílicos, ou a introdução de ligações ativas passíveis de quebra nos materiais, tais como ligações de base de Schiff e ligações de hidrazona. Após alterações de pH, espera-se que a protonação/desprotonação dos grupos ionizáveis ou a formação/decomposição das ligações covalentes tenham um efeito distinto nas interações eletrostáticas, ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e composições químicas, etc. nos auto-organizados. Como resultado, a morfologia ou funções dos nanomateriais auto-organizados podem ser controladas dinamicamente (ZHANG; GAO, 2017).

Para tanto, dentre as aplicações de materiais responsivos ao pH, destaca-se que o perfil de pH dos tecidos patológicos, como na presença de inflamação, infecção e câncer, é significativamente diferente do tecido normal. O pH em locais sistêmicos de infecções, tumores primários e tumores metastatizados é menor do que o pH do tecido normal. Por exemplo, o pH da região cai de 7,4 em condições normais até 6,5 após 60 h depois do início da reação inflamatória. Este comportamento pode ser utilizado como informação importante no preparo de sistemas responsivos a estímulos, que podem explorar as propriedades bioquímicas do local afetado (GANTA et al., 2008). Portanto, o pH é, em média, menor na massa tumoral do que em tecido normal. Uma vez que os tumores proliferam muito rapidamente, a vascularização do tumor geralmente é insuficiente para fornecer nutrientes e oxigênio necessários para a expansão da população de células tumorais. Isso resulta em diferença no ambiente metabólico entre os

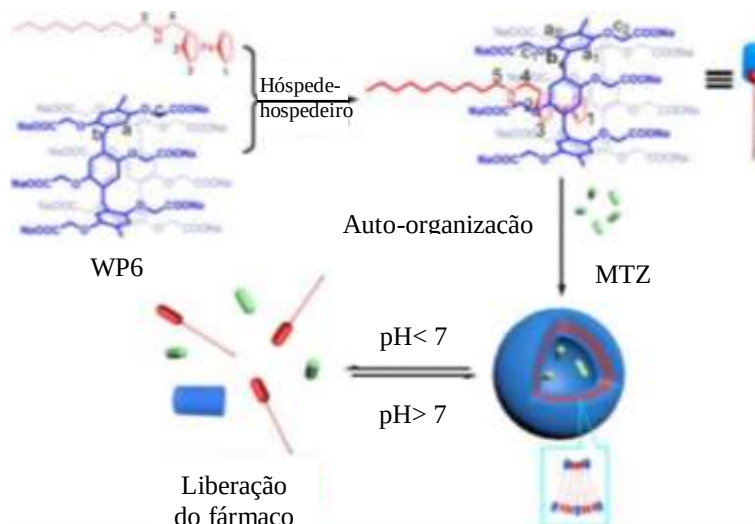
vários tumores sólidos e o tecido normal circundante. O oxigênio escasso no tumor leva à hipoxia e provoca a produção de ácido lático e hidrólise da ATP em um ambiente deficiente em energia, que contribui para um microambiente ácido, encontrado em muitos tumores. A maioria dos tumores sólidos tem pH extracelular menor ($< 6,5$) do que os tecidos circundantes (pH 7,4). O pH é compartimentado no tecido tumoral em um componente intracelular (pHi), que é similar em tecido tumoral e normal, e um componente extracelular (pHe), que é relativamente ácido nos tumores. Isso dá origem a uma diferença de gradiente de pH da membrana celular entre o tecido normal e o tecido tumoral, que pode ser explorada para a administração de medicamentos ao tumor na forma de eletrólitos fracos com o pKa apropriado (CHEN et al., 2014).

Estudos de liberação de fármacos em diferentes valores de pH utilizando materiais supramoleculares foram desenvolvidos, a exemplo do trabalho de Demuth e colaboradores (2011), que estudaram nanopartículas de sílica como sistemas de liberação de rodamina 6G, em pH 7,4 e 5,0. O grupo observou que no início, nos diferentes valores de pH, os sistemas liberam o fármaco nas três primeiras horas, seguida de uma diminuição após 40h. Além disso, em pH 5,0, houve liberação de cerca de 3,0 μg a mais de fármaco do que em pH 7,4, podendo ser atribuída a redução das interações eletrostáticas entre as moléculas de fármaco positivamente carregadas e a superfície da sílica, em pH 5,0. Já em pH 7,4, a superfície das nanopartículas é bem mais negativa, observado por estudo de potencial zeta (DEMUTH et al., 2011).

O desenvolvimento de nanopartículas supramoleculares pelo grupo de Hu (2011) a partir do polietilenoimina (PEI) com ligações cruzadas a ciclodextrina, foram estudadas pelo carregamento do fármaco doxorrubicina, usado na quimioterapia, e com DNA plasmidial e avaliados pela diferença de pH. O estudo de liberação do fármaco foi realizado em pH 7,4 (sanguíneo), 5,0 (lisossomo) e 3,0 (situação extrema), cujos dados confirmaram liberação da doxorrubicina pela dissociação do material dependente do pH, que demonstrou menor taxa de liberação no pH sanguíneo ($15 \pm 0,7\%$) e maior liberação em pH 3,0 ($52,9 \pm 1,4\%$) (HU et al., 2011).

Em outro trabalho, desenvolvido por Duan e colaboradores (2013), foi estudado um anfifílico supramolecular formado por um pilarareno solúvel e N-1-decilferrocenilmetilamina hidrofóbica em solução aquosa (Figura 32), cuja variação do pH altera a conformação do sistema. Quando o pH é ajustado para 6,0, não é possível encontrar vesículas nas imagens, demonstrando a desagregação das vesículas supramoleculares neste pH. No entanto, ao aumentar o pH para 7,0, as vesículas são reformadas (DUAN et al., 2013).

Figura 32 - Ilustração esquemática da formação das vesículas supramoleculares e a liberação de fármaco controlada pelo pH



Fonte: Adaptado de DUAN et al., 2013.

2.4 Planejamento experimental

Atualmente, é possível obter uma grande quantidade de dados nos experimentos levados a termo pelos cientistas, em virtude do avanço de técnicas e instrumentação, sendo fundamental a aplicação de ferramentas estatísticas, que visem explorar e entender esses dados e as informações originadas do sistema estudado (PEREIRA-FILHO; POPPI; ARRUDA, 2002).

À princípio, é necessário estudar quais variáveis ou fatores podem influenciar na resposta desejada. Em seguida, é preciso verificar quais variáveis influenciam o sistema e avaliar o procedimento experimental. E então, deve-se definir um planejamento para verificar o efeito dessas diferentes variáveis no resultado, dentre eles, destacam-se os planejamentos fatoriais dadas suas importâncias na compreensão do comportamento do sistema (BRUNS; SCARMINIO; BARROS-NETO, 2006; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). O planejamento fatorial é uma ferramenta interessante devido a sua simplicidade e tem sido cada vez mais usado por possibilitar a interpretação dos resultados a partir de parâmetros experimentais, além de fornecer o efeito das interações entre as variáveis estudadas (COSTA et al., 2006).

No planejamento fatorial completo, as influências de todas as variáveis experimentais e os efeitos de interação na resposta são avaliados. Se a combinação de k fatores é estudada em dois níveis, nível alto e nível baixo, o planejamento conterá 2^k experimentos. Esses níveis, quando aplicados a fatores quantitativos, são nomeados pelos sinais + (mais) e – (menos). Já para variáveis qualitativas, o cientista pode escolher os níveis desejados. O problema deste

planejamento é a grande quantidade de ensaios para cada fator estudado. Além disso, efeitos de altas ordens, como $k > 4$, são praticamente não significativos e, por isso, ensaios estudando os efeitos de interação são quase insignificantes. Decorrente disso, os planejamentos fatoriais fracionários, com 2^{k-b} , em que k é o número de variáveis e b , o tamanho da fração, promovem a redução do número de experimentos e geram as mesmas conclusões de um planejamento fatorial completo (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Dentre as vantagens do planejamento fatorial, tem-se a redução do número de ensaios sem prejuízo da informação obtida, o estudo simultâneo de diversas variáveis, a determinação da confiabilidade dos resultados, a pesquisa em etapas e a escolha das variáveis que influenciam o processo (CUNICO et al., 2008).

Por fim, nos casos em que as repetições autênticas apresentam inconvenientes, é possível incluir um experimento no centro do planejamento, um valor médio dos níveis de todas as variáveis estudadas. Este é o planejamento fatorial com ponto central (nível zero). As vantagens desse método incluem a possibilidade de avaliar a significância dos efeitos, minimizar a possível perda da relação não linear entre os intervalos, possibilidade de estimar um modelo razoável e verificar a falta de ajuste. A única requisição é que este método só pode ser aplicado ao utilizar variáveis quantitativas (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivos a obtenção e o estudo do comportamento físico-químico de supra-anfifílicos de fase liotrópica sintetizados a partir de meglumina e ácidos graxos homólogos em meio aquoso.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar supra-anfifílicos a base de meglumina tanto com o ácido esteárico como ácido oleico, aprofundando o conhecimento sobre a síntese e as características físico-químicas.
- Verificar a influência de diferentes variáveis como temperatura, quantidade de solvente e razão molar de ácido graxo em relação à meglumina na obtenção de supra-anfifílicos relacionando-as com o tipo de organização da molécula utilizando o delineamento experimental.
- Estudar a organização estrutural, capacidade de interação da água e adesividade de sistemas compostos pelos supra-anfifílicos a base de meglumina.
- Avaliar a capacidade do supra-anfifílico a base de meglumina atuar como sistema de liberação de fármaco em pele.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

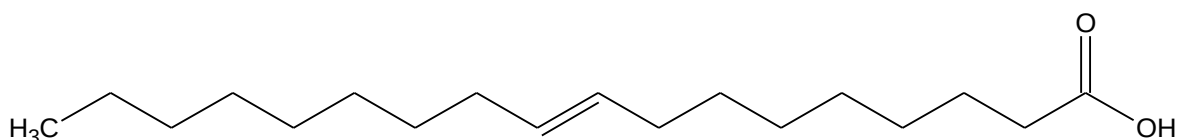
Ácido oleico, acetato de etila e metanol foram adquiridos da Synth Produtos para Laboratório Ltda. Ácido esteárico e N-metilglucamina (meglumina) foram adquiridos pela Sigma Aldrich Co. Acetato de dexametasona da Purifarma. Todos os reagentes foram usados da maneira como recebidos. A água utilizada nos experimentos foi a purificada em sistema MilliQ.

4.2 Estudos preliminares de preparação de supra-anfifílicos de ácido oleico e ácido esteárico com meglumina

4.2.1 Síntese de AOMEG

Os supra-anfifílicos usando quantidades equimolares (1:1) e de 1:2 de ácido oleico (Figura 33) para meglumina.

Figura 33 – Fórmula estrutural do ácido oleico



Fonte: Autor.

Cada 1g de meglumina, em 2,5 mL de água e o equivalente molar de ácido oleico foi solubilizado em 1,5 mL de acetato de etila. A quantidade de solvente adicionada foi a mínima necessária para a completa solubilização de cada componente. Após a solubilização, a solução contendo meglumina foi gotejada sobre a solução de ácido oleico e mantida sob agitação magnética. Posteriormente, a eliminação do solvente ocorreu por evaporação espontânea e em seguida, por fluxo de nitrogênio. Para a obtenção de supra-anfifílicos sem solvente, misturou-se os reagentes diretamente em almofariz, nas proporções descritas na Tabela 2.

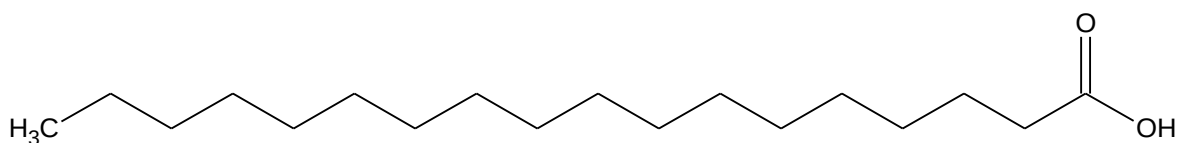
Tabela 2 - Síntese de amostras de ácido oleico (AO) e meglumina para estudos preliminares

Supra-anfifílico	Massa Reagente / g	Volume Solvente / mL
AOMEG11	1,46g AO	-
	1g meglumina	-
AOMEG11-0,5S	1,46g AO	0,75 mL acetato de etila
	1g meglumina	1,25 mL de água
AOMEG11-S	1,46g AO	1,50 mL acetato de etila
	1g meglumina	2,50 mL de água
AOMEG12	0,73g AO	-
	1g meglumina	-
AOMEG12-0,5S	0,73g AO	0,75 mL acetato de etila
	1g meglumina	1,25 mL de água
AOMEG12-S	0,73g AO	1,50 mL acetato de etila
	1g meglumina	2,50 mL de água

Fonte: Autor.

4.2.2 Síntese de AEMEG

Pesou-se e solubilizou-se 1 g meglumina em 2,5 mL de metanol a quente e ácido esteárico (Figura 34) de acordo com seu equivalente molar em 1,5 mL de acetato de etila a quente. A primeira foi gotejada sobre a solução de ácido esteárico e mantida sob agitação magnética por 2 minutos. A mistura foi congelada em freezer por 5 minutos e o excesso de solvente orgânico foi desprezado. As amostras foram mantidas sob lenta evaporação em capela de exaustão (48 h). Após esse período, as amostras foram mantidas sob fluxo de nitrogênio. A síntese dos supra-anfifílicos sem solvente foi realizada pela mistura direta dos reagentes (Tabela 3). Foram sintetizados supra-anfifílicos em proporções molares de 1:1 e 1:2 de ácido esteárico:meglumina.

Figura 34 - Fórmula estrutural do ácido esteárico

Fonte: Autor.

Tabela 3 - Síntese de amostras de ácido esteárico (AE) e meglumina para estudos preliminares

Supra-anfifílico	Massa Reagente / g	Volume Solvente / mL
AEMEG11	1,45g AE	-
	1g meglumina	-
AEMEG11-0,5S	1,45g AE	0,75 mL acetato de etila
	1g meglumina	1,25 mL de metanol
AEMEG11-S	1,45g AE	1,50 mL acetato de etila
	1g meglumina	2,50 mL de metanol
AEMEG12	0,72g AE	-
	1g meglumina	-
AEMEG12-0,5S	0,72g AE	0,75 mL acetato de etila
	1g meglumina	1,25 mL de metanol
AEMEG12-S	0,72g AE	1,50 mL acetato de etila
	1g meglumina	2,50 mL de metanol

Fonte: Autor.

4.2.3 Diagramas de fase de AOMEG e AEMEG e água

O estudo dos sistemas AOMEG/água e AEMEG/água por diagramas de fases é importante para determinar qual proporção é mais adequada para cada tipo de aplicação. A adição de água ocorreu à temperatura ambiente, seguida da homogeneização com bastão de vidro e então aqueceu-se a formulação a 65 °C por 5 minutos. As formulações preparadas estão especificadas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Composição das misturas binárias de AOMEG e água

Nome dos sistemas				Componentes / % (m/m)	
AOMEG11S	AOMEG11	AOMEG12S	AOMEG12	Água	Ácido oleico-meglumina
10%	10%	10%	10%	90	10
20%	20%	20%	20%	80	20
30%	30%	30%	30%	70	30
40%	40%	40%	40%	60	40
50%	50%	50%	50%	50	50
60%	60%	60%	60%	40	60
70%	70%	70%	70%	30	70
80%	80%	80%	80%	20	80
90%	90%	90%	90%	10	90

Fonte: Autor

Tabela 5 - Composição das misturas binárias de AEMEG e água

<i>Nome dos sistemas</i>				<i>Componentes / % (m/m)</i>	
AEMEG11S	AEMEG11	AEMEG12S	AEMEG12	Água	Ácido esteárico-meglumina
10%	10%	10%	10%	90	10
20%	20%	20%	20%	80	20
30%	30%	30%	30%	70	30
40%	40%	40%	40%	60	40
50%	50%	50%	50%	50	50
60%	60%	60%	60%	40	60
70%	70%	70%	70%	30	70
80%	80%	80%	80%	20	80
90%	90%	90%	90%	10	90

Fonte: Autor

4.2.4 Síntese dos sistemas de ácido oleico e ácido esteárico a 80 °C

Todos os sistemas formados pelos supra-anfílicos mencionados anteriormente foram avaliados quanto a organização estrutural por SAXS. Para isso, sintetizou-se formulações a 80 °C de acordo com o método empregado na síntese a 65 °C, totalizando 36 sistemas de AEMEG e 36 sistemas de AOMEG.

4.2.5 Preparação de sistemas diluídos de ácido oleico-meglumina e de ácido esteárico-meglumina equimolares em ausência de solventes orgânicos

Para avaliar o tamanho das partículas e seus respectivos potenciais zeta, sistemas diluídos de AOMEG11 e AEMEG11 (Tabela 6) foram sintetizados.

Tabela 6 - Sistemas diluídos de AOMEG11 e AEMEG11 sem solvente, dispersos em água

% de AOMEG11 (m/m)	% de AEMEG11 (m/m)
0,01491	0,01473
0,02985	0,02947
0,05973	0,05905
0,1195	0,1181
0,2393	0,2362
0,4789	0,4726
0,9573	0,9460

Fonte: Autor

O supra-anfifílico e a água foram pesados e acondicionados em banho termostático por 3 minutos, misturados com bastão de vidro, mantidos novamente no banho por mais 2 minutos e então, aguardou-se 1 semana para a estabilização das amostras antes de proceder as análises.

4.3 Delineamento experimental

Com o intuito de avaliar a influência de alguns parâmetros, foi traçado um planejamento fatorial completo, selecionando-se três variáveis, razão molar da mistura binária ácido graxo-meglumina (v1), presença de solvente (v2) e temperatura (v3) com a adição de 60 % de água, que foram testadas em três proporções molares, razão equimolar (1:1), de 1:1,5 e de 1:2 da mistura binária ácido graxo-meglumina, em presença ou ausência de solvente, bem como a metade de solvente usada para solubilizar a meglumina e o ácido graxo, pela adição de água em três níveis de temperatura, cada uma, a 65, 72 e 80 °C (Tabela 7).

Tabela 7 - Visão geral do experimento visando avaliar a influência da temperatura, solvente e razão molar nas formulações

Variáveis	Níveis		
	Baixo	Zero	Alto
Temperatura (v1)	65 °C	72 °C	80 °C
Presença de solvente (v2)	Não	Metade do nível alto	Sim
Razão molar AGMEG:água (v3)	1:1	1:1,5	1:2

Fonte: Autor

No total foram testadas 3 variáveis em 3 níveis, obtendo-se um total de $3^3 = 27$ experimentos. No entanto, não é possível efetuar cálculos com as variáveis nos níveis em escala experimental, por isso, se faz necessário codificar as variáveis, adotando-se os números -1 e +1 para os níveis baixo e alto e 0 para os valores intermediários de cada variável, que pode ser realizada a partir da Equação 1.

$$x_c = \frac{x_0 - PC}{\frac{Máximo - Mínimo}{2}} \quad (1)$$

A partir do Equação 1 apresentada, pode-se elaborar a Tabela 8 contendo a configuração das amostras que foram sintetizadas. Nessa tabela, a composição dos experimentos está representada com as codificações utilizadas nos cálculos. A razão molar foi estudada como a primeira variável (v1), em que a razão equimolar de ácido graxo em relação à meglumina foi representada pelo nível baixo (-1), 1:1,5 como nível médio (0) e 1:2 como nível alto (1). A

variável 2 (v2) se refere ao solvente, com ausência, uso de metade e aplicação de mínimo do solvente para a solubilização dos reagentes codificados em níveis baixo (-1), médio (0) e alto (1), respectivamente. A temperatura, denominada variável 3 (v3), apresenta como nível baixo (-1), médio (0) e alto (1), as temperaturas 65, 72 e 80°C.

Tabela 8 - Configuração dos 27 experimentos efetuados para avaliar os parâmetros temperatura, solvente e razão molar codificados em níveis (baixo, médio e alto) na formulação de ácido oleico e ácido esteárico com meglumina em água (60%)

Nomenclatura geral*	Razão molar AGMEG:água (v1 codificada)	Presença de solvente (v2 codificada)	Temperatura (°C) (v3 codificada)
AGMEG11-65	-1	-1	-1
AGMEG11-72	-1	-1	0
AGMEG11-80	-1	-1	1
AGMEG11-0,5S-65	-1	0	-1
AGMEG11-0,5S-72	-1	0	0
AGMEG11-0,5S-80	-1	0	1
AGMEG11S-65	-1	1	-1
AGMEG11S-72	-1	1	0
AGMEG11S-80	-1	1	1
AGMEG11,5-65	0	-1	-1
AGMEG11,5-72	0	-1	0
AGMEG11,5-80	0	-1	1
AGMEG11,5-0,5S-65	0	0	-1
AGMEG11,5-0,5S-72	0	0	0
AGMEG11,5-0,5S-80	0	0	1
AGMEG11,5S-65	0	1	-1
AGMEG11,5S-72	0	1	0
AGMEG11,5S-80	0	1	1
AGMEG12-65	1	-1	-1
AGMEG12-72	1	-1	0
AGMEG12-80	1	-1	1
AGMEG12-0,5S-65	1	0	-1
AGMEG12-0,5S-72	1	0	0
AGMEG12-0,5S-80	1	0	1
AGMEG12S-65	1	1	-1
AGMEG12S-72	1	1	0
AGMEG12S-80	1	1	1

*AG = Ácido graxo, podendo ser ácido oleico (AO) ou ácido esteárico (AE). **Fonte:** Autor.

Todas as amostras foram avaliadas quanto a respostas relacionadas a bioadesividade, pelas temperaturas *onset* de fusão obtidas por DSC e quanto a organização estrutural obtida por MLP e SAXS. Depois que os experimentos foram realizados, o próximo passo foi identificar quais variáveis eram realmente importantes. O cálculo dos efeitos é facilmente realizado em softwares como o Microsoft Excel® ou em calculadoras eletrônicas científicas e, com os experimentos descritos foi possível calcular um modelo empírico com 7 coeficientes: 3 coeficientes lineares (b_1 , b_2 , b_3), 3 coeficientes de interação de segunda ordem (b_{12} , b_{13} , b_{23}) e 1 de interação de terceira ordem (b_{123}), em que os algarismos estão relacionados às variáveis e o cálculo foi feito pela multiplicação da variável/variáveis com a resposta estudada.

Para identificar quais efeitos eram realmente importantes e quais deveriam ser desconsiderados, calculou-se a porcentagem que cada quadrado dos efeitos exerce sobre a soma dos quadrados dos mesmos (Equação 2).

$$Porcentagem = \left(\frac{Efeito_i^2}{\sum Efeito_i^2} \right) \times 100 \quad (2)$$

Então, sabendo-se quais variáveis são fundamentais, pode-se descartar as negligenciáveis, ou seja, as que apresentaram porcentagens baixas (quase nulas). Com isso, a partir da exclusão das variáveis negligenciáveis, um novo planejamento experimental foi obtido, com novos cálculos de efeitos e significância dos efeitos dessas variáveis e das interações entre elas foi verificada pela aplicação da análise de variância (ANOVA). Depois de realizar a análise do modelo, foi necessário verificar se todos os coeficientes calculados eram necessários, chegando-se a um modelo com determinados erros, os quais podem ser exibidos graficamente relacionando os coeficientes e seus erros críticos. Por fim, com o modelo proposto é possível visualizar a superfície de resposta gerada (PEREIRA-FILHO, 2015; PEREIRA-FILHO; PEREIRA; LEMOS, 2009; BREITKREITZ; SOUZA; POPPI, 2014; COSTA et al., 2006; SILVA et al., 2008).

4.3.1 Preparação de ácido oleico e meglumina (AOMEG) para delineamento fatorial

As amostras foram preparadas nas proporções molares de 1:1, 1:1,5 e de 1:2 de ácido oleico:meglumina conforme apresentado na Tabela 9. As amostras contendo solvente foram sintetizadas pela solubilização do ácido oleico em acetato de etila, enquanto a meglumina foi solubilizada em água. A solução contendo meglumina foi gotejada na solução de ácido oleico e mantida sob agitação magnética. Posteriormente, o material foi cristalizado pela evaporação espontânea dos solventes e então por fluxo de nitrogênio em placas de Petri.

Para a obtenção de supra-anfifílicos sem solvente, misturou-se os reagentes diretamente com auxílio de almofariz e pistilo.

Tabela 9 – Comparação dos supra-anfifílicos de ácido oleico e meglumina para delineamento experimental

Supra-anfifílico	Massa / g ácido oleico	Volume / mL acetato de etila	Massa / g meglumina	Volume / mL água
AOMEG11	1,46	-	1,00	-
AOMEG11-0,5S	1,46	0,75	1,00	1,25
AOMEG11-S	1,46	1,50	1,00	2,50
AOMEG11,5	1,46	-	1,50	-
AOMEG11,5-0,5S	1,46	0,75	1,50	1,25
AOMEG11,5-S	1,46	1,50	1,50	2,50
AOMEG12	0,73	-	1,00	-
AOMEG12-0,5S	0,73	0,75	1,00	1,25
AOMEG12S	0,73	1,50	1,00	2,50

Fonte: Autor.

4.3.2 Preparação de ácido oleico-meglumina com 60% de água em diferentes temperaturas

Após pelo menos 48h do preparo de AOMEG, foi realizada a preparação dos sistemas pela incorporação de 60% de água em massa às amostras AOMEG11, AOMEG11-0,5S, AOMEG11-S, AOMEG11,5, AOMEG11,5-0,5S, AOMEG11,5-S, AOMEG12, AOMEG12-0,5S e AOMEG12-S. A água foi pesada em balança analítica, adicionada a temperatura ambiente e homogeneizada com o auxílio de um bastão de vidro, seguida do aquecimento por 5 minutos, e de uma nova homogeneização. As temperaturas variaram entre 65, 72 e 80°C, no preparo de cada uma das amostras citadas, originando 27 sistemas (Tabela 10).

Tabela 10 - Sistemas formados por 40% de supra-anfifílico AOMEG com água em diferentes temperaturas

Amostra	Supra-anfifílico	Água	Temperatura / °C		
AOMEG11	40%	60%	65	72	80
AOMEG11-0,5S	40%	60%	65	72	80
AOMEG11-S	40%	60%	65	72	80
AOMEG11,5	40%	60%	65	72	80
AOMEG11,5-0,5S	40%	60%	65	72	80
AOMEG11,5-S	40%	60%	65	72	80
AOMEG12	40%	60%	65	72	80
AOMEG12-0,5S	40%	60%	65	72	80
AOMEG12S	40%	60%	65	72	80

Fonte: Autor.

4.3.3 Preparação de ácido esteárico e meglumina (AEMEG) para o delineamento experimental

Em amostras contendo solvente, solubilizou-se meglumina em metanol a quente e o equivalente molar de ácido esteárico em acetato de etila a quente. A primeira solução foi gotejada sobre a solução de ácido esteárico e mantida sob agitação magnética por 2 minutos. As misturas foram acondicionadas em placas de Petri e mantidas em capela sob exaustão por 48 horas. Após esse período, as amostras foram mantidas sob fluxo de nitrogênio por 4 horas para a máxima remoção do solvente.

A síntese dos supra-anfifílicos sem solvente foi realizada pela mistura direta dos reagentes em almofariz. As massas utilizadas e o volume dos solventes estão discriminados na Tabela 11.

Tabela 11 - Supra-anfifílicos de ácido esteárico e meglumina para delineamento experimental

Supra-anfifílico	Massa / g ácido oleico	Volume / mL acetato de etila	Massa / g meglumina	Volume / mL metanol
AEMEG11	1,45	-	1,00	-
AEMEG11-0,5S	1,45	0,75	1,00	1,25
AEMEG11-S	1,45	1,50	1,00	2,50
AEMEG11,5	1,45	-	1,50	-
AEMEG11,5-0,5S	1,45	0,75	1,50	1,25
AEMEG11,5-S	1,45	1,50	1,50	2,50
AEMEG12	0,72	-	1,00	-
AEMEG12-0,5S	0,72	0,75	1,00	1,25
AEMEG12S	0,72	1,50	1,00	2,50

Fonte: Autor.

4.3.4 Preparação de sistemas de ácido esteárico-meglumina com 60% de água em diferentes temperaturas

Após pelo menos 48h do preparo de AEMEG, sistemas foram obtidos pela incorporação de 60% de água em massa as amostras AEMEG11, AEMEG11-0,5S, AEMEG11-S, AEMEG11,5, AEMEG11,5-0,5S, AEMEG11,5-S, AEMEG12, AEMEG12-0,5S e AEMEG12-S. A água foi pesada em balança analítica, adicionada a temperatura ambiente e homogeneizada com o auxílio de um bastão de vidro, seguida do aquecimento por 3 minutos, e de uma nova homogeneização. As temperaturas variaram entre 65, 72 e 80°C, no preparo de cada uma das amostras citadas, originando 27 sistemas (Tabela 12).

Tabela 12 - Sistemas preparados com 40% de supra-anfifílico AEMEG com água em diferentes temperaturas

Amostra	Supra-anfifílico	Água	Temperatura / °C		
AEMEG11	40%	60%	65	72	80
AEMEG11-0,5S	40%	60%	65	72	80
AEMEG11-S	40%	60%	65	72	80
AEMEG11,5	40%	60%	65	72	80
AEMEG11,5-0,5S	40%	60%	65	72	80
AEMEG11,5-S	40%	60%	65	72	80
AEMEG12	40%	60%	65	72	80
AEMEG12-0,5S	40%	60%	65	72	80
AEMEG12S	40%	60%	65	72	80

Fonte: Autor.

4.4 Aplicação de sistemas supra-anfifílicos como plataforma de liberação de fármaco modelo

4.4.1 Síntese de AOMEG

Os supra-anfifílicos foram preparados em proporções molares variando de 1:1, pela mistura de 1g de meglumina a 1,45 g de ácido oléico (AOMEG11) e em 1:2 de ácido oleico:meglumina, tomando-se como base 1g de meglumina adicionada a 0,72 g de ácido oleico (AOMEG12) com auxílio de almofariz e pistilo e então armazenados em frascos plásticos.

4.4.2 Síntese de AEMEG

Foram sintetizados supra-anfifílicos de proporções molares 1:1 e 1:2 de ácido esteárico para meglumina. Pesou-se 1 g de meglumina a 1,46 g de ácido esteárico para a obtenção de

AEMEG11, e 1g de meglumina foi adicionado a 0,73 g de ácido esteárico para gerar AEMEG12, homogeneizados em almofariz com auxílio de pistilo e armazenados em frascos plásticos.

4.4.3 Obtenção de sistemas de AOMEG e AEMEG em água

Cada supra-anfifílico foi pesado em tubos Falcon e adicionado de 10 a 90% de água, com intervalos de 10% de uma amostra à outra. A adição de água ocorreu à temperatura ambiente e então os tubos foram aquecidos a 65 °C por 3 minutos, seguida da homogeneização do sistema com bastão de vidro e então retornou-se ao aquecimento por mais 5 minutos. Essas amostras foram estudadas por DSC, Bioadesão e MLP e as proporções de água e supra-anfifílicos adicionados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Sistemas em duas razões molares compostos por 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água, adicionada à 65°C

Amostra		Supra-anfifílico / %	Água / %
AOMEG11-10%	AOMEG12-10%	10	90
AEMEG11-10%	AEMEG12-10%		
AOMEG11-20%	AOMEG12-20%	20	80
AEMEG11-20%	AEMEG12-20%		
AOMEG11-30%	AOMEG12-30%	30	70
AEMEG11-30%	AEMEG12-30%		
AOMEG11-40%	AOMEG12-40%	40	60
AEMEG11-40%	AEMEG12-40%		
AOMEG11-50%	AOMEG12-50%	50	50
AEMEG11-50%	AEMEG12-50%		
AOMEG11-60%	AOMEG12-60%	60	40
AEMEG11-60%	AEMEG12-60%		
AOMEG11-70%	AOMEG12-70%	70	30
AEMEG11-70%	AEMEG12-70%		
AOMEG11-80%	AOMEG12-80%	80	20
AEMEG11-80%	AEMEG12-80%		
AOMEG11-90%	AOMEG12-90%	90	10
AEMEG11-90%	AEMEG12-90%		

Fonte: Autor.

4.4.4 Desenvolvimento de sistemas contendo 0,1% de dexametasona (DEX)

A partir dos sistemas AOMEG11, AOMEG12, AEMEG11 e AEMEG12 contendo 50% de água, foi adicionado 0,1% de dexametasona em massa a cada um dos sistemas. A 10g do sistema, adicionou-se 0,01 g de fármaco, os quais foram denominados AOMEG11F, AOMEG12F, AEMEG11F e AEMEG12F, respectivamente. A referida porcentagem de fármaco em 0,1% é utilizada comercialmente (HIDA et al., 2008; FERREIRA-FILHO; CORREIA; MASTROIANNI, 2010).

4.5 Caracterização dos supra-anfifílicos

4.5.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersividade (Pdl) das partículas

O diâmetro médio e o índice de polidispersividade das nanopartículas foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz em comprimento de onda pré-determinado, a 25°C em um ângulo de 90°. As medidas foram feitas em triplicata.

4.5.2 Determinação do potencial zeta

As análises de potencial zeta foram realizadas em Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments. A medição efetuada por este equipamento é baseada no efeito Doppler, ou seja, na alteração da frequência sofrida pela luz dispersa por uma partícula em movimento. A contagem dos fótons permite a elaboração de um espectro de frequência a partir do qual o potencial zeta das partículas pode ser calculado. As amostras diluídas em água foram analisadas em triplicata, com 5 determinações de potencial zeta para cada uma delas, calculando-se os valores médios e desvios padrões (CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2009).

4.5.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As análises de SAXS foram conduzidas na linha de luz D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas - SP, com radiação de comprimento de onda $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$. Os sistemas na forma líquida ou gel foram injetados por seringa em um porta amostra de 1 nm de espessura entre duas folhas de mica, enquanto as amostras sólidas foram acondicionadas em celas a temperatura ambiente. O tempo de exposição das amostras, para aquisição do sinal ao feixe variou de acordo com cada amostra. O espalhamento branco, espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra, foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas

para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

4.5.4 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

As amostras preparadas foram dispostas em lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio sob luz polarizada (DM 2700M, Leica).

4.5.5 Avaliação da bioadesão *in vitro* dos sistemas

A força de bioadesão entre a pele de orelha de porco e as formulações foi avaliada utilizando um analisador de textura TA-XT plus no modo *Hold until Time* (HUT), localizado no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara. Orelhas frescas foram obtidas de porcos saudáveis de 6 meses de idade de um abatedouro local e preparado para o teste como descrito por Dick e Scott (1992). As orelhas foram lavadas com água ($25 \pm 0,5$ °C), sendo que as orelhas com ferimentos foram descartadas. As peles íntegras foram removidas da cartilagem com um bisturi e uma camada de 400 µm de espessura do estrato córneo e epiderme foram separadas do tecido adiposo com um dermatômetro. As peles preparadas foram congeladas a -20 °C e armazenadas não mais do que 4 semanas.

No dia do experimento, a pele foi descongelada em solução fisiológica salina, contendo 0,9 % de NaCl (*m/V*), a $25 \pm 0,5$ °C por 30 min; então, seu pelo foi retirado com uma tesoura e atachado na extremidade inferior da prova cilíndrica (10 mm de diâmetro) com um elástico de borracha. As formulações foram colocadas abaixo da prova e imersas em um banho de água a $32 \pm 0,5$ °C. O teste foi feito abaixando a prova a uma velocidade constante (1 mm/s) até que a pele e as amostras entrassem em contato, como detectado pela força de 2 mN. A pele e a amostra foram mantidas em contato por 60 s e nenhuma força foi aplicada durante este intervalo. Após 60 s, a pele subiu (0,5 mm/s) até que o contato entre as superfícies fosse quebrado. Durante o experimento, uma curva força-tempo foi gravada; a partir do trabalho de adesão (TA) – a área sob a curva força-distância durante a fase de afastamento – e a adesão do pico (PA) foram calculadas. Triplicatas foram analisadas a $32 \pm 0,5$ °C.

4.5.6 Caracterização por Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas utilizando-se o calorímetro DSC1 STARe System da METTLER TOLEDO sob atmosfera de nitrogênio (vazão de 50 mL min⁻¹), com razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C min⁻¹. Amostras de 5,0 – 6,0 mg foram pesadas em

cadinhos de alumínio e foi utilizado um cadinho de referência de alumínio, previamente pesado. A amostra foi submetida a um resfriamento de 25°C a -80°C e, posteriormente, um aquecimento de -80°C a 160°C.

4.5.7 Termogravimetria / Termogravimetria derivada (TG/DTG)

As curvas TG / DTG foram obtidas em um módulo de análise térmica simultânea SDT-2960 do fabricante TA *Instruments*, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (vazão de 100 mL min⁻¹), com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, no intervalo de temperatura de 20 a 500°C, utilizando-se massa em torno de 10 mg. Os cadinhos para a amostra e de referência foram de alumina. O sistema foi calibrado com relação ao peso padrão TGA e temperatura, utilizando-se para tanto, padrão de Índio metálico.

4.5.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Preparo de solução tamponante fosfato pH 7,4 para liberação de dexametasona em HPLC

Dissolveu-se 1,2 g de NaH₂PO₄ em aproximadamente 900 mL de água deionizada em béquer de 1000 mL e 5% em massa de Procetyl AWS® (álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP). Tratou-se com base ou ácido forte monovalente a 25°C até atingir pH 7,4. Transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se com água.

Preparo de Tampão Acetato pH 5,0 para Liberação de dexametasona em HPLC

Dissolveu-se 0,6 g de CH₃COOH em aproximadamente 900 mL de água deionizada em béquer de 1000 mL e 5% em massa de Procetyl AWS® (álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP). Tratou-se com base ou ácido forte monovalente a 25°C até atingir pH 5,0. Transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se com água.

4.5.9 Desenvolvimento do método e sua validação da metodologia analítica para quantificação de dexametasona nos estudos de retenção *in vitro*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para a validação dos métodos analíticos foram usados parâmetros analíticos propostos por diretrizes do Comitê Internacional de Harmonização (ICH, 2005).

4.5.9.1 Condições cromatográficas

A detecção da DEX foi feita por HPLC, o equipamento utilizado foi um HPLC 1220 Infinity DAD Agilent Technologies, usando o software LC Open Lab. As condições experimentais foram: fase móvel constituída por uma mistura de metanol e acetonitrila (1:1) e água (70/30, v/v), coluna C18 (Kinetex®) dimensões 50 mm x 4,6 mm e 2,6 µm de tamanho de partícula, vazão 0,5 mL min⁻¹, volume de injeção 50 µL, detecção a 239 nm e 241 nm e temperatura do forno de 25 °C. A validação da metodologia analítica foi realizada usando os parâmetros: linearidade, precisão intra-corrida e intermediária, exatidão, especificidade / seletividade, limite de detecção e limite de quantificação, sugeridos pelos guias ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2003).

Linearidade

A construção da curva analítica foi realizada a partir de diluições da solução mãe de dexametasona 10 µg mL⁻¹, utilizando metanol como diluente. A linearidade foi obtida com o cálculo da regressão linear da curva analítica, obtendo-se a inclinação, y-intercepto e coeficiente de determinação (r²), em função da concentração de dexametasona pela área do pico referente ao fármaco. A construção de três curvas analíticas, em diferentes dias, permitiu a avaliação da linearidade.

4.5.9.2 Metodologia analítica para quantificação da dexametasona (DEX) nos estudos de liberação *in vitro*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foi construída uma curva analítica de DEX em tampão (fosfato de potássio monobásico pH 7,4 ou acetato pH 5,0), adicionado de 5 % de álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Procetyl AWS®). A partir da solução estoque de 1000 µg mL⁻¹ de dexametasona em metanol, preparou-se uma solução mãe a 100 µg mL⁻¹ em tampão fosfato. Foram preparadas diluições correspondentes às concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 µg mL⁻¹ em balões volumétricos de 5 mL, coletando-se 25 µL, 50 µL, 125 µL, 250 µL, 500 µL, 1250 µL e 2500 µL da solução mãe e completados com o tampão fosfato em triplicata. Foi preparada uma curva com 7 pontos em triplicata nos três primeiros dias. No quarto dia preparou-se 3 curvas e, no dia em que foi iniciada a liberação, fez-se uma última curva. Todas as soluções foram filtradas em membranas de acetato de celulose (Millipore®) com poros de 0,22 µm de diâmetro e analisadas por HPLC. As condições cromatográficas utilizadas são as mesmas descritas anteriormente.

4.5.10 Ensaio de liberação *in vitro*

A liberação de dexametasona das formulações AEMEG11F (pH 7,4), AEMEG12F (pH 5,0 e 7,4), AOMEG11F (pH 7,4) e AOMEG12F (pH 5,0 e 7,4) foi avaliada no equipamento automatizado de permeação cutânea (Hanson Microette HANSON 0700-1251), contendo seis células de Franz, de volume aproximado de 7 mL. A liberação do fármaco foi estudada usando-se membrana de acetato de celulose (Sigma Aldrich: D9402), com solução receptora composta por tampão fosfato (pH 7,4) ou acetato (pH 5,0), contendo 0,5% de Procetyl AWS®. Inicialmente, as membranas de acetato foram hidratadas em tampão fosfato, e então acondicionadas sob o porta amostra. As formulações foram pesadas compondo 300 mg de AEMEG11F, 300 mg de AEMEG12F, 600 mg de AOMEG11F e 400 mg de AOMEG12F, todas contendo 0,1% de dexametasona. Em seguida, as amostras foram transferidas ao copo dosador com auxílio de espátula, o qual foi disposto sob a célula de difusão de Franz.

Os experimentos foram conduzidos a 32,4°C e a solução receptora foi mantida em contato às células sob agitação a 300 RPM. Alíquotas de 2 mL foram coletadas após 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 horas, filtradas em membrana 0,45 µm e analisadas por HPLC com o intuito de avaliar a cinética de liberação do fármaco. Antes de cada coleta, 0,8 mL foi desprezado e, tanto o volume desprezado quanto o referente a coleta nos intervalos mencionados foram repostos automaticamente.

A Equação 3 (USP, 2006) foi utilizada para calcular a quantidade real liberada/permeada ($Q_{real,t}$) em determinado tempo:

$$Q_{real,t} = C_t V_r + \sum V_c C_c \quad (3)$$

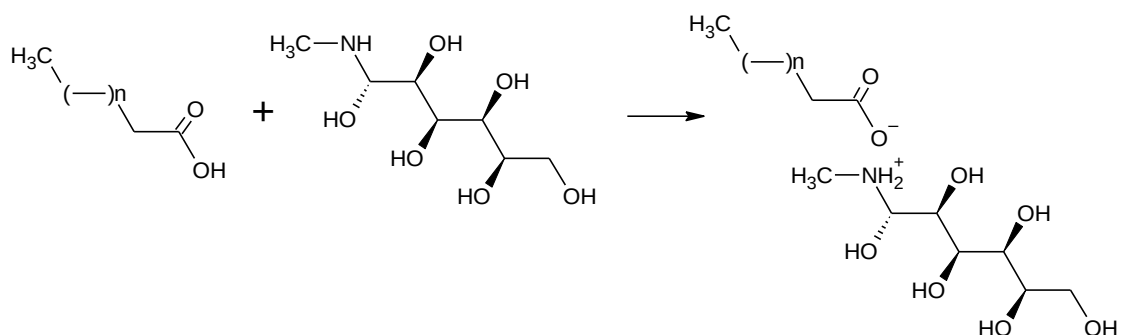
Em que, C_t = concentração obtida referente ao tempo t ; V_r = volume da solução receptora (7 mL); C_c = concentração da amostra coletada; V_c = volume da amostra coletada + limpeza.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos preliminares de preparação de supra-anfifílicos de ácido oleico e ácido esteárico com meglumina

A escolha dos ácidos graxos utilizados se embasou em estudos anteriores do grupo, cujos resultados demonstraram que sistemas formados por ácido oleico, o qual apresenta uma dupla ligação na cauda hidrofóbica, em relação ao seu homólogo ácido esteárico, possuem comportamentos diferentes em água. Além disso, ambos formam supra-anfifílicos com a meglumina, decorrente de uma reação do tipo ácido-base entre o oxigênio ácido do ácido graxo e a amina da meglumina (Figura 35).

Figura 35 - Reação ácido-base entre o grupo carboxilato-meglumina



Fonte: Autor.

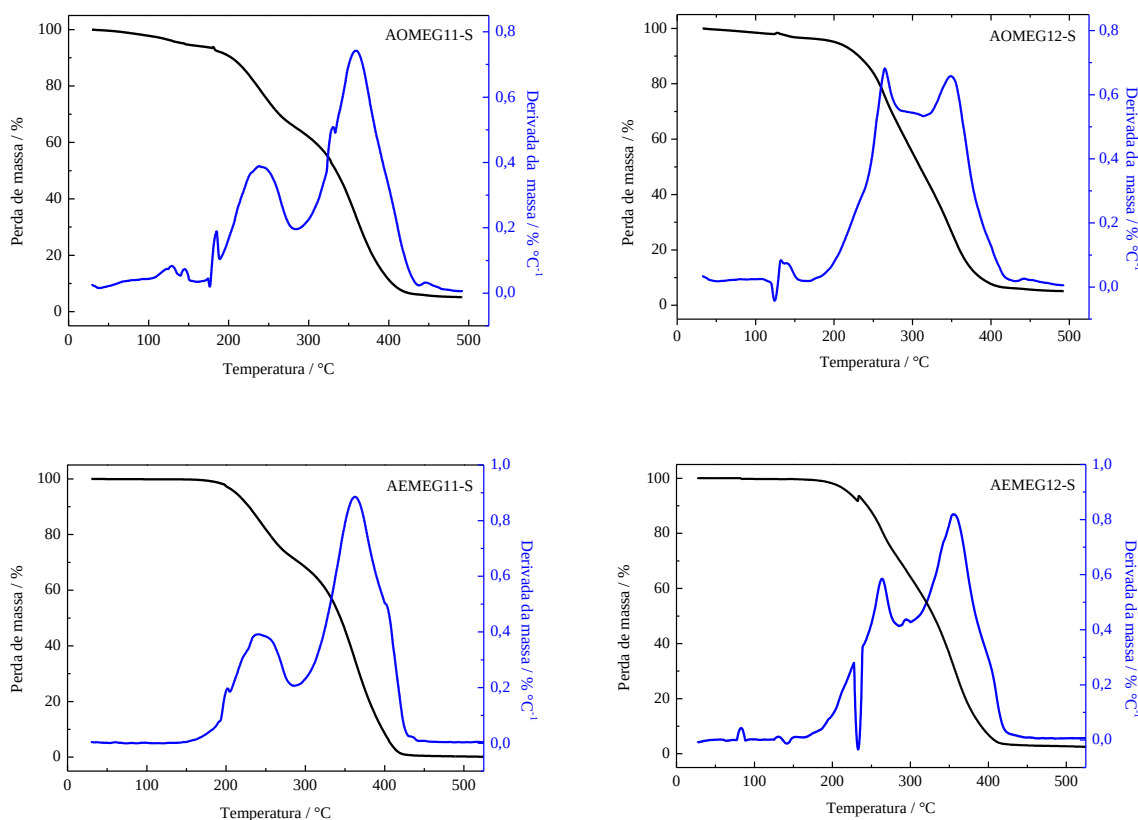
De acordo com os estudos de (CASSIMIRO et al., 2012), a interação entre o grupo carboxilato com o grupo amina da meglumina ocorrem via interação eletrostática. Supra-anfifílicos semelhantes aos obtidos neste trabalho vem sendo estudados nos últimos anos, a exemplo dos anfifílicos formados por surfactantes com extremidades carboxiladas interagindo com grupamentos amina, formando uma estrutura helicoidal (ODA et al., 1999). Em outro trabalho, foi mostrado que um copolímero composto por óxido de polietileno e polimetacrilato de sódio interagem com surfactantes catiônicos contendo grupos amina, mantidos por interações eletrostáticas (ZHANG; WANG, 2011). Por isso, neste trabalho, propõe-se a interação eletrostática entre o grupo carboxila dos ácidos graxos com o grupo amina da meglumina, compondo o supra-anfifílico.

Inicialmente, como não haviam informações sobre as propriedades físico-químicas dos sistemas ácido graxo-meglumina-água, propôs-se estudar o comportamento dos dois ácidos

graxos utilizando solvente para facilitar a reação entre eles e a meglumina. Para isso, adicionou-se a menor quantidade de acetato de etila (1,5 mL) que fosse suficiente para solubilizar o ácido graxo (1,45g) e o menor volume de metanol (2,5 mL) ou água (2,5 mL) para solubilizar a meglumina (1g). Além disso, a mistura de meglumina em metanol foi aquecida para auxiliar a solubilização. Assim, obteve-se os supra-anfifílicos de ácido oleico, AOMEG11-S e AOMEG12-S e de ácido esteárico, AEMEG11-S e AEMEG12-S. Com o intuito de verificar a possibilidade de sintetizar os mesmos supra-anfifílicos sem o uso de solventes, cada ácido graxo e meglumina nas duas proporções molares foram homogeneizados em sua ausência, gerando AOMEG11, AOMEG12, AEMEG11 e AEMEG12.

A fim de investigar se a metodologia de remoção dos solventes adicionados aos supra-anfifílicos foi adequada, curvas TG foram obtidas para todas as amostras que foram sintetizadas com solvente. De acordo com os resultados da Figura 36, praticamente todas as amostras não apresentarem evento abaixo de 100°C, por isso, todo o solvente foi removido ou parte está interagindo com o supra-anfifílico, com exceção de AEMEG12-S. De todo modo, deu-se continuidade com os procedimentos posteriores.

Figura 36 - Curvas TG dos supra-anfifílicos AOMEG e AEMEG em presença de solvente

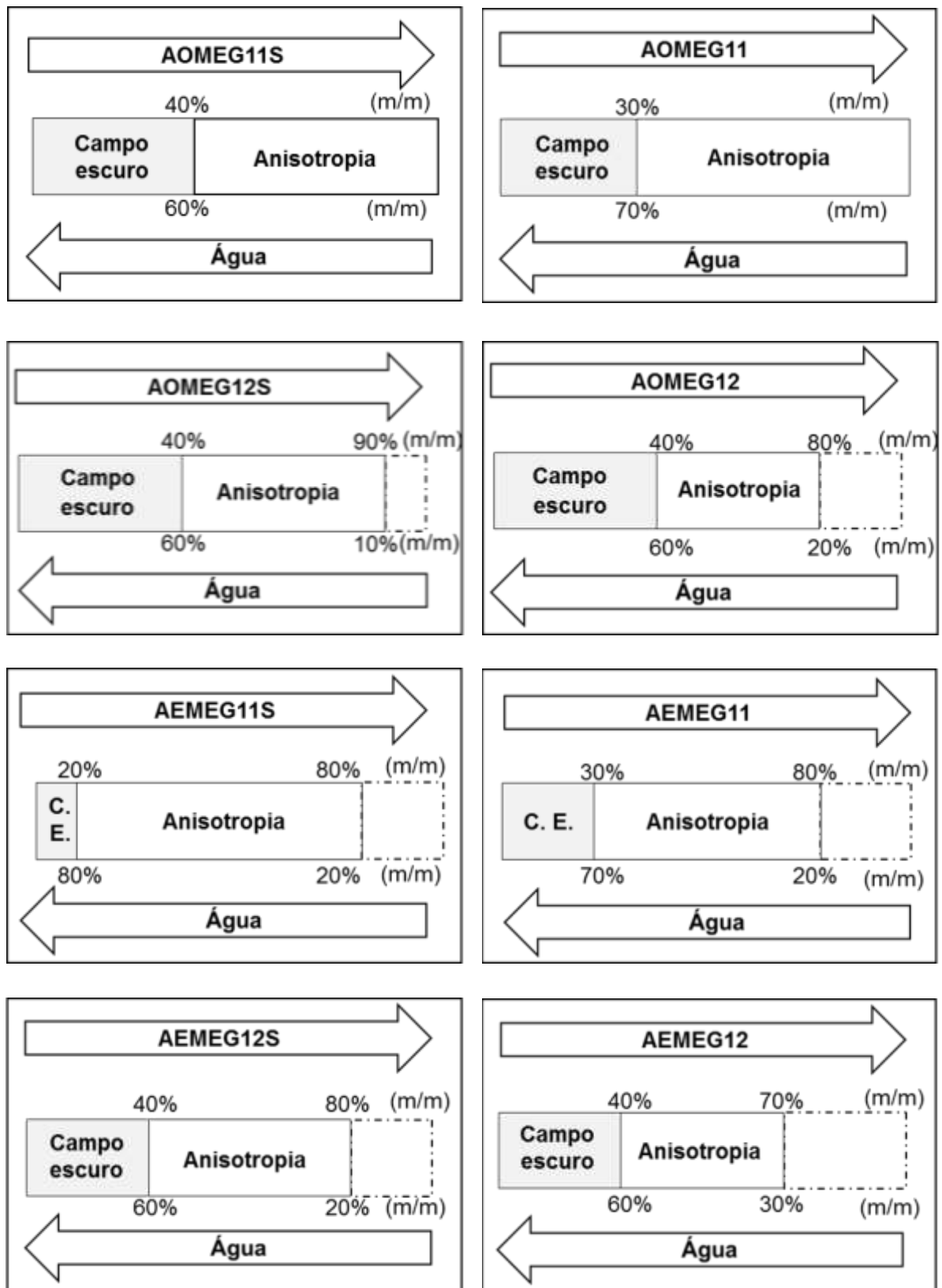


Fonte: Autor.

Posteriormente, os supra-anfifílicos AEMEG e AOMEG, com e sem solvente, nas proporções equimolares (1:1) e de 1:2 de ácido graxo-meglumina, constituíram sistemas pela adição de 10 a 90% de água, com intervalos de 10%, em banho termostático a 65°C, para facilitar a homogeneização da água incorporada, tomando-se cuidado para que a temperatura fosse abaixo da degradação do sistema (acima de 100°C).

Após a estabilização dos sistemas, por no mínimo 48h, verificou-se por microscopia ótica de luz polarizada a anisotropia ou isotropia dos sistemas, partindo-se do pressuposto de que se as amostras apresentassem estrutura líquido cristalina, elas poderiam ser estudadas como sistemas de liberação (FORMARIZ et al., 2005), que é um dos objetivos deste trabalho. Cristais líquidos compõem uma fase intermediária entre sólidos e líquidos, e, devido a mistura de diferentes porções do supra-anfifílico em relação a água, espera-se a formação de cristais líquidos liotrópicos, ou seja, constituídos pela adição de solventes (FORMARIZ et al., 2005). De acordo com os resultados (Figura 37), em concentrações acima de 70% de água nas amostras de ácido oleico e, portanto, em amostras contendo 30% ou menos de AOMEG, observa-se campo escuro em luz polarizada. Por isso, presume-se que essas formulações se organizam na forma de micelas, visto que são sistemas opticamente transparentes, de baixa viscosidade e isotrópicos. O mesmo resultado é obtido para as amostras AEMEG11S-10%, AEMEG12S-30% e AEMEG12-30% ou mais diluídas e AEMEG11-20% e AEMEG11-10%. Ao aumentar a quantidade de supra-anfifílico em relação a água, é possível que as micelas comecem a se organizar, podendo formar mesofases líquido-cristalinas, organizando-se na forma hexagonal, lamelar ou cúbica (FORMARIZ et al., 2005).

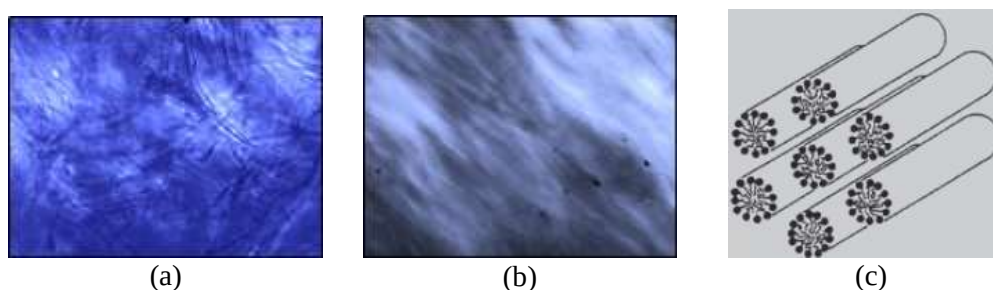
Figura 37 - Ilustração dos sistemas binários de AOMEG e AEMEG em diferentes proporções de água, 10 a 90%, estudados por microscopia de luz polarizada



Fonte: Autor.

Os sistemas de ácido oleico e ácido esteárico apresentaram anisotropia em determinadas misturas binárias, possivelmente se organizando na forma hexagonal, representada por estrias (Figura 38). Nesta fase, o material apresenta alta viscosidade, transparência e aparência de um gel (HYDE, 2001).

Figura 38 - (a) Fotomicrografia de AOMEG11S-50% (b) AEMEG11S-50% exemplificando os sistemas anisotrópicos apresentando estrias. (c) Representação de cristais líquidos de forma hexagonal



Fonte: Autor e adaptado de FORMARIZ et al., 2005.

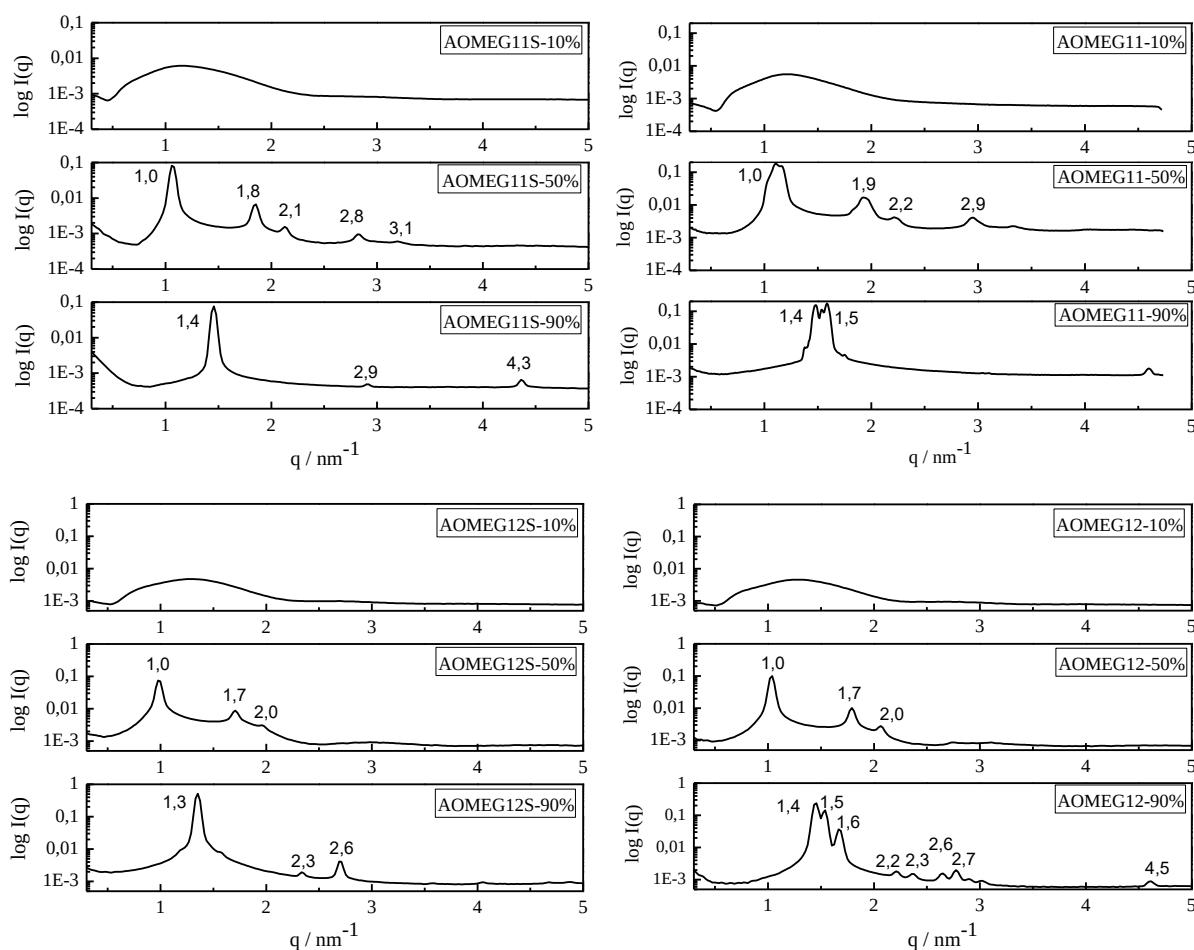
Para as formulações de AOMEG11S e AOMEG11, observa-se estrias nas amostras contendo a partir de 40 e 30% de supra-anfifílico, respectivamente. Para AOMEG12S e AOMEG12, as estrias são encontradas entre 40-90% e de 40-80% de supra-anfifílico, respectivamente. As amostras com o dobro de meglumina e baixa concentração de água, a exemplo de AOMEG12-90%, apresentam anisotropia, no entanto, também é possível observar cristais de meglumina dispersos nos sistemas. O mesmo é observado para o ácido esteárico, o qual apresenta estrias nas formulações de AEMEG11S-20% a 80%, AEMEG11-30% a 80%, AEMEG12S-40% a 80% e de AEMEG12-40% a 70% de supra-anfifílicos.

Como os ácidos graxos estudados apresentam uma cadeia carbônica, com cabeça polar e cauda apolar, com a adição de água, é provável que as caudas apolares se voltem para o meio interno de modo a obter um estado em que a cauda fique o mais afastado das moléculas de água, compondo micelas. Conforme a quantidade de água aumenta, é possível que as estruturas se alonguem, promovendo o empacotamento dos sistemas em fase hexagonal. Nesta fase, os agregados se arranjam na forma de longos cilindros, formando estruturas bidimensionais (Figura 38c) (FORMARIZ et al., 2005). No entanto, quando a quantidade de água é grande, é possível que a estruturação se perca, formando micelas normais. Portanto, para confirmar o tipo de organização das mesofases, deve-se estudá-los por Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

O uso do SAXS é interessante por permitir a avaliação dos tipos de organização a nível microscópico, os quais podem ser identificados por razões entre picos no eixo vetor de espalhamento q , cujas razões de picos em $q_1:q_2:q_3 = 1:\sqrt{3}:2$ representam a forma hexagonal, enquanto a forma lamelar apresenta picos localizados em posições periódicas com relação entre eles igual a $q_1:q_2:q_3:q_4 = 1:2:3:4$ (HOLMQVIST; ALEXANDRIDIS; LINDMAN, 1997).

A seguir estão apresentados os perfis de SAXS para AOMEG11, AOMEG11S, AOMEG12 e AOMEG12S contendo de 10, 50 e 90% de supra-anfifílico em água (Figura 39), com a intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q) e os resultados obtidos por SAXS para todas as amostras AOMEG (Tabela 14), a fim de confirmar a organização estrutural dos sistemas.

Figura 39 - Perfis de SAXS para AOMEG11S, AOMEG11, AOMEG12S e AOMEG12 contendo 10%, 50% e 90% de supra-anfifílico em água



Fonte: Autor.

O parâmetro de rede α (Equação 4) representa a distância do centro de um cilindro em relação a outro, incluindo o diâmetro total do cilindro e a espessura da camada de água (WANG

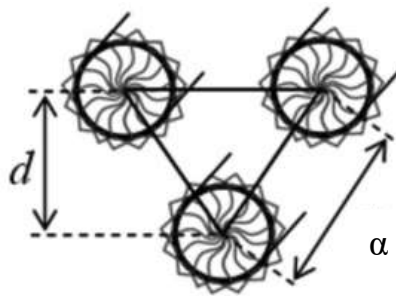
et al., 2006) (Figura 40), bem como a distância entre planos que passam por dois cilindros adjacentes d (Equação 5) (DE CAMPOS et al., 2012) foram calculados para as amostras que apresentaram estrutura hexagonal (Tabela 14).

$$\alpha = \frac{\frac{4\pi}{\sqrt{3}}}{q_{100}} \quad (4)$$

Em que q_{100} = primeiro pico de difração

$$d = \frac{\sqrt{3}}{2} \alpha \quad (5)$$

Figura 40 - Representação esquemática do parâmetro α



Fonte: Adaptado de CAMPOS et al., 2012.

Tabela 14 - Resultados obtidos por SAXS para sistemas de 10 a 90% de ácido oleico-meglumina contendo água

Sistema	AOMEG11S				AOMEG11			
	Razão q_1/q_n	Estrutura	$d/\text{\AA}$	$\alpha/\text{\AA}$	Razão q_1/q_n	Estrutura	$d/\text{\AA}$	$\alpha/\text{\AA}$
10%	-	Isotrópico	-	-	-	Isotrópico	-	-
20%	-	Isotrópico	-	-	$1:\sqrt{3}:2:2,5:4$	Hexagonal	8,5	9,8
30%	$1:1,8:2,1$	Hexagonal	8,1	9,3	$1:\sqrt{3}:2,1$	Hexagonal	7,5	8,6
40%	$1:1,7:2$	Hexagonal	6,7	7,7	$1:1,8:2,1:2,8:3,2$	Hexagonal	5,9	6,8
50%	$1:1,8:2,1:1,8:3,1$	Hexagonal	5,9	6,8	$1:\sqrt{3}:2:\sqrt{7}:3$	Hexagonal	5,6	6,4
60%	$1:1,8:2,8$	Hexagonal	5,4	6,2	$1:\sqrt{3}:2:2,7:3,6:3,7$	Hexagonal	4,9	5,7
70%	$1:1,7:2:2,5:3,1$	Hexagonal	5,0	5,7	$1:1,8:2,1:2,8:3,1:3,6:3,8$	Hexagonal	4,9	5,7
80%	$1:1,1:1,3:1,8:2:2,4:2,7:3,7$	Hexagonal*	5,4	6,2	$1:1,2:1,6:2:\sqrt{7}:3$	Hexagonal	4,6	-
90%	$1:2:3$	Lamelar	4,3	-	$1:3:2$	Estruturado	-	-
Sistema	AOMEG12S				AOMEG12			
	Razão q_1/q_n	Estrutura	$d/\text{\AA}$	$\alpha/\text{\AA}$	Razão q_1/q_n	Estrutura	$d/\text{\AA}$	$\alpha/\text{\AA}$
10%	-	Isotrópico	-	-	-	Isotrópico	-	-
20%	-	Isotrópico	-	-	$1:1,6$	Isotrópico	-	-
30%	$1:\sqrt{3}$	Hexagonal	7,9	9,1	$1:1,6$	Isotrópico	-	-
40%	$1:1,8:3,7$	Estruturado	-	-	$1:1,6:2$	Hexagonal	6,9	8,0
50%	$1:\sqrt{3}:1,9:3$	Hexagonal	6,4	7,4	$1:\sqrt{3}:2:2,7$	Hexagonal	6,0	7,0
60%	$1:1,8:2,1:2,8$	Hexagonal	5,8	6,7	$1:\sqrt{3}:2:2,7$	Hexagonal	5,6	6,4
70%	$1:1,8:2,8$	Hexagonal	5,4	6,2	$1:\sqrt{3}:\sqrt{7}$	Hexagonal	5,1	5,9
80%	$1:\sqrt{3}:2:2,7$	Hexagonal	5,0	5,8	$1:2:2,7:3:3,6:3,7$	Lamelar*	4,6	-
90%	$1:\sqrt{3}:2$	Hexagonal	4,7	5,3	$1:1,1:1,5:1,6:1,8:1,9$	Estruturado	-	-

¹Há mais de um tipo de estrutura. **Fonte:** Autor.

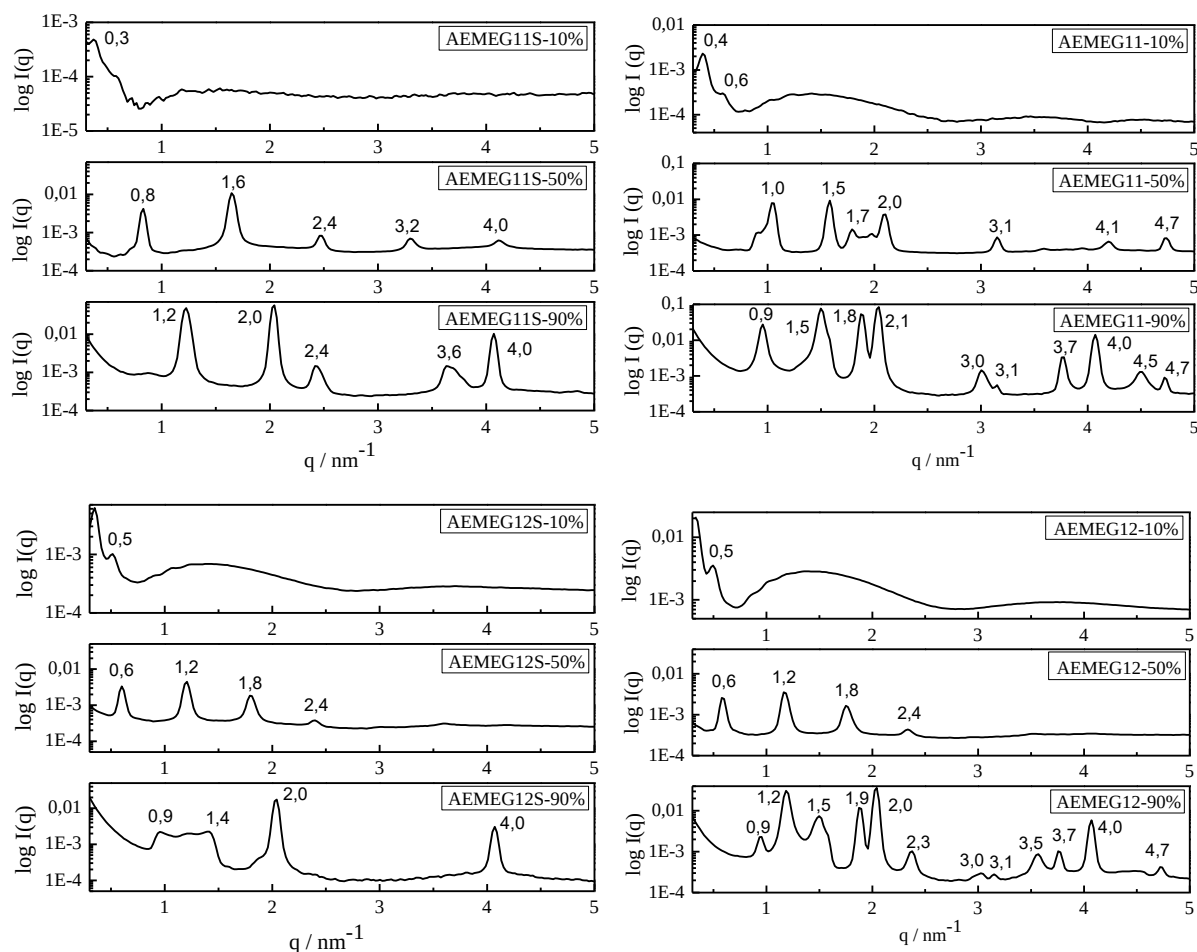
Todas as amostras contendo 10% de supra-anfifílico, além de AOMEG11S-20%, AOMEG12S-20% e AOMEG12-20% e 30% apresentaram um pico largo, seguido por uma cauda, o que é característico de amorfas, a exemplo de estruturas micelares (FANUN, 2008). Para os sistemas AOMEG11S e AOMEG12S, ambos contendo solvente, acredita-se que ocorra formação de estruturas hexagonais a partir de 30% de supra-anfifílico em relação a água (Figura 42). Para AOMEG11S, a partir de 80% de supra-anfifílico, além de apresentar estrutura hexagonal, também indica outro tipo de estrutura, mas que não foi encontrada nenhuma relação entre os picos. Já o sistema AOMEG11S-90%, com pouco conteúdo de água, apresenta-se na fase lamelar. AOMEG12S também apresenta uma exceção com 40% de supra-anfifílico, a qual apresenta um tipo de estruturação, mas diferente de hexagonal ou lamelar, que são mais comuns a esses tipos de sistemas.

Os resultados dos parâmetros de rede α indicam que, quanto maior a proporção de supra-anfifílico no sistema, maior a aproximação dos cilindros, indicando uma compactação do

sistema. Este resultado indica que o aumento da concentração de água leva ao intumescimento do sistema, resultado semelhante ao obtido por (DE CAMPOS et al., 2012), que estudou um tensoativo não iônico nonilfenol etoxilado em água.

A seguir estão apresentados os dados de SAXS para os supra-anfifílicos de ácido esteárico (Figura 41 e Tabela 15).

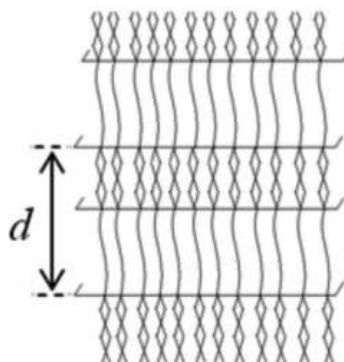
Figura 41 - Perfis de SAXS para AEMEG11S, AEMEG11, AEMEG12S e AEMEG12 contendo 10%, 50% e 90% de supra-anfifílico em água



Fonte: Autor.

O parâmetro espacial d (Figura 42), representa a distância entre duas lamelas adjacentes e foi calculado a partir do primeiro pico de difração (q_1), de acordo com a Equação 6:

$$d = \frac{2\pi}{q_1} \quad (6)$$

Figura 42 - Representação esquemática da estrutura lamelar com o parâmetro espacial d 

Fonte: Adaptado de CAMPOS et al., 2012.

Tabela 15 - Resultados obtidos por SAXS para sistemas de 10 a 90% de ácido esteárico-meglumina em água

Sistema	AEMEG11S			AEMEG11		
	Razão q_1/q_n	Estrutura	$d/\text{\AA}$	Razão q_1/q_n	Estrutura	$d/\text{\AA}$
10%	-	Isotrópico	-	1:1,4:2,6:3:3,5:3,9:4,5:8,5: 11,1	Estruturado	-
20%	1:3:4:5:6:7	Lamelar	19	1:2:3,1:4,2:5,2:6,3:7,2	Lamelar	19
30%	1: $\sqrt{3}$: $\sqrt{7}$	Lamelar	5,3	1:2,1:3,1:4,1:5,1:6,2:7,1:8,1	Lamelar	12
40%	1:1,9:2,1:4,9:5,8	Estruturado	-	1:2:3:4:5:6:7	Lamelar	9,5
50%	1:2:3:4:5	Lamelar	7,6	1:1,3:1,4:2,2:2,6:2,7:3:4,4:5	Lamelar*	5,9
60%	1:1,2:2,4:3,7:5	Lamelar	6,3	1:1,3:2,4:2,6:4:5,3	Lamelar	5,9
70%	1:1,3:2,7:4:5,3	Lamelar	5,4	1:1,5:3:4,5	Lamelar	5,2
80%	1:1,4:2:2,2:9:4,3:4,5	Lamelar*	4,8	1:1,3:1,5:1,6:2:2,2:2,5:2,7:3,2	Lamelar*	5,0
90%	1:1,4:2,3:2,7:4:4,5:5,4	Lamelar*	5,1	1:1,5:2:2,1:3,1:3,2:3,9:4,2:4,7	Lamelar*	6,6
Sistema	AEMEG12S			AEMEG12		
	Razão q_1/q_n	Estrutura	d	Razão q_1/q_n	Estrutura	d
10%	1:1,5:4,1:10,6	Estruturado	-	1:2,8:7,5	Estruturado	-
20%	1:1,9:3,2:4,2:5,3:6,4	Lamelar	20	1:2:3,1:4,1:5,1:6,1:7,1:14	Lamelar	22
30%	1:2:3:4:5,3:6,4	Lamelar	15	1:2,1:3,1:4,1:5,1:6,1:10	Lamelar	17
40%	1,6:2,4:3,2:4:6,4	Lamelar	6,8	1:1,9:2,9:3,8:4,7:5,8:6,7:7,6	Lamelar	11
50%	1:2:3:4:5,1:6,1:7,1	Lamelar	10	1:2:3:4:6,2:7	Lamelar	10
60%	1:2:3:4,1:5,1:6,1	Lamelar	8,6	1:2:3:4:5,1:6,1	Lamelar	8,7
70%	1:1,5:2,2,4,2,9:4,4,8	Lamelar*	7,4	1:2:4:5	Lamelar	6,9
80%	1:1,4:2:2,8:5,5	Lamelar*	8,4	1:1,3:2,3:2,6:3,9:4,6	Lamelar*	5,4
90%	1:1,3:1,4:2,1:4,2	Lamelar*	6,6	1,2:1,6:2:2,2:2,5:3,2:3,4:3,8	Lamelar*	6,6

*Lamelar e outro tipo de estrutura. **Fonte:** Autor.

Os sistemas AEMEG apresentam, a partir de 20% de formulação, organização lamelar com razões de picos periódicas com $q_1:q_2:q_3 = 1,2,3$. O sistema AEMEG11S-40% apresentou um tipo de estruturação, mas não foi determinada a razão entre os picos, diferente de lamelar ou hexagonal. Além disso, todas as amostras contendo acima de 80% de supra-anfifílico apresentaram, além da organização lamelar, algum outro tipo de estruturação, visto que não foi possível determinar todas as razões entre os picos. Zhu e colaboradores obtiveram resultados semelhantes estudando o sistema composto por ácido esteárico e trietanolamina em água sintetizados a 80°C, na forma de cristal líquido lamelar (ZHU et al., 2007).

Com relação ao parâmetro espacial d , o aumento da quantidade de supra-anfifílico leva a diminuição da distância entre lamelas. Esse resultado indica que a adição de grandes quantidades de água proporciona um maior intumescimento dos sistemas, resultado semelhante aos sistemas formados por ácido oleico. No caso de AEMEG11, comparando os sistemas contendo 30 e 50% de supra-anfifílico, ocorre um aumento do parâmetro, provavelmente porque o sistema contendo 40% de supra-anfifílico representa uma fase de transição de mudança de estrutura. Além disso, é importante ressaltar que o sistema AEMEG12-S apresenta uma diminuição do parâmetro d até 50% de supra-anfifílico, seguida do aumento da distância interlamelar.

5.1.1 Tamanho da partícula, polidispersividade e potencial zeta

Os sistemas diluídos de ácido esteárico e de ácido oléico foram estudados com relação ao tamanho da partícula, polidispersividade e carga de superfície. Essas análises são realizadas em sistemas dispersos, ou seja, de material em água. A proposta dessas medidas foi verificar se era possível compreender como ocorria o início da organização microestrutural dos sistemas em água, mas essas medidas não foram suficientes para inferir isso.

O estudo da polidispersividade demonstra a homogeneidade dos sistemas, ou seja, compara a semelhança dos tamanhos das partículas dispersas. Neste caso, quanto maior o índice de polidispersividade, menos homogêneo o sistema. Além disso, o equipamento apresenta uma limitação de medição ao índice de polidispersividade de 1000 e é por isso que sistemas mais concentrados não podem ser estudados. Já os resultados de potencial zeta são interessantes quando abrangem valores de carga próximo de ± 30 mV, indicando estabilidade em solução.

Para o ácido esteárico (Tabela 16), todos os sistemas estudados, mesmo os mais diluídos apresentaram a formação de partículas na escala de micrometros, mas não houve regularidade no aumento do tamanho com o aumento da concentração de supra-anfifílicos das soluções.

Além disso, de acordo com o índice de polidispersividade, foi possível observar que a maior parte dos sistemas mais diluídos são homogêneos, com exceção de AE 0,25925%. As medidas de potencial zeta apresentaram uma diminuição da carga do sistema contendo 0,0147% a 0,2362% de ácido esteárico, ou seja, o sistema apresentou tendência em ficar mais negativo. As duas amostras posteriores e mais concentradas, no entanto, foram negativas, mas a tendência de apresentarem-se ainda menos negativas do que os sistemas mais diluídos não ocorreu, provavelmente por serem amostras mais viscosas, dificultando a leitura delas pelo equipamento.

Tabela 16 - Medidas de tamanho, índice de polidispersividade (PdI) e potencial zeta e respectivos desvios padrão (DP) dos sistemas de ácido esteárico diluídos

Amostra	Tamanho / nm	DP tam.	PdI	DP PdI	Potencial zeta / mV	DP potencial zeta
AE 0,01473	6636	2835	0,836	0,284	-55,8	1,11
AE 0,02592	4042	226,1	1000	~	-67,3	2,78
AE 0,05905	5566	1335	0,848	0,159	-76,4	3,96
AE 0,1181	9044	379,8	0,759	0,089	-86,4	3,77
AE 0,2362	~*	~*	~*	~*	-81,6	7,71
AE 0,4726	6931	1010	1000	~*	-24,1	2,99
AE 0,9460	4216	305,6	1000	~*	-11,3	1,79

*A leitura não foi possível. **Fonte:** Autor.

Os resultados para os sistemas de ácido oléico (Tabela 17) demonstraram a formação de nanopartículas em todos os sistemas, mas não houve uma linearidade no aumento do tamanho das partículas com o aumento da concentração do supra-anfifílico. O índice de polidispersividade apresentou-se crescente, ou seja, quanto mais supra-anfifílico incorporado no sistema, maior a diferença de tamanho, já que as partículas aumentam com o aumento da quantidade de tensoativo. Isto aponta para a possibilidade de desenvolver partículas com tamanho dependente da concentração. Os resultados de potencial zeta apresentaram tendência em diminuir a carga, pois quanto maior a quantidade de tensoativo, mais carga negativa exposta para fora do sistema, tornando o potencial zeta mais negativo.

Tabela 17 - Medidas de tamanho, índice de polidispersividade (PdI) e potencial zeta e os respectivos desvios padrões (DP) dos sistemas de ácido oléico diluídos

Amostra	Tamanho / nm	DP tam.	PdI	DP PdI	Potencial zeta / mV	DP potencial zeta
AO 0,01491	204	4,01	0,247	0,016	-41,3	3,45
AO 0,02985	162,9	0,9504	0,247	0,01	-50,7	3,44
AO 0,05973	188,2	2,023	0,27	0,023	-42,3	2,1
AO 0,1195	118,5	7,163	0,347	0,017	-51,1	1,5
AO 0,2393	111,4	1,815	0,332	0,016	-61,4	1,35
AO 0,4789	129,5	1,582	0,459	0,029	-85,7	0,6
AO 0,9543	300,4	25,02	0,425	0,013	-83,9	5,25

Fonte: Autor

Comparando-se o ácido oléico com o ácido esteárico, conclui-se que, enquanto os sistemas de ácido esteárico formam micropartículas, os de ácido oléico formam partículas ainda menores, em escala nanométrica. Esta diferença pode ser explicada pela presença de uma torção na cadeia do ácido oleico, diminuindo as interações entre cadeias e, conseqüentemente, o tamanho da partícula formada. Por outro lado, os sistemas de ácido esteárico podem se empacotar lateralmente, formando partículas maiores. Quanto aos resultados de índice de polidispersividade, para o ácido oléico os índices foram menores, ou seja, a homogeneidade dos sistemas foram melhores do que para os sistemas de ácido esteárico, também possível por conta do empacotamento do ácido oléico. Com relação aos resultados de potencial zeta, no ácido esteárico, o potencial zeta inicia menor que do ácido oléico, mas com o aumento da concentração de supra-anfifílico, os potenciais zeta se equiparam em aproximadamente – 80 mV em ambos os ácidos graxos estudados.

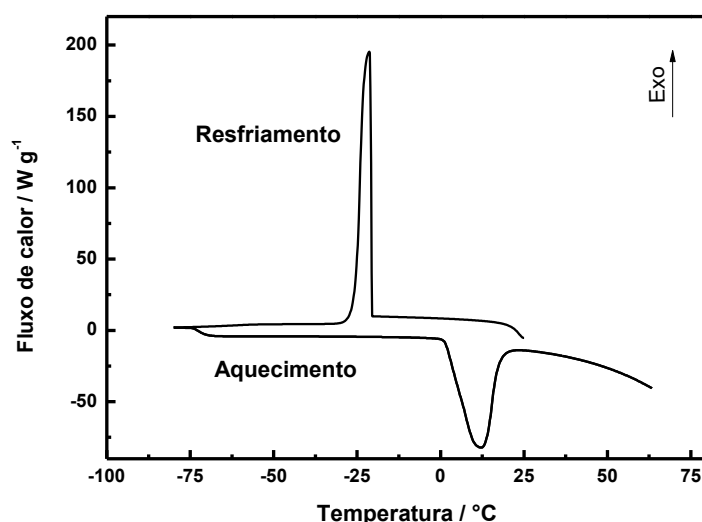
5.2 Planejamento experimental

De acordo com os resultados obtidos por MLP, todos os sistemas a partir de 40% apresentam anisotropia, ou seja, comportam-se como cristais líquidos, com viscosidade alta e ordenação estrutural. Pelo SAXS, mesmo com amostras sintetizadas a 80°C, estas informações foram confirmadas, indicando uma organização já a partir de 20%, na maior parte dos sistemas de ácido esteárico e contendo pelo menos 40% de ácido oleico. Por essa razão, foi traçado um planejamento fatorial completo, selecionando-se três variáveis, temperatura (v1), presença de solvente (v2) e razão molar da mistura binária ácido graxo-meglumina:água (v3) testadas em

três níveis, cada uma, a temperatura em 65 ,72 e 80 °C, a presença ou ausência de solvente, além da adição parcial de solvente e a razão equimolar, de 1:1,5 e de 1:2 da mistura binária, ou seja, adição do dobro de meglumina. No total, compondo 27 experimentos para cada ácido graxo, seguida da adição de 60% de água, visto que de acordo com os resultados de MLP, há estruturação dos sistemas contendo pelo menos 40% de supra-anfifílico. Os sistemas foram avaliados por DSC, MLP e Bioadesão, de modo a selecionar amostras que apresentassem características apropriadas para sistemas de liberação.

As curvas DSC de resfriamento e aquecimento para sistemas de AOMEG (Figura 47) e AEMEG (Figura 48) estão apresentadas de acordo com a variação da quantidade de solvente adicionada e, para facilitar a comparação, foram agrupadas de acordo com a mesma proporção molar e temperatura de síntese. Além disso, com o objetivo de verificar as interações do supra-anfifílico com a água nos sistemas, foi obtida uma curva de resfriamento e uma de aquecimento da água destilada pura (Figura 43). Em geral, a água livre apresenta temperatura de cristalização (T_c) abaixo de 0°C, devido ao efeito de supercongelamento, efeito influenciado pela razão de resfriamento. Quando aquecemos este sistema, a água apresenta temperatura *onset* de fusão em 0°C. Já a água ligada congelável apresenta T_c e T_f abaixo da T_c da água livre, devido às interações entre o supra-anfifílico e a água, além de apresentar um pico alargado quando comparado ao pico simétrico da água livre. Por fim, a água ligada não congelável não apresenta nenhum pico quando analisado por DSC (TANAKA, 2013).

Figura 43 - Curvas de resfriamento e aquecimento da água destilada

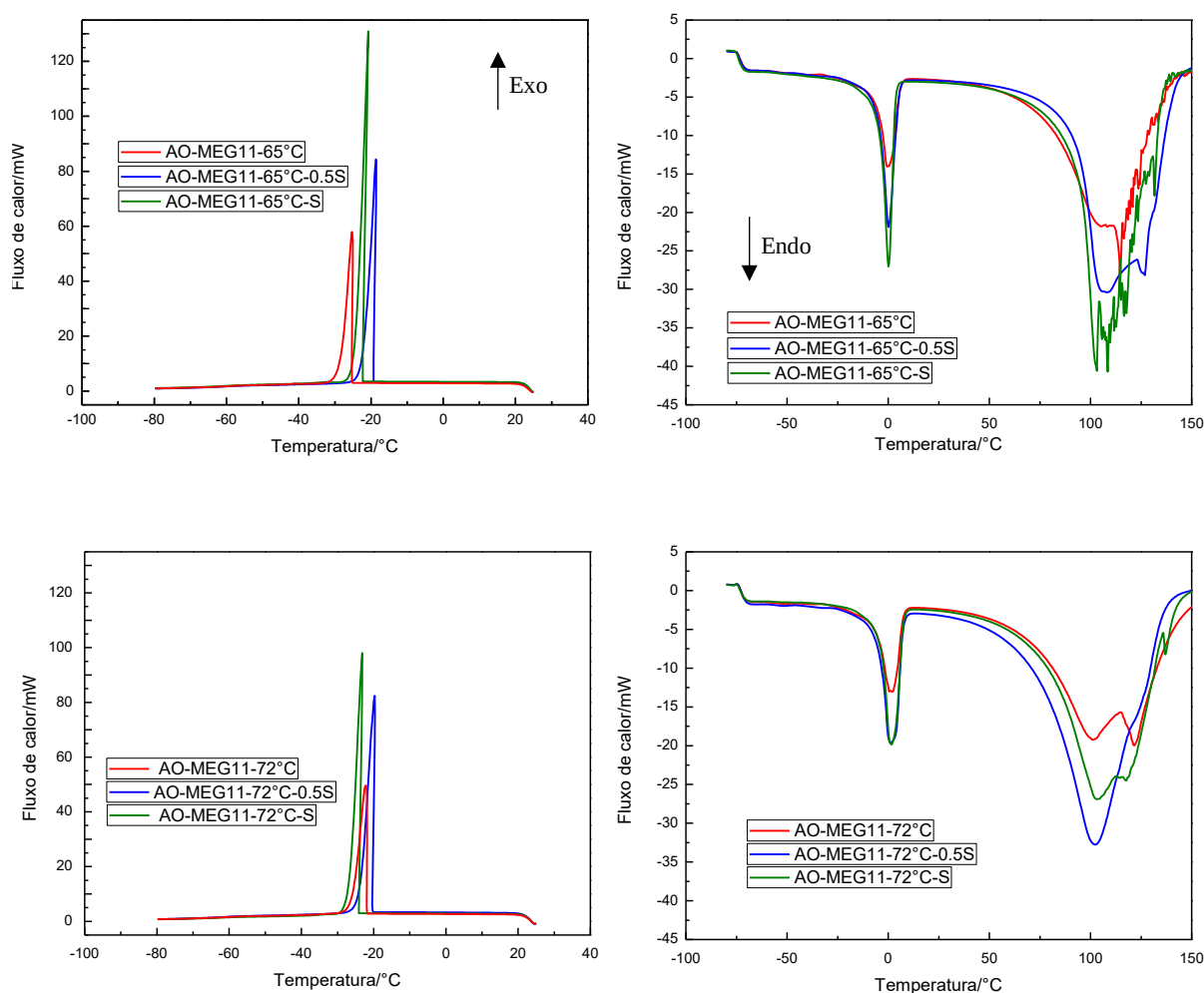


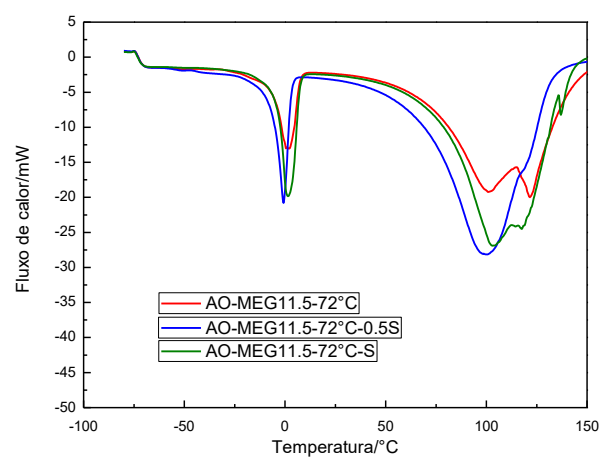
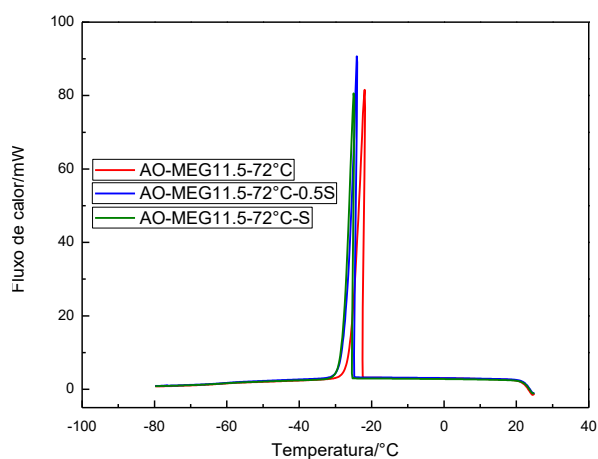
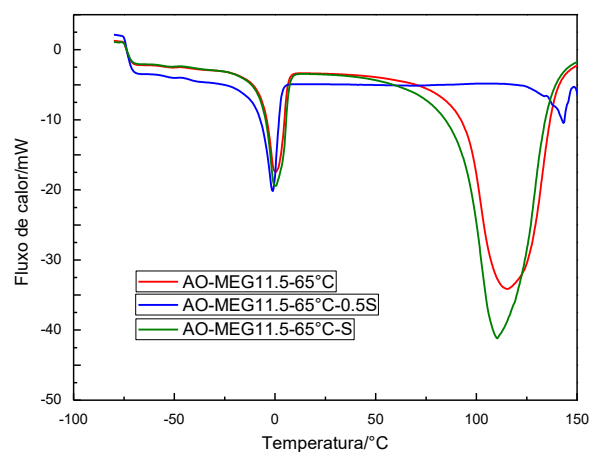
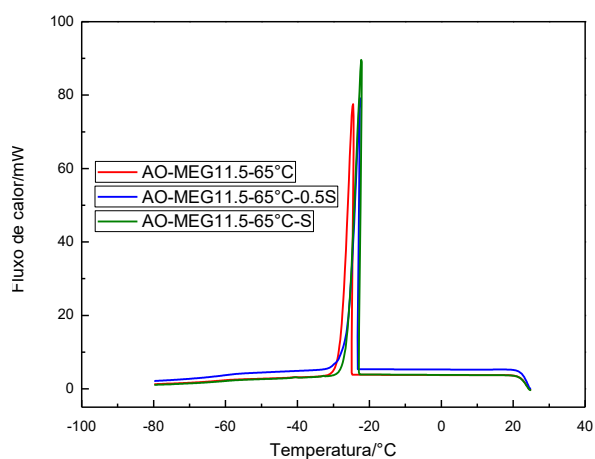
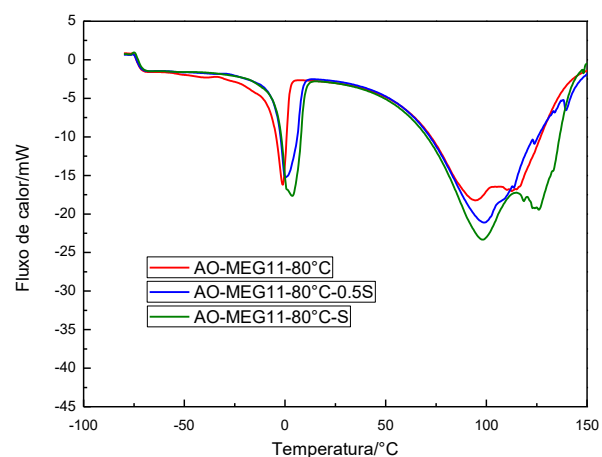
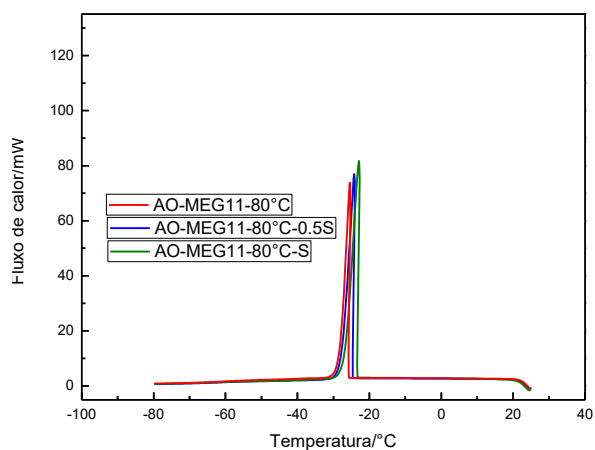
Fonte: Autor.

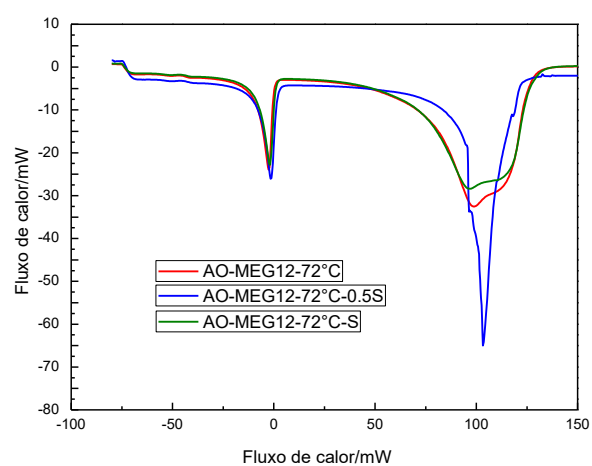
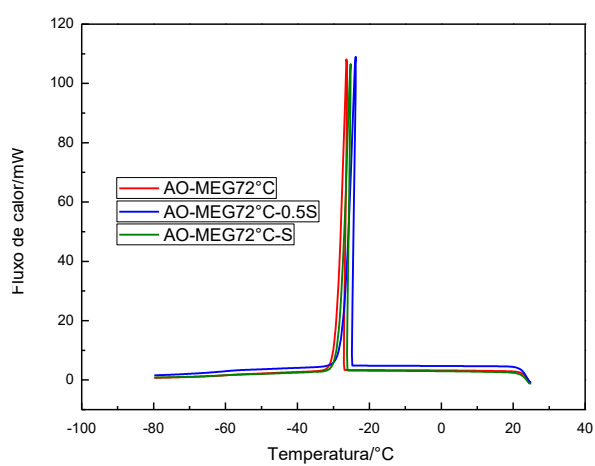
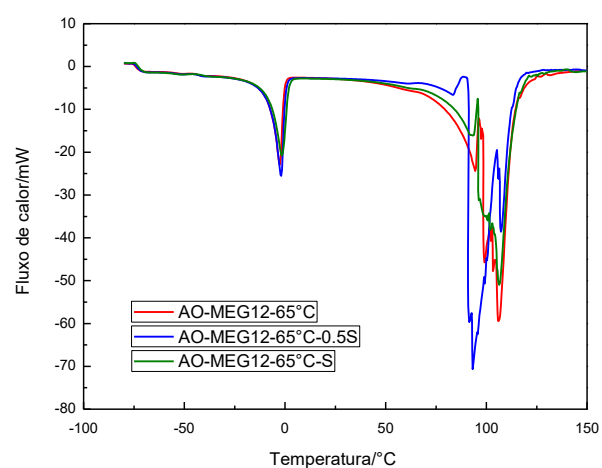
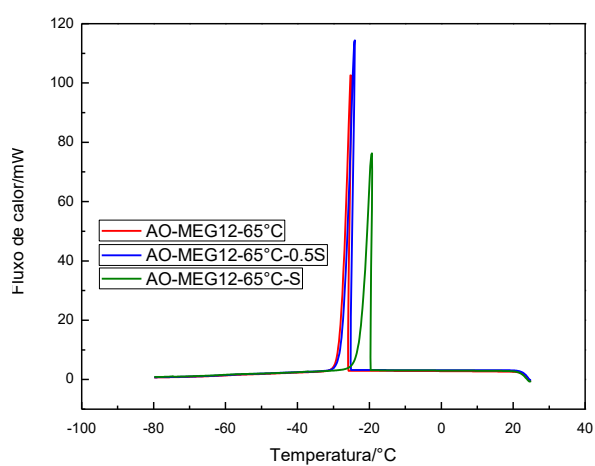
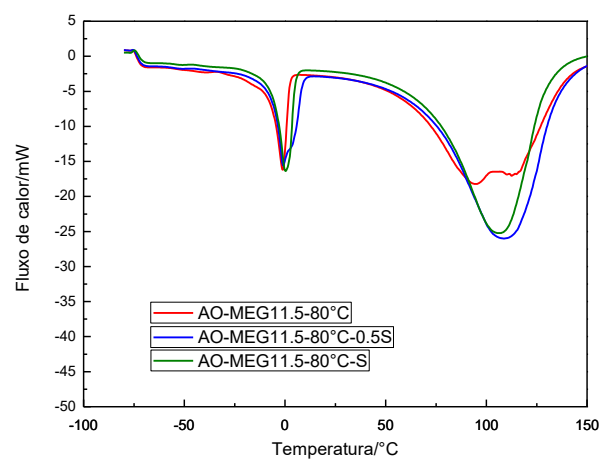
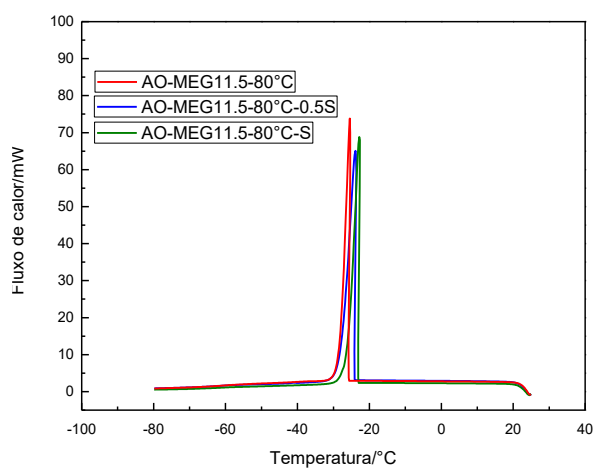
A curva de resfriamento da água pura (Figura 43) apresenta um pico de cristalização fino, temperatura *onset* de cristalização em $-20,1^{\circ}\text{C}$, com variação de entalpia de $307,6\text{ Jg}^{-1}$. Já a partir da curva de aquecimento é possível observar a temperatura *onset* de fusão em $0,59^{\circ}\text{C}$.

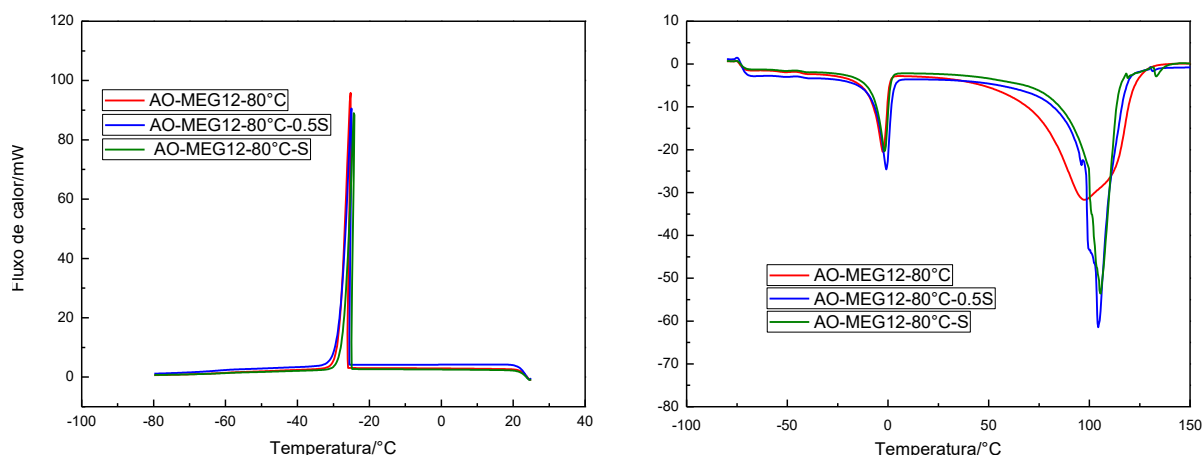
A seguir estão apresentadas as curvas de resfriamento, seguidas das de aquecimento dos sistemas desenvolvidos com ácido oleico durante o delineamento experimental (Figura 44).

Figura 44 - Curvas DSC de resfriamento e de aquecimento de sistemas de AOMEG contendo 40% de ácido oleico em água, variando temperatura, molaridade e solvente durante a síntese









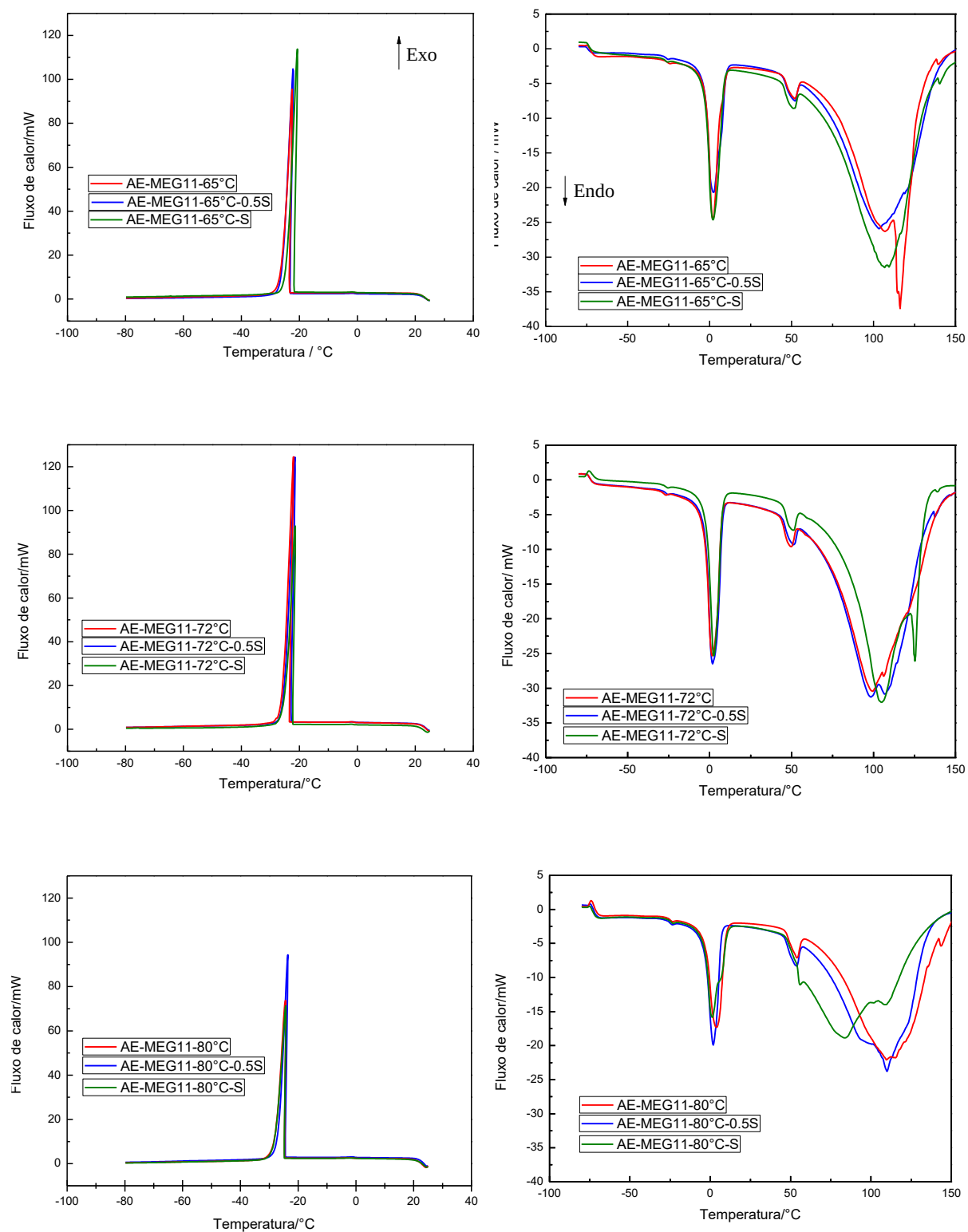
Fonte: Autor.

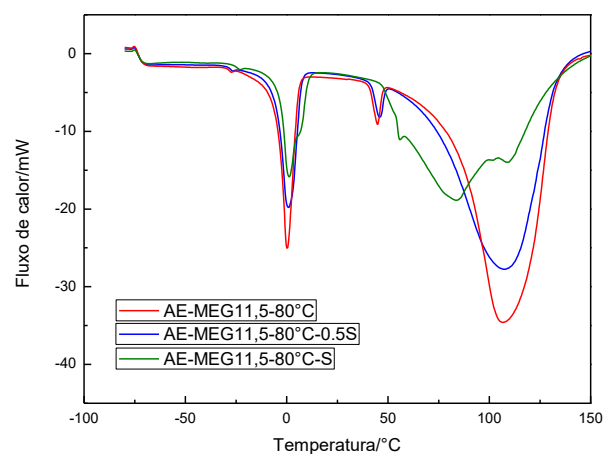
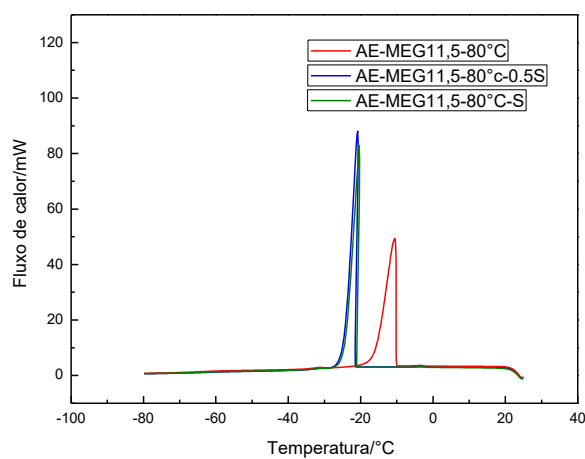
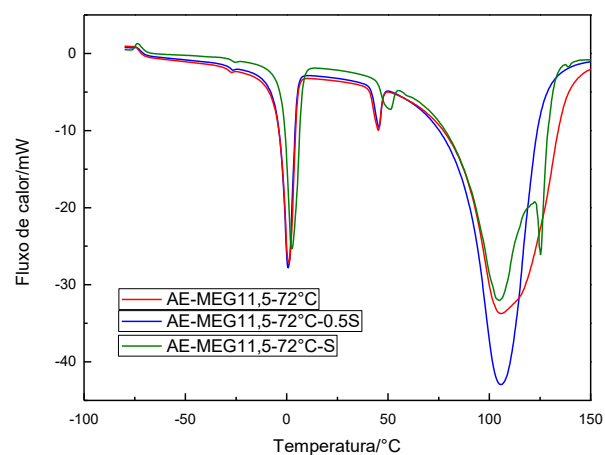
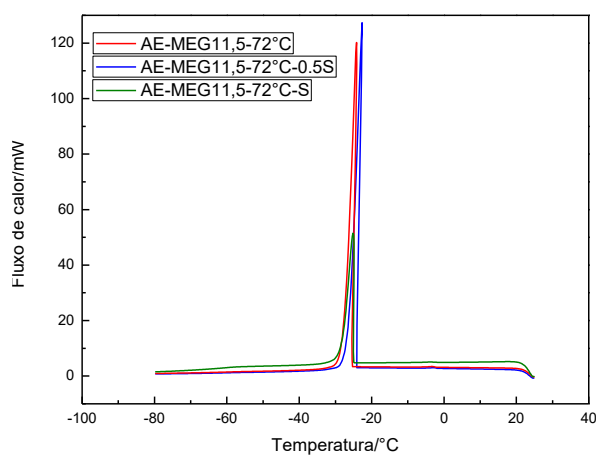
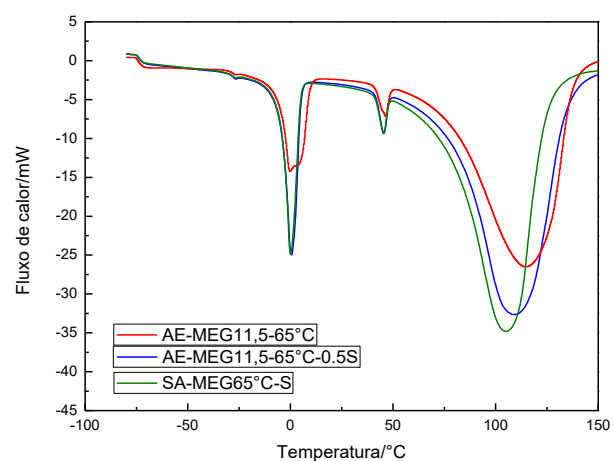
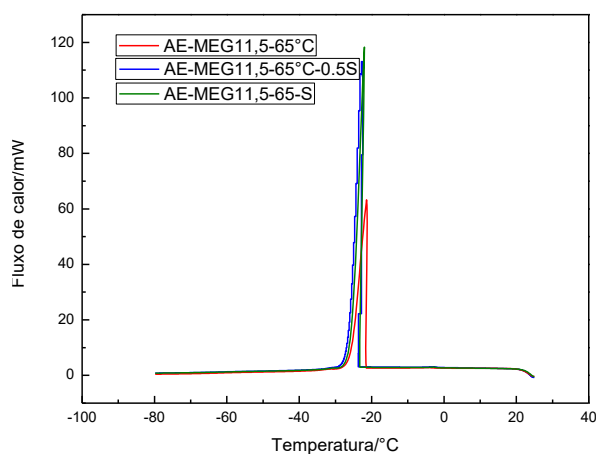
De acordo com as curvas DSC para os sistemas de AOMEG (Figura 45), pode-se inferir mesmo visualmente, a semelhança no início da cristalização (T_c) e fusão (T_f) da água na maior parte dos sistemas sintetizados à mesma temperatura e proporção molar de ácido oleico em relação a meglumina. De acordo com os resultados da Figura 47, é possível observar que todos os sistemas estudados apresentaram nas curvas de resfriamento, T_c entre -20 e -25°C .

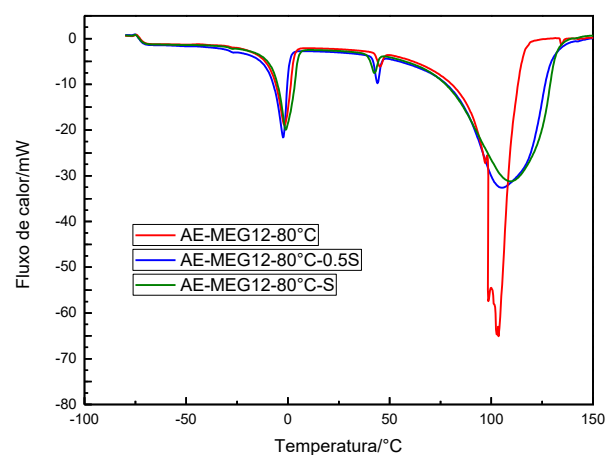
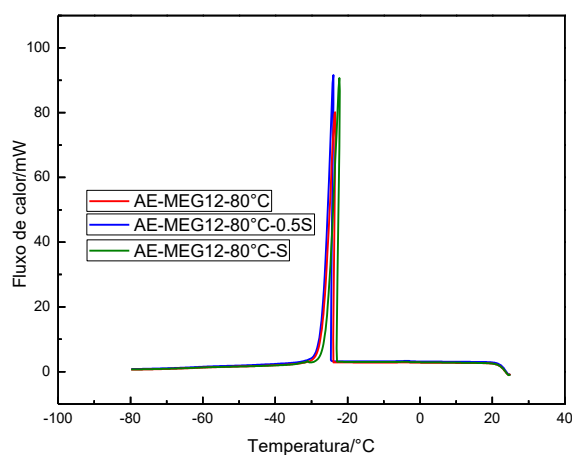
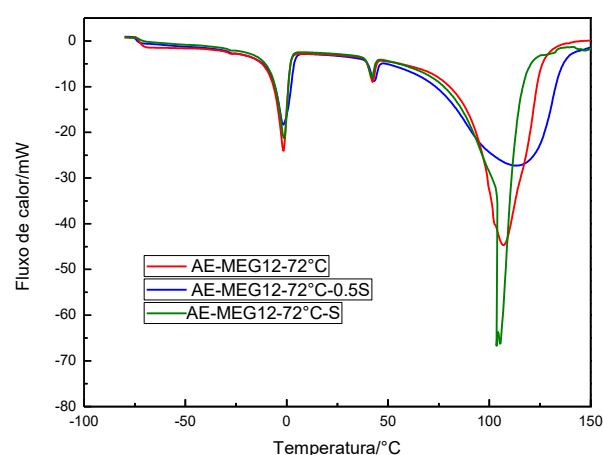
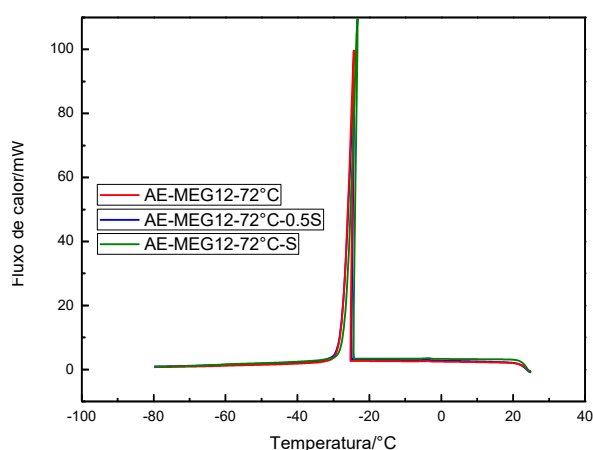
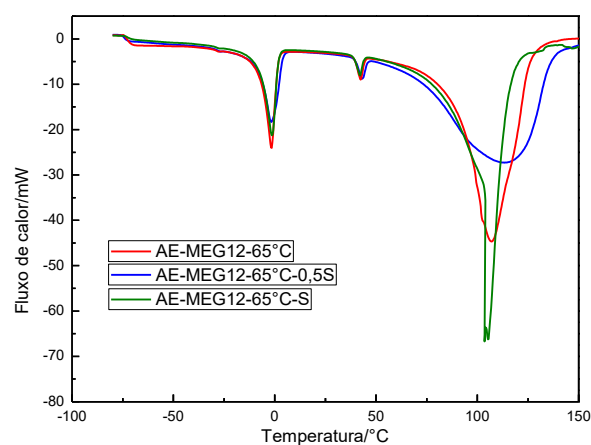
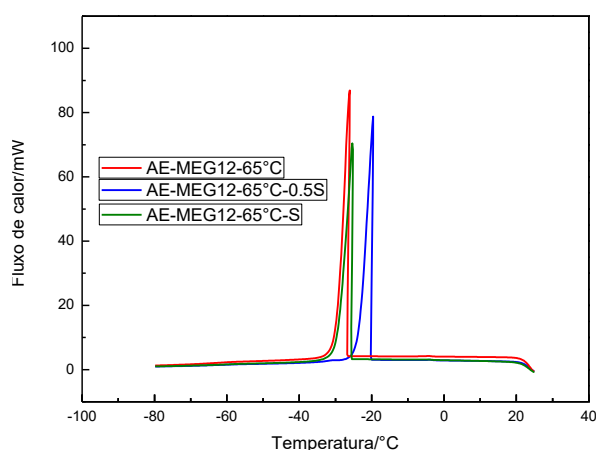
O estudo da absorção de água por materiais com aplicações biológicas é importante para aplicações em pele, a exemplo de sistemas de liberação de fármacos, por emitirem informações das propriedades das porções hidrofílicas dos materiais (TA INSTRUMENTS, s. n.). Por isso, por comparação da T_c da água pura, em sistemas de AOMEG contendo 60% de água, todos apresentaram T_c inferiores a primeira e, portanto, essa água foi associada ao tipo ligada congelável, a qual deve interagir com as porções hidrofílicas do sistema, formando ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila da meglumina. Devido a esta interação, a água demora a ser removida do sistema e, portanto, cristaliza a uma temperatura menor. Resultados semelhantes foram observados nas curvas de aquecimento, com início da fusão da água também em temperatura *onset* menor do que -20°C , com picos assimétricos. Em seguida, a água evapora e aparece como um segundo pico bastante assimétrico, com temperatura de pico próxima a 100°C .

A seguir estão apresentadas as curvas de resfriamento e de aquecimento dos sistemas formados por ácido esteárico desenvolvidos durante o delineamento experimental.

Figura 45 - Curvas DSC de resfriamento e de aquecimento de sistemas contendo 40% de ácido esteárico em água variando temperatura, molaridade e solvente durante a síntese







Fonte: Autor.

A partir das curvas de resfriamento dos sistemas de ácido esteárico, com exceção de AEMEG11,5-80°C, com temperatura *onset* de cristalização em -10,1°C, todas as outras amostras apresentaram T_c entre -20 e -25°C, indicando que a água interage com os grupos

hidroxila da meglumina ou com os grupos carboxílicos do ácido graxo dos sistemas, diminuindo sua temperatura de cristalização. Com relação às curvas de aquecimento, observa-se um evento imediatamente antes do início da fusão da água, atribuído a uma transição vítrea, definida como uma transição de um estado rígido para um estado “borrachoso”. Em seguida, ocorre a fusão da água com início próximo a -20°C nos sistemas, além de uma segunda transição, a uma temperatura próxima de 45°C , imediatamente antes da evaporação da água. É importante ressaltar que esta transição a 45°C não apareceu nos sistemas de ácido oleico, demonstrando ser característico do ácido esteárico. Esta transição foi atribuída a uma transição gel-sol, que apresenta uma faixa de temperatura que varia de acordo com o material ou massa molecular. Devido à complexidade das ligações no material, a faixa de temperatura da transição gel-sol é mais ampla do que a de fusão, enquanto o valor da entalpia de transição é pequena (IIJIMA et al., 2007). Nesses sistemas, é provável que a interação entre os supra-anfifílicos com a meglumina em água tenham gerado estruturas com ligações cruzadas, característico de polímeros supramoleculares, por exemplo. Essas ligações cruzadas se desfazem a 45°C em materiais compostos por ácido esteárico, liberando as moléculas de água de seus interiores e aparecendo na forma deste evento no DSC. Em um estudo do comportamento térmico do ácido esteárico com diferentes tipos de amina, foi verificada a transição gel-sol durante o aquecimento, com temperaturas variando de 45 a 55°C . Esse resultado foi observado pela avaliação de repetidos ciclos de aquecimento e resfriamento apresentando comportamentos de transição semelhantes, indicando a natureza termorreversível de agregação do material como um gel (BASIT et al., 2008). Além da mudança estrutural provocada pela variação de temperatura, esses sistemas formados ácido esteárico podem responder a outros estímulos externos, permitindo seu estudo como biomateriais responsivos.

Além disso, o estudo do comportamento da água em sistemas obtidos por auto-organização é importante porque pode influenciar nas propriedades físico-químicas dos materiais (HATAKEYAMA et al., 1988). Por isso, foi realizado o cálculo das porcentagens de água ligada, ou seja, aquela que interage com o supra-anfifílico, apresentadas na Tabela 18 de acordo com a Equação 9.

A quantidade de água livre (W_F , %) foi calculada a partir da entalpia de cristalização da água (ΔH_c) (J/g), a partir da entalpia de cristalização obtida na curva da água pura, utilizando-se os mesmos parâmetros de análise (Equação 7).

$$W_F = \frac{100 \times \Delta H_c}{307,6} \quad (7)$$

Tabela 18 - Porcentagem de água ligada em sistemas de ácido esteárico e ácido oléico (genericamente representados por AG, ácido graxo) contendo 40% de supra-anfifílico

Amostra*	Água ligada (%) Ácido esteárico	Água ligada (%) Ácido oléico
AGMEG11-65	44,60	59,19
AGMEG11-72	41,58	53,72
AGMEG11-80	48,49	60,86
AGMEG11-0,5S-65	40,39	47,39
AGMEG11-0,5S-72	35,07	45,28
AGMEG11-0,5S-80	44,84	45,57
AGMEG11S-65	48,49	48,56
AGMEG11S-72	46,72	44,59
AGMEG11S-80	50,97	41,01
AGMEG11,5-65	44,45	48,91
AGMEG11,5-72	44,49	48,66
AGMEG11,5-80	45,90	46,16
AGMEG11,5-0,5S-65	44,85	55,18
AGMEG11,5-0,5S-72	43,62	54,76
AGMEG11,5-0,5S-80	45,33	47,43
AGMEG11,5S-65	41,91	44,38
AGMEG11,5S-72	65,83	55,68
AGMEG11,5S-80	41,76	50,78
AGMEG12-65	47,66	52,53
AGMEG12-72	49,00	51,14
AGMEG12-80	44,91	52,15
AGMEG12-0,5S-65	45,26	50,13
AGMEG12-0,5S-72	49,49	47,88
AGMEG12-0,5S-80	51,62	48,20
AGMEG12S-65	49,03	50,61
AGMEG12S-72	48,66	49,29
AGMEG12S-80	43,76	50,89

*AG = ácido graxo, podendo ser ácido oleico ou ácido esteárico. **Fonte:** Autor.

De acordo com os resultados obtidos pela equação que relaciona a entalpia da água livre (Equação 8), é possível obter os resultados de água ligada em relação à quantidade total de água adicionada (60%), a fim de avaliar se houve interferência das variáveis de síntese estudadas. Com relação aos sistemas de ácido esteárico foi possível observar que os extremos foram AEMEG11-0,5S-72, com 35,07 % de água ligada e máximo em AEMEG11,5S-72, com 65,83% de água ligada. As amostras restantes apresentaram de 40 a 50% de água ligada e, em geral, para uma mesma proporção molar e quantidade de solvente, ou seja, variando-se a

temperatura de síntese, a maior parte dos sistemas apresentou porcentagens de água ligada semelhantes. Este é o segundo indicativo, além da semelhança visual do início da cristalização e fusão da água, de que é possível que os parâmetros estudados em diferentes níveis não influenciam significativamente no produto final. Com relação aos extremos mencionados, pode ser que algum outro tipo de fator, como a própria homogeneização do sistema, por ser realizada manualmente, tenha sido mais efetiva em algumas sínteses e em outras, nem tanto.

Para as amostras de ácido oleico, o extremo mínimo foi de 41,01% de água ligada para AOMEG11S-80 e máximo para AOMEG11-80, com 60,86% de água ligada. Os outros sistemas contêm de 44 a 60% de água ligada, com uma variação maior do que os sistemas formados por ácido esteárico. Novamente, é possível que a homogeneização manual tenha facilitado parte dos sistemas com relação a difusão da água. Um outro resultado ainda mais interessante em mencionar é que a presença de solvente durante a síntese dos supra-anfifílico não influencia na quantidade de água ligada nos sistemas, visto que não é possível encontrar um padrão de aumento deste tipo de água com a adição crescente de solvente.

Então, a fim de avaliar se as variáveis de preparação dos sistemas influenciavam na quantidade de água absorvida pelos supra-anfifílicos, ou seja, se apresentam valores extremos, foi aplicado um teste estatístico (teste Grubbs, que avalia valores extremos em testes amostrais) num nível de significância de 0,05. A hipótese H_0 indica que todas as amostras pertencem à mesma população, ou seja, independente de como os sistemas foram preparados, o comportamento da água em relação ao supra-anfifílico é o mesmo. Já a hipótese H_1 indica valores extremos, ou seja, a amostra apresenta interação do supra-anfifílico com a água de maneira diferente às outras. De acordo com o teste, dentre os sistemas de ácido esteárico somente a amostra AEMEG12 sintetizada a 80°C com metade de solvente, cuja quantidade de água ligada foi de 65,83 % apresentou um valor discrepante aos outros sistemas. Além disso, a média de água incorporada nos sistemas foi de 46,24%, com um desvio padrão de 5,292% e coeficiente de variação de 11,4%.

O mesmo teste foi aplicado às amostras de ácido oleico, que não apresentaram valores extremos no nível de significância de 0,05. A média de água incorporada foi de 50,03% com um desvio padrão de 4,545% e coeficiente de variação de 9,1%, inferiores ao do ácido esteárico.

Esses resultados reafirmam que independentemente das variáveis que foram utilizadas na síntese, a incorporação de água é efetiva e que a interação entre ela e os supra-anfifílicos independem das variáveis estudadas.

Na Tabela 19 estão apresentadas as temperaturas *onset* de fusão dos 27 sistemas estudados por DSC, com as variáveis v1, v2 e v3 representando a temperatura de síntese, a presença de solvente e a razão molar de ácido graxo-meglumina, respectivamente.

Tabela 19 - Resultados de temperatura *onset* de fusão obtida por DSC as 27 amostras realizados, com ponto central em triplicata

Amostra*	v1	v2	v3	Tonset fusão / °C	
				AEMEG	AOMEG
AGMEG11-65	-1	-1	-1	-2,28	-5,59
AGMEG11-72	0	-1	-1	-3,19	-6,33
AGMEG11-80	1	-1	-1	-3,23	-7,44
AGMEG11-0,5S-65	-1	0	-1	-2,83	-4,74
AGMEG11-0,5S-72	0	0	-1	-2,66	-4,88
AGMEG11-0,5S-80	1	0	-1	-3,61	-4,73
AGMEG11S-65	-1	1	-1	-2,81	-4,32
AGMEG11S-72	0	1	-1	-1,99	-3,83
AGMEG11S-80	1	1	-1	-3,55	-3,99
AGMEG11,5-65	-1	-1	0	-5,6	-6,21
AGMEG11,5-72	0	-1	0	-3,94	-5,93
AGMEG11,5-80	1	-1	0	-4,86	-5,77
AGMEG11,5-0,5S-65	-1	0	0	-4,66	-7,67
AGMEG11,5-0,5S-72 (1)	0	0	0	-4,09	-6,24
AGMEG11,5-0,5S-72 (2)	0	0	0	-4,68	-6,06
AGMEG11,5-0,5S-72 (3)	0	0	0	-5,16	-6,11
AGMEG11,5-0,5S-80	1	0	0	-5,11	-5,95
AGMEG11,5S-65	-1	1	0	-4,44	-6,37
AGMEG11,5S-72	0	1	0	-7,19	-7,28
AGMEG11,5S-80	1	1	0	-5,05	-5,65
AGMEG12-65	-1	-1	1	-7,72	-8,08
AGMEG12-72	0	-1	1	-7,1	-8,52
AGMEG12-80	1	-1	1	-8,55	-4,74
AGMEG12-0,5S-65	-1	0	1	-7,54	-7,7
AGMEG12-0,5S-72	0	0	1	-8,1	-7,29
AGMEG12-0,5S-80	1	0	1	-8,59	-6,91
AGMEG12S-65	-1	1	1	-8,11	-7,94
AGMEG12S-72	0	1	1	-7,16	-7,9
AGMEG12S-80	1	1	1	-6,95	-7,42

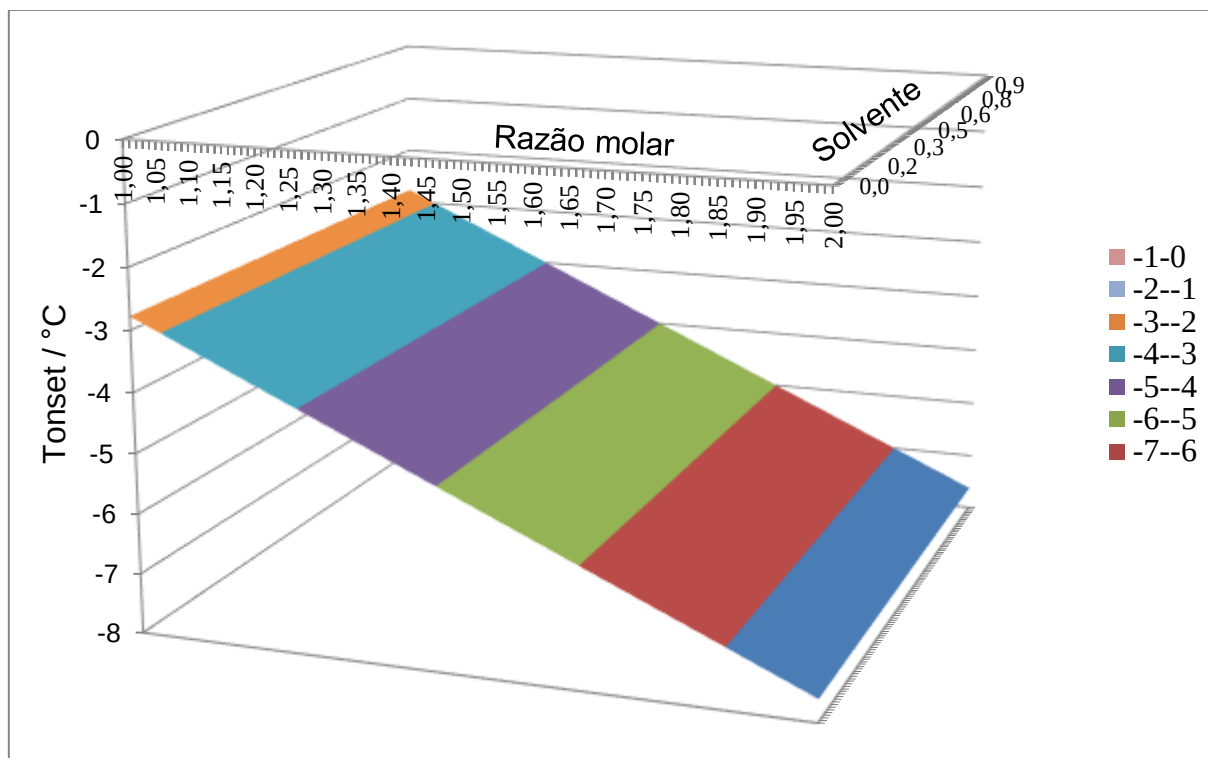
*AG = ácido graxo, podendo ser ácido oleico ou ácido esteárico. **Fonte:** Autor.

A partir desses resultados (Tabela 19) é possível realizar o cálculo dos efeitos individuais para cada variável testada, denominadas principais (primeira ordem) e efeitos de interação de segunda ordem de duas a duas variáveis, quando se busca avaliar se a interação de duas variáveis apresenta influência sobre os resultados estudados.

Na metodologia implementada, a partir do modelo obtido estudando-se como resposta a temperatura *onset* de fusão, o qual gera gráficos que indicam se todos os coeficientes calculados são necessários e, caso algum não seja importante, gera-se outra matriz até que nenhum coeficiente seja insignificante. Então, obtém-se uma equação, que permite a obtenção de gráficos de contorno e de superfície para avaliar quais variáveis e qual a influência delas na resposta estudada durante a síntese dos sistemas (PEREIRA-FILHO, 2015). Tanto para os sistemas de ácido esteárico como para os de ácido oleico, as temperaturas de síntese não influenciaram na resposta de temperatura *onset* (*Tonset*) de fusão.

Após a análise do modelo é possível observar a superfície da resposta gerada em uma curva de superfície de resposta para as amostras de AEMEG (Figura 46) estudadas por DSC. É possível concluir que apresentaram influência na temperatura *onset* de fusão apenas a razão molar do ácido graxo em relação a meglumina, na qual quanto maior a proporção molar, ou seja, quanto maior a quantidade de meglumina no sistema, menor a temperatura *onset* de fusão, demonstrando um maior aprisionamento/interação da água pela meglumina durante o aquecimento do sistema. Este aprisionamento pode estar relacionado com as interações de hidrogênio entre os grupos hidroxila da meglumina com a água, dificultando sua saída quando o sistema é aquecido. Além disso, o gráfico de contorno demonstra que se forem preparados sistemas variando de 1:1 a 1:1,25 de ácido esteárico:meglumina, as temperaturas *onset* aparecerão entre -4 e -2°C. Entre 1:1,25 e 1:1,67, as temperaturas *onset* estarão entre -6 e -4°C e nas proporções de 1:1,67 a 1:2, entre -8 e -6°C.

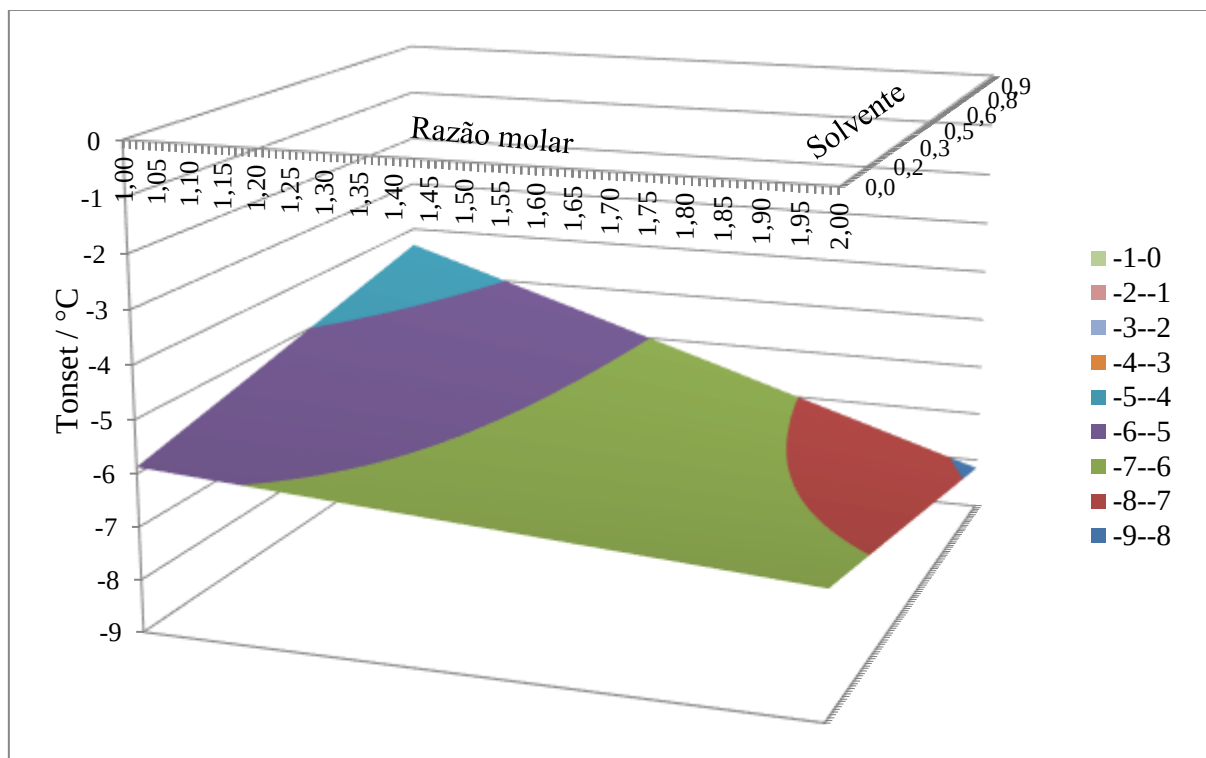
Figura 46 - Curva de superfície de resposta de AEMEG com respostas de temperatura *onset* de fusão e influência da razão molar e presença de solvente



Fonte: Autor.

Para AOMEG, o gráfico de superfície (Figura 47) apresentou influência nos resultados de *Tonset* de fusão devido às variáveis razão molar e a presença ou ausência de solvente. As maiores *Tonset* foram observadas em presença de solvente na proporção molar 1:1, entre -4 e -5°C. Nessa mesma proporção molar, quando se diminui a quantidade de solvente, ocorre diminuição da *Tonset*, variando entre -6 e -5°C. Partindo do ponto em presença de solvente, conforme se altera a proporção molar, é possível observar que o aumento da quantidade de meglumina leva a uma diminuição da *Tonset* de fusão dos sistemas, com temperaturas entre -9 e -8 °C. Quando se aumenta a quantidade de meglumina, aumenta-se a possibilidade de elas interagirem por ligações de hidrogênio entre elas ou com moléculas de água. Com isso, ocorre a diminuição da temperatura de fusão, já que com o aumento das ligações, a quantidade de água interagindo com o sistema apresenta maior dificuldade para escapar do sistema e passar para o estado líquido.

Figura 47 - Curva de superfície de resposta de AOMEG com respostas de temperatura *onset* de fusão e influência da razão molar e presença de solvente



Fonte: Autor.

A segunda resposta avaliada foi o trabalho de adesão estudado por bioadesão, realizado para as 27 amostras de AEMEG e com as outras 27 amostras de AOMEG (Tabela 20), as quais foram analisadas individualmente e aleatoriamente. Para cada um dos ácidos graxos estudados, a partir das 27 amostras, além do ponto central (amostra 14) analisado em triplicata, totalizando 29 amostras, foi composta uma matriz X de 29x10. Essa matriz é composta pelas variáveis 1, 2 e 3, representando a temperatura, presença de solvente e razão molar, respectivamente. A matriz Y é composta pelo trabalho de adesão de cada amostra, compondo a matriz 29x1.

Tabela 20 - Trabalho de adesão (N s) avaliado por bioadesão em pele de porco para as 27 amostras de AEMEG e AOMEG, com ponto central em triplicata

Amostra	v1*	v2*	v3*	Trabalho de adesão / N.s	
				AEMEG	AOMEG
1	-1	-1	-1	0,0813	0,0737
2	0	-1	-1	0,0713	0,0900
3	1	-1	-1	0,0760	0,0737
4	-1	0	-1	0,0917	0,111
5	0	0	-1	0,0670	0,118
6	1	0	-1	0,107	0,0753
7	-1	1	-1	0,248	0,0667
8	0	1	-1	0,0720	0,0953
9	1	1	-1	0,0737	0,116
10	-1	-1	0	0,140	0,0707
11	0	-1	0	0,0533	0,0810
12	1	-1	0	0,0470	0,0783
13	-1	0	0	0,0503	0,105
14 (1)	0	0	0	0,0620	0,0810
14 (2)	0	0	0	0,0730	0,0810
14 (3)	0	0	0	0,0720	0,0730
15	1	0	0	0,0567	0,167
16	-1	1	0	0,0573	0,155
17	0	1	0	0,0517	0,106
18	1	1	0	0,0613	0,104
19	-1	-1	1	0,0620	0,000
20	0	-1	1	0,0710	0,000
21	1	-1	1	0,0680	0,000
22	-1	0	1	0,0437	0,000
23	0	0	1	0,0587	0,000
24	1	0	1	0,0510	0,000
25	-1	1	1	0,0637	0,000
26	0	1	1	0,0863	0,000
27	1	1	1	0,0657	0,000

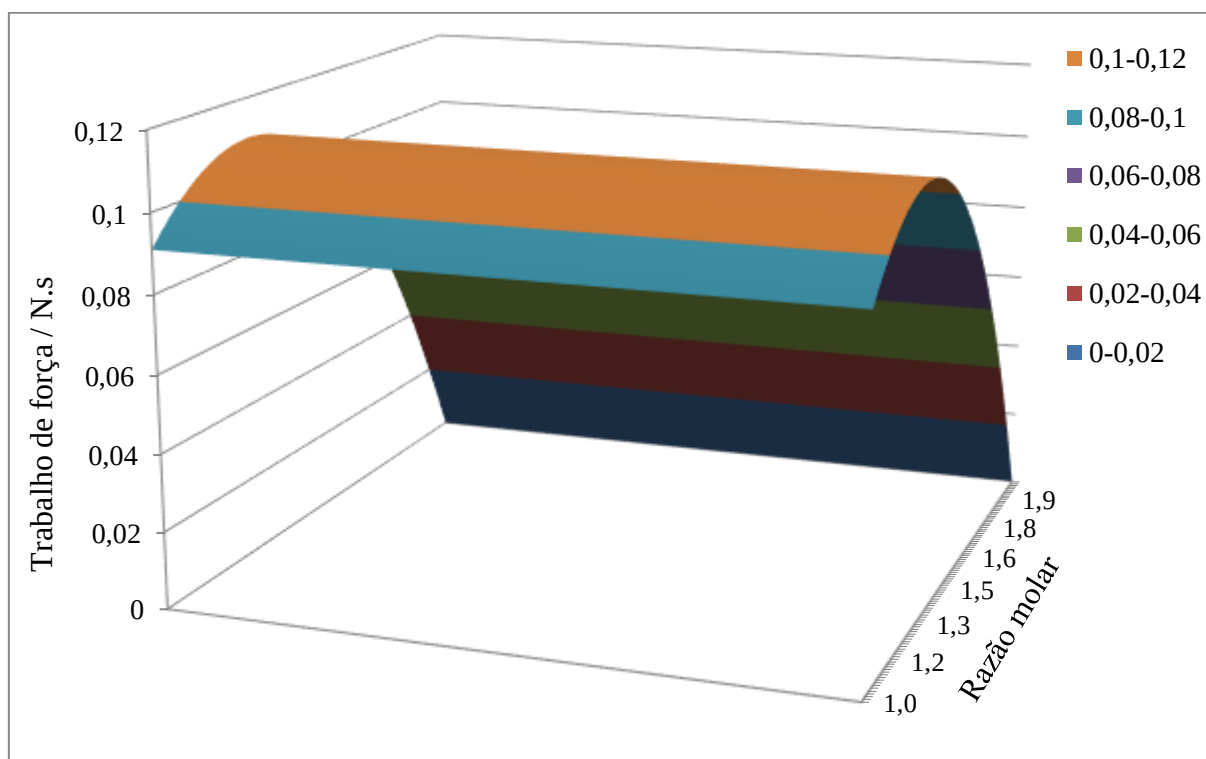
*v1 = temperatura/°C; v2 = quantidade de solvente; v3 = razão molar ácido graxo-meglumina. **Fonte:** Autor.

De acordo com o modelo, foi possível determinar se alguma das variáveis ou a interação de duas delas interferiam na resposta avaliada. Pelo modelo aplicado, para AEMEG nenhuma das variáveis estudadas apresenta influência sobre o trabalho de adesão estudado por bioadesão. Portanto, para as próximas etapas do trabalho foi proposta a síntese dos sistemas na ausência

de solvente e na menor temperatura utilizada, de 65°C, visto que isso colaborando com menos gasto de energia e economia de solventes/reagentes, em acordo com os objetivos da Química Verde.

Os resultados obtidos para AOMEG demonstram que a razão molar interfere nas respostas de trabalho de adesão. De acordo com o gráfico de superfície de AOMEG (Figura 48), é possível observar que aumentando a quantidade de meglumina a partir da razão molar de 1:1, ocorre aumento do trabalho de adesão, o qual atinge um máximo entre 0,1 e 0,12 N s e então, com o aumento da quantidade de meglumina, o trabalho decresce até atingir um trabalho de força nulo quando se tem amostras nas proporções 1:2. Visualmente AOMEG12 apresentou uma viscosidade muito baixa e, por isso, não foi possível avaliar o trabalho de força dessas amostras, atribuindo-lhes valor zero (0).

Figura 48 - Curva de superfície de resposta de AOMEG com respostas de trabalho de bioadesão e influência da razão molar e temperatura



Fonte: Autor.

A última resposta estudada que compõe o delineamento experimental é anisotropia ou isotropia obtida por microscopia de luz polarizada. Todas as amostras de AEMEG apresentaram anisotropia na forma de estrias. As amostras de AOMEG também apresentaram anisotropia na forma de estrias. Em geral, as estrias representam o tipo de organização hexagonal, no entanto

só se pode confirmar isso por Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), cujos resultados já apresentados demonstraram que o ácido esteárico geralmente se organiza na forma lamelar, enquanto os sistemas de ácido oleico se estruturam na forma hexagonal.

5.3 Desenvolvimento de sistemas preparados na ausência de solvente com adição de água a 65°C avaliados por Bioadesão, DSC e MLP

Nesta etapa, supra-anfifílicos de ácido esteárico e ácido oleico foram sintetizados em duas proporções molares, 1:1 e 1:2, de ácido graxo-meglumina, pela mistura direta dos reagentes. Depois da estabilização das amostras, adicionou-se 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% de água, sob aquecimento a 65°C para facilitar a homogeneização.

Os ensaios de bioadesão dos sistemas em pele de orelha de porco estão apresentados na Tabela 21. A bioadesão decorre de uma combinação de mecanismos que envolvem as propriedades físico-químicas do material e da superfície biológica e interações não-covalentes. O trabalho de adesão é obtido pela área sob a curva de destacamento do material com a superfície biológica (CARVALHO et al., 2013; JONES; WOOFSON; BROWN, 1997).

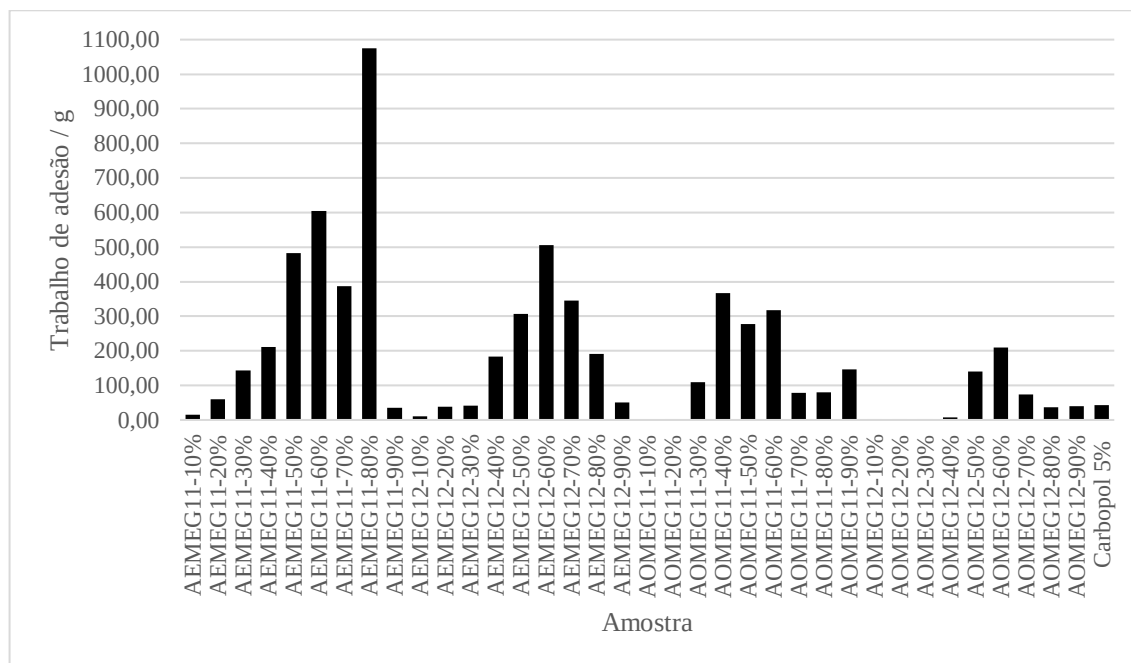
Tabela 21 - Ensaios de bioadesão para sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 com porções de 10 a 90% de água

Amostra	Trabalho de adesão / N s	Desvio padrão	Amostra	Trabalho de adesão / N s	Desvio padrão
AEMEG11-10%	14,84	0,8000	AOMEG11-10%	0	0
AEMEG11-20%	60,41	1,780	AOMEG11-20%	2,400	0,2640
AEMEG11-30%	142,7	21,09	AOMEG11-30%	109,0	11,84
AEMEG11-40%	210,3	30,17	AOMEG11-40%	367,6	13,12
AEMEG11-50%	482,1	44,36	AOMEG11-50%	277,3	28,99
AEMEG11-60%	604,3	31,28	AOMEG11-60%	318,0	39,97
AEMEG11-70%	387,2	40,85	AOMEG11-70%	78,91	39,71
AEMEG11-80%	1075	82,81	AOMEG11-80%	80,26	21,13
AEMEG11-90%	35,47	22,13	AOMEG11-90%	145,4	15,44
AEMEG12-10%	11,05	1,740	AOMEG12-10%	2,990	0,1800
AEMEG12-20%	38,19	2,050	AOMEG12-20%	2,690	0,1300
AEMEG12-30%	41,19	1,160	AOMEG12-30%	3,140	0,4600
AEMEG12-40%	183,7	22,37	AOMEG12-40%	6,750	3,190
AEMEG12-50%	307,1	7,790	AOMEG12-50%	139,7	22,77
AEMEG12-60%	505,2	51,27	AOMEG12-60%	209,0	36,75
AEMEG12-70%	345,7	21,62	AOMEG12-70%	74,31	14,22
AEMEG12-80%	191,0	25,70	AOMEG12-80%	36,12	2,270
AEMEG12-90%	50,92	27,51	AOMEG12-90%	39,30	15,77

Fonte: Autor.

Com os resultados apresentados na Tabela 21, foi construído um gráfico relacionando os trabalhos de adesão em relação ao produto comercial Carbopol®, utilizado no ramo farmacêutico devido a suas características bioadesivas (Figura 49).

Figura 49 - Comparação do trabalho de adesão dos sistemas AEMEG e AOMEG variando de 10 a 90% de água comparado ao Carbopol® 5%



Fonte: Autor.

As propriedades de bioadesão dos sistemas foram comparadas com o Carbopol® 5% que é descrito na literatura como um material amplamente aplicado devido às suas propriedades bioadesivas. Os sistemas compostos por ácido esteárico apresentaram regularidade no aumento da concentração de AEMEG em relação a quantidade de água, promovendo o aumento do trabalho de adesão, seguida de uma diminuição gradual, com exceção de AEMEG11-80%, que apresentou o maior trabalho de adesão dos sistemas estudados. Os sistemas compostos por ácido esteárico preparados com 10 e 20% de água, por serem compostos praticamente por reagentes sólidos são de difícil homogeneização, o que explicaria a anormalidade do resultado para AEMEG11-80%.

As amostras contendo ácido oleico apresentaram maior bioadesividade quando utilizou-se proporções equimolares de ácido oleico:meglumina comparada ao dobro de meglumina (Figura 52). Apesar de aumentar os grupamentos hidroxila com adição de mais meglumina, a ordenação destas em um arranjo estruturado é dificultado devido a dobra da cadeia hidrofóbica resultante da dupla ligação presente no ácido oleico.

Comparando os sistemas com o Carbopol®, tanto nas proporções molares 1:1 como 1:2 de ácido graxo:meglumina, tanto para ácido oleico como para ácido esteárico, é possível desenvolver sistemas com trabalho de adesão equivalente e até superior ao sistema comercial, a exemplo de AEMEG11-20%, AEMEG12-20% e AEMEG12-30% para ácido esteárico e AOMEG11-70%, AOMEG11-80%, AOMEG12-70% e AOMEG12-90%. O material de

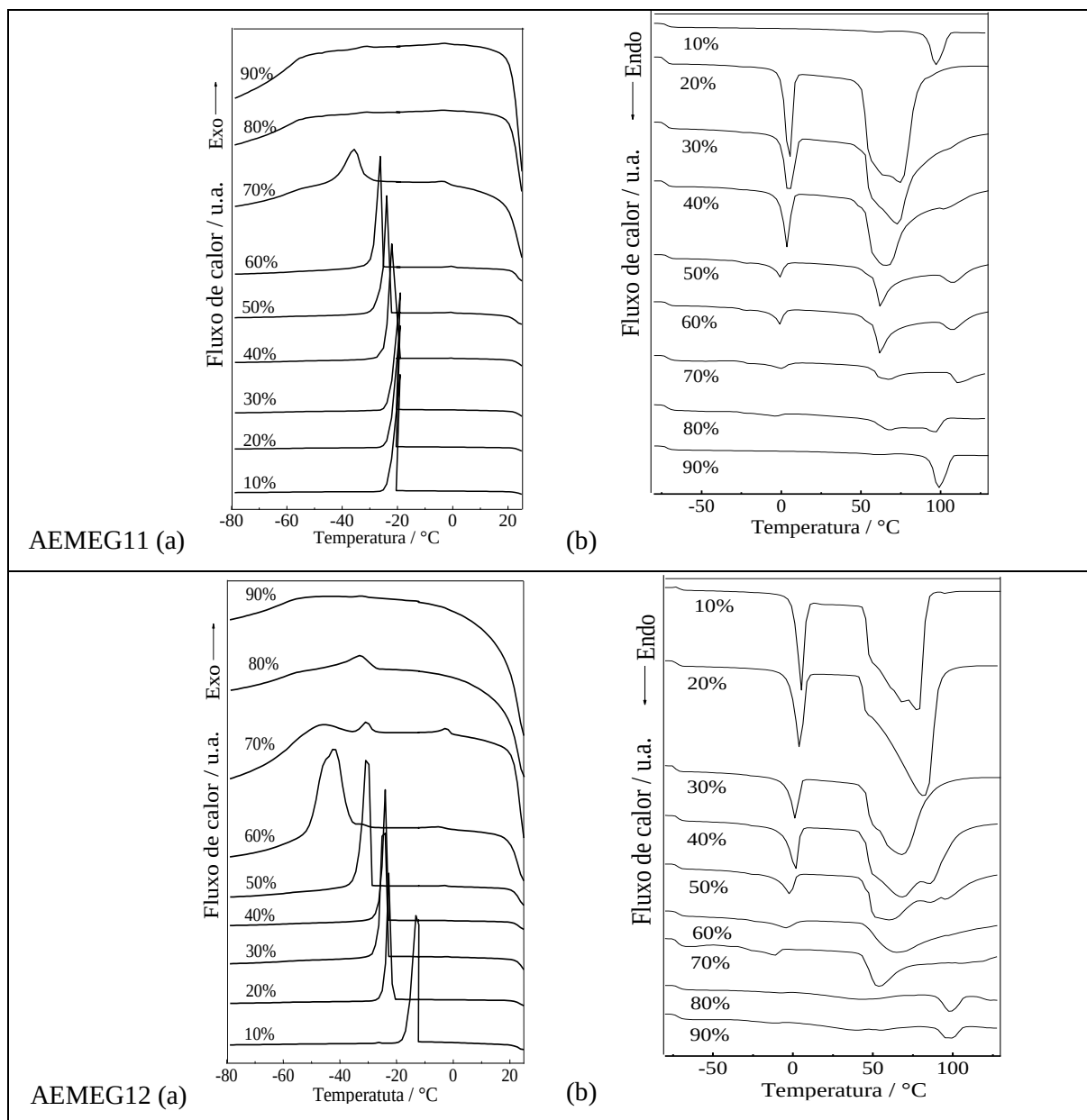
referência comercial foi usado porque neste trabalho propôs-se a aplicação dos sistemas no ramo farmacêutico. No entanto, altos valores de trabalho de adesão não indicam, necessariamente, uma melhor liberação do fármaco, visto que só indica o trabalho necessário para superar as forças entre a amostra e a prova com a superfície biológica. Além disso é necessário racionalizar se alguma amostra apresenta aspecto quebradiço, caso dos sistemas contendo 80% ou mais de AEMEG em relação a quantidade de água.

Além da bioadesão, é possível estudar o comportamento dos sistemas para aplicações biomédicas de outra forma, em virtude do tipo de interação da água modificar-se bastante em contato com alguma interface quando comparada com a água pura, seja um material de origem orgânica, como biomembranas e proteínas ou inorgânica, a exemplo da argila e trocadores de íons (GARTI, 2001).

A compreensão da interação entre a água e tais interfaces é relevante no estudo de seus problemas decorrentes em organismos vivos, como baixa adesão, além da importância que pequenos volumes de água desempenham no meio que controla a estrutura e comportamento próximo às membranas biológicas, a exemplo das microemulsões que servem de modelo para o estudo da água em espaços confinados. É importante ressaltar que o estudo da água em relação a qualquer interface deve considerar os diferentes tipos de água, variando desde a que mais interage com o sistema, até o tipo livre, cujo comportamento se assemelha a água pura (GARTI, 2001). Em uma das definições, a diferença dos tipos de água baseia-se em pontos de fusão e pontos de congelamento, classificando-as como água livre, com fusão/congelamento em temperatura próxima à de água pura, água interfacial (água ligada congelável) com fusão/congelamento em temperatura aproximadamente 10 °C inferior à da água livre e água ligada (água ligada não congelável) com pontos de fusão/congelamento ainda mais inferiores do que a da água ligada. É evidente que essas temperaturas variam de acordo com a quantidade e composição de água no sistema estudado. Além disso, o termo água “ligada” se refere a interações do tipo dipolo-dipolo e íon-dipolo (SENATRA et al., 1988; TANAKA; HAYASHI; MORITA, 2013).

O comportamento da água, considerando os tipos de água, ligada ou não, em cada uma das amostras foi estudado por DSC (Figuras 50, 51, 52 e 53).

Figura 50 - Curvas de (a) resfriamento e de (b) aquecimento de sistemas AEMEG11 e AEMEG12 contendo de 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água



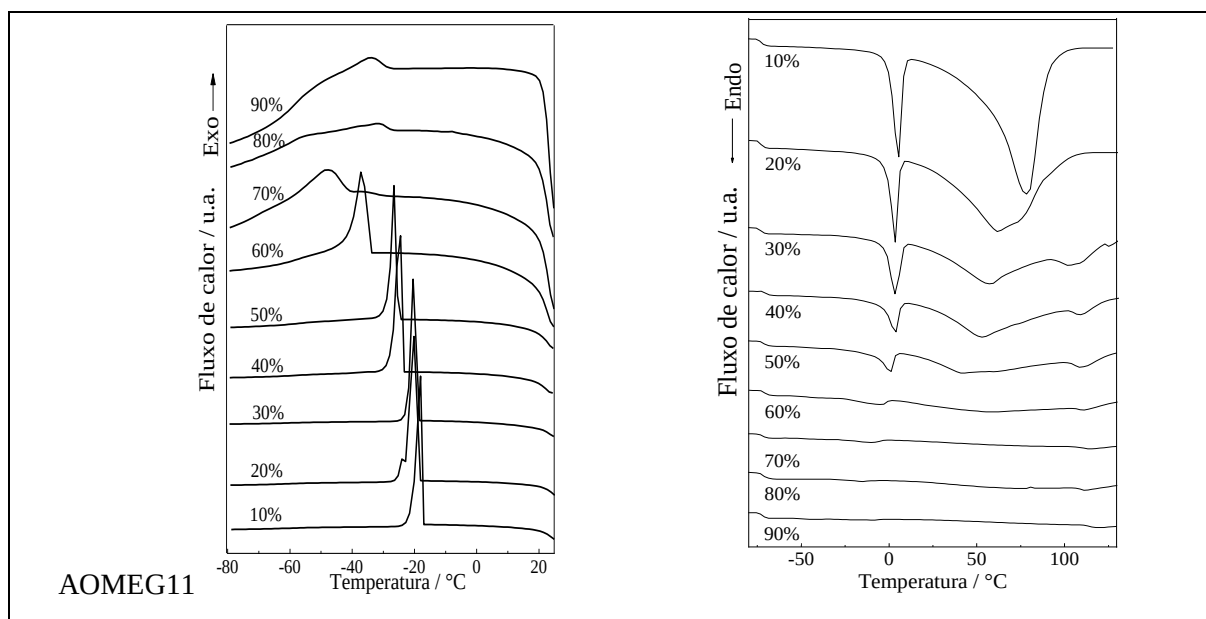
Fonte: Autor.

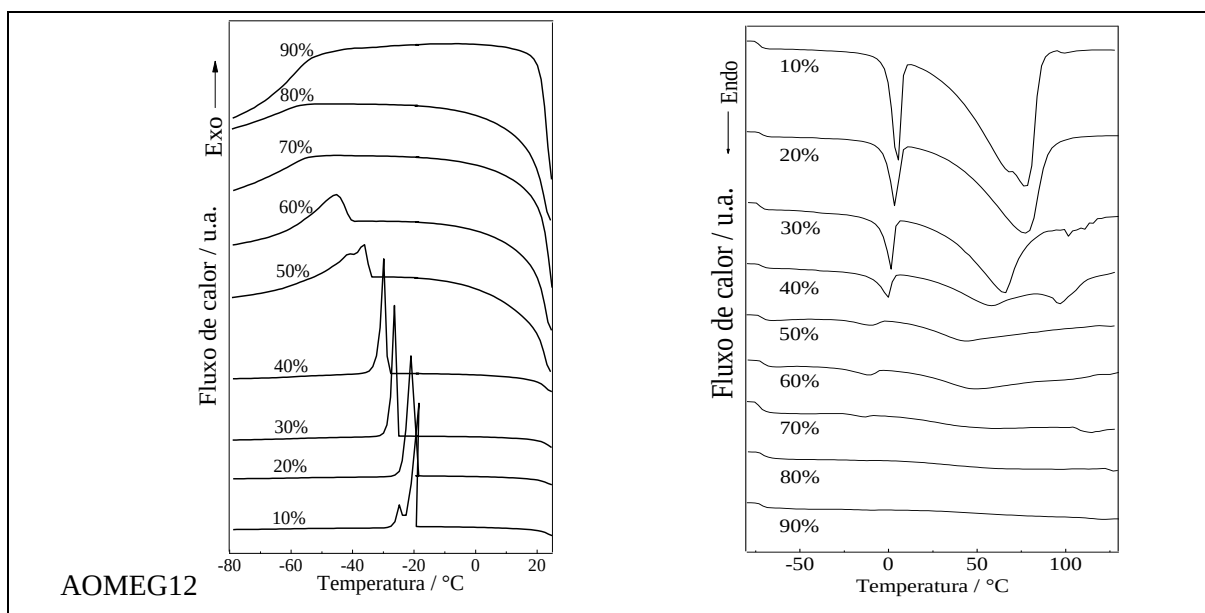
A princípio, os sistemas foram resfriados a partir da temperatura ambiente até -80°C , seguido do aquecimento até 130°C . Para AEMEG11-H₂O contendo 90 e 80% de supra-anfifílico ou seja, apenas 10 e 20% de água, não há transição de primeira ordem no resfriamento nem no aquecimento. A partir do sistema AEMEG11-H₂O contendo 70% de supra-anfifílico e 30% de água, ocorre a cristalização da água com temperatura *onset* menor do que -25°C , indicando uma interação com o material. Acima de 40% de água, é possível verificar nas curvas de resfriamento que as temperaturas *onset* de cristalização tornam-se maiores, demonstrando que a água vai perdendo o caráter de água ligada para água livre, ou seja, que apresenta uma

mistura de ambos os tipos com a preponderância de água livre. Observações semelhantes foram obtidas nas curvas de aquecimento.

Para sistemas de AEMEG12, a água começa a cristalizar logo em AEMEG12-H₂O contendo 80% de supra-anfifílico, e o restante das amostras apresentam comportamento semelhante aos sistemas de AEMEG11, salvo AEMEG12-H₂O, com 10% de supra-anfifílico, que apresentou temperatura *onset* de cristalização de água livre, com temperatura bem acima da amostra posterior, que continha 20% de supra-anfifílico. Assim como demonstrado anteriormente, os sistemas de ácido esteárico apresentam a transição gel-sol em aproximadamente 45°C.

Figura 51 - Curvas de resfriamento e de aquecimento de sistemas AOMEG11 e AOMEG12 contendo de 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água



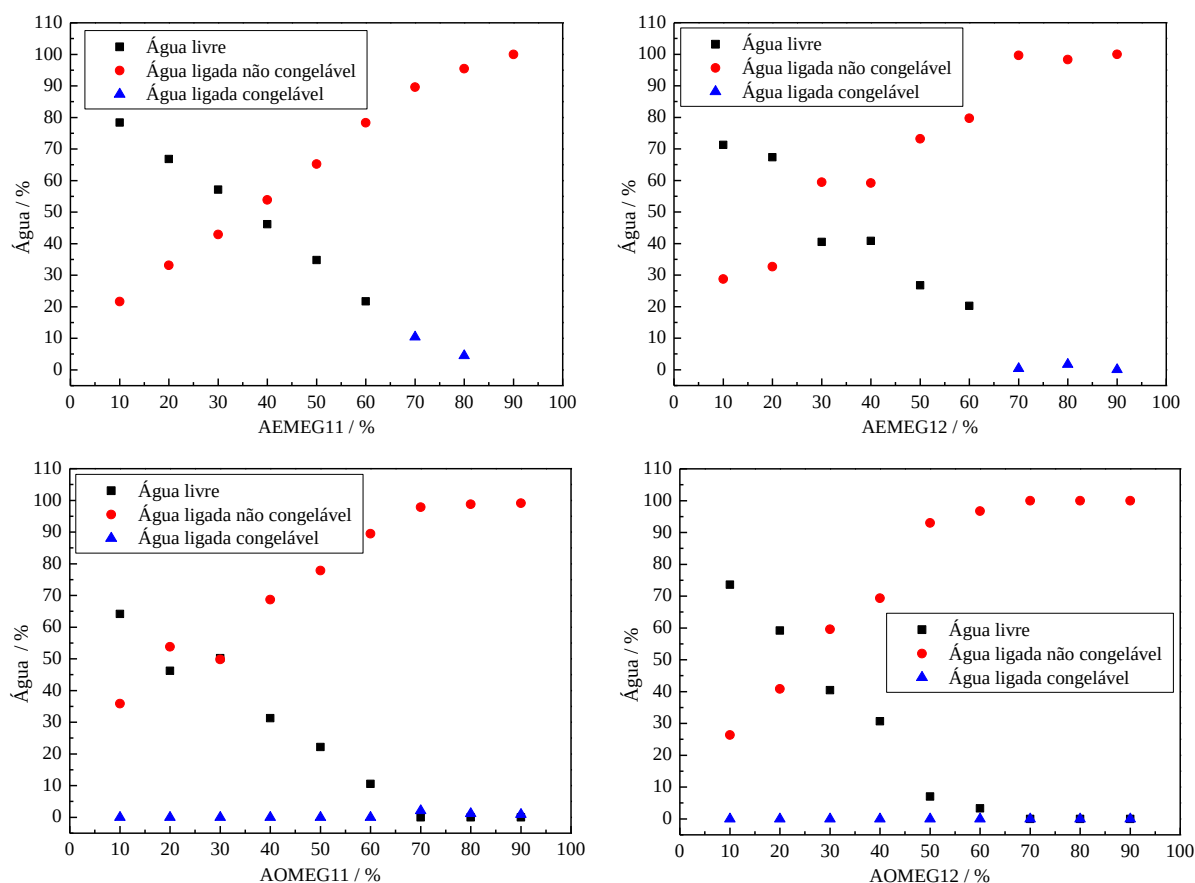


Fonte: Autor.

A partir da Figura 51, é possível observar o congelamento da água mesmo nas suas menores concentrações adicionadas em AOMEG11, enquanto que AOMEG12 apresenta congelamento da água a partir da adição de 40% ou porcentagem maior de água de água. Durante o aquecimento, é possível observar a fusão da água, mas não a transição gel-sol observada nas curvas do ácido esteárico. Além disso, o aumento gradual da quantidade de água leva ao aumento da temperatura *onset* de cristalização, porque parte da água adicionada interage com o material e o restante se comporta como água livre, apresentando *Tonset* de cristalização em temperaturas mais altas do que da água ligada.

É possível ainda realizar o estudo tanto no modo exotérmico, como no endotérmico e, apesar de o modo exotérmico poder apresentar problemas de supercongelamento, este foi escolhido para que informações sobre a microestrutura fossem obtidas, tomando-se as devidas precauções com razões de resfriamento e massa de amostra.

Figura 52 - Representação dos tipos de água e suas respectivas quantidades nos sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 contendo de 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água



Fonte: Autor.

Na Figura 52 estão representados os gráficos que relaciona as quantidades de água livre, ligada congelável e ligada não congelável, a qual não apresenta evento no DSC, indicando que, para os sistemas de ácido esteárico, conforme a quantidade de supra-anfifílico aumenta, a água diminui o caráter de água livre e começa a apresentar maior proporção de água ligada não congelável. O limiar deste comportamento é encerrado entre 60 e 70% de supra-anfifílico nos sistemas, em que a água passa a apresentar caráter de ligada congelável. Comparando os valores de trabalho de adesão, é possível observar que tanto AEMEG11 como AEMEG12 contendo entre 50 e 70% apresentam água do tipo ligada congelável e foram as que apresentaram os maiores trabalhos de adesão (Figura 49), indicando relação entre o tipo de água com a interação do sistema e a superfície biológica.

Os sistemas de ácido oleico, por outro lado, apresentaram água ligada do tipo congelável mantendo a mesma proporção em todas as amostras estudadas. Com relação a diminuição da quantidade de água livre e aumento do tipo ligada não congelável, os resultados são semelhantes ao ácido esteárico, também apresentando um limite entre 60 e 70% de supra-anfifílico.

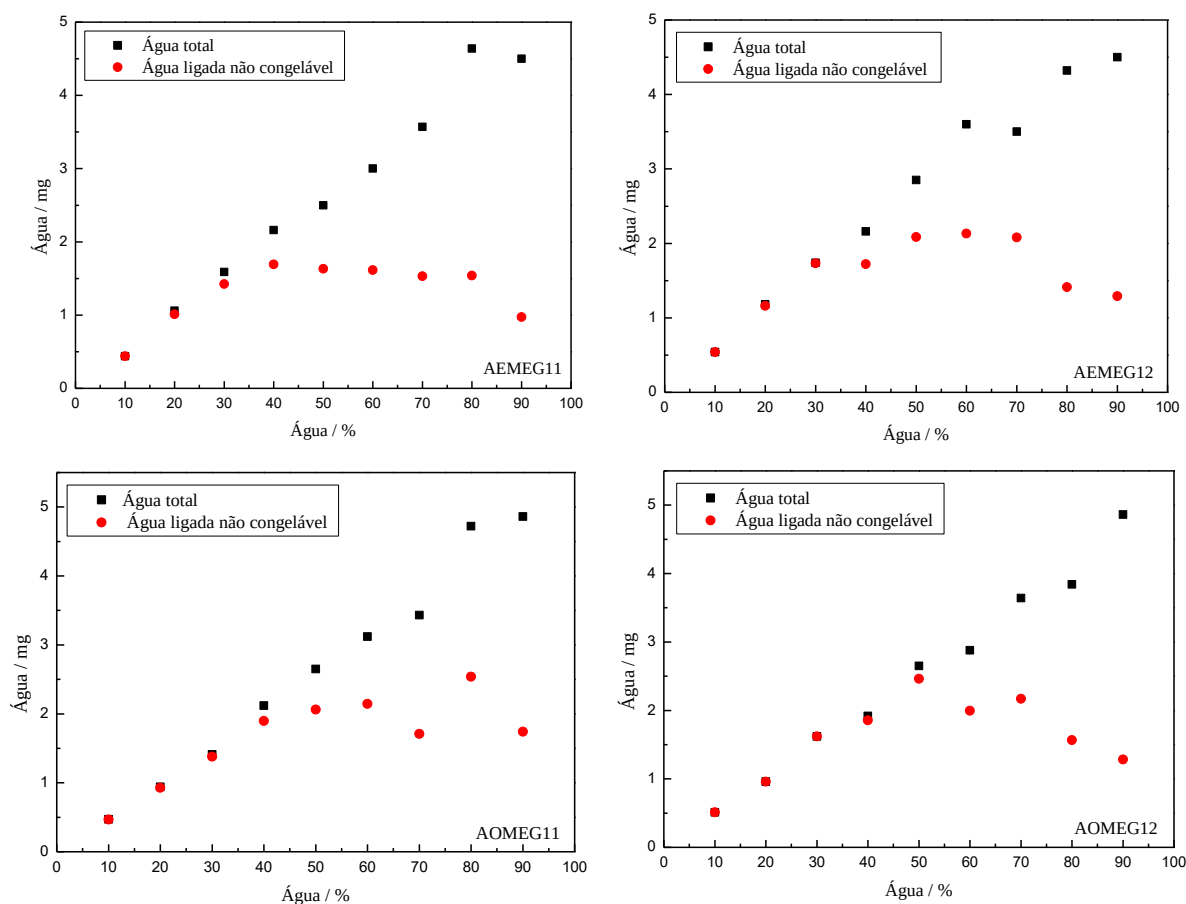
Comparando os tipos de água com os trabalhos de adesão, somente AOMEG11 apresentou relação entre a presença de água ligada do tipo congelável com os maiores trabalhos de adesão, contendo de 40 a 60% de supra-anfifílico.

A relação inversamente proporcional entre a água ligada não congelável com a água livre conforme a proporção do supra-anfifílico em relação a água é alterada pode ser devido a saturação do filme formado por moléculas de água sobre o supra-anfifílico, com o aumento da proporção de água, além de que o excesso de moléculas de água (água livre) altamente ativas é acomodado pobremente no filme anfifílico, convertendo-se a água livre (ZHANG et al., 2013).

A partir da Figura 55, se partirmos dos sistemas contendo 90% de supra-anfifílico e aumentarmos o conteúdo de água gradualmente, observa-se que a quantidade de água ligada congelável aumenta até atingir um valor constante, que corresponde a uma razão molar da quantidade de água total em relação ao supra-anfifílico (70% de supra-anfifílico). Neste ponto, o supra-anfifílico está totalmente ou praticamente hidratado e a partir daí, é possível detectar água livre por DSC. Essa característica é evidente nos sistemas de AEMEG12, com um máximo de 1,7% de água ligada congelável e AOMEG11 apresentando um máximo de 2% deste tipo de água (MITTAL & SHAH, 2002).

Para avaliar se o comportamento da água é alterado apenas entre 60 e 70% de adição de supra-anfifílico, comparou-se a quantidade de água adicionada ao sistema em relação a água ligada não congelável (Figura 53), visto que esta interage diretamente com o supra-anfifílico. Esses gráficos foram plotados em relação à proporção, em porcentagem, de água, ou seja, um sistema cujo eixo da ordenada contém 10% de água, se refere ao sistema contendo 90% de supra-anfifílico, de modo a evidenciar que a proporção de água adicionada a cada sistema interfere diretamente no tipo de água.

Figura 53 - Representação da quantidade de água em massa em relação a quantidade de água adicionada nos sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 contendo 10 a 90% de água

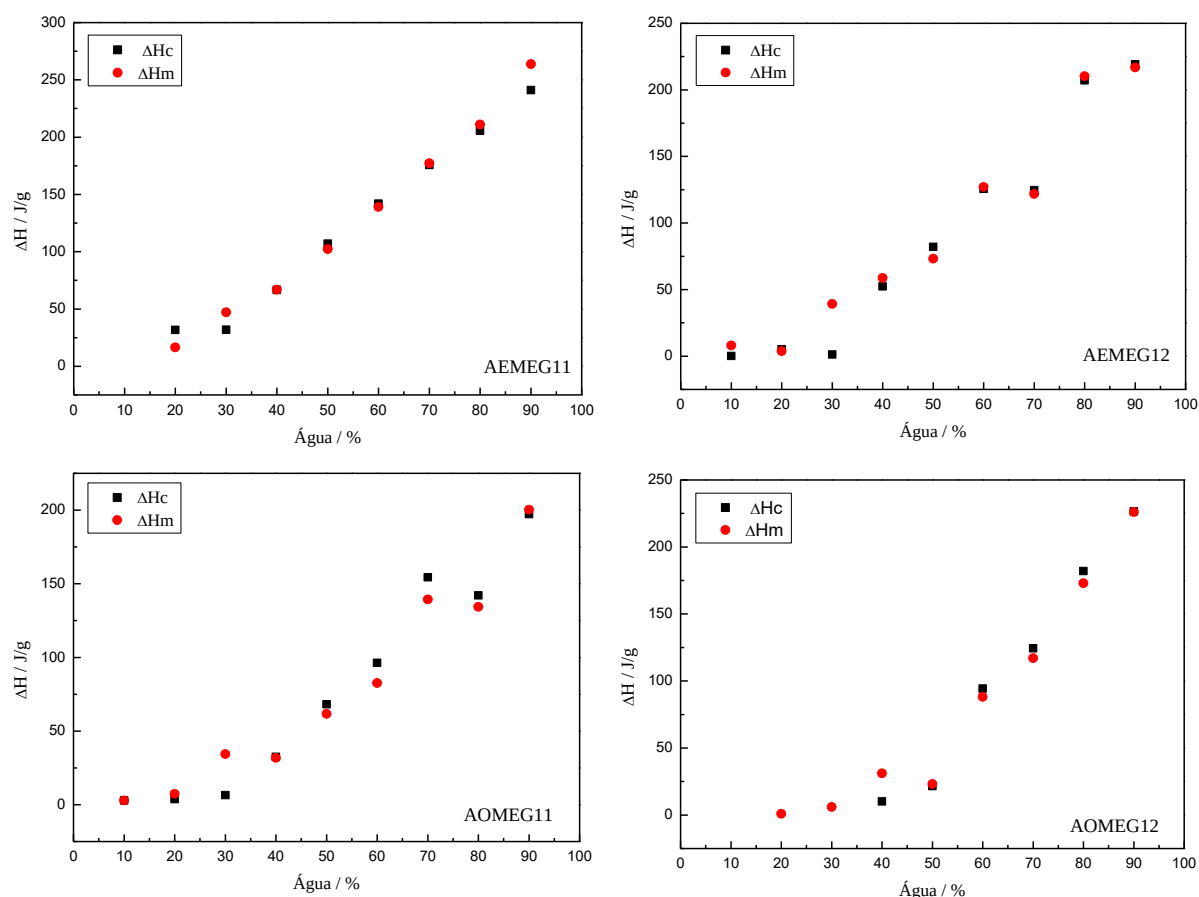


Fonte: Autor.

A partir da Figura 53 é possível observar que a adição de até 30% de água em sistemas de ácido esteárico leva a formação da água do tipo ligada não congelável adicionada ao supra-anfifílico. A partir da adição de 40% ou mais de água, esta quantidade de água ligada não congelável permanece constante até cerca de 80% da proporção de água adicionada ao sistema AEMEG11 e 70% de água em AEMEG12, quando então começa a diminuir sua quantidade.

Em relação aos sistemas de ácido oleico, praticamente toda a água adicionada aos sistemas com proporção de 10 a 40% de água apresentaram a forma de água ligada não congelável. Posteriormente, para AOMEG11, a quantidade de água deste tipo apresentou-se constante, diminuindo apenas com a adição de 70% de água em proporção, enquanto AOMEG12 contendo 50% ainda apresenta grande parte de água ligada do tipo não congelável. A partir de 60% de água adicionada ao AOMEG12, a quantidade de água não congelável começa a diminuir.

Figura 54 - Comparação das variações de entalpia obtidas pelas curvas de resfriamento em relação às curvas de aquecimento dos sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 contendo 10 a 90% de água



Fonte: Autor.

Em relação à variação de entalpia de cristalização e fusão obtidas pelas curvas DSC (Figura 54), é evidente em todos os sistemas que conforme se diminui a proporção de água, a entalpia reduz proporcionalmente. Como os anfifílicos se agregam espontaneamente em meio aquoso, os grupos cabeça hidratados formam uma interface polar/apolar criando uma barreira entre a parte hidrofóbica e a água pura. Os fenômenos de hidratação podem ser atribuídos à capacidade de orientação da água sobre os dipolos dos grupos cabeça dos anfifílicos, além de ser tratada como um fenômeno de solvatação, levando a processos desordenados, a exemplo do aumento da flexibilidade dos grupos cabeça. Desta forma, a hidratação representa a criação de uma interface polar/apolar entre a água e as cadeias dos anfifílicos, levando a uma contribuição tanto de interações inter como intramoleculares a entalpia do sistema (BINDER; KOHLSTRUNK; HEERKLOTZ, 1999). Esse processo de hidratação promovido pela água pode explicar o aumento da entalpia pelo aumento gradual de água nos sistemas.

sólido mesmo com a adição de água, é impossível distribuí-la homogeneamente, dificultando, assim, sua interação com o supra-anfifílico. Desta forma, dependendo do local que a amostra coletada para a análise por DSC tenha sido feita, não houve quantidade de água suficiente para cristalizar na razão de resfriamento aplicada.

O estudo da anisotropia dos sistemas foi realizado em microscópio de luz polarizada (Tabela 22).

Tabela 22 – Estudo da anisotropia dos sistemas de AEMEG11, AEMEG12, AOMEG11 e AOMEG12 contendo 10 a 90% de supra-anfifílico em relação a água

Amostra	AEMEG	MLP	Amostra	AOMEG	MLP
AEMEG11-10%	10%	Campo escuro	AOMEG11-10%	10%	Campo escuro
AEMEG11-20%	20%	Campo escuro	AOMEG11-20%	20%	Campo escuro
AEMEG11-30%	30%	Campo escuro	AOMEG11-30%	30%	Campo escuro
AEMEG11-40%	40%	Estrias	AOMEG11-40%	40%	Estrias
AEMEG11-50%	50%	Estrias	AOMEG11-50%	50%	Estrias
AEMEG11-60%	60%	Estrias	AOMEG11-60%	60%	Estrias
AEMEG11-70%	70%	Estrias	AOMEG11-70%	70%	Estrias
AEMEG11-80%	80%	Estrias	AOMEG11-80%	80%	Estrias
AEMEG11-90%	90%	Estrias	AOMEG11-90%	90%	Estrias
AEMEG12-10%	10%	Campo escuro	AOMEG12-10%	10%	Campo escuro
AEMEG12-20%	20%	Campo escuro	AOMEG12-20%	20%	Campo escuro
AEMEG12-30%	30%	Campo escuro	AOMEG12-30%	30%	Campo escuro
AEMEG12-40%	40%	Estrias	AOMEG12-40%	40%	Estrias
AEMEG12-50%	50%	Estrias	AOMEG12-50%	50%	Estrias
AEMEG12-60%	60%	Estrias	AOMEG12-60%	60%	Estrias
AEMEG12-70%	70%	Estrias + cristais	AOMEG12-70%	70%	Estrias
AEMEG12-80%	80%	Estrias + cristais	AOMEG12-80%	80%	Estrias + cristais
AEMEG12-90%	90%	Estrias + cristais	AOMEG12-90%	90%	Estrias + cristais

Fonte: Autor.

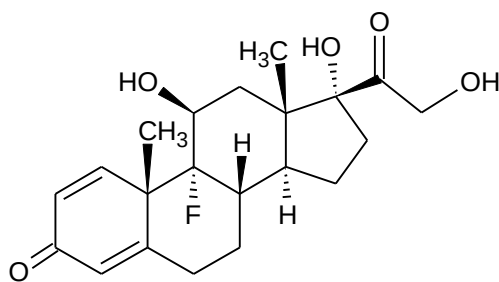
Todos os sistemas apresentaram anisotropia acima de 40% de supra-anfifílico. No entanto, acima de 70% para as amostras compostas por AEMEG12 e acima de 80% para amostras de AOMEG12, foram observados cristais, possivelmente de meglumina que não se misturaram e nem se solubilizaram ao sistema devido à baixa porcentagem de água.

Em relação a possibilidade de aplicação dos sistemas na forma de sistemas de liberação de fármaco em pele, a partir dos resultados obtidos pelos ensaios de bioadesão, estudos de quantidade de água ligada e resultados referentes a anisotropia dos sistemas, as respostas mais

interessantes de bioadesividade, que facilitariam a interação do sistema e, portanto, da formulação para a pele, é encontrada nas amostras intermediárias, ou seja, nas que contêm entre 30 e 60 % de supra-anfifílicos. Além disso, as maiores proporções de água ligada ao sistema foram observadas nas amostras sintetizadas com 30 e 60 % de supra-anfifílicos, e, sabe-se que a água auxilia na interação do sistema com a pele. De acordo com os resultados obtidos por microscopia de luz polarizada, os sistemas com mais de 40 % de supra-anfifílico apresentaram anisotropia na forma de estrias, sugerindo uma ordenação na forma hexagonal, tanto para os derivados de ácido esteárico como para os de ácido oleico, mas levou a formação de cristais quando combinou-se alta concentração de meglumina (superior a 80% de supra-anfifílico) e baixa quantidade de água. Nos últimos anos, os sistemas líquido cristalinos liotrópicos receberam atenção devido ao excelente potencial de aplicação como carreadores de fármacos, destacando as mesofases cúbicas e hexagonais em virtude de suas habilidades em reter desde fármacos até proteínas, peptídios e ácidos nucleicos (GUO et al., 2010). Logo, a fim de verificar a possibilidade de incorporação de fármacos nos sistemas estudados, foram realizados ensaios de liberação com os sistemas que apresentem características interessantes para a liberação de dexametasona em pele, e então optou-se estudar os quatro sistemas compostos por 50% de supra-anfifílico, sendo eles, AEMEG11-50%, AEMEG12-50%, AOMEG11-50% e AOMEG12-50%, de modo a comparar o efeito do dobro de meglumina na liberação, apresentados a seguir.

5.3.1 Avaliação estrutural de sistemas de ácido oleico e de ácido esteárico com 50% de água contendo 0,1% de dexametasona

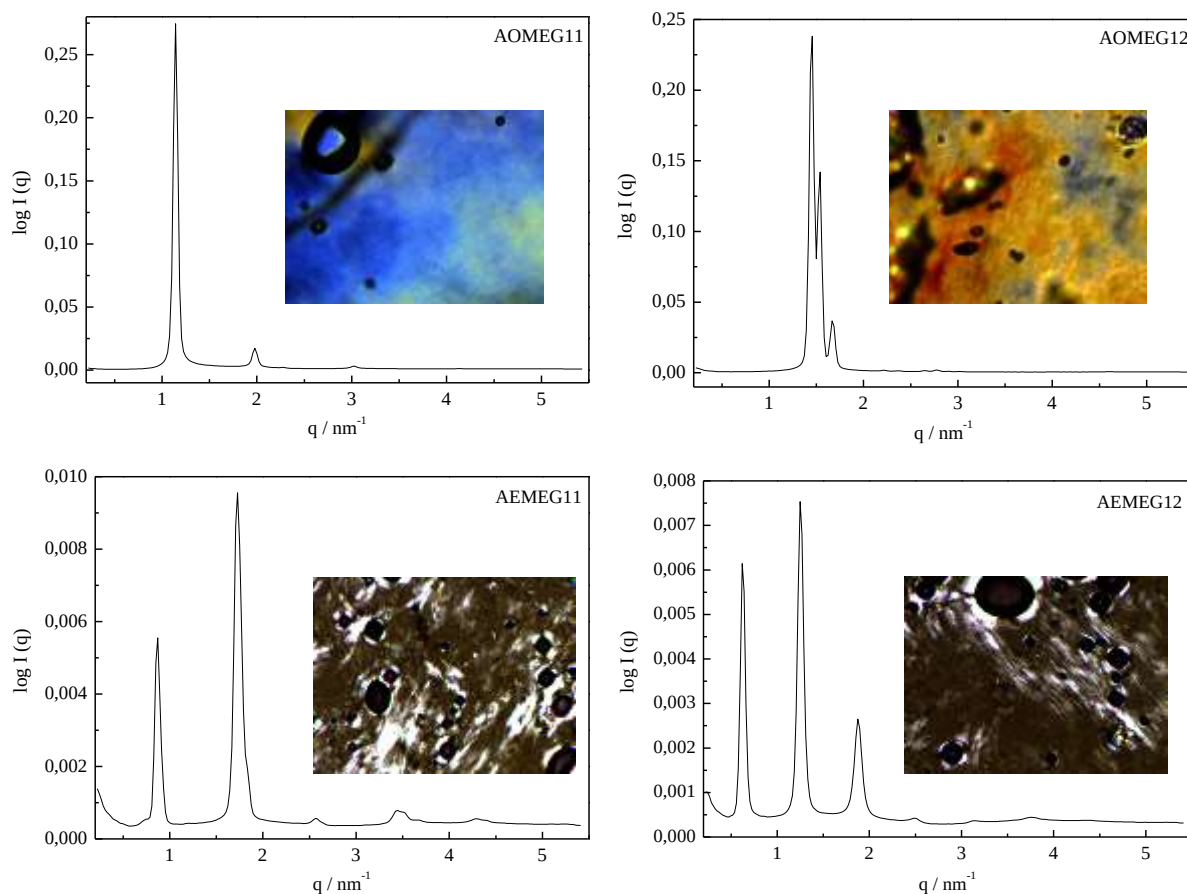
A dexametasona, 9- α -fluoro-11 β ,17,21-tridroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona (Figura 56), apresenta fórmula molecular $C_{22}H_{29}FO_5$ e massa molecular de 392,45, na forma de um pó cristalino próximo ao branco, quase insolúvel em água, mas facilmente solúvel em etanol, acetona, dioxano e metanol, bem como é levemente solúvel em clorofórmio e éter (BERGAMINI, 2008).

Figura 56 - Fórmula estrutural da dexametasona

Fonte: Autor.

A dexametasona é um glicocorticoide e apresenta propriedades glico e mineralocorticoides, anti-inflamatórias e imunodepressoras (ARSAND, 2010).

Após o preparo de formulações contendo 0,1% de dexametasona, estas foram avaliadas por MLP e SAXS (Figura 57) para verificar se houve alteração do tipo de estrutura com a incorporação do fármaco.

Figura 57 - Caracterização por MLP e SAXS dos sistemas AOMEG11F, AOMEG12F, AEMEG11F e AEMEG12F com 50% de água, contendo 0,1 % de dexametasona

Fonte: Autor.

A partir dos resultados de MLP (Figura 57), todas as amostras avaliadas contendo dexametasona apresentaram estrias, que são classificadas como estruturas hexagonais. Com o intuito de confirmar os resultados obtidos por MLP, foi realizado o estudo por SAXS, que geraram resultados mais precisos acerca da estrutura das formulações.

Os sistemas foram avaliados de acordo com a posição dos picos de Braggs ($q_1, q_2, q_3, \dots$), calculando a razão entre os picos q_n obtidos em função do primeiro pico q_1 (Figura 57). Esses resultados estão apresentados na Tabela 23, além dos cálculos do parâmetro de rede a (Equação 1) e distância d entre cilindros adjacentes (Equação 4) para sistemas hexagonais, e o parâmetro espacial d (Equação 6) para sistemas lamelares.

Tabela 23 - Razão entre picos q_n/q_1 e parâmetros de rede, espaciais e distancias entre cilindros para as formulações AOMEG11F, AOMEG12F, AEMEG11F e AEMEG12F

Formulações	Razão q_1/q_n	Estrutura	$d/\text{\AA}$	$a/\text{\AA}$
AOMEG11F	$1:\sqrt{3}:\sqrt{7}$	Hexagonal	5,5	6,3
AOMEG12F	1:1,1:1,1:1,5:1,6:1,8:1,9	Estruturado	4,4	5,0
AEMEG11F	1:2:3:4:5	Lamelar	7,3	-
AEMEG12F	1:2:3,1:4,2	Lamelar	10	-

Fonte: Autor.

Comparando-se as estruturas dos sistemas sem o fármaco (Tabelas 14 e 15) e as formulações (Tabela 23), observa-se que a formulação AOMEG12F tem a estrutura alterada, visto que sem o fármaco apresenta forma hexagonal, enquanto na presença de dexametasona, não é possível encontrar relação entre os picos para determiná-la. Já AEMEG11F, por outro lado, partia de um sistema lamelar com algum outro tipo de estrutura na ausência do fármaco e, em sua presença, organiza-se totalmente na forma lamelar, ou seja, neste caso, a dexametasona auxilia, de alguma forma, na organização do sistema. AOMEG11F e AEMEG12F mantiveram suas estruturas idênticas aos originais, antes da adição do fármaco.

Em relação aos parâmetros de rede d e a distância entre cilindros adjacentes, para AOMEG11F os valores em presença e na ausência de dexametasona foram semelhantes. Para AOMEG12F, a presença do fármaco reduziu seus valores, mas como não foi possível determinar o tipo de estrutura, pode ser que este cálculo usado para estruturas hexagonais não esteja de acordo com o tipo de estrutura verdadeiro, já que não pode se inferir uma relação entre os picos de Braggs.

O cálculo do parâmetro espacial d de AEMEG11-50% para AEMEG11F aumentou de 5,9Å para 7,3Å, provavelmente em virtude de um melhor rearranjo do sistema que pode ter

aprisionado o fármaco, aumentando seu tamanho. Já este parâmetro para AEMEG12-50% permaneceu o mesmo na presença e ausência de dexametasona. Nesse caso, como há um excesso de meglumina, é provável que o fármaco tenha se alocado entre elas.

5.3.2 Desenvolvimento e validação do método para quantificação de dexametasona nos estudos de liberação *in vitro*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O objetivo da validação é verificar se o método é apropriado para uma determinada finalidade, seja ela qualitativa, semi-qualitativa ou quantitativa de fármacos e outras substâncias presentes em produtos farmacêuticos. Desse modo, a partir de dados experimentais, a validação torna-se uma garantia de que o método, quando devidamente executado, apresenta resultados confiáveis. Para tanto, é necessário a avaliação de alguns parâmetros, como linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003).

Linearidade

Na Tabela 24 estão apresentados os valores das áreas sob a curva, gerados na leitura das soluções de diferentes concentrações. Para esses valores foram calculadas as curvas analíticas.

Tabela 24 - Concentrações das soluções padrão de dexametasona usadas para a construção de curvas analíticas e os respectivos valores da área sob a curva (ASC) obtida por HPLC no comprimento de onda a 241 nm, com n = 3

[DEX] / $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,500	1,00	2,50	5,00	10,0	25,0	50,0
ASC / mAU	110,687	216,1648	488,8681	997,8972	1981,663	5027,709	9740,601
DP	2,51194	4,614673	6,440844	6,953294	36,58082	66,69808	46,27434
CV / %	2,26941	2,134794	1,317502	0,696795	1,845965	1,32661	0,475067
ASC / mAU	99,8118	194,3245	499,2942	972,1246	1815,307	4783,401	9614,715
DP	2,106498	4,236984	13,92283	13,0551	179,4244	82,53762	122,1965
CV / %	2,11047	2,180366	2,788503	1,342945	9,88397	1,725501	1,270932
ASC / mAU	91,16211	188,843	464,1991	937,1217	1834,87	4654,222	9231,744
DP	5,21577	5,815479	16,15263	17,33656	9,294527	61,25624	23,35537
CV / %	5,721423	3,079531	3,479678	1,849979	0,50655	1,316143	0,25299
ASC / mAU	89,60749	182,8472	456,5396	893,4424	1789,998	4524,879	9091,393
DP	5,029637	4,363039	12,48256	17,22721	16,70653	38,78323	72,85161
CV / %	5,612965	2,386167	2,734168	1,928184	0,933327	0,857111	0,801325
ASC / mAU	97,71916	190,0487	457,5939	912,9152	1830,215	4574,858	8882,228
DP	7,448678	6,108341	9,931415	16,7055	47,26042	103,8126	342,0169
CV / %	7,622536	3,214093	2,170356	1,829907	2,582234	2,269199	3,850575
ASC / mAU	97,83757	187,5734	467,5933	908,1573	1810,742	4627,637	9107,642
DP	8,264954	3,67726	9,859615	44,81794	34,21829	21,31303	30,01108
CV / %	8,447628	1,960438	2,108588	4,935041	1,889739	0,46056	0,329515
ASC / mAU	94,38677	176,7104	448,6254	903,0665	1746,167	4406,864	8708,423
DP	3,833316	12,4278	7,69494	16,78093	5,158708	48,99795	93,01123
CV / %	4,061285	7,032863	1,715226	1,858217	0,29543	1,111855	1,068061

[DEX] = concentração de dexametasona; ASC = área sobre a curva; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. **Fonte:** Autor.

A partir das 7 curvas obtidas nos 5 dias, com n = 3, é possível obter suas respectivas curvas de regressão linear (Tabela 25). No eixo X encontra-se a concentração de dexametasona em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o eixo Y apresenta a área do pico em mV s^{-1} .

Tabela 25 - Valores do intercepto no eixo Y, inclinação da curva de regressão linear a partir das diferentes concentrações de dexametasona

	Curva	Intercepto no eixo Y (área do pico mV s^{-1})	Inclinação da curva	Coeficiente de correlação r^2
Dia 1	1	195,3375	28,83849	0,999885
Dia 2	2	192,1573	-11,9723	0,999924
Dia 3	3	184,7851	4,623611	0,999989
	4	181,8134	-8,82131	0,999993
	5	178,0147	30,31308	0,999899
	6	182,466	7,910947	0,999966
Dia 5	7	174,1945	15,70842	0,999981

Fonte: Autor.

Especificidade

De acordo com a literatura, a partir do estudo de sistemas estruturados de liberação de dexametasona foi demonstrado que o método aplicado neste trabalho é específico para determinar dexametasona e que o fármaco dexametasona eluiu em aproximadamente 5 minutos. Neste trabalho, utilizou-se uma coluna maior e, por isso, o tempo de retenção do fármaco também foi maior do que o encontrado na literatura (OYAFUSO, 2012).

Precisão

A precisão avalia quão próximos são os resultados obtidos em uma série de medidas para uma mesma amostra e é verificada quanto a repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo esta última não aplicada no projeto.

A repetibilidade (precisão intra-corrida) se refere a concordância entre os resultados em um curto período de tempo obtidos pelo mesmo analista e mesma instrumentação. Para tanto, são avaliadas no mínimo 9 determinações, contemplando concentrações baixa, média e alta.

A precisão intermediária (precisão inter-corridas) verifica a concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório em dias diferentes, podendo ser avaliado com analistas ou equipamentos diferentes.

A precisão pode ser expressa como o coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação 8.

$$CV\% = \frac{DP}{CMD} 100\% \quad (8)$$

Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável do DPR é de até 5% (BRASIL, 2003).

Para o estudo da repetibilidade obteve-se os resultados que estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Resultados obtidos para o estudo da precisão por repetibilidade (n = 3)

[DEX] _{teórica} (µg.mL ⁻¹)	área	DP	DPR (%)
2,50	456,53	0,06390	2,918
10,0	1789,9	0,08553	0,9486
50,0	9091,3	0,37295	0,8039

DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo. **Fonte:** Autor.

De acordo com os resultados obtidos para o DPR, mesmo o valor de 2,918% ainda está dentro do permitido, já que não ultrapassa 5%, demonstrando que o método é preciso.

Na Tabela 27 estão apresentados os resultados para verificar a precisão intermediária.

Tabela 27 - Resultados obtidos para o estudo da precisão intermediária (n = 3)

[DEX]_{teórica} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	área	DP	DPR (%)
2,5	2,188	0,05637	2,57
10	9,018	0,3210	3,56
50	45,77	1,894	4,13

DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo. **Fonte:** Autor.

Assim como no estudo da repetibilidade, a precisão intermediária também apresenta DPR abaixo de 5%, demonstrando a precisão do método em acordo com a ANVISA.

Exatidão

A exatidão de um método analítico descreve a proximidade entre os resultados obtidos em relação a um valor de referência (BRASIL, 2003). A expressão da exatidão foi dada pela porcentagem de recuperação da concentração de dexametasona comparada com a concentração verdadeira do fármaco em cada uma das amostras. Foram avaliadas 3 concentrações, baixa, média e alta, com 5 replicatas, utilizando resultados obtidos em um mesmo dia. Os resultados estão apresentados na Tabela 28, com os respectivos DP e DPR.

Tabela 28 - Cálculos de exatidão para a validação do método de quantificação de dexametasona por HPLC

	[DEX]_{teórica} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	2,50	10,0	50,0
Média	2,214	9,050	45,70
DP	12,30	27,25	264,4
DPR (%)	2,667	1,516	2,953
Recuperação	88,57	90,50	91,40

DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo. **Fonte:** Autor.

Os resultados de DPR estão abaixo de 5%, demonstrando a precisão do método de acordo com o que preconiza a ANVISA. Além disso, o método mostrou-se exato já que os valores de recuperação permaneceram dentro da faixa de 80 e 110% (BRASIL, 2003).

Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor quantidade de analito detectada numa amostra, de acordo com as condições experimentais estabelecidas. Sua estimativa pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha base (ICH, 2005), determinada pela seguinte equação:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (9)$$

Em que, DPa é o o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de detecção; IC é a inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito que pode ser determinada de maneira precisa e exata, estabelecido a partir da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco (ICH, 2005). Pode ser expresso pela equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (10)$$

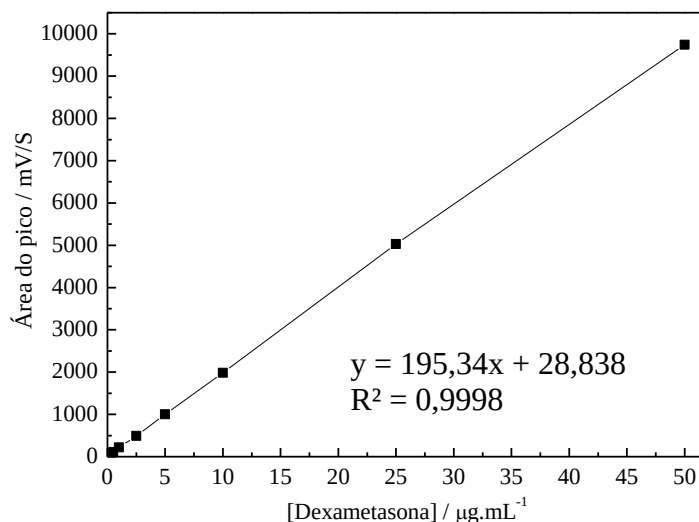
Em que, DPa é o o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação; IC é a inclinação da curva de calibração.

A partir da leitura das áreas sob a curva das amostras de concentrações 2,50, 10,0 e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e das equações, o limite de detecção é de 0,04092 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o limite de quantificação é de 0,1364 $\mu\text{g mL}^{-1}$, consideravelmente abaixo da menor concentração empregada na curva analítica.

5.3.3 Metodologia analítica para quantificação de dexametasona nos estudos de liberação *in vitro*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Nessa etapa do trabalho a ideia era verificar se os materiais desenvolvidos respondiam a variação do pH, estudando-os em pH neutro, 7,4 e pH ácido, 5,0, este último próximo ao ambiente de inflamações ou câncer. Após o procedimento de validação do método, procurou-se quantificar o fármaco estudado utilizando HPLC. Comparando-se os valores de R, bem como os coeficientes de variação das amostras dentre as diversas curvas de reta geradas, escolheu-se a seguinte (Figura 58) para os cálculos de liberação de dexametasona *in vitro*.

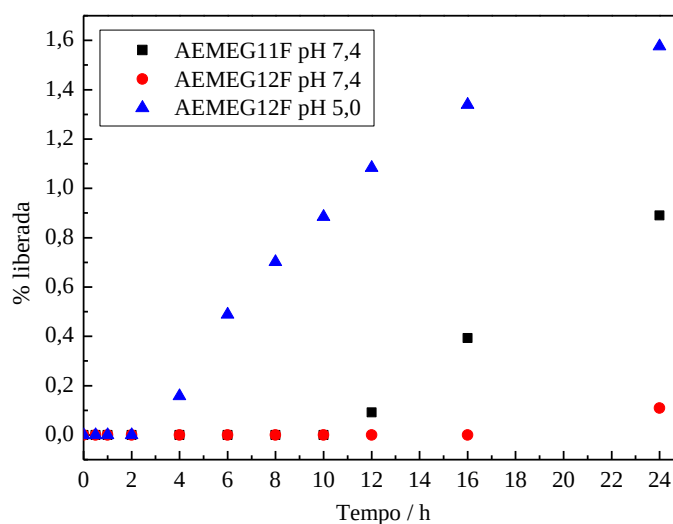
Figura 58 - Curva analítica de dexametasona em tampão fosfato de potássio 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4 contendo 0,5% Procetyl®



Fonte: Autor.

O teste de liberação *in vitro* das formulações AEMEG11F, AEMEG12F, AOMEG11F e AOMEG12F com 50% de água contendo 0,1 % de dexametasona foi realizado (Figura 59), a fim de verificar o comportamento de saída do fármaco do sistema matricial em pH 7,4. No entanto, apenas as formulações de ácido esteárico liberaram o fármaco nesse pH. Por isso, AEMEG12F foi estudado também em pH 5. Da mesma maneira, AOMEG12F também foi estudado em pH 5, porém, também não exibiu liberação do fármaco estudado.

Figura 59 - Perfil de liberação *in vitro* de DEX incorporada nas formulações AEMEG11F e AEMEG12F contendo 0,1 % de dexametasona (n=6) em pH 7,4 e pH 5,0



Fonte: Autor.

As formulações de ácido esteárico, AEMEG11F e AEMEG12F liberaram dexametasona após 10 e 24 horas, respectivamente, demonstrando o aprisionamento do fármaco na estrutura do material, nas condições estudadas de pH 7,4 e temperatura 32,4°C. Por esse pH ser próximo ao do sistema de ácido esteárico, em se tratando de um sistema supramolecular, é provável que ele não tenha alterado sua conformação, ou seja, nesse pH as ligações cruzadas do material foram mantidas, impedindo a liberação do fármaco. Por isso foi realizado o ensaio de liberação da dexametasona em pH 5,0, próximo a condições anormais da pele, como inflamação ou em presença de células cancerígenas. Neste caso, o sistema AEMEG12F apresentou liberação do fármaco estudado logo nas primeiras 4h de estudo, bem como uma liberação crescente até o intervalo de 24h, totalizando 1,6% de dexametasona liberada. A princípio, essa porcentagem de liberação de dexametasona pode parecer baixa, mas tudo depende do tipo de aplicação, já que um fármaco tóxico, por exemplo, não pode ser prontamente liberado em dosagens altas. Além disso, é possível que outros fármacos apresentem comportamentos de liberação diferentes do apresentado para a dexametasona.

É importante destacar que a variação no pH influencia na quantidade e tempo do fármaco liberado, demonstrando que esses biomateriais podem ser tratados como “*smart materials*”, por responderem a um estímulo externo. De acordo com (GUO et al., 2010), normalmente as mesofases cúbica e hexagonal foram as mais estudadas nos últimos anos como sistemas de liberação de fármacos, no entanto, ao contrário desta afirmação, a liberação da dexametasona a partir dos sistemas contendo ácido oleico, organizados em forma hexagonal, não foram capazes de liberar a dexametasona quando comparados ao sistema de ácido esteárico, de forma lamelar. Ainda segundo esse grupo mencionado, é evidente que o comportamento de liberação está relacionado com muitos outros aspectos, tais como as propriedades do fármaco, quantidade inicial de água, capacidade de entumescimento, retenção do fármaco, interações eletrostáticas entre o fármaco, entre outros.

O estudo da liberação da dexametasona das formulações homólogas de ácido oléico não liberaram o fármaco acima do limite de detecção, por isso, considera-se que não houve liberação. Alguns modelos cinéticos para liberação foram testados, mas nenhum apresentou resultados que representassem o perfil de liberação do fármaco adequadamente. Além disso, sabe-se que a liberação do fármaco depende diretamente de suas interações com o sistema, bem como com o estímulo externo avaliado, facilitando ou não, sua liberação.

6 CONCLUSÃO

Supra-anfifílicos formados por dois ácidos graxos homólogos, ácido oleico e ácido esteárico, pela adição de meglumina são mantidos por interação eletrostática entre o grupo carboxilato do ácido graxo com o grupamento amina da meglumina.

Os sistemas contendo no mínimo 40% de supra-anfifílico apresentam anisotropia. Quando os sistemas são avaliados por SAXS, é possível verificar a possibilidade de organização hexagonal para sistemas de ácido oleico, e para os sistemas de ácido esteárico, a partir de 20% de supra-anfifílico, foi observada estrutura lamelar.

O planejamento experimental avaliou três variáveis em três níveis, quantidade de solvente adicionado para a síntese do supra-anfifílico, a razão molar de ácido graxo-meglumina (1:1, 1:1,5 e 1:2) e temperatura (65, 72 e 80°C) de adição da água, compondo sistemas de ácido oleico e de ácido esteárico, comparando os resultados de DSC, MLP e Bioadesão, a razão molar é a única resposta que influencia os resultados de DSC e Bioadesão para ambos os ácidos graxos estudados.

Pelos resultados de DSC, também é possível verificar diferenças de comportamento nas curvas de aquecimento dos sistemas de ácido oleico e ácido esteárico, por este último apresentar uma transição gel-sol com temperatura *onset* de 45°C antes da evaporação da água.

O estudo dos tipos de água demonstrou que a adição de proporções crescentes propõe a existência de água ligada não-congelável, água ligada congelável e água livre, e, a partir de 40% de água, os sistemas atingem o limite de água na forma não-congelável.

A adição de 0,1% do fármaco dexametasona não alterou a organização estrutural dos sistemas contendo 50% de supra-anfifílico em água, que mantiveram a forma hexagonal, em AOMEG11F e lamelar para AEMEG12F. Foi também realizada a validação do método de quantificação de dexametasona e os ensaios de liberação de dexametasona apresentaram resultados positivos apenas para os sistemas de ácido esteárico, com liberação tanto em pH 7,4, mas mais evidente em pH 5,0 para AEMEG12F.

O planejamento experimental foi importante para diminuir a quantidade de amostras preparadas, mas com as máximas informações possíveis, de modo a avaliar as diferentes respostas com diferentes variáveis, gerando economia dos reagentes de síntese. Os sistemas foram estudados na área farmacêutica para verificar a possibilidade de atuarem como materiais responsivos a estímulos externos, além de terem como base a auto-organização, que converge com as definições da Química Supramolecular.

REFERÊNCIAS

- AIDA, T.; MEIJER, E. W.; STUPP, S. I. Functional supramolecular polymers. **Science**, v. 335, n. 6070, p. 813–817, 2012.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010.
- ARIGA, K. et al. Molecular recognition: from solution science to nano/materials technology. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 17, p. 5800, 2012.
- ARSAND, D. R. **Anti-inflamatório Dexametasona**: estudos de biodegradabilidade , toxicidade, ocorrência e degradação oxidativa avançada em efluente hospitalar. 2010. 121 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- ATWOOD, J. L.; STEED, J. W. **Encyclopedia of Supramolecular Chemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 1648 p.
- BALDWIN, R. History of the Chlorine Industry. **Journal of Chemical Education**, v. 4, n. 3, p. 313–319, 1927.
- BASIT, H. et al. Two-component hydrogels comprising fatty acids and amines: structure, properties, and application as a template for the synthesis of metal nanoparticles. **Chemistry - A European Journal**, v. 14, n. 21, p. 6534–6545, 2008.
- BEER, P. D.; GALE, P. A. Anion recognition and sensing: The state of the art and future perspectives. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 40, n. 3, p. 487–516, 2001.
- BERGAMINI, G. **Dexametasona**: interação com ácidos carboxílicos aromáticos no estado sólido. 2008. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- BHATNAGAR, V. M. Clathrate Compounds of Quinol. **Defence Science Journal**, v. 13, p. 57–66, 1963.
- BINDER, H.; KOHLSTRUNK, B.; HEERKLOTZ, H. H. Hydration and lyotropic melting of amphiphilic molecules : a thermodynamic study using humidity titration calorimetry. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 235–249, 1999.
- BOSMAN, A. W. et al. Supramolecular polymers: from scientific curiosity to technological reality. **Macromolecular Symposia**, v. 201, p. 143–154, 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, DF, 2003.

- BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com *o*-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. S1-S7, 2014.
- BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. **Statistical design** – Chemometrics, Amsterdã: Elsevier, 2006. 422 p.
- BUSSERON, E. et al. Supramolecular self-assemblies as functional nanomaterials. **Nanoscale**, v. 5, n. 16, p. 7098–7140, 2013.
- BUUR, J. L. et al. Pharmacokinetics of flunixin meglumine in swine after intravenous dosing. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 5, p. 437–440, 2006.
- CARVALHO, F. C.; et al. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, 2012.
- CASSIMIRO, D. L. et al. Structural aspects, thermal behavior, and stability of a self-assembled supramolecular polymer derived from flunixin-meglumine supramolecular adducts. **Thermochemica Acta**, v. 529, p. 59–67, 2012.
- CASSIMIRO, D. L. et al. Kinetic parameters for thermal decomposition of supramolecular polymers derived from diclofenac – meglumine supramolecular adducts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 24–28, 2013.
- CASSIMIRO, D. L. et al. On the influence of fatty acid chain unsaturation on supramolecular gelation of aminocarbohydrate-based supra-amphiphiles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 5, p. 1–11, 2018.
- CHEN, X. et al. Dual responsive supramolecular nanogels for intracellular drug delivery. **Chemical Communications**, v. 50, n. 29, p. 3789–3791, 2014.
- CHICHAK, K. S. et al. Molecular Borromean rings. **Science**, v. 304, n. 5675, p. 1308–1312, 2004.
- CLARK, J. H. Green chemistry: challenges and opportunities. **Green Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 1999.
- CONSTABLE, E. C.; HOUSECROFT, C. E. Coordination chemistry: the scientific legacy of Alfred Werner. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 4, p. 1429–1439, 2013.
- COSTA, L. M. et al. Factorial design employed for microwave-assisted digestion of bean samples. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 149–152, 2006.
- CRAM, D. J.; BAUER, R. H. Macro Rings. XX. Transannular Effects in π - π -Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, p. 5971–5977, 1959.
- CRAM, D. J. et al. Spherands - Ligands whose binding of cations relieves enforced electron-electron repulsions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 101, p. 6752–6754, 1979.

CSABA, N.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ALONSO, M. J. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1–2, p. 205–214, 2009.

CUNICO, M. W. M. W. M. et al. Factorial Desing: a Valuable Statistic Tool To Define Experimental Parameters Applied in Scientific Research. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23–32, 2008.

DE CAMPOS, D. D. P. et al. Avaliação por saxs e DSC das interações entre H₂O e Renex-100. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 355–359, 2012.

DEMUTH, P. et al. Mesoscale porous silica as drug delivery vehicles: Synthesis, characterization, and pH-sensitive release profiles. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 141, n. 1–3, p. 128–134, 2011.

DENNIS, CARINA; CAMPBELL, P. The eternal molecule. **Nature**, v. 421, p. 82–139, 2003.

DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G. Advances in Physics Intercalation compounds of graphite. **Advances in Physics**, v. 51, n. 1, p. 139–326, 1981.

DUAN, Q. et al. pH-responsive supramolecular vesicles based on water- soluble pillar [6] arene and ferrocene derivative for drug delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 10542–10549, 2013.

DYSON, P. J.; JOHNSON, B. F. G.; MARTIN, C. M. Ruthenium cluster-[2.2]paracyclophane complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 175, n. 1, p. 59–89, 1998.

ESCHENMOSER, A.; WINTNER, C. E. Natural product synthesis and vitamin B₁₂. **Science**, v. 196, n. 4297, p. 1410–1420, 2016.

FERREIRA, L. M. B. et al. Structural and Thermal Behavior of Meglumine-Based Supra-Amphiphiles in Bulk and Assembled in Water. **Langmuir**, v. 32, n. 45, p. 11878–11887, 2016.

FERREIRA-FILHO, J. C. R.; CORREIA, G. T.; MASTROIANNI, P. C. Acesso a medicamentos essenciais em farmácias e drogarias do município de Araraquara. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 177-182, 2010.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301–313, 2005.

FOUQUEY, C.; LEHN, J. -M; LEVELUT, A. -M. Molecular recognition directed self-assembly of supramolecular liquid crystalline polymers from complementary chiral components. **Advanced Materials**, v. 2, n. 5, p. 254–257, 1990.

GANTA, S. et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 126, n. 3, p. 187–204, 2008.

GARTI, N. (Ed.). **Thermal behavior of dispersed systems**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2001.

GOROFF, N. S. Mechanism of fullerene formation. **Accounts of Chemical Research**, v. 29, n. 2, p. 77–83, 1996.

GUO, C. et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23–24, p. 1032–1040, 2010.

HARRIS, K. D. M.; THOMAS, J. M. Structural aspects of urea inclusion compounds and their investigation by X-ray diffraction: a general discussion. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 86, n. 17, p. 2985, 1990.

HART, L. R. et al. Healable supramolecular polymers. **Polymer Chemistry**, v. 4, n. 18, p. 4860, 2013.

HIDA, W. T. Estudo comparativo do desempenho visual e análise de frente de onda entre as lentes intra-oculares multifocais difrativas Tecnis® ZM900 e AcrySof® ReSTOR® SN60D3. **Arquivos Brasileiros Oftalmológicos**, v. 71, n. 6, p. 788–792, 2008.

HODGKIN, D. C. et al. Structure of vitamin B12. **Nature**, v. 178, p. 64–66, 1956.

HOLMQVIST, P.; ALEXANDRIDIS, P.; LINDMAN, B. Modification of the microstructure in poloxamer Block copolymer-water-“oil” systems by varying the “oil” type. **Macromolecules**, v. 30, n. 22, p. 6788–6797, 1997.

HU, Q.-D. et al. Cationic supramolecular nanoparticles for co-delivery of gene and anticancer drug. **Chemical Communications**, v. 47, n. 19, p. 5572, 2011.

HUANG, F.; SCHERMAN, O. A. Supramolecular polymers. **Chemical Society reviews**, v. 41, n. 18, p. 5879–80, 21 set. 2012.

HYDE, S. T. Identification of Lyotropic Liquid Crystalline Mesophases. In: **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. Nova Iorque: Wiley, cap. 16, p. 299–332.

ICH. International Conference on Harmonization. Topic Q2 (R1). **Validation of analytical procedures**: text and methodology. 2005.

IJIMA, M. et al. Effect of thermal history on kappa-carrageenan hydrogelation by differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**, v. 452, n. 1, p. 53–58, 2007.

IKEDA, I.; EMURA, H.; OKAHARA, M. Hydrophilicity and complexing ability of alkyl lariat ethers. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 57, n. 6, p. 1612–1616, 1984.

INAGAKI, M. Applications of graphite intercalation compounds. **Rapid Communications**, v. 4, n. 6, p. 1560–1568, 1989.

JONES, D. S.; BROWN, A. F.; WOOLFSON, D. Rheological characterization of bioadhesive, antimicrobial, semisolids designed for the treatment of periodontal diseases: transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 12, p. 1978-1990, 2001.

KANG, Y. et al. Supra-Amphiphiles for Functional Assemblies. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 48, p. 8920–8931, 2016.

KANG, Y.; LIU, K.; ZHANG, X. Supra-amphiphiles: A new bridge between colloidal science and supramolecular chemistry. **Langmuir**, v. 30, n. 21, p. 5989–6001, 2014.

KRAKOWIAK, K. E.; BRADSHAW, J. S. Syntheses of the Cryptands. A Short Review. **Israel Journal of Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 3–13, 1992.

KRISCHE, M. J.; LEHN, J. M. The utilization of persistent H-bonding motifs in the self-assembly of supramolecular architectures. **Molecular Self-Assembly**, v. 96, p. 3–29, 2000.

KUROKAWA, S. S. S. **Sistemas anfifílicos derivados de meglumina**: uma nova abordagem no desenvolvimento de biomateriais supramoleculares. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2014.

LEHN, J.-M. Supramolecular chemistry. **Science**, v. 260, p. 1762–1763, 1993.

LEHN, J.-M. **Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1995.

LEHN, J.-M. Química / Ciência Supramolecular Algumas Conjecturas e Perspectivas *. **Química**, v. 79, p. 8–15, 2000.

LEHN, J. M. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 36, p. 151–160, 2007.

LI, S.-L. et al. Advanced supramolecular polymers constructed by orthogonal self-assembly. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 18, p. 5950–5958, 2012.

LIM, Y.; MOON, K.-S.; LEE, M. Recent advances in functional supramolecular nanostructures assembled from bioactive building blocks. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 4, p. 925–934, 2009.

LIU, K. et al. 25th Anniversary article: Reversible and adaptive functional supramolecular materials: “noncovalent interaction” matters. **Advanced Materials**, v. 25, n. 39, p. 5530–5548, 2013.

LIU, Y.; WANG, Z.; ZHANG, X. Characterization of supramolecular polymers. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 18, p. 5922, 2012.

LOMBARDO, D. et al. Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches. **Advances in Condensed Matter Physics**, v. 2015, p. 1–22, 2015.

MENGER, F. M. Supramolecular chemistry and self-assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 8, p. 4818–4822, 2002.

MITTAL, K. L.; SHAH, D. O. (Ed.) **Adsorption and aggregation of surfactants in solution**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2002. 724 p.

MÜLLER, S. **Studies on Inclusion Resolution**: gaining insight into chemical and physical properties. 2003. 144 f. Tese (Ciências Naturais, Matemática e Informática) - Radboud University, Geleen, 2003.

NGUYEN, S. T. et al. Supramolecular chemistry: Functional structures on the mesoscale. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 21, p. 11849–11850, 2001.

NOBELPRIZE.ORG. **The Nobel Prize in Chemistry 1987**. 2014a. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1987/>. Acesso em: 05 abr. 2018.

NOBELPRIZE.ORG. **The Nobel Prize in Chemistry 1996**. 2014b. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1996/>. Acesso em: 05 abr. 2018.

NOBELPRIZE.ORG. **The Nobel Prize in Chemistry 2003**. 2014c. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/>. Acesso em: 05 abr. 2018.

OBERT, E. et al. Both water- and organo-soluble supramolecular polymer stabilized by hydrogen-bonding and hydrophobic interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 50, p. 15601–15605, 2007.

ODA, R. et al. Tuning bilayer twist using chiral counterions. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 566–569, 1999.

OLIVEIRA, B. G.; ARAÚJO, R. C. M. U.; RAMOS, M. N. A Topologia molecular qtaim e a descrição mecânico- quântica de ligações de hidrogênio e ligações de di-hidrogênio. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1155–1162, 2010.

OSHOVSKY, G. V.; REINHOUDT, D. N.; VERBOOM, W. Supramolecular chemistry in water. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 14, p. 2366–2393, jan. 2007.

OYAFUSO, M. H. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas micro e nanoestruturados para a administração cutânea de acetato de dexametasona**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2012.

PAL, A. et al. Structure and properties of two component hydrogels comprising lithocholic acid and organic amines. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 25, p. 4325–4334, 2009.

PALIN, D.E. POWELL, H. M. The Structure of Molecular Compounds. Part VI. The B-Type Clathrate Compounds of Quinol. **Journal of the Chemical Society**, n. 0, p. 815–821, 1948.

PAULING, L.; MARSH, R. E. The Structure of Chlorine Hydrate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 38, n. 2, p. 112–118, 1952.

PEDERSEN, C. J. The discovery of crown ethers (Nobel address). **Angewandte Chemie**, v. 100, n. 8, p. 1053–1059, 1988.

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 246–253, 2002.

PEREIRA-FILHO, E. R.; PEREIRA, F. M. V.; LEMOS, S. G. Introducing factorial design concepts using experiments with multi-colored chocolates. **Chemical Educator**, v. 14, p. 200–203, 2009.

PEREIRA-FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química**: maximizando a obtenção de resultados. 1 ed. São Carlos: EDUFSCAR, 2015. 88 p.

PETKAU-MILROY, K.; BRUNSVELD, L. Supramolecular chemical biology; bioactive synthetic self-assemblies. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 219–232, 2013.

POPR, M. et al. Properties of cationic monosubstituted tetraalkylammonium cyclodextrin derivatives - Their stability, complexation ability in solution or when deposited on solid anionic surface. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 11, p. 192–199, 2015.

PRÜLL, C.-R. Part of a scientific master plan? Paul Ehrlich and the origins of his receptor concept. **Medical history**, v. 47, n. 3, p. 332–356, 2003.

RAMANATHAN, M. et al. Amphiphile nanoarchitectonics: from basic physical chemistry to advanced applications. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 26, p. 10580, 2013.

REZAEIVALA, M.; KEYPOUR, H. Schiff base and non-Schiff base macrocyclic ligands and complexes incorporating the pyridine moiety - The first 50 years. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 280, p. 203–253, 2014.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1076–1082, 1998.

RYBTCHINSKI, B. Adaptive supramolecular nanomaterials based on strong noncovalent interactions. **ACS Nano**, v. 5, n. 9, p. 6791–6818, 2011.

SANTOS, L. J. DOS et al. Fulereo [C₆₀]: química e aplicações. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 680–693, 2010.

SENATRA, D. et al. Conformational Changes at the Microemulsion Water/oil Interface and their Influence on the System's Dielectric Temperature Behavior. **IEEE Transactions on**

Electrical Insulation, v. 23, n. 4, p. 579–589, 1988.

SIJBESMA, R. P. et al. Reversible polymers formed from self-complementary monomers using quadruple hydrogen bonding. **Science**, v. 278, p. 1601-1604, 1997.

SILVA, J. A. et al. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da ferramenta alcóolica. **Química Nova**, v. 31, p. 1073-1077, 2008.

STEED, J. W.; TURNER, D. R.; WALLACE, K. J. **Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry**. Chichester: Wiley, 2007. 320 p.

STEENSMA, D. P.; SHAMPO, M. A.; KYLE, R. A. Max Perutz and the Structure of Hemoglobin. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 8, p. e89, 2015.

TA INSTRUMENTS. **Thermal analysis to determine various forms of water present in hydrogels**. New Castle, s. n. (Nota técnica TA384). Disponível em: <<http://www.tainstruments.com/pdf/literature/TA384.pdf>>. Acesso em: 29 jun. 2018).

TANAKA, M.; HAYASHI, T.; MORITA, S. The roles of water molecules at the biointerface of medical polymers. **Polymer Journal**, v. 45, n. 7, p. 701–710, 2013.

TANOJO, H. et al. In Vitro Human Skin Barrier Modulation by Fatty Acids: Skin Permeation and Thermal Analysis. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 42–49, 1997.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

THIEMANN, O. H. A descoberta da estrutura do DNA: de Mendel a Watson e Crick. **Química Nova na Escola**, v. 17, p. 13-15, 2003.

TOKSOZ, S.; ACAR, H.; GULER, M. O. Self-assembled one-dimensional soft nanostructures. **Soft Matter**, v. 6, n. 23, p. 5839–5849, 2010.

UHLENHEUER, D. A.; PETKAU, K.; BRUNSVELD, L. Combining supramolecular chemistry with biology. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 2817–2826, 2010.

USP 29. The United States Pharmacopeia. **Rockville, USP Convention, 2006**.

VICENS, J.; VICENS, Q. Emergences of supramolecular chemistry: From supramolecular chemistry to supramolecular science. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 71, n. 3–4, p. 251–274, 30 jun. 2011.

WANG, B. Y.; XU, H.; ZHANG, X. Tuning the amphiphilicity of building blocks: Controlled self-assembly and disassembly for functional supramolecular materials. **Advanced Materials**, v. 21, n. 28, p. 2849–2864, 2009.

WANG, Z. et al. Microstructure and rheological properties of liquid crystallines formed in Brij 97/water/IPM system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, n. 2, p. 813–818, 2006.

WEBER, E.; VÖGTLE, F. Crown-Type compounds - an introductory overview table of contents. In: VÖGTLE, F.; WEBER, E. (Ed.). **Host Guest Complex Chemistry / Macrocycles**. Berlin-Heidelberg: Springer, 1981. v. 98p. 1–41.

XU, X. et al. Smart Nanovehicles based on ph-triggered disassembly of supramolecular peptide-amphiphiles for efficient intracellular drug delivery. **Small**, v. 10, n. 6, p. 1133–1140, 2014.

YAN, X. et al. Stimuli-responsive supramolecular polymeric materials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 18, p. 6042, 2012.

ZAYED, J. M. et al. Chemical complexity—supramolecular self-assembly of synthetic and biological building blocks in water. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 2806–2816, 2010.

ZHANG, H. et al. Structure-Activity Relationship of a U-Type Antimicrobial Microemulsion System. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–6, 2013.

ZHANG, W.; GAO, C. Morphology transformation of self-assembled organic nanomaterials in aqueous solution induced by stimuli-triggered chemical structure changes. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 5, p. 16059–16104, 2017.

ZHANG, X.; WANG, C. Supramolecular amphiphiles. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 94–101, 2011.

ZHU, S. et al. Interaction of acid soap of triethanolamide stearate and stearic acid with water. **J. Phys. Chem. B**, v. 111, p. 1016–1024, 2007.