



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química



Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e
Doutorado

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SÍLICA MESOPOROSA E
ESTUDO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE EMODINA COMO
SUBSTÂNCIA BIOATIVA.**

Jessé Marques da Silva

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Utrera Martines

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo

Campo Grande - 2015

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SÍLICA MESOPOROSA E
ESTUDO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE EMODINA COMO
SUBSTÂNCIA BIOATIVA.**

Jessé Marques da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Utrera Martines

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo

Campo Grande – 2015

“A experiência não permite nunca atingir a certeza absoluta. Não devemos procurar obter mais que uma probabilidade.”

Bertrand Russel

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Marco Antonio Utrera Martines e co-orientador Carlos Alexandre Carollo, pelos ensinamentos, confiança e amizade fornecidas.

À minha família, especialmente a minha mãe, Myrian Pastore da Silva e meu pai, José Flávio Marques da Silva por todo suporte, amor e confiança, desde sempre depositados. Também ao meu irmão, Lucas Marques da Silva, pela amizade e cumplicidade.

Aos colegas do grupo de pesquisa QSMB: Juliana K., Juliana J. Edita, Fernanda, Osmar, Daniel, Silvana, Teófilo, Michelli e todos outros que contribuíram com o trabalho.

Às amigas próximas, Dênis, Enéas, Ramiro, Rossi, Marcello, Danilo, Leonardo B., Igor e Renata. Às amigas distantes, Ricardo Zoio, Pedro Paulo, Ali, Rodrigo, Michael e Leonardo J. por todos os momentos de diversão.

À CAPES pela bolsa de mestrado

E todos que de alguma forma interferiram em minha vida, contribuindo com minha formação.

RESUMO

A forma mais comum, e também uma das mais convenientes, de administração de fármacos é via oral. Porém, nem todo fármaco pode ser administrado dessa forma, já que podem apresentar baixa solubilidade ou até mesmo sofrer degradação, como as enzimas e peptídeos; existem ainda alguns fármacos que causam efeitos colaterais muito intensos, como os anticâncer. Buscando desenvolver métodos de liberação controlada que pudessem proteger o fármaco de possíveis degradações, e que ainda fizessem sua liberação de forma controlada, pesquisadores desenvolveram sistemas de liberação controlada (SLC) que, por definição, são sistemas nos quais o agente ativo é liberado independentemente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida. No método convencional de administração são necessárias diversas doses espaçadas ao longo do dia, ocorrendo momentos com alta e baixa concentração do fármaco. Nos sistemas de liberação controlada esta concentração permanece quase constante por um longo período, diminuindo a quantidade de doses necessárias para o tratamento e evitando situações de baixas e altas dosagens. Com isso, são minimizados os efeitos adversos, além de proporcionar um melhor aproveitamento da substância pelo organismo com a possibilidade ainda da liberação ser localizada. Existem vários materiais que podem ser utilizados como SLC; dentre eles, destacam-se os nanomateriais mesoporosos que possuem: grande área superficial e volume de poros; diâmetro de poros, tamanho e forma de partículas controláveis; estabilidade química e biocompatibilidade. O tamanho e organização dos poros podem ser controlados através de direcionadores de estrutura diversos. A emodina é uma antraquinona encontrada em várias plantas e apresenta várias atividades biológicas como vasorrelaxamento, imunossupressão, hepatoproteção e anti-tumorais. Além disso, é largamente utilizada como laxativo. Apesar da ampla gama de atividades, a emodina apresenta baixa solubilidade, o que prejudica sua biodisponibilidade por via oral. A sílica SBA-16 produzida neste trabalho possui $526 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ de área superficial e poros com 5 nm de diâmetro, a matriz foi capaz de incorporar $2,83 \text{ mg g}^{-1}$ de emodina e liberou cerca de 27% do fármaco impregnado. Foram também realizadas caracterizações por espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS); espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR); microscopia eletrônica de varredura (MEV), e adsorção-dessorção de N_2 a 77 K utilizando a técnica de BET.

ABSTRACT

The most common, and also convenient, way of drug administration is oral. However, not all drugs can be administered orally because some present low solubility or even suffer degradation, as do the enzymes and peptides; some drugs can even cause intense side effects, like the anticancer drugs. Controlled release drug delivery systems are a method that could protect the drug from possible degradation, and that could release the drug in a controlled way, researchers developed controlled release systems drug delivery systems (DDS) which, by definition, are systems in which the active agent is liberated regardless of external factors and with well established kinetics. In the conventional way of drug administration, various doses are necessary throughout the day, which lead to moments of high drug concentration in the organism as moments with low concentration. With DDS, the drug concentration remains almost constant for long periods, reducing the number of necessary doses for the treatment and avoiding situations of low and high dosages. Doing that, the systems of controlled release minimize the adverse effects and provide a better use of the substance by the organism with the possibility to do localized releases. There are several materials that can be used as DDS and, among them, the mesoporous nanomaterials stand out as they have: large surface areas and pore volume; the diameter of pores, size and shape of the controlled particles; chemical stability and biocompatibility. The size and organization of pores can be controlled through diverse structural templates. Emodin is an anthraquinone found in various plants and has several biological activities like vasorelaxation, immunosuppression, hepatoprotection and anti-tumoral. In addition, this compound is largely used as a laxative. Despite the large spectrum of activities, emodin presents low solubility which hampers its oral bioavailability. The synthesized SBA-16 silica has $526 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ of surface area and $5,0 \text{ nm}$ of pore size, the matrix were cable to incorporate $2,83 \text{ mg g}^{-1}$ of emodin and released about 27% of it. It was also made characterization by small angle X-ray scattering (SAXS); absorption spectroscopy in infrared region (FTIR); scanning electronic microscopic (SEM) and adsorption-desorption of N_2 at 77 K using BET technics.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Comparação dos perfis de liberação imediata ou convencional (–) e liberação controlada (– –) de um fármaco no organismo..... | 15 |
| Figura 2 – Representação da liberação de fármaco por difusão em um (a) sistema monolítico e (b) sistema reservatório | 17 |
| Figura 3 – Representação de um sistema de liberação controlada por osmose (SADAHIRA, 2007). ... | 18 |
| Figura 4 – Sistema de liberação controlada por desintegração da matriz..... | 18 |
| Figura 5 – Comparação de distribuição de diâmetros de poros dos materiais micro, meso e macroporosos..... | 19 |
| Figura 6 – Representação das estruturas dos materiais do tipo MCM. (a) MCM-41; (b) MCM-48; MCM-50. | 20 |
| Figura 7 - Ilustrações de agregados micelares: (A) esférica, (B) cilíndrica, (C) planar, (D) reversa, (E) fase bicontínua (ou cúbica), (F) lipossomas. | 22 |
| Figura 8 – Comparação entre os sistemas de cristal líquido moldante (a) e mecanismo cooperativo de cristal líquido moldante (b). | 22 |
| Figura 9 – Representação das interações entre surfactantes e precursor inorgânico. As interações eletrostáticas estão representadas em a-d; as interações por ligação de hidrogênio em e-f; onde (S) surfactante; (I) precursor inorgânico; (X) contra-íons. Os símbolos (⁺ ⁰ ⁻) representam os caracteres catiônico, neutro e aniônico, respectivamente. | 24 |
| Figura 10 – Representações das estruturas presentes na sílica..... | 25 |
| Figura 11 – Comparação entre os sistemas (a) hexagonal e (b) cúbico..... | 26 |
| Figura 12 - Representação esquemática da síntese de SBA-16. | 27 |
| Figura 13 - Estrutura química da emodina..... | 29 |
| Figura 14 - Isotermas de adsorção-dessorção de N ₂ a 77K da amostra de sílica mesoporosa SBA-16. Distribuição de tamanho de poros inserida no gráfico..... | 39 |
| Figura 15 – Espectro vibracional de absorção na região do Infravermelho por transformada de Fourier. Em destaque temos as bandas referentes à ligações C-H, indicando a remoção do surfactante. | 41 |
| Figura 16 - DRX da amostra de sílica SBA-16..... | 42 |
| Figura 17 - Micrografias da sílica SBA-16. Nos detalhes algumas partículas com formato hexagonais. | 43 |
| Figura 18 – Cromatografia líquida de uma solução padrão de emodina..... | 44 |
| Figura 19 - Curva de Calibração utilizando metanol como solvente..... | 48 |
| Figura 20 - Liberação de emodina impregnada em sílica mesoporosa SBA-16 | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Gradiente de eluição das fases móveis: água com 1% de ácido acético (A) e acetonitrila com 1% de ácido acético (B) | 38 |
| Tabela 2 - Valores obtidos através das análises de adsorção de N ₂ | 40 |
| Tabela 3 -- Dados de desvio padrão e precisão da curva analítica. | 45 |
| Tabela 4 - Dados de Precisão e Exatidão..... | 46 |

LISTA DE ABREVIACÕES

BET - Brunauer-Emmett-Teller

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CD – Concentração Determinada

CT – Concentração Teórica

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

DAD – Detector de Arranjo de Diodo

Dp - Diâmetro de poros

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

DRX - Difração de raios X

E – Exatidão

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LSS – Lauril Sulfato de Sódio

M41S - Mobil 41: Synthesis

MCM - Mobil Composition of Matter

TEOS - Tetraetilortossilicato

TGA – Análise Termogravimétrica

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

SBA - Santa Barbara Amorphous

S-BET – Área específica

SLC - Sistema de Liberação Controlada

ÍNDICE

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Introdução | 13 |
| 2 | Revisão Bibliográfica | 15 |
| 2.1 | Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos..... | 15 |
| 2.2 | Mecanismos de Liberação Controlada | 16 |
| 2.3 | Matrizes Para SLCs | 18 |
| 2.4 | Materiais Mesoporosos..... | 19 |
| 2.5 | Síntese de Materiais Mesoporosos. | 21 |
| 2.6 | Interações entre direcionadores de estrutura e precursor inorgânico. | 23 |
| 2.7 | Sílica Mesoporosa | 24 |
| 2.8 | Sílica SBA-16 | 26 |
| 2.9 | Emodina..... | 28 |
| 3 | Objetivos | 30 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 30 |
| 3.2 | Objetivos Específicos..... | 30 |
| 4 | Parte Experimental..... | 31 |
| 4.1 | Materiais e Reagentes..... | 31 |
| 4.1.1 | Materiais | 31 |
| 4.1.2 | Reagentes..... | 31 |
| 4.2 | Métodos | 33 |
| 4.2.1 | Método de Síntese de Sílica Mesoporosa SBA-16..... | 33 |
| 4.2.2 | Validação da metodologia analítica | 33 |
| 4.2.3 | Método de impregnação de emodina em sílica..... | 34 |
| 4.2.4 | Determinação da solubilidade de emodina no meio de liberação | 34 |
| 4.2.5 | Quantificação da emodina na sílica mesoporosa..... | 35 |
| 4.2.6 | Liberação do fármaco in vitro | 35 |
| 4.3 | Técnicas de caracterização..... | 36 |
| 4.3.1 | Isotermas de adsorção – dessorção de Nitrogênio a 77 K..... | 36 |
| 4.3.2 | Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 36 |
| 4.3.3 | Difratometria de Raios X (DRX) | 36 |
| 4.3.4 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 37 |
| 4.3.5 | Análise Termogravimétrica (TGA) | 37 |

| | |
|---|----|
| 4.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 37 |
| 5 Resultados e Discussão | 39 |
| 5.1 Sílica Mesoporosa | 39 |
| 5.1.1 Isotermas de adsorção – dessorção de Nitrogênio a 77 K | 39 |
| 5.1.2 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 40 |
| 5.1.3 Espalhamento de Raios-X à Baixo Ângulo (SAXS)..... | 42 |
| 5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 43 |
| 5.2 Validação da metodologia analítica | 44 |
| 5.2.1 Seletividade | 44 |
| 5.2.2 Linearidade..... | 44 |
| 5.2.3 Precisão e Exatidão | 45 |
| 5.2.4 Limites de Detecção e Quantificação | 47 |
| 5.3 Sílica Mesoporosa impregnada com Emodina | 48 |
| 5.3.1 Impregnação e quantificação de Emodina na sílica. | 48 |
| 5.3.2 Solubilidade da emodina no meio de liberação..... | 49 |
| 5.3.3 Taxa de Liberação da Emodina..... | 49 |
| 6 Conclusões..... | 51 |
| 7 Referências..... | 52 |

1 Introdução

Atualmente os métodos de administração de fármacos são em geral por via oral, tópica, transmucosal (bucal, sublingual, nasal, vaginal, ocular e retal) e por inalação. Porém, alguns fármacos, como enzimas, peptídeos, vacinas entre outros, não podem ser administrados por essas rotas por possível ação enzimática ou baixa absorção pelo sistema circulatório devido às dimensões ou propriedades físico-químicas do fármaco (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1997). Há também fármacos que causam efeitos colaterais em concentrações terapêuticas, a exemplo podemos citar os fármacos anti-câncer, que causam náuseas, fraqueza, dores de cabeça, entre outras adversidades que dificultam a continuidade do tratamento.

Visando maneiras de evitar esses problemas, desenvolveu-se novos métodos de liberação de fármacos que pudessem proteger o fármaco de possíveis degradações e que ainda fizessem a liberação de forma constante e controlada, denominados Sistemas de Liberação Controlada (SLC). Por definição, são sistemas nos quais o agente ativo é liberado com uma cinética bem estabelecida (BAKER, 1987). Os SLC se baseiam em uma matriz capaz de incorporar certa quantidade de fármaco e liberá-lo de forma controlada.

Materiais mesoporosos possuem poros com tamanho entre 2 e 50 nm e apresentam estrutura organizada, grande área superficial e distribuição de tamanho de poros regular, o que confere a estes materiais características apropriadas a diversas aplicações, incluindo sistema de liberação controlada de fármacos. A sílica mesoporosa é uma boa opção para este tipo de sistema já que apresenta biocompatibilidade, possibilidade de preencher os poros com um fármaco, para posterior liberação e possibilidade de fazer modificações químicas na superfície de suas paredes (SLOWING et al., 2008).

A emodina é uma antraquinona com ampla distribuição na natureza, em plantas como rubarbo e babosa e também alguns fungos. Este composto apresenta atividades anti-carcinogênica, vasorelaxante, hepatoprotetiva, entre outras (SRINIVAS et al., 2007; PAN, WANG, J. e HUANG, N. 2007). Apesar das atividades biológicas apresentadas, a emodina possui baixa solubilidade em água e pode causar efeitos colaterais adversos, como laxativo, motivo pelo qual é largamente utilizado na medicina popular.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um SLC utilizando sílica mesoporosa como matriz carreadora. O fármaco utilizado para esse estudo foi a emodina, substância abundante

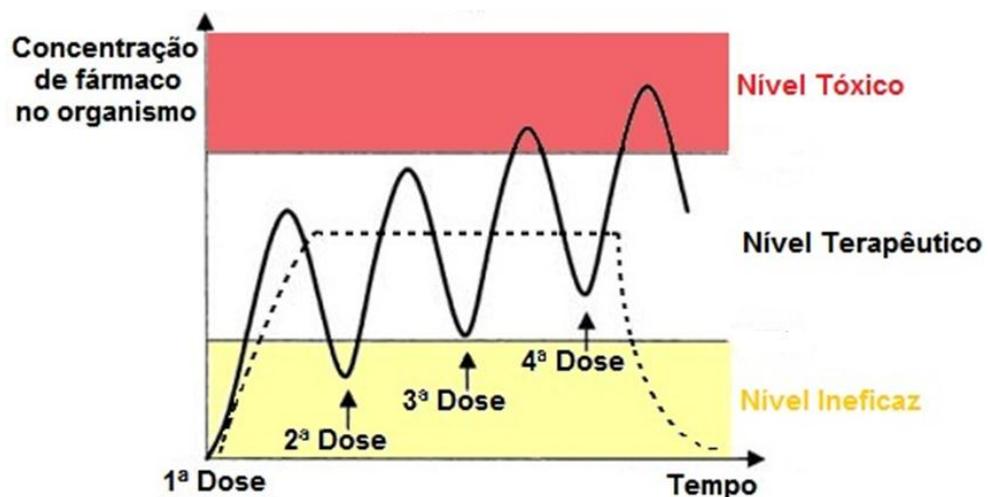
no reino vegetal que apresenta importantes atividades biológicas.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Nos métodos convencionais de liberação de fármacos (comprimidos, cápsulas, injeções) o organismo recebe uma dose elevada do princípio ativo devido à liberação imediata, conforme ocorre o metabolismo o nível desse fármaco decresce devido à eliminação pelo organismo ou transformação química do mesmo nos processos metabólicos. Passado algum tempo após a administração, a concentração desse fármaco no organismo já não é a mesma e não apresentará atividade terapêutica, sendo necessário administrar outra dose, o que provoca a brusca elevação da concentração, a um nível agora maior que o da primeira dose, já que ainda restava um pouco do fármaco no organismo. Esse tipo de administração de fármacos provoca grande oscilação na concentração do princípio ativo, podendo alternar entre doses não eficientes e tóxicas. Para contornar essa situação pode-se criar um dispositivo que armazene o fármaco e depois o libere de forma a manter sua concentração constante dentro da faixa terapêutica independente de fatores externos (DASH e CUDWORTH., 1998; LANGER, 1990).

Figura 1 - Comparação dos perfis de liberação imediata ou convencional (—) e liberação controlada (- - -) de um fármaco no organismo.



Fonte: adaptado de Dash e Cudworth (1998)

Os SLCs são objetos de pesquisa amplamente investigados, há diversas publicações científicas, e isso se justifica quando observamos as vantagens que esse tipo de sistema oferece à biomedicina, como desenvolver novos tratamentos para doenças utilizando diversos fármacos, melhorando a eficácia e segurança, ou até mesmo permitindo o uso de fármacos que não são viáveis. Esses sistemas podem também melhorar a biodisponibilidade, diminuir a dose e o número de administrações necessárias ao paciente, reduzindo problemas relacionados à super/sub-dosagens, tornando o tratamento mais efetivo e menos agressivo ao paciente (LANGER, 1990; ZHANG et al, 2013).

Apesar das diversas vantagens, há alguns problemas que devem receber a devida atenção quando se trata de SLC. Dependendo da natureza físico-química da matriz usada como carreador pode haver uma demora no início da liberação do fármaco, por exemplo, se a matriz for do tipo reservatório, para ocorrer a liberação do fármaco é necessário ocorrer a dissolução das paredes da matriz, o que leva certo tempo até o fármaco entrar de fato na corrente sanguínea. Outro problema é a dificuldade de interrupção da administração, caso o paciente apresente algum sintoma de intolerância ao fármaco, além de ser mais difícil fazer uma adaptação posológica para cada indivíduo. Em relação à viabilidade econômica do tratamento, o uso de SLCs torna o custo da dose maior caso comparado à administração convencional, mas a longo prazo considerando diversas doses, o tratamento fica mais viável, já que o número de doses utilizando os SLCs é bem menor (LYRA et al., 2007).

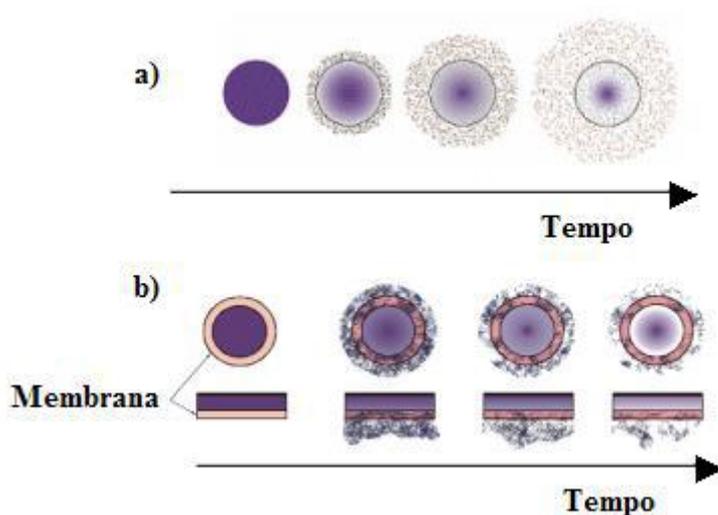
Um SLC é baseado em uma matriz particulada que serve como transportador do fármaco, sendo que este pode estar retido ou disperso na matriz, que tanto pode ser uma nanopartícula como uma nanocápsula, sendo então divididos em sistemas reservatório (sistema com o fármaco encapsulado) e monolítico (o fármaco está disperso na matriz) (SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.2 Mecanismos de Liberação Controlada

Há três mecanismos distintos para realizar a liberação controlada do fármaco: difusão, ativação do solvente e reação química. No mecanismo de difusão a matriz pode ser tanto do tipo reservatório como monolítico. Nas matrizes monolíticas, o fármaco é liberado através dos poros que a matriz apresenta, sendo que a taxa de liberação depende fortemente do tipo de

matriz utilizado. Nos sistemas de reservatório o fármaco atravessa a parede polimérica da matriz, portanto a natureza química da parede, assim como sua espessura também influenciam a taxa de liberação, Figura 2 (GUTOWSKA et al., 1997).

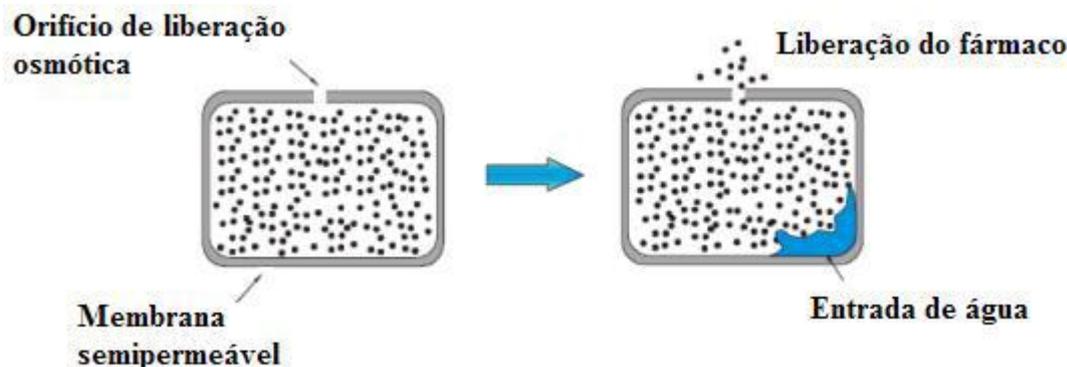
Figura 2 – Representação da liberação de fármaco por difusão em um (a) sistema monolítico e (b) sistema reservatório



Fonte: adaptado de Sadahira (2007)

Nos sistemas por ativação do solvente a liberação pode ocorrer por dois mecanismos: osmose ou absorção de água. Nos sistemas de liberação controlada por osmose, a matriz deve ser um reservatório, ou seja, uma nanocápsula com um orifício por onde o fármaco pode ser liberado, as paredes da partícula devem ser compostas por uma membrana semipermeável. Ao ser administrado, esse sistema entra em meio aquoso e a água começa penetrar a partícula, aumentando a pressão interna da partícula e expulsando o fármaco através do orifício (Figura 3). Nos sistemas controlados por absorção de água, o fármaco está disperso numa matriz de material hidrofílico, ao absorver água a partícula permite a saída do fármaco, portanto a taxa de liberação está diretamente associada a quantidade de água absorvida (GUTOWSKA et al., 1997).

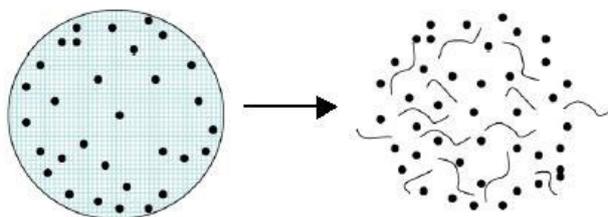
Figura 3 – Representação de um sistema de liberação controlada por osmose (SADAHIRA, 2007).



Fonte: adaptado de Sadahira (2007)

Os sistemas de liberação controlados por reação química podem ocorrer também de duas maneiras: por desintegração da matriz, representado na Figura 4, e por quebra de ligação, quando o fármaco está ligado covalentemente à matriz. (HAMADI, AZADI e RAFIEI, 2008).

Figura 4 – Sistema de liberação controlada por desintegração da matriz



Fonte: adaptado de Fredenberg (2011)

2.3 Matrizes Para SLCs

A matriz a ser utilizada em um sistema de liberação controlada deve atender alguns requisitos para que seja considerada viável. A matriz deve apresentar biocompatibilidade, ter a capacidade de encapsular ou incorporar o fármaco, deve ser capaz de atingir o tecido alvo e fazer a liberação de forma controlada. (SLOWING et al., 2008).

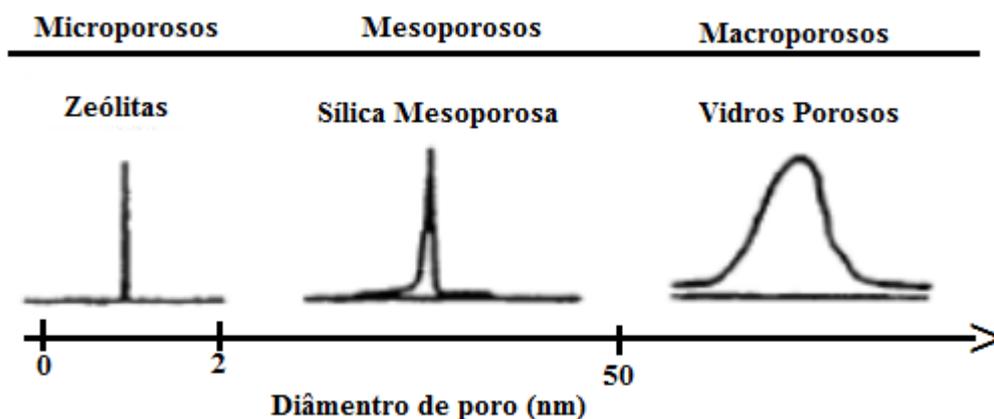
A literatura apresenta uma grande variedade de nanomateriais utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos. Dentre eles, pode-se citar os lipossomos

(HOSTA-RIGAU et al., 2010), copolímeros em bloco (YANG et al., 2010), dendrímeros (SHEN et al., 2010), nanocompósitos (PANVZYK, WARZOCHA e CAMP., 2010), biocerâmicas (BARO et al., 2002) e nanopartículas porosas (SLOWING et al., 2008). Estes últimos, similarmente às partículas que propostas neste trabalho, apresentam como vantagens a grande área superficial; volume dos poros; diâmetro dos poros controláveis, tamanho e forma de partículas controláveis; estabilidade química; duas superfícies de fácil funcionalização (dentro ou fora dos poros), dentre outras propriedades (SLOWING et al., 2008).

2.4 Materiais Mesoporosos

Materiais porosos atraem muita atenção dos cientistas e da indústria devido a grande variedade de aplicações que esses materiais possuem, como por exemplo em tecnologias de adsorção, catálise, separação molecular, sensores, etc. Podemos classificar esses materiais dividindo-os quanto ao tamanho de seus poros (SING et al., 1985), os materiais microporosos são aqueles com diâmetro de poros menor que 2nm (zeólitas), mesoporosos com diâmetro entre 2 e 50nm (sílicas M41S, SBA) e macroporosos aqueles com poros maiores que 50nm (cerâmicas) (Figura 5).

Figura 5 – Comparação de distribuição de diâmetros de poros dos materiais micro, meso e macroporosos.



Fonte: adaptado de Soller-Illia et al.(2002)

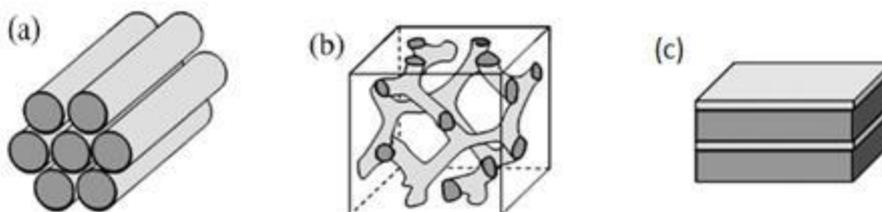
Os materiais microporosos apresentam grande uniformidade nos poros e estreita distribuição de diâmetro de poros, porém o tamanho dos poros é muito pequeno (menor que 2nm) o que torna seu uso limitado, sendo viável apenas para moléculas pequenas (LIU et al., 2013). Já os materiais macroporosos possuem poros grandes o suficiente para comportar macromoléculas, porém a distribuição de tamanho de poros é muito larga, o que dificulta a padronização do sistema.

No ano de 1990, surgiu um novo campo de pesquisa de materiais, os materiais mesoporosos, com síntese semelhante às zeólitas (material microporoso) mas apresentando poros maiores, esses materiais agora possibilitavam a entrada de moléculas mais volumosas no interior dos poros, além de apresentar grande área superficial (BECK et al., 1992).

Em 1992 pesquisadores da *Mobil Oil Corporation - Mobil Research and Development Corporation*, desenvolveram uma série de nanopartículas de sílica mesoporosa que denominaram M41S – *Mobil 41 Synthesis* (BECK et al. 1992). O diferencial desses materiais foi o uso de surfactantes como molde estrutural, permitindo o controle do tamanho e organização dos poros. Esses materiais apresentam grande área superficial, podendo superar $1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, poros organizados e uma distribuição de diâmetros de poros estreita (LEBEAU et al, 2005).

Os materiais da classe M41S são classificados de acordo com a organização dos poros na estrutura, cada arranjo foi batizado com o nome MCM-n – *Mobil Composition of Matter*, seguido do número referente à estrutura. Temos então três estruturas distintas, nomeadas MCM-41, MCM-48 e MCM-50, essas estruturas apresentam o arranjo hexagonal, cúbico e lamelar, respectivamente (HOFFMANN et al., 2006). Uma representação dessas estruturas é apresentada na Figura 6.

Figura 6 – Representação das estruturas dos materiais do tipo MCM. (a) MCM-41; (b) MCM-48; MCM-50.



Fonte: adaptado de Chew, Ahmad e Bhatia (2010).

Os materiais classificados como pertencentes à família M41S são formados em meio alcalino. Se um material mesoporoso de sílica for sintetizado em meio ácido, este é denominado como SBA – *Santa Barbara Amorphous*. (CHEW, AHMAD e BHATIA, 2010).

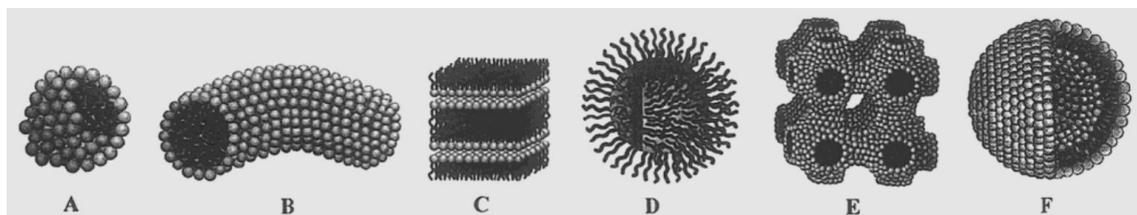
Os materiais denominados SBA recebem este nome em referência à cidade (Santa Barbara) onde foram desenvolvidos, por pesquisadores da Universidade da Califórnia. Além de utilizar o meio ácido em sua síntese, a diferença destes materiais em relação aos do tipo M41S é o uso de copolímeros de bloco triplo como direcionadores de estrutura, mesmo assim, tanto o uso como a estrutura química desses copolímeros é semelhante aos surfactantes utilizados na síntese dos materiais M41S. (SUN et al., 2009).

Os materiais SBA apresentam poros com diâmetros entre 2 e 30 nm e elevadas áreas superficiais. Os arranjos porosos desses materiais são semelhantes aos obtidos com os materiais da família M41S, por exemplo, tanto a SBA-15 quanto MCM-41 apresentam estrutura hexagonal, e os materiais SBA-16 e MCM-48 possuem estrutura cúbica (CHEN et al., 2010).

2.5 Síntese de Materiais Mesoporosos.

Para obtenção dos materiais mesoporosos, utilizam-se direcionadores de estrutura a fim de obter a estrutura de poros desejada. Esses direcionadores são moléculas que apresentam tanto uma região hidrofóbica como uma região hidrofílica, ou seja, são moléculas anfifílicas. A baixas concentrações as moléculas encontram-se isoladas na solução, mas quando a concentração aumenta, as moléculas em solução começam a se agregar, formando estruturas chamadas micelas, essa agregação ocorre justamente devido à propriedade anfifílica da molécula. Essas micelas podem apresentar diferentes microestruturas, como apresentado na Figura 7 (RANGEL-YAGUI, PESSOA-JR e BLANKSCHTEIN, 2004).

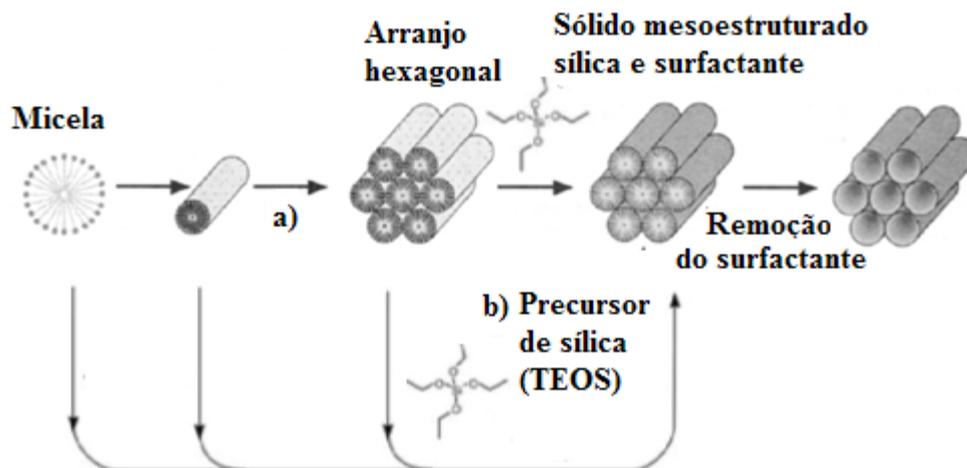
Figura 7 - Ilustrações de agregados micelares: (A) esférica, (B) cilíndrica, (C) planar, (D) reversa, (E) fase bicontínua (ou cúbica), (F) lipossomas.



Fonte: adaptado de Soller-Illia (2002).

Essa microestrutura recebe o nome de mesofase, e quando o precursor inorgânico é adicionado, este começa a polimerizar em torno da mesofase, formando então a estrutura do material. Os poros são formados após a remoção do surfactante de seu interior, que pode ser feita por extração Soxhlet ou tratamento térmico.

Figura 8 – Comparação entre os sistemas de cristal líquido moldante (a) e mecanismo cooperativo de cristal líquido moldante (b).



Fonte: adaptado de Beck et al (1992).

Sabe-se que são os agentes direcionadores de estrutura os responsáveis pela organização dos poros, mas o mecanismo pelo qual ocorre a formação da estrutura não é muito claro. Há dois mecanismos propostos para sistemas iônicos, o primeiro é o mecanismo do cristal líquido moldante, onde primeiro há a formação das micelas e mesofase, para então adicionar o precursor inorgânico, polimerizando sobre a estrutura já montada. O segundo é o

mecanismo cooperativo de cristal líquido moldante, onde a partir da formação das primeiras micelas ocorre a polimerização do precursor inorgânico favorecendo a formação das estruturas. Os mecanismos são apresentados na Figura 8 (SLOWING et al., 2008).

2.6 Interações entre direcionadores de estrutura e precursor inorgânico.

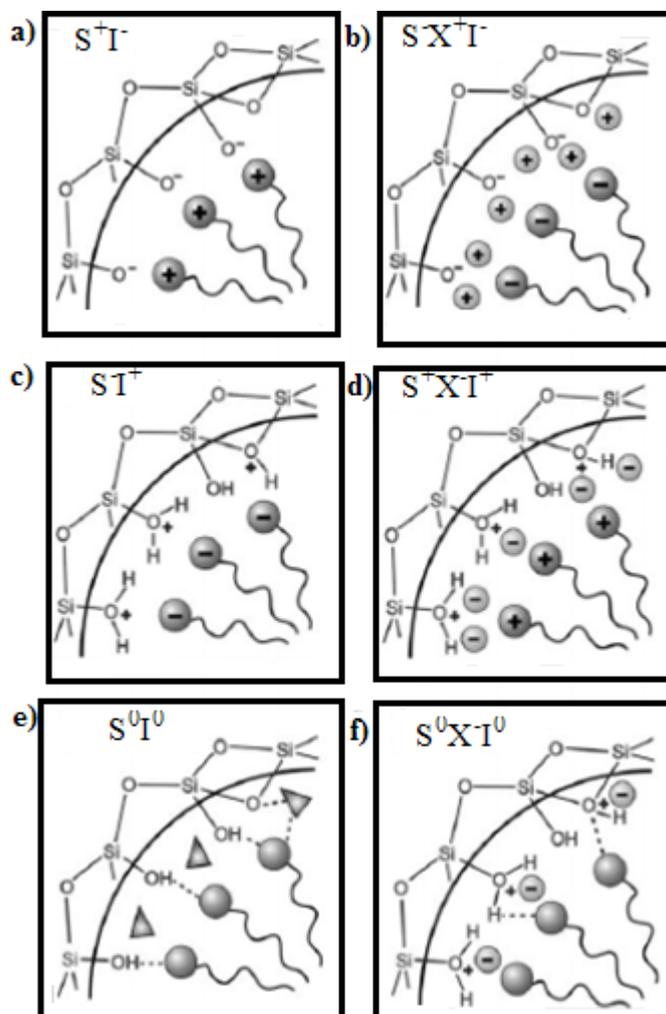
As interações entre precursor inorgânico e surfactantes estão apresentadas na Figura 9, onde (S) representa o surfactante, (I) o precursor inorgânico e (X) representa os contra-íons, que podem ser presentes ou não. Os símbolos (⁺ ⁰ ⁻) representam os caracteres catiônico, neutro e aniônico, respectivamente.

Em meio alcalino, a sílica adquire caráter aniônico (I⁻) e em meios ácidos (pH < 2 por ser o ponto isoelétrico da sílica) a carga positiva se torna predominante (I⁺). Portanto, interações representadas por S⁺I⁻ indicam o uso de surfactante catiônico e precursor inorgânico aniônico e as interações representadas por S⁻I⁺ indicam o uso de surfactante aniônico e precursor inorgânico catiônico.

Nos casos onde tanto o surfactante quanto o precursor inorgânico possuem o mesmo caráter iônico é necessário a presença de um contra-íon para balancear as cargas. Em casos onde ambos possuem caráter aniônico o uso de um cátion metálico (X⁺) irá balancear as cargas negativas, como na representação S⁻X⁺I⁻. Já nos casos em que as cargas do surfactante e precursor inorgânico forem positivas as cargas podem ser equilibradas pelo uso de um ânion (X⁻), como por exemplo, um haleto, formando um sistema representado por S⁺X⁻I⁺. Essas interações entre surfactantes e precursores inorgânicos são apenas eletrostáticas.

Quando o surfactante é neutro (S⁰) e a reação ocorre em meio neutro, a interação será do tipo S⁰I⁰, já em condições ácidas, a interação que ocorre é S⁰X⁺I⁰, em ambos casos, as interações são forças de atração fracas, como ligação de hidrogênio. (HUO et al., 1994).

Figura 9 – Representação das interações entre surfactantes e precursor inorgânico. As interações eletrostáticas estão representadas em a-d; as interações por ligação de hidrogênio em e-f; onde (S) surfactante; (I) precursor inorgânico; (X) contra-íons. Os símbolos (⁺ ⁰ ⁻) representam os caracteres catiônico, neutro e aniônico, respectivamente.



Fonte: adaptado de Hoffmann et al. (2006).

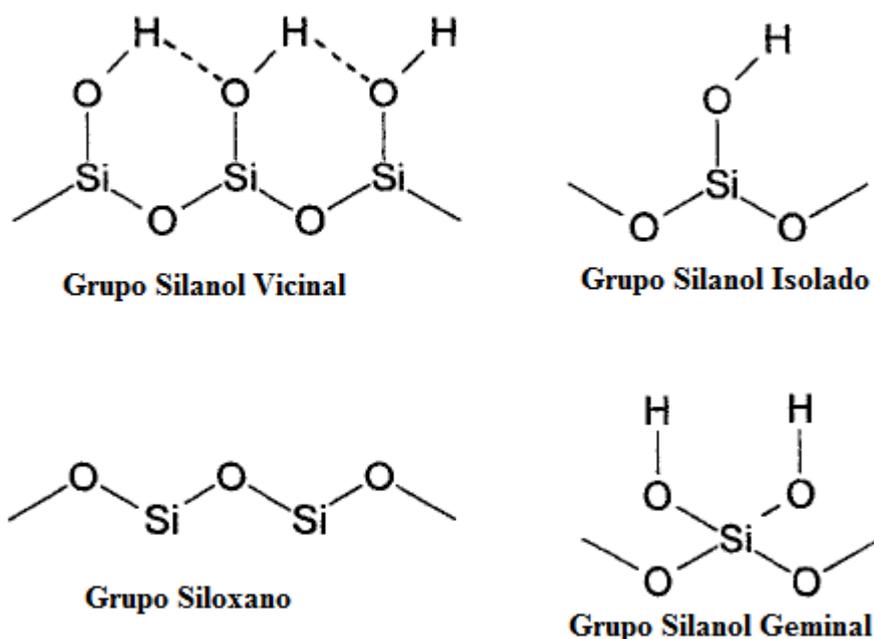
2.7 Sílica Mesoporosa

Dentre os materiais mesoporosos, a sílica é um dos materiais que mais se destacam. A estrutura do material é formada por unidades tetraédricas de SiO₄ unidas entre si por grupos siloxanos (Si-O-Si) e a superfície possui ainda grupos silanóis (Si-OH). Estruturalmente as paredes são consideradas amorfas, já que a única organização existente está na geometria

tetraédrica do SiO_4 , apesar disso, os poros presentes na estrutura apresentam regularidade em sua distribuição, cada tipo de material apresenta diferentes estruturas organizacionais, por exemplo, a estrutura MCM-41 apresenta organização dos poros em arranjo hexagonal e a MCM-50 apresenta estrutura lamelar.

Na Figura 10 estão representados os possíveis grupos presentes na superfície da sílica. Os grupos silanóis são responsáveis pelas propriedades funcionais da sílica, como reatividade e ligações de hidrogênio. Esses grupos podem estar presentes de três maneiras: isolados, vicinais e geminais. Nos silanóis isolados e vicinais há apenas um grupo OH ligado em cada átomo de silício, enquanto que nos casos de silanóis geminados, um mesmo átomo de silício está ligado à dois grupos OH.

Figura 10 – Representações das estruturas presentes na sílica.



Fonte: adaptado de Edge et al. (2001).

As propriedades que a sílica mesoporosa apresenta fazem este material ser apropriado à diversas áreas tecnológicas, como por exemplo, catálises, uso em CLAE, armazenamento de gases, pode ser utilizado como descontaminante de água retirando diversas impurezas como metais pesados, além de retenção e liberação de fármacos. Por ser um material atóxico, biocompatível, ter tamanho de poros reguláveis, estrutura organizada, grande área superficial e grupos silanóis na superfície, é um material muito adequado ao uso em armazenamento e

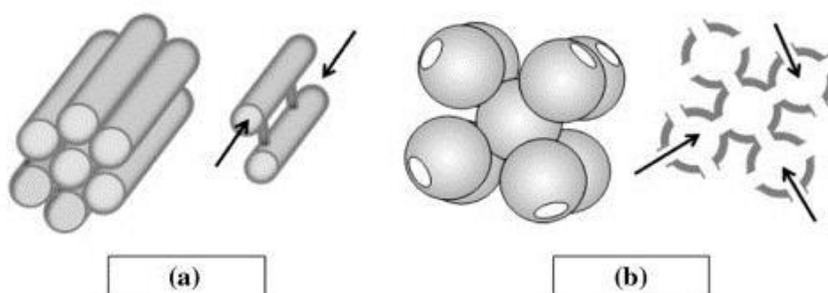
liberação controlada de fármacos. (UKMAR e PLANINSEK, 2010; MARTINS et al., 2013; RENUKA, PRAVEEN e ANAS, 2013).

2.8 Sílica SBA-16

Zhao e colaboradores (1998a, 1998b) sintetizaram uma série de sílicas mesoporosas do tipo SBA (Santa Barbara) utilizando copolímero de bloco triplo (Pluronic F127) como direcionador de estrutura. Esse tipo de surfactante é interessante devido a seu baixo custo, atoxicidade e fácil remoção. As sínteses que utilizam este tipo de surfactante geralmente ocorrem em soluções de baixo pH (pH~2), onde a interação ocorre através do mecanismo $S^0H^+X^-I^+$ (sendo S^0H^+ o surfactante ligado a um íon hidrônio, X^- um íon cloreto e I^+ é a sílica protonada) (STEVENS et al., 2006).

Sílicas do tipo SBA apresentam tamanho de poros grande (20-300 Å), paredes dos poros espessas e alta estabilidade (SUN et al., 2009). Entre as sílicas desse tipo, a SBA-16 é considerada de interesse devido ao seu arranjo cúbico dos poros correspondente ao grupo espacial $Im3m$.

Figura 11 – Comparação entre os sistemas (a) hexagonal e (b) cúbico.



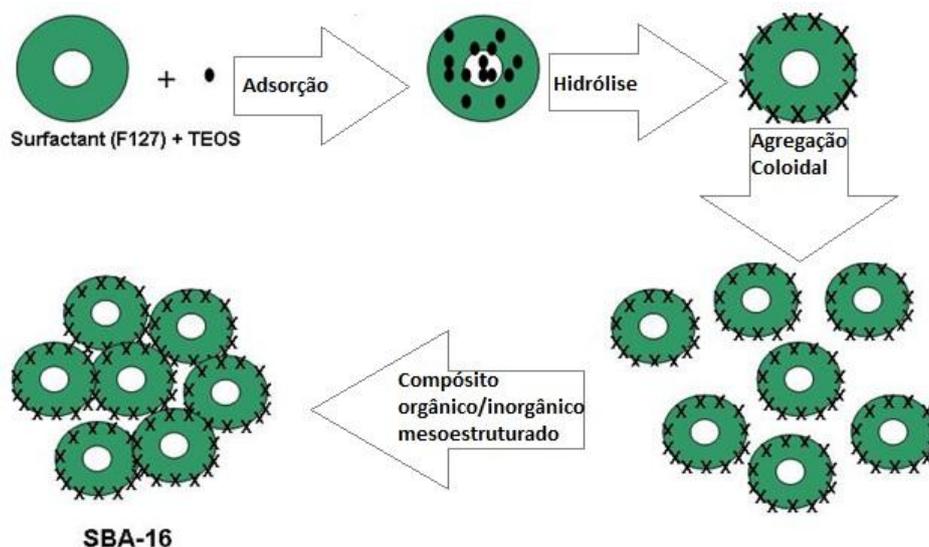
Fonte: adaptado de Lopes dos Santos et al. (2013).

SBA-16 pode ser sintetizada sob condições ácidas numa faixa estreita de concentração de surfactante Pluronic F127 (3%~5%) em temperatura ambiente. Concentrações maiores do copolímero levam à formação de sílica gel, enquanto que em concentração menores obtém-se sílica amorfa (ZHAO., 1998b). Atualmente os materiais SBA-16 são sintetizados em sua

maioria utilizando Pluronic F127, há alguns artigos que relatam o uso de misturas de copolímeros (KIM et al., 2004) de P123 e F127 ou surfactantes oligoméricos não iônicos (WANG L. et al., 2004). Posteriormente, Mesa et al (2005) utilizaram F127 como surfactante e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como co-surfactante. Eles propuseram que a presença do CTAB na forma catiônica pode regular a forma das micelas e sua interação com os precursores de sílica durante a síntese. Além disso foi proposto que CTAB ajuda a controlar a morfologia e formato da meso-estrutura da SBA-16 (LIN et al 2008; CHEN et al 2005).

A principal rota sintética para obtenção de sílica SBA-16 é através do método de gabarito utilizando surfactantes ao invés de uma reação não controlada. A auto-montagem orgânico-inorgânico é guiada por ligações fracas não covalentes, como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e ligações eletrovalentes entre o surfactante de copolímero de bloco triplo e espécies inorgânicas. Ocorre então a hidrólise do precursor inorgânico tetraetilortossilicato (TEOS) formando a sílica polimerizada na superfície do surfactante formando um composto orgânico/inorgânico mesoestruturado. De modo geral, moléculas anfifílicas tendem a formar uma fase liquido-cristalina em soluções aquosas (BECK et al., 1992; KRESGE et al., 1992). A formação dessa fase depende fortemente das condições na solução. Essa fase é chamada de mesoestrutura e há importantes parâmetros que influenciam em sua formação, como temperatura, concentração ou pH da solução (Figura 12).

Figura 12 - Representação esquemática da síntese de SBA-16.



Fonte: adaptado de Rivera-Munhoz e Huirache-Acuña (2010).

A porosidade só é obtida com a remoção do surfactante, e há diferentes formas de fazer essa remoção, como utilizar solventes orgânicos ou ácidos, mas a forma mais utilizada e que garante remoção total é a calcinação. Os surfactantes são totalmente decompostos em atmosferas de oxigênio ou ar (WAN, Y e ZHAO, D. 2007). A rampa de aquecimento deve ser lenta o suficiente para evitar o colapso da estrutura, em média $1-2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até em torno de 550°C , mantendo a essa temperatura por cerca de 5h. A calcinação pode alterar a estrutura do material, sendo que altas temperaturas levam a diminuição do tamanho e volume dos poros e grupos silanóis da superfície.

2.9 Emodina

Emodina (3-metil-1,6,8-trihidroxiantraquinona, Figura 13) é uma antraquinona encontrada em algumas plantas como, Ruibarbo (*Rheum officinale B.*), Babosa (*Aloe barbadensis M.*) e também nas folhas de Sene (*Cassia angustifolia*) (HUANG et al., 2007; SRINIVAS et al., 2007). Apresenta várias atividades biológicas como vasorelaxamento, imunossupressão, hepatoproteção e anti-tumoral (SRINIVAS et al., 2007; PAN, WANG, J. e HUANG, N. 2007) além de ser largamente utilizada como laxativo. Sua atividade antitumoral tem-se mostrado promissora, pois sua ação está ligada à inibição da proliferação, interrupção do ciclo celular, apoptose das células cancerosas e previne a metástase (CHEN et al., 2010; FU, HAN e HUANG, 2007; HSU et al., 2010).

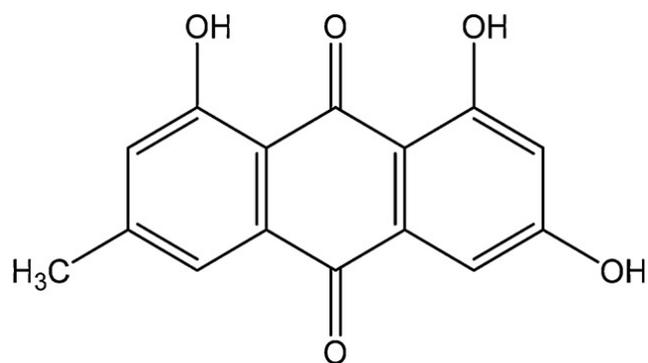
Chen e colegas (2010) realizaram um teste de viabilidade celular utilizando células HL-60 na presença de 3 antraquinonas estruturalmente relacionadas: emodina; crisofanol e fisiona. Cada composto foi testado em duas concentrações, 40 e $80 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Após 12 horas apenas o teste com emodina apresentou um decaimento significativo da quantidade de células, ficando abaixo de 40% em relação à quantidade inicial, os outros dois compostos mantiveram a contagem de células acima dos 80% para ambas concentrações.

Apesar das atividades que a emodina apresenta, a biodisponibilidade oral é muito baixa devido a sua baixa solubilidade em água, como a maioria das antraquinonas. Apesar de sua baixa solubilidade em água, é solúvel em etanol e soluções aquosas alcalinas. Similarmente aos fenóis, apresenta caráter ácido (em acetonitrila) pKa: 5,70 e 7,94. (WANG et al., 2012). Propriedades que devem ser levadas em consideração quando estuda-se a

emodina em soluções aquosas.

Considerando as informações citadas acima, é interessante o desenvolvimento de materiais que façam a liberação da emodina de forma controlada, a fim de melhorar a biodisponibilidade, ação anti-tumoral e minimização de efeitos indesejados (laxativo). A sílica SBA-16 tem características que atendem os requisitos necessários para o estudo de liberação desse fármaco, como tamanho de poros, tamanho de partículas e volume dos poros.

Figura 13 - Estrutura química da emodina



3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver nanomateriais contendo moléculas bioativas (sistemas para liberação controlada), visando aplicações biológicas.

3.2 Objetivos Específicos

- Síntese e caracterização de nanopartículas de sílica mesoporosa (matriz);
- Impregnação de emodina nas nanopartículas e estudo da liberação.

4 Parte Experimental

4.1 Materiais e Reagentes

Aqui serão apresentados os materiais utilizados e técnicas realizadas neste trabalho.

4.1.1 Materiais

Banho ultratermostatizado Marconi – MA 184

Balança analítica AY 220 - Shimadzu

Agitador magnético Labnet – PC-420D

Banho ultratermostatizado – Huber D77656

Mufla Marconi – 385/3

Dissolutor Dissolution Tester Logen Scientific

Estufa Fanem -515

Centrífuga Sigma- 2-5

Ultrassom Limp Sonic

4.1.2 Reagentes

Água Milli-Q (Sistema Millipore)

Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) 98% – Sigma Aldrich

Pluronic F127 – Sigma Aldrich

Tetraetilortossilicato 98% – Sigma Aldrich

Ácido Clorídrico P.A. 37% – Vetec

Emodina 95% – Sigma Aldrich

Lauril Sulfato de Sódio – Vetec

Metanol HPLC/UV 99,9% – Vetec

Acetonitrila HPLC/UV 99,9% – J. J. Baker

Ácido Acético HPLC/UV 99,9% – (Vetec)

Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado

Fosfato de Sódio Bibásico Anidro P.A. 99,8% - Synth

4.2 Métodos

4.2.1 Método de Síntese de Sílica Mesoporosa SBA-16

Em um sistema de refluxo com aquecimento controlado por banho termostaticado, primeiro dilui-se 0,63 g de Pluronic F127 e 0,073 g de CTAB em 71,5 mL de uma solução 2 mol L⁻¹ de HCl sob agitação vigorosa (~900 rpm) e 40°C. Após a diluição total dos surfactantes adicionou-se 2,083 g de precursor de sílica (TEOS), a temperatura é mantida em 40 °C por 2 h e então elevada à 80 °C onde é mantida por mais 6 h (SUN et al., 2009). O produto final é então separado da dispersão via centrifugação a 4500 rpm por 20 min, lavado com água deionizada 3 vezes, repetindo a centrifugação a cada lavagem, seco em estufa por 24 h, pulverizado e então calcinado à 500 °C por 5 h com uma taxa de aquecimento de 1 °C min⁻¹, a fim de eliminar todo o surfactante.

4.2.2 Validação da metodologia analítica

Para validar a metodologia analítica do sistema de liberação controlada de emodina foram escolhidos os parâmetros seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão. A validação foi realizada num equipamento de CLAE, utilizando as condições apresentadas em 4.8.6.

Para construir a curva de calibração é preciso identificar o comprimento de onda de máxima absorção específica do fármaco, para tal utilizou-se uma solução metanólica de 20 µg mL⁻¹ que teve sua absorção analisada numa faixa de comprimentos de onda de 200 a 800 nm, sendo o máximo específico registrado em 440 nm.

A seletividade é um parâmetro necessário para identificar e quantificar exclusivamente o analito de interesse, caso contrário, todos os outros parâmetros, linearidade, precisão e exatidão, são comprometidos, prejudicando o resultado. Foi utilizado um detector de arranjo

de diodos (DAD), com a seletividade em 440nm.

Para a linearidade foi utilizada a média de 3 curvas analíticas, com concentrações entre 100 e 6.10^{-3} $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados foram tratados matematicamente para definir o coeficiente angular, equação de reta e desvio padrão.

Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ respectivamente) foram avaliados considerando o desvio padrão em razão do coeficiente angular, obtidos no tratamento da linearidade. Foram utilizadas as seguintes equações:

$$\text{LD} = \text{DPa} \times 3/\text{IC} \text{ (equação 1)}$$

$$\text{LQ} = \text{DPa} \times 10/\text{IC} \text{ (equação 2)}$$

4.2.3 Método de impregnação de emodina em sílica

Para realizar a impregnação, foi utilizado 1,52 g de sílica e 100 mL de solução metanólica de emodina $600 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução e sílica foram mantidas em agitação durante 15h, após esse tempo a mistura foi filtrada e seca. A sílica filtrada foi levada seca em estufa a 60°C durante 24 h, afim de eliminar o metanol.

4.2.4 Determinação da solubilidade de emodina no meio de liberação

Para determinar a solubilidade máxima da emodina no meio de liberação, foi preparada uma solução com tampão fosfato pH 8 e lauril sulfato de sódio 1% (LSS 1%), utilizou-se nesse estudo o pH 8 para facilitar a solubilização da emodina, que é insolúvel em soluções ácidas. Um excesso de emodina foi adicionado nessa solução e agitado com ultrassom, após 24h de repouso uma alíquota do sobrenadante foi recolhida e analisada em CLAE, fornecendo então a concentração através da equação de uma reta. A equação foi obtida a partir da média de três curvas analíticas que foram construídas utilizando 5 soluções padrão de emodina no meio de liberação, nas concentrações: 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.5 *Quantificação da emodina na sílica mesoporosa.*

A quantidade impregnada foi determinada através da diferença de concentração da solução antes e após a impregnação, adquiridas com o uso de CLAE. Para isso utilizou-se a equação de reta obtida a partir da média de três curvas analíticas. As curvas foram construídas utilizando soluções nas concentrações: 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de padrão de emodina em metanol.

4.2.6 *Liberação do fármaco in vitro*

Para realizar o ensaio de liberação de emodina da matriz de sílica mesoporosa, utilizou-se um dissolutor de comprimidos (Logen Scientific), onde 3 cubas continham 1,18 mg de emodina livre, e outras 3 cubas continham 425 mg de sílica contendo o equivalente a 1,18 mg de emodina impregnada. O volume utilizado nas cubas do dissolutor foi 200 mL, o equivalente a 2x o volume de saturação da solução em pH 8 LSS 1% de forma a garantir uma concentração suficiente para realizar a . As soluções foram mantidas em 37 °C e sob agitação de 100 rpm. A cada tempo pré-determinado, uma alíquota de 10 mL de cada cuba foi coletada para posteriormente ser analisada por CLAE. O mesmo volume de meio foi adicionado para manter o volume constante após cada coleta de alíquota. A diluição do meio foi considerada nos cálculos das concentrações.

4.3 Técnicas de caracterização

4.3.1 Isotermas de adsorção – dessorção de Nitrogênio a 77 K

As isotermas de adsorção-dessorção a 77 K foram realizadas em um analisador de superfície específica e porosidade 2020 da Micromeritics. As análises de superfície específica (S-BET) e diâmetro de poros (D_p) foram determinados através do método de Brunauer-Emmett-Teller (BET). A amostra foi previamente desgaseificadas a 150 °C por 15 h.

4.3.2 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Essa técnica foi utilizada para verificar a eliminação de resíduos de surfactantes da síntese do interior da matriz de sílica e para verificar a impregnação da emodina nessa sílica. As análises foram realizadas em um espectrofotômetro Nicolet iS5 da Thermo Scientific, foram realizados 100 scans com resolução de 4 cm^{-1} entre a faixa de 4000 a 400 cm^{-1} empregando pastilhas de KBr. As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LTF-UFMS).

4.3.3 Difractometria de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um equipamento Bruker D8 Advance, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), fenda de 0,4 mm, operando em voltagem de 40 KV, corrente de 40 mA, com incremento de 0,01° (em 2θ) e velocidade de goniômetro de 1° min^{-1} . A amostra foi varrida na faixa de 2θ de 0,7 a 5°. As análises foram realizadas no Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo,

Campus de Diadema. São Paulo (UNIFESP - Diadema).

4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias foram obtidas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura realizadas no Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul campus de Campo Grande, utilizando um microscópio Jeol JSM-6380 LV operando com 15 e 30 kV. As amostras foram metalizadas com ouro durante 5 minutos, corrente de 30 mA e vácuo de 200 mTorr no equipamento Denton Vacuum Desk III.

4.3.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas no equipamento TGA Q50 V20.10 Build 36 da TA Instruments, utilizando os parâmetros: razão de aquecimento de 10° C por minuto, fluxo de ar de 60 mL min⁻¹ na amostra e 40 mL min⁻¹ de gás N₂ na balança, método rampa, com isoterma de 80 °C na qual permaneceu por 10 minutos e em seguida até 900° C. As análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Tanto a impregnação como a liberação foram acompanhadas de análises em CLAE, foi utilizado um equipamento Shimadzu UFLC SPD-M20A, com uma coluna Onyx C18 monolítica com dimensões de 10,0 x 3,0 mm. Foram utilizadas duas fases móveis: água com 1% de ácido acético (A) e acetonitrila com 1% de ácido acético (B), sendo o método de eluição utilizado foi de gradiente (detalhes na Tabela 1). O volume de injeção foi 20 µL e o fluxo de 1,4 ml min⁻¹. O tempo de retenção da emodina foi de 4,2 min. O detector foi um

DAD com o comprimento selecionado em 440 nm.

Tabela 1 - Gradiente de eluição das fases móveis: água com 1% de ácido acético (A) e acetonitrila com 1% de ácido acético (B)

| Tempo (min) | Concentração de B (%) |
|-------------|-----------------------|
| 0-1 | 40 |
| 1-4 | 70 |
| 4-5 | 40 |

Fonte: Autoria própria.

5 Resultados e Discussão

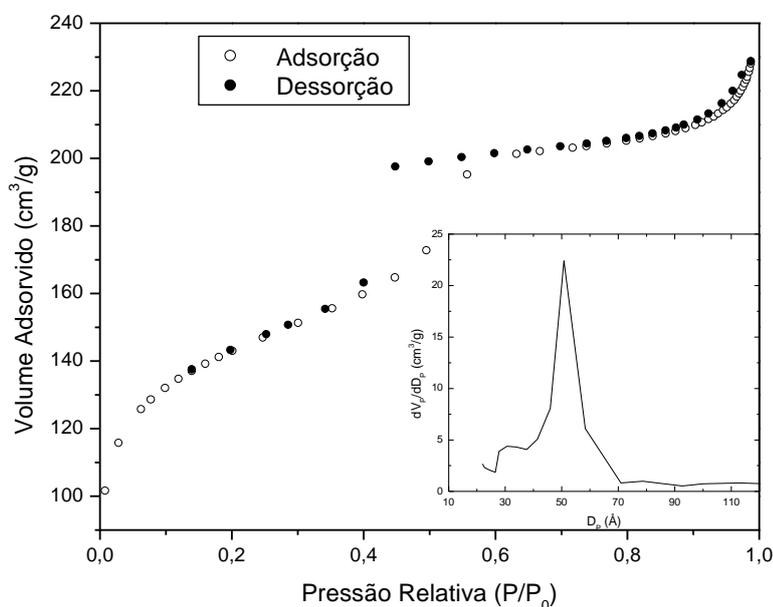
5.1 Sílica Mesoporosa

Abaixo são apresentados os resultados referentes à caracterização da sílica SBA-16

5.1.1 Isotermas de adsorção – dessorção de Nitrogênio a 77 K

Essa técnica fornece informações a respeito da área superficial, diâmetro e volume dos poros. A Figura 16 apresenta a isoterma de adsorção-dessorção de Nitrogênio na matriz de sílica SBA-16. A distribuição de diâmetro de poros, Tabela 2, foi obtida utilizando os valores de dessorção através de uma correlação polinomial entre pressão relativa e diâmetro de poro, deduzido através do modelo de Broekhoff-de Boer (BOISSIÈRE C. et al., 2003).

Figura 14 - Isotermas de adsorção-dessorção de N_2 a 77K da amostra de sílica mesoporosa SBA-16. Distribuição de tamanho de poros inserida no gráfico.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Valores obtidos através das análises de adsorção de N₂

| Material | S-BET (m ² g ⁻¹) | D _p (nm) | V _p (cm ³ g ⁻¹) |
|--------------------|---|---------------------|---|
| SBA-16 | 526 | 5,0 | 0,346 |
| (SUN et al., 2009) | 551 | 3,4 | 0,386 |

Fonte: Autoria Própria

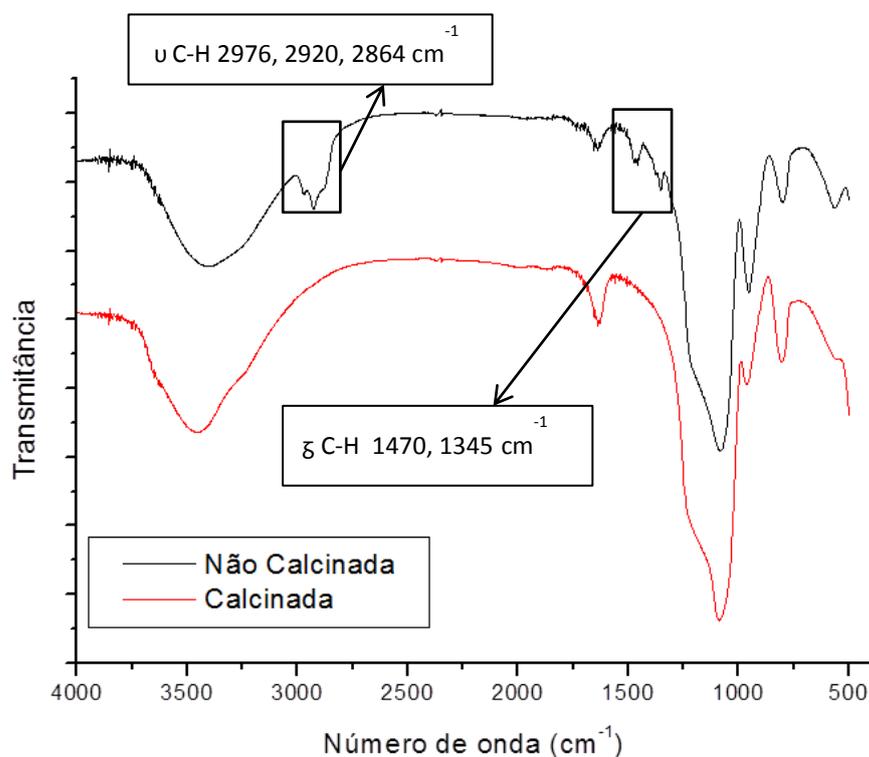
De acordo com a IUPAC a isoterma apresentada é do tipo IV, característica de materiais mesoporosos, com poros entre 2 e 50 nm. Além disso, as isotermas apresentam uma histerese, que ocorre devido à diferenças no mecanismo de adsorção e dessorção. O nitrogênio, ao condensar preenche os poros, mas no processo de dessorção, quando ele evapora, tem a influência de interações superficiais entre o N₂ e a sílica, formando um menisco e dificultando a saída do gás do interior dos poros. Essa histerese é classificada como do tipo H2, também chamada de “tinteiro” em comparação às canetas tinteiro. É típica de materiais com poros cúbicos, como é o caso da sílica sintetizada (GREGG e SING, 1982).

A Figura 16 apresenta a distribuição de diâmetros de poros da sílica SBA-16, mostrando que a matriz de sílica possui poros com diâmetro de 5,0 nm e o pico de distribuição de tamanhos de poros apresenta 1 nm de largura à meia altura.

5.1.2 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Ambos os espectros apresentaram bandas largas nas regiões de absorção em 3400 e 1637 cm⁻¹ que são referentes a estiramento (ν O-H) e deformação (δ H-O-H), respectivamente, de moléculas de água, adsorvidas na superfície da sílica.

Figura 15 – Espectro vibracional de absorção na região do Infravermelho por transformada de Fourier. Em destaque temos as bandas referentes à ligações C-H, indicando a remoção do surfactante.



Fonte: Autoria própria.

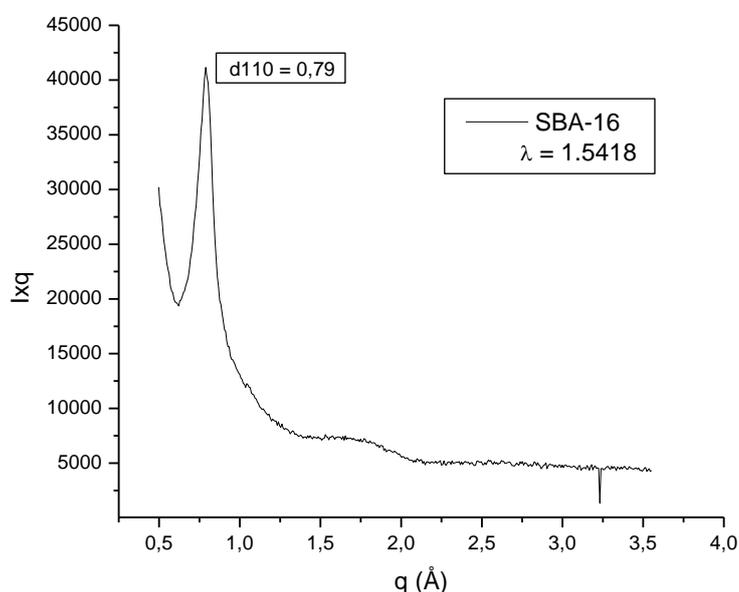
As outras bandas atribuídas à sílica podem ser verificadas em 1085 cm^{-1} , 800 cm^{-1} e 962 cm^{-1} , sendo referentes, respectivamente, aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo siloxano ($\nu\text{ Si-O-Si}$) e deformação do grupo silanol (Si-OH).

O espectro da sílica não calcinada apresenta bandas referentes aos modos vibracionais da sílica e da molécula de surfactante, que foram atribuídas à deformação ($\delta\text{ C-H}$) dos grupos CH_2 nas regiões de 1470 cm^{-1} e 1345 cm^{-1} e estiramento ($\nu\text{ C-H}$) em 2976 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} e 2864 cm^{-1} (SOLOMONS e FRUHLE, 2001). Como essas bandas não aparecem na sílica calcinada, conclui-se que o surfactante foi devidamente removido da matriz de sílica, liberando os poros para posterior impregnação da emodina.

5.1.3 Espalhamento de Raios-X à Baixo Ângulo (SAXS).

O espalhamento de Raios-X à baixo angulo (SAXS) fornece informação a respeito do arranjo poroso e a distância entre os centros dos poros. O SAXS da amostra apresenta apenas o pico em $q = 0,79 \text{ \AA}$ ($2\theta = 1,1^\circ$) referente à distância interplanar 110, há também um halo no intervalo $q = 1,5$ a $q = 2,0 \text{ \AA}$.

Figura 16 - DRX da amostra de sílica SBA-16



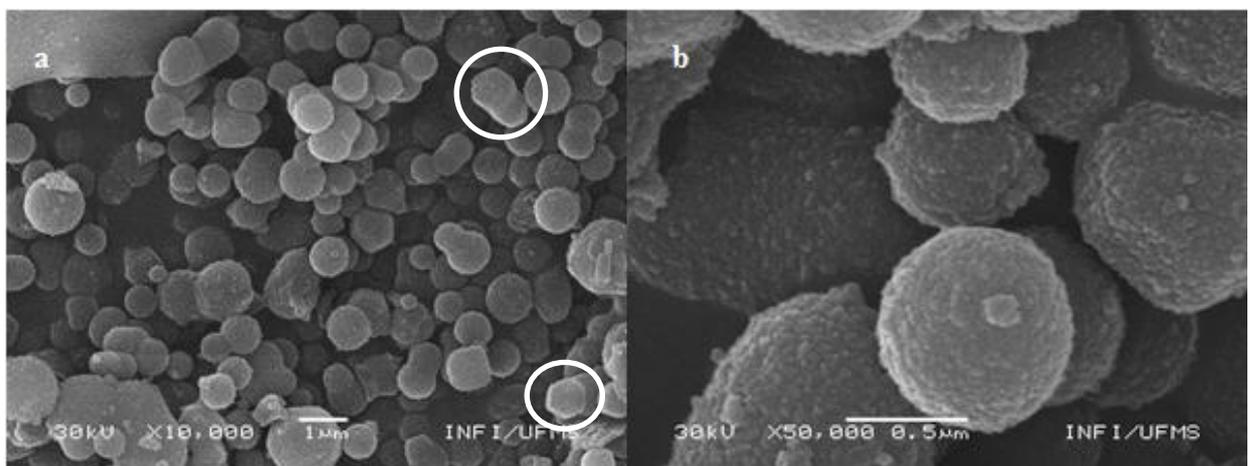
Fonte: Autoria própria.

Sun e colegas (2009) variaram os parâmetros da síntese de sílica mesoporosa SBA-16, como razão molar entre os reagentes e tempo de síntese afim de obter uma sílica com padrão cúbico de poros num menor tempo de síntese. Em seus resultados observou três picos bem definidos (110), (200) e (211) típicos de um padrão cúbico. Além disso, os autores demonstraram por DRX e TEM que a variação dos parâmetros de síntese pode resultar em arranjo poroso cúbico menos organizado, como observado neste trabalho.

5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) são apresentadas na Figura 19 e fornece dados sobre o tamanho e forma das partículas. As imagens exibem partículas pouco agregadas, a maioria esféricas e algumas hexagonais, com diâmetros variando entre 0,5 e 1,5 μm . Os resultados de MEV estão de acordo com os resultados da literatura (SUN et al., 2009).

Figura 17 - Micrografias da sílica SBA-16. Nos detalhes algumas partículas com formato hexagonal.



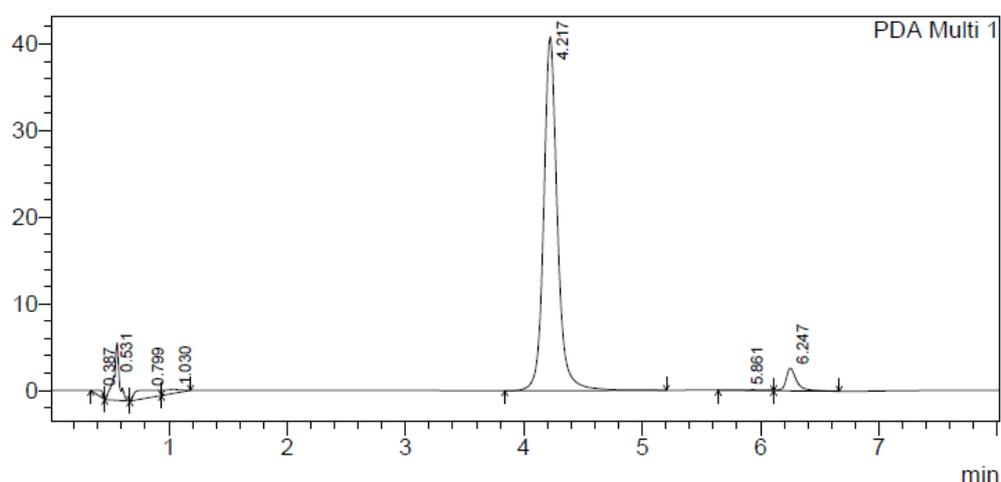
Fonte: Autoria própria.

5.2 Validação da metodologia analítica

5.2.1 Seletividade

O método desenvolvido para análise mostrou seletividade para a emodina, não apresentando nenhum interferente no tempo de retenção de 4,2 min ou próximo à sua base.

Figura 18 – Cromatografia líquida de uma solução padrão de emodina.



Fonte: Autoria própria.

5.2.2 Linearidade

A equação de regressão linear foi construída através de três curvas analíticas sendo $Y = 26002,52189 * X$. O coeficiente de linearidade foi $R = 0,9997$ o que mostra que o método é adequado para a faixa de concentração trabalhada já que é superior ao valor determinado pela ANVISA, de 0,99 (BRASIL, 2003). A curva analítica é apresentada na Figura 21.

Os dados de desvio padrão e precisão estão todos de acordo com a ANVISA, que determina que o valor máximo seja de 5%, portanto a metodologia tem boa precisão. Os

dados podem ser observados na Tabela-2.

Tabela 3 -- Dados de desvio padrão e precisão da curva analítica.

| Concentração (µg/mL) | Média das Áreas | Desvio Padrão | Precisão (%) |
|----------------------|-----------------|---------------|--------------|
| 0,78125 | 22323 | 638,3 | 2,86 |
| 1,5625 | 42337 | 433,7 | 1,02 |
| 3,125 | 78393 | 366 | 0,47 |
| 6,25 | 158662 | 1512,5 | 0,95 |
| 12,5 | 367630 | 12456,4 | 3,39 |
| 25 | 655520 | 14481,5 | 2,21 |

Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Precisão e Exatidão

Avaliou-se a repetibilidade (precisão intra-dia) do experimento através da comparação dos resultados obtidos num curto espaço de tempo utilizando a mesma instrumentação e mesmo operador. Para tal é necessário a realização de no mínimo nove análises, utilizando três concentrações diferentes e três repetições para cada uma (BRASIL, 2003). A repetibilidade intermediária (precisão inter-dia) é verificada através da média entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, nas mesmas condições e analista, mas em dias diferentes, a fim de verificar se o laboratório fornece resultados confiáveis em dias diferentes.

A exatidão (E(%)) é obtida a partir das mesmas análises e indica a proximidade do valor de concentração determinada (CD) no experimento com o valor de concentração teórico

(CT). A ANVISA recomenda uma exatidão entre 95 e 105% (BRASIL, 2003).

Tabela 4 - Dados de Precisão e Exatidão.

| CT (µg/ml) | CD (µg/ml) Dia 1 | CD (µg/ml) Dia 2 | Inter-corrida |
|------------|---------------------|---------------------|---------------|
| 1,56 | 1,647 | 1,430 | |
| | 1,607 | 1,481 | |
| | 1,629 | 1,604 | |
| Média ± DP | 1,628 ± 0,016 | 1,505 ± 0,072 | 1,566 ± 0,061 |
| %DPR | 1,02 | 4,84 | 3,91 |
| E (%) | 104,37 | 96,50 | 100,43 |
| 12,5 | 14,214 | 11,096 | |
| | 13,517 | 11,519 | |
| | 14,683 | 11,904 | |
| Média ± DP | 14,138± 0,479 | 11,506± 0,330 | 12,822± 1,315 |
| %DPR | 3,38 | 2,87 | 10,26 |
| E (%) | 113,10 | 92,05 | 102,57 |
| 50 | 50,909 | 48,307 | |
| | 48,881 | 50,246 | |
| | 49,890 | 53,979 | |
| Média ± DP | 49,893± 0,828 | 50,844± 2,354 | 50,369± 0,475 |
| %DPR | 1,65 | 4,63 | 0,94 |
| E (%) | 99,78 | 101,68 | 100,73 |

Fonte: Autoria própria.

5.2.4 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de Detecção e Quantificação indicam as concentrações mínimas que conseguimos detectar e quantificar o analito em uma amostra com precisão e exatidão aceitáveis para os parâmetros exigidos (BRASIL, 2003). Para se determinar esses valores, utilizou-se dados da curva analítica e as equações 1 e 2. Os valores obtidos foram: $0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ para LD e $0,07 \mu\text{g ml}^{-1}$ para LQ.

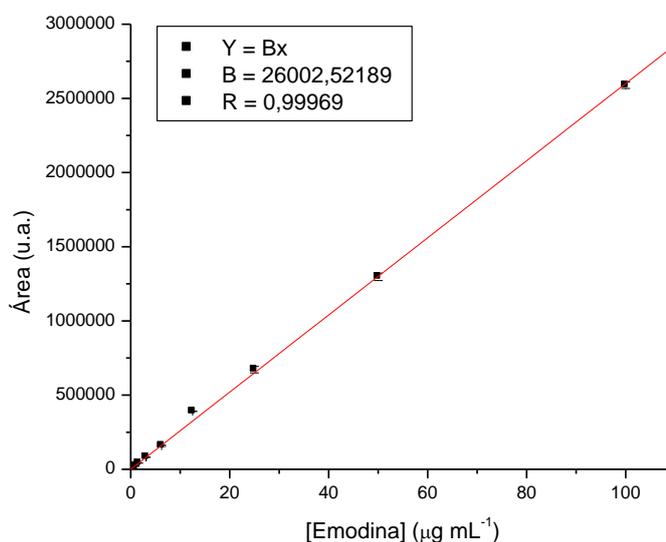
5.3 Sílica Mesoporosa impregnada com Emodina

Aqui são apresentados os resultados referentes à impregnação e liberação da emodina na sílica SBA-16

5.3.1 Impregnação e quantificação de Emodina na sílica.

A impregnação da emodina na sílica foi realizada durante 24 h, nas quais a sílica e uma solução metanólica saturada de emodina foram mantidas juntas em agitação. Para quantificar a massa de emodina impregnada na sílica verificou-se a diferença de concentração da solução antes e depois da impregnação, sendo que essa diferença é justamente a quantidade impregnada. Para tal, foi necessário a criação de uma curva de calibração, Figura 21. Foram construídas 3 curvas que apresentam linearidade na faixa de concentração escolhida, através da equação da reta, determinada através dessa curva analítica, pode-se determinar a concentração de emodina na sílica, sendo $2,83 \text{ mg g}^{-1}$.

Figura 19 - Curva de Calibração utilizando metanol como solvente



Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Solubilidade da emodina no meio de liberação

É necessário fazer esse teste para evitar que a liberação seja comprometida pela saturação do meio. A concentração de saturação (ou solubilidade) foi determinada através da adição de um excesso de emodina no meio de liberação, agitando a solução com ultrassom por 30 min e mantida em repouso por 24 h. Parte do sobrenadante foi coletado e levado à análise cromatográfica sendo previamente filtrado para evitar a passagem de emodina não solubilizada.

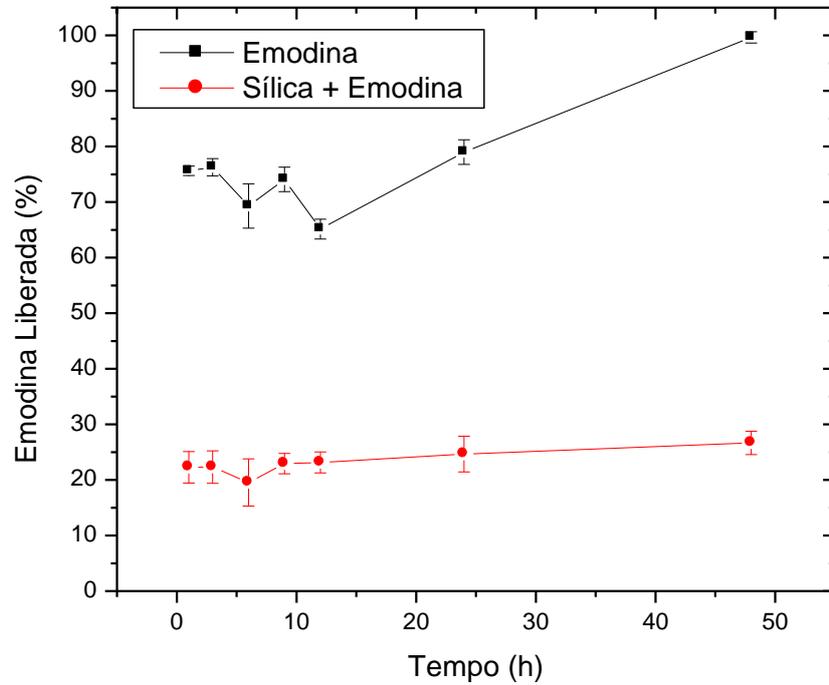
A partir dessa análise podemos determinar a concentração através da equação de reta obtida na curva analítica. O valor obtido foi de $11,8 \text{ ug mL}^{-1}$. O volume utilizado como meio de liberação foi de 200 mL, 2x maior que o volume de saturação.

5.3.3 Taxa de Liberação da Emodina

Na figura 22 é apresentado o perfil de solubilização da emodina livre e liberação da emodina impregnada na sílica. Houve uma rápida solubilização da emodina livre, com mais de 75% solubilizado na coleta da primeira alíquota, em 1 h de experimento. Após 48 h do início da liberação toda a emodina foi solubilizada.

A liberação da emodina impregnada na sílica foi muito baixa, pouco acima dos 25% no fim da liberação, sendo que dentro da primeira hora já havia mais de 20% da emodina em solução. Essa rápida liberação no início pode ser atribuída à emodina impregnada na superfície das partículas de sílica, e o leve aumento na liberação no restante do experimento deve ser devido à emodina saindo dos poros.

Figura 20 - Liberação de emodina impregnada em sílica mesoporosa SBA-16



Fonte: Fonte: Autoria própria.

6 Conclusões

Através da técnica de isotermas de adsorção/dessorção de N_2 , pode-se observar que a matriz de sílica mesoporosa *SBA-16* apresenta uma histerese característica de materiais porosos com arranjo cúbico. A distribuição de tamanho de poros mostrou-se bastante estreita, sendo ideal para sistemas de liberação controlada.

As imagens micrográficas mostraram que as partículas são bastante regulares quanto ao formato, esféricas, baixa agregação e o tamanho das partículas é relativamente pequeno se comparado à outras sílicas *SBA-16*, provavelmente devido ao tempo de síntese reduzido.

A impregnação da emodina foi realizada com sucesso. Tanto a impregnação como a liberação foram confirmadas e quantificadas através de CLAE.

A matriz realizou uma liberação inicialmente rápida, porém pouca quantidade de fármaco foi liberada, necessitando de adequações para uma possível aplicação.

7 Referências

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS – **Committee on Drugs, Pediatrics**, v. 100, n. 1, p. 143-152, 1997.

ANTONIO R. DA CUNHA et al., Protonation/deprotonation process of Emodin in aqueous solution and pKa determination: UV/Visible spectrophotometric titration and quantum/molecular mechanics calculations, **Chemical Physics**, 440, 69-79, 2014.

BAKER, R. Controlled release of biologically active agents. New York: **Wiley-Interscience Publication**, 1987. apud C. A. Ogawa, A. M. G. Plepis, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 12, p. 115-122, 2002.

BARO, M. et al., In vitro–in vivo characterization of gentamicin bone implants, **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 353-364, 2002.

BECK, J. S. et al. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid-crystal templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 27, p. 10834-10843, Dec 30 1992.

BOISSIÈRE, C. et al. Mechanisms of pore size control in MSU-X mesoporous silica., **Chem. Matter**, v. 15, p. 509-515, 2003.

BRASIL, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diretoria Colegiada da Agência Nacional da Vigilância Sanitária**, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

CHEN, B.-C. et al., Faceted single crystals of mesoporous SBA-16 from a ternary surfactant system: Surface roughening model. **Microporous Mesoporous Mater.** v. 81, 241–249, 2005.

CHEN, Y.Y et al., Emodin, aloe-emodin and rhein inhibit migration and invasion in human tongue cancer SCC-4 cells through the inhibition of gene expression of matrix metalloproteinase-9. **Int. J. Oncol.**, 36, 1113–1120, 2010.

CHEW, T. L.; AHMAD, A. L.; BHATIA, S. Ordered mesoporous silica (OMS) as an adsorbent and membrane for separation of carbon dioxide (CO₂). **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 153, n. 1-2, p. 43-57, Jan 2010.

DASH, A. K.; CUDWORTH, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems - the role of intraluminal antibiotics. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 40, p. 1-12, 1998.

EDGE, M. et al. The retention of heterocyclics by siliceous frameworks. **Journal of Materials Science**, v. 36, p.1443 – 1450, 2001.

FREDENBERG, S. et al. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-A review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 415, n. 1-2, p. 34-52, Aug 30 2011.

FU, Z.Y., HAN, J.X., HUANG, H.Y., Emodin affects ERCC1 expression in breast cancer cells. **Chin. Med. J. (Engl.)**, 120, 1710–1715, 2007.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, Surface Area and Porosity**. 2^a. 1982.

GUTOWSKA, A. et al. Squeezing hydrogels for controlled oral drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 48, n. 2-3, p. 141-148, Oct 13 1997.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638-1649, Dec 14 2008.

HOFFMANN, F. et al. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 45, n. 20, p. 3216-3251, 2006.

HOSTA-RIGAU, L. et al., Noncovalent Liposome Linkage and Miniaturization of Capsosomes for Drug Delivery. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 3548, 2010.

HSU, C.M. et al., Emodin inhibits the growth of hepatoma cells: finding the common anti-cancer pathway using Huh7, Hep3B, and HepG2 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 392, 473–478, 2010.

HUANG, Q. et al., Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. **Med. Res. Rev.** v. 27, 609–630, 2007.

HUO, Q. S. et al. Organization of organic-molecules with inorganic molecular-species into nanocomposite biphase arrays. **Chemistry of Materials**, v. 6, n. 8, p. 1176-1191, Aug 1994.

KIM, T.-W. et al., Tailoring the pore structure of sba-16 silica molecular sieve through the use of copolymer blends and control of synthesis temperature and time **J. Phys. Chem. B**, 108, 11480–11489, 2004.

KRESGE, C.T et al., Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. **Nature**. v. 359, 710–712, 1992.

LANGER, R. New methods of drug delivery. **Science**, v. 249, p. 1527-1533, 1990.

LEBEAU, B. et al. Organized mesoporous solids: mechanism of formation and use as host materials to prepare carbon and oxide replicas. **Comptes Rendus Chimie**, v. 8, n. 3-4, p. 597-607, Mar-Apr 2005.

LIN, C.-L. et al., Synthesis of SBA-16 and SBA-15 mesoporous silica crystals templated with neutral block copolymer surfactants. **J. Phys. Chem. Solids**, v. 69, 415–419, 2008.

LIU, B. et al. Synthesis of organic-inorganic hybrid microspheres and the corresponding mesoporous silica nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 411, p. 98-104, Dec 1 2013.

LOPES DOS SANTOS, S. M. et al. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 180, p. 284-292, , Nov 1 2013.

LYRA, M. A. M. D. et al. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26 2007.

MARTINS, T. S. et al. Local atomic structure of lanthanide complexes in cubic ordered mesoporous silica. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 560, p. 67-71, May 25 2013

MESA, M. et al. Morphology and porosity characteristics control of SBA-16 mesoporous silica. Effect of the triblock surfactant Pluronic F127 degradation during the synthesis. **Solid State Sciences**, v. 7, n. 8, p. 990-997, Aug 2005.

PAN, C.J.; WANG, J.; HUANG, N., Preparation, characterization and in vitro anticoagulation of emodin-eluting controlled biodegradable stent coatings. **Colloids Surf. B Biointerf.**, 77, 155–160, 2010.

PANCZYK, T.; WARZOCHA, T. P.; CAMP, P. J. A Magnetically Controlled Molecular Nanocontainer as a Drug Delivery System: The Effects of Carbon Nanotube and Magnetic Nanoparticle Parameters from Monte Carlo Simulations. **J. Phys. Chem. C**, v. 114, p. 21299, 2010.

RENUKA, N. K.; PRAVEEN, A. K.; ANAS, K. Influence of CTAB molar ratio in tuning the

texture of rice husk silica into MCM 41 and SBA-16. **Materials Letters**, v. 109, p. 70-73, Oct 15 2013.

RIVERA-MUÑOZ EM, HUIRACHE-ACUÑA R. Sol Gel-Derived SBA-16 Mesoporous Material. **International Journal of Molecular Sciences**. 11(9):3069-3086, 2010.

SADAHIRA, C. M. "Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis do álcool polivinílico pH sensitivos processados por métodos físico-químicos". 2007. 89 Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Minas Gerais

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. 26 2003.

SHEN, Y. Q. et al., Charge-reversal polyamidoamine dendrimer for cascade nuclear drug delivery. **Nanomedicine**, v. 5, p. 1205, 2010.

SING, K.S.W. et al., Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. **Pure and Applied Chemistry**, v. 57(4), p. 603-619, 1985.

SLOWING, II et al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1278-1288, Aug 2008.

SOLER-ILLIA, G. J. D. A. A. et al. Chemical strategies to design textured materials: from microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. **Chemical Reviews**. 102: 4093-4138 p. 2002.

SOLOMONS, T. W. G.; FRUHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7^a. 2001.

SRINIVAS, G. et al., Molecular Mechanism of Emodin Action: Transition from Laxative Ingredient to an Antitumor Agent. **Med. Res. Rev.** v. 27, 591–608, 2007.

STEVENS, W.J.J. et al., Investigation of the Morphology of the Mesoporous SBA-16 and SBA-15 Materials. **J. Phys. Chem. B**, 110, 9183–9187, 2006.

SUN, H. et al. Mesostructured SBA-16 with excellent hydrothermal, thermal and mechanical stabilities: Modified synthesis and its catalytic application. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 333, n. 1, p. 317-323, May 1 2009.

UKMAR, T.; PLANINSEK, O. Ordered mesoporous silicates as matrices for controlled release of drugs. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, n. 4, p. 373-385, Dec 2010.

WANG, L. et al., Synthesis and characterization of small pore thick-walled SBA-16 templated by oligomeric surfactant with ultra-long hydrophilic chains. **Microporous Mesoporous Mater.** v. 67, 135–141, 2004.

WANG, S. et al., Emodin loaded solid lipid nanoparticles: preparation, characterization and

antitumor activity studies. **Int. J. Pharm.** 430(1-2):238-46, 2012.

WAN, Y.; ZHAO, D. On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates. **Chem. Rev.** v. 107, 2821–2860, 2007.

YANG, X. Q. et al., Multifunctional Stable and pH-Responsive Polymer Vesicles Formed by Heterofunctional Triblock Copolymer for Targeted Anticancer Drug Delivery and Ultrasensitive MR Imaging. **ACS Nano**, n. 4, p. 6805, 2010.

ZHANG, H. et al. Diatom silica microparticles for sustained release and permeation enhancement following oral delivery of prednisone and mesalamine. **Biomaterials**, v. 34, n. 36, p. 9210-9219, Dec 2013.

ZHAO, D. et al., Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. **Science**, v. 279, 548–552, 1998.

_____.et al., Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. **J. Am. Chem. Soc.** 120, 6024–6036. 1998.