

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **TESE** será disponibilizado somente a partir de 24/09/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Cápsulas supramoleculares derivadas de redes metalo-orgânicas
para liberação de fármaco

Marina Paiva Abuçafy

Orientadora: Prof^a. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

Coorientadora: Prof^a. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Araraquara - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Marina Paiva Abuçafy

**Cápsulas supramoleculares derivadas de redes metalo-orgânicas
para liberação de fármaco**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Regina Celia Galvão Frem

Araraquara - SP

2020

A166c Abuçafy, Marina Paiva.
Cápsulas supramoleculares derivadas de redes metalo-orgânicas para liberação de fármaco / Marina Paiva Abuçafy. – Araraquara: [S.n.], 2020.
130 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Leila Aparecida Chiavacci Favorin.
Coorientadora: Regina Célia Galvão Frem.

1. Cápsulas de MOF. 2. Metotrexato. 3 Colagenase. 4. Sistemas duplos de liberação. I. Favorim, Leila Aparecida Chiavacci, orient. II. Frem, Regina Célia Galvão, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo apoio incondicional e incentivo na vida e nos estudos, sendo sempre muito presentes e pacientes.

"Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido"

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por apoiarem sempre meus estudos e vibrarem a cada conquista, sempre demonstrando apoio incondicional;

Ao meu irmão Daniel, por estar sempre ao meu lado apoiando todo o meu caminho e dando conselhos;

À minha orientadora, Prof. Dra. Leila Aparecida Chiavacci, por sempre confiar em mim, me proporcionando muitas inúmeras oportunidades e compartilhando seus conhecimentos. Também agradeço a amizade construída durante todos os anos de convívio no período de iniciação científica, mestrado e doutorado;

À minha coorientadora, Prof. Dra. Regina Célia Galvão Frem, pelos grandes ensinamentos e por me acolher em seu laboratório de forma muito atenciosa, sempre me tratando com muito respeito, carinho e amizade;

Ao meu supervisor durante o período de estágio de pesquisa no exterior, Dr. Christian Serre, por me orientar durante o estágio sanduíche, pelos conhecimentos compartilhados e oportunidades, que me engrandeceram profissionalmente. Muito obrigada por me receber com tanto respeito e humildade;

Aos Dr. Cedric Boissiere e Dr. Nicolas Bremond, por todos os ensinamentos e discussões durante o meu estágio no exterior, sempre abertos a discussões que me fizeram amadurecer no âmbito profissional;

Ao prof. Dr. Anselmo, por permitir o uso do equipamento Spray Dryer;

Ao prof. Dr. Fernando Pavan, pela colaboração na realização dos estudos de viabilidade celular;

À prof. Dra. Vera Lucia, por me fornecer a linhagem celular HaCaT;

Aos professores Dr. Celso Santilli e Dra. Sandra Pulcinelli pela disponibilidade do laboratório e dos equipamentos de DRX, TG e Fissorção de N₂;

Ao Maurício Cavicchioli pela ajuda e empréstimo do aerossol;

À todos os funcionários e técnicos do Instituto de Química UNESP, em especial Diego (MEV), Rafael (IV) e Neide (DRX);

Aos grandes amigos que tive a oportunidade de conhecer durante todos esses anos no CMAF, especialmente Bruna Lallo, Mariana Marin, Valesca Pizzone, Camila Garcia, Thúlio Lemos, Bruna Chiari e João Oshiro Junior, pela agradável convivência que tornou esse período mais leve e divertido no ambiente de trabalho, também por compartilharem comigo as alegrias e angústias de cada etapa deste trabalho;

Aos alunos de iniciação científica, Fernanda de Melo, Patrícia Mayume, Mariane Dias, Bruno Altran, João Monteiro e Júlio Budin, pela paciência e dedicação;

À todos os meus amigos e colegas do laboratório Applied MOFs, que me receberam com os braços abertos. Em especial à Camila Lima, Caroline Moreaes, Mariana Dessimone e Renan Augusto que sempre tiveram muito carinho comigo.

Ao Odair Bim Júnior por toda a ajuda e colaboração em relação a enzima colagenase.

À todos os colegas do laboratório IMAP (ESPCI/ ENS- Paris), em especial Inês, Victoria, Angelika e Farid, que me acolheram e fizeram meus dias mais leves e divertidos, além de compartilharem muito conhecimento;

Aos amigos que me acompanham desde a graduação e que sempre estão comigo em todas as etapas da minha vida, Camila Puertas, Monique Gonçalves, Clíscea Corso, Felipe Hilário, Rafael Romano, Lenita Tomita, Leandro Alves do Santos, Barbara Kapp e Alice Hadadd;

Aos amigos que a pós-graduação me proporcionou, que foram muito importantes para eu passar por esse período com mais leveza, Jéssica Bernegossi, Mariana Rillo Sato, Luciani Toledo, Giovanna Fortunato, Mariana Santoro, Isabel Silva, Larisa Spoto e Matheus Ramos;

Aos amigos Eloisa Berbel Manaia, Bruno Leonardo Caetano, Rosembergue Gonçalves, Rodolfo Fini, Rodrigo Santos e Larissa S. Penna por toda parceria e amizade, que fizeram desses anos muito mais divertidos. Em especial aos compadres Eloisa Berbel Manaia e Bruno Leonardo Caetano, pela família que foram para mim durante 8 meses e pela amizade de tantos anos;

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara, em particular à Fátima, Queila, Natália, Paulo, Cristina Feltrin e Dona Neuzinha, por todos os momentos de atenção e cuidado;

À todos os amigos que o período de estágio no exterior me proporcionaram;

À Capes, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Doutorado em parte desse trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

À CNPq, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Doutorado em parte desse trabalho;

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio deste projeto com bolsa de doutorado no Brasil e no exterior (Processos nº 2016/11563-4 e 2018/00442-7).

RESUMO

As redes metalo-orgânicas são polímeros de coordenação cristalinos e altamente porosos constituídos por interações covalentes entre íons ou clusters metálicos e ligantes orgânicos. Dentre algumas superestruturas que podem ser construídas com base em MOFs, destacam-se as cápsulas, que tem atraído muito interesse dos pesquisadores por ser um material que além da porosidade usualmente encontrada neste tipo de material, podem apresentar cavidades no seu interior. O uso de cápsulas construídas a partir de MOFs como sistemas de liberação de fármaco tem progredido, particularmente para superar as limitações dos carreadores já explorados pela literatura, proporcionando a possibilidade de transportar moléculas grandes ou uma elevada massa da molécula de interesse. Dentro desse contexto, foram desenvolvidas nesse trabalho cápsulas à base das MOFs HKUST, ZIF-8 e MIL-100 por três métodos diferentes: utilização de moldes, emulsão de *pickering* e *spray drying*, com o objetivo de formar um sistema de duplo carregamento para o tratamento de câncer. Os materiais foram caracterizados físico-quimicamente e as cápsulas à base da MIL-100 desenvolvidas por *spray drying* mostraram-se mais promissoras para a aplicação farmacêutica, apresentando diâmetro médio de 800 nm. As cápsulas exibiram maior eficiência de encapsulação para o fármaco metotrexato (MTX) quando comparada com a sua oclusão em nanopartículas do mesmo material, o que corrobora com as suas propriedades e a presença de cavidades ocas observadas por microscopia eletrônica, além do aumento de tamanho do sistema. Além disso, as cápsulas apresentaram também uma alta capacidade de encapsulação de moléculas grandes, como a enzima colagenase (91,7%). O ensaio de atividade enzimática mostrou que a colagenase permaneceu com sua atividade preservada mesmo após o processo de encapsulação. Quanto aos processos de liberação da matriz porosa, o perfil de liberação do fármaco MTX mostrou que as cápsulas têm maior capacidade para prolongar a liberação do metotrexato, de maneira que após 48 horas, apenas 50% do fármaco foi liberado, enquanto quase 93% do fármaco presente na nanopartículas da MOF MIL-100 já haviam sido liberados, o que também pode ser justificado pela maior área superficial da nanopartícula. Além disso, a cápsula também controla a liberação da colagenase, permitindo o uso desse sistema como um material capaz de transportar e liberar o fármaco e a enzima em associação. A avaliação da citotoxicidade em células e A-375 revelou alta viabilidade celular das cápsulas de MIL-100 e, que após 24 horas de incubação, as cápsulas contendo MTX e colagenase causaram aumento da citotoxicidade, principalmente na linhagem celular cancerígena, o que confirma a ação antitumoral do sistema composto pelo fármaco e pela proteína.

Palavras-chave: *Cápsulas de MOF, metotrexato, colagenase, sistemas duplos de liberação.*

ABSTRACT

Metal-Organic Frameworks are highly porous and crystalline coordination polymers made up of covalent interactions between metallic ions or clusters and organic ligands. Among some superstructures that can be developed based on MOFs, the capsules stand out, which has attracted a lot of interest from researchers because it is a material that, in addition to the porosity usually found in this type of material, can have cavities (hollow capsules) inside. The use of capsules based on MOFs as drug delivery systems has progressed, particularly to overcome the limitations of carriers already explored in the literature, providing the possibility of transporting large molecules or a high mass of the molecule of interest. Within this context, capsules based on MOFs HKUST, ZIF-8 and MIL-100 (Fe) were developed in this work by three different methods: using molds, *pickering* emulsion and *spray drying*, aiming to form a double loading system for the treatment of cancer. The materials were physically and chemically characterized and the capsules based on MIL-100 (Fe) developed by *spray drying* proved to be more promising for pharmaceutical application, presenting an average diameter of 800 nm. The capsules exhibited greater encapsulation efficiency for the drug methotrexate (MTX) when compared to its occlusion in nanoparticles of the same material, which corroborates with its properties and the presence of hollow cavities observed by electron microscopy, besides the increase of the system size. In addition, the capsules also showed a high capacity to encapsulate large molecules, such as the collagenase enzyme (91.7%). The enzyme activity test showed that the collagenase remained with its activity preserved even after the process of encapsulation by *spray drying*. As for the release processes of the porous matrix, the MTX drug release profile showed that the capsules have a greater capacity to prolong the release of methotrexate, so that after 48 hours, only 50% of the drug was released, while almost 93% of the drug was released. drug present in the MOF MIL-100 nanoparticles had already been released, which can also be justified by the larger surface area of the nanoparticle. In addition, the capsule also controls the release of collagenase, allowing the use of this system as a material capable of transporting and releasing the drug and enzyme in combination. The evaluation of cytotoxicity in HaCat and A-375 cells revealed high cell viability of MIL-100 (Fe) capsules and, after 24 hours of incubation, capsules containing MTX and collagenase caused an increase in cytotoxicity, mainly in the cancer cell line, which confirms the antitumor action of the system composed of the drug and the protein.

Keywords: *MOF capsules, methotrexate, collagenase, dual release systems.*

LISTA DE ABREVIATURAS

MOF	Metal-Organic Framework
HKUST	MOF a base de cobre e ácido trimésico
ZIF-8	MOF a base de zinco e 2-metilimidazol
MIL-100	MOF a base de ferro e ácido trimésico
DRX	Difração de raios X
IV	Espectroscopia na região do Infravermelho
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FIB	Microscopia Eletrônica de Varredura com feixe de íons focalizados
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGA	Análise Termogravimétrica
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
SBU _s	Secondary Building Units
MTX	Metotrexato
PS	Poliestireno
DMF	Dimetilformamida
BTC	Ácido trimésico (ácido 1,3,5-benzeno tricarbóxico)
2-MeIM	2- metilimidazol
SDS	Dodecilsulfato de sódio
RhB	Rodamina B
PVA	Álcool polivinílico
DOPC	1,2-dioleil-fosfatidilcolina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustração dos blocos de construção e estrutura de uma MOF com topologia cúbica. .18
- Figura 2:** Alguns ligantes orgânicos que são usualmente utilizados na síntese de MOFs. 19
- Figura 3:** Estrutura da MOF HKUST, $[\text{Cu}_2(\text{BTC})_3]$ (BTC = 1,3,5-benzenotricarboxilato)20
- Figura 4:** Estrutura da ZIF-8, $[\text{Zn}(2\text{-metilimidazol})_2]$ (azul tetraédrico: zinco; preto: carbono; verde: nitrogênio).21
- Figura 5:** Estrutura da MIL-100 (Fe) (laranja: ferro; carbono: preto).....21
- Figura 6:** Esquema de uma das estratégias de incorporação e liberação de fármaco de uma MOF.23
- Figura 7:** Esquema da preparação de cápsulas de ZIF-8 desenvolvidas utilizando molde sólido.25
- Figura 8:** Preparação interfacial de uma camada de MOF utilizando uma mistura bifásica formada por uma solução aquosa contendo íons metálicos (azul) e uma solução orgânica de ligante (lilás).26
- Figura 9:** Esquema de formação da cápsula de MOF por emulsão de *pickering*, proposto por Zijun Bian e colaboradores27
- Figura 10:** Esquema do processo de spray drying para sintetizar superestruturas de HKUST (a); Esquema de formação da estrutura esférica pelo spray drying, em que a MOF se cristaliza na superfície da estrutura esférica (b); fotografia do equipamento spray dryer após a síntese do HKUST.....28
- Figura 11:** Distribuição de tamanhos de partículas e vias de administração.....29
- Figura 12:** Esquema da preparação das cápsulas de MOFs utilizando um molde rígido..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13:** Esquema da preparação das cápsulas de MOFs utilizando um molde líquido a partir de uma seringa (a) e a partir de um aerógrafo (b). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 14:** Esquema da preparação das cápsulas de MOF utilizando a emulsão de *pickering* a partir de nanopartículas de MOFs (a) e a partir de íons metálicos e ligantes orgânicos (b). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 15:** Esquema do processo de secagem por spray drying de um Mini Spray drying B290 (Büchi). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 16:** Esquema da tentativa de preparação das cápsulas de MOFs utilizando um molde rígido, mostrando a desestruturação da cápsula após a remoção do molde rígido. O destaque mostra as imagens das partículas de HKUST obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 17:** Esquema da formação de cápsulas de MOF e em destaque a fotografia do material obtido à base de HKUST. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 18:** Micrografias estereoscópicas obtidas com um aumento de 50x e histograma de distribuição de tamanho das cápsulas (a) a base de cobre, HKUST e (b) a base de ferro, MIL-100. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 19:** Curvas de TGA das cápsulas à base das MOFs (A) HKUST e (B) MIL-100. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 20:** Espectros vibracionais no IV das cápsulas a base das MOFs HKUST e MIL-100 obtidas por molde líquido. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 21:** Difractogramas de raios X das cápsulas a base das MOFs HKUST e MIL-100. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 22: Imagens MEV das cápsulas a base da MOF HKUST formadas através de uma seringa (a - c) e um aerógrafo (d - f). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23: Microanálise da cápsula de HKUST obtida por espectroscopia de raio X por dispersão em energia (EDS). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24: Perfil de distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas ZIF-8 (curva de três medidas independentes). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25: Difratoograma de raios X de pó (DRX) das nanopartículas ZIF-8. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26: Imagem de microscopia óptica da emulsão de *pickering* EpZ3 baseada em nanopartículas de ZIF-8 (a) e gráfico de distribuição de tamanho de das cápsulas (b). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 27: Imagem de microscopia óptica da emulsão de *pickering* Epz4 baseada em uma maior concentração de nanopartículas de ZIF-8 (a) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (b). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 28: Microscopia óptica e fotografia da emulsão de *pickering* de ZIF-8 com PVA (a) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (b). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 29: Microscopia óptica de emulsão contendo ligantes livres e com PVA adicionado durante o desenvolvimento (a) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (b). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 30: Microscopia óptica de emulsão contendo ligantes livres e com PVA adicionado na formulação recém preparada (a) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (b). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 31: Imagens da microscopia eletrônica de varredura das esferas obtidas a partir da emulsão de *pickering* utilizando a ZIF-8 e adicionando PVA durante (a) e após (b) o seu preparo. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 32: Difratoogramas de raios X (DRX) das nanopartículas de ZIF-8 (1) das cápsulas de ZIF-8 obtidas por emulsão de *pickering* com a adição de PVA na formulação recém formada (2) e das cápsulas ZIF-8 obtidas por emulsão de *pickering* com a adição de PVA durante o seu desenvolvimento (3). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 33: Perfil de distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas MIL-100 (curva de três medidas independentes). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 34: Difratoograma de raios X de pó (DRXP) das nanopartículas MIL-100. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 35: Imagens da microscopia óptica das emulsões EpM4 (a), EpM5 (b) e EpM6 (c) com os respectivos gráficos de distribuição de tamanho de partícula. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 36: Imagens da microscopia eletrônica de varredura das amostras EpM4 (a), EpM5 (b) e EpM6 (c). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 37: Difratoogramas de raios X das nanopartículas de MIL-100 (1) das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de *pickering* (2) das cápsulas obtidas após a adição de 5-terc-butil isoftálico na formulação (3) e das cápsulas MIL-100 após a adição de ibuprofeno na formulação (4).. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 38: Espectros na região do infravermelho das nanopartículas de MIL-100 (1) das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de *pickering* (2) das cápsulas obtidas após a adição de 5-terc-butil isoftálico na formulação (3) e das cápsulas MIL-100 após a adição de ibuprofeno na formulação (4). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 39: Imagens da microscopia óptica da emulsão EpM7 e gráfico de distribuição de tamanho de partícula. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 40: Difração de raios X das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de *pickering* após três lavagens (1), duas lavagens (2) e com uma lavagem (3). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 41: Espectros na região do infravermelho das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de *pickering* após três lavagens (1), duas lavagens (2) e uma lavagem (3). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 42: Imagem da microscopia eletrônica de varredura da amostra EpM7. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 43: Imagens de MEV-FEG de material obtido do *spray drying* com fluxo da bomba de 50% e a partir da suspensão de nanopartículas MIL-100 a 1 mg/mL..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 44: Imagens de MEV-FEG de material obtido do *spray drying* com fluxo da bomba de 5% e a partir da suspensão de nanopartículas MIL-100 a 0,125mg/mL. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 45: Imagens MEV de material obtido por *spray drying* com fluxo da bomba de 5% e a partir da suspensão de nanopartículas MIL-100 a 1mg/mL, e gráfico de distribuição de tamanho de partícula. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 46: Imagens de MET de cápsula de MIL-100 obtida por *spray drying*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 47: Imagem de MEV-FIB de cápsula de MIL-100 obtida por *spray drying*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 48: Difração de raios X das nanopartículas MIL-100 (preto) e das cápsulas de MIL-100 obtidas por *spray drying* (vermelho). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 49: Espectros vibracionais na região do infravermelho das nanopartículas MIL-100 (preto) e das cápsulas de MIL-100 obtidas por *spray drying* (vermelho). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 50: Isotermas de adsorção- dessorção de nitrogênio das cápsulas de MIL-100 obtidas por *spray drying*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 51: Estrutura molecular do metotrexato. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 52: Estrutura molecular da colagenase. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 53: Padrão de difração de raios X (a) e espectros vibracionais na região do infravermelho (b) da cápsula MIL-100 (azul), cápsula MIL-100_MTX (vermelho) e o fármaco MTX livre (preto). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 54: Curva analítica do MTX em solução aquosa de HCl 0,1M. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 55: Curva analítica do MTX em tampão fosfato pH 7,4 e pH 5,0. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 56: Perfis de liberação do MTX a partir das amostras MIL-100, cápsulas de MIL-100 e fármaco livre em meio tampão fosfato pH 7,4 (a) e pH 5,0 (b). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 57: Padrão de difração de raios X de pó da cápsula MIL-100, cápsula MIL-100_colagenase e colagenase livre. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 58: Espectros no infravermelho para cápsula MIL-100, cápsula MIL-100_colagenase e colagenase livre. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 60: Curva analítica da colagenase em água obtida por espectroscopia no UV-Vis.... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 60: Curva analítica da colagenase em PBS obtida por espectroscopia no UV-Vis. ... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 61: Perfis de liberação da colagenase das nanopartículas, cápsulas e enzima livre em meio tampão fosfato pH 7,4 (a) e pH 5,0 (b). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 62: Padrão de difração de raios X da cápsula MIL-100 antes e após a impregnação do fármaco MTX e da colagenase. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 63: Espectros vibracionais no infravermelho da cápsula MIL-100 (em preto) e do material obtido após a oclusão do metotrexato e da colagenase (em vermelho). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 64: Curvas TG das cápsulas MIL-100 e das cápsulas MIL-100 contendo MTX e colagenase. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 65: Isotermas de adsorção-dessorção das cápsulas de MIL-100 vazias, das cápsulas contendo MTX e das cápsulas contendo MTX e colagenase. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 66: Imagens MEV das cápsulas MIL-100_MTX_colagenase. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 67: Fotografias da gelatina pura (1) e co-cultivada com cápsula pura (2), cápsula MIL-100_colagenase (3), colagenase (4), MTX (5), cápsula MIL-100_MTX (6) e cápsula MIL-100_MTX_colagenase (7) incubadas com gelatina imediatamente após a mistura (tempo 0), após 3h, 12h e 24h. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 68: Viabilidade celular nas linhagens celulares A-375 e HaCat pelo método Alamar Blue. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes formulações de emulsões de *pickering* com as ZIF-8. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2: Composição das formulações de emulsões de *pickering* com MIL-100. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3: Composição das formulações de emulsões de *pickering* com MIL-100 contendo Ibuprofeno ou ácido 5-tert-butil isoftálico para estabilizar a interface óleo/ água. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4: Composição da emulsão de *pickering* contendo os ligantes que constituem a nanopartículas MIL-100 para estabilizar a interface óleo/ água (EpM7). **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 5: Avaliação textural das cápsulas MIL-100. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 6: Resumo dos dados obtidos do ensaio de encapsulação do MTX nas nanopartículas MIL-100 e nas cápsulas de MIL-100. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 7: Cinética de liberação do MTX das nanopartículas e cápsulas de MIL-100 em pH 7,4. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 8: Cinética de liberação do MTX das nanopartículas e cápsulas de MIL-100 em pH 5,0. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 9: Dados obtidos do ensaio de encapsulação da colagenase nas cápsulas de MIL-100. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 10: Cinética de liberação da collagenase das cápsulas de MIL-100 em pH 7,4 e pH 5,0.
..... **Erro! Indicador não definido.**
Tabela 11: Propriedades texturais das cápsulas, antes e após a encapsulação do fármaco MTX e de ambas moléculas bioativas, MTX e collagenase. **Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
Capítulo I. Introdução	16
I.1. Introdução ao Capítulo I.....	17
I.2. Redes metalo-orgânicas	17
I.3. MOFs biocompatíveis	19
I.4. MOFs como sistemas carreadores de fármacos	22
I.5. Cápsulas à base de MOFs	24

I.6. Conclusões do Capítulo I	30
Objetivos	31
Capítulo II. Parte experimental	Erro! Indicador não definido.
II.1. Introdução ao Capítulo II	Erro! Indicador não definido.
II.2. Desenvolvimento das cápsulas a base de MOFs:	Erro! Indicador não definido.
II. 2.1. Desenvolvimento de cápsulas de MOFs a partir de um molde sólido	Erro! Indicador não definido.
II. 2.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de um molde líquido	Erro! Indicador não definido.
II. 2.3. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de emulsão de <i>pickering</i>	Erro! Indicador não definido.
II. 2.4. Desenvolvimento de cápsulas de MOF utilizando <i>spray drying</i>	Erro! Indicador não definido.
II.3. Caracterização dos materiais obtidos:.....	Erro! Indicador não definido.
II.4. Ensaios <i>in vitro</i> utilizando as cápsulas de MIL-100	Erro! Indicador não definido.
II.4.1. Avaliação da eficiência de encapsulação do fármaco metotrexato nas cápsulas à base de MOFs	Erro! Indicador não definido.
II.4.2. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do fármaco metotrexato	Erro! Indicador não definido.
II.4.3. Avaliação da eficiência de encapsulação da colagenase nas cápsulas a base de MOFs	Erro! Indicador não definido.
II. 4.4. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da colagenase	Erro! Indicador não definido.
II.4.5. Atividade enzimática da colagenase	Erro! Indicador não definido.
II.4.6. Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i> pelo método Alamar Blue	Erro! Indicador não definido.
II.5. Conclusões do Capítulo II.....	Erro! Indicador não definido.
Capítulo III. Desenvolvimento de cápsulas de MOF utilizando molde sólido e molde líquido	Erro! Indicador não definido.
III.1. Introdução do Capítulo III	Erro! Indicador não definido.
III.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de um molde rígido	Erro! Indicador não definido.
III.3. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de um molde líquido	Erro! Indicador não definido.
III.4. Conclusões do Capítulo III.....	Erro! Indicador não definido.

Capítulo IV. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de emulsão de pickering . Erro! Indicador não definido.

IV. 1. Introdução do Capítulo IV **Erro! Indicador não definido.**

IV.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de emulsão de *pickering* **Erro! Indicador não definido.**

IV.2.1. Cápsulas de MOF ZIF-8 a partir de emulsão de pickering **Erro! Indicador não definido.**

IV.2.2. Cápsulas de MOF MIL-100 a partir de emulsão de *pickering* **Erro! Indicador não definido.**

IV. 3. Conclusão do Capítulo IV **Erro! Indicador não definido.**

Capítulo V. Desenvolvimento de cápsulas de MOF utilizando spray drying Erro! Indicador não definido.

V. 1. Introdução do Capítulo V **Erro! Indicador não definido.**

V.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF MIL-100 utilizando *spray drying* **Erro! Indicador não definido.**

V. 3. Conclusão do Capítulo V **Erro! Indicador não definido.**

Capítulo VI. Ensaios “in vitro” utilizando as cápsulas de MIL-100 Erro! Indicador não definido.

VI. 1. Introdução do Capítulo VI **Erro! Indicador não definido.**

VI. 2. Avaliação da eficiência de encapsulação do metotrexato e da colagenase e ensaio de liberação *in vitro* das cápsulas de MOFs **Erro! Indicador não definido.**

VI. 2.1. Avaliação da eficiência de encapsulação e perfil de liberação do metotrexato nas cápsulas a base de MOFs **Erro! Indicador não definido.**

VI. 2.2. Avaliação da eficiência de encapsulação e perfil de liberação da colagenase nas cápsulas a base de MOFs **Erro! Indicador não definido.**

VI. 3. Investigação da possibilidade de utilização das cápsulas metalo-orgânicas como sistemas de dupla liberação: cápsulas de MIL-100 contendo duas moléculas biologicamente ativas, o fármaco metotrexato (MTX) e a enzima colagenase **Erro! Indicador não definido.**

VI. 4. Avaliação da atividade enzimática da colagenase liberada das cápsulas de MIL-100 . **Erro! Indicador não definido.**

VI. 5. Avaliação da viabilidade celular das cápsulas de MIL-100 . **Erro! Indicador não definido.**

VI. 6. Conclusão do Capítulo VI **Erro! Indicador não definido.**

Considerações Finais e Perspectivas 32

Referências 34

Capítulo I.

Introdução

I.1. Introdução ao Capítulo I

Neste capítulo foi apresentada uma revisão dos assuntos relevantes discutidos nessa tese. Primeiramente, foi feita uma breve introdução sobre as redes metalo-orgânicas, as MOFs biocompatíveis mais estudadas e a sua aplicação como sistema carreador de fármaco. Também foram abordados temas relacionados às capsulas de MOFs e os principais mecanismos envolvidos na sua formação.

I.2. Redes metalo-orgânicas

Os materiais cristalinos porosos vêm sendo estudados há muito tempo para diversas aplicações, e com o avanço das técnicas de caracterização e de métodos de síntese, a partir da primeira metade do século XIX, houve o desenvolvimento da síntese de zeólitas e, posteriormente, materiais mesoporosos. No entanto, as zeólitas apresentam pequenas dimensões de poros, o que limita adsorção de outros constituintes e os materiais mesoporosos, descobertos posteriormente para solucionar essa limitação, continuavam apresentando poros limitados e impossibilidade de variação das propriedades estruturais¹. Em 1954, surgiram os polímeros de coordenação, que são estruturas cristalinas inorgânicas em que os íons metálicos se ligam com componentes orgânicos, chamados de espaçadores, capazes de combinar a capacidade de modulação das propriedades estruturais com a porosidade².

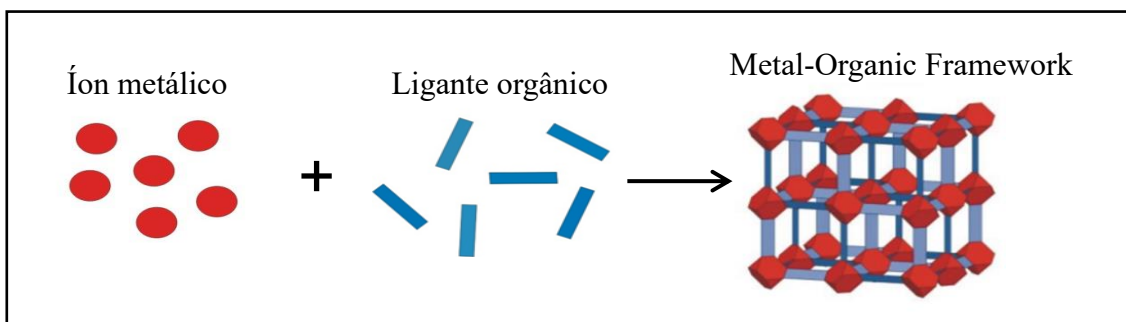
Durante muitos anos, diversos trabalhos foram realizados na área de polímeros de coordenação, até que em 1995 o termo “Metal-Organic Framework” (MOF) surgiu na literatura de periódicos nos trabalhos do grupo de Yaghi³, sendo que em nenhum trabalho ainda havia dados específicos sobre a porosidade e o foco era para a aplicação catalítica.

Assim como Yaghi e colaboradores⁴, Robson e seu grupo⁵ e o grupo de pesquisa de Ferey⁶ continuaram impulsionando esse amplo campo de pesquisa. Em 1999 foi publicado o primeiro caso de sucesso de síntese da MOF com altíssima porosidade e estabilidade, feito com grupamentos Zn₄O e ácido tereftálico como ligante orgânico, nomeado como MOF-5. A partir deste trabalho muitas MOFs foram sintetizadas com diversas propriedades estruturais e tamanho de poros⁴.

Dentro das recomendações da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), através de um projeto denominado “Coordination polymers and metal-organic frameworks: terminology and nomenclature guidelines”⁷, o termo MOF deve ser usado para

compostos cristalinos constituídos a partir de íons metálicos interconectados por espaçadores orgânicos contendo espaços vazios (poros), como está ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Ilustração dos blocos de construção e estrutura de uma MOF com topologia cúbica.

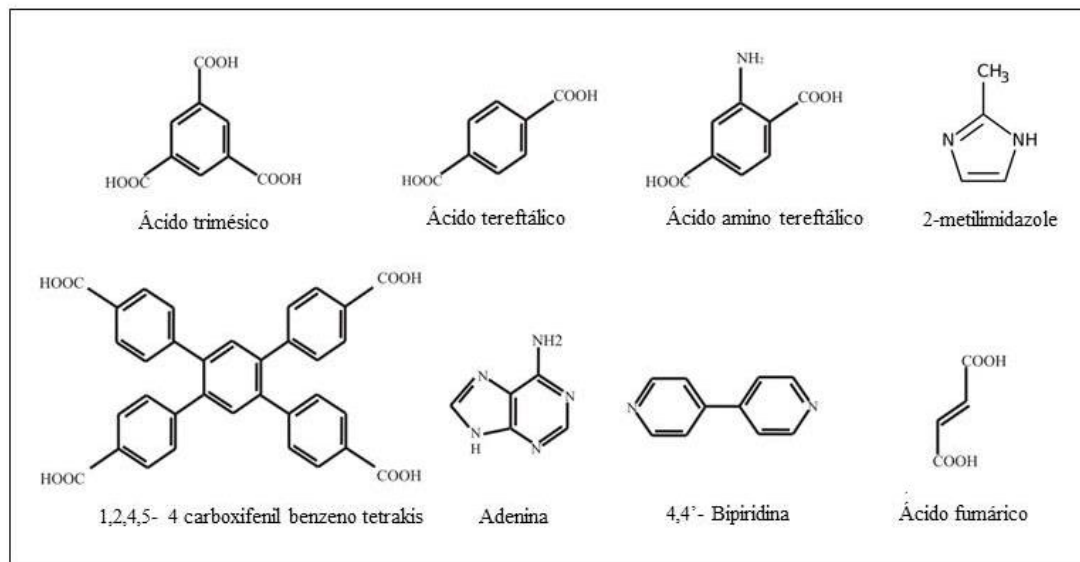


Fonte: A autora (2020).

A nomenclatura das MOFs vem sendo descrita, na maioria das vezes, com uma abreviatura seguida de um número sequencial de acordo com a descoberta. As abreviaturas indicam o tipo de material, como MOF (*Metal-Organic Framework*) e COF (*Covalent-Organic Framework*), o tipo de estrutura, como ZIF (*Zeolitic Imidazole Framework*) e IRMOF (MOF isoretilar) ou até mesmo o laboratório em que o material foi desenvolvido, como por exemplo, CPO (*coordination polymer of Oslo*), HKUST (*Hong Kong University of Science and Technology*) e MIL (*Materials of Institut Lavoisier*). Outra maneira de nomear este tipo de material é usar a estequiometria da célula unitária, podendo conter também a molécula visitante, por exemplo: $[Zn_4(O)(bdc)_3] \cdot 3H_2O$, sendo que o oxigênio e a molécula 1,4-benzeno dicarboxilato (bdc) são os ligantes orgânicos e a H_2O é uma molécula hóspede¹.

As inúmeras possibilidades de combinações variadas entre os conectores metais e ligantes proporcionam o desenvolvimento de estruturas cristalinas diferenciadas, resultando em variações de tamanho de poros, forma, estruturas e possibilita ainda muitas oportunidades de funcionalizações⁸. As características dos metais utilizados podem dar origem a diversas geometrias da estrutura, de acordo com o estado de oxidação e os números de coordenação possíveis, que podem variar de 2 a 12. Da mesma maneira, as diferentes propriedades estruturais dos ligantes orgânicos permitem uma ampla variedade de sítios de coordenação⁹. A Figura 2 mostra alguns exemplos dos ligantes orgânicos mais utilizados para o desenvolvimento de MOFs.

Figura 2: Alguns ligantes orgânicos que são usualmente utilizados na síntese de MOFs.



Fonte: A autora (2020).

A síntese das MOFs pode ocorrer de diferentes maneiras, geralmente seguindo a adição de uma solução contendo o metal e outra contendo o componente orgânico. A junção das duas soluções promove um processo de auto-arranjo, em que o ligante orgânico cede elétrons para o centro metálico formando a ligação coordenada¹⁰.

Somente nos últimos anos surgiu a preocupação de sintetizar MOFs constituídas por compostos naturais e biocompatíveis¹¹, antes disso sua composição era feita, na maioria das vezes, por ligantes orgânicos não renováveis ou derivados de petróleo e metais pesados, apresentando alta toxicidade. Entre as MOFs biocompatíveis que são mais utilizadas atualmente destaca-se a HKUST, ZIF-8 e MIL-100.

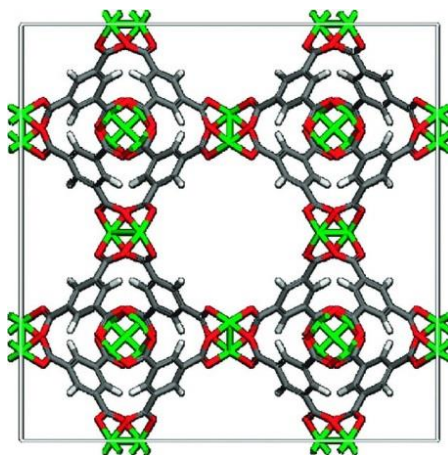
I.3. MOFs biocompatíveis

A MOF HKUST é composta por íons de cobre (II) e pelo ligante orgânico ácido trimésico, também conhecido como BTC (ácido 1,3,5-benzeno tricarbóxico), de maneira que cada íon metálico é coordenado a quatro átomos de oxigênio provenientes do ligante orgânico formando a estrutura mostrada na Figura 3. Esta MOF foi relatada pela primeira vez em 1999 por Chui e

colaboradores ¹² e o nome HKUST se refere ao local da sua primeira síntese ser em Hong Kong University of Science and Technology.

Figura 3: Estrutura da MOF HKUST, $[\text{Cu}_3(\text{BTC})_2]^{13}$.

(verde: cobre; vermelho: oxigênio; preto: carbono e branco: hidrogênio).

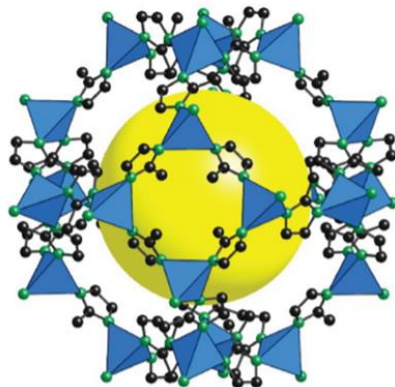


Esta MOF apresenta propriedades físico-químicas típicas de uma estrutura aberta altamente porosa, composta por cristais com morfologia octaédrica¹⁴. Dentro deste contexto, sabendo que esta é uma MOF promissora e biocompatível, ela foi utilizada neste trabalho para desenvolver cápsulas de HKUST.

A MOF ZIF-8 apresenta topologia zeolítica, ou seja, a presença de um ligante orgânico com 5 membros, como é o caso do imidazol. O estudo destes materiais à base de imidazolato ganhou significância quando Chen e colaboradores¹⁵ observaram que o ângulo entre o ligante orgânico e o metal era de 145°, semelhantemente com o ângulo de ligação presentes em ligações Si-O-Si nas zeólitas ¹⁶. A partir de então, estes materiais foram chamados de *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIFs), formando uma subfamília das MOFs¹⁵. Essa classe também merece uma convenção de nomenclatura distinta das outras MOFs por apresentar incrível estabilidade térmica e química. Entre as ZIFs existentes, a ZIF-8, constituída por íons de Zinco (II) e o ligante orgânico 2-metilimidazol (2-MeIM), é um dos compostos mais estudados¹⁷, e a sua estrutura é mostrada na Figura 4.

Figura 4: Estrutura da ZIF-8, $[\text{Zn}(\text{2-metilimidazol})_2]^{18}$.

(azul tetraédrico: zinco; preto: carbono; verde: nitrogênio; amarelo: representação do poro).

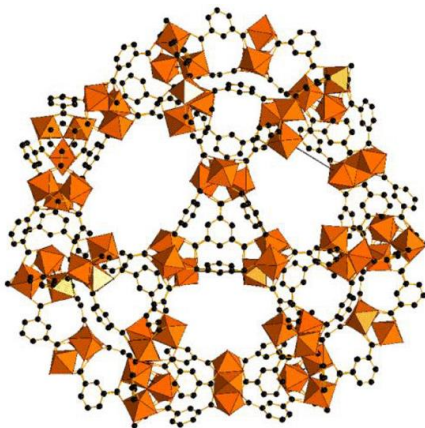


Desta maneira, este material é composto por um metal biocompatível (zinco) e um ligante não tóxico, e por isso essa MOF vem sendo muito utilizada para aplicações biomédicas, e foi escolhida para ser utilizada neste trabalho para o desenvolvimento de cápsulas à base de ZIF-8.

A MOF MIL-100 apresenta este nome devido ao local em que foi sintetizada pela primeira vez (*Material of Institut Lavoisier*). Este material é constituído por trímeros oxocentrados de octaedros de ferro ligados por grupos de ácido trimésico formando um arranjo 3D de redes mesoporosas acessíveis através de estruturas superficiais microporosas¹⁹, como mostra a Figura 5.

Figura 5: Estrutura da MIL-100 (Fe)²⁰.

(laranja: ferro; carbono: preto).



A MOF MIL-100 é composta por um ligante hidrofílico e por isso apresenta também características hidrofílicas. Existem na literatura diversos relatos da sua biocompatibilidade e da sua utilização como carreador de fármacos²¹, o que mostra ser um material muito promissor para a área farmacêutica. Com isso, este trabalho consiste também em desenvolver cápsulas à base de MIL-100.

I.4. MOFs como sistemas carreadores de fármacos

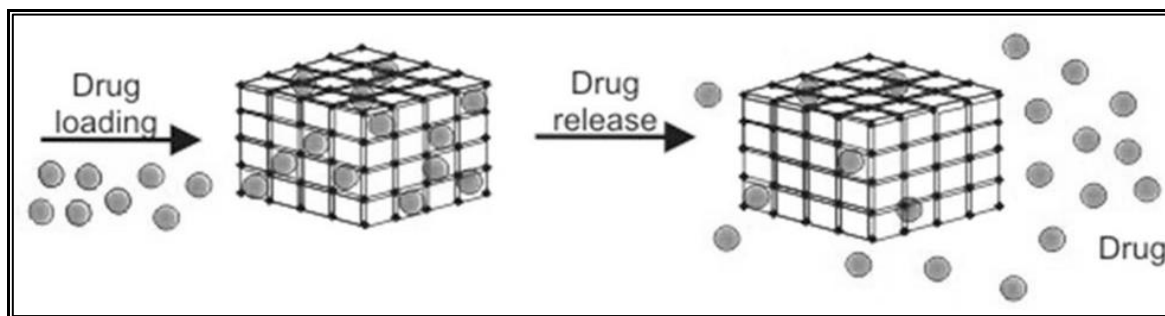
Os sistemas carreadores de fármacos são frequentemente usados para ampliar a biodisponibilidade do fármaco, melhorar sua estabilidade em meio biológico, manter e controlar as taxas de liberação e ainda direcioná-los para locais específicos do corpo caso seja funcionalizado, visando sempre reduzir a frequência de administração do fármaco e favorecer o conforto do paciente^{22,23}.

As interações que ocorrem entre os fármacos e sistemas supramoleculares representam um importante aspecto na pesquisa científica na área médica e de tecnologia farmacêutica, devido às implicações biológicas desses novos compostos que podem interferir no perfil de biodisponibilidade ou modificar a estabilidade de grande número de substâncias de uso terapêutico. Os fármacos administrados através de um carreador exibem perfis cinéticos e biológicos diferentes daqueles obtidos quando o fármaco é administrado de forma convencional^{24,25}.

Alguns sistemas têm sido muito explorados como carreadores de fármaco, dentre eles, destacam-se: lipossomas²⁶, dispositivos revestidos implantáveis²⁷, nanopartículas²², dendrímeros²³, ciclodextrina²⁸ e recentemente as redes metalo-orgânicas²¹.

Dessa maneira, as MOFs são sistemas promissores para liberação de fármacos por terem a possibilidade de ajustar os grupos funcionais e o tamanho dos poros. A Figura 6 apresenta um esquema para ilustrar como pode ocorrer a incorporação e a liberação de um fármaco a partir dos poros das MOFs.

Figura 6: Esquema de uma das estratégias de incorporação e liberação de fármaco de uma MOF²⁹.



Um dos primeiros grupos que pesquisaram as MOFs como potencial para aplicação em sistema de liberação de fármacos é de Ferey e colaboradores³⁰ que sintetizaram a família MIL desenvolvido em Versalhes. Horcajada e colaboradores, por exemplo, avaliaram a incorporação e a liberação de ibuprofeno a partir da MOF mesoporosa MIL-100³¹. A liberação do fármaco não levou a perda da cristalinidade ou decomposição da estrutura. A cinética do ibuprofeno liberada através da MOF foi monitorada por HPLC, evidenciando a liberação sustentada do fármaco durante as primeiras 8h e a liberação completa ao final de 6 dias. Além disso, este mesmo grupo de pesquisa também sintetizaram outras MOFs não tóxicas a base de ferro (III), como MIL-53, MIL-88A, MIL-88B, MIL-89, MIL-100 e MIL-101-NH₂, que variam os seus ligantes orgânicos, como nanocarreadores para liberação eficiente de antitumorais e retrovirais (bussufano, trifosfato de azidotimidina, doxorubicina ou ciclovir) para o tratamento de câncer e da AIDS. Os autores investigaram a toxicidade, biocompatibilidade, eficiência de carga do fármaco e perfil de liberação para estas MOFs. O ensaio de toxicidade foi feito *in vitro*, através da citotoxicidade em macrófagos de ratos utilizando o método de MTT, e *in vivo*, através da administração intravenosa das MOFs, sendo que a não toxicidade foi confirmada através da ausência de respostas imune ou de reações inflamatórias. Estes materiais podem ser obtidos em soluções aquosas e etanólicas e podem encapsular fármacos com diferentes polaridades, tamanhos e grupos funcionais.

Apesar de as MOFs apresentarem capacidade de transportar fármacos, o tamanho dos poros destes materiais ainda assim é limitado, o que conseqüentemente torna restrita a eficiência de carga de fármaco, ou ainda de moléculas maiores, como as proteínas. Desta maneira, para superar esta limitação, alguns grupos de pesquisa estão desenvolvendo cápsulas de MOF^{32,33}.

I.5. Cápsulas à base de MOFs

Dentro da classe das MOFs, recentemente, um novo grupo de materiais, que é capaz de formar cápsulas, têm atraído muito interesse por apresentar propriedades desejáveis, como presença de poros e cavidades ocas, além de também ter a possibilidade de apresentar permeabilidade seletiva³², elevada resistência térmica e mecânica, estabilidade e ser pH- sensível para a desestruturação^{34,35}.

A utilização de cápsulas de MOFs como sistemas de liberação de fármacos é muito promissora para a área farmacêutica, visto que este material possui os poros intrínsecos das MOFs e cavidades da cápsula, permitindo a incorporação de uma grande quantidade de fármacos, bem como biomoléculas maiores, como proteínas, o que é uma vantagem notável em comparação com o uso de apenas partículas MOF com tamanho de poro limitado.

Apesar de todas as vantagens da utilização das cápsulas à base de MOFs, muitos desafios devem ser superados, como a obtenção de uma boa estabilidade química e mecânica, e ainda exibir uma morfologia homogênea e uma distribuição de tamanho de partícula controlada, podendo estar na escala nanométrica ou micrométrica. Para isso, existem diversas técnicas desenvolvidas para sintetizar cápsulas à base de MOFs, sendo que as mais utilizadas são: formação mediada por molde sólido³⁶, formação mediada por molde líquido³², emulsão de “*pickering*”³⁷ e *spray drying*³⁸.

As cápsulas a base de MOFs sintetizadas a partir de moldes são desenvolvidas a partir da formação de filmes metalo-orgânicos na superfície do molde, que posteriormente é removido, resultando em uma cápsula oca³⁶. O processo de desenvolvimento deste material pode ocorrer com molde rígido e com molde líquido.

A estratégia de molde rígido pode ser exemplificada pelo uso de partículas esféricas sólidas como molde. Hee Jung Lee e colaboradores desenvolveram cápsulas ocas de MOF ZIF-8 utilizando partículas de poliestireno (PS) como molde esférico. Foram preparadas estruturas casca-caroço PS@ZIF-8, através de uma solução de metanol contendo PS, 2-metilimidazol e Zn(NO₃)₂. Em seguida as microesferas formadas foram adicionadas em uma solução de dimetilformamida (DMF), que dissolve de forma seletiva o núcleo de PS³⁹. A Figura 7 apresenta um esquema do sistema formado por molde sólido desenvolvido pelos autores.

Figura 7: Esquema da preparação de cápsulas de ZIF-8 desenvolvidas utilizando molde sólido³⁹.

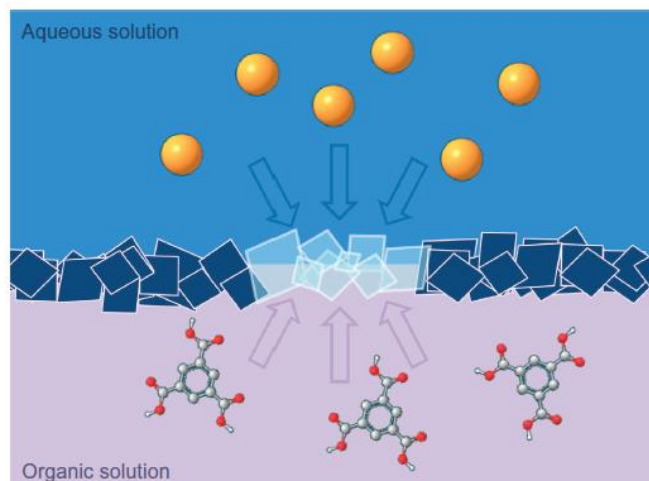


Outros autores também obtiveram microesferas ocas com o MIL-100 e Cu-BTC utilizando a mesma estratégia⁴⁰. Apesar de as estratégias que utilizam molde rígidos para o desenvolvimento de cápsulas ocas serem simples e diretas, elas são limitadas às estruturas de casca e caroço com propriedades de dissolução significativamente diferentes. Além disso, a etapa de remoção do molde rígido exige a utilização de solventes orgânicos que muitas vezes deteriora as propriedades inerentes da capsula oca formada, desestruturando as MOFs.

Visando superar essas dificuldades, o estudo de moldes líquidos é cada vez mais promissor, visto que permite a remoção fácil do molde das estruturas. A estratégia da utilização de molde líquido pode ser preparada usando duas fases diferentes, sendo que a interface entre dois líquidos imiscíveis favorece a formação controlada de camadas finas com diferentes componentes. Desta maneira, a formação da cápsula ocorre através de uma dispersão aquosa como gotículas em uma fase imiscível, de maneira que as gotículas servem como molde para formar as cápsulas³².

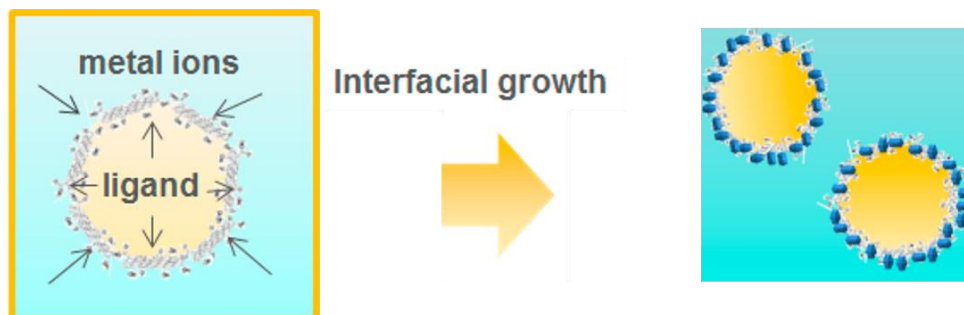
O grupo de pesquisa de Ameloot³² preparou cápsulas ocas de HKUST através do crescimento interfacial usando dois líquidos imiscíveis. As gotas da solução aquosa contendo íons metálicos (Cu^{2+}) e PVA foram usadas como molde líquido ao entrar em contato com uma solução orgânica de 1-octanol contendo ligantes (BTC). O crescimento resulta da formação de uma membrana reticulada na interface das cápsulas ocas, como mostra a Figura 8, sendo que o molde de líquido foi removido durante o processo de lavagem em etanol.

Figura 8: Preparação interfacial de uma camada de MOF utilizando uma mistura bifásica formada por uma solução aquosa contendo íons metálicos (azul) e uma solução orgânica de ligante (lilás)³².



Outra metodologia utilizada para o desenvolvimento de cápsulas é a emulsão *pickering*. Emulsão de *pickering* é um tipo de emulsão estabilizada apenas por nanopartículas sólidas localizadas na interface óleo-água, substituindo os surfactantes tradicionais por nanopartículas sólidas biocompatíveis. As emulsões de *pickering* são estabilizadas, na maioria das vezes, por nanopartículas anfifílicas, como sílica, proteínas, óxidos metálicos. Recentemente, as MOFs também foram relatadas com sucesso como estabilizadora para as emulsões de *pickering*^{37,41}. Desta maneira, as cápsulas de MOF obtidas por esta metodologia são desenvolvidas primeiramente pela formação de uma emulsão inversa (água/ óleo) seguida pela formação de uma “coroa” de MOF formado pelo efeito de *pickering*, como mostra a Figura 9.

Figura 9: Esquema de formação da cápsula de MOF por emulsão de *pickering*, proposto por Zijun Bian e colaboradores⁴².



Usando a microemulsão como processo de obtenção das cápsulas, Liu e colaboradores prepararam capsulas ocas e híbridas de ZIF/alginato através de emulsões de Pickering. Primeiramente foram preparadas as nanopartículas de ZIF-8 em isoctanol e, em seguida, foram preparadas as cápsulas através da emulsão. A microemulsão foi preparada usando a suspensão de isoctanol contendo nanopartículas de ZIF-8 como fase contínua e solução aquosa de alginato-PEG-2000 como fase dispersa. Por fim, as gotas de emulsão foram coletadas e recobertas com uma camada de polidimetilsiloxano para evitar aderência. Foram formadas cápsulas uniformes, capazes de carrear a Rodamina B (RhB) e libera-la de forma controlada, o que é promissor para aplicação de moléculas ativas ⁴¹.

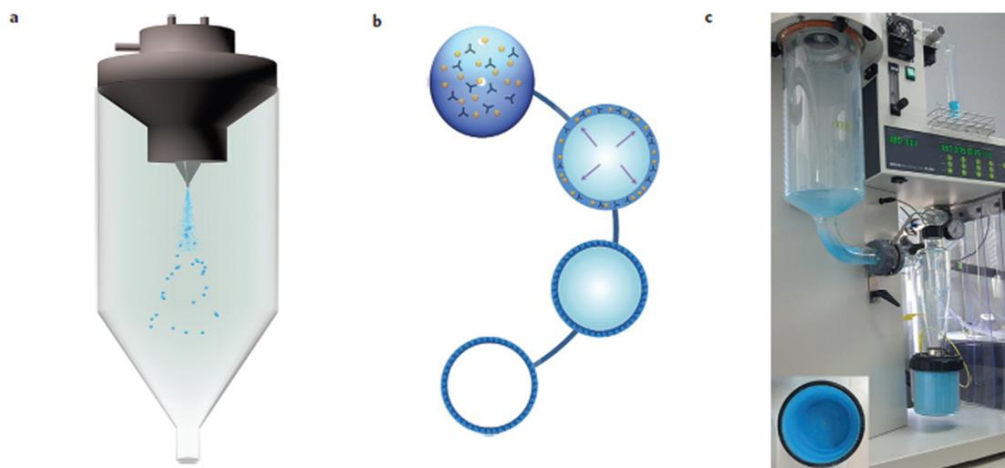
Outro método que pode ser muito promissor para o desenvolvimento de cápsulas à base de MOFs é a técnica de *spray drying*. O *spray drying* é relatado na literatura como um método de secagem de suspensões, método de microencapsulação e também pode ser adaptada para a formação de um sistema do tipo esférico, partindo de uma mistura líquida contendo nanopartículas dispersas. Esse tipo de processo permite a formação de micro ou nanocápsulas, dependendo da formulação precursora e dos parâmetros utilizados no equipamento ⁴³.

O princípio básico de funcionamento do equipamento *spray dryer* é a conversão de um líquido, podendo ser uma solução, suspensão ou emulsão, em um material seco, particulado, por meio da atomização do fluxo em uma câmara de secagem aquecida⁴⁴.

Apesar de essa técnica ser muito conhecida em estudos de tecnologia farmacêutica com o objetivo de secar materiais sensíveis a temperatura, preparo de grânulos para produção de comprimidos e melhoria na solubilidade, a aplicação desse equipamento para sintetizar MOFs é uma inovação muito importante para a produção desse material em larga escala. A Figura 10 mostra

um esquema de como ocorre a síntese da MOF por *spray drying*, proposto por Arnau Carné-Sánchez e colaboradores³⁸.

Figura 10: Esquema do processo de *spray drying* para sintetizar superestruturas de HKUST (a); Esquema de formação da estrutura esférica pelo *spray drying*, em que a MOF se cristaliza na superfície da estrutura esférica (b); fotografia do equipamento *spray dryer* após a síntese do HKUST³⁸.

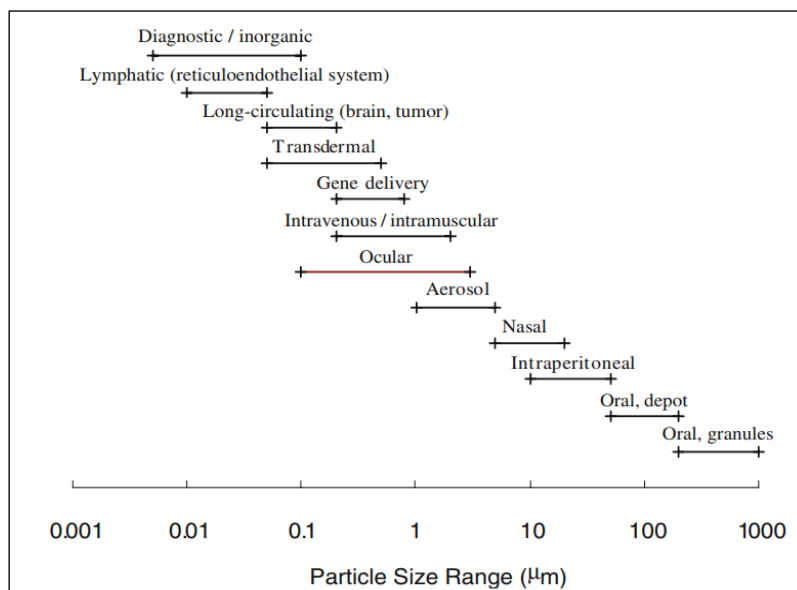


Em outro exemplo, desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Cedric Boissiere, desenvolveu-se nanopartículas de HKUST, ZIF-8 e $\text{Fe}_3(\text{BTC})_2$ a partir do *spray drying*. Foram utilizadas duas suspensões, sendo uma de ligante orgânico e uma do sal metálico, injetadas simultaneamente dentro do mesmo fluxo de ar quente para que a partícula de MOF fosse formada no interior do equipamento durante a secagem. Em seguida, o material coletado foi submetido ao ultrassom para obter as nanopartículas de MOFs, como era o objetivo do trabalho⁴⁵. Sendo assim, a utilização do *spray drying* para obter cápsulas de MOF é um método promissor, por ser um método rápido e escalonável. Esta metodologia também permite a produção em larga escala de superestruturas esféricas a partir de nanopartículas de MOFs na superfície de gotículas atomizadas⁴³.

Assim sendo, a evolução dos processos farmacêuticos em direção a maior produtividade e simplificação das formulações garante a atratividade do uso do *spray drying* como um método útil para formular sistemas de liberação de fármacos. As condições de processamento têm um efeito sobre as características do produto final, que por sua vez influencia a capacidade de encapsulação

e o perfil de liberação do fármaco. Além disso, a capacidade de o equipamento produzir partículas de vários tamanhos oferece possibilidades para aplicação para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármaco para vias de administração nasais, oculares, pulmonares, oral, intramuscular, intravenosa, entre outras. A Figura 11 mostra os diferentes intervalos de tamanho de partículas para as diferentes vias de administração, segundo Shekunov e colaboradores⁴⁶.

Figura 11: Distribuição de tamanhos de partículas e vias de administração⁴⁶.



Além de determinar a via de administração, o tamanho e a forma das partículas podem influenciar uma grande variedade de propriedades físicas e processabilidade durante a fabricação, incluindo: taxa de dissolução e biodisponibilidade dos princípios ativos, taxa de liberação controlada do fármaco e tempo de depuração.

O desenvolvimento de cápsulas baseadas em MOFs é uma alternativa para melhorar a estabilidade e eficiência do fármaco durante tratamentos difíceis, como o câncer. No entanto, este material ainda não foi muito explorado na área farmacêutica, e desta maneira, existem poucos relatos da eficiência de encapsulação e do perfil de liberação de fármacos a partir das cápsulas de MOF. Como exemplo de trabalhos desenvolvidos, Tang e colaboradores sintetizaram nanocápsulas poliméricas pH- responsivas usando a MOF ZIF-8 (composta por zinco e 2-metilimidazol) como molde. As cápsulas preparadas apresentaram alta eficiência de encapsulação, em torno de 87%, do

antitumoral doxorrubicina. O perfil de liberação do fármaco mostrou maior liberação em meio ácidos, provavelmente devido à quebra das nanocápsulas erodidas pelo H^+ ⁴⁷.

As cápsulas de MOFs são materiais promissores para um grande avanço nos sistemas de liberação controlada de fármacos visando especificamente nesse trabalho o tratamento do câncer, devido a capacidade de associar a incorporação de um fármaco, com ação anticancerígena, como por exemplo o metotrexato, nos poros intrínsecos das MOFs que constituem as cápsulas, e a incorporação de uma proteína, como por exemplo a colagenase, nas cavidades internas da estrutura da cápsula formada. O metotrexato é um fármaco antineoplásico que possui ampla atividade antitumoral e é utilizado para tratamentos de primeira linha de carcinomas colorretais, de mama e de pele^{48,49}. A colagenase faz parte do grupo de enzimas denominado proteases, que têm a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas, e vem sendo utilizada para degradar proteínas extracelulares e fatores de crescimento das células tumorais, evitando a progressão do tumor e a metástase⁵⁰.

I.6. Conclusões do Capítulo I

Neste capítulo foram apresentados alguns dos assuntos relevantes discutidos nessa Tese. O capítulo abordou uma breve introdução sobre as redes metalo-orgânicas, o surgimento e a importância das MOFs biocompatíveis, destacando-se as mais estudadas e a aplicação desse material como sistema de liberação de fármaco (*DDS, drug delivery system*). Também foram apresentados diferentes métodos para a formação de cápsulas baseadas em MOFs, como por molde sólido, molde líquido, emulsão de *pickering* e por *spray drying*.

Dessa maneira, conclui-se que apesar de haver trabalhos que buscam opções de materiais biocompatíveis e que sejam capazes de carrear uma grande quantidade de fármacos ou uma molécula com maior massa molecular, como as proteínas, muitos desafios devem ser superados durante a sua síntese, como a obtenção de uma boa estabilidade, morfologia homogênea e distribuição de tamanho de partícula controlada. Nesse sentido, o desenvolvimento de cápsulas de MOFs é uma alternativa promissora para esta aplicação. Fica evidente que mais estudos são necessários visando explorar o desenvolvimento de cápsulas de MOFs e a sua aplicação como sistema carreador de fármacos.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi desenvolver cápsulas a base de redes metalo-orgânicas à base de diferentes íons metálicos e ligantes orgânicos, como HKUST (cobre e ácido trimésico), ZIF-8 (zinco e 2-metilimidazol) e MIL-100(Fe) (ferro e ácido trimésico), capazes de transportar simultaneamente grande quantidade de fármaco e moléculas de elevada massa molecular que possuam atividades terapêuticas. Para alcançar esse objetivo, diferentes métodos de obtenção de cápsulas, como o uso de molde sólido, molde líquido, emulsão de *pickeringe spray drying* foram avaliados.

Considerações finais e perspectivas futuras

A preparação das cápsulas à base das MOFs compostas pelos íons metálicos biologicamente compatíveis cobre, zinco e ferro foi realizada com sucesso e, portanto podemos concluir que os objetivos gerais do trabalho foram alcançados. Em diversas situações, foi possível identificar a presença das nanopartículas das MOFs nas paredes das cápsulas obtidas por diferentes técnicas de preparação.

As cápsulas obtidas a partir da MOF de cobre(II) e o ácido trimésico (HKUST) foram desenvolvidas pelo método de molde líquido e apresentaram características cristalinas, como pode ser observado pelas análises de DRX que corroboram com dados apresentados na literatura.

Por outro lado, as cápsulas de ZIF-8 (à base de zinco e 2-metilimidazol) e MIL-100 (à base de ferro (III) e ácido trimésico) foram sintetizadas por outro método (emulsão *pickering*) no qual as nanopartículas atuaram como estabilizadoras da interface óleo/água das emulsões inversas desenvolvidas, formando uma “coroa” na gotícula que resultou nas cápsulas de MOF.

Cápsulas à base de MIL-100(Fe) foram também construídas por *spray drying* com estabilidade e tamanho de partícula controlado (~ 800 nm). É muito importante destacar que o uso desse método para desenvolver cápsulas baseadas nessa MOF de ferro foi um grande desafio e portanto consiste em uma contribuição significativa deste trabalho. Como o *spray drying* apresenta vantagens por ser uma técnica rápida e escalonável, os resultados obtidos neste trabalho são promissores para a produção semi-industrial de superestruturas esféricas com cavidades ocas à base de MOFs biocompatíveis.

Além disso, as cápsulas de MIL-100 obtidas por *spray drying* nesse trabalho podem ser consideradas como sistemas de dupla liberação, posto que apresentaram características que favoreceram a incorporação simultânea do fármaco metotrexato (pelos poros intrínsecos das nanopartículas de MIL-100) e encapsulação da colagenase (nas cavidades das cápsulas ocas) em um mesmo material. As cápsulas também mostraram um controle maior sobre a liberação do metotrexato (~ 50% após 48 horas) em comparação com as nanopartículas da MOF (93%), o que confirma as características promissoras deste material como sistema de liberação controlada de fármaco. A permanência da atividade enzimática da colagenase após a encapsulação mostra que esse é um material interessante para a associação do fármaco antitumoral com a proteína, e assim potencializar a ação antitumoral do sistema.

Por fim, as cápsulas obtidas por *spray drying* apresentaram baixa citotoxicidade em ensaio realizado com as células HaCat e A-375. Todavia, as cápsulas contendo MTX e colagenase apresentaram aumento da citotoxicidade, principalmente na linhagem celular tumoral, o que corrobora com a ação antitumoral do sistema composto pelo fármaco e pela proteína.

A diversidade de possibilidade de formação das MOFs, somada aos resultados positivos e desenvolvimento de cápsulas de MOF apresentados nesse trabalho, requer ainda uma pesquisa mais profunda destes materiais. Sendo assim, como perspectiva de trabalhos futuros destaca-se a possibilidade de realização de experimentos com os sistemas desenvolvidos, como a avaliação da internalização celular, liberação das moléculas ativas em meio celular e ainda ensaios *in vivo*, o que elucidará possíveis lacunas ainda não elucidadas na pesquisa com estes compostos e com as MOFs de modo geral.

Referências

1. CORMA, A.; GARCÍA, H.; LLABRÉS i XAMENA, F. X. Engineering Metal Organic Frameworks for Heterogeneous Catalysis. *Chem. Rev.* v. 110, p. 4606–4655, 2010.
2. WELLS, A. F. The geometrical basis of crystal chemistry. Part 2. *Acta Crystallogr.* v. 7, p. 545–554, 1954.
3. YAGHI, O. M.; LI, H. Hydrothermal Synthesis of a Metal-Organic Framework Containing Large Rectangular Channels. *J. Am. Chem. Soc.* v.117, p. 10401–10402, 1995.
4. LI, H.; EDDAOUDI, M.; O'KEEFFE, M.; YAGHI, O. M. Design and synthesis of an exceptionally stable and highly porous metal-organic framework. *Nature* v. 402, p. 276–279, 1999.
5. BATTEN, S. R.; HOSKINS, B. F.; ROBSON, R. Two Interpenetrating 3D Networks Which Generate Spacious Sealed-Off Compartments Enclosing of the Order of 20 Solvent Molecules in the Structures of Zn (CN)(NO₃)(tpt) 2/3. cntdot. solv (tpt= 2, 4, 6-tri (4-pyridyl)-1, 3, 5-triazine, solv=. appr. 3/4C₂H₂Cl₄. cntdot. 3/4CH₃OH or. appr. 3/2CHCl₃. cntdot. 1/3CH₃OH). *J Am Chem Soc*, v. 117, p. 5385-5386, 1995.
6. RIOU, D.; FÉREY, G. Hybrid open frameworks (MIL-n). Part 3 Crystal structures of the HT and LT forms of MIL-7: a new vanadium propylenediphosphonate with an open-framework. Influence of the synthesis temperature on the oxidation state of vanadium within the same structural t. *J. Mater. Chem.* v. 8, p. 2733–2735, 1998.
7. BATTEN, S. R. *et al.* Coordination polymers, metal–organic frameworks and the need for terminology guidelines. *CrystEngComm* v. 14, p. 3001–3004, 2012.
8. DHAKSHINAMOORTHY, A.; GARCIA, H. Metal–organic frameworks as solid catalysts for the synthesis of nitrogen-containing heterocycles. *Chem. Soc. Rev.* v. 43, p. 5750–5765, 2014.
9. KITAGAWA, S.; KITAURA, R.; NORO, S. Coordination Polymers Functional Porous Coordination Polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* v. 43, p. 2334–2375, 2004. doi:10.1002/anie.200300610.
10. RAMOS, A. L. D.; TANASE, S.; ROTHENBERG, G. Redes metalorgânicas e suas aplicações em catálise. *Quim. Nova*, v. 37, p. 123–133, 2014.
11. SMALDONE, R. A. *et al.* Metal–organic frameworks from edible natural products. *Angew.*

- Chem Int. Ed.* v. 49, p. 8630–8634, 2010.
12. CHUI, S. S. Y.; LO, S. M. F.; CHARMANT, J. P. H.; ORPEN, A. G.; WILLIAMS, I. D. A chemically functionalizable nanoporous material[Cu₃(TMA)₂(H₂O)₃]. *Science*, v. 283, p. 1148–1150, 1999.
 13. ZACHER, D.; SHEKHAH, O.; WÖLL, C.; FISCHER, R. A. Thin films of metal–organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* v. 38, p. 1418–1429, 2009.
 14. WU, D.; GUO, X.; SUN, H.; NAVROTSKY, A. Thermodynamics of Methane Adsorption on Copper HKUST - 1 at Low Pressure. *J Phys Chem Lett.* v. 6, p. 2439–2443, 2015.
 15. TIAN, Y.-Q. *et al.* Two Polymorphs of Cobalt(II) Imidazolate Polymers Synthesized Solvothermally by Using One Organic Template N,N-Dimethylacetamide. *Inorg. Chem.* v. 43, p. 4631–4635, p. 2004.
 16. PIMENTEL, B. R.; PARULKAR, A.; ZHOU, E.; BRUNELLI, N. A. Zeolitic Imidazolate Frameworks: Next-Generation Materials for Energy-Efficient Gas Separations. *ChemSusChem.* v. 7, p. 3202–3240, 2014.
 17. CHOI, J. Y. *et al.* Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 103, p. 10186–10191, 2006.
 18. MORRIS, W. *et al.* NMR and X-ray study revealing the rigidity of zeolitic imidazolate frameworks. *J. Phys. Chem. C* v. 116, p. 13307–13312, 2012.
 19. HORCAJADA, P. *et al.* Synthesis and catalytic properties of MIL-100 (Fe), an iron (III) carboxylate with large pores. *Chem. Commun.* v. 27, p. 2820–2822, 2007.
 20. CUNHA, D. *et al.* Rationale of drug encapsulation and release from biocompatible porous metal-organic frameworks. *Chem. Mater.* v. 25, p. 2767–2776, 2013.
 21. HORCAJADA, P. *et al.* Porous metal–organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nat. Mater.* v. 9, p. 172–178, 2010.
 22. BURGESS, D. J. Colloids and colloid drug delivery systems. *Encycl. Pharm. Technol. Third Ed. London Inf. Healthc.* v. 1, p. 636–647, 2006.
 23. SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* v. 3, p. 20–31, 2007.
 24. KOSTARELOS, K. Rational design and engineering of delivery systems for therapeutics: biomedical exercises in colloid and surface science. *Adv. Colloid Interface Sci.* v. 106, p. 147–168, 2003.

25. de OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim. Nova* v. 27, p. 131–138, 2004.
26. ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 65, p. 36–48, 2013.
27. PONTES ANDRADE LIMA, D.; ALVES JUNIOR, S. O. *Novos materiais metal-orgânicos como veículo de liberação controlada de fármacos*. Dissertação de mestrado em Ciências de Materiais. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
28. PEDERSEN, M.; BJERREGAARD, S.; JACOBSEN, J.; SØRENSEN, A. M. A genuine clotrimazole γ -cyclodextrin inclusion complex-isolation, antimycotic activity, toxicity and an unusual dissolution rate. *Int. J. Pharm.* v. 176, p. 121–131, 1998.
29. ABUÇAFY, M. P. *et al.* Supramolecular cyclodextrin-based metal-organic frameworks as efficient carrier for anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 127, p. 112–119, 2018.
30. FÉREY, G. *et al.* A chromium terephthalate-based solid with unusually large pore volumes and surface area. *Science*. v. 309, p. 2040–2042, 2005.
31. HORCAJADA, P. *et al.* Flexible porous metal-organic frameworks for a controlled drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* v. 130, p. 6774–6780, 2008.
32. AMELOOT, R. *et al.* Interfacial synthesis of hollow metal–organic framework capsules demonstrating selective permeability. *Nat. Chem.* v. 3, p. 382–387, 2011.
33. SHI, J.; ZHANG, L.; JIANG, Z. Facile construction of multicompartiment multienzyme system through layer-by-layer self-assembly and biomimetic mineralization. *ACS Appl. Mater. Interfaces* v. 3, p. 881–889, 2011.
34. HE, Q. *et al.* A pH-responsive mesoporous silica nanoparticles-based multi-drug delivery system for overcoming multi-drug resistance. *Biomaterials* v. 32, p. 7711–7720, 2011.
35. SUN, C. Y. *et al.* Zeolitic imidazolate framework-8 as efficient pH-sensitive drug delivery vehicle. *Dalt. Trans.* v. 41, p. 6906–6909, 2012.
36. GUO, J. *et al.* Engineering multifunctional capsules through the assembly of metal–phenolic networks. *Angew. Chemie Int. Ed.* v. 53, p. 5546–5551, 2014.
37. BIAN, Z. *et al.* Interfacial Growth of Metal Organic Framework/Graphite Oxide Composites through Pickering Emulsion and Their CO₂ Capture Performance in the Presence of

- Humidity. *Langmuir* v. 31, p. 7410-7417, 2015.
38. CARNÉ-SÁNCHEZ, A.; IMAZ, I.; CANO-SARABIA, M.; MASPOCH, D. A spray-drying strategy for synthesis of nanoscale metal–organic frameworks and their assembly into hollow superstructures. *Nat. Chem.* v. 5, p. 203–211, 2013.
 39. LEE, H. J.; CHO, W.; OH, M. Advanced fabrication of metal–organic frameworks: template-directed formation of polystyrene@ ZIF-8 core–shell and hollow ZIF-8 microspheres. *Chem. Commun.* v. 48, p. 221–223, 2012.
 40. LI, A.-L. *et al.* Controllable synthesis of metal–organic framework hollow nanospheres by a versatile step-by-step assembly strategy. *CrystEngComm* v. 15, p. 3554–3559, 2013.
 41. LIU, W.; ZHAO, Y.; ZENG, C.; WANG, C.; SERRA, C. A. Microfluidic preparation of yolk / shell ZIF-8 / alginate hybrid microcapsules from Pickering emulsion. *Chem. Eng. J.* v. 307, p. 408- 417, 2016.
 42. BIAN, Z. *et al.* Interfacial Growth of Metal Organic Framework/Graphite Oxide Composites through Pickering Emulsion and Their CO₂ Capture Performance in the Presence of Humidity. *Langmuir* v. 31, p. 7410–7417, 2015.
 43. RÉ, M. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. *Drying Technol.* v. 3937, p. 433-466, 2007.
 44. B-, S. D. *et al.* Nanoparticles by spray drying using innovative new technology : The Büchi Nano. *J. Control. Release* v. 147, p. 304–310, 2010.
 45. GARCIA MARQUEZ, A. *et al.* Green scalable aerosol synthesis of porous metal–organic frameworks. *Chem. Commun.* v. 49, p. 3848–3850, 2013.
 46. SHEKUNOV, B. Y.; CHATTOPADHYAY, P.; TONG, H. H. Y.; CHOW, A. H. L. Expert Review Particle Size Analysis in Pharmaceuticals : Principles , Methods and Applications. *Pharm. Res.* v. 24, p. 203-227, 2007.
 47. TANG, L., SHI, J., WANG, X., ZHANG, S. & WU, H. Coordination polymer nanocapsules prepared using metal – organic framework templates for pH-responsive drug delivery. *Nanotechnology* v. 28, p. 275-601, 2017.
 48. LI, Y. *et al.* Novel methotrexate prodrug-targeted drug delivery system based on PEG – lipid – PLA hybrid nanoparticles for enhanced anticancer efficacy and reduced toxicity of mitomycin C. *J. Mater. Chem. B* v. 2, p. 6534–6548, 2014.
 49. MYC, A. *et al.* Targeting the efficacy of a dendrimer-based nanotherapeutic in

- heterogeneous xenograft tumors in vivo. *Anti-cancer drugs* v. 21, p. 1–15, 2010.
50. SORIA-VALLES, C. *et al.* The anti-metastatic activity of collagenase-2 in breast cancer cells is mediated by a signaling pathway involving decorin and miR-21. *Oncogene* v. 33, p. 3054–3063, 2014.
 51. LENGERT, E. *et al.* Hollow silver alginate microspheres for drug delivery and surface enhanced Raman scattering detection. *Chem Sci*. v. 6, p. 20447–20452, 2016.
 52. FORGAN, R. S. *et al.* Nanoporous carbohydrate metal-organic frameworks. *ACS Pharmacol Transl Sci*. v. 134, p. 406–417, 2012.
 53. DEMESSENCE, A. *et al.* Adsorption properties in high optical quality nanoZIF-8 thin films with tunable thickness. *J Mater Chem A Mater*. v. 20, p. 7676–7681, 2010.
 54. HUO, J.; MARCELLO, M.; GARAI, A.; BRADSHAW, D. MOF-polymer composite microcapsules derived from pickering emulsions. *Adv. Mater*. v. 25, p. 2717–2722, 2013.
 55. PANCHAL, M. *et al.* Low temperature process for the synthesis of mof carboxylate nanoparticles. *WIPO Patent n. 2018141685*, 2018.
 56. HORCAJADA, P. *et al.* Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nat. Mater*. v. 9, p. 172–178, 2010.
 57. WILLIAMS, R. L. United States Pharmacopeia. *Encyclopedia of Clinical Pharmacy* p. 886–890, 2012.
 58. ARPAGAUS, C.; COLLENBERG, A.; RÜTTI, D.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm*. v. 546, p. 194–214, 2018.
 59. WANG, X. *et al.* Hybrid pH-sensitive nanogels surface-functionalized with collagenase for enhanced tumor penetration. *J. Colloid Interface Sci*. v. 525, p. 269–281, 2018.
 60. PAVAN, F. R. *et al.* Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. *Eur. J. Med. Chem*. v. 45, p. 1898–1905, 2010.
 61. SUKHORUKOV, G. B. *et al.* Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds. *J. Mater. Chem*. v. 14, p. 2073–2081, 2004.
 62. SHEN, K. *et al.* Ordered macro-microporous metal-organic framework single crystals. *Science*. v. 359, p. 206–210, 2018.
 63. JEONG, G. Y. *et al.* Bioactive MIL-88A Framework Hollow Spheres via Interfacial

- Reaction In-Droplet Microfluidics for Enzyme and Nanoparticle Encapsulation. *Chem. Mater.* v. 27, p. 7903–7909, 2015.
64. LESTARI, W. W. *et al.* Electro-Synthetic Optimization of Host Material Based on MIL-100(Fe). *Molekul* v. 11, p. 61, 2016.
 65. CANIONI, R. *et al.* Stable polyoxometalate insertion within the mesoporous metal organic framework MIL-100(Fe). *J. Mater. Chem.* v. 21, p. 1226–1233, 2011.
 66. BELLIDO, E. *et al.* Understanding the colloidal stability of the mesoporous MIL-100(Fe) nanoparticles in physiological media. *Langmuir* v. 30, p. 5911–5920, 2014.
 67. MARTO, J. *et al.* Starch-based Pickering emulsions for topical drug delivery: A QbD approach. *Colloids Surf. B Biointerfaces* v. 135, p. 183–192, 2015.
 68. ARDITTY, S.,; SCHMITT, V.; LEQUEUX, F.; LEAL-CALDERON, F. Interfacial properties in solid-stabilized emulsions. *Eur. Phys. J. B* v. 44, p. 381–393, 2005.
 69. DANAEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* v. 10, p. 1–17, 2018.
 70. PARK, K. M.; LEE, M. K.; HWANG, K. J.; KIM, C. K. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process. *Int. J. Pharm.* v. 183, p. 145–154, 1999.
 71. MELLE, S.; LASK, M.; FULLER, G. G. Pickering emulsions with controllable stability. *Langmuir* v. 21, p. 2158–2162, 2005.
 72. ZHANG, F. *et al.* Pickering emulsions stabilized by a metal-organic framework (MOF) and graphene oxide (GO) for producing MOF/GO composites. *Soft Matter* v. 13, p. 7365–7370, 2017.
 73. DONG, Y.; BHATTACHARYYA, D. Composites : Part A Effects of clay type , clay / compatibiliser content and matrix viscosity on the mechanical properties of polypropylene / organoclay nanocomposites. *Compos. Part. A Appl. Sci. Manuf.* 39, p.1177–1191, 2008.
 74. LAMPRECHT, A.; SAUMET, J. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int J Pharm.* v. 278, p. 407–414, 2004.
 75. HORCAJADA, P. *et al.* Metal–organic frameworks as efficient materials for drug delivery. *Angew. chemie* v. 118, p. 6120–6124, 2006.
 76. BAYU, A.; NANDIYANTO, D.; OKUYAMA, K. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles : From the nanometer to

- submicrometer size ranges. *Adv. Powder Technol.* v. 22, p. 1–19, 2011.
77. GARZÓN-TOVAR, L. *et al.* A spray-drying continuous-flow method for simultaneous synthesis and shaping of microspherical high nuclearity MOF beads. *React. Chem. Eng.* v. 1, p. 533-539, 2016.
 78. TROYANO, J. *et al.* Spray-Drying Synthesis of MOFs, COFs, and Related Composites. *Acc. Chem. Res.* v. 53, p. 1206–1217, 2020.
 79. DECUZZI, P. *et al.* Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J. Control. Release* v. 141, p. 320–327, 2010.
 80. CRONSTEIN, B. N.; AUNE, T. M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* v. 16, p. 145–154, 2020.
 81. BERNABEU, E.; GONZALEZ, L.; CAGEL, M.; MORETTON, M. A.; CHIAPPETTA, D. A. Deoxycholate-TPGS mixed nanomicelles for encapsulation of methotrexate with enhanced in vitro cytotoxicity on breast cancer cell lines. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* v. 50, p. 293–304, 2019.
 82. CIRO, Y. *et al.* Production, physicochemical characterization, and anticancer activity of methotrexate-loaded phytic acid-chitosan nanoparticles on HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carbohydr. Polym.* v. 243, p. 116436, 2020.
 83. SANTOS, ALINE MARTINS DOS. *Desenvolvimento e caracterização de micro/nanossuspensões com propriedades mucoadesivas para liberação cólon-específica de metotrexato.* Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2015.
 84. BIM JÚNIOR, O. *et al.* Encapsulation of collagenase within biomimetically mineralized metal-organic frameworks: designing biocomposites to prevent collagen degradation. *New J. Chem.* v. 43, p. 1017–1024, 2019.
 85. LI, R. *et al.* Controllable synthesis of dual-MOFs nanostructures for pH-responsive artemisinin delivery, magnetic resonance and optical dual-modal imaging-guided chemo/photothermal combinational cancer therapy. *Biomaterials* v. 100, p. 27-40, 2016.
 86. JANG, B.; KWON, H; KATILA, P.; LEE, S. J.; LEE, H. Dual delivery of biological therapeutics for multimodal and synergistic cancer therapies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 98, p. 113–133, 2016.
 87. ABÁNADES LÁZARO, I.; WELLS, C. J. R.; FORGAN, R. S. Multivariate Modulation of

- the Zr MOF UiO-66 for Defect-Controlled Combination Anticancer Drug Delivery. *Angew. Chemie Int. Ed.* v. 59, p. 5211–5217, 2020.
88. FULIAŞ, A. *et al.* Thermoanalytical and spectroscopic study on methotrexate - active substance and tablet. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* v. 9, p. 93–98, 2014.
 89. TROTTA, M.; PEIRA, E.; CARLOTTI, M. E.; GALLARATE, M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *Int. J. Pharm.* v. 270, p. 119–125, 2004.
 90. MUHAMMAD, Z. *et al.* European Journal of Pharmaceutical Sciences PEG capped methotrexate silver nanoparticles for efficient anticancer activity and biocompatibility. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. 91, p. 251–255, 2016.
 91. VEMULAPALLI, V.; BANGA, A. K.; FRIDEN, P. M. Optimization of iontophoretic parameters for the transdermal delivery of methotrexate. *Drug Deliv.* v. 15, p. 437–442, 2008.
 92. MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Rev. Bras. Ciências Farm. J. Pharm. Sci.* v. 38, p. 375–399, 2002.
 93. SHEN, Y.; TANG, H.; RADOSZ, M.; VAN KIRK, E.; MURDOCH, W. J. pH-responsive nanoparticles for cancer drug delivery. *Drug Deliv. Sci.* p. 183–216, 2008.
 94. ZHANG, K. *et al.* Increased dissolution and oral absorption of itraconazole/Soluplus extrudate compared with itraconazole nanosuspension. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 85, p. 1285–1292, 2013.
 95. KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* v. 15, p. 25–35, 1983.
 96. KORSMEYER, R.; PEPPAS, N. Macromolecular and modeling aspects of swelling controlled system in controlled release delivery systems. *Adv. Drug. Deliv.* v. 77, p. 1-5, 1992.
 97. MARTÍNEZ, L. *et al.* Monte Carlo simulations for the study of drug release from cylindrical matrix systems with an inert nucleus. *Int. J. Pharm.* v. 369, p. 38–46, 2009.
 98. PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *J. Control Release* p. 110-111, 1985.
 99. BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell us about proteins. *Q. Rev. Biophys.* v. 35,

p. 369–430, 2002.

100. MORAES, P. R. F. de S. *et al.* Bacterial cellulose/collagen hydrogel for wound healing. *Mater. Res.* v. 19, p. 106–116, 2016.
101. ROUQUEROL, J. *et al.* Recommendations for the characterization of porous solids. *Pure Appl. Chem.* v. 66, p. 1739–1758, 1994.
102. MARTINS, G. A.; ARRUDA, L. Systemic treatment of psoriasis - Part I: Methotrexate and acitretin. *An. Bras. Dermatol.* v. 79, p. 263–278, 2004.
103. ABDOLAHINIA, E. D. *et al.* Enhanced penetration and cytotoxicity of metformin and collagenase conjugated gold nanoparticles in breast cancer spheroids. *Life Sci.* v. 231, p. 116545, 2019.