

**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<sup>ª</sup>. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. 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<sup>ª</sup>. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. 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**

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CÁPSULAS SUPRAMOLECULARES DERIVADAS DE REDES METALO-ORGÂNICAS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

AUTORA: MARINA PAIVA ABUÇAFY

ORIENTADORA: LEILA APARECIDA CHIAVACCI FAVORIN

COORDENADORA: REGINA CÉLIA GALVÃO FREM

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LEILA APARECIDA CHIAVACCI FAVORIN (Participação Virtual)  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. BRUNA GALDORFINI CHIARI ANDRÉO (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Centro Universitário de Araraquara-UNIARA

Profa. Dra. RENATA FONSECA VIANNA LOPEZ (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. SEVERINO ALVES JUNIOR (Participação Virtual)  
Química Fundamental / Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. LIPPY FARIA MARQUES (Participação Virtual)  
Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UERJ - Rio de Janeiro

Araraquara, 24 de setembro de 2020

## **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 eu 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 N<sub>2</sub>;

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 <sub>s</sub>	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

<b>Figura 1:</b> Ilustração dos blocos de construção e estrutura de uma MOF com topologia cúbica. .	19
<b>Figura 2:</b> Alguns ligantes orgânicos que são usualmente utilizados na síntese de MOFs. ....	20
<b>Figura 3:</b> Estrutura da MOF HKUST, [Cu <sub>2</sub> (BTC) <sub>3</sub> ] (BTC = 1,3,5-benzenotricarboxilato) .....	21
<b>Figura 4:</b> Estrutura da ZIF-8, [Zn(2-metilimidazol) <sub>2</sub> ] (azul tetraédrico: zinco; preto: carbono; verde: nitrogênio). ....	22
<b>Figura 5:</b> Estrutura da MIL-100 (Fe) (laranja: ferro; carbono: preto).....	22
<b>Figura 6:</b> Esquema de uma das estratégias de incorporação e liberação de fármaco de uma MOF. ....	24
<b>Figura 7:</b> Esquema da preparação de cápsulas de ZIF-8 desenvolvidas utilizando molde sólido.	26
<b>Figura 8:</b> 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). ....	27
<b>Figura 9:</b> Esquema de formação da cápsula de MOF por emulsão de <i>pickering</i> , proposto por Zijun Bian e colaboradores .....	28
<b>Figura 10:</b> 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.....	29
<b>Figura 11:</b> Distribuição de tamanhos de partículas e vias de administração.....	30
<b>Figura 12:</b> Esquema da preparação das cápsulas de MOFs utilizando um molde rígido.....	36
<b>Figura 13:</b> Esquema da preparação das cápsulas de MOFs utilizando um molde líquido a partir de uma seringa (a) e a partir de um aerógrafo (b). ....	37
<b>Figura 14:</b> Esquema da preparação das cápsulas de MOF utilizando a emulsão de <i>pickering</i> a partir de nanopartículas de MOFs (a) e a partir de íons metálicos e ligantes orgânicos (b). ....	39
<b>Figura 15:</b> Esquema do processo de secagem por spray drying de um Mini Spray drying B290 (Büchi). ....	41
<b>Figura 16:</b> 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. ....	51
<b>Figura 17:</b> Esquema da formação de cápsulas de MOF e em destaque a fotografia do material obtido à base de HKUST. ....	53
<b>Figura 18:</b> 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. ....	54
<b>Figura 19:</b> Curvas de TGA das cápsulas à base das MOFs (A) HKUST e (B) MIL-100. ....	55
<b>Figura 20:</b> Espectros vibracionais no IV das cápsulas a base das MOFs HKUST e MIL-100 obtidas por molde líquido. ....	56
<b>Figura 21:</b> Difractogramas de raios X das cápsulas a base das MOFs HKUST e MIL-100.....	57
<b>Figura 22:</b> Imagens MEV das cápsulas a base da MOF HKUST formadas através de uma seringa (a - c) e um aerógrafo (d - f). ....	58
<b>Figura 23:</b> Microanálise da cápsula de HKUST obtida por espectroscopia de raio X por dispersão em energia (EDS). ....	59
<b>Figura 24:</b> Perfil de distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas ZIF-8 (curva de três medidas independentes). ....	63

<b>Figura 25:</b> Difratoograma de raios X de pó (DRX) das nanopartículas ZIF-8. ....	64
<b>Figura 26:</b> Imagem de microscopia óptica da emulsão de <i>pickering</i> EpZ3 baseada em nanopartículas de ZIF-8 (a) e gráfico de distribuição de tamanho de das cápsulas (b).....	66
<b>Figura 27:</b> Imagem de microscopia óptica da emulsão de <i>pickering</i> Epz4 baseada em uma maior concentração de nanopartículas de ZIF-8 (a) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (b). .....	67
<b>Figura 28:</b> Microscopia óptica e fotografia da emulsão de <i>pickering</i> de ZIF-8 com PVA (a) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (b). ....	68
<b>Figura 29:</b> Microscopia óptica de emulsão contendo ligantes livres e com PVA adicionado durante o desenvolvimento (a) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (b).....	69
<b>Figura 30:</b> 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). ....	69
<b>Figura 31:</b> Imagens da microscopia eletrônica de varredura das esferas obtidas a partir da emulsão de <i>pickering</i> utilizando a ZIF-8 e adicionando PVA durante (a) e após (b) o seu preparo. ....	70
<b>Figura 32:</b> Difratoogramas de raios X (DRX) das nanopartículas de ZIF-8 (1) das cápsulas de ZIF-8 obtidas por emulsão de <i>pickering</i> com a adição de PVA na formulação recém formada (2) e das cápsulas ZIF-8 obtidas por emulsão de <i>pickering</i> com a adição de PVA durante o seu desenvolvimento (3). ....	70
<b>Figura 33:</b> Perfil de distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas MIL-100 (curva de três medidas independentes). ....	72
<b>Figura 34:</b> Difratoograma de raios X de pó (DRXP) das nanopartículas MIL-100.....	73
<b>Figura 35:</b> Imagens da microscopia óptica das emulsões EpM4 (a), EpM5 (b) e EpM6 (c) com os respectivos gráficos de distribuição de tamanho de partícula. ....	76
<b>Figura 36:</b> Imagens da microscopia eletrônica de varredura das amostras EpM4 (a), EpM5 (b) e EpM6 (c).....	77
<b>Figura 37:</b> Difratoogramas de raios X das nanopartículas de MIL-100 (1) das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de <i>pickering</i> (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).....	77
<b>Figura 38:</b> Espectros na região do infravermelho das nanopartículas de MIL-100 (1) das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de <i>pickering</i> (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). ....	78
<b>Figura 39:</b> Imagens da microscopia óptica da emulsão EpM7 e gráfico de distribuição de tamanho de partícula. ....	80
<b>Figura 40:</b> Difração de raios X das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de <i>pickering</i> após três lavagens (1), duas lavagens (2) e com uma lavagem (3). ....	80
<b>Figura 41:</b> Espectros na região do infravermelho das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de <i>pickering</i> após três lavagens (1), duas lavagens (2) e uma lavagem (3). ....	81
<b>Figura 42:</b> Imagem da microscopia eletrônica de varredura da amostra EpM7.....	82
<b>Figura 43:</b> Imagens de MEV-FEG de material obtido do <i>spray drying</i> com fluxo da bomba de 50% e a partir da suspensão de nanopartículas MIL-100 a 1 mg/mL.....	85
<b>Figura 44:</b> Imagens de MEV-FEG de material obtido do <i>spray drying</i> com fluxo da bomba de 5% e a partir da suspensão de nanopartículas MIL-100 a 0,125mg/mL.....	86
<b>Figura 45:</b> Imagens MEV de material obtido por <i>spray drying</i> 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. ....	87
<b>Figura 46:</b> Imagens de MET de cápsula de MIL-100 obtida por <i>spray drying</i> .....	87

<b>Figura 47:</b> Imagem de MEV-FIB de cápsula de MIL-100 obtida por <i>spray drying</i> . .....	88
<b>Figura 48:</b> Difração de raios X das nanopartículas MIL-100 (preto) e das cápsulas de MIL-100 obtidas por <i>spray drying</i> (vermelho). .....	89
<b>Figura 49:</b> Espectros vibracionais na região do infravermelho das nanopartículas MIL-100 (preto) e das cápsulas de MIL-100 obtidas por <i>spray drying</i> (vermelho). .....	89
<b>Figura 50:</b> Isotermas de adsorção- dessorção de nitrogênio das cápsulas de MIL-100 obtidas por <i>spray drying</i> . .....	91
<b>Figura 51:</b> Estrutura molecular do metotrexato. ....	94
<b>Figura 52:</b> Estrutura molecular da colagenase. ....	95
<b>Figura 53:</b> 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). .....	96
<b>Figura 54:</b> Curva analítica do MTX em solução aquosa de HCl 0,1M. ....	98
<b>Figura 55:</b> Curva analítica do MTX em tampão fosfato pH 7,4 e pH 5,0. ....	100
<b>Figura 56:</b> 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). ....	101
<b>Figura 57:</b> Padrão de difração de raios X de pó da cápsula MIL-100, cápsula MIL-100_colagenase e colagenase livre. ....	105
<b>Figura 58:</b> Espectros no infravermelho para cápsula MIL-100, cápsula MIL-100_colagenase e colagenase livre. ....	105
<b>Figura 60:</b> Curva analítica da colagenase em água obtida por espectroscopia no UV-Vis. ....	106
<b>Figura 60:</b> Curva analítica da colagenase em PBS obtida por espectroscopia no UV-Vis. ....	108
<b>Figura 61:</b> Perfis de liberação da colagenase das nanopartículas, cápsulas e enzima livre em meio tampão fosfato pH 7,4 (a) e pH 5,0 (b). ....	108
<b>Figura 62:</b> Padrão de difração de raios X da cápsula MIL-100 antes e após a impregnação do fármaco MTX e da colagenase. ....	111
<b>Figura 63:</b> Espectros vibracionais no infravermelho da cápsula MIL-100 (em preto) e do material obtido após a oclusão do metotrexato e da colagenase (em vermelho). ....	112
<b>Figura 64:</b> Curvas TG das cápsulas MIL-100 e das cápsulas MIL-100 contendo MTX e colagenase. ....	113
<b>Figura 65:</b> Isotermas de adsorção-dessorção das cápsulas de MIL-100 vazias, das cápsulas contendo MTX e das cápsulas contendo MTX e colagenase. ....	115
<b>Figura 66:</b> Imagens MEV das cápsulas MIL-100_MTX_colagenase. ....	116
<b>Figura 67:</b> 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. ....	117
<b>Figura 68:</b> Viabilidade celular nas linhagens celulares A-375 e HaCat pelo método Alamar Blue. ....	118

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Diferentes formulações de emulsões de <i>pickering</i> com as ZIF-8.....	65
<b>Tabela 2:</b> Composição das formulações de emulsões de <i>pickering</i> com MIL-100.....	73
<b>Tabela 3:</b> Composição das formulações de emulsões de <i>pickering</i> com MIL-100 contendo Ibuprofeno ou ácido 5-tert-butil isoftálico para estabilizar a interface óleo/ água. ....	75
<b>Tabela 4:</b> Composição da emulsão de <i>pickering</i> contendo os ligantes que constituem a nanopartículas MIL-100 para estabilizar a interface óleo/ água (EpM7).....	79
<b>Tabela 5:</b> Avaliação textural das cápsulas MIL-100. ....	90
<b>Tabela 6:</b> Resumo dos dados obtidos do ensaio de encapsulação do MTX nas nanopartículas MIL-100 e nas cápsulas de MIL-100. ....	98
<b>Tabela 7:</b> Cinética de liberação do MTX das nanopartículas e cápsulas de MIL-100 em pH 7,4. ....	103
<b>Tabela 8:</b> Cinética de liberação do MTX das nanopartículas e cápsulas de MIL-100 em pH 5,0. ....	103
<b>Tabela 9:</b> Dados obtidos do ensaio de encapsulação da colagenase nas cápsulas de MIL-100. ....	107
<b>Tabela 10:</b> Cinética de liberação da colagenase das cápsulas de MIL-100 em pH 7,4 e pH 5,0. ....	110
<b>Tabela 11:</b> Propriedades texturais das cápsulas, antes e após a encapsulação do fármaco MTX e de ambas moléculas bioativas, MTX e colagenase. ....	114

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	14
<b>Capítulo I. Introdução</b> .....	17
I.1. Introdução ao Capítulo I.....	18
I.2. Redes metalo-orgânicas .....	18
I.3. MOFs biocompatíveis .....	20
I.4. MOFs como sistemas carreadores de fármacos .....	23
I.5. Cápsulas à base de MOFs .....	25
I.6. Conclusões do Capítulo I .....	31
<b>Objetivos</b> .....	32
<b>Capítulo II. Parte experimental</b> .....	33
II.1. Introdução ao Capítulo II.....	34
II.2. Desenvolvimento das cápsulas a base de MOFs: .....	34
II. 2.1. Desenvolvimento de cápsulas de MOFs a partir de um molde sólido .....	35
II. 2.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de um molde líquido.....	36
II. 2.3. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de emulsão de <i>pickering</i> .....	38
II. 2.4. Desenvolvimento de cápsulas de MOF utilizando <i>spray drying</i> .....	40
II.3. Caracterização dos materiais obtidos:.....	42
II.4. Ensaios <i>in vitro</i> utilizando as cápsulas de MIL-100.....	43
II.4.1. Avaliação da eficiência de encapsulação do fármaco metotrexato nas cápsulas à base de MOFs .....	43
II.4.2. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do fármaco metotrexato .....	44
II.4.3. Avaliação da eficiência de encapsulação da colagenase nas cápsulas a base de MOFs.....	45
II. 4.4. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da colagenase .....	45
II.4.5. Atividade enzimática da colagenase .....	46
II.4.6. Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i> pelo método Alamar Blue .....	46
II.5. Conclusões do Capítulo II.....	47

<b>Capítulo III. Desenvolvimento de cápsulas de MOF utilizando molde sólido e molde líquido</b>	49
III.1. Introdução do Capítulo III	50
III.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de um molde rígido	50
III.3. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de um molde líquido	51
III.4. Conclusões do Capítulo III	60
<b>Capítulo IV. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de emulsão de pickering</b>	61
IV. 1. Introdução do Capítulo IV	62
IV.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de emulsão de <i>pickering</i>	62
IV.2.1. Cápsulas de MOF ZIF-8 a partir de emulsão de pickering	63
IV.2.2. Cápsulas de MOF MIL-100 a partir de emulsão de <i>pickering</i>	72
IV. 3. Conclusão do Capítulo IV	82
<b>Capítulo V. Desenvolvimento de cápsulas de MOF utilizando spray drying</b>	83
V. 1. Introdução do Capítulo V	84
V.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF MIL-100 utilizando <i>spray drying</i>	84
V. 3. Conclusão do Capítulo V	92
<b>Capítulo VI. Ensaios “in vitro” utilizando as cápsulas de MIL-100</b>	93
VI. 1. Introdução do Capítulo VI	94
VI. 2. Avaliação da eficiência de encapsulação do metotrexato e da colagenase e ensaio de liberação <i>in vitro</i> das cápsulas de MOFs	95
VI. 2.1. Avaliação da eficiência de encapsulação e perfil de liberação do metotrexato nas cápsulas a base de MOFs	96
VI. 2.2. Avaliação da eficiência de encapsulação e perfil de liberação da colagenase nas cápsulas a base de MOFs	104
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	110
VI. 4. Avaliação da atividade enzimática da colagenase liberada das cápsulas de MIL-100	116
VI. 5. Avaliação da viabilidade celular das cápsulas de MIL-100	118
VI. 6. Conclusão do Capítulo VI	119
<b>Considerações Finais e Perspectivas</b>	120
<b>Referências</b>	122

## **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 estruturais<sup>1</sup>. 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 porosidade<sup>2</sup>.

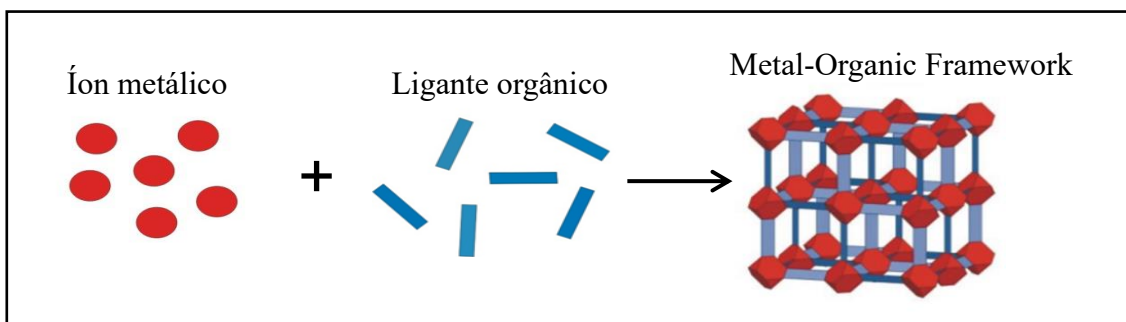
Durante muitos anos, diversos trabalhos foram realizados na área de polímeros de coordenação, até que em 1995 o termo “Metal-Organic Framework” (MOF) surgiu na literatura de periódicos nos trabalhos do grupo de Yaghi<sup>3</sup>, sendo que em nenhum trabalho ainda havia dados específicos sobre a porosidade e o foco era para a aplicação catalítica.

Assim como Yaghi e colaboradores<sup>4</sup>, Robson e seu grupo<sup>5</sup> e o grupo de pesquisa de Ferey<sup>6</sup> 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 Zn<sub>4</sub>O 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 poros<sup>4</sup>.

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”<sup>7</sup>, 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.

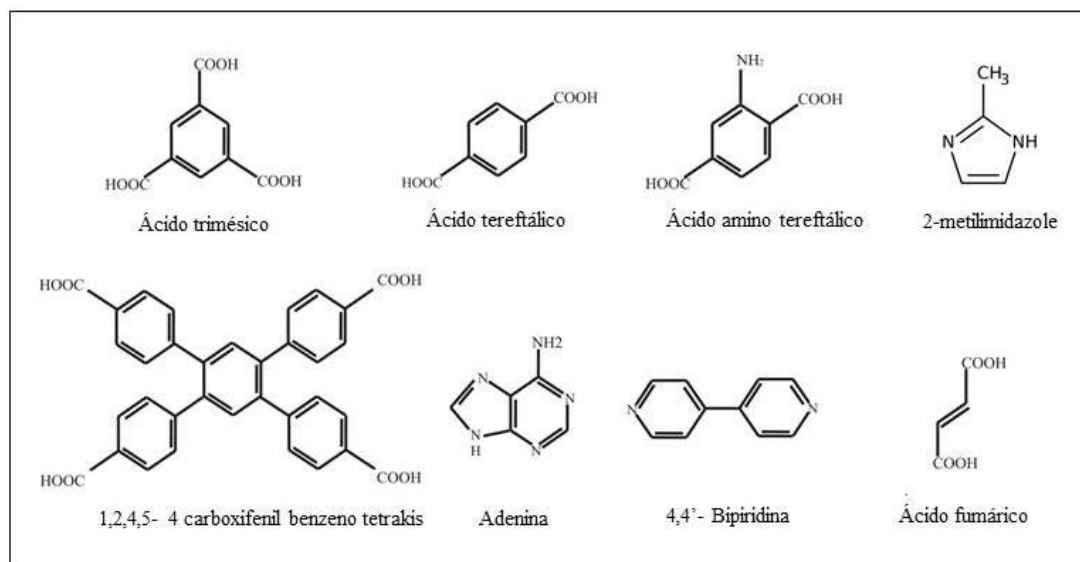


**Fonte:** A autora (2020).

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 isorecticular) 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 hóspede<sup>1</sup>.

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 funcionalizações<sup>8</sup>. 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 coordenação<sup>9</sup>. 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 coordenada<sup>10</sup>.

Somente nos últimos anos surgiu a preocupação de sintetizar MOFs constituídas por compostos naturais e biocompatíveis<sup>11</sup>, 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.

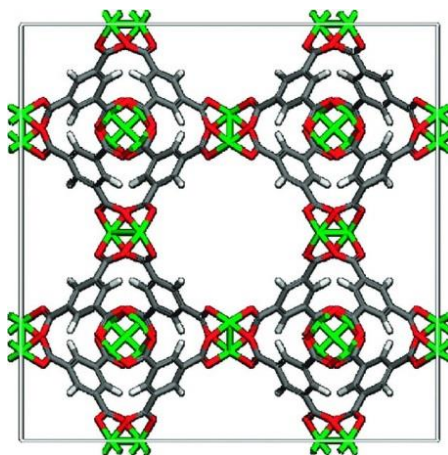
### I.3. MOFs biocompatíveis

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 <sup>12</sup> 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).

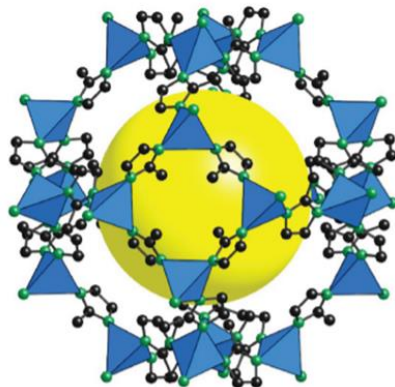


Esta MOF apresenta propriedades físico-químicas típicas de uma estrutura aberta altamente porosa, composta por cristais com morfologia octaédrica<sup>14</sup>. Dentro deste contexto, sabendo que esta é uma MOF promissora e biocompatível, ela foi utilizada neste trabalho para desenvolver cápsulas de HKUST.

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 colaboradores<sup>15</sup> 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 <sup>16</sup>. A partir de então, estes materiais foram chamados de *Zeolitic Imidazolate Framework* (ZIFs), formando uma subfamília das MOFs<sup>15</sup>. 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 estudados<sup>17</sup>, 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).

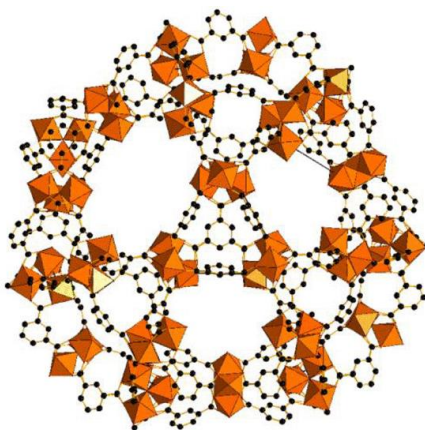


Desta maneira, este material é composto por um metal biocompatível (zinco) e um ligante não tóxico, e por isso essa MOF vem sendo muito utilizada para aplicações biomédicas, e foi escolhida para ser utilizada neste trabalho para o desenvolvimento de cápsulas à base de ZIF-8.

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 microporosas<sup>19</sup>, como mostra a Figura 5.

**Figura 5:** Estrutura da MIL-100 (Fe)<sup>20</sup>.

(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 fármacos<sup>21</sup>, 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**

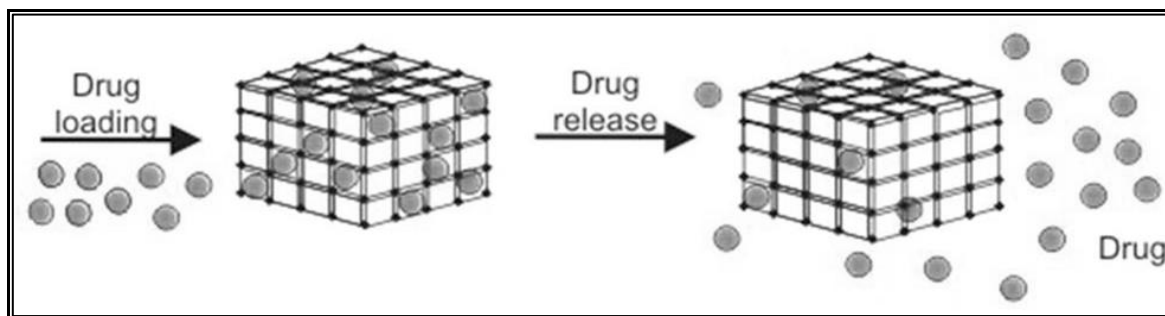
Os sistemas carreadores de fármacos são frequentemente usados para ampliar a biodisponibilidade do fármaco, melhorar sua estabilidade em meio biológico, manter e controlar as taxas de liberação e ainda direcioná-los para locais específicos do corpo caso seja funcionalizado, visando sempre reduzir a frequência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

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<sup>24,25</sup>.

Alguns sistemas têm sido muito explorados como carreadores de fármaco, dentre eles, destacam-se: lipossomas<sup>26</sup>, dispositivos revestidos implantáveis<sup>27</sup>, nanopartículas<sup>22</sup>, dendrímeros<sup>23</sup>, ciclodextrina<sup>28</sup> e recentemente as redes metalo-orgânicas<sup>21</sup>.

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 MOF<sup>29</sup>.



Um dos primeiros grupos que pesquisaram as MOFs como potencial para aplicação em sistema de liberação de fármacos é de Ferey e colaboradores<sup>30</sup> 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-100<sup>31</sup>. 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-NH<sub>2</sub>, 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<sup>32,33</sup>.

## 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 seletiva<sup>32</sup>, elevada resistência térmica e mecânica, estabilidade e ser pH- sensível para a desestruturação<sup>34,35</sup>.

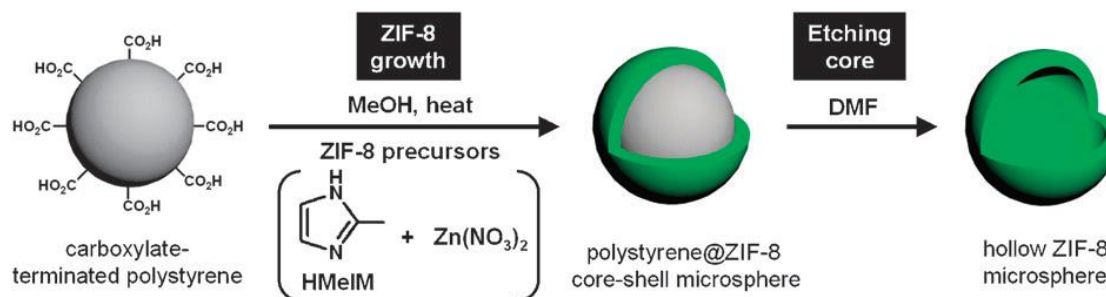
A utilização de cápsulas de MOFs como sistemas de liberação de fármacos é muito promissora para a área farmacêutica, visto que este material possui os poros intrínsecos das MOFs e cavidades da cápsula, permitindo a incorporação de uma grande quantidade de fármacos, bem como biomoléculas maiores, como 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 sólido<sup>36</sup>, formação mediada por molde líquido<sup>32</sup>, emulsão de “*pickering*”<sup>37</sup> e *spray drying*<sup>38</sup>.

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 oca<sup>36</sup>. 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  $Zn(NO_3)_2$ . Em seguida as microesferas formadas foram adicionadas em uma solução de dimetilformamida (DMF), que dissolve de forma seletiva o núcleo de PS<sup>39</sup>. 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 sólido<sup>39</sup>.

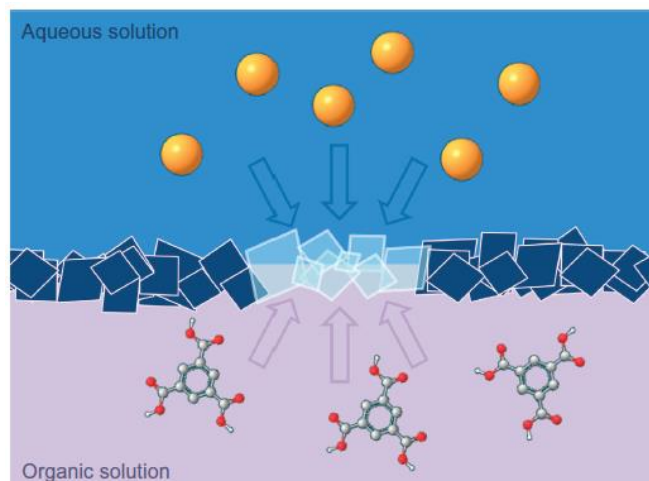


Outros autores também obtiveram microesferas ocas com o MIL-100 e Cu-BTC utilizando a mesma estratégia<sup>40</sup>. Apesar de as estratégias que utilizam molde rígidos para o desenvolvimento de cápsulas ocas serem simples e diretas, elas são limitadas às estruturas de casca e caroço com propriedades 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 cápsulas<sup>32</sup>.

O grupo de pesquisa de Ameloot<sup>32</sup> preparou cápsulas ocas de HKUST através do crescimento interfacial usando dois líquidos imiscíveis. As gotas da solução aquosa contendo íons metálicos (Cu<sup>2+</sup>) 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)<sup>32</sup>.



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*<sup>37,41</sup>. 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 colaboradores<sup>42</sup>.



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 <sup>41</sup>.

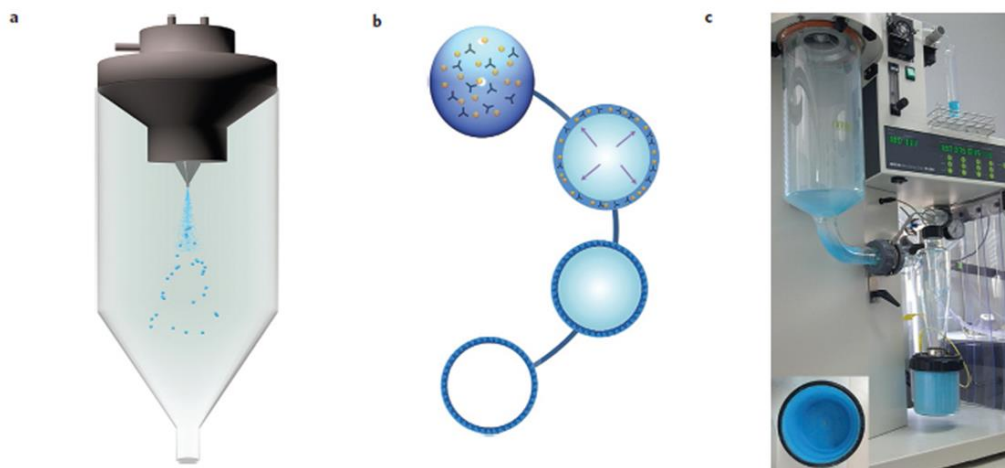
Outro método que pode ser muito promissor para o desenvolvimento de cápsulas à base de MOFs é a técnica de *spray drying*. O *spray drying* é relatado na literatura como um método de secagem de suspensões, método de microencapsulação e também pode ser adaptada para a formação de um sistema do tipo esférico, 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 <sup>43</sup>.

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 aquecida<sup>44</sup>.

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 colaboradores<sup>38</sup>.

**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<sup>38</sup>.

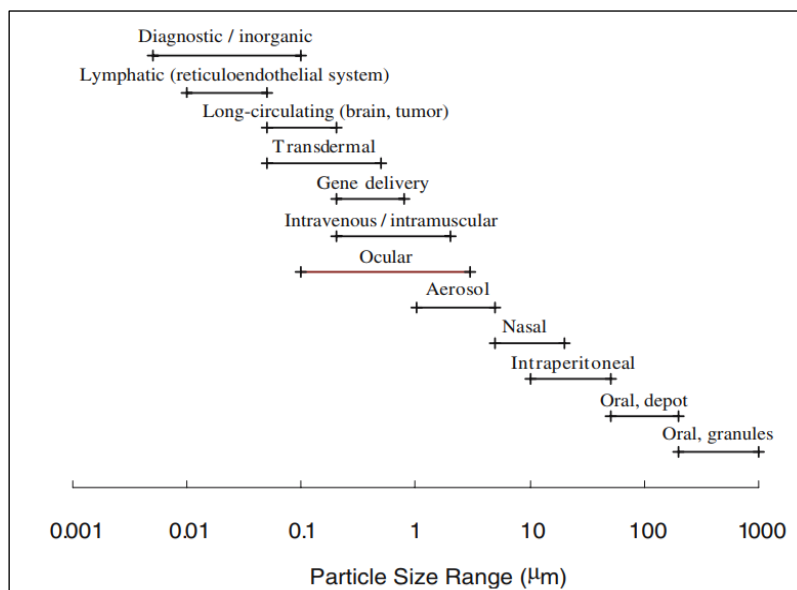


Em outro exemplo, desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Cedric Boissiere, desenvolveu-se nanopartículas de HKUST, ZIF-8 e  $\text{Fe}_3(\text{BTC})_2$  a partir do *spray drying*. Foram utilizadas duas suspensões, sendo uma de ligante orgânico e uma do sal metálico, injetadas simultaneamente dentro 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 trabalho<sup>45</sup>. 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 atomizadas<sup>43</sup>.

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 colaboradores<sup>46</sup>.

**Figura 11:** Distribuição de tamanhos de partículas e vias de administração<sup>46</sup>.



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  $H^+$  <sup>47</sup>.

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<sup>48,49</sup>. 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 metástase<sup>50</sup>.

## **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.

## **Capítulo II.**

---

Parte experimental

## II.1. Introdução ao Capítulo II

Neste capítulo foram descritos os procedimentos experimentais para a obtenção das cápsulas de MOF. Foram utilizadas as MOFs à base de cobre (HKUST), zinco (ZIF-8) e ferro (MIL-100). As metodologias mostradas nesse capítulo foram o uso de molde sólido, molde líquido, emulsão de *pickering* e *spray drying*. Durante o período deste trabalho foi realizado um estágio de pesquisa de oito meses no exterior (BEPE- FAPESP). O estágio foi feito no laboratório IMAP (Institut des Matériaux Poreux de Paris) localizado nas prestigiadas escolas ENS (École normale Supérieure) e ESPCI (École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris) da Universidade PSL (Université de recherche Paris Sciences et Lettres), sob a supervisão de Christian Serre, diretor de pesquisa CNRS. Durante o período de estágio foram desenvolvidas cápsulas por emulsão de *pickeringe* pelo método de *Spray drying*, em colaboração com os pesquisadores Nicolas Bremond do ESPCI e Cedric Boissiere da Université Pierre et Marie Curie (UPMC).

Também está descrito nesse capítulo as técnicas empregadas na caracterização destes materiais, como difração de raios X, espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, espalhamento de luz dinâmico, isotermas de adsorção/ dessorção de nitrogênio, microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV e MEV/FIB) e microscopia eletrônica de transmissão.

Por fim, mostra-se os ensaios de incorporação e liberação *in vitro* dos princípios ativos utilizados, metotrexato e colagenase, bem como a avaliação da atividade enzimática da colagenase e viabilidade celular do sistema desenvolvido.

## II.2. Desenvolvimento das cápsulas a base de MOFs:

As cápsulas à base de MOFs foram desenvolvidas utilizando quatro metodologias: (1) molde sólido, (2) molde líquido, (3) emulsão de *pickering* e (4) *spray drying*.

## II. 2.1. Desenvolvimento de cápsulas de MOFs a partir de um molde sólido

O desenvolvimento de cápsulas de MOFs utilizando um molde sólido como substrato foi baseado em metodologias previamente descritas na literatura<sup>36,40</sup> com algumas modificações.

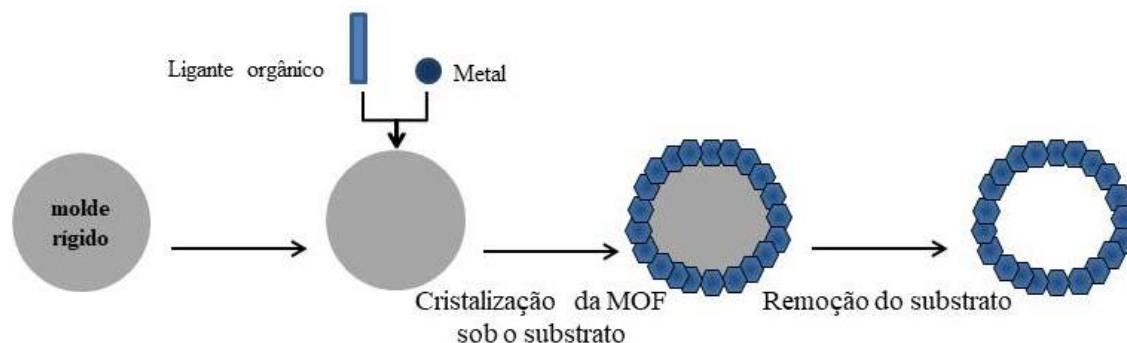
Para essa etapa do trabalho, optou-se pelo uso do carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) como molde rígido para o desenvolvimento de cápsulas da MOF<sup>51</sup>, sendo que essa metodologia foi estudada para a formação de cápsulas à base de íons de cobre e do ligante ácido trimésico, conhecida na literatura como HKUST<sup>52</sup>; à base de íons de zinco e do ligante 2-metilimidazol, conhecida como ZIF-8<sup>53</sup>; e à base de íons de ferro e do ligante ácido trimésico, conhecida como MIL-100<sup>19</sup>.

Primeiramente, foi preparada uma solução do sal metálico de cada MOF (acetado de cobre, nitrato de zinco ou nitrato de ferro) em água, na concentração de  $0.5 \text{ mM.mL}^{-1}$ , e em seguida adicionou-se o  $\text{CaCO}_3$ , que nesta síntese atua como molde, na concentração de  $0.6 \text{ mM.mL}^{-1}$ , formando uma suspensão aquosa das partículas do substrato ( $\text{CaCO}_3$ ). Esta suspensão foi mantida em agitação constante a 400 rpm durante 15 min e, em seguida, foi adicionada uma solução etanólica do ligante orgânico de cada MOF (ácido trimésico ou 2- metilimidazol) também na concentração de  $0.5 \text{ mM.mL}^{-1}$ , e o sistema foi mantido em agitação constante a 400 rpm durante 30 min a  $25^\circ\text{C}$ . A mistura foi basificada com uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH 0.1 M) para o pH 8, para facilitar a desprotonação do ligante, e então a suspensão foi mantida em repouso por 1 hora. As partículas formadas foram lavadas com água e separadas por centrifugação a 3000 rpm por 5 min. Em seguida, as partículas foram adicionadas novamente, mais duas vezes, em uma solução aquosa de metais e uma solução etanólica de ligante orgânico, repetindo os procedimentos anteriormente descritos, para a formação de uma camada mais grossa de MOFs na superfície do substrato.

Por fim, as partículas foram lavadas 3x com água e, para a remoção do molde, adicionou-se o solvente orgânico tetraidrofurano (THF), deixando em contato durante 12 horas. As partículas foram então centrifugadas, lavadas para a remoção de resíduos e armazenadas em etanol.

A Figura 12 mostra um esquema da síntese de cápsulas de MOFs à partir de um molde rígido.

**Figura 12:** Esquema da preparação das cápsulas de MOFs utilizando um molde rígido.



**Fonte:** A autora (2020)

## II. 2.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de um molde líquido

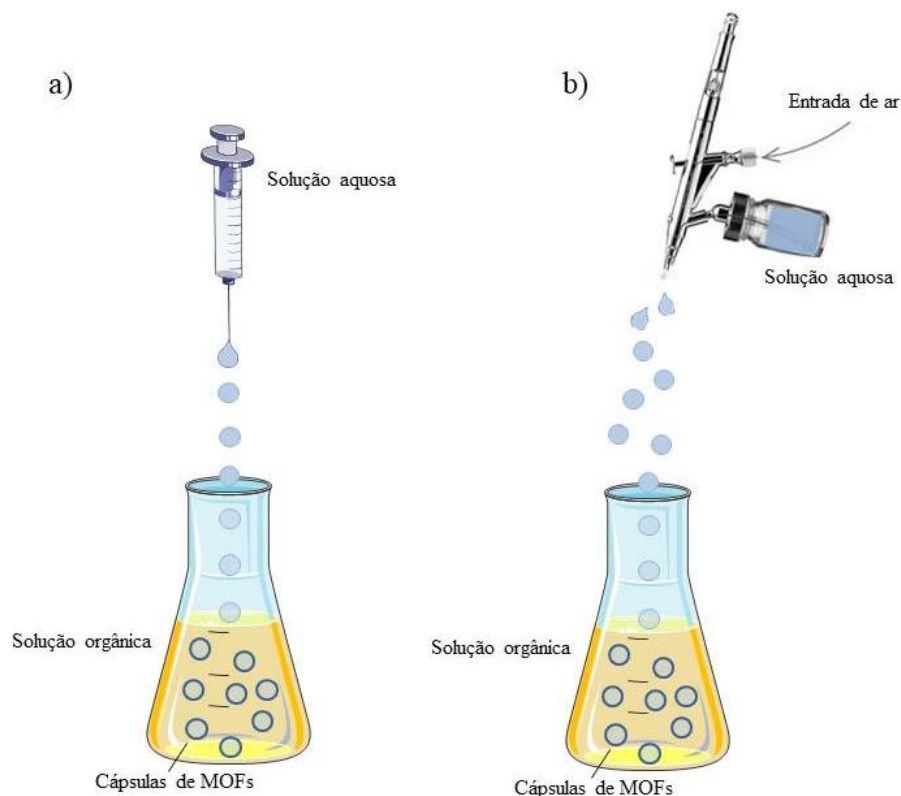
O desenvolvimento de cápsulas de MOFs a partir de um molde líquido foi baseado na metodologia proposta por Ameloot e colaboradores<sup>32</sup> com algumas modificações.

As cápsulas foram obtidas dispersando uma fase imiscível em outra pelo gotejamento através de uma seringa, como mostra a Figura 13.a., ou com um spray aerossol (aerógrafo), como mostra a Figura 13.b., sendo que a interface entre esses dois líquidos é usada como molde para a formação de uma camada fina de MOF. Esta metodologia corrobora com o fato de que a tensão superficial entre dois líquidos imiscíveis é tão grande que o sólido espontaneamente se desloca para a superfície a fim de minimizar essa tensão, e desta maneira, essas camadas finas de MOFs podem ser formadas resultando nas cápsulas de MOFs.

Nessa etapa do trabalho optou-se por preparar cápsulas de HKUST, ZIF-8 e MIL-100, sendo que a síntese partiu de dois líquidos imiscíveis, a água e o n-octanol. Para o preparo do precursor aquoso, adicionou-se 4mL de uma suspensão do sal metálico em álcool polivinílico (PVA), na concentração de 90 mM.mL<sup>-1</sup>, a 100mL de água, e em seguida agitou-se a 300 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. As partículas de óxido metálico formadas foram removidas por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Por fim, adicionou-se 20% (massa/massa) de etanol absoluto à solução límpida resultante. O precursor orgânico foi preparado adicionando-se 70 mM do ligante em 20 mL de n-octanol, seguido de aquecimento a 60°C até a solubilização. Em seguida, adicionou-se 105 mM de tributilamina imediatamente antes da formação das cápsulas, para favorecer a desprotonação do ligante orgânico.

Posteriormente, a solução de precursor aquoso foi adicionada, com o auxílio de uma agulha (Figura 13.a.) ou, alternativamente, de um aerógrafo (Figura 13.b.), na solução do precursor orgânico, que foi mantido em agitação branda. Dessa maneira, esse processo facilita a formação das cápsulas de MOF na interface dos dois meios, no momento do contato da gotícula aquosa no n-octanol. As cápsulas preparadas desta forma foram coletadas em etanol e o n-octanol restante foi removido trocando rapidamente o sobrenadante por etanol.

**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).



**Fonte:** A autora (2020).

### II. 2.3. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de emulsão de *pickering*

A emulsão de *pickering* é um tipo de emulsão que é estabilizada apenas por partículas sólidas presentes na interface óleo-água, substituindo os surfactantes tradicionais. Essa é uma estratégia simples, conveniente e abrangente para a preparação de cápsulas de MOF dependente apenas das propriedades de superfície ajustáveis das MOF<sup>41,54</sup>.

O desenvolvimento das cápsulas de MOF utilizando a emulsão de *pickering* foi realizado em colaboração com o Dr. Christian Serre e com o Dr. Nicolas Bremond.

Para essa estratégia foram testadas as MOFs ZIF-8 e MIL-100, e para isso primeiramente as nanopartículas de MOF foram sintetizadas com base em metodologias já descritas na literatura<sup>54,56</sup>.

#### - Nanopartículas MIL-100:

As nanopartículas MIL-100 foram sintetizadas adicionando ácido trimésico (BTC) e nitrato de ferro II em água. A mistura reacional foi mantida em agitação a 60°C durante 48 horas, como reportado na literatura<sup>55</sup>. Em seguida, as nanopartículas foram coletadas por centrifugação a 14500 rpm e lavadas duas vezes com água mili-Q e duas vezes com etanol. A MOF foi seca a 100 °C em uma estufa a vácuo.

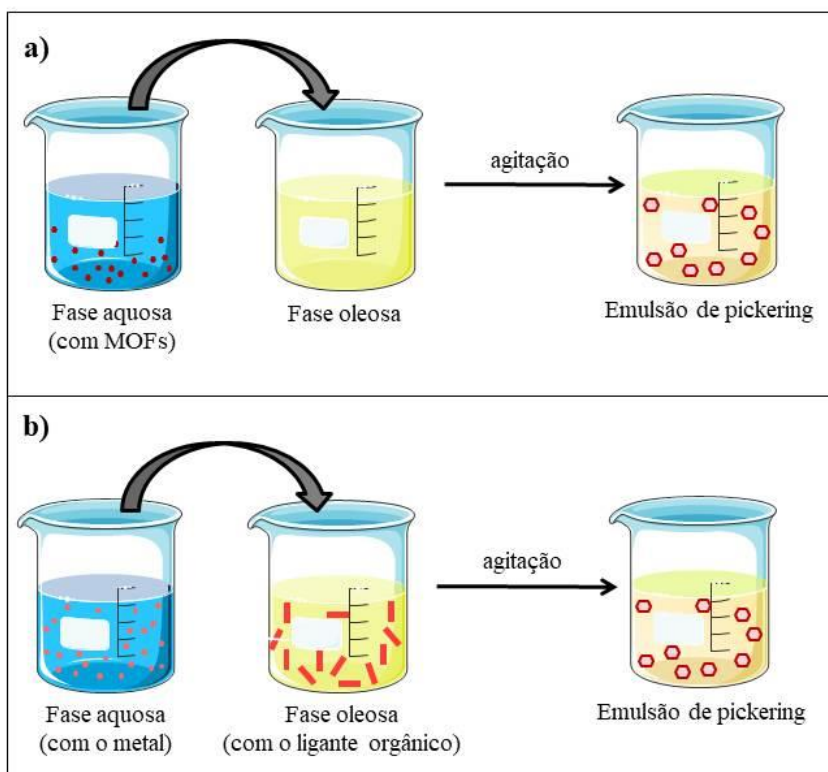
#### -Nanopartículas ZIF-8

As nanopartículas ZIF-8 foram sintetizadas dissolvendo 1,29g de 2-metilimidazol (2-MeIM) em 40 mL de metanol e 0,58 g de nitrato de zinco em 40 mL de metanol. A solução de 2-MeIM foi adicionada à solução de Zn<sup>2+</sup> e a mistura foi agitada a 300 rpm durante 1 hora à temperatura ambiente. As nanopartículas foram recolhidas por centrifugação a 20.000 rpm durante 15 min, lavadas três vezes com etanol e foram secas sob vácuo por 12 horas<sup>54</sup>.

Duas metodologias diferentes foram utilizadas para o desenvolvimento das cápsulas de MOF à partir da emulsão de *pickering*. Primeiramente, foi preparada uma emulsão a partir de nanoMOFs previamente sintetizadas e, desta maneira, as nanopartículas sólidas de MOF ocasionaram o efeito *pickering*, conforme esquematizado pela Figura 14.a.. Na segunda metodologia, o ligante orgânico e o sal metálico, responsáveis pela formação da MOF, foram adicionados separadamente na fase oleosa e aquosa, respectivamente, para que a nucleação das

nanopartículas de MOF ocorra durante a preparação da emulsão, como também está esquematizado pela Figura 14.b..

**Figura 14:** Esquema da preparação das cápsulas de MOF utilizando a emulsão de *pickering* partir de nanopartículas de MOFs (a) e a partir de íons metálicos e ligantes orgânicos (b).



**Fonte:** A autora (2020).

Durante o desenvolvimento da emulsão alguns parâmetros de síntese foram estudados, tais como tipo, velocidade e tempo de agitação. Foram usadas a agitação mecânica, por meio de um agitador magnético a 700 rpm e por 3 h, o ultrasonicador a 600 W por 3 min e ainda o ultraturrax a 12000rpm por 3 min.

## II. 2.4. Desenvolvimento de cápsulas de MOF utilizando *spray drying*

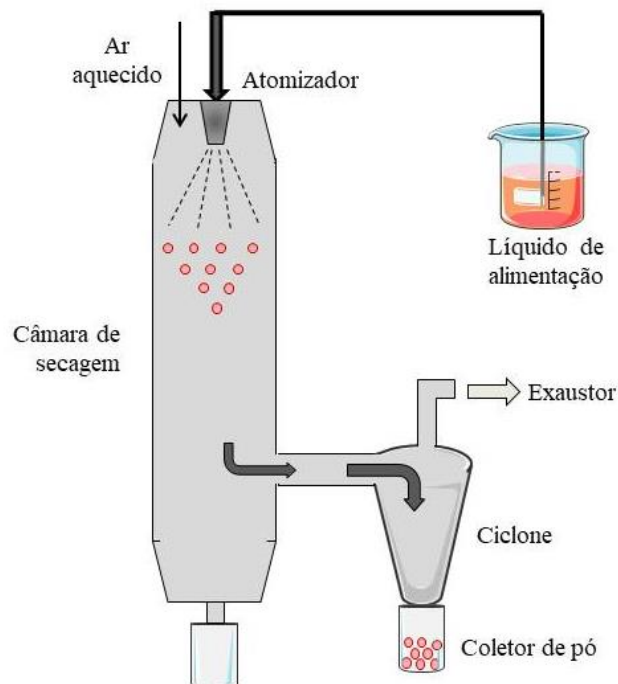
Nessa etapa do trabalho foram preparadas cápsulas de MOF MIL-100, tendo em vista que essas nanopartículas foram consideradas promissoras para ser utilizada neste equipamento. As MOFs MIL-100 apresentam tamanho nanométrico de aproximadamente 80 nm e ainda são facilmente dispersas, evitando assim possíveis dificuldades na utilização do *spray drying*, como o entupimento do pico dispersor.

A metodologia utilizada para o desenvolvimento das cápsulas de MOF a partir do *spray drying* foi baseada em artigos previamente publicados, em que foi estudado a síntese das nanopartículas de MOF utilizando o *spray drying*<sup>45</sup>. Cedric Boissiere, um dos autores dos principais artigos que foram utilizados como base para esse experimento, participou como colaborador desse trabalho juntamente com Christian Serre.

Inicialmente uma suspensão coloidal de nanopartículas de MIL-100 em etanol foi preparada antes do processamento de *spray drying*, como descrito anteriormente no item II. 2.3. A suspensão foi introduzida como fluido de alimentação no Nano Spray Dryer e o equipamento foi acionado para a secagem da suspensão com os parâmetros (temperatura, fluxo de gás, entre outros) definidos previamente e, por fim, a gota gerada pelo equipamento é seca pelo gás de secagem, e então é formada a cápsula com as nanopartículas de MOF.

A Figura 15 mostra um esquema do processo que ocorre nesse equipamento, sendo que foi utilizado como aparato um bico de fluido concêntrico (fluido e ar) com orifício de 0.5mm em um sistema de Nano Spray Dryer Büchi B-290.

**Figura 15:** Esquema do processo de secagem por *spray drying* de um Mini *Spray drying* B290 (Büchi).



**Fonte:** A autora (2020).

Para a primeira síntese, foi preparada uma suspensão de MIL-100 na concentração de 1 mg/mL. A suspensão foi introduzida no Spray Dryer com agitação contínua e os parâmetros de síntese foram: temperatura de entrada: 80°C, pressão: 50 bar, fluxo de bomba 50% e capacidade máxima do aspirador 100%.

Na segunda síntese foi utilizada uma suspensão de MIL-100 na concentração de 0.125 mg/mL. A suspensão foi introduzida no Spray Dryer com agitação contínua e as condições de síntese foram: temperatura de entrada: 80°C, pressão: 50 bar, fluxo de bomba 5% e capacidade máxima do aspirador 100%.

Para a terceira síntese, foi preparada uma suspensão de MIL-100 na concentração de 1 mg/mL. A suspensão foi introduzida no Spray Dryer com agitação contínua e os parâmetros foram: temperatura de entrada: 80°C, pressão: 50 bar, fluxo de bomba 5% e capacidade máxima do aspirador 100%.

### **II.3. Caracterização dos materiais obtidos:**

#### **Difração de raios X (DRX)**

A presença de fases cristalinas dos materiais desenvolvidos foi analisada por um difratômetro Siemens D5000 usando radiação CuK  $\lambda$ ,  $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ . Os dados da intensidade de difração foram medidos em uma faixa  $2\theta = 2- 30^\circ$ , com passo de  $0,05^\circ$  e tempo de exposição por passo de 1s.

#### **Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)**

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho da BRUKER com detector DLaTGS ( $400 \text{ a } 4000 \text{ cm}^{-1}$ ). Os acessórios usados para as amostras na forma de pó foram: ATR – espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio por meio de reflexão total atenuada (cristal de diamante).

#### **Termogravimetria**

As medidas de TGA foram realizadas no equipamento SDT 600 Simultaneous DTA-TG da TA Instruments. As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina de  $90\mu\text{L}$  e aquecidas de  $25$  até  $600^\circ\text{C}$  com uma taxa de  $2^\circ\text{C}/\text{min}$  sob fluxo de oxigênio de  $100 \text{ mL}/\text{min}$ .

#### **Espalhamento de luz dinâmico (DLS)**

A análise de espalhamento de luz dinâmica foi realizada usando um Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK. O espalhamento de luz é um método em que o feixe de luz monocromática atinge a amostra, e a luz espalhada é detectada. Dessa maneira, o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão pode ser caracterizado.

#### **Isotermas de adsorção/ dessorção de nitrogênio**

Para medidas das isotermas de adsorção/ dessorção de  $\text{N}_2$  utilizou-se o equipamento ASAP 2013 da Micromeritics. As amostras foram submetidas a  $100^\circ\text{C}$  em vácuo de  $\sim 1 \mu\text{mHg}$  para limpeza da superfície e dessorção de gases. As medidas foram realizadas a  $77 \text{ K}$ , usando o método volumétrico estático e intervalo de pressão relativa entre  $0,002$  e  $0,98$ . A área específica dos poros foram determinadas pelo método de BET.

## **Microscopia óptica**

A microscopia óptica foi realizada para analisar a formação das cápsulas e morfologia do material obtido. Foi utilizado um microscópio Olympus BX41, equipamento capaz de analisar partículas de tamanho micrométricos, com a digitalização de imagens no computador através do programa analisador de imagem Leica Qwin. Amostras das cápsulas de MOFs foram cuidadosamente dispostas sobre lâminas, sem sobreposição de lamínula. As imagens das partículas foram obtidas com aumento de 50x e 100x.

## **Microscopia eletrônica de varredura (MEV e MEV/FIB)**

A microestrutura das cápsulas foi observada com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura com Emissão de Campo (MEV- FEG). As amostras foram preparadas da seguinte maneira: as cápsulas obtidas foram aderidas a uma fita de carbono condutora e metalizadas com filme de carbono de 20 nm de espessura durante 1 minuto, adequando-as a análise ao Microscópio. O microscópio utilizado foi o modelo TopconSM-300 com detector de elétrons secundários com voltagem de aceleração de elétrons de 10Kv e com acoplamento do sistema de microanálise por espectrometria de Raios X (EDS). Além disso, também foi utilizado o microscópio modelo HELIOS NANOLAB 600i com coluna de íons gálio (MEV-FIB).

## **Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

A nanoestrutura do material foi observada em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-2011, do Laboratório de Apoio e Uso Geral do DEMa/UFSCAR. As amostras sólidas foram dispersas em etanol.

## **II.4. Ensaios *in vitro* utilizando as cápsulas de MIL-100**

### **II.4.1. Avaliação da eficiência de encapsulação do fármaco metotrexato nas cápsulas à base de MOFs**

Os ensaios de encapsulação foram realizados com as nanopartículas MIL-100 e com as cápsulas de MIL-100 obtidas por *spray drying*, separadamente, com a finalidade de comparar a influência da presença de uma cavidade nas cápsulas durante encapsulação do fármaco.

Para a incorporação, o fármaco metotrexato foi dissolvido em água com 1% de HCl 0.1M a 55 °C e após a sua completa dissolução, foram adicionadas as nanopartículas MOFs e as cápsulas MIL-100, separadamente. A proporção utilizada foi de 3:1 (massa: massa) do fármaco e das MOFs, baseando-se na literatura através da metodologia utilizada por Horcajada e colaboradores<sup>56</sup>. O material foi deixado sob agitação constante, em um Thermo Mixer, por 12 horas e à temperatura ambiente (25°C).

Após o período de agitação, o material foi centrifugado a 11000 rpm, por 10 minutos e em seguida, foi medida a absorvância por UV-Vis do sobrenadante. Dessa maneira, a absorvância referente ao fármaco livre foi determinada no sobrenadante, após a centrifugação.

Para quantificar a eficiência de encapsulação, foi necessário primeiramente fazer uma curva analítica do fármaco estudado em água com HCl 0.1M nas concentrações 1,25; 2,5; 5; 10; 15 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com medidas de absorvância realizadas no intervalo de 200-400nm (absorção máxima do metotrexato  $\lambda = 305\text{nm}$ ).

#### **II.4.2. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco metotrexato**

O ensaio de liberação *in vitro* do fármaco metotrexato foi realizado em tampão PBS pH 5 e pH 7.4 a 37°C, sob condição *sink* (no mínimo três vezes o volume de meio necessário para se obter uma solução saturada do fármaco)<sup>57</sup>. Foram dispersos 10 mg de nanopartículas MIL-100 e cápsulas MIL-100 com o fármaco já encapsulado em 30 mL de tampão PBS. O sistema foi mantido sob agitação constante de 300 rpm e de tempos em tempos determinados foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos e uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi retirado para a quantificação do metotrexato, sendo que posteriormente, o mesmo volume de tampão fresco foi repostado. As alíquotas retiradas foram então submetidas à análise de espectroscopia de absorção molecular no UV- Vis para determinação do teor de metotrexato e posterior construção da curva do perfil de liberação do fármaco em função do tempo.

Para quantificar o fármaco liberado, foi necessário primeiramente fazer uma curva analítica do fármaco estudado nas concentrações 1.25, 2.5, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  utilizando tampão PBS pH 5 e pH 7.4, com medidas de absorvância realizadas no intervalo de 200-400nm, em triplicata.

### II.4.3. Avaliação da eficiência de encapsulação da collagenase nas cápsulas a base de MOFs

O ensaio de encapsulação da proteína collagenase tipo I foi realizado com as cápsulas de MIL-100 durante o processo da sua formação, no *spray drying*. Atualmente muitos produtos farmacêuticos, como cápsulas ou comprimidos, são preparados por meio do *spray drying* e, em muitos casos, este equipamento está sendo usado para encapsular moléculas bioativas em materiais para protegê-las e para aumentar a sua biodisponibilidade. Arpagaus et al. (2018)<sup>58</sup> estudaram as influências dos parâmetros do processo, como tamanho de partícula, morfologia e eficiência de encapsulamento, revisando mais de 160 artigos. Este trabalho destaca que esta metodologia é capaz de obter uma alta eficiência de encapsulamento, superior a 95%.

Para a incorporação, a proteína collagenase foi rapidamente dispersa em etanol e em seguida, foram adicionadas as nanopartículas de MOFs. A proporção utilizada foi de 4:1 (massa: massa) das nanopartículas de MIL-100 e de collagenase, respectivamente. A mistura foi mantida sob agitação constante em um agitador magnético, e então o material foi introduzido no *spray drying*, seguindo os mesmos parâmetros descritos na terceira síntese do item II. 2.4.

Depois da encapsulação, o material foi lavado duas vezes com água, para a remoção de proteínas que podem ter ficado adsorvidas na superfície da cápsula, centrifugado a 6000 rpm por 10 min e, em seguida, foi medida a absorvância por UV-Vis do sobrenadante. Com isso, a absorvância referente à proteína livre foi determinada no sobrenadante e a encapsulação foi quantificada de forma indireta.

Para obter a eficiência de encapsulação, foi necessário primeiramente fazer uma curva analítica da proteína estudada em água nas concentrações 30, 60, 90, 120, 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  com medidas de absorvância realizadas no intervalo de 200-400nm (absorção máxima da collagenase  $\lambda = 258$  nm).

### II. 4.4. Determinação do perfil de liberação *in vitro* da collagenase

O ensaio de liberação *in vitro* da collagenase também foi realizado em tampão PBS pH 5 e pH 7.4 a 37°C, sob condição *sink*. Foram dispersos 10 mg de cápsulas MIL-100 com collagenase já encapsulada em 30 mL de tampão PBS. O sistema foi mantido sob agitação constante de 300 rpm e de tempos em tempos determinados foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos e uma

alíquota de 2 mL do sobrenadante foi retirado para a quantificação da colagenase, sendo que posteriormente, o mesmo volume de tampão fresco foi repostado. As alíquotas retiradas foram então submetidas à análise de espectroscopia de absorção molecular no UV- Vis para determinação do teor de colagenase e posterior construção da curva do perfil de liberação da enzima em função do tempo.

Para quantificar a enzima liberada, foi necessário primeiramente fazer uma curva analítica da colagenase estudada nas concentrações 60, 90, 120, 150, 180 e 210  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  utilizando tampão PBS pH 5 e pH 7.4, com medidas de absorbância realizadas no intervalo de 200-400nm, em triplicata.

#### **II.4.5. Atividade enzimática da colagenase**

Após a encapsulação da proteína na cápsula de MOF e o seu estudo do perfil de liberação *in vitro*, foi realizado um ensaio preliminar da atividade enzimática da colagenase que é liberada da cápsula, de acordo com os procedimentos descritos anteriormente por Wang et al. (2018) <sup>59</sup>.

Foi preparada uma solução de gelatina tipo B (Sigma Aldrich G9391- 72 KDa) na concentração 30 mg/mL em água a 37°C. Essa solução foi dividida em 6 grupos e co-cultivada com a cápsula de MIL-100, a cápsula de MIL-100\_colagenase, colagenase livre, MTX livre, cápsula MIL-100\_MTX e cápsula MIL-100\_MTX\_colagenase. A concentração de colagenase eram iguais em todas amostras, levando em consideração quantidade encapsulada nas cápsulas de MOFs, para não haver interferência no resultado.

Em intervalos de tempo predeterminados (1, 3, 6, 12 e 24 h), cada amostra foi então armazenada a 4°C por 30 min antes da imagem obtida por uma câmera digital.

#### **II.4.6. Ensaio de viabilidade celular *in vitro* pelo método Alamar Blue**

A viabilidade celular das linhagens HaCat (queratinócitos humanos) e A-375 (melanoma humano) foi determinado pelo método de microdiluição com resazurina padronizado por Pavan e colaboradores<sup>60</sup>.

As células foram incubadas sob condições padronizadas de cultivo celular (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% de umidade), em garrafas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, contendo meio de cultura apropriado para seu

crescimento, suplementado com soro Fetal Bovino (SFB - Gibco). As células foram recolhidas das garrafas de cultivo utilizando 3 mL de tripsina-EDTA 0,25%, centrifugadas a 200 g por 5 minutos e contadas em câmara Neubauer, utilizando o método de exclusão pela solução azul de trypan a 0,004%, que cora as células inviáveis, em seguida, ajustou-se a concentração para  $7,5 \times 10^4$  células/mL. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços (TPP) obtendo uma concentração celular de  $1,5 \times 10^4$  células/poço, e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo, durante 24 horas para permitir a aderência celular. Para o tratamento, diluições de cápsula MIL-100, cápsula MIL-100\_MTX, cápsula MIL-100\_MTX\_colagenase e MTX livre foram preparadas para obter concentrações variando de  $3,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Como controle foi utilizado o diluente dos compostos, DMSO. Novamente as células foram incubadas por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido, e logo em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de cloridrato de resazurina 0,01%. As placas foram novamente incubadas por 3 horas (HaCat) ou 2 horas (A-375). Em seguida, procedeu-se a leitura da fluorescência em leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek®) em filtros de excitação e de emissão nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos pela porcentagem de viabilidade celular (%) calculada em relação à fluorescência emitida pelo controle negativo, considerada como 100% de viabilidade.

## **II.5. Conclusões do Capítulo II.**

Neste capítulo foram apresentados os procedimentos experimentais utilizados nessa tese para a obtenção de cápsulas de MOF, sua caracterização e os procedimentos dos ensaios *in vitro* para estudar a aplicação do material desenvolvido como sistema de liberação controlada de fármaco.

A escolha das metodologias utilizadas foi baseada na literatura levando em consideração a possibilidade de formar superestruturas esféricas de MOF através de reações de coordenação. A utilização de molde sólido é certamente uma das estratégias mais simples para a formação desse material, em que a nucleação da MOF ocorreria na superfície do molde, e por isso foi a primeira a ser abordada nesse trabalho. O molde líquido permite a reação de coordenação na interface entre uma solução que contém os íons metálicos e outra solução que contém os ligantes orgânicos e,

nesse caso, a interface entre os dois líquidos imiscíveis permite a formação da MOF. Outro método apresentado nesse trabalho é a emulsão de *pickering*, em que o uso das nanopartículas de MOF podem substituir o uso de tensoativos em emulsões e, após secas, a formação de superestruturas esféricas de MOF. O uso de *spray drying* para formação de cápsulas de MOF é muito promissor por ser uma síntese rápida e escalonável. Além disso, esse método já é muito empregado para encapsulação de moléculas ativas na indústria farmacêutica, o que sugere a possibilidade da encapsulação da proteína durante o processo de formação das cápsulas.

As caracterizações físico-química foram realizadas por difração de raios X, espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, espalhamento de luz dinâmico, isotermas de adsorção/ dessorção de nitrogênio, microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV e MEV/FIB) e microscopia eletrônica de transmissão.

Os ensaios *in vitro* de incorporação e liberação do fármaco metotrexato e a avaliação da eficiência de encapsulação e análise do perfil de liberação da colagenase, além do ensaio de atividade enzimática da proteína e viabilidade celular do sistema desenvolvido, foram realizados para avaliar a potencialidade desse material para à aplicação proposta na área farmacêutica.

## **Capítulo III.**

---

Desenvolvimento de cápsulas de MOF utilizando molde sólido e molde líquido

### **III.1. Introdução do Capítulo III**

Nesta seção é apresentado um estudo da influência dos métodos escolhidos utilizando molde sólido e molde líquido, além dos parâmetros de síntese utilizados na preparação de cápsulas de MOFs. Nesta etapa buscou-se o controle da estrutura e do tamanho das cápsulas, bem como a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação desses materiais.

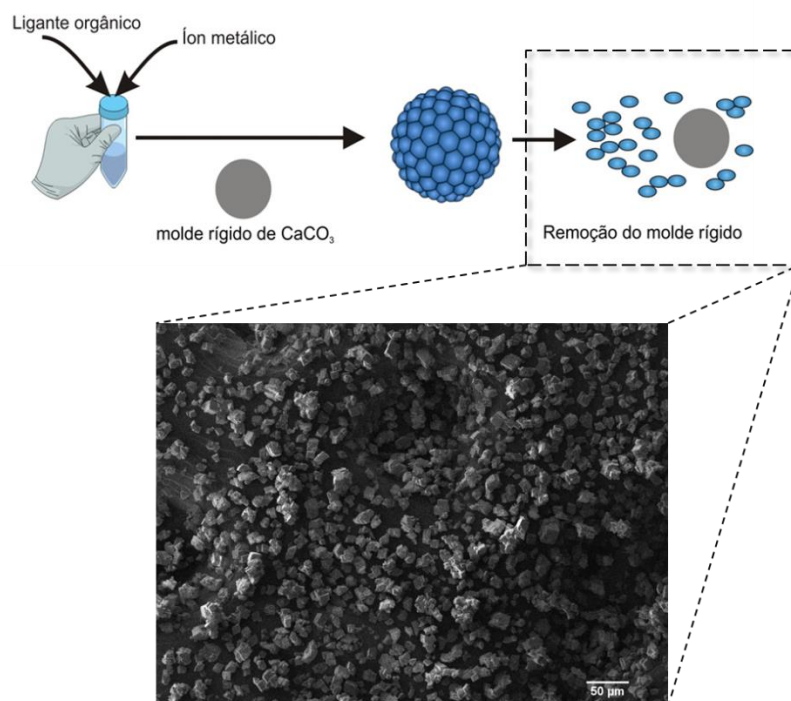
### **III.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de um molde rígido**

A tentativa de obtenção das cápsulas de MOF foi realizada, primeiramente, utilizando um molde rígido, uma vez que muitos trabalhos da literatura científica usam esse tipo de molde para obtenção de cápsulas ou esferas de diferentes materiais <sup>61</sup>. Optou-se do emprego do carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) como molde rígido, devido as propriedades dessas micropartículas, por ser um material de fácil acesso e barato. A natureza porosa desse material pode ser usado como molde que pode ser decomposto, para obter cápsulas de MOF. Após a formação da camada de MOF na superfície, o núcleo pode ser extraído e há a formação da cápsula como material resultante.

Nessa etapa do trabalho, buscou-se desenvolver cápsulas utilizando diferentes metais na sua composição, testando a sua formação à base de MOFs HKUST, ZIF-8 e MIL-100. O processo de auto- arranjo (*self- assembly*) das MOFs deve ocorrer na superfície do molde sólido, como descrito no Capítulo II.

Depois da formação do material, a etapa de lavagem e remoção do molde foi realizada para obter um material com cavidade oca e livre do carbonato de cálcio. Entretanto, ao adicionar o solvente tetrahidrofurano (THF) para a remoção do molde, as MOFs ZIF-8 e MIL-100 se desestruturaram e, desta maneira, não foi mais possível obter um precipitado da reação de síntese. Esse resultado pode ser explicado pela instabilidade dessas MOFs em solventes orgânicos, como o THF<sup>62</sup>. No estudo em que foi utilizado a MOF HKUST, houve ainda assim a obtenção de um precipitado após a remoção do molde. Entretanto, como observado por Microscopia Eletrônica de Varredura, mostrada na Figura 16, o precipitado formado é constituído das partículas de HKUST, o que sugere que durante a remoção do molde das cápsulas, elas foram rompidas e as redes supramoleculares entre as MOFs foram destruídas. A remoção do molde sólido da cápsula é considerada uma fase crítica da síntese das cápsulas utilizando esta metodologia, o que corrobora com as informações já relatadas na literatura <sup>36</sup>.

**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.



**Fonte:** A autora (2020)

Devido a essa grande dificuldade de formação das cápsulas utilizando um molde rígido, optou-se por mudar a metodologia utilizada. Após uma busca na literatura para uma melhor alternativa para a formação desse tipo de material, optou-se desenvolver cápsulas de MOF a partir do contato entre dois líquidos imiscíveis, utilizando um molde líquido.

### III.3. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de um molde líquido

Nessa etapa do trabalho, optou-se pelo desenvolvimento das cápsulas de MOF HKUST, ZIF-8 e MIL-100 a partir de um molde líquido. As cápsulas foram obtidas dispersando uma fase imiscível em outra pelo gotejamento através de uma seringa ou de um spray aerossol (aerógrafo), de maneira que a interface entre esses dois líquidos é usada como molde para a formação de uma camada de MOF.

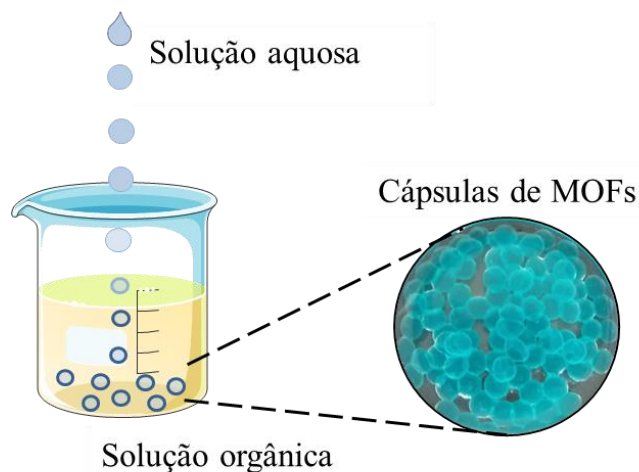
Para evitar uma diminuição na cristalização devido à perda de reagente perto da interface entre os dois líquidos imiscíveis, as concentrações tanto da solução de ligante orgânico quanto de metal estavam próximas da solubilidade máxima de cada composto. Adicionou-se a base tributilamina na fase orgânica para ocorrer a desprotonação dos grupos carboxílicos presentes nos ligantes orgânicos e desta maneira facilitar a formação de ligações covalentes metal-oxigênio e acelerar a formação das MOFs <sup>32</sup>.

Ao colocar as duas soluções imiscíveis em contato, sabe-se com base na literatura, que a nucleação e o crescimento da MOF ocorre através da troca entre os grupos carboxilatos dos ligantes para formação de unidades de estrutura secundárias isoestruturais com os metais, de maneira que o crescimento resulta na formação de uma membrana inter cruzada na interface das cápsulas ocas <sup>32,63</sup>.

O método de preparação via contato entre dois líquidos imiscíveis foi usado nesse trabalho com sucesso, resultando na formação de dois tipos diferentes de cápsulas, uma a base de cobre (HKUST) e outra à base de ferro (MIL-100). A tentativa de síntese da cápsula à base de zinco (ZIF-8) também foi realizada, no entanto, não houve a formação de ligações suficientes para manter as redes das MOFs estáveis e, dessa maneira, não foi possível obter um precipitado do material para realizar a caracterização físico-química e dar continuidade no trabalho.

A Figura 17 mostra um esquema da formação das cápsulas de MOF utilizando um molde líquido e em destaque uma fotografia das cápsulas de HKUST formadas.

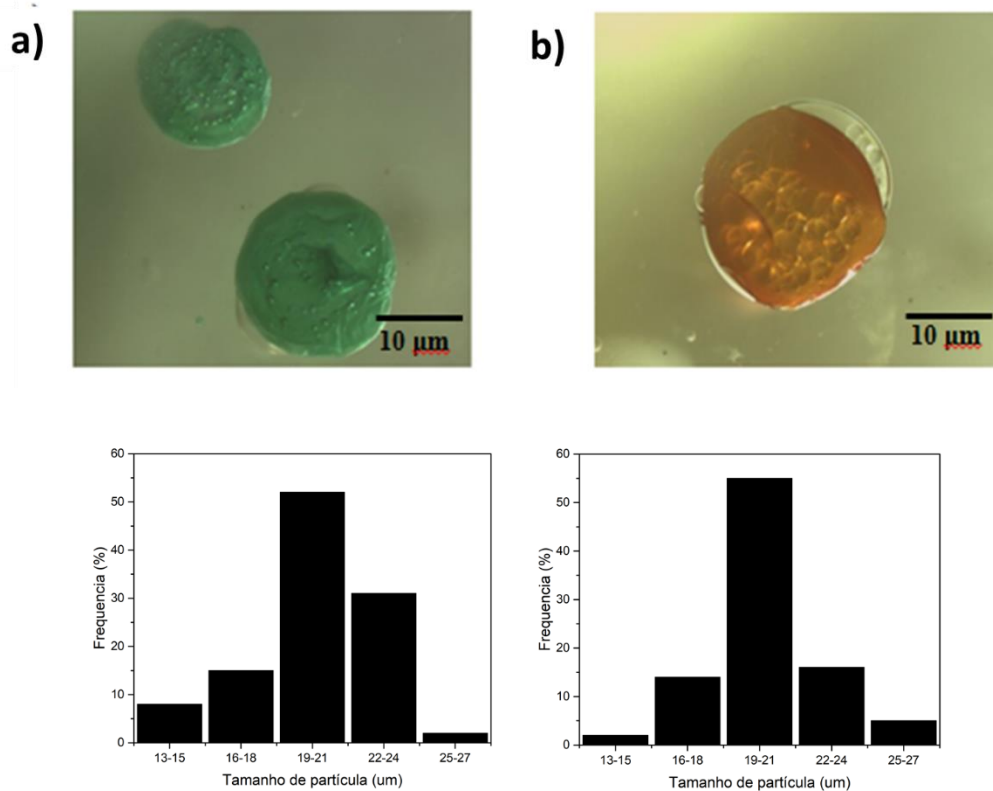
**Figura 17:** Esquema da formação de cápsulas de MOF e em destaque a fotografia do material obtido à base de HKUST.



**Fonte:** A autora (2020)

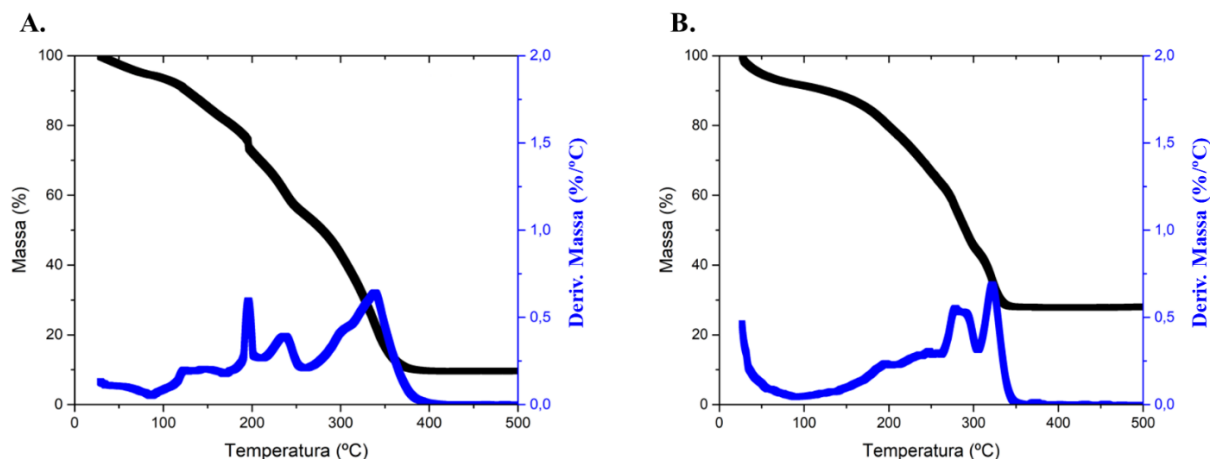
As imagens de microscopia óptica das cápsulas de MIL-100 e de HKUST obtidas nesta etapa do trabalho estão apresentadas na Figura 18, juntamente com os seus histogramas de distribuição de tamanho de partículas. As cápsulas apresentam a morfologia esférica e os valores médios de 50 partículas usando o programa *ImageJ* mostram que elas possuem a mesma faixa de tamanho, de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A homogeneidade da forma e do tamanho obtidos nesses materiais é muito importante para a aplicação farmacêutica, assegurando um parâmetro importante para a sua futura aplicação como sistema de liberação de fármacos, nesse caso, viável para aplicações oral e tópica.

**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.



Os materiais obtidos foram caracterizados por análise térmica para melhor determinação da composição destas MOFs, como mostra a Figura 19, demonstrando as temperaturas de decomposição das cápsulas à base de cobre (HKUST) e de ferro (MIL-100).

**Figura 19:** Curvas de TGA e as suas derivadas (DTG) das cápsulas à base das MOFs (A) MIL-100 e (B) HKUST.

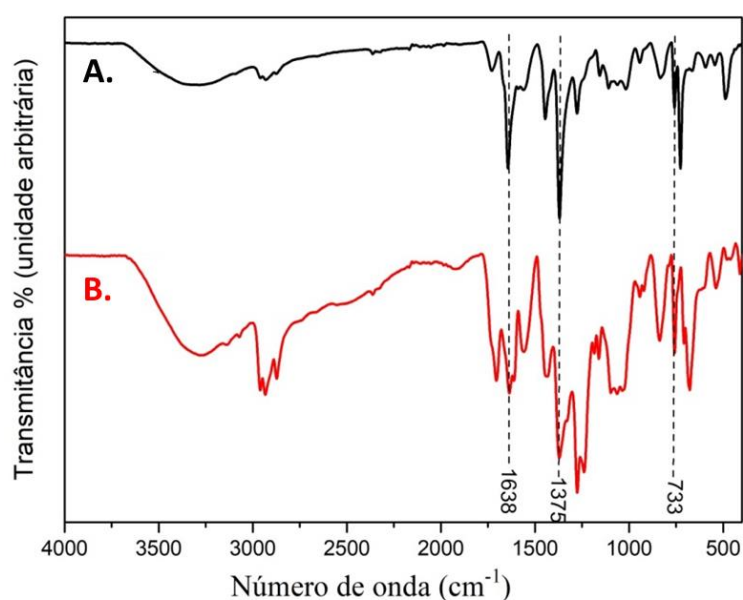


Para a cápsula de MIL-100 é observado um primeiro fenômeno de perda de massa de aproximadamente 12%, a eliminação de moléculas de água e etanol, que poderiam estar presentes dentro dos poros, na faixa de temperatura entre 110 °C e 150 °C. Em seguida, entre 200 °C e 260 °C, ocorreu uma segunda perda de massa de aproximadamente 24% referente à saída de moléculas de *n*-octanol (P.E. ~ 195 °C) e a degradação do álcool polivinílico (PVA)<sup>32</sup> utilizados durante a síntese desse material. É importante considerar também, durante essa segunda perda de massa, a eliminação de moléculas de água coordenadas axialmente aos íons ferro dos blocos de construção triméricos<sup>64</sup>. Além dos eventos relacionados à perda de moléculas de solventes, água coordenada e degradação do PVA, a amostra apresentou um terceiro evento que corresponde à degradação do ligante orgânico utilizado para a síntese da MOF constituinte das paredes das cápsulas. A decomposição do ligante ácido trimésico, utilizado para o preparo das cápsulas a base de MIL-100, ocorreu em aproximadamente entre 280 °C e 370 °C, com uma perda de massa de aproximadamente 40%. Todas as faixas de temperatura de decomposição estão de acordo com dados previamente relatados na literatura, o que corrobora que houve a formação de um material com as mesmas características térmicas<sup>65</sup>.

No que diz respeito ao material que contém Cu (II), que são as cápsulas constituídas da MOF HKUST, observa-se na Figura 19 que o material tem uma perda de massa entre 250 °C e 300 °C, aproximadamente 18% referente a decomposição das moléculas de água coordenadas, *n*-octanol e PVA. A decomposição do ligante orgânico benzenotricarboxilato que constitui a MOF ocorreu na faixa de 305 °C e 350 °C com uma perda de massa de aproximadamente 40%.

A espectroscopia na região do infravermelho permitiu avaliar a formação da ligação coordenada entre o ligante orgânico e o metal durante a formação das cápsulas de MOF. Foram analisadas as cápsulas de MIL-100 e de HKUST, como mostra a Figura 20. A coordenação entre o metal e o ligante é caracterizada, principalmente, pelo estiramento assimétrico e simétrico dos grupos carboxilatos coordenados.

**Figura 20:** Espectros vibracionais no IV das cápsulas à base de cobre para formação da HKUST (A) e das cápsulas à base de ferro para formação da MIL-100 (B), obtidas por molde líquido.



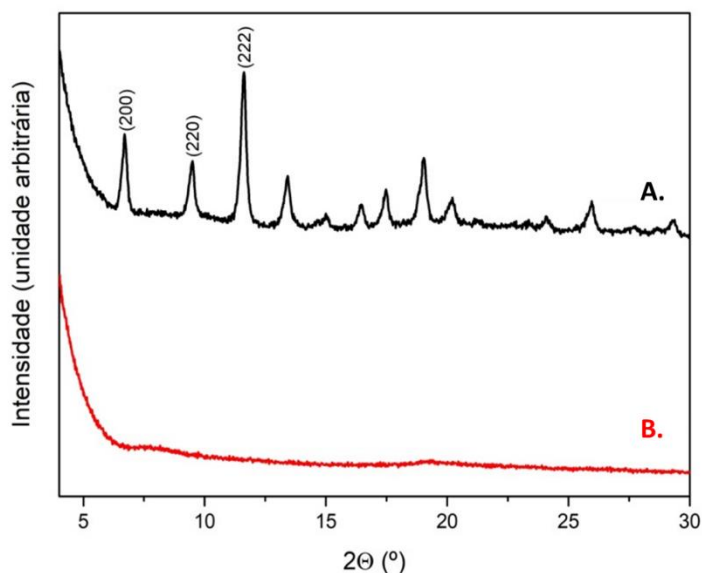
De um modo geral, nos espectros vibracionais ilustrados na Figura 20, pode-se observar inicialmente uma banda larga centrada em cerca de  $3450\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao modo de estiramento  $\nu_{\text{OH}}$  das moléculas de água. Essas moléculas de água podem estar coordenadas ou terem sido adsorvidas pelo contato das MOFs com a umidade do ar. A presença de água nos materiais também foi revelada pelas análises termogravimétricas. Em seguida, aparecem bandas de baixa intensidade na região de  $2900\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  que estão relacionadas a movimentos de estiramento de ligações C-H. A confirmação da coordenação dos grupos carboxilato dos ligantes orgânicos aos íons  $\text{Cu(II)}$  e  $\text{Fe(III)}$  ocorreu pelo deslocamento da frequência da banda  $\nu_{\text{C=O}}$  entre  $1688\text{--}1715\text{ cm}^{-1}$  nos ligantes livres para  $\sim 1603\text{--}1665\text{ cm}^{-1}$  e  $1373\text{--}1404\text{ cm}^{-1}$  nos espectros dos compostos metálicos, atribuídas, respectivamente, aos estiramentos assimétrico ( $\nu_{\text{as}}\text{OCO}^-$ ) e simétrico ( $\nu_{\text{s}}\text{OCO}^-$ ) dos grupos

carboxilato coordenados. Além disso, pode ser observada também uma banda pouco intensa entre 728-745  $\text{cm}^{-1}$  associada a movimentos de deformação CH do anel benzênico.

Desta maneira, analisando os espectros de IV das cápsulas desenvolvidas através da utilização de molde líquido, é possível afirmar que houve a formação da ligação metal- ligante orgânico e que as estruturas moleculares das MOFs HKUST e MIL-100 foram formadas.

Os padrões de DRX das amostras das cápsulas são apresentados na Figura 21. A amostra cápsula MIL-100 apresenta picos largos indicando material não bem cristalizado, o que não é característico de uma MOF. O padrão de DRX da cápsula HKUST mostra picos finos e bem definidos o que confirma a cristalinidade das cápsulas.

**Figura 21:** Difratogramas de raios X das cápsulas a base de cobre para formação da MOF HKUST (A) e das cápsulas à base de ferro para a formação da MOF MIL-100 (B).

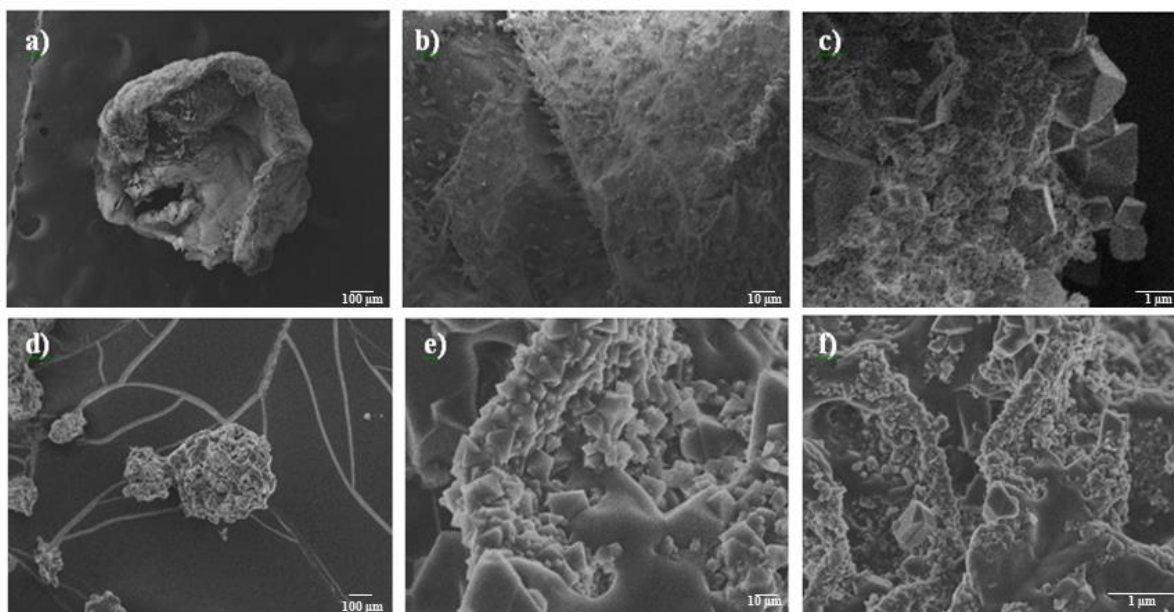


O difratograma (linha preta na Figura 21) mostrou todos os picos correspondentes a estrutura octaédrica de  $[\text{Cu}_3(\text{BTC})_2(\text{H}_2\text{O})_3]_n$ , onde BTC = benzenotricarboxilato, também chamado de ácido trimésico<sup>12</sup>. Os picos mais intensos corroboram com os picos reportados na literatura para a MOF HKUST, estão localizados em  $2\theta = 11.68^\circ$ ;  $9.58^\circ$  e  $6.78^\circ$  relacionados com os planos de difração (222), (220) e (200), respectivamente como está representado na Figura 21. Desta maneira, podemos afirmar que a preparação das cápsulas de cobre não alterou as propriedades cristalinas da rede metalo-orgânica HKUST.

O difratograma de nanopartículas MIL-100 de referência apresentam picos intensos em baixo ângulo<sup>66</sup> mas, o difratograma referente às cápsulas a base de ferro obtidos nessa etapa do trabalho mostra a formação de um material amorfo (linha vermelha na Figura 21), o que sugere que apesar da formação das cápsulas, evidenciada nesse trabalho por outros resultados de caracterização, estas não são compostas por MOFs, por não apresentarem alta cristalinidade.

A caracterização das cápsulas de HKUST por MEV (Figura 22) mostram a morfologia esférica do material preparado por um molde líquido através do uso de uma seringa (Figuras. 22a-c) e um aerógrafo (Figuras. 22d-f).

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



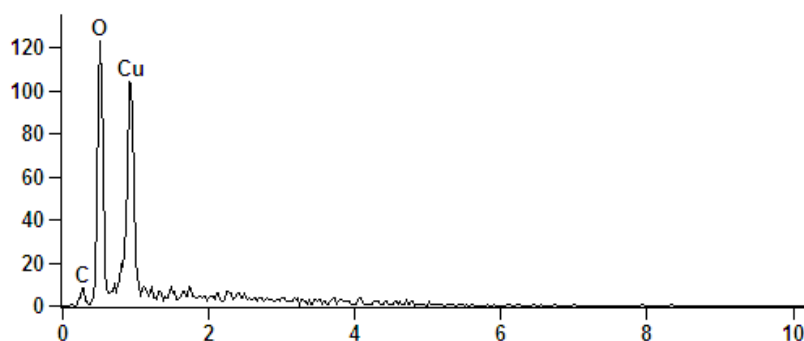
As imagens de MEV das cápsulas de HKUST foram realizadas após a secagem do material, permitindo avaliar se a estrutura esférica da cápsula é mantida após a remoção do molde líquido, que se encontrava no interior do material. Dessa maneira, as imagens das cápsulas de HKUST que foram formadas a partir de uma seringa mostram que após a secagem a estrutura da cápsula é deformada e não permanece mais na forma esférica. Mas é importante destacar que ainda é possível observar os cristais de HKUST na superfície das cápsulas, como mostra a Figura 22c e 22d, sugerindo que as MOFs estão inalteradas. Por outro lado, a Figura 22.(d) mostra que quando a

cápsula é sintetizada utilizando um aerógrafo, ela não perde a estrutura esférica mesmo após a etapa de secagem. Além disso, também é possível observar a integridade dos cristais da MOF HKUST na casca da cápsula, através da análise das Figuras 22.(e) e 22.(f). A manutenção da morfologia da cápsula obtida através do aerógrafo pode ser explicada pelo fato de as cápsulas obtidas serem muito menores quando comparadas àquelas ilustradas nas Figuras 22a-c, e com menores espaços vazios em seu interior, as cápsulas não deformaram, mantendo sua estrutura esférica mesmo após a secagem. O tamanho médio das cápsulas formadas utilizando uma seringa é 1 mm e as formadas utilizando um aerógrafo é de 500  $\mu\text{m}$ .

Além disso, as imagens da MEV também revelaram que, embora os cristais da MOF HKUST apresentem a morfologia octaédrica nas cápsulas obtidas pelas duas metodologias, há maior homogeneidade no tamanho do cristal de HKUST nas cápsulas obtidas por aerossol, o que pode também contribuir para a maior estabilidade das cápsulas após a etapa de secagem e a manutenção da sua estrutura sem grandes deformações.

Com o intuito de caracterizar os compostos coordenados foi realizado um mapeamento químico a partir da técnica de espectroscopia de raio X por dispersão em energia (EDS). Foi realizada uma análise química das cápsulas de HKUST, sugerindo desse modo a presença dos principais elementos químicos obtidos na síntese realizada. Essa técnica foi realizada em conjunto com a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde foi possível atribuir à presença de carbono, oxigênio e cobre, como mostra a Figura 23.

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



A presença desses elementos químicos é um indicativo da formação dos cristais de HKUST e ausência de qualquer elemento presente em solventes utilizados durante a síntese das cápsulas. A composição mostrada na Figura 23 é a mesma por toda a extensão do material, com a presença de carbono, oxigênio e cobre como picos distintos. Considerando que a MOF é constituída de íons cobre e o ligante benzenotricarboxílico, a presença unicamente desses elementos confirma a pureza do material e o sucesso na síntese da fase desejada.

#### III.4. Conclusões do Capítulo III.

Neste capítulo nós demonstramos que a utilização do molde sólido para a formação das cápsulas de MOF ainda apresenta muitos desafios que precisam ser superados. Apesar da possível formação das MOFs durante esse processo, a remoção do substrato é uma etapa crítica que desestruturou as cápsulas.

O uso de molde líquido mostrou resultados positivos para a formação das cápsulas de MOFs. A formação de cápsulas esféricas de HKUST foi obtida por diferentes metodologias, em que foi usada uma seringa ou um aerógrafo. O resultado obtido corrobora com estudos anteriores, em que foi relatado que para a formação da cápsula, ao utilizar um molde líquido, ocorre inicialmente a substituição, na interface entre as soluções aquosa e orgânica, dos grupos carboxilatos dos íons de acetato de cobre, por aqueles dos ligantes BTC, formando a MOF. Além disso, a rede cristalina da MOF é formada através da ligação entre as unidades SBU (*secondary building units*) recém-formadas com os ligantes remanescentes. Desta maneira, ao dispersar a solução aquosa como gotas na fase de *n*-octanol, houve a formação de cápsulas ocas em função da ação das gotículas como molde<sup>32</sup>.

As cápsulas de HKUST obtidas por aerógrafo tiveram a sua morfologia esférica e as características físico-químicas da MOF foram similares às relatadas na literatura científica. Dessa maneira, o uso de aerógrafo parece ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de cápsulas utilizando moldes líquidos. Entretanto, o tamanho das esferas obtidas nessa etapa do trabalho, de aproximadamente 500 µm dificulta futura administração intravenosa ou intratumoral. Todavia, esse material é promissor para futura administração do sistema por via oral ou via tópica.

## Capítulo IV.

---

Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de emulsão de *pickering*

## **IV. 1. Introdução do Capítulo IV**

Neste capítulo, descreve-se a síntese de cápsulas de MOF pelo método de emulsão de *pickering*. A emulsão de *pickering* é um tipo de emulsão estabilizada apenas por partículas sólidas, que substituem os tensoativos tradicionais. Esse tipo de emulsão é muitas vezes desenvolvido com nanopartículas que possuem propriedades anfifílicas, como sílica, proteínas e óxido metálicos. Recentemente, as MOFs também estão sendo relatadas como estabilizadoras para emulsão de *pickering*, através da acumulação espontânea das partículas de MOF na interface óleo-água, impedindo a coalescência (reunião de duas ou mais gotículas que entram em colisão) por efeitos estéricos<sup>67</sup>.

Essas emulsões estabilizadas por sólidos são interessantes para aplicações na área da saúde uma vez que sistemas de menor toxicidade podem ser formados ao reduzir o uso de tensoativos. Além disso, apresentam maior estabilidade quando formadas com alta quantidade de fase interna, permitindo a fabricação de gotículas protegidas por uma “coroa” de MOF formada pelo efeito *pickering*.

Dessa maneira, nesse capítulo foram desenvolvidas emulsões de *pickering* utilizando as nanopartículas de MOF MIL-100 e ZIF-8 como estabilizantes, formando assim as cápsulas de MOF. Para isso, diferentes condições de sínteses foram estudadas bem como a compreensão dos mecanismos envolvidos para formar esses materiais.

## **IV.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF a partir de emulsão de *pickering***

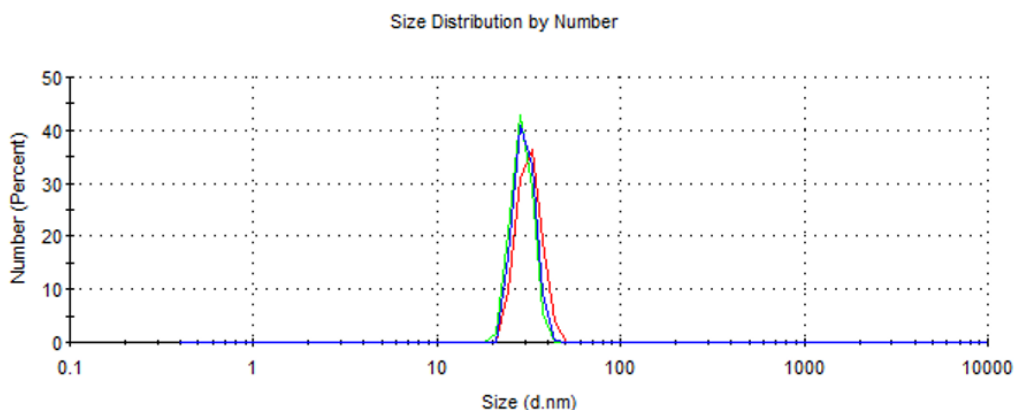
Nessa etapa do trabalho foram utilizadas as nanopartículas de MOF à base de ferro e zinco, MIL-100 e ZIF-8, respectivamente, como estabilizantes da emulsão para a formação das cápsulas de MOF em emulsões inversas, ou seja água em óleo (A/O)<sup>68</sup>. Dessa maneira, nessa seção do trabalho, primeiramente serão apresentados os resultados sobre a formação das nanopartículas de MOFs, de acordo com as metodologias já descritas pela literatura, para então utilizá-las na formação das cápsulas através das emulsões de *pickering*.

#### IV.2.1. Cápsulas de MOF ZIF-8 a partir de emulsão de pickering

Primeiramente, as nanopartículas de ZIF-8 foram sintetizadas de acordo com o que já foi reportado na literatura<sup>53</sup>. As nanopartículas de ZIF-8 sintetizadas foram caracterizadas para avaliar suas propriedades físico-químicas com base nos relatos descritos na literatura.

Pelo método de espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanopartículas de ZIF-8 em água foi possível calcular o tamanho médio das partículas. A Figura 24 apresenta o perfil de distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de ZIF-8 que foi igual a  $32,4 \pm 3,07$  nm. Outros estudos sintetizaram nanopartículas dessa MOF com diâmetros próximos a 30 nm, corroborando com os resultados encontrados<sup>53</sup>.

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

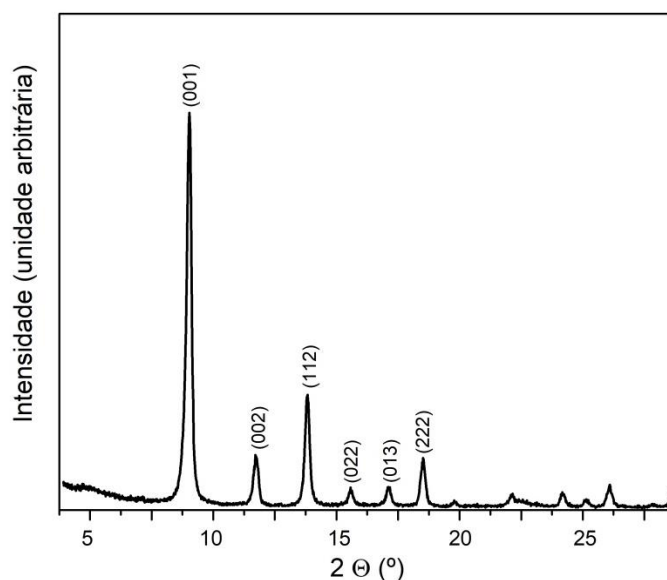


O índice de polidispersão (PDI) é um parâmetro usado para indicar a distribuição do tamanho das partículas em suspensão e pode ser um indicativo de homogeneidade ou não das nanopartículas em relação ao seu tamanho. Índices de polidispersão inferiores ou iguais a 0,3 indicam uma população homogênea de nanopartículas, e podem ser consideráveis aceitáveis<sup>69</sup>. O PDI das NPs de ZIF-8 foi de 0,14, o que mostra que as nanopartículas sintetizadas apresentam uma homogênea distribuição de tamanho.

O tamanho da partícula na região nanométrica e o baixo índice de polidispersão são propriedades que influenciam diretamente a formação das cápsulas de MOFs, uma vez que esses materiais formam a base estrutural das esferas.

O difratograma de raios X das nanopartículas de ZIF-8 é apresentado na Figura 25. Pode-se observar a presença de picos estreitos e de alta intensidade em regiões de  $2\theta$  características da MOF ZIF-8, conforme anteriormente reportado na literatura para esse material<sup>53</sup>.

**Figura 25:** Difratoograma de raios X de pó (DRX) das nanopartículas ZIF-8.



Após a síntese das NPs ZIF-8, as cápsulas a base de ZIF-8 foram desenvolvidas a partir da formação da emulsão de *pickering*. A emulsão de *pickering* foi preparada utilizando as NPs de ZIF-8 como estabilizadores da emulsão.

As características anfífilas das partículas ditam sua posição de equilíbrio na interface entre os dois meios imiscíveis, o que resulta em uma camada de partículas adsorvidas na interface das gotas, formando redes compactas e resultando em uma superfície fortemente rígida e resistente à coalescência<sup>68</sup>.

Inicialmente foi preparada uma emulsão inversa (A/O) composta por uma fase aquosa de água mili-Q, NPs ZIF-8 e por uma fase oleosa de ácido oleico. Em seguida, também foi desenvolvida a formulação em que os ligantes que constituem a ZIF-8 foram adicionados, para favorecer a nucleação e formação da emulsão de *pickering* com a MOF. As demais variações de formulações propostas, mostradas na Tabela 1, foram em relação ao tipo e tempo de agitação. Além disso, o uso de alguns componentes adicionais já vem sendo muito reportado pela literatura para auxiliar a estabilidade da formulação, e nesse trabalho foram utilizados a dioleilfosfatidilcolina (DOPC) e o álcool polivinílico (PVA).

**Tabela 1:** Diferentes formulações de emulsões de *pickering* com as ZIF-8.

		Formulações						
		EpZ1	EpZ2	EpZ3	EpZ4	EpZ5	EpZ6	EpZ7
Método e parâmetros de agitação		Agitação mecânica	Sonicador de ponteira	Ultraturrax				
		700 rpm 3 h	9Hz 5 min	12000 rpm 8 min				
		% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)
Fase Aquosa	Água	36,01	36,01	36,01	28,45	36,01	36,01	36,01
	NPs de ZIF-8	7,58	7,58	7,58	15,14	6,18	7,58	6,18
	Nitrato de zinco II	-	-	-	-	0,7	-	0,7
	2- MeIM	-	-	-	-	0,7	-	0,7
Fase oleosa	Ácido oleico	48,01	48,01	48,01	48,01	48,01	48,01	52,41
	DOPC	8,40	8,40	8,40	8,40	8,40	-	-
	PVA	-	-	-	-	-	-	4

**Fonte:** Autora (2020).

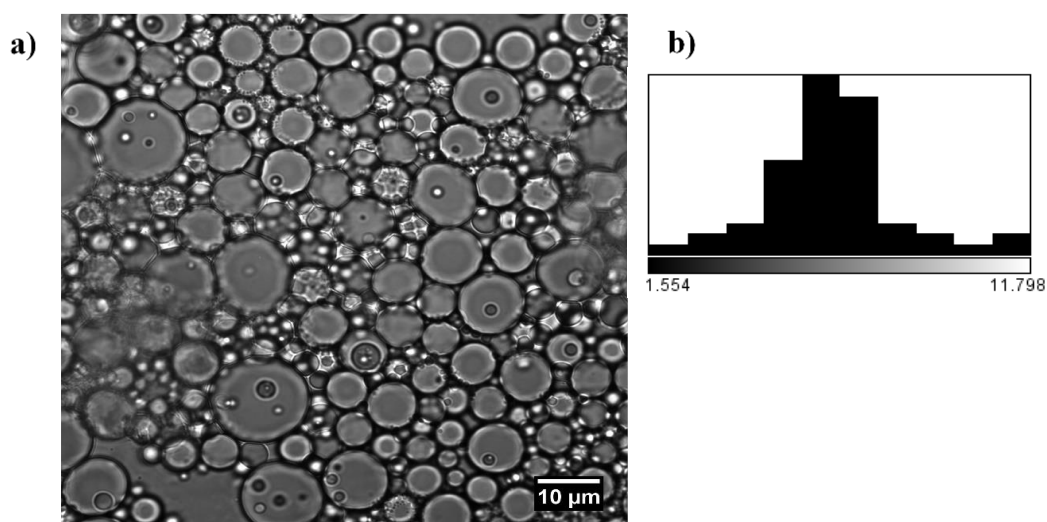
NOTA: Ep= emulsão de *pickering*; Z: à partir de ZIF-8.

As primeiras formulações desenvolvidas são compostas somente por água com as nanopartículas de ZIF-8 formando a fase aquosa, e o ácido oleico com a DOPC formando a fase oleosa. Devido à propriedade anfifílica, esses fosfolipídeos (DOPC) têm a capacidade de formar emulsões com baixa tensão interfacial, sendo assim, pode ser muito bem empregada em associação com as nanopartículas sólidas de MOF para promover a estabilização da emulsão<sup>70</sup>.

As emulsões a base de ZIF-8 preparadas usando agitação mecânica e sonicação com as proporções apresentadas na Tabela 1 em nomeadas como EpZ1 e EpZ2, apresentaram separação das fases após 24 horas em repouso. Sendo assim, foram preparadas emulsões usando a ultrassonicação, chamadas de EpZ3 a EpZ7. Todas essas formulações foram observadas por microscopia óptica e os histogramas de distribuição de tamanho de partícula foram construídos a partir da medida do diâmetro de 50 cápsulas, pelo programa ImageJ.

A formulação EpZ3, que tem a sua composição descrita na Tabela 1 é formada por gotículas, como apresenta a Figura 26.

**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).

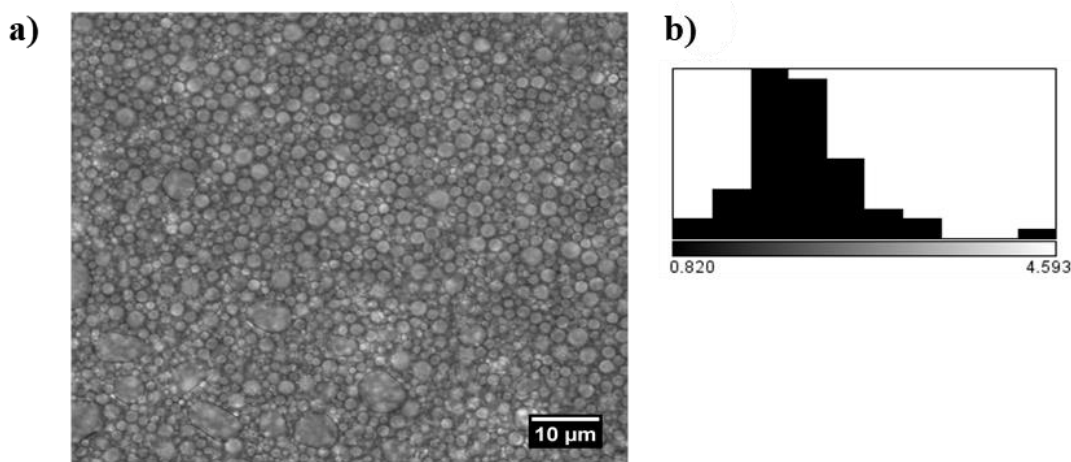


O diâmetro médio das gotículas formadas nesta etapa do trabalho, mensurado através do programa ImageJ, é de  $7 \pm 1,2 \mu\text{m}$ . Essa emulsão não apresentou separação de fases após 24 horas, sendo então mais estável, o que revela a importância do método de agitação não apenas da formação de gotículas menores, mas também na estabilidade da formulação.

Relatos na literatura afirma que em emulsões formadas pelo aumento sistemático da concentração das partículas, de maneira geral, o diâmetro da gota média diminui com o aumento da concentração das partículas. Dessa maneira, é possível afirmar que a quantidade de partículas na emulsão é inversamente proporcional ao diâmetro da gota<sup>71</sup>.

Como o tamanho das gotículas que atuam como molde é proporcional ao das cápsulas formadas, aumentou-se a quantidade de nanopartículas usada no preparo das emulsões na tentativa de diminuir o tamanho das cápsulas e aumentar a possibilidade de administração das mesmas por diferentes vias. A concentração de nanopartículas de ZIF-8 na formulação foi duplicada de 7,56 % (m/m) para 15,12% (m/m) e a emulsão resultante, chamada de EpZ4, foi observada por microscopia óptica, como mostrado na Figura 27.

**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).



O diâmetro médio das cápsulas da formulação EpZ4, como mostrado na Figura 27, é de  $2 \pm 0,6 \mu\text{m}$ . O resultado obtido corrobora com o que já vem sendo descrito pela literatura, ou seja, o aumento na concentração de nanopartículas diminuiu em mais de três vezes o tamanho da gotícula formada. Isso pode ser atribuído à maior área de superfície total das partículas presentes na interface líquido-líquido, favorecendo a estabilidade da emulsão<sup>71,72</sup>.

No entanto, a camada de nanopartículas presentes na interface não foi suficiente para formar uma estrutura sólida capaz de resistir à saída de água durante a secagem do material.

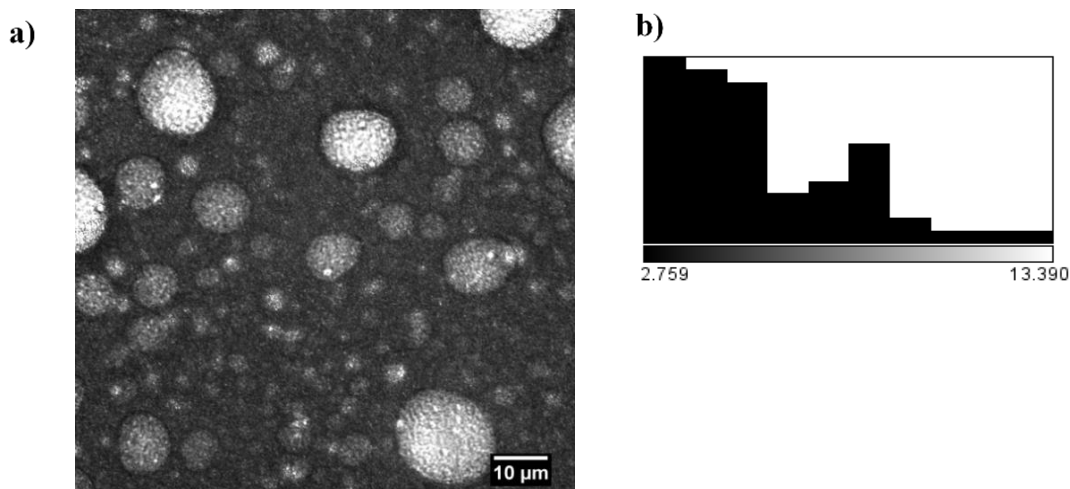
Seguindo com o propósito de obter cápsulas de MOF por emulsão de *pickering*, a adição de ligantes livres (nitrato de zinco e 2-metilimidazol) à formulação, chamada de EpZ5, seria uma alternativa para otimizar a estabilidade das cápsulas. Os ligantes livres adicionados podem auxiliar na formação de uma camada de MOF mais estável na superfície da gotícula, e isso pode ser explicado porque a presença dessas moléculas no meio reacional pode favorecer o crescimento

sobre a nucleação. No entanto, houve a separação de fases e nenhuma formulação de emulsão de *pickering* seguindo esta metodologia foi desenvolvida.

Com todos estes resultados obtidos, optou-se por remover a DOPC da formulação, porque o fosfolipídio poderia estar ocupando o lugar das nanopartículas de MOF na interface líquido-líquido e desta maneira competindo com a ZIF-8 pela formação de uma emulsão de “*pickering*”.

Além disso, considerando que nenhuma das alternativas anteriores levou a resultados satisfatórios, decidiu-se desenvolver uma formulação contendo o polímero PVA para evitar a coalescência das cápsulas. O PVA é conhecido, mesmo quando usado em pequenas quantidades, por aumentar significativamente a resistência mecânica das cápsulas, aumentando a coesão das partículas presentes na interfase através da interação entre os grupos hidroxila e os cristalitos das nanopartículas de MOFs, facilitando a ligação e entre eles e a formação de uma camada mais estruturada e coesa de nanopartículas<sup>32</sup>. A partir disso, foram desenvolvidas formulações utilizando uma solução aquosa com 4% de PVA. A Figura 28 mostra uma imagem de microscopia óptica da emulsão com PVA.

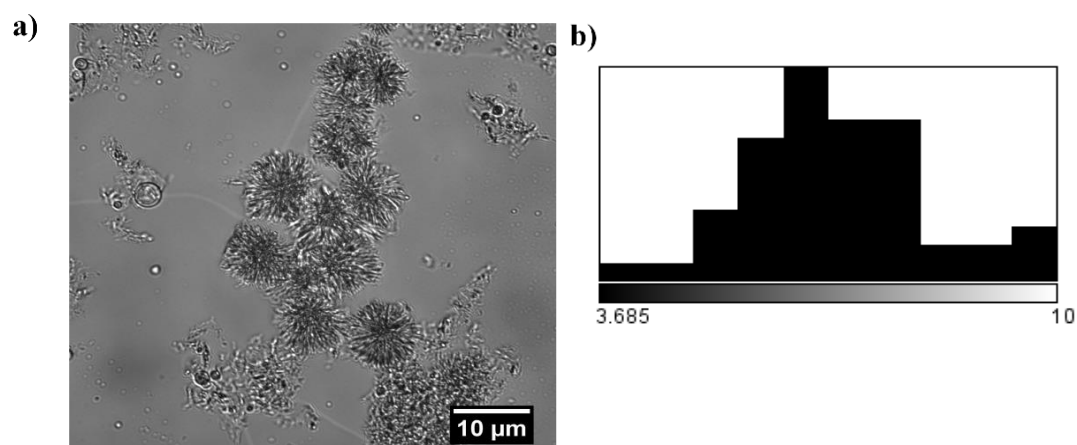
**Figura 28:** Microscopia óptica e fotografia da emulsão de *pickering* de ZIF-8 com PVA (a) e gráfico de distribuição de tamanho de partícula (b).



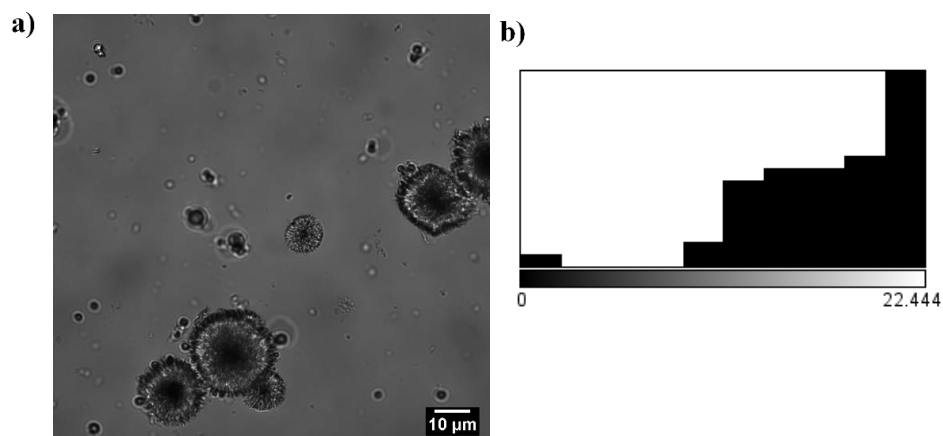
Os tamanhos das gotas formadas foram de aproximadamente  $5,7 \pm 0,6$  µm de diâmetro, no entanto, a emulsão obtida não apresentou estabilidade durante a etapa de secagem e as cápsulas não se mantiveram íntegras após a eliminação dos solventes.

O mesmo teste foi realizado, mas adicionando além do PVA, uma pequena quantidade dos reagentes das MOFs, nitrato de zinco e 2-metilimidazol. A Figura 29 mostra as imagens de microscopia óptica das emulsões contendo os ligantes livres e com PVA adicionado durante o seu desenvolvimento e a Figura 30 mostra a imagem de microscopia óptica da emulsão também contendo os ligantes e com a adição de PVA na formulação recém preparada.

**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).



**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).

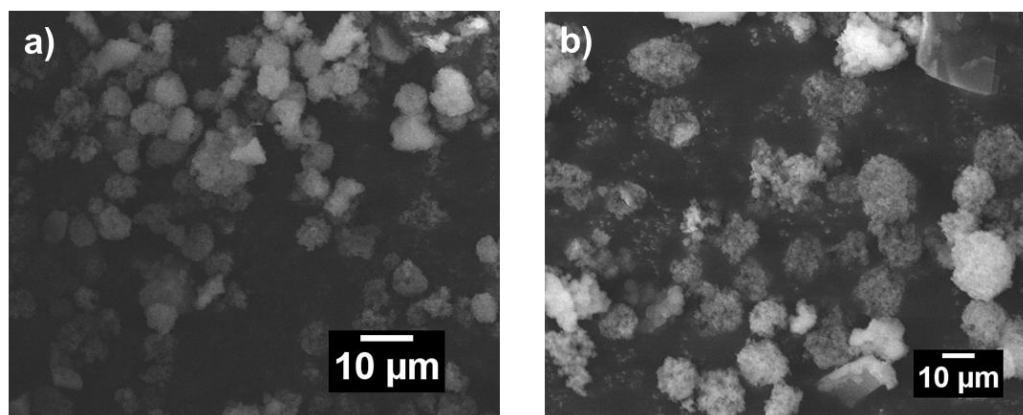


O tamanho das esferas formadas com a adição de PVA durante o desenvolvimento da emulsão, como visto na Figura 29, é de aproximadamente  $6,97 \pm 0,4 \mu\text{m}$  de diâmetro, já o tamanho médio das esferas formadas com a adição de PVA na formulação recém preparada, como mostra a Figura 30, é de aproximadamente  $17 \pm 0,9 \mu\text{m}$  de diâmetro.

Os materiais obtidos através dessa metodologia, adicionando PVA na formulação, permaneceram estáveis durante a secagem e, então, esses materiais foram escolhidos para seguir para a caracterização físico química.

A Figura 31 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura do material obtido utilizando a emulsão de *pickering*, adicionando PVA durante (a) e após (b) a sua preparação.

**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.

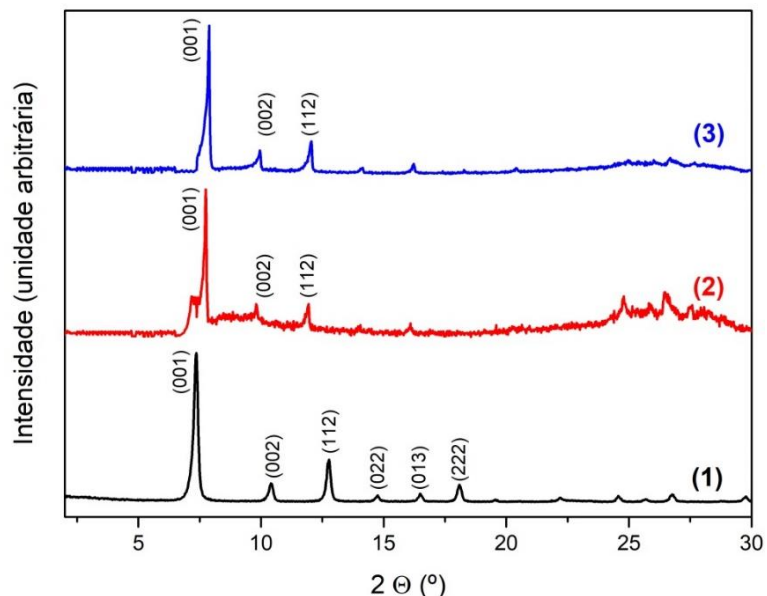


As imagens apresentadas na Figura 31 confirmam a formação de um material esférico mesmo após a secagem da emulsão de *pickering*.

Os difratogramas de raios X (DRX) das nanopartículas de ZIF-8 e das cápsulas obtidas por emulsões de *pickering* preparadas com PVA e ligantes livres estão mostrados na Figura 32.

**Figura 32:** Difratogramas 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).



A Figura 32 mostra que os principais picos presentes nas cápsulas de ZIF-8 obtidos por emulsão de *pickering* são os mesmos presentes nas nanopartículas ZIF-8 (1). Além disso, é possível observar que o difratograma das cápsulas apresentam um pequeno deslocamento dos picos relacionados aos planos (002) e (112) para ângulos de difração menores, comparados com as nanopartículas ZIF-8 anteriormente sintetizadas, sugerindo a intercalação das cadeias do polímero PVA entre as redes metal- orgânicas, da mesma forma que é relatado por Dong, Y. & Bhattacharyya, D<sup>73</sup>. É importante destacar que, ainda assim, as cápsulas de MOFs desenvolvidas a partir das emulsões apresentam cristalinidade semelhante à das nanopartículas ZIF-8.

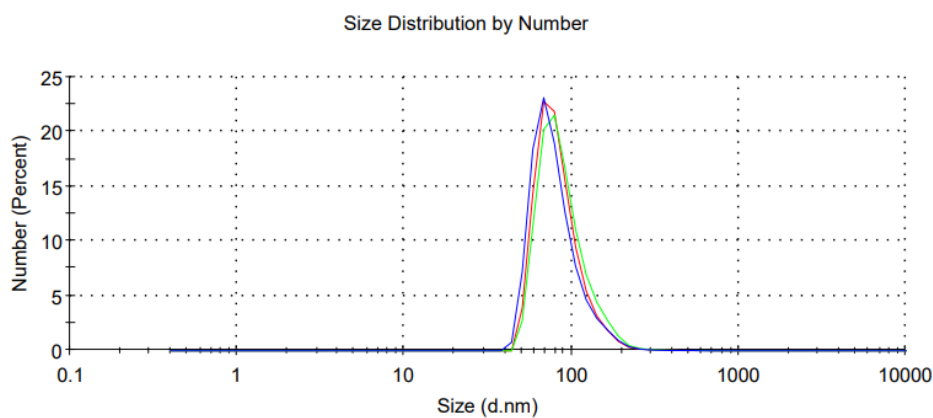
De maneira geral, os resultados obtidos até esta etapa do trabalho indicam a síntese bem-sucedida de esferas obtidas por emulsão de *pickering* a partir da MOF biocompatíveis ZIF-8. O sistema formado em emulsão apresenta tamanho de cápsula controlado, estabilidade química com a possibilidade de, com maiores estudos, ter futura aplicação deste material como sistema de liberação tópico.

#### IV.2.2. Cápsulas de MOF MIL-100 a partir de emulsão de *pickering*

As nanopartículas MIL-100 foram sintetizadas, primeiramente, de acordo com o que já foi reportado na literatura e descritos anteriormente no Capítulo II. Após a síntese, as nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas para avaliar suas propriedades físico-químicas com base nos relatos descritos na literatura.

A determinação do tamanho das partículas e do índice de polidispersão (PDI) foram realizadas através do DLS em água. Pelo método de DLS, as nanopartículas MIL-100 apresentaram tamanho médio igual a  $80,23 \pm 6,1$  nm, como mostra na Figura 33, o que corrobora com outros estudos anteriores que reportaram a síntese nanopartículas MIL-100 com tamanhos próximos a 80 nm<sup>55</sup>.

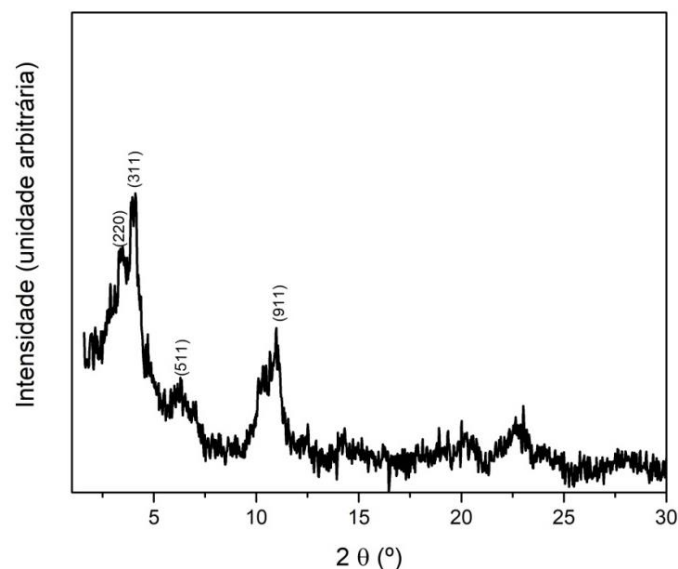
**Figura 33:** Perfil de distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas MIL-100 (curva de três medidas independentes).



O PDI das NPs MIL-100 foi 0,3, o que mostra que as nanopartículas sintetizadas apresentam uma homogênea distribuição de tamanho de acordo com o relatado na literatura, com PDI inferiores ou iguais a 0,3<sup>69</sup>. Como as NPs MIL-100 apresentam tamanho de partícula nanométrico, aceitável índice de polidispersão e propriedade anfifílica, esse material torna-se promissor para a formação das cápsulas de MOF por emulsão de *pickering*, tendo as principais características para formar uma base estrutural das esferas que esse trabalho busca desenvolver.

O difratograma de raios X das NPs MIL-100 está apresentado na Figura 34.

**Figura 34:** Difratoograma de raios X de pó (DRXP) das nanopartículas MIL-100.



A amostra apresenta picos característicos da MOF MIL-100, conforme anteriormente reportado na literatura<sup>55,66</sup>.

Em seguida, as cápsulas à base de MIL-100 foram preparadas por emulsão de *pickering*. Dessa maneira, a emulsão nessa parte do trabalho foi preparada utilizando as NPs de MIL-100 como estabilizadores da emulsão. Existe uma dificuldade adicional para o desenvolvimento de uma emulsão de *pickering* estável e a formação de cápsulas baseadas em nanopartículas MIL-100, que é a facilidade de agregação das nanopartículas MIL-100 quando o pH da solução é alterado durante a troca de solvente<sup>66</sup>. Portanto, devido à natureza ácida já conhecida das NPs MIL-100, o pH das emulsões preparadas foi mantido em 3.8 durante todo o desenvolvimento das emulsões.

Inicialmente foi preparada uma emulsão inversa (A/O) composta por uma fase aquosa de água mili-Q, NPs MIL-100 e por uma fase oleosa de ácido oleico. Também foi desenvolvida a formulação em que os ligantes livres que constituem a MIL-100 foram adicionados, para favorecer a nucleação e formação da emulsão de *pickering* com a MOF. Além disso, também foram preparadas formulações com a adição de DOPC para auxiliar a estabilidade. Todas as emulsões de *pickering* nessa parte do trabalho foram preparadas utilizando ultraturrax a 12000 rpm durante 3 minutos.

A Tabela 2 apresenta a composição das formulações desenvolvidas por emulsões de *pickering* à base de MIL-100.

**Tabela 2:** Composição das formulações de emulsões de *pickering* com MIL-100.

		Formulações		
		EpM1	EpM2	EpM3
		% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)
Fase aquosa	Água	36,01	36,01	38,81
	Nanopartículas de MIL-100	7,58	6,18	11,78
	Nitrato de Ferro	-	0,7	0,7
	Ácido trimésico	-	0,7	0,7
Fase oleosa	Ácido oleico	48,01	48,01	48,01
	DOPC	8,40	8,40	-

**Fonte:** Autora (2020).

NOTA: Ep= emulsão de *pickering*; M: à partir de MIL-100.

As primeiras formulações apresentadas na Tabela 2, nomeadas como EpM1 e EpM2, são constituídas por água + NPs de MIL-100, formando a fase aquosa, e o ácido oleico + DOPC, formando a fase oleosa. Além disso, a formulação EpM2 também contém ligantes livres (nitrato de ferro e ácido trimésico). No entanto, após o preparo dessas formulações (EpM1 e EpM2) houve separação de fases. A formulação EpM3 foi preparada sem o DOPC porque o fosfolípídeo poderia estar competindo com a MOF na interface, dificultando a formação de cápsulas estáveis, no entanto, não apresentaram estabilidade.

Ao levar em consideração que as nanopartículas MIL-100 são mais hidrofílicas do que ZIF-8, pode-se também considerar que isso limita a capacidade das NPs MIL-100 permanecerem na interface da emulsão. Dessa maneira, para contornar essa dificuldade, foi considerada uma estratégia alternativa para facilitar o efeito *pickering* que envolve o revestimento da superfície das nanopartículas de MIL-100 com ácidos monocarboxílico hidrofóbicos. Foram utilizados o 5-terc-butil isoftálico e o ibuprofeno como aditivos da formulação.

O 5-terc-butil isoftálico foi adicionado na fase aquosa para revestir a superfície externa das nanopartículas de MIL-100 e, conseqüentemente aumentar a sua capacidade de permanecer na interface água/ óleo. Foram adicionados cerca de 10% (m/m) desse composto em relação às nanopartículas MIL-100.

O ibuprofeno também foi considerado promissor para aumentar a afinidade das

nanopartículas MIL-100 na interface água/ óleo. Este ligante foi adicionado na fase oleosa para se difundir na interface, já que apresenta também grupamentos carboxílicos hidrofílicos. Apesar de o ligante ibuprofeno, provavelmente, ser parcialmente adsorvido nos poros das MOFs, a sua permanência na sua superfície externa, modificando suas características físico-químicas, torna as nanopartículas mais hidrofóbicas e facilitando a sua permanência na interface. Neste caso, foram adicionados 50% (m/m) em relação às nanopartículas MIL-100. Além de modificar as propriedades físico- químicas da emulsão, o ibuprofeno, é um anti-inflamatório não esteroideal (AINE), cuja liberação modificada foi bastante estudada na literatura científica<sup>74</sup>. Há inclusive relatos de sua incorporação em nanopartículas de MOFs MIL-100<sup>75</sup> para modificar a liberação deste fármaco. Desta maneira, nessa formulação o fármaco pode atuar como agente estabilizador e também como molécula biologicamente ativa.

Em ambos os casos, os aditivos foram primeiramente solubilizados nos solventes de cada fase da emulsão. A relação dos componentes das formulações, chamadas de EpM4 a EpM6, estão mostrados na Tabela 3.

**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.

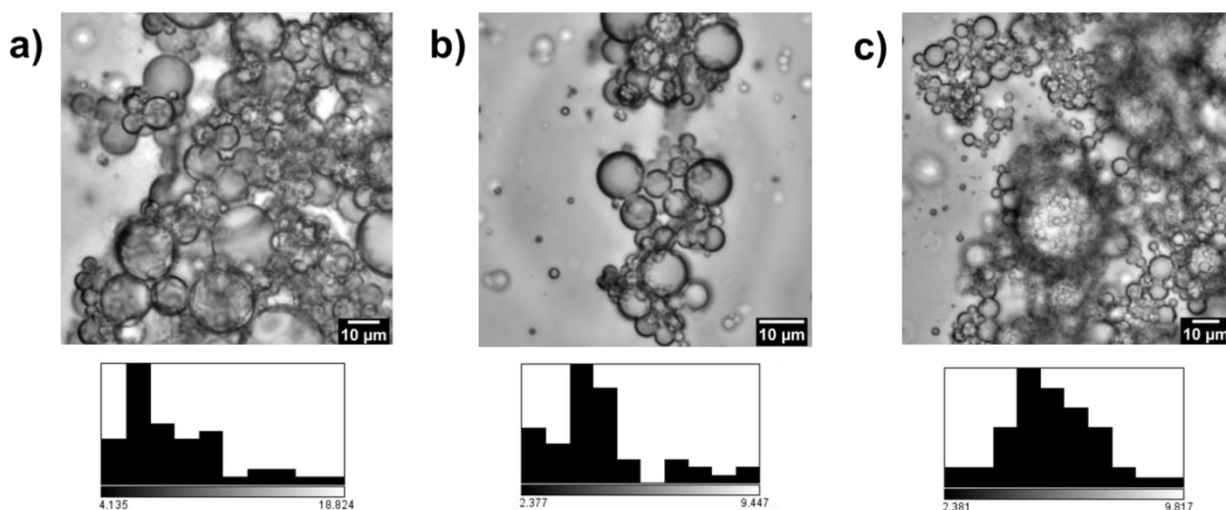
		Formulações		
		EpM4	EpM5	EpM6
		% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)
Fase aquosa	Água	40,21	41,96	40,46
	Nanopartículas de MIL-100	7,58	7,58	7,58
	5-terc-butil isoftálico	-	0,78	-
Fase oleosa	Ácido oleico	52,21	49,68	48,18
	Ibuprofeno	-	-	3,78

As formulações EpM4, EpM5 e EpM6 apresentaram maior estabilidade e por isso foram escolhidas para prosseguimento do trabalho.

A Figura 35 apresenta as imagens de microscopia óptica das cápsulas desenvolvidas a base

de MIL-100 nessa etapa do trabalho, o que possibilita analisar a influência dos diferentes compostos na morfologia e no tamanho de partículas.

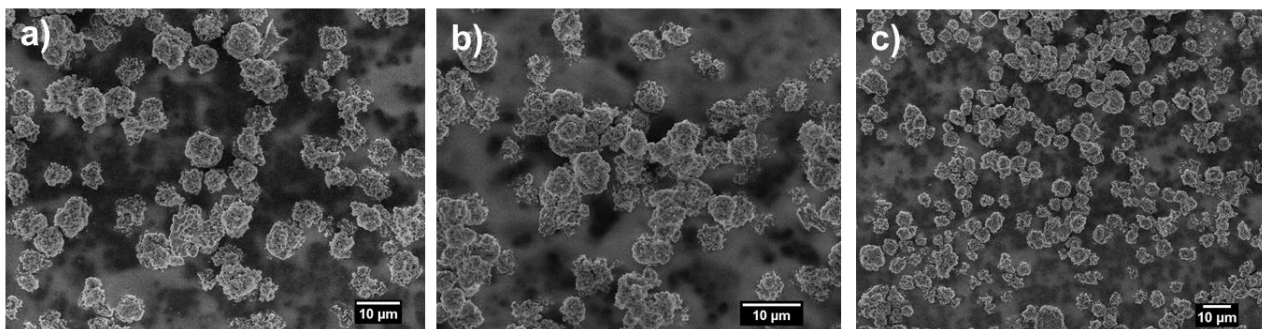
**Figura 35:** Imagens da microscopia óptica das emulsões EpM4 (a), EpM5 (b) e EpM6 (c) com os respectivos gráficos de distribuição de tamanho de partícula.



Os diâmetros médios das cápsulas formadas nessa etapa do trabalho foram  $8,68 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ,  $4,72 \pm 0,7 \mu\text{m}$  e  $5,68 \pm 0,3 \mu\text{m}$  nas formulações EpM4, EpM5 e EpM6, respectivamente. É possível afirmar que, de maneira geral, a adição de ibuprofeno ou ácido 5-terc-butil isoftálico resultou em uma redução significativa do tamanho das cápsulas.

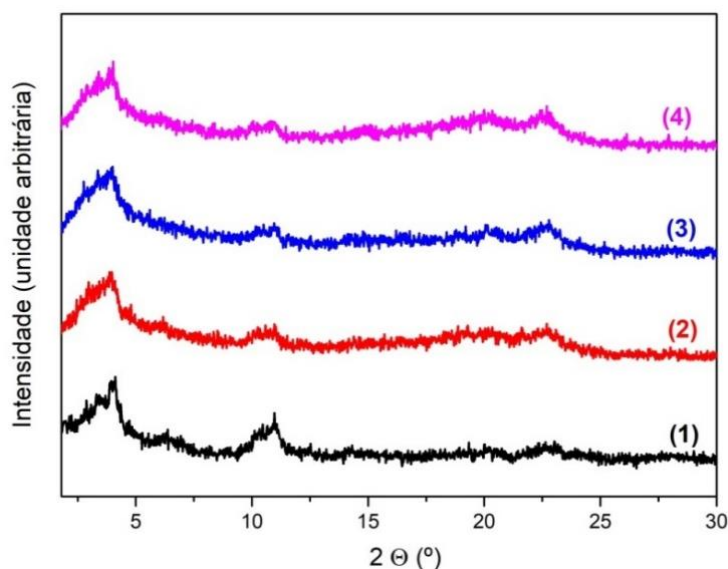
Após a secagem do material, as amostras EpM4, EpM5 e EpM6 foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 36 mostra as imagens de MEV, confirmando a formação de um material esférico a partir da utilização da emulsão de *pickering*, após a secagem.

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



A Figura 37 apresenta os difratogramas de raios X das cápsulas obtidas após a secagem das formulações de emulsão de *pickering* à base de MIL-100.

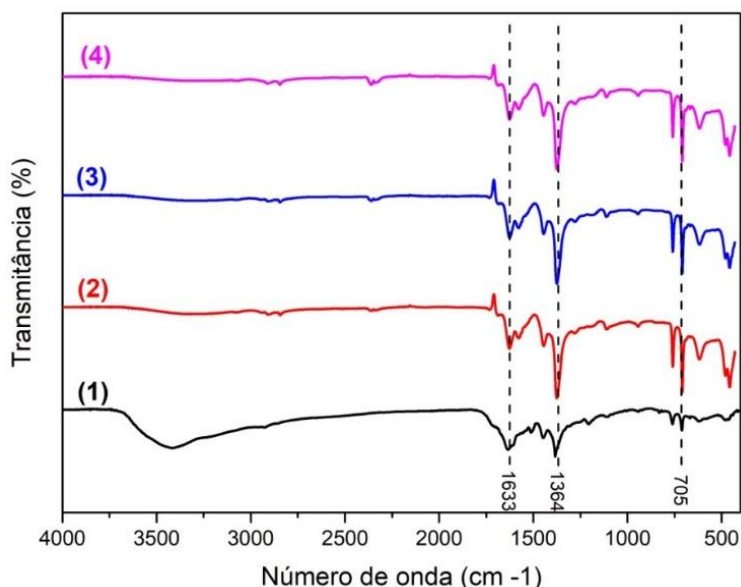
**Figura 37:** Difratogramas de raios X das nanopartículas de MIL-100 (1) das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de *pickering* (2) das cápsulas obtidas após a adição de 5-terc-butil isoftálico na formulação (3) e das cápsulas MIL-100 após a adição de ibuprofeno na formulação (4).



De acordo os difratogramas mostrados na Figura 37 os materiais obtidos por emulsão de *pickering* apresentam o mesmo padrão de difração de raios X obtidos da nanopartícula MIL-100. Pode-se inferir, portanto, que o desenvolvimento por emulsão de *pickering* não alterou a estrutura cristalina da MIL-100.

A Figura 38 apresenta os espectros vibracionais na região do infravermelho das cápsulas obtidas nessa etapa do trabalho.

**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).



A Figura 38 mostra os espectros na região do infravermelho das nanopartículas MIL-100 e das cápsulas obtidas à partir das emulsões desenvolvidas. As principais bandas presentes na nanopartícula MIL-100 também estão presentes nas cápsulas sintetizadas. Há um deslocamento da frequência da banda  $\nu_{C=O}$  de 1688-1715  $\text{cm}^{-1}$  dos ligantes livres para 1633  $\text{cm}^{-1}$ , que está atribuído ao estiramento assimétrico ( $\nu_{as}OCO^-$ ), e para 1364  $\text{cm}^{-1}$ , atribuído ao estiramento simétrico ( $\nu_sOCO^-$ ) dos grupos carboxilato coordenados. Também pode ser observada uma banda em 705  $\text{cm}^{-1}$  associada a movimentos de deformação CH do anel benzênico. Desta maneira podemos concluir pela análise dos espectros que houve a formação de MOF em todos os casos.

Os resultados obtidos até esta etapa do trabalho indicam a síntese bem-sucedida de esferas obtidas por emulsão de *pickering* utilizando a MOF MIL-100, com a possibilidade de futura aplicação deste material como sistema de liberação.

Todavia, existe ainda a possibilidade de formação das cápsulas de MOF por emulsão de

*pickering* utilizando os ligantes que constituem a nanopartícula MIL-100. Então, em outra etapa do trabalho, foi estuada também a possibilidade da síntese das nanopartículas das MOFs durante o desenvolvimento da emulsão. O sal metálico e o ligante orgânico, necessários para preparar MIL-100, foram adicionados às fases da emulsão para formar nanopartículas de MOF diretamente na superfície das gotículas da emulsão e, como resultado do efeito de *pickering*, as cápsulas foram formadas.

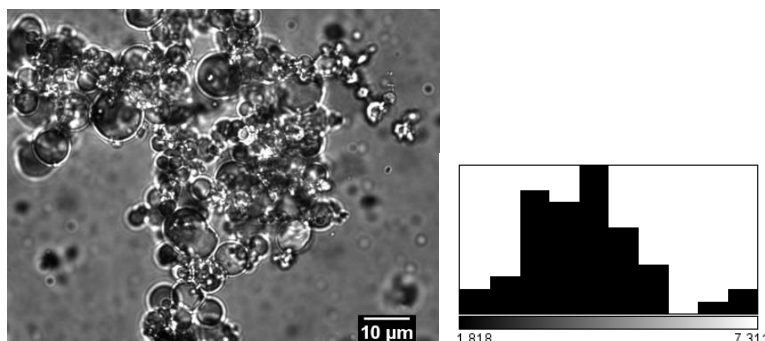
A Tabela 4 apresenta a composição da emulsão preparada para a formação de cápsulas MIL-100 nessa etapa do trabalho.

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

Formulação		
EpM7		
		% (m/m)
Fase aquosa	Água	40,21
	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	5,83
Fase oleosa	Ácido oleico	52,21
	Ácido trimésico (BTC)	1,75

A Figura 39 apresenta as imagens de microscopia óptica e o gráfico de distribuição de tamanho de partícula das cápsulas a base de MIL-100 preparadas com o uso dos ligantes da MOF para a sua formação durante o preparo da emulsão de *pickering*.

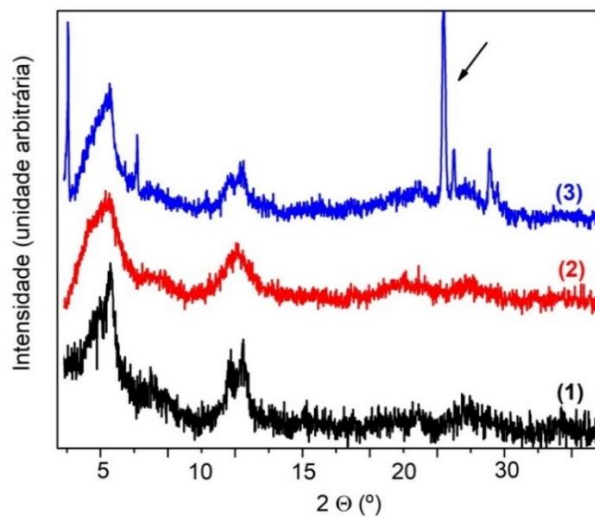
**Figura 39:** Imagens da microscopia óptica da emulsão EpM7 e gráfico de distribuição de tamanho de partícula.



O diâmetro médio das cápsulas formadas nessa etapa do trabalho foi  $4,11 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . O uso dos ligantes ácido trimésico e nitrato de ferro para a formação das MOFs na emulsão de *pickering* resultou em cápsulas de MIL-100 com menores tamanhos. Além disso a formulação resultante também apresentou maior estabilidade, sem separação de fases.

Após a síntese, as cápsulas de MIL-100 foram lavadas de uma a três vezes com etanol, para a remoção de resquícios da fase oleosa, e seco a  $100^\circ\text{C}$  em estufa a vácuo. Como ilustra a Figuras 40, após a terceira lavagem o padrão de difração de raios X da MOF MIL-100 manteve-se inalterado, indicando que o processo de síntese por emulsão de *pickering* não alterou a estrutura cristalina da MOF recém formada.

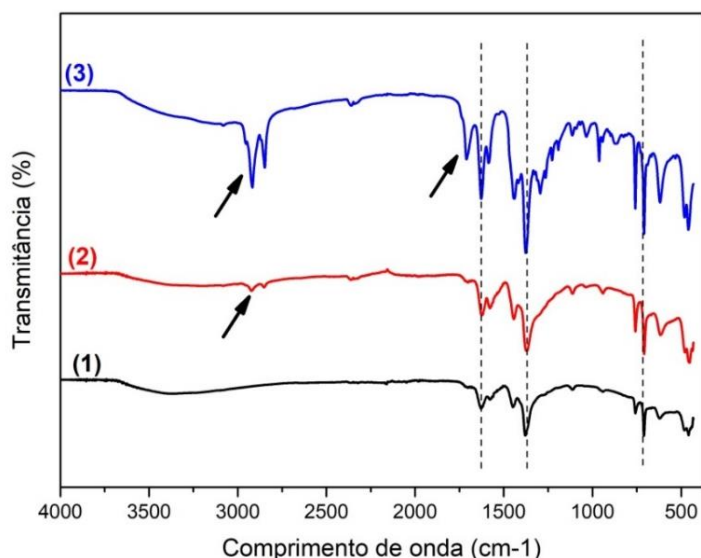
**Figura 40:** Difração de raios X das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de *pickering* após três lavagens (1), duas lavagens (2) e com uma lavagem (3).



A presença de um pico fino em alto ângulo, destacado com uma seta na Figura 40, pode estar relacionada à porções orgânicas residuais, provavelmente de ácido oleico. O difratograma das cápsulas lavadas três vezes mostra a não existência mais desse pico, confirmando a necessidade da lavagem para total remoção residual.

A Figura 41 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho das cápsulas de MIL-100 obtidas por emulsão de *pickering* após as lavagens.

**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).

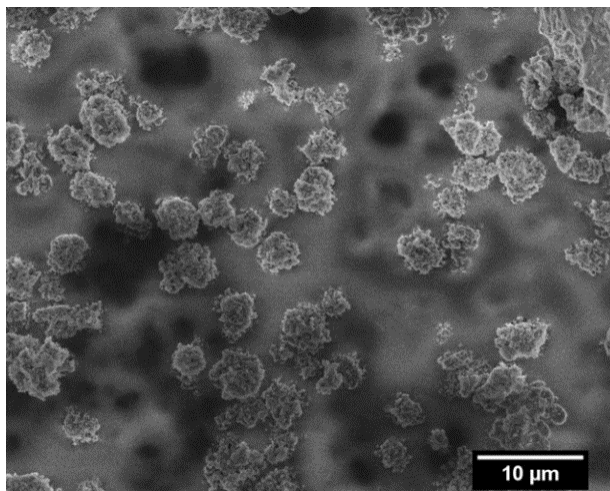


Comparando os espectros de IV das cápsulas de MIL-100 formadas através do efeito *pickering*, é possível afirmar que houve a formação de ligações químicas de coordenação e que os espectros formados foram semelhantes ao da MOF MIL-100.

As bandas que representam o ligante livre ou excesso de ácido oleico, em destaque com setas na Figura 41, não são mais observados após a terceira lavagem.

Após a secagem, o material formado após 3 lavagens foi observado por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 42 apresenta a imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura da amostra EpM7.

**Figura 42:** Imagem da microscopia eletrônica de varredura da amostra EpM7.



Os resultados obtidos mostram que o sistema apresenta a morfologia esférica após a secagem, e dessa maneira, o desenvolvimento promissor de esferas obtidas por emulsão de *pickering* a partir de ligantes da MOF MIL-100 pode ter futura aplicação como sistema de liberação de fármaco.

### IV. 3. Conclusão do Capítulo IV

Neste capítulo foram desenvolvidas cápsulas de MOF utilizando emulsão de *pickering*. Os resultados obtidos até o momento se mostraram inovadores e muito promissores para a aplicação desse material como carreador de fármaco. Foram desenvolvidas cápsulas de ZIF-8 e de MIL-100 com estabilidade e com os menores tamanhos de partículas (6,97 $\mu$ m e 4,11 $\mu$ m, respectivamente) quando comparados àqueles obtidos pelo uso de molde líquido.

A otimização do material desenvolvido foi feita estabelecendo a quantidade de nanopartículas das MOFs ou ainda a quantidade de ligantes livres da MIL-100 nas fases aquosa e oleosa. O processo de produção da emulsão, por sua vez, foi ajustado quanto ao tempo e a velocidade de agitação, para garantir a qualidade e variabilidade mínima.

A abordagem feita nessa parte do trabalho construiu com sucesso a qualidade das emulsões de *pickering*, permitindo o desenvolvimento de cápsulas que podem ser futuramente aplicadas como carreadoras de fármacos. Os resultados obtidos sugerem que esses sistemas são um veículo promissor para o uso em produtos para administração por via oral e tópica.

## Capítulo V.

---

Desenvolvimento de cápsulas de MOF utilizando *spray drying*

## V. 1. Introdução do Capítulo V

Neste capítulo, descreve-se a síntese de cápsulas de MOF MIL-100 utilizando o *spray drying*. O *spray drying* é muito descrito na literatura para secar suspensões e encapsular ativos para diversas aplicações, especialmente na área farmacêutica.

Apesar dessa técnica já ter sido reportada também como método de síntese de MOFs em larga escala, a abordagem do uso do *spray drying* para o desenvolvimento de cápsulas à base de MOF é muito promissora por apresentar características positivas, como baixo custo, ser um método rápido e escalonável. Além disso, ao contrário das técnicas abordadas anteriormente, como utilização de molde sólido, molde líquido ou emulsão de *pickering*, o *spray drying* não exige o uso de materiais poliméricos, moldes ou solventes imiscíveis.

Dessa maneira, o desenvolvimento de cápsulas de MOF por *spray drying* pode permitir a produção em escala semi-industrial de superestruturas ocas e esféricas utilizando nanopartículas de MOF na superfície das gotículas atomizadas.

Foram utilizadas suspensões etanólicas das nanopartículas MIL-100 para serem atomizadas por *spray drying* e então preparar cápsulas de MOF. Para isso, diferentes condições e parâmetros do equipamento foram estudadas bem como a compreensão dos mecanismos para a formação desses materiais.

## V.2. Desenvolvimento de cápsulas de MOF MIL-100 utilizando *spray drying*

Nessa etapa do trabalho foram utilizadas as nanopartículas de MOF à base de ferro, MIL-100, para a formação das cápsulas de MOF. Primeiramente, foram sintetizadas as nanopartículas MIL-100, de acordo com o que foi apresentado nos capítulos anteriores. As nanopartículas foram dispersas em etanol, formando uma dispersão coloidal, que foi seca por atomização no equipamento Nano *Spray drying* B290 para formação das cápsulas.

Alguns fatores, durante o processo de *spray drying*, podem interferir na morfologia e no tamanho das cápsulas resultantes. O ajuste de parâmetros como a temperatura de entrada e de saída do equipamento, interfere no processo de transferência de calor da superfície para a região mais profunda no interior da gota, e pode criar partículas ocas. Uma variação do tamanho inicial das partículas que compõem a suspensão precursora pode produzir partículas esféricas com diferentes

rugosidade superficiais<sup>76</sup>.

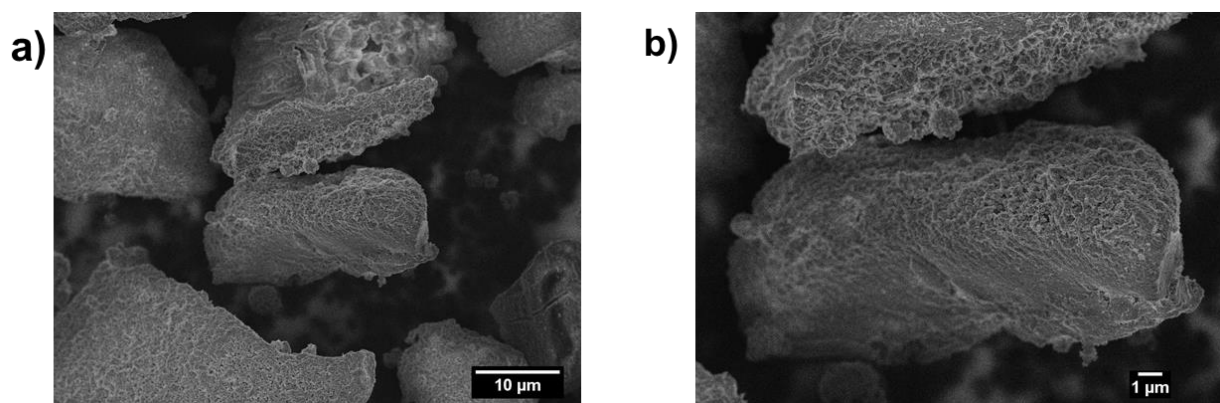
Segundo a literatura, o princípio de secagem por atomização, que é utilizado no *spray drying*, produz partículas de tamanho pequeno que pode ser ajustado pela variação da abertura do bico atomizador. Como uma única gota produz uma cápsula, o tamanho da gota e a quantidade de solvente na gotícula estão relacionadas ao diâmetro final das cápsulas sintetizadas. Em suma, é possível controlar o diâmetro da cápsula formada, alterando o tamanho da gota, ajustando a concentração do precursor e o fluxo de passagem da suspensão precursora<sup>45,76,77</sup>.

Desta maneira, esses parâmetros foram estudados para controlar o tamanho de partículas até a faixa nanométrica, visando ampliar as possibilidades de futura aplicação deste material como sistema de liberação controlada de fármaco<sup>45,77</sup>. Em todas as sínteses foram utilizados um bico atomizador com um orifício de 0,5 mm.

Foram investigados os melhores parâmetros para síntese das cápsulas MIL-100, com base em tentativas anteriores já relatadas pelo grupo de Cedric Boissiere<sup>45</sup>. Primeiramente, os parâmetros programados no equipamento *spray dryer* foram: 80°C de temperatura de entrada, 50 bar de pressão de ar, 100% da capacidade máxima do aspirador e fluxo da bomba de 50%, utilizando a concentração de 1 mg/mL de suspensão de nanopartículas MIL-100.

A Figura 43 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) do material obtido com os parâmetros descritos anteriormente.

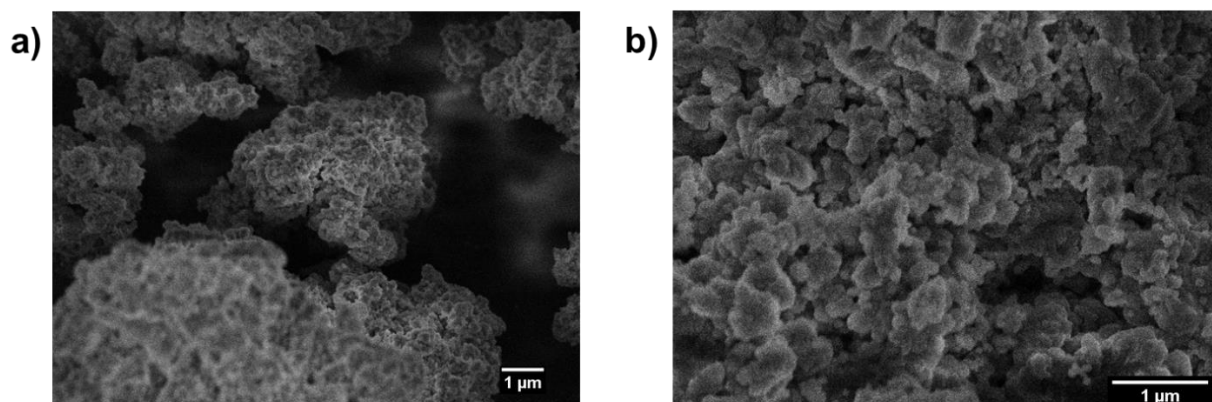
**Figura 43:** Imagens de MEV-FEG de material obtido do *spray drying* com fluxo da bomba de 50% e a partir da suspensão de nanopartículas MIL-100 a 1 mg/mL.



A Figura 43 mostra que não houve a formação de um material com morfologia esférica esperada para uma cápsula, o que poderia assegurar homogeneidade no material para o seu uso como sistema de liberação de fármaco. Desta maneira, continuando o propósito de obtenção de uma cápsula de MOF por *spray drying*, o parâmetro de fluxo da bomba foi alterado para 5%, e a concentração da suspensão de MIL-100 foi reduzida oito vezes, chegando a 0,125mg/mL, baseando-se em relatos da literatura de que afirmam que a diminuição da concentração da suspensão utilizada favorece a formação de um material esférico<sup>78</sup>.

A Figura 44 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) do material obtido a partir das mudanças dos parâmetros de fluxo de bomba e de concentração da suspensão de MIL-100.

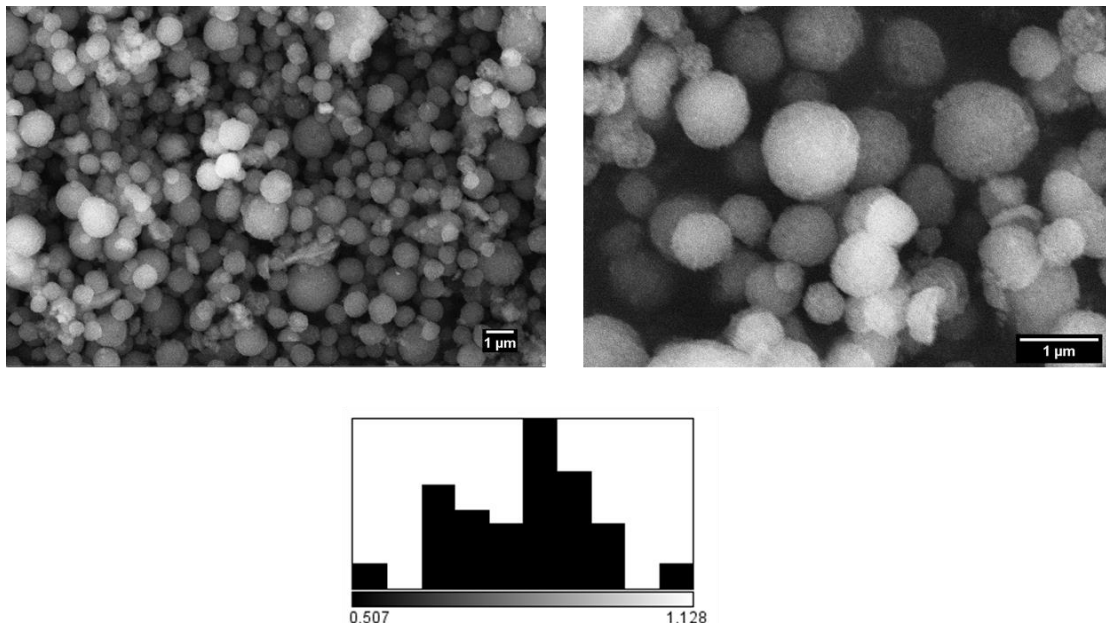
**Figura 44:** Imagens de MEV-FEG de material obtido do *spray drying* com fluxo da bomba de 5% e a partir da suspensão de nanopartículas MIL-100 a 0,125mg/mL.



Todavia, a Figura 43 mostrou que, novamente, o material obtido não apresentou a morfologia esférica que se espera de uma cápsula. Desta vez, visando obter ainda uma cápsula de MOF por *spray drying*, foram mantidos os parâmetros do equipamento a 80°C de temperatura de entrada, 50 bar de pressão de ar, 100% da capacidade máxima do aspirador e fluxo da bomba de 5%, mas a concentração utilizada foi alterada para 1mg/mL de suspensão nanopartículas MIL-100.

A Figura 45 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) do material obtido a partir dos parâmetros determinados e da suspensão etanólica de nanopartículas a 1mg/mL.

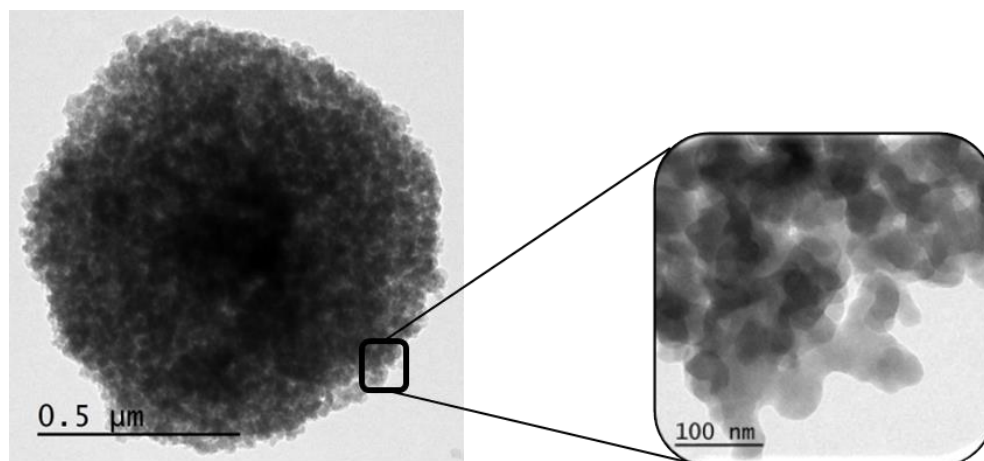
**Figura 45:** Imagens MEV de material obtido por *spray drying* com fluxo da bomba de 5% e a partir da suspensão de nanopartículas MIL-100 a 1mg/mL, e gráfico de distribuição de tamanho de partícula.



A Figura 45 mostrou que as cápsulas formadas nessa etapa do trabalho apresentam morfologia esférica e com tamanho médio de  $800 \pm 100$  nm.

A Figura 46 ilustra as imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) obtidas da cápsula de MIL-100, que permitem confirmar a morfologia esférica, e ainda em zoom é possível observar as nanopartículas MIL-100 que constituem a cápsula.

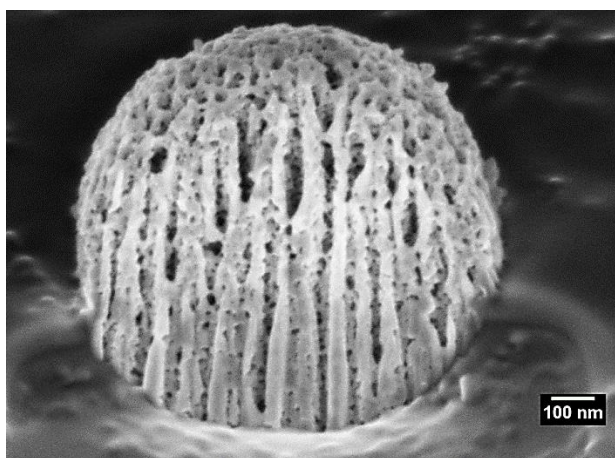
**Figura 46:** Imagens de MET de cápsula de MIL-100 obtida por *spray drying*.



Dessa maneira, as imagens das microscopias mostram que as cápsulas obtidas por *spray drying* possuem uma morfologia homogênea e esférica. O tamanho médio da cápsula de 800 nm permite futura aplicação por diferentes vias, como intratumoral, tópica e a oral<sup>47</sup>. Pode-se observar também que a cápsula é composta por nanopartículas MIL-100, sem rachaduras ou defeitos detectáveis por esta técnica.

A Figura 47 mostra uma imagem de microscopia eletrônica de varredura usando um feixe de íons focalizados (FIB) da cápsula de MIL-100 desenvolvida nessa etapa do trabalho. O uso do FIB permite que seja feito um corte transversal na amostra, possibilitando a visualização do seu interior.

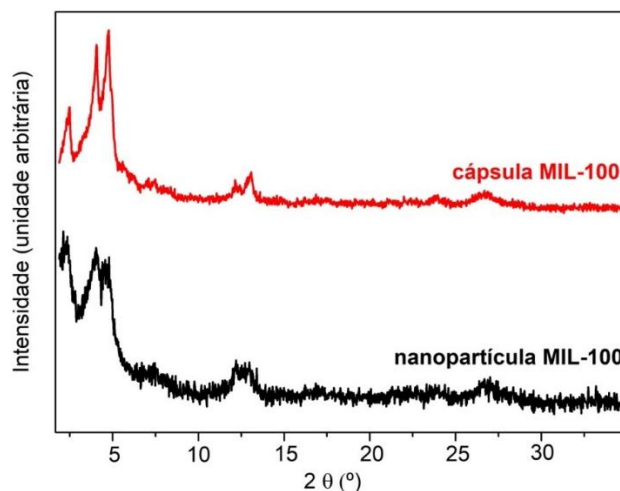
**Figura 47:** Imagem de MEV-FIB de cápsula de MIL-100 obtida por *spray drying*.



Apesar de não ter sido possível observar se as esferas de MIL-100 desenvolvidas possuem uma cavidade única e oca, a presença de grandes cavidades, de até 30 nm de diâmetro observadas pela imagem acima, além dos poros intrínsecos da MOF, torna esse material muito promissor para a sua utilização como cápsula, possibilitando a incorporação de grande quantidade de fármacos e de materiais biológicos de tamanho ainda maiores, como proteínas.

A Figura 48 apresenta os difratogramas de raios X para os pós das nanopartículas de MOF MIL-100 e das cápsulas obtidas por *spray-drying*.

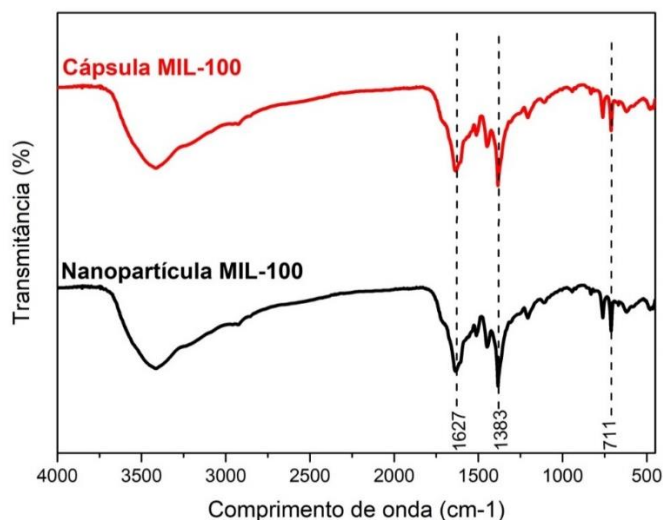
**Figura 48:** Difração de raios X das nanopartículas MIL-100 (preto) e das cápsulas de MIL-100 obtidas por *spray drying* (vermelho).



Como pode ser observado, o material obtido após o *spray drying* e as nanopartículas MIL-100 mantiveram praticamente o mesmo padrão de difração de raios-X, referentes à estrutura da MIL-100. Pode-se inferir, portanto, que o processo de *spray drying* não alterou significativamente a estrutura cristalina da MIL-100.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho da MOF MIL-100 e das cápsulas obtidas por *spray drying* estão ilustrados na Figura 49.

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



O estudo espectroscópico mostra que o material obtido após o uso do *spray drying* e as nanopartículas MIL-100 mantiveram praticamente os mesmos espectros, referentes à estrutura da MIL-100. Desta maneira, confirma-se que o processo de *spray drying* não alterou a estrutura molecular da MIL-100. Uma observação importante a partir desse estudo espectroscópico foi a ausência da banda associada à ligação C=O ( $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) do ligante livre. De fato, a coordenação dos íons ferro(III) através dos grupos carboxilato do ligante 1,3,5-benzenotricarboxílico pode ser confirmada pelo aparecimento nos espectros vibracionais das bandas em  $1627$  e  $1383 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas, respectivamente aos modos vibracionais de estiramento assimétrico e simétrico do grupo carboxilato  $-\text{COO}^-$  do ligante BTC, indicando que ele foi desprotonado para a coordenação aos íons  $\text{Fe}^{+3}$  para a formação da MOF MIL-100. A banda observada em  $711 \text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao movimentos de deformação CH do anel benzenico. Dessa maneira, confirma-se uma vez mais que o processo de *spray drying* para a formação das cápsulas não alterou a estrutura molecular da MIL-100.

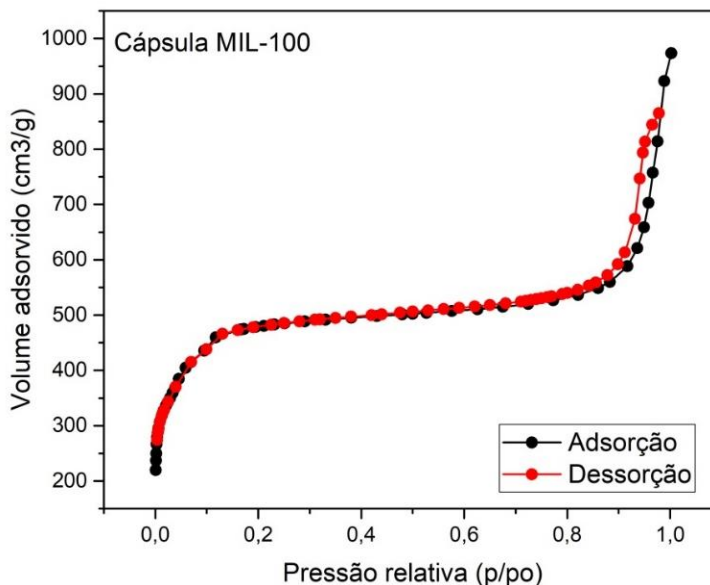
Foi realizada nessa etapa do trabalho a avaliação textural das cápsulas esféricas da MIL-100 cujos resultados estão compilados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Avaliação textural das cápsulas MIL-100.

	Área específica ( $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ )	Volume de poros ( $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ )
<b>Cápsula de MIL-100</b>	1613,03	0,848

A Figura 50 mostra as isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio das cápsulas desenvolvidas por *spray drying*.

**Figura 50:** Isotermas de adsorção- dessorção de nitrogênio das cápsulas de MIL-100 obtidas por *spray drying*.



A característica mesoporosa das nanopartículas MIL-100 presente também nas cápsulas de MOF foi confirmada pela técnica de adsorção de nitrogênio, cuja isoterma tipo IV está apresentada na Figura 50. A partir do resultado dessa técnica e usando o método de cálculo BET, determinou-se a área específica e o volume de poros (ver Tabela 5). Os valores obtidos são consistentes com os valores relatados anteriormente pela literatura, como área superficial de aproximadamente  $1330 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  para a MOF MIL-100<sup>19,55</sup>, confirmando assim a porosidade do material sintetizado. É importante ressaltar que a porosidade da cavidade do interior da cápsula não pode ser medida por essa técnica, assim sendo os resultados são apenas para os valores de poros existentes nas nanopartículas MIL-100 formadoras da casca da cápsula.

Materiais mesoporosos com alta área específica, como os obtidos nesse trabalho, estão sendo cada vez mais utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos. Essa classe de materiais é ainda mais interessante devido à presença de cavidades no interior da cápsula formada por *spray drying*. Por essa razão, esse material foi submetido aos ensaios *in vitro* de encapsulação e liberação do fármaco metotrexato e da proteína colagenase.

### V. 3. Conclusão do Capítulo V

Este capítulo mostrou o estudo do desenvolvimento de cápsulas de MIL-100 utilizando a técnica de *spray drying*. O material formado nessa etapa do trabalho mostrou ter tamanho médio de 800 nm, sendo possível ser aplicado como sistema de liberação de fármaco por algumas vias de administração como intratumoral, tópica e oral. O uso do *spray drying* para a produção de cápsulas de MOF apresenta muitas vantagens em relação aos métodos anteriormente relatados neste trabalho, como rápida síntese e ser escalonável. Dessa maneira, o resultado obtido mostra que esse é um material promissor para a produção em grande escala de superestruturas esféricas com cavidades ocas à partir de gotículas atomizadas com nanopartículas de MOF localizadas na sua superfície.

Além disso, as cápsulas obtidas por *spray drying* apresentam características que favorecem a incorporação de fármacos pelos poros intrínsecos das MOFs e ainda a encapsulação de uma proteína que em associação com o fármaco, pelas cavidades das cápsulas, que pode aumentar a eficiência do tratamento de escolha.

Desta maneira, as cápsulas MIL-100 foram escolhidas para dar continuidade ao trabalho com os ensaios *in vitro* que serão apresentados no Capítulo VI.

## Capítulo VI

---

Ensaio *in vitro* utilizando as cápsulas de MIL-100

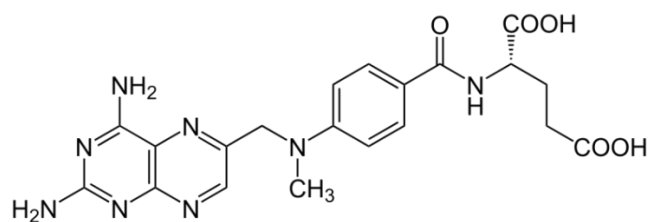
## VI. 1. Introdução do Capítulo VI

Neste capítulo, foram abordados os ensaios *in vitro* realizados com as cápsulas de MIL-100 obtidas por *spray drying*, considerando que o material formado é muito promissor para aplicação farmacêutica como carreador de fármaco e de uma molécula ativa maior, como uma proteína.

Nesta etapa do trabalho, foram avaliadas as eficiências de encapsulação do metotrexato e da colagenase nas cápsulas de MOF e, em seguida foram analisados os perfis de liberação. Também foi feita a caracterização físico-química da cápsula de MOF antes e depois da encapsulação para confirmar a integridade da MOF. Foi avaliada a atividade enzimática da colagenase, para analisar se o processo de *spray drying* não desnaturou a enzima, e se ela ainda mantém a sua atividade após a encapsulação. Por fim, foi avaliada a viabilidade celular dos sistemas desenvolvidos em uma linhagem celular saudável e em uma linhagem celular tumoral.

O metotrexato (ácido 2,4-diamino-N10-metilpteróil glutâmico - MTX), cuja estrutura molecular está representada na Figura 51, é um antimetabólito/ antifolato que é estruturalmente semelhante ao ácido fólico e age inibindo de maneira competitiva a enzima diidrofolato-redutase, resultando na depleção dos cofatores do tetraidrofolato, sendo assim considerado um quimioterápico específico para as populações celulares em fase de crescimento exponencial. É um fármaco muito utilizado para o tratamento de doenças autoimunes, como a artrite reumatóide, e para o tratamento do câncer colón-retal, de mama e de pele<sup>80-82</sup>.

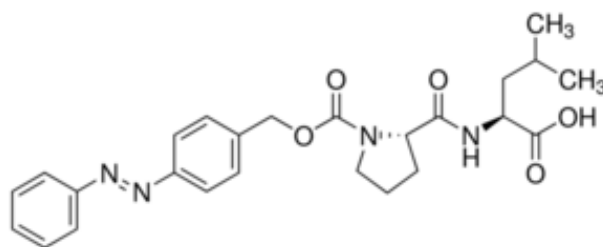
**Figura 51:** Estrutura molecular do metotrexato.



A utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos contendo MTX podem oferecer vantagens como a manutenção da concentração plasmática e proteção do fármaco contra processos de degradação<sup>83</sup>.

Por outro lado, há relatos na literatura de que a collagenase, cuja estrutura molecular está representada na Figura 52, apresenta um papel protetor na progressão de tumores e metástases, mesmo que os mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos ainda sejam desconhecidos<sup>50</sup>. Estudos mostram que embora o catabolismo do colágeno seja crítico para a homeostase tecidual, a atividade excessiva do colágeno também está relacionada a condições patológicas como metástase<sup>50,84</sup>.

**Figura 52:** Estrutura molecular da collagenase.



Desta maneira, o desenvolvimento de sistemas de carregamento de collagenase pode ser uma estratégia promissora para a incorporação desta classe de moléculas em associação com um fármaco antitumoral, como o metotrexato. A literatura tem demonstrado a eficácia dessa estratégia recente de associação de duas moléculas bioativas em um mesmo material, conhecida como *Dual-delivery* ou *bimodal deliver*<sup>85-87</sup>.

## **VI. 2. Avaliação da eficiência de encapsulação do metotrexato e da collagenase e ensaio de liberação *in vitro* das cápsulas de MOFs**

Em função das características porosas das nanopartículas MIL-100 e das cápsulas MIL-100, estes materiais foram submetidos ao ensaio de encapsulação e liberação do fármaco metotrexato e da enzima collagenase.

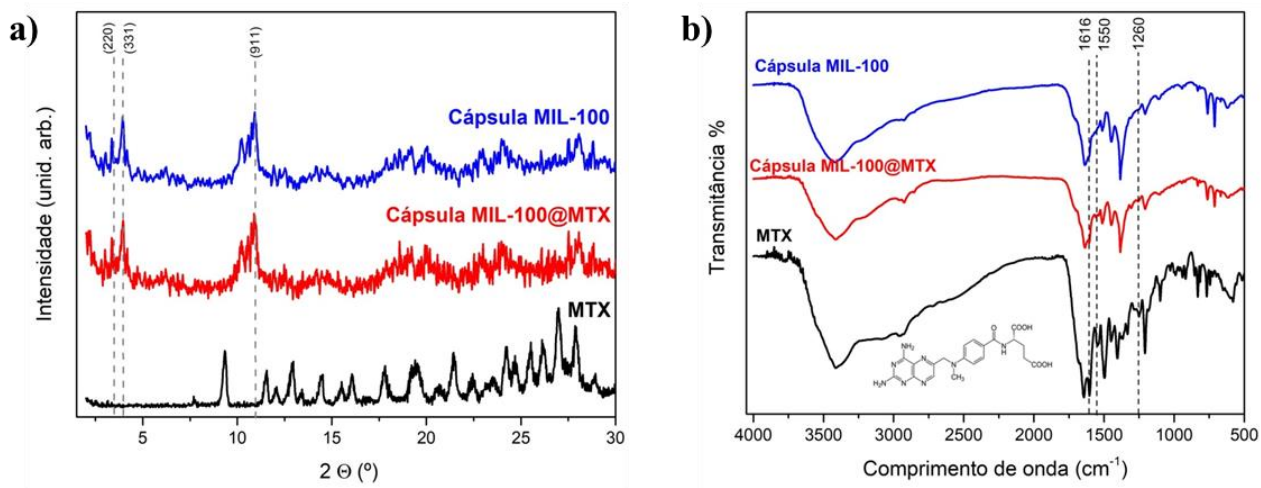
## VI. 2.1. Avaliação da eficiência de encapsulação e perfil de liberação do metotrexato nas cápsulas a base de MOFs

Os espectros de absorção do MTX (PubChem CID: 126941) em solução aquosa de HCl 0.1M e no meio tampão fosfato 0.1 M (pH 7,4) foram obtidos por espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis. A banda de absorção observada no espectro do fármaco em 305 nm foi selecionada para a realização das análises quantitativas do fármaco.

As nanopartículas MIL-100 e as cápsulas de MIL-100 foram submetidas a ensaios de encapsulação do fármaco metotrexato. Uma mistura contendo nanopartículas ou cápsulas de MOF MIL-100, o fármaco metotrexato e água permaneceu em agitação por 12 horas. Em seguida, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi analisado por espectroscopia no UV-vis, como previamente descrito.

A Figura 53 mostra os difratogramas DRX e os espectros vibracionais na região do infravermelho obtidos para o metotrexato e para a cápsula MIL-100, antes e após a encapsulação do fármaco.

**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).



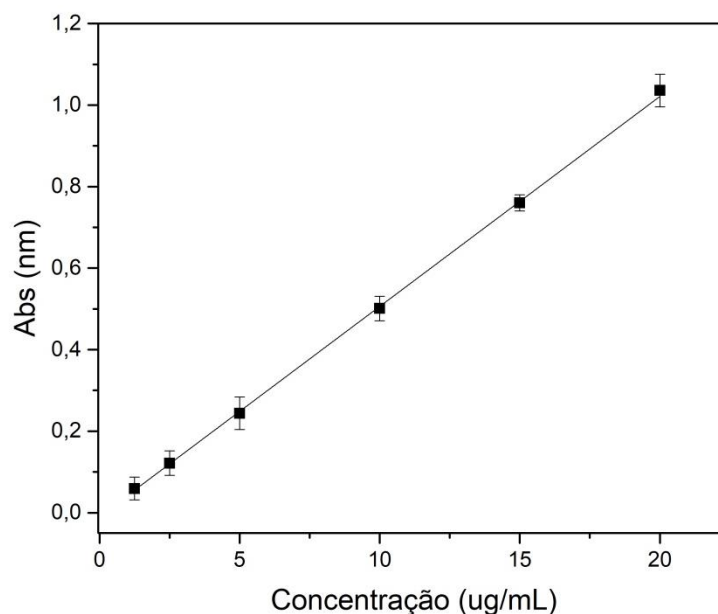
Pode ser observado que após a encapsulação do fármaco MTX, o padrão de difração de raios X das cápsulas de MIL-100 manteve-se inalterado nas regiões referentes aos planos (220),

(311) e (911) em relação à MOF antes do encapsulamento. Portanto, houve a manutenção da integridade estrutural mesmo após a oclusão do fármaco nos poros do material.

Os resultados de espectroscopia vibracional confirmam, em primeiro lugar, os dados de difração no sentido de que o material permaneceu estruturalmente intacto após a incorporação do fármaco. Além disso, ainda que com intensidades muito baixas possivelmente por estar presente em baixa concentração na matriz porosa, foi possível confirmar a presença do fármaco no material<sup>87</sup> pelo aparecimento das principais bandas características de alguns movimentos vibracionais importantes do metotrexato (ver linha vermelha na Figura 53) como aquelas observadas em 1616, 1550 e 1260  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas, respectivamente, aos modos de estiramento  $\nu\text{C}=\text{O}$ , deformação angular  $\delta\text{N-H}$  do grupo amídico e estiramento  $\nu\text{C-O}$  do grupo carboxílico das moléculas de MTX. Além disso, o espectro vibracional do composto também se mostra ligeiramente modificado na região correspondente às vibrações de estiramento N-H do fármaco ( $\sim 3080 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>88</sup>.

A quantidade de MTX presente nas MOFs foi determinada utilizando um método indireto a partir da curva analítica do metotrexato em água. A curva analítica está mostrada na Figura 54 e a partir dela foi obtida a equação da reta:  $y = 0,0519x - 0,0114$  e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi igual a 0,9997, indicando uma boa linearidade da curva.

**Figura 54:** Curva analítica do MTX em solução aquosa de HCl 0,1M.



A eficiência de encapsulação (EE%) corresponde à quantidade de MTX encapsulado em relação à quantidade total de fármaco inicialmente adicionada. A Tabela 6 resume os dados dos ensaios de encapsulação realizados nessa etapa do trabalho.

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

	<b>Nanopartículas MIL-100</b>	<b>Cápsulas MIL-100</b>
<b>EE (%)</b>	52,12% ± 1,3	83,43% ± 1,7

*\*média de três determinações*

Os resultados de 52,12% e 83,43% de eficiência de encapsulação do metotrexato nas nanopartículas e nas cápsulas de MIL-100, respectivamente, superam alguns dados relatados por outros grupos de pesquisa que estudaram a eficiência de encapsulação do metotrexato em outros nanocarreadores<sup>89,90</sup>. Entre os poucos grupos de pesquisa que estudaram a encapsulação de fármacos em cápsulas de MOFs, nenhum avaliou a eficiência de encapsulação em cápsulas de MIL-100 do fármaco metotrexato. Todavia, é possível correlacionar os resultados encontrados nesse trabalho com os relatos de sistemas semelhantes encontrados na literatura. Tang e colaboradores

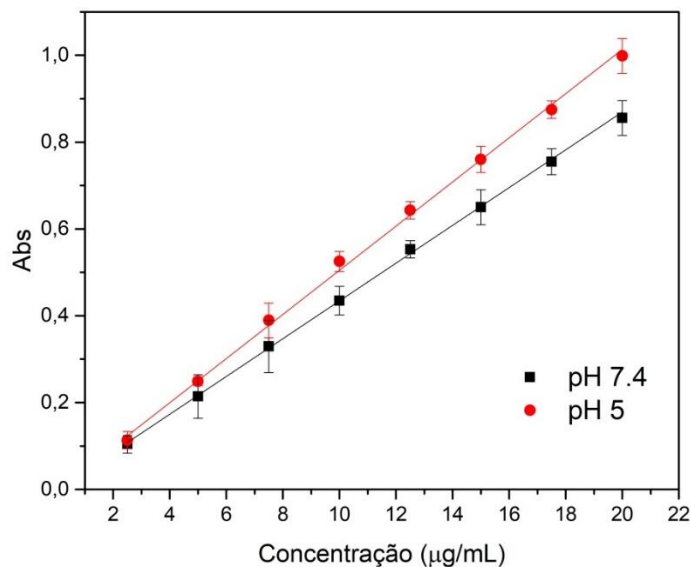
desenvolveram cápsulas poliméricas a partir de moldes à base da MOF ZIF-8 e obtiveram a eficiência de encapsulação de 87% do fármaco doxorubicina<sup>47</sup>, o que corrobora com o resultado obtido nesse trabalho com cápsulas de MIL-100. Além disso, o aumento da eficiência de encapsulação nas cápsulas de MIL-100 em comparação com as nanopartículas dessa MOF tem relação com a presença de cavidades no interior da cápsula, além da porosidade intrínseca das nanopartículas.

A solubilidade do fármaco é um parâmetro importante para o ensaio de liberação, sendo sempre necessário trabalhar sob condições *sink*, que é definida como sendo o volume de meio no mínimo três vezes superior ao necessário para obter uma saturação do fármaco em solução<sup>91</sup>.

O ensaio de liberação *in vitro* do fármaco está relacionado ao processo pelo qual o fármaco é liberado da sua matriz e se torna disponível em meios fisiológicos, sendo uma ferramenta inicial e muito importante para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Segundo Rui Manadas e colaboradores, esses ensaios permitem avaliar de forma inicial os perfis de liberação para futuras ações que visem otimizar a eficácia e a segurança do sistema e correlacionar o perfil *in vitro* e *in vivo*, ou seja, estabelecer parâmetros na tentativa de prever o comportamento *in vivo* do sistema<sup>92</sup>.

O estudo de liberação foi feito através da determinação da quantidade de fármaco liberada do material estudado que foi relacionada proporcionalmente com a quantidade de fármaco presente no meio receptor, calculada a partir da curva analítica do metotrexato no meio fisiológico (ver Figura 55). Foram realizados os ensaios em pH 7,4 simulando o pH dos tecidos normais, e em pH 5,0 simulando o meio ácido do sítio intersticial das células tumorais<sup>93</sup>.

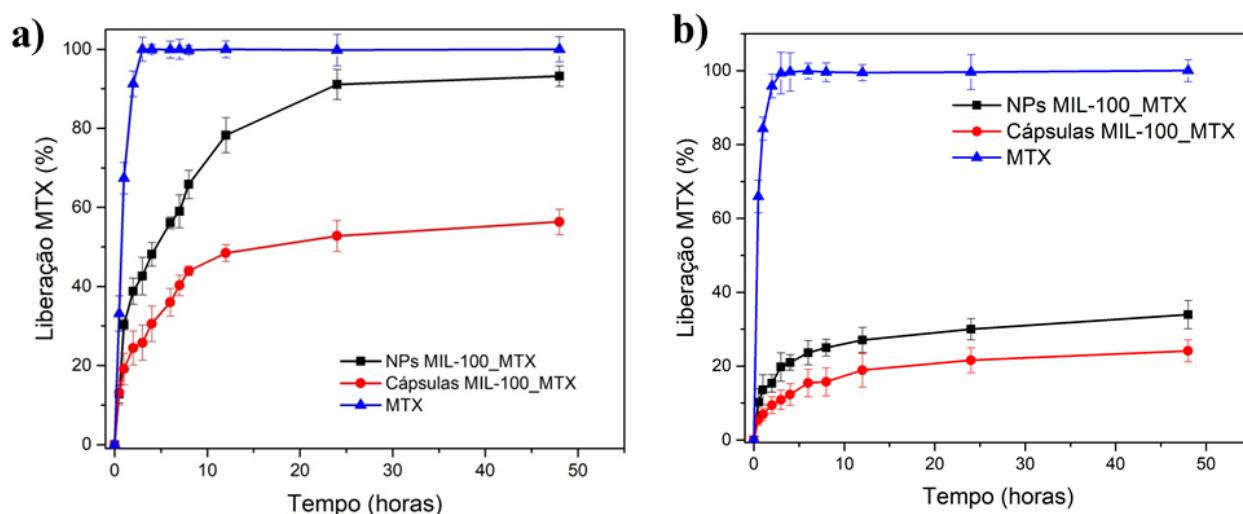
**Figura 55:** Curva analítica do MTX em tampão fosfato pH 7,4 e pH 5,0.



A partir da curva analítica do metotrexato, a equação da reta da curva obtida em PBS pH 7,4 foi:  $y = 0,0439x - 0,0325$  e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi igual a 0,9971. A equação da reta da curva obtida em PBS pH 5,0 foi:  $y = 0,0506x + 0,0026$  e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi igual a 0,9945, indicando linearidade das curvas.

Os estudos de liberação foram realizados para as nanopartículas MIL-100 e para as cápsulas MIL-100, comparadas com o fármaco livre. Os perfis de liberação estão apresentados na Figura 56.

**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).



Como esperado, os perfis de liberação *in vitro* do MTX a partir das nanopartículas MIL-100 e das cápsulas de MIL-100 exibiram taxas de liberação modificadas do fármaco, quando comparada com o fármaco livre. Os resultados apresentados na Figura 56 mostraram que as nanopartículas MIL-100 liberam o MTX de maneira mais rápida quando comparada às cápsulas de MIL-100. A maior taxa de liberação das nanopartículas de MIL-100 em comparação com as cápsulas pode ser atribuído ao tamanho das partículas, uma vez que o maior diâmetro das cápsulas ocasiona a diminuição da área superficial e consequentemente a diminuição da velocidade de liberação<sup>94</sup>. Além disso, a estrutura e a possível presença de cavidades ocas no interior das cápsulas podem dificultar a difusão do fármaco para fora da cápsula, prolongando assim a sua liberação.

No ensaio realizado em pH 7,4, observa-se que no início do experimento houve liberação mais rápida para os dois sistemas estudados, sendo cerca de 30% e 47% do fármaco liberado das cápsulas de MIL-100 e das nanopartículas MIL-100, respectivamente, nas primeiras 4 horas. Essa liberação rápida inicial pode ser atribuída à presença de fármacos na superfície das partículas. Entre 6 - 12 h houve um aumento de 13% e 22% da liberação das cápsulas de MIL-100 e das nanopartículas, respectivamente. A redução da taxa de liberação do fármaco durante esse período pode ser atribuída à estrutura do material, formado por redes de ligações entre o metal e o ligante orgânico. Após 24 h do início do ensaio de liberação é observada uma tendência de estabilização da liberação do MTX. As quantidades máximas de MTX liberado das nanopartículas MIL-100 foi

de ~ 93% e das cápsulas foi próxima a 50% depois de 48 horas de experimento. Desta maneira, não houve a liberação completa do fármaco da cápsula durante o período do teste, evidenciando a retenção de parte do fármaco na estrutura do material.

Os perfis de liberação do MTX em meio pH 5,0 mostraram que houve uma menor taxa de liberação de MTX quando comparada com o meio em pH 7,4. Nas primeiras 4 horas do ensaio houve a liberação de 12,3% e 21% do fármaco das cápsulas de MIL-100 e das nanopartículas, respectivamente. A máxima de MTX liberado após 48 h de experimento foi de cerca de 24 e 34% das cápsulas e nanopartículas MIL-100, respectivamente. Portanto, a quantidade de fármaco liberada em meio ácido foi aproximadamente duas vezes menor do que a quantidade de fármaco liberada em meio pH 7,4. Essa diferença nos perfis de liberação pode ser explicada pela natureza ácida (pH 3,8) da suspensão de MIL-100, e desta maneira o sistema apresenta maior estabilidade no meio ácido<sup>66</sup>.

A interpretação quantitativa dos valores obtidos no ensaio de liberação *in vitro* é facilitada pela utilização de equações que traduzem matematicamente o perfil de liberação em função de alguns parâmetros relacionados com a forma farmacêutica. O tratamento dos dados de liberação através de modelos matemáticos pode fornecer informações importantes sobre os processos físico-químicos envolvidos durante o processo de liberação do fármaco na matriz estudada. Entre os fatores que podem influenciar a cinética de liberação os mais importantes são o tipo de fármaco, a cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e a quantidade incorporada na matriz<sup>95,96</sup>.

Os perfis cinéticos de liberação do fármaco MTX foram tratados com os modelos matemáticos Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Hixson-crowell, Primeira ordem e Weibull, com o auxílio do *software* Sigma Plot 10. Os valores da cinética de liberação estão apresentados nas Tabelas 7 e Tabela 8.

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

Modelos matemáticos	Nanopartículas MIL-100		Cápsulas MIL-100	
	r <sup>2</sup> ajustado	Expoente de liberação	r <sup>2</sup> ajustado	Expoente de liberação
Korsmeyer-Peppas	0,9909	η = 0,4944	0,9989	η = 0,5468
Higuchi	0,8498		0,7076	
Hixson-crowell	0,8065		0,7203	
Primeira ordem	0,8838		0,7021	
Weibull	0,9838	b = 0,7460	0,9644	b = 0,6602

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

Modelos matemáticos	Nanopartículas MIL-100		Cápsulas MIL-100	
	r <sup>2</sup> ajustado	Expoente de liberação	r <sup>2</sup> ajustado	Expoente de liberação
Korsmeyer-Peppas	0,9998	η = 0,4729	0,9979	η = 0,4967
Higuchi	0,9353		0,8666	
Hixson-crowell	0,6920		0,6920	
Primeira ordem	0,6854		0,6854	
Weibull	0,9710	b = 0,6870	0,9885	b = 0,7412

A escolha do melhor modelo matemático pode ser baseada no valor de coeficiente de correlação r<sup>2</sup> mais próximo a 1. De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 7 e 8, observa-se que a liberação de MTX da MOF e da cápsula em ambos valores de pH apresentaram maior correlação com o modelo de Korsmeyer/ Peppas.

O modelo de Korsmeyer- Peppas relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo, como mostra a Equação 2<sup>95,97</sup>.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t n$$

Equação 2

onde  $Mt$  representa a quantidade absoluta de fármaco liberada por tempo  $t$ ,  $M^\infty$  é a quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito, que corresponde a quantidade inicial de fármaco,  $K$  é a constante cinética e  $n$  é o expoente de liberação que caracteriza o mecanismo de liberação.

Peppas utilizou o valor de  $\eta$  para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, sendo que em estruturas esféricas, quando  $\eta < 0,45$  o mecanismo de transporte do fármaco é difusão quase Fickiana, quando  $\eta = 0,5$  é caracterizado por difusão Fickiana,  $0,45 < \eta < 0,89$  corresponde a transporte anômalo ou não fickiano,  $\eta = 0,89$  é transporte caso II e  $\eta > 0,89$  se refere ao transporte supercaso II<sup>98</sup>.

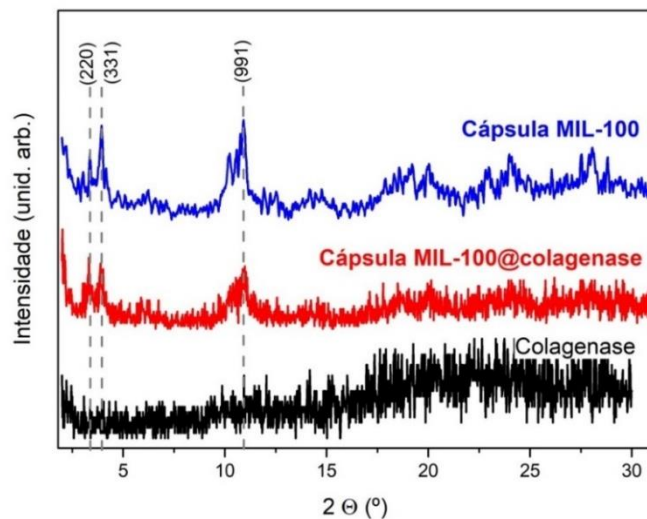
Os valores de  $\eta$  obtidos representam casos de difusão anômala não Fickiana, em que a liberação ocorre por mais de um processo, que pode ser tanto por mecanismo de difusão quanto por erosão. Dessa maneira, os resultados apresentados nos modelos cinéticos sugerem que, apesar das duas curvas apresentarem diferentes tempos de liberação, as nanopartículas e as cápsulas de MIL-100 liberaram o fármaco por difusão, o que pode ser justificado principalmente pela porosidade intrínseca da MOF e ainda das cavidades presentes na cápsula, e por erosão que ocorre com a degradação da MOF em PBS principalmente depois de 12 h de ensaio<sup>66</sup>. Além disso, a presença de partículas e das cavidades no interior das cápsulas, pode interferir na penetração do meio na matriz e conseqüentemente na difusão do fármaco do interior do sistema até chegar na superfície do material, o que também altera o perfil de liberação do MTX e resulta no prolongamento da liberação.

## **VI. 2.2. Avaliação da eficiência de encapsulação e perfil de liberação da colagenase nas cápsulas a base de MOFs**

Em função da presença de cavidades ocas no interior das cápsulas, estes materiais foram submetidos ao ensaio de encapsulação da proteína colagenase durante a sua formação pela técnica de *spray drying*.

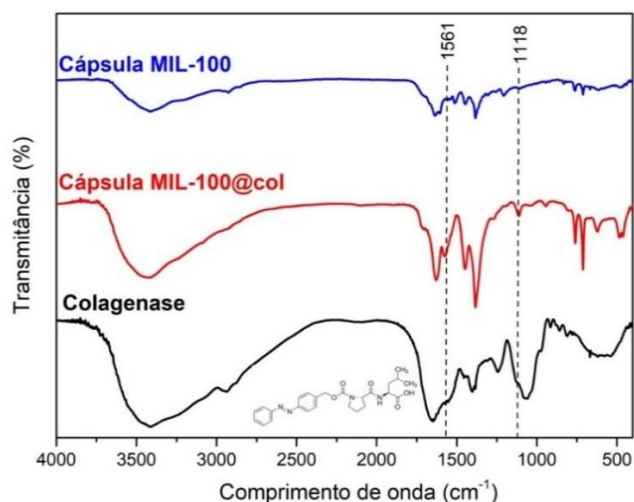
A Figura 57 mostra que após a encapsulação da colagenase, o padrão de difração de raios X das cápsulas manteve-se inalterado nas regiões referentes aos planos (220), (311) e (911) em relação à MOF antes do encapsulamento da enzima. Esse resultado revela, portanto que a integridade estrutural da MIL-100(Fe) foi mantida.

**Figura 57:** Padrão de difração de raios X de pó da cápsula MIL-100, cápsula MIL-100\_colagenase e colagenase livre.



A Figura 58 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho da cápsula MIL-100, cápsula MIL-100\_colagenase e colagenase livre.

**Figura 58:** Espectros no infravermelho para cápsula MIL-100, cápsula MIL-100\_colagenase e colagenase livre.

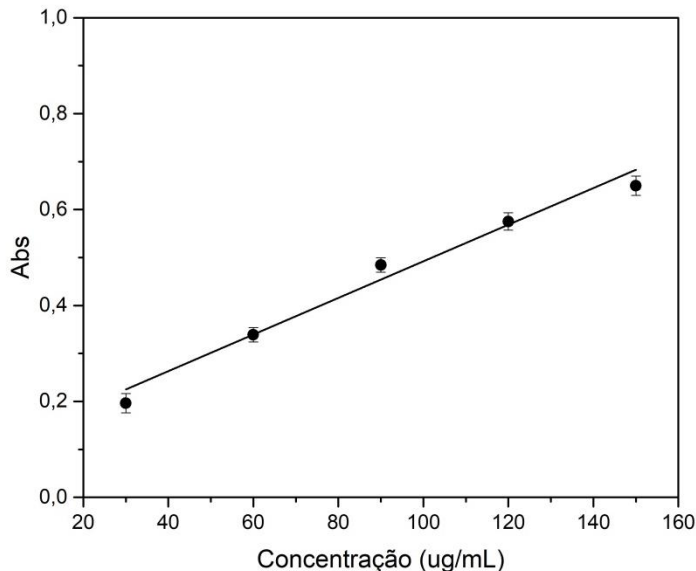


O espectro de transmitância na região do infravermelho do material encapsulado (linha vermelha na Figura 58) mostrou, como esperado, não apenas as bandas associadas aos modos vibracionais da MIL-100(Fe), como também a presença de bandas características da enzima como

aquelas correspondentes à amida II ( $1561\text{ cm}^{-1}$ ) e ao modo de estiramento da ligação C-O,  $\nu\text{C-O}$  ( $1118\text{ cm}^{-1}$ )<sup>84,99</sup>. Esses resultados confirmam a presença da colagenase nas cápsulas da MIL-100, mesmo após as etapas de lavagem.

Para a quantificação da encapsulação da colagenase na cápsula, primeiramente foi realizada uma curva analítica da enzima e para isso, foi mensurada a sua absorvância no intervalo de 200-400nm ( $\lambda_{\text{máx}} = 258\text{ nm}$ ) usando soluções aquosas nas concentrações de 30, 60, 90, 120 e 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A curva analítica da enzima está mostrada na Figura 60 e à partir dela foi obtida a equação da reta  $y = 0,0038x + 0,0994$  e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,9902.

**Figura 59:** Curva analítica da colagenase em água obtida por espectroscopia no UV-Vis em água.



A quantidade de colagenase presente nas cápsulas de MIL-100 foi determinada utilizando o método indireto a partir da curva analítica. A Tabela 9 resume os dados do ensaio de encapsulação realizados nessa etapa do trabalho.

**Tabela 9:** Dados obtidos do ensaio de encapsulação da collagenase nas cápsulas de MIL-100.

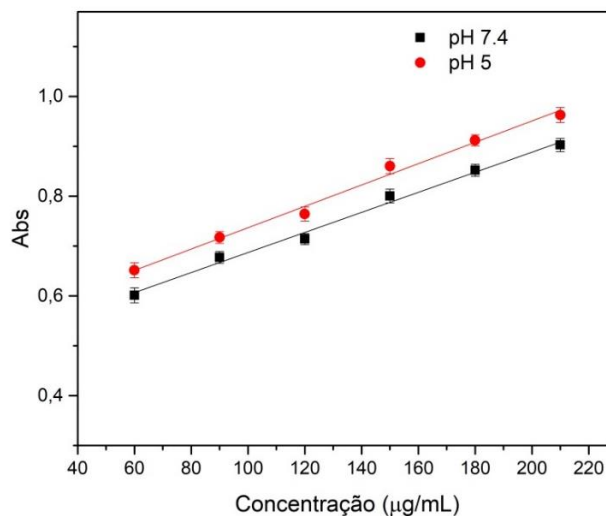
	<b>Cápsulas MIL-100</b>
<b>Eficiência de Encapsulação (%)</b>	91,74% ± 0,98

*\*média de três determinações*

A eficiência de encapsulação da collagenase nas cápsulas de MIL-100 foi de 91,74%, o que mostra a grande capacidade dessas estruturas porosas em encapsular moléculas grandes como as de proteínas. Como já relatado na literatura<sup>58</sup>, a técnica de *spray drying* tem sido utilizada para o encapsulamento de fármacos e moléculas bioativas em materiais capazes de protegê-los de processos e condições ambientais adversas, liberar de forma controlada, bem como associar com outros fármacos. Neste nosso trabalho, a observação então de uma alta eficiência de encapsulação da collagenase no interior das cápsulas formadas pela MIL-100(Fe) já contendo em seus poros o fármaco anticancerígeno metotrexato demonstra a formação de um sistema muito promissor para o tratamento de alguns tipos de câncer.

O estudo de liberação foi feito através da determinação da quantidade da enzima liberada do material estudado que foi relacionada proporcionalmente com a quantidade de enzima no meio receptor, calculada a partir da curva analítica da collagenase no meio receptor, obtida por UV-vis, como mostra a Figura 60. Assim como o estudo de liberação do fármaco MTX, o ensaio com a collagenase foi feito em pH 7,4 simulando o pH dos tecidos normais, e em pH 5,0 simulando o meio ácido do sítio intersticial das células tumorais<sup>93</sup>.

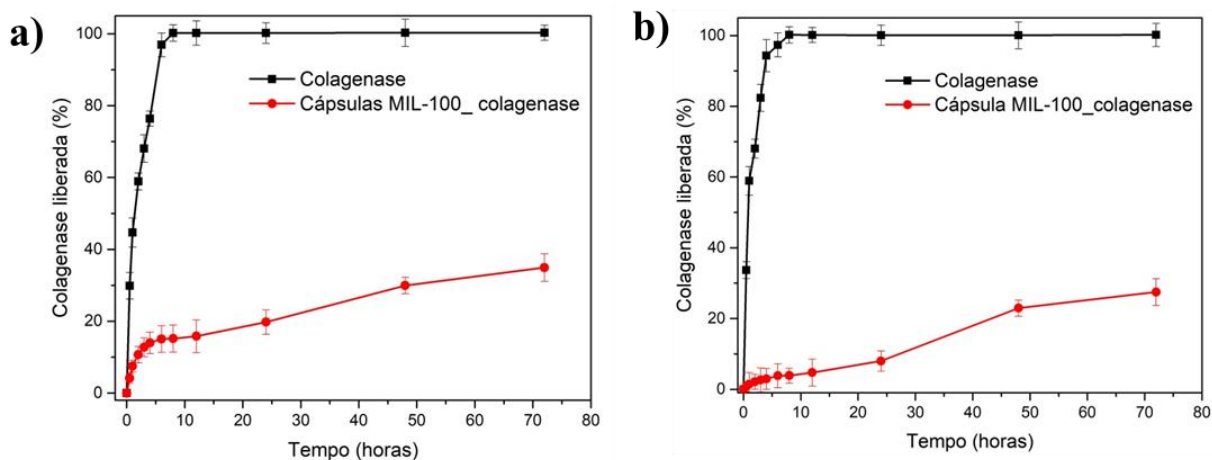
**Figura 60:** Curva analítica da colagenase em PBS obtida por espectroscopia no UV-Vis.



A partir das curvas analíticas da colagenase, foram obtidas as equações das retas das curvas que apresentaram o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,9927 e 0,9914, respectivamente para o pH menos e mais ácido. A equação da reta em pH 7,4 foi  $y = 0,002x + 0,4858$  e em pH 5,0 foi  $y = 0,0021x + 0,5237$ .

Os estudos de liberação foram realizados para as nanopartículas, cápsulas MIL-100 e a enzima livre, como está apresentado na Figura 61.

**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).



No estudo realizado em meio pH 7,4, observa-se que no início do experimento houve uma liberação mais rápida, sendo que cerca de 15,4% da enzima foi liberada das cápsulas de MIL-100 nas primeiras 8 horas. Essa liberação rápida inicial pode ser atribuída à presença da enzima em cavidades próximas a superfície. Entre 8 h e 12 h ocorreu uma redução da taxa de liberação da enzima, que pode ser atribuída a estrutura do material, de maneira que a enzima pode estar localizada nas cavidades internas das cápsulas. Entre 12h e o final do ensaio, em 72 h, é possível observar um aumento de 18% da liberação da enzima, que pode ser justificado pela difusão da enzima pelas cavidades das cápsulas e também à degradação da MOF<sup>66</sup>.

O perfil de liberação da colagenase em pH 5,0 mostrou redução da taxa de liberação da colagenase quando comparada com o meio em pH 7,4. Nas primeiras 8 horas do ensaio houve a liberação de apenas 3,8% da enzima. Após 24 h, há um aumento da liberação da colagenase, mas a quantidade máxima liberada foi de apenas 26,9%, ou seja, uma redução de 8% da enzima liberada comparando com o valor obtido em pH 7,4. Assim, a diferença nos perfis de liberação pode ser explicado pela natureza ácida da suspensão natural da matriz MIL-100, e desta maneira o sistema apresenta maior estabilidade no meio ácido<sup>66</sup>, liberando uma pequena quantidade da colagenase, que deve se encontrar no interior da cápsula de MIL-100.

Esses resultados permitiram também verificar uma maior retenção da enzima, em comparação como fármaco MTX para a mesma matriz e nas mesmas condições, o que pode ser justificado pela sua localização no interior da cápsula, e também por ser uma molécula maior, a colagenase não se difunde pelos poros da MOF e, desta maneira, para ser liberada é necessário que ocorra a difusão pelas cavidades internas e também a degradação da MOF.

Os perfis cinéticos de liberação da colagenase foram tratados com os modelos matemáticos Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Hixson-crowell, Primeira ordem e Weibull, com o auxílio do software Sigma Plot 10. Os valores da cinética de liberação estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10:** Cinética de liberação da colagenase das cápsulas de MIL-100 em pH 7,4 e pH 5,0.

Modelos matemáticos	pH 7,4		pH 5,0	
	r <sup>2</sup> ajustado	Expoente de liberação	r <sup>2</sup> ajustado	Expoente de liberação
Korsmeyer-Peppas	0,9927	$\eta = 0,8358$	0,9968	$\eta = 0,4626$
Higuchi	0,9250		0,9257	
Hixson-crowell	0,3333		0,9862	
Primeira ordem	0,4052		0,9866	
Weibull	0,9842	$b = 0,4699$	0,9961	$b = 0,7241$

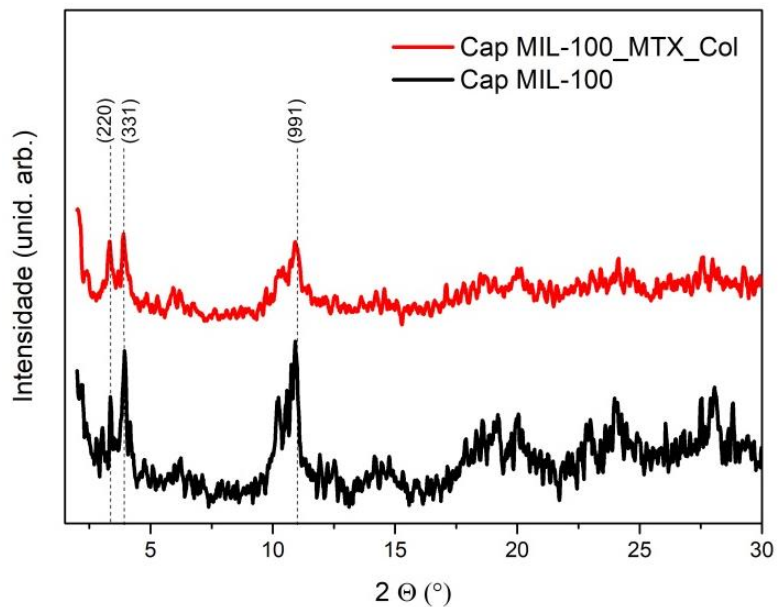
De acordo com os dados apresentados na Tabela 10, observa-se que as liberações da enzima do interior da cápsula de MIL-100 em ambos valores de pH apresentaram maior correlação com o modelo de Korsmeyer/ Peppas. Os valores de  $\eta$  entre 0,45 e 0,89 obtidos representam casos de transporte anômalo ou não fickiano, em que a liberação ocorre por mais de um processo. Dessa maneira é possível afirmar que a liberação da colagenase deve ocorrer por difusão entre as cavidades internas das cápsulas e também por erosão, conforme as nanopartículas MIL-100 se degradam no meio.

### **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**

A etapa final da pesquisa culminou, então, na possibilidade de utilizar as cápsulas metalo-orgânicas como sistemas de dupla liberação. Para isso, foram realizados inicialmente ensaios de encapsulação do fármaco MTX e da enzima colagenase nas cápsulas da MIL-100 e caracterização para avaliar a estrutura do material obtido após a incorporação das duas moléculas ativas.

A Figura 62 apresenta os difratogramas de raios X das cápsulas de MIL-100 antes e após a oclusão das moléculas bioativas.

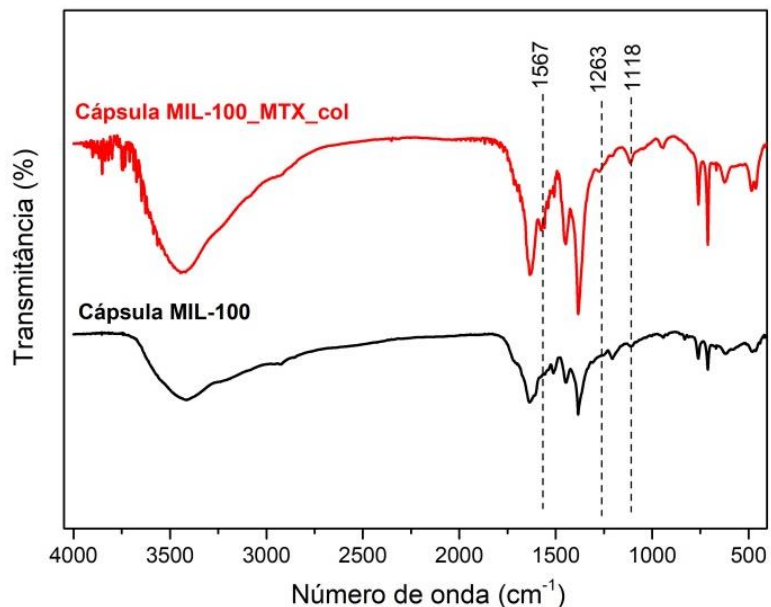
**Figura 62:** Padrão de difração de raios X da cápsula MIL-100 antes e após a impregnação do fármaco MTX e da colagenase.



Como pode ser observado na figura, o padrão de difração de raios X das cápsulas MIL-100 com MTX e colagenase manteve-se inalterado nas regiões referentes aos planos (220), (311) e (911) em relação à superestrutura baseada nessa bioMOF de ferro antes do encapsulamento. Esse resultado demonstra a manutenção da integridade estrutural do material após os processos de oclusão do fármaco e da enzima.

A Figura 63 mostra os espectros na região do infravermelho da cápsula MIL-100 antes e após a encapsulação do metotrexato e da colagenase.

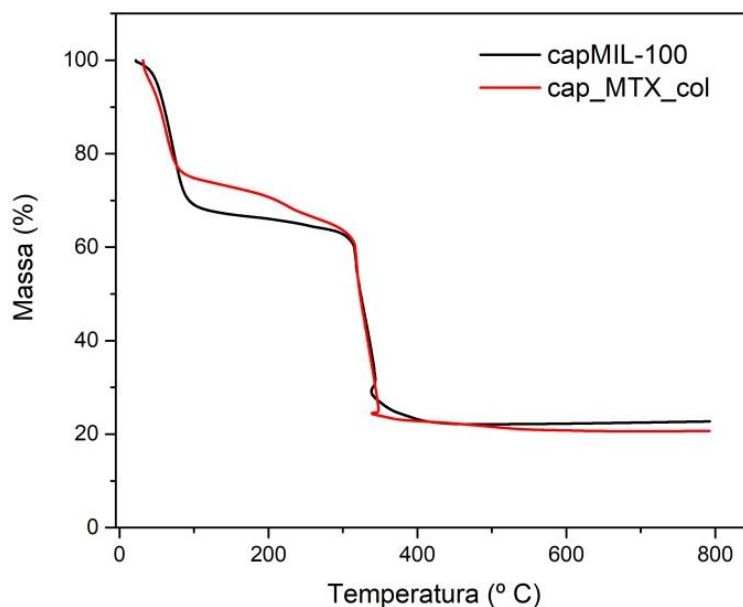
**Figura 63:** Espectros vibracionais no infravermelho da cápsula MIL-100 (em preto) e do material obtido após a oclusão do metotrexato e da colagenase (em vermelho).



Os resultados da espectroscopia vibracional corroboram com aqueles obtidos por difração de raios X no sentido de que o material se mantém intacto após o processo de encapsulação das moléculas bioativas. Além disso, como mostra a Figura 63 (linha vermelha), foi também possível detectar a presença de algumas bandas de baixa intensidade associadas à presença do fármaco e da enzima. A banda observada em  $1567\text{ cm}^{-1}$ , por exemplo, é muito característica de espectros vibracionais de peptídeos, podendo ser atribuída ao modo vibracional amida II (majoritariamente constituído pela deformação angular  $\delta\text{N-H}$  do grupo amida) da enzima, cuja presença no material também pode ser verificada pela banda de estiramento<sup>102</sup> C-O ( $1118\text{ cm}^{-1}$ ). Quanto ao fármaco metotrexato, embora uma das suas principais bandas ( $\delta\text{N-H}$ ) ocorra exatamente na mesma região que aquela referente à amida II ( $1560\text{ cm}^{-1}$ ), sua presença pode estar associada à banda<sup>87</sup> observada em  $1263\text{ cm}^{-1}$ , característica de modos vibracionais relacionados ao estiramento da ligação C-O do grupo carboxílico do MTX. Esses resultados sugerem, então, a presença de ambas moléculas nas cavidades do material.

A Figura 64 mostra as curvas termogravimétricas da cápsula MIL-100, antes e após a encapsulação das moléculas bioativas.

**Figura 64:** Curvas TG das cápsulas MIL-100 e das cápsulas MIL-100 contendo MTX e collagenase.



A curva termogravimétrica das cápsulas ocas (linha preta) revela que a sua decomposição térmica ocorre em três etapas. A primeira, entre 30-80 °C, está relacionada à liberação de moléculas de água oclusas nos poros do material. No intervalo de 80-298 °C, ocorre a eliminação de moléculas de água coordenadas nos clusters triméricos de ferro e entre ~ 300-350 ° é observada a decomposição do ligante com formação de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  como resíduo final. Conforme esperado, a cápsula de MIL-100 contendo MTX e collagenase exibe uma perda de massa menor do que a cápsula de MIL-100 até 300°C. Uma primeira perda de massa pode ser observada da temperatura ambiente até ~ 80 °C correspondente à liberação de moléculas de água não coordenada, enquanto moléculas desse solvente em interação mais forte com a estrutura são eliminadas na faixa de temperatura de 80 - 298 ° C. Pode-se notar a menor perda de massa de água na cápsula MIL-100 contendo MTX e collagenase em comparação com a cápsula MIL-100 livre, que pode ser explicado pela ocupação dos poros e cavidades com o fármaco e a enzima. Finalmente, o sólido degrada a temperaturas mais altas (> 298 ° C) com a decomposição dos grupos benzenotricarboxilato. Faz-se também muito importante nesse momento destacar que as decomposições térmicas das moléculas livres de MTX e da collagenase ocorrem, respectivamente, em ~ 310 e 325 °C<sup>88,100</sup>, o que permite concluir que as moléculas bioativas estejam se degradando aproximadamente na

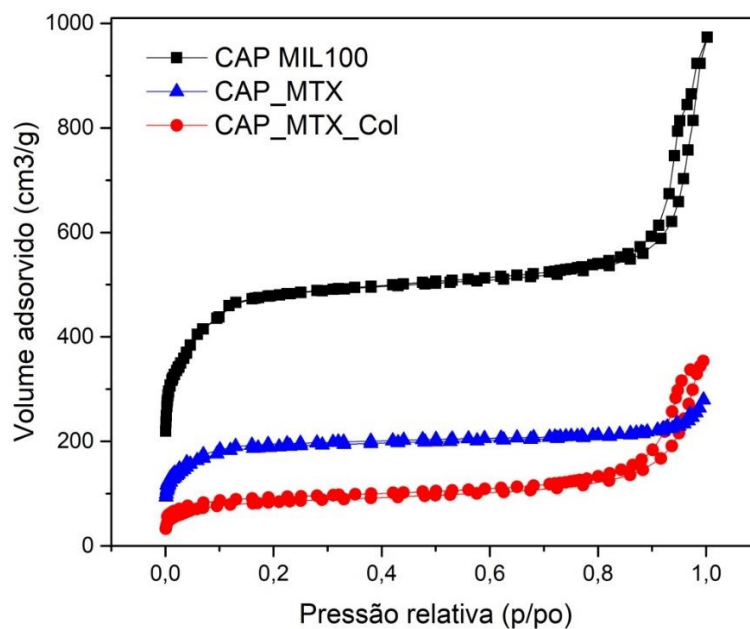
mesma faixa de temperatura em que a matriz porosa se decompõe termicamente. Os resultados obtidos dos experimentos de avaliação textural dos principais materiais obtidos nesse trabalho após a incorporação do metotrexato e da colagenase estão compilados na Tabela 11.

**Tabela 11:** Propriedades texturais das cápsulas, antes e após a encapsulação do fármaco MTX e de ambas moléculas bioativas, MTX e colagenase.

	Área específica (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Volume de poros (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )
<b>Cápsula de MIL-100</b>	1613,03	0,85
<b>Cápsula de MIL-100 com MTX</b>	629,78	0,32
<b>Cápsula de MIL-100 com MTX e Col</b>	285,60	0,21

A Figura 65 mostra as isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio obtidas a 77K das cápsulas desenvolvidas por *spray drying* antes e após as incorporações do MTX e da colagenase.

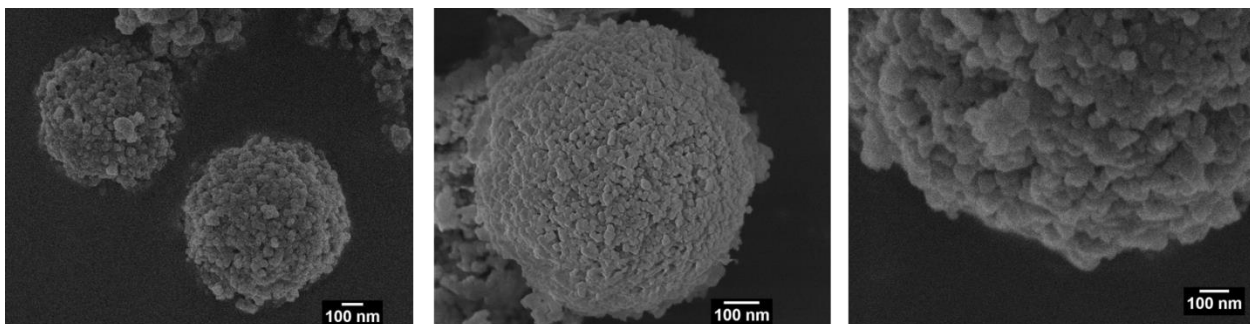
**Figura 65:** Isotermas de adsorção-dessorção das cápsulas de MIL-100 vazias, das cápsulas contendo MTX e das cápsulas contendo MTX e colagenase.



A partir dos resultados obtidos desses experimentos e usando o método de cálculo BET, determinou-se a área específica e o volume de poros para os três materiais (ver Tabela 11). De um modo geral, as isotermas apresentaram um patamar em elevados valores de pressão relativa e laços de histerese, sendo classificadas como isotermas do Tipo IV, características de materiais mesoporosos<sup>101</sup>. A Figura 65 também revela que após a encapsulação do fármaco anticancerígeno metotrexato, houve uma diminuição na área específica do respectivo material. Esse fato pode ser justificado pela ocupação dos poros pelo fármaco após a sua incorporação. Após a incorporação do fármaco e da colagenase houve uma diminuição ainda maior da área específica e do volume de poros. Esses resultados indubitavelmente estão de acordo com as nossas expectativas no sentido de que a incorporação do fármaco e da enzima levaria de fato a uma diminuição considerável da porosidade da cápsula MIL-100.

A Figura 66 mostra as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das cápsulas após a encapsulação do metotrexato e da colagenase.

**Figura 66:** Imagens MEV das cápsulas MIL-100\_MTX\_colagenase.

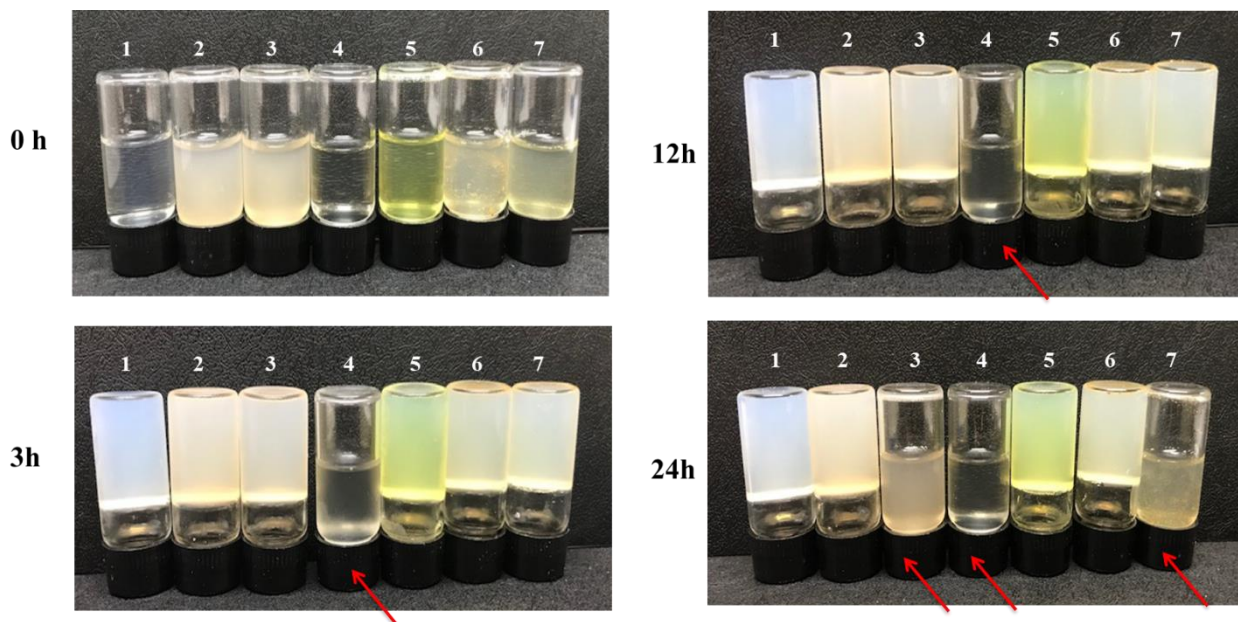


Através dessas imagens foi possível verificar que a encapsulação do metotrexato e da colagenase nas cápsulas de MIL-100 não alterou a estrutura, tamanho e morfologia das cápsulas formadas por *spray drying*.

#### **VI. 4. Avaliação da atividade enzimática da colagenase liberada das cápsulas de MIL-100**

A atividade enzimática da colagenase tipo I ocluída no material MIL-100\_colagenase foi avaliada através da degradação da gelatina cujo procedimento é descrito a seguir. A gelatina pura (30 mg/mL) foi dissolvida em água morna e dividida em 7 grupos sendo eles: a gelatina pura, co-cultivada com a colagenase livre, MTX livre, cápsula MIL-100, cápsula MIL-100\_MTX, cápsula MIL-100\_colagenase e cápsula MIL-100\_MTX\_colagenase. Em intervalos de tempo predeterminados, cada amostra foi então armazenada a 4 °C por 30 min antes de a imagem ser registrada por uma câmera digital. A Figura 67 mostra as fotografias da gelatina co-cultivada com cada amostra em diversos intervalos de tempo.

**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.



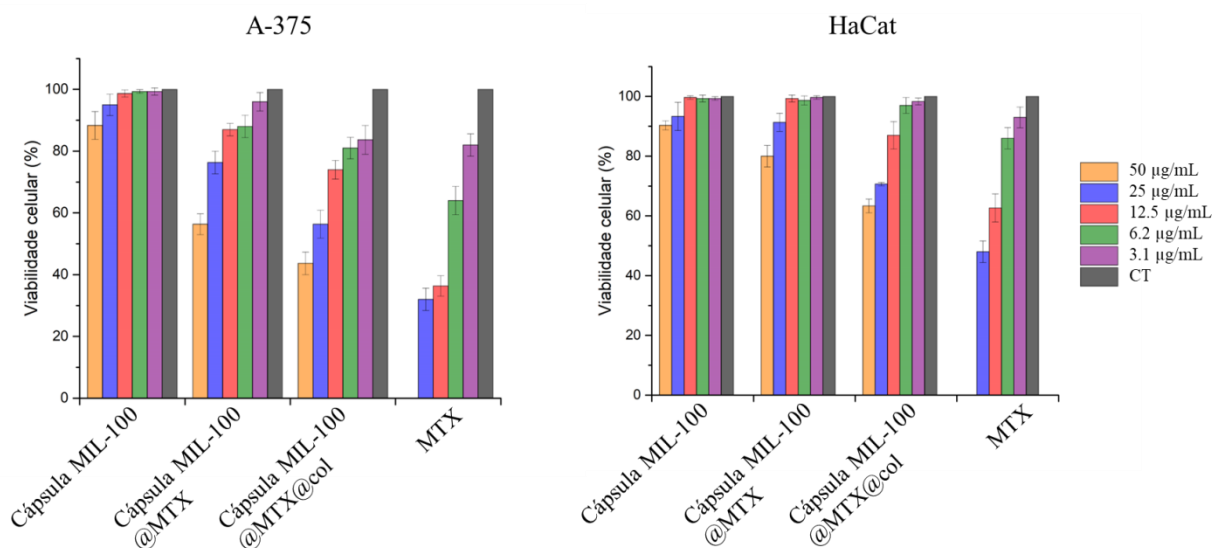
Os resultados apresentados na Figura 68 mostram que a gelatina pura se re-solidificou em hidrogéis a 4°C. Além disso, a gelatina também pode formar hidrogéis após a co-cultivação com as cápsulas MIL-100 e com o fármaco MTX, o que indica que essas amostras não degradaram a gelatina. Todavia, a gelatina quando em presença da colagenase livre permanece em estado líquido após 3 horas, sugerindo a degradação da gelatina pela ação da colagenase. O que é importante destacar com esses resultados é que, como esperado, os sistemas contendo as superestruturas metalorgânicas encapsuladas com a enzima, isto é, cápsula MIL-100\_colagenase (amostra 3) e cápsula MIL-100\_MTX\_colagenase (amostra 7) voltaram ao estado líquido entre 12 e 24 h de experimento, o que sugere que a gelatina foi degradada após maior liberação da colagenase para o meio e que a mesma permanece com sua atividade enzimática após carregamento da cápsula<sup>59</sup>. Esse resultado corrobora com o perfil de liberação *in vitro* apresentado no item VI. 2.2 dessa Tese, que mostra que após 12 h de ensaio, houve uma liberação maior da colagenase e isso está diretamente relacionado com a degradação da gelatina.

## VI. 5. Avaliação da viabilidade celular das cápsulas de MIL-100

A viabilidade celular das cápsulas de MIL-100 foi avaliada na linhagem celular saudável, a HaCat (queratinócito humano) e na linhagem celular tumoral, a A-375 (melanoma humano), sendo determinadas pelo método de Alamar Blue.

As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com as amostras com incubação de 24 horas: cápsula MIL-100, cápsula MIL-100\_MTX, cápsula MIL-100\_MTX\_colagenase e MTX livre. A Figura 68 apresenta os resultados de viabilidade celular obtidos.

**Figura 68:** Viabilidade celular nas linhagens celulares A-375 e HaCat pelo método Alamar Blue.



Os resultados de viabilidade celular mostraram que as cápsulas de MIL-100 vazias apresentaram baixa citotoxicidade para as duas linhagens celulares estudadas, chegando a manter no mínimo 87% das células vivas. Além disso, quando comparamos a viabilidade celular das células saudáveis com as células cancerígenas, os resultados obtidos mostram que a amostra formada pelas cápsulas contendo ambos os compostos bioativos (amostra MIL-100\_MTX\_colagenase) teve uma diminuição da viabilidade celular de 63% para 44% para as linhagens celulares HaCat e A-375, respectivamente, na concentração de 50 µg/mL. Portanto, a cápsula MIL-100 carregada com MTX e colagenase possui maior citotoxicidade frente as células

cancerígenas A-375 do que as células sadias HaCat, sugerindo seletividade da citotoxicidade para as células tumorais estudadas.

O fármaco metotrexato (MTX) é um antimetabólito, estruturalmente análogo ao ácido fólico, e inibe a enzima diidrofolato-redutase (DHFR), atuando diretamente na fase S do ciclo celular. Dessa maneira, pode-se afirmar que esse fármaco apresenta efeito seletivo sobre as células tumorais porque essa população de células apresenta fase de crescimento exponencial, e assim o efeito mais marcante do fármaco é observado<sup>102</sup>. Neste trabalho, a colagenase está sendo utilizada em associação com o fármaco antitumoral para auxiliar na eficácia do tratamento contra o câncer uma vez que essa enzima pode aumentar a apoptose celular, principalmente tumoral, por provocar diminuição da enzima piruvatoquinase M2 (PKM2), que pode limitar a geração de ATP. Isso ocorre porque a enzima PKM2 ativa a cascata de açúcar da qual dependem as células. As células cancerígenas, em especial, consomem muito mais energia e, conseqüentemente, dependem mais desse açúcar e por isso apresenta maior morte celular na presença da colagenase<sup>103</sup>.

## **VI. 6. Conclusão do Capítulo VI**

Neste capítulo foi demonstrado que as cápsulas de MIL-100 obtidas por *spray drying* apresentam alta capacidade de encapsulação do fármaco MTX e da proteína colagenase.

Os perfis de liberação do MTX e da colagenase mostraram que houve uma liberação controlada do fármaco e da enzima, e os estudos com modelos cinéticos sugerem que o mecanismo envolvido durante esse processo é a associação da difusão com erosão da estrutura. Além disso, o ensaio de atividade enzimática mostrou que a colagenase ainda permanece com atividade após o carregamento em associação com o MTX.

As cápsulas obtidas por *spray drying* apresentaram baixa citotoxicidade em ensaio realizado com as células HaCat e A-375. Já as cápsulas contendo MTX e colagenase apresentaram aumento da citotoxicidade mais relevante na linhagem celular tumoral. Acredita-se que esse resultado possa ser creditado a uma ação antitumoral conjunta e sinérgica do fármaco e da proteína presentes em um único material.

## 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 collagenase (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 collagenase 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)(NO<sub>3</sub>)(tpt) 2/3. cntdot. solv (tpt= 2, 4, 6-tri (4-pyridyl)-1, 3, 5-triazine, solv=. appr. 3/4C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>. cntdot. 3/4CH<sub>3</sub>OH or. appr. 3/2CHCl<sub>3</sub>. cntdot. 1/3CH<sub>3</sub>OH). *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[Cu<sub>3</sub>(TMA)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]. *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  $\gamma$ -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 multicompartement 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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.