

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 11/07/2025.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo *in vitro* do potencial da piperina encapsulada em
metal-organic frameworks e com modificação de superfície
para o tratamento do câncer de mama**

CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA

Araraquara-SP

2023



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo *in vitro* do potencial da piperina encapsulada em
metal-organic frameworks e com modificação de superfície
para o tratamento do câncer de mama**

CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA

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

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Araraquara-SP

2023

Q36e

Quijia Quezada, Christian Rafael.

Estudo *in vitro* do potencial da piperina encapsulada em *metal-organic frameworks* e com modificação de superfície para o tratamento do câncer de mama / Christian Rafael Quijia Quezada. – Araraquara: [S.n.], 2023.

122 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.

Orientador: Marlus Chorilli.

Coorientadora: Regina Célia Galvão Frem.

1. Câncer de mama. 2. *Metal-organic frameworks*. 3. MIL-100 (Fe). 4. Piperina. 5. Membrana celular. 6. Quitosana. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Frem, Regina Célia Galvão, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação do potencial da piperina encapsulada em *metal-organic frameworks* e com modificação de superfície para o tratamento do câncer de mama

AUTOR: CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

COORIENTADORA: REGINA CÉLIA GALVÃO FREM

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)

Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. SEVERINO ALVES JUNIOR (Participação Virtual)

Departamento de Química Fundamental / Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. ADLEY ANTONINI NEVES DE LIMA (Participação Virtual)

Departamento de Farmácia / Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Profa. Dra. RENATA VIDOR CONTRI (Participação Virtual)

Departamento de Produção de Matéria-Prima / Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. PATRICIA SEVERINO (Participação Virtual)

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Tiradentes

Araraquara, 11 de julho de 2023

Impacto esperado: Os resultados desta tese podem levar a uma terapia mais eficaz e segura para o tratamento do câncer de mama, que é uma das principais causas de morte entre mulheres portadoras de câncer no mundo. A utilização de nanoestruturas como MOFs revestidos com membranas de macrófagos ou quitosana pode melhorar as propriedades biofarmacêuticas da piperina, reduzindo sua toxicidade e aumentando sua eficácia contra as células cancerígenas. Portanto, o benefício potencial desta pesquisa para a sociedade é a possibilidade de oferecer um tratamento mais eficaz e seguro para o câncer de mama, melhorando a qualidade de vida das mulheres afetadas por essa doença.

Expected impact: The results of this these can lead to a more effective and safer therapy for the treatment of breast cancer, which is one of the leading causes of cancer-related death among women worldwide. The use of nanostructures such as MOFs coated with macrophage membranes or chitosan can improve the bio-pharmaceutical properties of piperine, reducing its toxicity and increasing its effectiveness against cancerous cells. Therefore, the potential benefit of this research to society is the possibility of offering a more effective and safer treatment for breast cancer, improving the quality of life of women affected by this disease.

DEDICATÓRIA

A mis padres (Delfida Quezada Rodríguez y Miguel Quijia Gualoto) por todo su esfuerzo y mis hermanos en especial a Angela Quijia por siempre alentarme en mis sueños y objetivos.

AGRADECIMENTO

Inicialmente, gostaria de expressar minha gratidão à minha família e amigos, em particular, aos meus pais, por todo o amor e apoio incondicional que sempre me deram.

Também gostaria de agradecer ao grupo de MOFs do laboratório de Química-UNESP, em especial a Caroline e Renata, pelo valioso conhecimento científico em MOFs que compartilharam comigo. A todos do grupo, muito obrigado.

Do mesmo modo, gostaria de agradecer ao grupo de Farmacotecnia, especialmente a Kaio, Marcelle e Camila, e a todo o pessoal, pelo auxílio fundamental na realização dos ensaios de citotoxicidade. Sem a ajuda deles, esse trabalho não seria possível.

Sou grato aos técnicos que sempre me auxiliaram, em particular ao técnico Rafael Romano, por toda a paciência e rapidez nas análises.

Gostaria de reconhecer o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Nº processo: 2018/21119-0) e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (Nº processo: 2021/07281-1) que concederam bolsas e suporte financeiro para este projeto.

Aos professores que fizeram parte da minha banca de qualificação do doutorado, agradeço por aceitarem participar e por compartilharem seus conhecimentos e experiências comigo.

Expresso minha gratidão ao meu orientador, professor Dr. Marlus Chorilli, por sua dedicação permanente e sugestões valiosas que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho de investigação. Agradeço também sua amizade e respeito.

Por fim, gostaria de agradecer minha coorientadora de teses, a professora Regina Frem, do laboratório de MOFs, por todas as suas dicas científicas e por compartilhar seus vastos conhecimentos comigo. Sou grato e em dívida com ela por todas as inúmeras horas que passamos trabalhando juntos.

Ever tried. Ever failed. No matter. Try Again. Fail again. Fail better.

Samuel Beckett

RESUMO

O câncer de mama é uma das principais causas de morte entre mulheres com câncer em todo o mundo, levando à busca por tratamentos quimioterápicos mais eficazes. Entre os compostos com potencial quimioterapêutico, destaca-se a piperina (PIP), que demonstrou atividade antitumoral em linhagens de câncer de mama. No entanto, a utilização desse composto em estudos pré-clínicos tem sido limitada devido à sua toxicidade. Uma abordagem promissora para melhorar as propriedades biofarmacêuticas da piperina é o uso de redes metalo-orgânicas (MOFs), como o MIL-100 (Fe), como sistemas de liberação de fármacos. Além disso, a modificação de nanoestruturas com materiais naturais, como as membranas de macrófagos (MM) ou quitosana (QUI), pode proporcionar uma camuflagem contra o sistema imunitário, resistência à degradação e liberação controlada. Inspirado por esses avanços científicos e tecnológicos, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial da piperina encapsulada em MOFs revestidos com MM ou QUI para o tratamento do câncer de mama. Neste estudo, foram sintetizados com sucesso os nanosistemas baseados no MIL-100(Fe) contendo piperina revestida com MM (MM@PIP@MIL-100(Fe)) ou com QUI (QUI@PIP@MIL-100(Fe)) por meio de síntese hidrotermal assistida por micro-ondas e método de impregnação. As análises por difração de raios-X de MIL-100(Fe) e PIP@MIL-100(Fe) revelaram a cristalinidade dos materiais e tamanhos de partícula de 18,32 nm e 76,18 nm, respectivamente. A presença de proteínas na superfície das vesículas de MM@PIP@MIL-100(Fe) foi confirmada por eletroforese (SDS-PAGE), enquanto o revestimento de quitosana (QUI) no MOF foi sugerido por espectroscopia de infravermelho. A quantificação da piperina nos MOFs foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), mostrando uma eficiência de encapsulamento de $95 \pm 3\%$. Os ensaios de citotoxicidade em células de câncer de mama, como MCF-7, SKBR3, MDA-MB-231 e BT549, utilizando os materiais PIP@MIL-100(Fe), MM@PIP@MIL-100(Fe) e QUI@PIP@MIL-100(Fe), revelaram um índice de citotoxicidade maior em comparação com a piperina livre, com uma concentração inibitória média (IC₅₀) entre duas e dezessete vezes maior. Em conclusão, este trabalho sugere potencial aplicação da piperina nessas nanoestruturas no tratamento do câncer de mama.

Palavras chave: câncer de mama, *metal-organic frameworks*, MIL-100 (Fe), piperina, membrana celular, quitosana.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the leading causes of death among women with cancer worldwide, triggering the search for more effective chemotherapy treatments. Among the compounds with chemotherapeutic potential, piperine (PIP) stands out as promising due to its antitumor activity in breast cancer cell lines. However, the introduction of this compound in preclinical studies has been limited due to its toxicity. Metal-organic frameworks (MOFs), including MIL-100 (Fe), represent an attractive platform as drug delivery systems and can be employed to improve the bio-pharmaceutical properties of this molecule. Additionally, one engineering strategy is the modification of nanostructures with natural materials, such as macrophage membranes (MM) or chitosan (CHI), which are used as a camouflage system against the immune system within the body, providing resistance to degradation and controlled release. Inspired by these scientific and technological advancements, the present study aims to evaluate the potential of PIP encapsulated in MOFs coated with MM or CHI for breast cancer treatment. In this research, we report the successful synthesis of nanosystems based on MIL-100(Fe) containing piperine coated with MM (MM@PIP@MIL-100(Fe)) or with CHI (CHI@PIP@MIL-100(Fe)) via microwave-assisted hydrothermal synthesis and impregnation method. X-ray diffraction analysis of MIL-100(Fe) and PIP@MIL-100(Fe) revealed the crystallinity of the materials, with particle sizes of 18.32 nm and 76.18 nm, respectively. Coating of vesicles for MM@PIP@MIL-100(Fe) was confirmed by electrophoresis (SDS-PAGE), demonstrating the presence of proteins on its surface. Chitosan coating on the MOF was confirmed by infrared spectroscopy. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to quantify PIP in the MOFs, showing an encapsulation efficiency of $95 \pm 3\%$. Cytotoxicity assays on breast cancer cells such as MCF-7, SKBR3, MDA-MB-231, and BT549, using the materials PIP@MIL-100(Fe), MM@PIP@MIL-100(Fe), and CHII@PIP@MIL-100(Fe), revealed a higher cytotoxicity index compared to free piperine, with two to seventeen times higher median inhibitory concentration (IC_{50}). In conclusion, this work undeniably demonstrates that these nanostructures hold promise for PIP-based therapies for breast cancer.

Key words: Breast cancer, metal–organic framework, MIL-100 (Fe), Piperine, cell membrane, chitosan.

RIGHTS AND PERMISSIONS

The permissions to re-use texts, figures, and tables from previously published articles from the author were secured from:

Publisher: Elsevier

Paper 1: QUIJIA, Christian Rafael et al. In situ synthesis of piperine-loaded MIL-100 (Fe) in microwave for breast cancer treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 75, p. 103718, 2022.

DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103718

Elsevier have copyright policies that grant automatic permission for re-use the paper in your thesis if you are the author: (...) as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source (...)

Publisher: MDPI

Paper 2: QUIJIA, Christian Rafael et al. Macrophage Cell Membrane Coating on Piperine-Loaded MIL-100 (Fe) Nanoparticles for Breast Cancer Treatment. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 14, n. 6, p. 319, 2023.

DOI: 10.3390/jfb14060319

MDPI: Permissions, no special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Câncer de mama	14
1.2	Piperina	16
1.3	Nanossistemas	19
1.3.1	Redes Metalorgânicas	19
1.3.1.1	MIL-100(Fe).....	19
1.3.1.2	Citotoxicidade de MIL-100(Fe)	20
1.3.1.3	Métodos de sínteses do MIL-100(Fe)	20
1.3.1.4	Estratégias de encapsulação	20
1.3.1.5	Modificações de superfície de MOFs.....	21
1.4	OBJETIVO.....	22
1.5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
1.6	REFERÊNCIAS	23
2	CAPÍTULO 2: In Situ Synthesis Of Piperine-Loaded MIL-100 (Fe) In Microwave For Breast Cancer Treatment	29
3	CAPÍTULO 3: Macrophage Cell Membrane Coating on Piperine-Loaded MIL-100(Fe) Nanoparticles for Breast Cancer Treatment	53
4	CAPÍTULO 4: Piperine-loaded Chitosan-Coated MIL-100(Fe) Nanoparticles For Potential Application In Breast Cancer Treatment.....	75
5	CONCLUSÕES.....	93
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
7	ANEXOS.....	95
7.1	Anexo 1. - Análise XRD.	95
7.2	Anexo 2. - Análise MEV.....	95
7.3	Anexo 3. – Viabilidade celular em diferentes linhas celulares usando piperina	96
7.4	Anexo 4. – Viabilidade celular em diferentes linhas celulares usando PIP@MIL-100(Fe)..	96
7.5	Anexo 5. – Viabilidade celular em diferentes linhas celulares usando QUI@PIP@MIL-100(Fe).....	96
7.6	Anexo 6. – Viabilidade celular em diferentes linhas celulares usando MM@PIP@MIL-100(Fe).....	97
7.7	Anexo 7. – Validação do método de quantificação.....	97
7.7.1	Desenvolvimento do método analítico para quantificação de PIP por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD).....	97
7.7.1.1	Parâmetros para testar a metodologia analítica	97
7.7.1.2	Seletividade	97
7.7.1.3	Linearidade.....	98

7.7.1.4	Análise residual	98
7.7.1.5	Precisão	98
7.7.1.6	Exatidão.....	99
7.7.1.7	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	99
7.8	Desenvolvimento do método analítico para quantificação de PIP por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD)	99
7.8.1	Conformidade do sistema cromatográfico	100
7.8.2	Seletividade	101
7.8.3	Linearidade.....	101
7.8.4	Análise residual	102
7.8.5	Precisão	103
7.8.6	Exatidão.....	103
7.8.7	Limite de detecção e Limite de quantificação.....	104
7.8.8	Robustez.....	104
7.8.9	Avaliação do método de quantificação de PIP liberada por CLAE-DAD	105
7.8.10	Conformidade do sistema cromatográfico	105
7.8.11	Seletividade	106
7.8.12	Linearidade.....	108
7.8.13	Análise residual	110
7.8.14	Precisão	110
7.8.15	Exatidão.....	111
7.8.16	Limite de detecção e Limite de quantificação.....	112
7.8.17	Robustez.....	112
8	LICENÇAS DO JORNAL PARA PUBLICAÇÃO	114

1 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente e a maior causa de morte entre mulheres portadoras de câncer no mundo. De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), está previsto que em 2030 haverá 30 milhões de casos novos e 13 milhões de mortes relacionadas com este câncer, devido à sua elevada capacidade metastática. De acordo com as estimativas realizadas pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer), o número de casos novos de câncer aumentará 22 milhões nas duas décadas seguintes. No Brasil é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com estimativas de 66.280 novos casos para o ano 2023. O câncer de mama também acontece em homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença (1).

Os carcinomas mamários podem, ainda, ser chamados de adenocarcinoma quando, além de apresentarem alterações nas células epiteliais ductal, também apresentam alterações no padrão de crescimento glandular. A maioria dos tumores de mama é classificada em adenocarcinoma (2).

A classificação pode ser de quatro tipos de câncer: receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2), tipo basal enriquecido (sem expressão do receptor de estrogênio [ER]), luminal A e luminal B (que expressa o ER). As células de câncer de mama podem ter um, ambos ou nenhum desses receptores e são sub-classificados da seguinte forma: i) câncer de mama triplo negativo (TNBC) são tumores que não expressam ER, HER2 ou receptor de progesterona (PR) e ii) positivo os receptores hormonais (ER-positivos) são tumores que expressam ER e/ou PR (3). No entanto, aproximadamente 70% dos cânceres de mama são classificados como ER-positivos, enquanto os TNBC representam 15% (4).

As células MCF-7, SKBR-3, MDA e BT549 são linhagens de células de câncer de mama amplamente estudadas em pesquisas científicas. Elas possuem diferenças significativas em termos de expressão de receptores hormonais, amplificação do gene HER2/neu e características comportamentais (5). As células MCF-7 são receptoras de estrogênio (ER+), e tendem a crescer em agregados. As células SKBR-3 são caracterizadas pela amplificação do gene HER2/neu e superexpressão do receptor HER2. Elas são negativas para receptores hormonais (ER-) e apresentam alta capacidade de proliferação. As células MDA são triplo-negativas ademais altamente invasivas e metastáticas, o que as torna mais agressivas e resistentes ao tratamento hormonal. As células BT549 também são consideradas triplo-negativas e exibem características mesenquimais (6). Cada uma dessas linhagens celulares

oferece um modelo valioso para o estudo de diferentes aspectos do câncer de mama, como resposta hormonal, amplificação do HER2 e comportamento invasivo.

A OMS realiza e promove o controle do câncer de mama, o qual exige ações múltiplas. Essas ações são acompanhadas de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento. Existem quatro procedimentos principais para o tratamento do câncer, incluindo cirurgia, radiação, terapia hormonal e quimioterapia. No entanto, a resistência multidrogas (MDR) é uma condição em que as células cancerosas se tornam resistentes aos efeitos citotóxicos de vários agentes quimioterapêuticos estruturais e não relacionados mecanicamente. Este é um grande problema no tratamento clínico do câncer (7). Durante tratamento prolongado, muitos pacientes sofrem de MDR, o que pode reduzir a eficiência terapêutica e levar a uma falha no tratamento e a uma chance de sobrevivência.

Por outro lado, a maioria dos quimioterápicos age tanto em células tumorais como em células normais e isto causa toxicidade sistêmica e efeitos indesejáveis ao organismo. Isto ocorre porque os quimioterápicos agem mais intensamente em células saudáveis do que em células cancerígenas (8). Além disso, a rápida eliminação e ampla distribuição de quimioterápicos em tecidos não alvos requerem sua administração em grande quantidade, o que é impraticável devido à toxicidade inespecífica inerente dos agentes quimioterápicos (9).

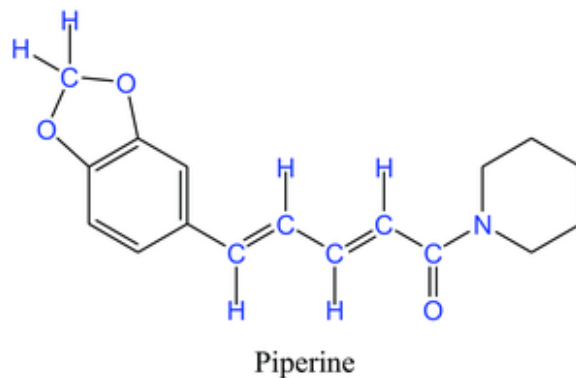
A ineficiência e efeitos indesejáveis da quimioterapia atuais são causados, principalmente, pela formulação e farmacocinética dos quimioterápicos. Estes quimioterápicos por exemplo são: os taxanos (docetaxel e paclitaxel), antraciclinas (doxorubicina, doxorubicina lipossômica peguilada e epirubicina), agentes da platina (cisplatina, carboplatina), entre outros. Por outro lado, seu sucesso depende da liberação controlada destes fármacos dirigida especificamente às células cancerígenas, com uma dose suficiente segura para os organismos por um longo período de tempo, podendo causar muitos efeitos colaterais, dependendo dos medicamentos administrados e do tempo tratamento (10).

Sendo assim, a busca de novos agentes quimioterapêuticos, dentre eles os provenientes de plantas, vem aumentando significativamente nos últimos anos. Várias plantas medicinais têm servido como fonte de estudos de anticancerígenos e mais de 60% dos atuais fármacos contra o câncer, como vimblastina, topotecano, etoteca e paclitaxel, são compostos derivados de plantas (11, 12).

1.2 Piperina

A piperina (PIP), também conhecida como (E, E) -1-piperoilpiperidina e (E, E) -1- [5-(1, 3-benzodioxol-5-il) -1-oxo-2, 4-pentidenil] piperidina (**Figura 1**), é um alcaloide extraído de sementes de plantas da família Piperácea, como são, por exemplo, a pimenta preta (3-9%) e a pimenta longa (3-5%) (13). Este composto tem sido utilizado como antimicrobiano, antiparasitário (14), antidepressivo (15), e modulador do carcinógeno de estresse oxidativo induzido (16). Sua estrutura química é dividida em três partes: um anel heterocíclico aromático, um anel piperidina e uma cadeia hidrocarbonada alifática (17). O anel piperidina é uma farmacóforo heterocíclico com alta atividade anticancerígena que pode inibir a telomerase, metaloproteases, topoisomerases e proteassomas, além de atuar em vários receptores nas células cancerígenas (18). Possui características químicas que a tornam insolúvel em água. Sua estrutura molecular hidrofóbica, a ausência de grupos hidrofílicos e sua polaridade apolar dificultam a interação com a água, tornando-a insolúvel. No entanto, a piperina é solúvel em solventes orgânicos apolares, como álcool e éter. Esses solventes possuem características semelhantes à PIP, o que permite sua dissolução (19).

Figura 1. Estrutura química da piperina (PIP)



Fonte: (20)

A PIP pode inibir a proliferação de células do câncer de mama, por meio dos seguintes mecanismos: a) redução dos fatores de transcrição; b) indução de parada do ciclo celular e apoptose; c) inibição do crescimento do tumor; e d) alteração da expressão da proteína de sinalização (**Figura 2**), conforme evidenciado em estudos *in vitro* e *in vivo* com linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (21, 22).

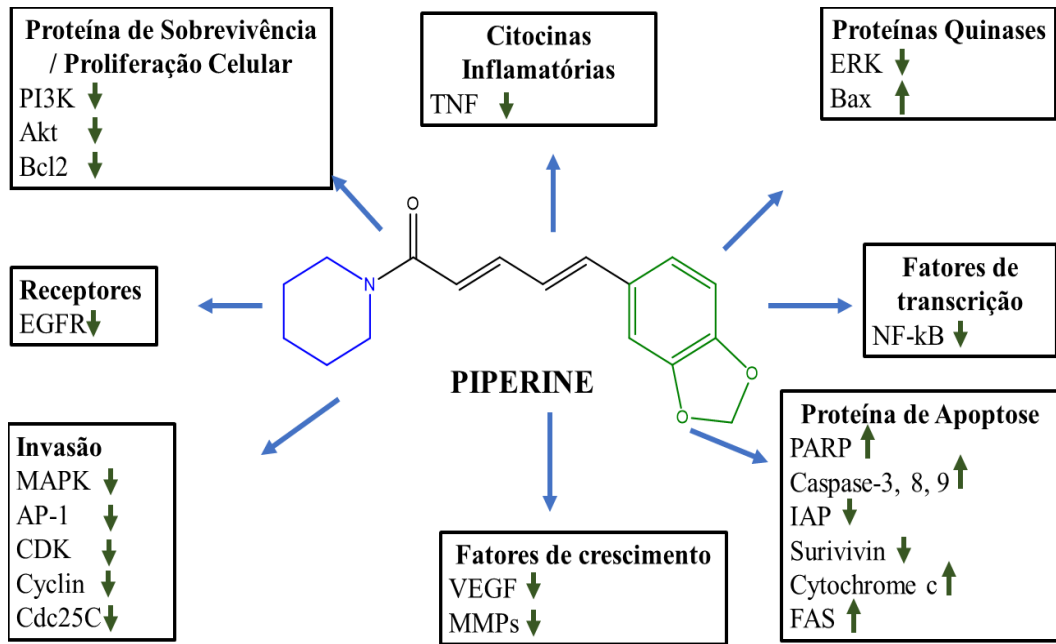


Figura 2. Alvos moleculares da piperina no câncer de mama. (23)

Nota: Fosfoinosítídeo 3-quinases (PI3Ks); Proteína quinase B (Akt); linfoma de células B-2 (Bcl-2); Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR); Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK); proteína ativadora 1 (AP-1); inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); Metaloproteínas de matriz (MMP); fator de necrose tumoral (TNF); quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs); Intensificador de cadeia leve de fator nuclear de células B ativadas (NF-κB); Poli(ADP-ribose) polimerase (PARP); proteínas de apoptose (IAP); sintase de ácido gordo (FAS); ↓ Down-regulated targets; ↑ Up-regulated targets.

No entanto, o uso da piperina enfrenta algumas dificuldades em virtude de seu elevado requisito de concentração, devido à sua natureza hidrofóbica, causando problemas relacionados à biodisponibilidade, imunotoxicidade e toxicidade (24, 25). Desta forma, a sua incorporação em um sistema de liberação nanoestruturado pode ser uma alternativa viável para viabilizar o seu emprego.

Estes nanossistemas carregados com PIP devem ter diversas características como: uma alta capacidade de carga, liberação controlada de drogas e atividade anticancerígena melhorada, em comparação com a PIP livre. Atualmente as nanoestruturas carregadas de PIP contra câncer de mama já foram relatados como nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono e lipossomas (**Tabela 1**).

Tabela 1.- Diferentes nanossistemas carregados de piperina contra o câncer de mama.

Nanossistemas	Eficiência de encapsulação da PIP (%)	Tempo de liberação	Linha celular de câncer de mama	Concentração inibitória meia máxima (IC ₅₀)	Referência bibliográfica
PIP-PLGA	36.23 ± 5.6	Sem informação	MCF-7	128.2 ± 11.3 µM	(28)
PIP-PEG-PLGA	37.82 ± 6.8	16 dias	MCF-7	129.6 ± 9.2 µM	
APT-PIP-PEG-PLGA	33.4 ± 3.4	Sem informação	MCF-7	125.8 ± 8.7 µM	
PIP Lipossomas	56 ± 2.64	3 dias	MDA-MB-231	55.39 ± 1.1 µg/mL	(29)
Piperine-MWCNTs	Sem informação	Sem informação	MDA-MB-231	6 µg/mL	(30)

Nota: PIP: Piperina; PEG-PLGA: Polietileno glicol-ácido polilático-ácido co-glicólico; APT: Aptâmero; MWCNTs: nanotubos de carbono de paredes múltiplas (23).

Lipossomas são vesículas esféricas compostas por uma dupla camada de fosfolipídios e colesterol, utilizadas como sistemas de transporte de fármacos. Eles são biodegradáveis, biocompatíveis e estáveis, protegendo os fármacos da degradação e reduzindo a toxicidade não específica. Lipossomas são amplamente aplicados no transporte de antibióticos, fungicidas, vacinas e anti-inflamatórios.

Nanolipossomas, formados a partir de fosfolipídios TPGS, têm se mostrado eficazes no tratamento de várias doenças, como o câncer de mama. Eles são utilizados como veículos para quimioterápicos lipossomais, como o Doxil, usado no tratamento do câncer de mama recorrente. O cetuximabe, um anticorpo monoclonal que bloqueia o antígeno EGFR, é frequentemente combinado com nanolipossomas para tratamento do câncer de mama triplo-negativo (TNBC), que é mais difícil de tratar devido à ausência de expressão dos genes ER, PR e HER2. Além dos lipossomas, as nanopartículas poliméricas também são amplamente utilizadas na entrega de fármacos. O ácido polilático-co-glicólico (PLGA) é um copolímero biodegradável e biocompatível com capacidade de liberação controlada de fármacos (27). Estudos demonstraram que o PLGA pode ser usado para encapsular a rapamicina (RA), um composto que inibe a proliferação celular e o crescimento tumoral. A presença do fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP) em nanopartículas de PLGA aumentou a absorção oral da RA, melhorando sua eficácia no tratamento do câncer (26).

1.3 Nanossistemas

Os nanossistemas são categorizados como nanomateriais inorgânicos (por exemplo, nanopartículas de óxido de ferro, nanopartículas de ouro e zeólitos), nanomateriais orgânicos (por exemplo, nanopartículas poliméricas, micelas, dendrímeros e lipossomas) e finalmente uma terceira categoria, que são chamados de redes metalorgânicas ou polímeros de coordenação porosos (MOFs) (29).

1.3.1 Redes Metalorgânicas

Os MOFs são materiais porosos construídos a partir da cristalização controlada de íons metálicos ou aglomerados de metais de maior nuclearidade (clusters) com ligantes orgânicos multitópicos (30), os quais são capazes de superar as limitações dos sistemas nanoestruturados, como a baixa capacidade de carga e liberação de fármaco (31).

Os diversos métodos que são utilizados para a síntese de MOFs proporcionam a oportunidade de projetar e controlar as propriedades químicas e físicas desses materiais (32). Os MOFs são construídos a partir da montagem, exclusivamente por fortes ligações covalentes, subunidades inorgânicas e ligantes orgânicos, que podem ser quimicamente ajustáveis (por exemplo, carboxilatos, fosfonatos e imidazolatos), levando a estruturas cristalinas com porosidades, por vezes, muito altas e regulares (33). Além disso, a alta flexibilidade estrutural de alguns MOFs porosos permite a adaptação da sua porosidade à forma da molécula hospedada (34).

1.3.1.1 MIL-100(Fe)

Um exemplo destes MOFs é o MIL-100 (Fe) (MIL: *Materials of Institute Lavoisier*), que tem uma forma de um pó policristalino, sendo formado a partir de íons ferro(III) e o ácido 1,3,5-benzenotricarboxílico (35). As características do MIL-100 (Fe), como a presença de porosidade característica de materiais mesoporosos (25 e 29 Å), alta área superficial ($S_{\text{BET}} \sim 2.000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, $V_p \sim 1,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$), estrutura regular e a combinação com seu microambiente anfifílico interno (metal polar anfifílico e ligante não polar), permitem o carregamento de grandes quantidades de fármacos (hidrofílico, hidrofóbico e anfifílico) e também possibilita a cinética de liberação controlada (29, 36-39). O encapsulamento dos fármacos nestes MOFs tem duas vantagens importantes: (i) eliminar qualquer possibilidade de complexação, protegendo-os de íons e protegendo os sítios de coordenação disponíveis e (ii) aumentar a solubilidade do fármaco (40).

1.3.1.2 Citotoxicidade de MIL-100(Fe)

O MIL-100(Fe) não apresenta citotoxicidade em alguns tipos de células, como câncer de pulmão humano (Calu-3), adenocarcinomas epiteliais alveolares basais humanos (A549), carcinoma de fígado humano (HepG2) (concentração $< 0,064 \text{ mg mL}^{-1}$) (41), adenocarcinomas colorretais epiteliais humanos heterogêneos (CACO-2) e câncer de mama (MCF-7) (concentração $< 1,2 \text{ mg mL}^{-1}$) (29). Esta baixa citotoxicidade pode estar relacionada com a redução do íon ferro na estrutura do MIL-100 (Fe) (na superfície interna e externa), gerando radicais hidroxila ou outras espécies reativas (*Haber-Weiss* e reação de Fenton) dentro da célula (41).

1.3.1.3 Métodos de sínteses do MIL-100(Fe)

O MIL-100(Fe) pode ser sintetizado por vários métodos, incluindo as técnicas hidrotermal assistida por micro-ondas, eletroquímica, mecanoquímica, sonoquímica, entre outras (42). No entanto, a síntese assistida por micro-ondas apresenta vantagens sobre as demais, como tempos de reação mais curtos, aquecimento homogêneo e menor polidispersidade, além de rápida formação, crescimento e tamanho de cristais em nanoescala. Além disso, estruturas em nanoescala têm sido amplamente utilizadas devido à sua capacidade de superar drogas e barreiras biológicas de forma eficiente ao microambiente tumoral (36, 43-46).

1.3.1.4 Estratégias de encapsulação

Diversas estratégias de encapsulamento de fármacos têm sido relatadas para MIL-100 (Fe), como os métodos de impregnação, de alta pressão ou mecanoquímico (47). Um estudo realizado por Singco, Liu (48) utilizou uma nova estratégia de encapsulamento *in situ* durante a formação do MIL-100 (Fe) para a incorporação de ácido acetilsalicílico. Esta estratégia implica que algumas moléculas ou pró-drogas estejam diretamente ligadas através da coordenação disponível (49). Desta forma, o carregamento de fármacos com estruturas menores poderia ser realizado, evitando o vazamento do fármaco antes da degradação do carreador. No entanto, uma forte interação entre os fármacos e MOFs é essencial para alcançar um comportamento de carga e liberação de fármaco satisfatório, como a utilização de grupos funcionais especiais (COOH, SO₃H, C=O, etc.) ou carga oposta que ajuda com sucesso no encapsulamento *in situ* com o MOF (50).

1.3.1.5 Modificações de superfície de MOFs

Estratégias de modificação de superfície de nanopartículas de MOFs tem sido desenvolvida recentemente, cujo objetivo é melhorar a estabilidade química e coloidal dos materiais. Além disso, esta funcionalização poderia ser adequada para administração intravenosa, o que permitiria um aumento das interações do MIL-100(Fe) com receptores específicos (*targeting*) e/ou escape do sistema imunitário associado com tempos de circulação mais prolongados.

Dentro desse contexto, o biopolímero quitosana (QUI) poderia proteger a matriz e permanecer maior tempo em circulação e ser lentamente eliminado pelo organismo. Outras propriedades biológicas como a biocompatibilidade, baixa toxicidade e imunoestimulante, fazem atrativo o revestimento do MIL-100(Fe) por esse biopolímero.

Outra estratégia que vem sendo investigada na engenharia de materiais é a combinação dos sistemas de liberação de fármacos com materiais naturais. Dentro dessa perspectiva, as membranas de revestimento celular são um novo tipo de nanoestruturas biomiméticas que combinam as funções da membrana celular e a engenharia de nanomateriais sintéticos, objetivando melhor entrega de agentes quimioterapêuticos (51). Uma delas consiste na utilização de membranas de macrófagos. Estas células são um tipo de glóbulos brancos que encontram e fagocitam detritos celulares, células cancerosas e quaisquer substâncias estranhas que não possuem os biomarcadores específicos das células do corpo saudáveis em sua superfície.

Desta forma, a vantagem de recobrir nanoestruturas com membranas de macrófagos ou quitosana é a potencialidade de camuflagem, de forma a se evitar a depuração dos sistemas de fagócitos mononucleares e ter maior circulação sanguínea prolongada (52). Se as nanoestruturas podem ser camufladas com membranas de macrófagos ou quitosana, torna-se possível utilizar esta adesão célula-célula no combate ao câncer (52-54).

Inspirados por esses avanços científicos e tecnológicos, no presente trabalho, foram obtidas vesículas de membrana de macrófagos naturais juntamente com suas proteínas de membrana; além disso, o biopolímero quitosana também foi utilizado para revestir o MIL-100 (Fe). Previamente estes MOFs foram encapsulados com a PIP *in situ* mediante síntese em micro-ondas (PIP@MIL-100 (Fe)). Foram também realizados nesse trabalho estudos de eficácia destes sistemas nanoestruturados *in-vitro* contra células do câncer de mama. Pretende-se obter um sistema que seja estável em fase aquosa, que aumente a biodisponibilidade da piperina e reduza a toxicidade não específica deste fármaco.

1.4 OBJETIVO

Avaliar o potencial da piperina encapsulada em *metal-organic frameworks* revestidos com modificações de superfície no tratamento do câncer de mama.

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Encapsular a piperina (PIP) no MOF de ferro, MIL-100(Fe), mediante síntese *in situ* por micro-ondas, obtendo o material PIP@MIL-100(Fe);
- Avaliar a eficiência de encapsulação da PIP na matriz PIP@MIL-100(Fe) por cromatografia CLAE;
- Produzir as vesículas derivadas da membrana dos macrófagos RAW 264.7 (vesículas MM) mediante o método citólise hipotônica;
- Revestir as membranas de células de macrófagos RAW 264.7 (MM), via impregnação, no material PIP@MIL-100(Fe), obtendo o nanosistema MM@PIP@MIL-100(Fe);
- Determinar e comparar as proteínas das vesículas MM das células de macrófago RAW 264.7 com aquelas nas nanoestruturas MM@PIP@MIL-100(Fe) empregando ensaios de SDS-PAGE e dispersão de luz dinâmica (DLS);
- Revestir a matriz PIP@MIL-100(Fe) com quitosana (QUI) por impregnação, com a preparação do biocompósito QUI@PIP@MIL-100(Fe);
- Caracterizar as diferentes MOFs por meio de microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, medidas de dispersão de luz dinâmica (DLS), difração de raios X (XRD), análise térmica (TGA), porosidade por isoterma de adsorção de nitrogênio, espectroscopia no infravermelho (IR) e análises elementar;
- Determinar a estabilidade da matriz PIP@MIL-100(Fe) em presença de PBS a 37 °C por meio de difração de raios X e microscopia eletrônica de transmissão;
- Analisar a estabilidade da nanosistema MM@PIP@ MIL-100(Fe) por meio de DLS;
- Avaliar o perfil de liberação da piperina a partir das diferentes nanoestruturas por CLAE;
- Avaliar a citotoxicidade dos diferentes tratamentos por método de ensaio colorimétrico em diferentes linhagens celulares de câncer de mama.

1.6 REFERÊNCIAS

1. INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer 2021 [Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acessoainformacao/site/home/>].
2. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Patologia: bases patológicas das doenças: Elsevier; 2005.
3. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. 2001;98(19):10869-74.
4. Yao H, He G, Yan S, Chen C, Song L, Rosol TJ, et al. Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? 2017;8(1):1913.
5. Ninio-Many L, Hikri E, Burg-Golani T, Stemmer SM, Shalgi R, Ben-Aharon IJFio. miR-125a induces HER2 expression and sensitivity to trastuzumab in triple-negative breast cancer lines. 2020;10:191.
6. Chen J-Q, Russo JJBBeBA-RoC. ER α -negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches. 2009;1796(2):162-75.
7. Ho EA, Soo PL, Allen C, Piquette-Miller M. Impact of intraperitoneal, sustained delivery of paclitaxel on the expression of P-glycoprotein in ovarian tumors. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2007;117(1):20-7.
8. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Advanced drug delivery reviews. 2004;56(11):1649-59.
9. Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. Nano today. 2007;2(3):14-21.
10. Barrios C, Freitas-Junior R, Martins S, Bines J, Estevez-Diz MDP, Caleffi MJGO. Challenge of Incorporating New Drugs for Breast Cancer in Brazil: A Proposed Framework for Improving Access to Innovative Therapies. 2021;7:474-85.
11. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. Journal of natural products. 2003;66(7):1022-37.
12. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. Journal of ethnopharmacology. 2005;100(1-2):72-9.
13. Srinivasan K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. Critical reviews in food science and nutrition. 2007;47(8):735-48.
14. Mitra M, Mandal AK, Chatterjee TK, Das N. Targeting of mannosylated liposome incorporated benzyl derivative of Penicillium nigricans derived compound MT81 to

reticuloendothelial systems for the treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of drug targeting*. 2005;13(5):285-93.

15. Li S, Wang C, Wang M, Li W, Matsumoto K, Tang Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. *Life sciences*. 2007;80(15):1373-81.

16. Khajuria A, Thusu N, Zutshi U, Bedi KL. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;189(1-2):113-8.

17. Zadorozhna M, Tataranni T, Mangieri DJMbr. Piperine: role in prevention and progression of cancer. 2019;46(5):5617-29.

18. Goel P, Alam O, Naim MJ, Nawaz F, Iqbal M, Alam MIJEJoMC. Recent advancement of piperidine moiety in treatment of cancer-A review. 2018;157:480-502.

19. Yan X, Li M, Xu X, Liu X, Liu FJFiN. Zein-based nano-delivery systems for encapsulation and protection of hydrophobic bioactives: A review. 2022;9:999373.

20. Gorgani L, Mohammadi M, Najafpour GD, Nikzad M. Piperine—the bioactive compound of black pepper: from isolation to medicinal formulations. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2017;16(1):124-40.

21. Lai LH, Fu QH, Liu Y, Jiang K, Guo QM, Chen QY, et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. *Acta pharmacologica Sinica*. 2012;33(4):523-30.

22. Bezerra DP, Castro FO, Alves AP, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piperine and piperlongumine, two alkaloid amides from *Piper*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2006;39(6):801-7.

23. Quijia CR, Chorilli MJPR. Piperine for treating breast cancer: A review of molecular mechanisms, combination with anticancer drugs, and nanosystems. 2022;36(1):147-63.

24. Chuchawankul S, Khorana N, Poovorawan Y. Piperine inhibits cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Genetics and molecular research : GMR*. 2012;11(1):617-27.

25. Daware MB, Mujumdar AM, Ghaskadbi S. Reproductive toxicity of piperine in Swiss albino mice. *Planta medica*. 2000;66(3):231-6.

26. Pachauri M, Gupta ED, Ghosh PCJJodds, technology. Piperine loaded PEG-PLGA nanoparticles: Preparation, characterization and targeted delivery for adjuvant breast cancer chemotherapy. 2015;29:269-82.

27. Imam SS, Alshehri S, Altamimi MA, Hussain A, Qamar W, Gilani SJ, et al. Formulation of piperine–chitosan-coated liposomes: characterization and In Vitro Cytotoxic Evaluation. 2021;26(11):3281.
28. Raza K, Kumar D, Kiran C, Kumar M, Guru SK, Kumar P, et al. Conjugation of docetaxel with multiwalled carbon nanotubes and codelivery with piperine: implications on pharmacokinetic profile and anticancer activity. 2016;13(7):2423-32.
29. Rezaei M, Abbasi A, Varshochian R, Dinarvand R, Jeddi-Tehrani M. NanoMIL-100(Fe) containing docetaxel for breast cancer therapy. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*. 2018;46(7):1390-401.
30. Carne A, Carbonell C, Imaz I, MasPOCH D. Nanoscale metal-organic materials. *Chemical Society reviews*. 2011;40(1):291-305.
31. Wu MX, Yang YW. Metal-Organic Framework (MOF)-Based Drug/Cargo Delivery and Cancer Therapy. *Adv Mater*. 2017;29(23).
32. Giménez-Marqués M, Hidalgo T, Serre C, Horcajada P. Nanostructured metal–organic frameworks and their bio-related applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 2016;307:342-60.
33. Férey G. Hybrid porous solids: past, present, future. *Chemical Society reviews*. 2008;37(1):191-214.
34. Férey G, Serre C. Large breathing effects in three-dimensional porous hybrid matter: facts, analyses, rules and consequences. *Chemical Society reviews*. 2009;38(5):1380-99.
35. Horcajada P, Surble S, Serre C, Hong DY, Seo YK, Chang JS, et al. Synthesis and catalytic properties of MIL-100(Fe), an iron(III) carboxylate with large pores. *Chem Commun (Camb)*. 2007(27):2820-2.
36. Bellido E, Hidalgo T, Lozano MV, GuilleVIC M, Simon-Vazquez R, Santander-Ortega MJ, et al. Heparin-Engineered Mesoporous Iron Metal-Organic Framework Nanoparticles: Toward Stealth Drug Nanocarriers. *Advanced Healthcare Materials*. 2015;4(8):1246-57.
37. Marcos-Almaraz MT, Gref R, Agostoni V, Kreuz C, Clayette P, Serre C, et al. Towards improved HIV-microbicide activity through the co-encapsulation of NRTI drugs in biocompatible metal organic framework nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry B*. 2017;5(43):8563-9.
38. Horcajada P, Chalati T, Serre C, Gillet B, Sebrie C, Baati T, et al. Porous metal–organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nature materials*. 2010;9(2):172.

39. Li X, Semiramoth N, Hall S, Tafani V, Josse J, Laurent F, et al. Compartmentalized Encapsulation of Two Antibiotics in Porous Nanoparticles: an Efficient Strategy to Treat Intracellular Infections. *Particle & Particle Systems Characterization*. 2019;36(3).
40. Taherzade SD, Soleimannejad J, Tarlani A. Application of Metal-Organic Framework Nano-MIL-100(Fe) for Sustainable Release of Doxycycline and Tetracycline. *Nanomaterials (Basel)*. 2017;7(8).
41. Grall R, Hidalgo T, Delic J, Garcia-Marquez A, Chevillard S, Horcajada P. In vitro biocompatibility of mesoporous metal (III; Fe, Al, Cr) trimesate MOF nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015;3(42):8279-92.
42. Han Y, Yang H, Guo XJSM, Crystallization. Synthesis methods and crystallization of MOFs. 2020:1-23.
43. Agostoni V, Anand R, Monti S, Hall S, Maurin G, Horcajada P, et al. Impact of phosphorylation on the encapsulation of nucleoside analogues within porous iron(III) metal-organic framework MIL-100(Fe) nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013;1(34):4231-42.
44. Bellido E, Guillevic M, Hidalgo T, Santander-Ortega MJ, Serre C, Horcajada P. Understanding the colloidal stability of the mesoporous MIL-100 (Fe) nanoparticles in physiological media. *Langmuir*. 2014;30(20):5911-20.
45. Hidalgo T, Alonso-Nocelo M, Bouzo B, Reimondez-Troitiño S, Abuin-Redondo C, de la Fuente M, et al. Biocompatible iron (iii) carboxylate metal-organic frameworks as promising RNA nanocarriers. 2020;12(8):4839-45.
46. Rodriguez-Ruiz V, Maksimenko A, Anand R, Monti S, Agostoni V, Couvreur P, et al. Efficient "green" encapsulation of a highly hydrophilic anticancer drug in metal-organic framework nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*. 2015;23(7-8):759-67.
47. Quijia CR, Lima C, Silva C, Alves RC, Frem R, Chorilli MJJoDDS, et al. Application of MIL-100 (Fe) in drug delivery and biomedicine. 2020:102217.
48. Singco B, Liu LH, Chen YT, Shih YH, Huang HY, Lin CH. Approaches to drug delivery: Confinement of aspirin in MIL-100(Fe) and aspirin in the de novo synthesis of metal-organic frameworks. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2016;223:254-60.
49. Valekar AH, Batule BS, Kim MI, Cho KH, Hong DY, Lee UH, et al. Novel amine-functionalized iron trimesates with enhanced peroxidase-like activity and their applications for the fluorescent assay of choline and acetylcholine. *Biosensors & Bioelectronics*. 2018;100:161-8.

50. Zhang H, Li Q, Liu R, Zhang X, Li Z, Luan YJAFM. A Versatile prodrug strategy to in situ encapsulate drugs in MOF nanocarriers: a case of cytarabine-IR820 prodrug encapsulated ZIF-8 toward chemo-photothermal therapy. 2018;28(35):1802830.
51. Meyer RA, Sunshine JC, Green JJ. Biomimetic particles as therapeutics. Trends in biotechnology. 2015;33(9):514-24.
52. Xuan M, Shao J, Dai L, He Q, Li J. Macrophage cell membrane camouflaged mesoporous silica nanocapsules for in vivo cancer therapy. Advanced healthcare materials. 2015;4(11):1645-52.
53. Rao L, He ZB, Meng QF, Zhou ZY, Bu LL, Guo SS, et al. Effective cancer targeting and imaging using macrophage membrane-camouflaged upconversion nanoparticles. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2017;105(2):521-30.
54. Xuan MJ, Shao JX, Dai LR, Li JB, He Q. Macrophage Cell Membrane Camouflaged Au Nanoshells for in Vivo Prolonged Circulation Life and Enhanced Cancer Photothermal Therapy. *Acs Applied Materials & Interfaces*. 2016;8(15):9610-8.
55. Brasil AJDORFd. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC N° 166, de 24 de Julho de 2017. 2017.
56. Reyes Solís LM, Sánchez RA, Restrepo JJRdC. Encapsulation of the Piperine Present in *Piper tuberculatum* Species Using Multilamellar Vesicles and Determination of its Antioxidant Power. 2017;21(2):11-28.
57. Taherzade SD, Soleimannejad J, Tarlani A. Application of Metal-Organic Framework Nano-MIL-100(Fe) for Sustainable Release of Doxycycline and Tetracycline. *Nanomaterials*. 2017;7(8).
58. Guo AL, Durymanov M, Permyakova A, Sene S, Serre C, Reineke J. Metal Organic Framework (MOF) Particles as Potential Bacteria-Mimicking Delivery Systems for Infectious Diseases: Characterization and Cellular Internalization in Alveolar Macrophages. *Pharmaceutical Research*. 2019;36(4).
59. Simon MA, Anggraeni E, Soetaredjo FE, Santoso SP, Irawaty W, Thanh TC, et al. Hydrothermal Synthesis of HF-Free MIL-100 (Fe) for Isoniazid-Drug Delivery. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-11.
60. Guideline IHTJQ. Validation of analytical procedures: text and methodology. 2005;1:1-15.
61. Brasil BJDORFd. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências (Resolução RDC n° 166, de 24 de julho de 2017). 2017.

62. Mendonça RJRMAI. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2006;15(1):1-10.

2 CAPÍTULO 2: In Situ Synthesis Of Piperine-Loaded MIL-100 (Fe) In Microwave For Breast Cancer Treatment

Artigo publicado em setembro 2022 no periódico Journal of Drug Delivery Science and Technology

DOI: [10.1016/j.jddst.2022.103718](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103718)

3 CAPÍTULO 3: Macrophage Cell Membrane Coating on Piperine-Loaded MIL-100(Fe) Nanoparticles for Breast Cancer Treatment

Artigo publicado em Junho 2023 no periódico Journal of Functional Biomaterials

DOI: [10.3390/jfb14060319](https://doi.org/10.3390/jfb14060319)

4 CAPÍTULO 4: Piperine-loaded Chitosan-Coated MIL-100(Fe) Nanoparticles For Potential Application In Breast Cancer Treatment

Artigo científico que será submetido ao periódico Microporous and Mesoporous Materials.

5 CONCLUSÕES

Em resumo, esse trabalho demonstra que a estratégia de preparação e de encapsulação *in situ* de fármacos em sistemas de liberação controlada baseados em MOFs oferece novas oportunidades para a encapsulação da piperina (PIP) no MIL-100 (Fe). Foi possível encapsular PIP a uma porcentagem > do 90 %, comparado com o método tradicional (impregnação) que encapsulou menos do que 15 % (**Anexo 1**). Por outro lado, foram desenvolvidas ainda duas novas nanoestruturas de MOFs revestidas com membrana de macrófago (MM) e quitosana (QUI), os quais foram aplicados em linhagens celulares de câncer de mama (ver a seguir). As MOFs que foram revestidas com MM e QUI mostraram exitosamente a modificação de superfície mediante diversas técnicas, sendo as mais importantes microscopia eletrônica de transmissão que sugeriu o sucesso do recobrimento das membranas de macrófago ou quitosana, que formaram uma camada externa de ~ 10 nm de espessura. Por espectroscopia vibracional no infravermelho puderam ser identificadas as principais bandas de absorção, incluindo aqueles referentes à estrutura de sacarídeos (1164, 1092 e 1042 cm^{-1}), sugerindo, portanto, a presença da quitosana no MOF. Já o sucesso na preparação da nanosistema MM@PIP@MIL-100(Fe) pode ser verificado através das bandas de massa molecular das proteínas nos ensaios de eletroforese. Foi verificado também que os materiais exibem uma liberação controlada do fármaco piperina, em meio PBS a dois diferentes valores de pH (5,0 e 7,4), a 37 °C. De um modo geral, a liberação da PIP ocorre por um modelo cinético tipo difusão *Fickiana*. Por outro lado, as modificações realizadas na superfície das MOFs resultaram em porcentagens menores de liberação (< 25 %, 7 dias), quando comparado com a matriz PIP@MIL-100(Fe). Os resultados da avaliação de citotoxicidade frente a quatro diferentes linhagens celular de câncer de mama (MCF-7, SKBR3, MDA -MB-231 e BT549) indicaram que as nanoestruturas MOFs carregadas com PIP são mais tóxicas do que o próprio fármaco. Com base nesses resultados, este trabalho demonstrou que os materiais baseados na MOF porosa MIL-100(Fe) contendo piperina e revestimentos de membrana de macrófago ou quitosana apresentaram um padrão de liberação sustentado (~ 7 dias) e controlado, demonstrando potencialidade de ser uma estrutura promissora em terapias baseadas em piperina contra o câncer de mama.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a piperina tenha sido encapsulada com sucesso nos materiais aqui propostos, estudos *in vivo* ainda precisam ser realizados, fato esse que não foi ainda possível, pois uma quantidade maior de fármaco dentro das matrizes seria necessária. Este teste foi realizado colocando uma quantidade maior de PIP durante a síntese; todavia, este teste demonstrou que infelizmente os nanocompostos tiveram uma modificação em sua estrutura, conforme analisado em DRX e MEV. Por exemplo, ao colocar 4 mg de PIP, os resultados de cristalografia revelaram uma perda de cristalinidade pela diminuição de picos do difratômetro em $2\theta = 4,72^\circ$; $6,2^\circ$; $10,26^\circ$ e $10,9^\circ$ (**Anexo 1**). Quando 20 mg do fármaco foi adicionado no meio reacional, (ver **Artigo 1**), apenas 14 % de rendimento foi obtido e os produtos formados são um material amorfo e partículas na forma de agulhas (**Anexo 2**).

Para a análise de citômetro de fluxo deste tipo de material, é necessário otimizar o encapsulamento da piperina por outro tipo de metodologia (método mecanoquímico ou método de alta pressão, por exemplo), conforme argumentado no parágrafo anterior, já que para atingir as análises dentro do citômetro é necessário que os MOFs conttenham 20 mg de PIP, e isso não foi possível de realizar.

A análise de internalização no nível intracelular tem sido amplamente relatada. No entanto, para o nosso estudo é necessário realizar modificações de superfície contendo fluoróforos nas matrizes tanto na vesícula da membrana do macrófago quanto na quitosana.

Finalmente, a estratégia de síntese e encapsulamento da piperina realizados *in situ* nos materiais desenvolvidos neste trabalho poderia ser amplamente utilizada para outros tipos de fármacos ou outros tipos de doenças, uma vez que esta metodologia é inovadora e não há nenhum outro estudo relatado anteriormente.