



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Materiais micro e mesoporosos na entrega de fármacos

Ana Filipa Assude Funenga

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Paulo Gil
Lourenço

2018



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Materiais micro e mesoporosos na entrega de
 fármacos**

Ana Filipa Assude Funenga

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Paulo Gil
Lourenço

2018

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados nos textos e constam da listagem de referências incluída.

(Ana Filipa Assude Funenga)

Copyright © 2018 Filipa Funenga

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de reportórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Ao fim destes cinco anos, dou por concluído o meu percurso académico, consegui assim finalizar uma das etapas mais marcantes e, para oficializar esse momento, agradeço a todos os que estiveram presentes nesta caminhada e que a tornaram única e especial.

Antes de mais gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor João Lourenço, por me despertar o interesse pela química inorgânica e por me aceitar como sua mestranda. O professor, mesma à distância, conseguiu acompanhar-me e ajudar-me sempre que precisei. Agradeço também a todos os professores que de certo modo me suscitaram interesse pelo curso e que me inculcaram o gosto pelo mesmo.

Estou também grata aos meus pais, avós, irmão e restante família, que embora longe, estiveram sempre comigo e me deram ânimo para percorrer este longo caminho e alcançar tudo aquilo que eu sou, tanto nos valores como na formação. Queria também deixar uma palavra de apreço pelo apoio incondicional que me deram, permitindo-me assim a concretização deste curso.

Um obrigada enorme aos amigos de todas as horas, Maria Mira, Márcia, André, Beatriz, Bárbara, Kristina, João Pontes e ao meu namorado, Gil, que foram a minha família Algarvia nestes últimos cinco anos. Todos estiveram presentes quando mais precisei tanto nos bons e nos maus momentos académicos bem como nos de diversão, de alegria e de companheirismo. Momentos inesquecíveis que ficarão sempre comigo.

Aos meus amigos de longa data, Inês Ginja, Russo, Afonso, Bruno, Rodrigo, pois sempre que eu vinha a casa, conseguíamos pôr as conversas em dia e manter a nossa amizade.

E um obrigado final a todos não mencionados, mas que mesmo assim fizeram parte destes últimos cinco anos!

RESUMO

Com o atual desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e devido ao aparecimento de alguns efeitos colaterais associados à administração convencional de determinados fármacos, surgiu a necessidade de aperfeiçoar novas formas de entrega de fármacos. Criaram-se assim novos sistemas de entrega de fármacos – sistemas de *drug delivery*.

Este novo meio de entrega de fármacos contribuiu para um maior controlo a nível da taxa, período de entrega de fármacos e dos alvos específicos onde estes irão atuar, dando origem a uma libertação mais controlada e direcionada. Com isto procura-se atuar unicamente em áreas específicas do organismo, ou seja, em células não saudáveis.

Os sistemas de entrega de fármacos têm assim o intuito de criar uma melhor terapêutica, tanto a nível de tratamento eficaz como na diminuição de efeitos indesejáveis associados.

Materiais siliciosos micro e mesoporosos, nomeadamente os zeólitos e sílicas mesoporosas ordenadas, como o MCM-41 e SBA-15 possuem diversas características texturais, no que diz respeito ao tamanho do poro, área superficial, porosidade, possibilidade de funcionalização da superfície, que os tornam compostos promissores na entrega eficaz de determinados agentes terapêuticos. Estes transportadores destacam-se por não apresentarem toxicidade e terem boa biocompatibilidade, o que os torna úteis e com elevado potencial em inúmeras áreas que englobam a química, nanotecnologia e medicina.

Neste âmbito, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar os transportadores de fármacos, nomeadamente materiais micro e mesoporosos, evidenciando diversos estudos onde se verifica vantagem na incorporação de agentes terapêuticos nestes ‘novos’ sistemas de entrega de fármacos, relativamente à administração convencional.

Palavras-chave: entrega de fármaco – drug delivery, materiais micro e mesoporosos, zeólitos, MCM-41, SBA-15, agente terapêutico, adsorção, libertação

ABSTRACT

With the current development of new therapeutic agents and due to the appearance of some collateral effects associated with the conventional administration of certain medicines, it became imperative the development of new ways of delivering specific drugs. New drug delivery systems involving a drug carrier have been continuously developed aiming to improve the therapeutic efficiency of the drug.

This new way of drug delivery contributed to a greater control of the rate level, the time period for the delivery of medicines and of the specific targets, giving rise to a more controlled and directed release. With this, it is intended to act uniquely in specific areas of our body, that is, on unhealthy cells.

The systems of drug delivery have, therefore, the purpose of creating better therapeutics not only in relation with an effective treatment, but also concerning the decrease of unwanted associated side effects

Siliceous materials micro and mesoporous, namely the zeolites and the mesoporous silicas ordered like the MCM-41 and SBA-15 have different texture characteristics concerning the size of the pore, superficial area, porosity, possibility of the surface functionalization, that transforms them into promising compounds in the effective delivery of certain therapeutic agents. These carriers stand out because they do not present toxicity and they have a good biocompatibility, which make them useful and with an increasing potential in several areas that encompass chemistry, nanotechnology and medicine.

In this context, the aim of this work is to revise drug transporters, namely micro and mesoporous materials, highlighting the various studies in which there is an advantage in the integration of therapeutic agents in these new systems of drug delivery, compared to the regular administration.

Key words: drug delivery, micro and mesoporous materials, zeolites, MCM-41, SBA-15, therapeutic agent, adsorption, liberation.

ÍNDICE REMISSIVO

ÍNDICE DE IMAGENS.....	VI
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
I. INTRODUÇÃO	11
1.1. Entrega de fármacos	11
1.2. Perspetiva histórica	14
1.3. Desafios atuais.....	16
1.4. Nanopartículas na entrega de fármacos.....	17
1.5. Objetivos do trabalho	19
II. SÍLICAS MESOPOROSAS ORDENADAS E MATERIAIS ZEOLÍTICOS.....	20
2.1. Materiais do tipo MCM-41 e SBA-15.....	20
2.1.1. Características estruturais.....	20
2.1.2. Funcionalização.....	21
2.2. Zeólitos.....	23
2.2.1 Características estruturais.....	23
2.2.2. Síntese e modificação.....	25
III. SÍLICAS MESOPOROSAS ORDENADAS NA ENTREGA DE FÁRMACOS..	27
3.1. Importância das características estruturais	27
3.1.1. Tamanho dos poros	27
3.1.2. Área superficial	36
3.1.3. Volume de poro.....	37
3.2. Funcionalização de sistemas de entrega de fármacos mesoporoso	38
3.3 Dosagem em Materiais Mesoporosos	48
3.4. Libertação estimulada do fármaco	50
IV. MATERIAIS ZEOLÍTICOS.....	54
4.1. Estudo e potencial desenvolvimento	54
4.1.1 Efeitos antioxidantes, anti-apoptóticos e anti-inflamatórios dos zeólitos	55
4.1.2. Efeito dos zeólitos na hemóstase/ zeólitos hemostáticos	56
4.2. Potenciação do 5-fluorouracilo encapsulado em zeólitos no tratamento do carcinoma colon-retal.....	56
4.3. Incorporação e libertação de óxido nítrico (NO) em sistemas microporosos EST-10 e análogos com alumínio (ETAS-10) e gálio (ETGS-10).....	64
4.4. Zeólitos ZSM-5 como sistemas de <i>drug delivery</i> e gentamicina	67
V. CONCLUSÃO	71
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

ÍNDICE DE IMAGENS

Figura I-1. Visão geral do sistema de desenvolvimento de processos de libertação controlada de fármacos desde a investigação básica até às aplicações clínicas	14
Figura I-2. Concentração de fármaco vs tempo. Níveis de concentração de fármaco não estável, de equilíbrio e mínima eficaz	15
Figura II-1. Mecanismo da estruturação do MCM-41	21
Figura II-2. Imagens de microscopia eletrónica de transmissão (TEM) de MCM-41 (a) e SBA-15 (b)	21
Figura II-3. Funcionalização da sílica mesoporosa pelos métodos da co-condensação e modificação pós-síntese	22
Figura II-4. Estruturas dos zeólitos A, Xe e Y	24
Figura II-5. Método de dessilicação e desaluminação	26
Figura II-6. Método de dessilicação	26
Figura III-1. Percentagem de libertação do ibuprofeno a partir do sistema de entrega de fármacos MCM-41 após 24 horas de administração, de acordo com o diâmetro do poro.....	28
Figura III-2. Estrutura química do ácido gálico	30
Figura III-3. Espectro de FTIR da MSN, MSN-GA e GA. Nesta figura são visíveis quatro bandas características, uma banda a 1628, 970 e 460 cm^{-1} que se devem à vibração resultante da flexão entre Si-OH e uma banda a 804 cm^{-1} que se associa ao alongamento simétrico de Si OH. Nas MSN-GA verifica-se uma diminuição da intensidade das bandas.....	30
Figura III-4. Perfis de libertação de MSN-GA, P1-MSN-GA e P2-MSN-GA num fluido gastrointestinal simulado	31
Figura III-5. Atividade antioxidante do ácido gálico libertado num fluido gastrointestinal simulado	32
Figura III-6. Quantidade de fármaco adsorvido por unidade de área de superfície BET vs o tamanho dos poros de um determinado sistema	34
Figura III-7. Quantidade de captopril incorporado nas diferentes amostras de sílica mesoporosa a) SBA-15, b) MCM-41 ₁₆ e c) MCM-41 ₁₂ , em função do tempo	35
Figura III-8. Taxa de libertação do captopril em sílica mesoporosa. a) CapH ₂ /SBA-15, b) CapH ₂ /MCM-41 ₁₆ , c) CapH ₂ /MCM-41 ₁₂	36
Figura III-9. Funcionalidade da parede dos poros em materiais mesoporosos de sílica e estrutura molecular de determinados fármacos de usados nesses sistemas.	38
Figura III-10. (A) Perfis termogravimétricos de nanopartículas amino-funcionalizadas e não amino-funcionalizadas carregadas com budesonida (MCM-41bud e MCM-41NH ₂ bud). (B) Comparação da carga de budesonida nas diferentes nanopartículas	43

Figura III-11. Liberação in vitro de budesonida a partir de MCM-41budC revestido com carbopol e de MCM-41 amino-funcionalizado com carbopol MCM-41NH ₂ budC a valores de pH de 6,8 (A) e 1,2 (B)	43
Figura III-12. Liberação de LDH de células HEP G2 tratadas com nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com budesonida: A) exposição de 24 e B) exposição de 48 h (A e B, respectivamente)	44
Figura III-13. Perfis de liberação de DOX do DOX @ MSN-NH ₂ . MSN-NH ₂	46
Figura III-14. Viabilidade celular de células A549 expostas a diferentes concentrações de MSN-NH ₂	47
Figura III-15. Viabilidade celular de células A549 expostas a diferentes concentrações de DOX @ MSN-NH ₂ e DOX livre após 24 horas de incubação (a), 48 horas de incubação (b) e 72 horas de incubação (c)	48
Figura III-16. Perfil de entrega de fármacos de materiais mesoporosos	49
Figura III-17 - Estímulos internos ou externos que estimulam os sistemas de entrega de fármaco de nanopartículas mesoporosas de sílica	51
Figura III-18. Entrega de fármacos sensíveis a estímulos internos. A) nanossistema sensível ao pH baseado em MSNs revestidos por polímeros; B) nanossistema sensível ao potencial redox, com base em MSNs funcionalizados com ligações dissulfeto e com nanopartículas inorgânicas; C) nanossistema sensível a enzimas, com base em MSNs revestidos com um polímero degradável	52
Figura III-19. Entrega de fármacos sensíveis/responsivos a estímulos internos, através de A) campos magnéticos alternativos (AM Field), B) ultrassons e C) luz visível	52
Figura III-20. Sistema de entrega de fármacos sensível ao pH, a partir de uma interação entre polimerizações PDDA e as partículas de sílica modificadas com ácido carboxílico negativamente carregado	54
Figura IV-1. Efeito dos zeólitos NaY (a), nanoNaY (b) e LTL (c) e dos sistemas de drug delivery na viabilidade de células HCT-15 do carcinoma do cólon. Incubação de células HCT-15 com zeólitos e com sistemas de drug delivery a diferentes durante 48 h. Zeólito sem fármaco (linha colorida), Sistema de drug delivery (linha preta)	58
Figura IV-2. Efeito dos zeólitos NaY (a), nanoNaY (b) e LTL (c) e dos sistemas de drug delivery na viabilidade de células RKO de carcinoma do cólon. Incubação de células RKO com zeólitos e com sistemas de drug delivery a diferentes durante 48 h. Zeólito sem fármaco (linha colorida), Sistema de drug delivery (linha preta)	58
Figura IV-3. Localização celular do zeólito NaY carregado com Rodamina B em linhas celulares de carcinoma do colon retal (setas a vermelho). Linha celular HCT-15: (a) - (d); Linha celular de RKO: (e) - (h); Controle: (a), (e) e (f); RB @ NaY: (b), (c), (d), (g) e (h)	59
Figura IV-4. Perfil de liberação de sistemas de entrega de fármaco (5-FU@ETS-10, 5-FU@NaY e 5-FU@NaA) a pH de 7,4 e a 37°C durante 60 minutos	61

Figura IV-5. Perfil de libertação de 5-FU@HZSM5 e de 5-FU@NaZSM5 numa solução a pH = 7,4 e a 37°C durante 60 minutos	61
Figura IV-6. Perfil de libertação de 5-FU@NaA em soluções a pH de 7,4; 5,8 e 2 a 37°C, durante 60 minutos	62
Figura IV-7. Espectro de FITR de a) NaY e b) EST-10, antes e após tratamento a pH 2	62
Figura IV-8. Efeito de a) ETS-10 e b) NaA e de sistemas de entrega de fármacos em células RKO.....	63
Figura IV-9. Estudo da adsorção de nitrogénio em compostos titanossilicato a -196°C.....	65
Figura IV-10. Perfil cinético da desadsorção de NO em microporos titanossilicatos em alto vácuo a 25°C, após adsorção a 80 kPa	65
Figura IV-11. Perfil cinético da adsorção de NO em microporos titanossilicatos a 80 kPa e a 25°C.....	66
Figura IV-12. Espectro UV/vis de uma solução de oxihemoglobina introduzida em materiais com NO como a) ETS-10, b) ETAS-10 e c) ETGS-10.....	67
Figura IV-13. Libertação de NO vs tempo na fase líquida	67
Figura IV-14. a) Eficiência da incorporação do fármaco nos zeólitos HAP e ZSM-5, numa solução de gentamicina com concentração =,216g/L; b) perfil de libertação do fármaco in vitro no Gent-HAPs e Gent-ZSM-5	68
Figura IV-15. a) e b) Imagens obtidas a partir do TEM, de zeólitos ZSM-5 em diferentes ampliações	68
Figura IV-16. a) Padrão de XDR; b) Espectro de FTIR de zeólitos	69
Figura IV-17. a) Imagens representativas do crescimento de bactérias nas HAPs (1), Gent-HAPs (2), ZSM-5 (3) e Gent-ZSM-5 (4), após um período de 24horas; b) eficiência antibacteriana contra a culturas Staphylococcus epider- midi	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I-1. Evolução dos sistemas de entrega de fármacos a partir do ano de 1950	16
Tabela III-1. Parâmetros texturais das diversas amostras preparadas (MSN, MSN-GA, PI-MSN, P1-MSN-GA, P2-MSN E P2-MSN-GA	29
Tabela III-2. Valores de libertação de ácido gálico contidos no MSN-GA, P1-MSN-GA e P2-MSN-GA, nos diferentes fluidos simulados	31
Tabela III-3. Quantidade de fármaco adsorvida em materiais de sílica mesoporosa	33
Tabela III-4. Exemplos de estrutura e dados químicos de sílica mesoporosa incorporada com captopril	37
Tabela III-5. Propriedades a nível das propriedades estruturais em materiais de sílica modificados com amina	40
Tabela III-6. Quantidade de fármaco adsorvida por diferentes materiais de sílica mesoporosa não funcionalizada	41
Tabela III-7. Quantidade de fármaco adsorvido após amina-modificação de amostras de sílica	41
Tabela III-8. Parâmetros e características dos poros de MSN, MSN-NH ₂ e DOX @ MSN-NH ₂	45
Tabela III-9. Valores da eficiência da retenção de doxorrobicina em MSN e MSN-NH ₂ com diferentes densidades de grupos amina	45
Tabela III-10. Valores de carga de DOX e da eficiência de DOX @MSN-NH ₂	46
Tabela IV-1. Incorporação de 5-FU nos sistemas de entrega de fármaco	57
Tabela IV-2. Valores IC ₅₀ de 5-FU, 5-FU @ NaY, 5-FU @ nanoNaY e 5-FU @ LTL para linhagens HCT-15 e RKO	59
Tabela IV-3. Incorporação de 5-FU em sistemas de entrega de fármacos	60
Tabela IV-4. Valores de IC ₅₀ para as linhagens RKO e HCT-15 com o 5-FU livre e incorporado em sistemas de entrega de fármaco	63
Tabela IV-5. Valores de IC ₅₀ para células MDA-MB-468 com o 5-FU livre e incorporado em sistemas de entrega de fármaco	64

LISTA DE ABREVIATURAS

APTE - 3-aminopropiltriétoxissilano

DOX - doxorubicina

DT - 1-[3-(trimetoxissilil)propil]dietileno-triamina (DT)

Human non-small-cell lung cancer cells -

IC₅₀ - 50% da concentração máxima inibitória

MSN - nanopartículas de sílica mesoporosa

NO - óxido nítrico

Particle-like - “tipo partícula”

Rod-like - “tipo bastão”

SPIONS - nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas

TEM - microscopia eletrônica de transmissão

I. INTRODUÇÃO

1.1. Entrega de fármacos

A entrega de fármacos tem como objetivo administrar uma determinada substância ativa *in vivo* de forma controlada e/ou dirigida, de modo a obter o máximo benefício terapêutico e minimizando os efeitos adversos.

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo moroso e dispendioso, pelo que, aumentar a eficácia e a segurança de fármacos já conhecidos é uma via bastante interessante do ponto de vista económico e social. Neste contexto, a libertação de fármacos a velocidade controlada, libertação lenta ou libertação direcionada são algumas das alternativas à administração convencional que têm sido intensamente estudadas [1].

Por outro lado, o crescente desenvolvimento de compostos farmacêuticos contribuiu para a necessidade de se criarem novos sistemas de entrega de fármacos – *drug delivery* - que estariam à altura dos desafios impostos pelas novas moléculas a testar. Entre os diversos métodos mais estudados, está a encapsulação de fármacos em nanopartículas orgânicas ou inorgânicas bem como novos sistemas baseados em microtecnologia. Estes novos sistemas, como seja a microinjecção, embora já se encontrem num estado avançado de desenvolvimento, revelam ainda obstáculos a ultrapassar de modo a alcançar o potencial pretendido e permitir uma administração do fármaco de forma mais eficaz [2,3]. Também o desenvolvimento de novas moléculas ativas e de possíveis terapêuticas como terapia génica, originou novos compostos/agentes terapêuticos e contribuiu para o aperfeiçoamento das formas de administração desses mesmos compostos [4].

Existem determinadas famílias de candidatos a medicamentos que incluem um amplo espectro de moléculas, como grandes biomoléculas - péptidos e proteínas - que podem ter baixa biodisponibilidade; pequenas moléculas com reduzida solubilidade em água e ainda potentes medicamentos com janelas terapêuticas reduzidas. As propriedades físico-químicas e farmacocinéticas destes novos fármacos fazem com que as vias de administração oral e intravenosa não sejam as mais adequadas [2].

A avaliação de novos fármacos e a otimização da evolução dos mesmos, torna-se limitada, uma vez que nem sempre existem sistemas adequados de entrega de fármacos [2]. A libertação controlada e direcionada de fármacos é uma necessidade em diversas áreas, tais como a imunologia, tratamento oncológico, terapia genética e administração de insulina. Há ainda a referir a existência de barreiras físicas no organismo humano como a barreira hematoencefálica, que separa os órgãos da circulação sanguínea, impedindo uma distribuição intravenosa convencional [2] e barreiras “simples” como a pele.

Atualmente, uma parte da investigação na área da entrega de medicamentos tem vindo a cingir-se essencialmente na libertação localizada e direcionada de fármacos. Esta área envolve igualmente o desenvolvimento ao nível da capacidade de carga dos portadores de fármacos, da

captação celular dos mesmos e ainda na liberação sustentada de fármacos no interior de células alvo. Os estudos sobre estes sistemas baseiam-se na entrega de medicamentos para o citoplasma da célula alvo sem efeitos tóxicos e nocivos para tecidos ou órgãos saudáveis [5]. No tratamento de determinadas patologias, há certos fármacos que devido à falta de especificidade para o tecido alvo, podem originar efeitos adversos, uma vez que há uma grande possibilidade de estes atuarem em células saudáveis, interferindo assim na eficácia do tratamento nas células alvo. Este problema verifica-se sobretudo em terapias anti tumorais e de forma a ser evitado, houve a necessidade de criar “reforços” nos sistemas de entrega dos fármacos. Estes originam uma liberação direcionada de fármacos, atuando unicamente em células não saudáveis e sem causar quaisquer efeitos indesejáveis [6].

A maioria dos sistemas de entrega de fármacos permite uma liberação controlada dos mesmos, ou seja, estes sistemas são formulações que controlam a taxa e o período de administração do fármaco - a dose do fármaco libertado ao longo do tempo - atingindo áreas específicas no organismo [4,7]. Esses sistemas devem permitir a carga e o transporte de uma determinada quantidade efetiva de fármaco causando assim menos efeitos colaterais agudos e crônicos. Para que se atinja esse objetivo, os sistemas de entrega de fármacos têm de cumprir certos requisitos, como [6]:

- haver biocompatibilidade entre o transportador, a substância ativa e o organismo humano;
- permitir uma carga elevada, conferindo proteção à molécula de fármaco;
- evitar a liberação do fármaco antes de alcançar o alvo terapêutico (liberação prematura nula);
- originar uma captação celular eficiente;
- permitir uma liberação endossomal efetiva;
- ter uma taxa de liberação controlada até atingir uma concentração local efetiva;
- ter a possibilidade de dirigir a atuação para células e tecidos-alvo.

Nas últimas décadas, foram desenvolvidas diferentes estratégias com o intuito de idealizar materiais para sistemas de entrega de fármacos e cumprir os requisitos acima mencionados. Criaram-se transportadores de base orgânica, tais como lipossomas e vários tipos de polímeros, incluindo dendrímeros. Estes têm sido usados como sistemas “inteligentes” permitindo a liberação de agentes terapêuticos em determinadas condições fisiológicas. Além disso, diversas descobertas baseadas em partículas inorgânicas e nanotubos de carbono têm também aberto novas e interessantes perspectivas nesta área [6].

A informação ao nível da cinética dos efeitos farmacológicos e do seu potencial depende da taxa de liberação e da hora de administração do fármaco. A administração controlada de um fármaco tem como objetivo a melhoria e tratamento dos sintomas. Desta forma, antes da fase de conceção e desenvolvimento dos sistemas de entrega de fármacos devem ser colocadas e

respondidas as seguintes questões ^[8]:

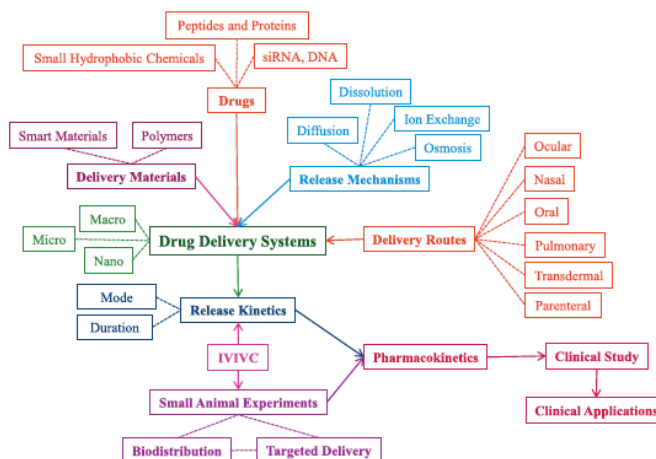
- 1- Quais são as características necessárias para que, o fármaco ou o dispositivo médico administrado, seja libertado e atue, exercendo o efeito pretendido?
- 2- Qual é a taxa de libertação, tempo ou alvo terapêutico ideal, de forma a haver distribuição/entrega adequada do fármaco?
- 3- Qual é o sistema de entrega mais adequado e que esteja em conformidade com o tempo e as taxas de libertação pretendidas, assim como o sítio de ligação do fármaco?

As questões atrás mencionadas foram respondidas de forma inversa, isto é, primeiro determinou-se qual o sistema de entrega de fármacos mais adequado para que haja a administração do novo fármaco. Em segundo, uma vez que não foram definidas as características que o sistema deveria cumprir para exercer efeito terapêutico, realizaram-se estudos farmacológicos com o intuito de otimizar um perfil mais adequado de entrega do fármaco selecionado. Por último, e consoante o efeito do fármaco num determinado indivíduo, é fundamental monitorizar as funções corporais do mesmo bem como controlar a extensão e o tempo de ação do fármaco, de forma a prevenir possíveis resistências ao mesmo ^[8].

O futuro dos sistemas de entrega de fármacos associa-se assim à capacidade desses mesmos sistemas conseguirem ou não superar os limites estabelecidos pela fisiologia humana, “sendo que o processo de desenvolvimento pode ser acelerado com as novas formas de pensar” ^[3].

Os sistemas de entrega de fármacos permitem que candidatos a fármacos com pouca solubilidade em água e que candidatos a fármacos com curto tempo de vida se tornem, respetivamente, fármacos de formulações terapêuticamente eficazes, e em fármacos de formulações de libertação sustentável. De acordo com as propriedades e características de cada fármaco, é importante que haja diferentes sistemas de fármacos e que estes tenham a capacidade de incorporar e libertar os vários agentes terapêuticos, mantendo as suas características e assim alcançar o efeito desejado ^[3].

Presentemente, a área de investigação, que envolve o tema da entrega de fármacos, é muito vasta, incluído diversos tópicos que vão da investigação laboratorial pura até às aplicações clínicas, tal como identificado na figura I-1.



.Figura I-1. Visão geral do sistema de desenvolvimento de processos de libertação controlada de fármacos desde a investigação básica até às aplicações clínicas [9].

A grande indústria farmacêutica tem assim vindo a reconhecer a entrega de fármacos como uma componente essencial e fundamental para futuras inovações e crescimento a nível farmacêutico, bem como os sistemas de entrega controlada de fármacos têm revelado ser uma das aplicações mais promissoras a nível dos cuidados de saúde humanos e representam um campo em constante evolução para a ciência dos materiais biomédicos [4].

Desta forma a nanomedicina arranja soluções para problemas de origem médica, visando assim o aumento da biodisponibilidade e redução de efeitos adversos causados pelos fármacos [10,11].

1.2. Perspetiva histórica

A entrega de fármacos através de sistemas de *drug delivery* sofreu um contínuo desenvolvimento nas últimas seis décadas. Iniciou-se em 1952, ano em que houve a primeira formulação a ser libertada de forma sustentada – a primeira formulação de libertação controlada foi introduzida por Smith Kline & French em 1952 para uma entrega de 12 horas de dextroanfetamina (Dexedrine) [12,13] - desde então, até ao final da década de 1970, a administração controlada de fármacos a nível de mecanismos de libertação de medicamentos diferentes, incluindo mecanismos de dissolução, difusão, osmose e permuta iónica, tem sido a mais difundida [9].

A primeira geração de entrega de fármacos decorreu entre 1950-1980 e focou-se sobretudo no desenvolvimento de sistemas de libertação sustentada oral e transdérmica e no estabelecimento de mecanismos adequados na libertação de fármacos [3,9].

A segunda geração ocorreu entre 1980 e 2010 [3,9], e baseava-se no desenvolvimento de sistemas de libertação de ordem zero, de sistemas de entrega de fármacos ‘autorregulados’, de formulações a longo prazo (*long-term depot formulations*) e ainda em sistemas de entrega

de fármacos com base em nanotecnologia. A última fase da segunda geração teve em atenção e deveu-se sobretudo ao estudo de formulações de nanopartículas [9].

No início dos anos 80, a investigação centrava-se no desenvolvimento de sistemas de entrega de ordem zero, pois pensava-se que este tipo de sistemas teriam uma cinética de libertação superior, uma vez que mantinham a concentração constante de fármaco no sangue, como é visível na figura I-2. Após uma década de inúmeros estudos, verificou-se que a entrega de ordem zero não era fundamental para o desenvolvimento de sistemas de entrega sustentável de medicamentos. Isto porque, a libertação de ordem zero não levava à manutenção de uma concentração constante do fármaco no sangue, o que é essencial para os sistemas de entrega oral, sobretudo devido às propriedades de absorção de fármacos, que diminuem sempre, durante o percurso que este faz desde o intestino delgado superior até atingir o intestino grosso. Desta forma, a concentração do fármaco diminui lentamente após se atingir um pico. Em segundo lugar, a manutenção da concentração constante de fármaco no sangue não é realmente necessária para a maioria dos medicamentos, porque a eficácia do fármaco continua a ser a mesma desde que a concentração do fármaco esteja acima do nível mínimo eficaz e abaixo da concentração mínima tóxica. Aliás, em alguns fármacos, como nitroglicerina, hormonas da hipófise e insulina, o nível sanguíneo constante pode não ser o ideal e pretendido. Foi necessário cerca de uma década para que houvesse o esclarecimento desse facto, no entanto, esse permitiu a existência de flexibilidade no design de futuros sistemas de entrega de medicamentos [9].

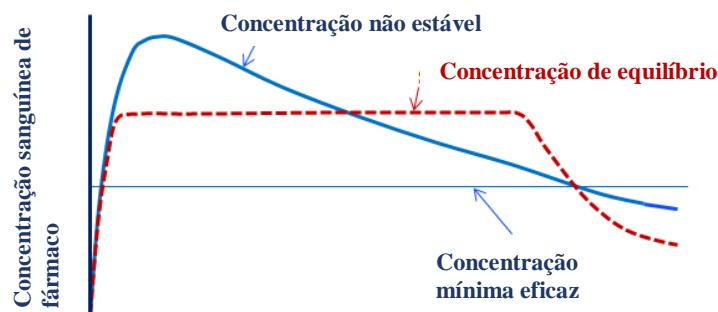


Figura I-2. Concentração de fármaco vs tempo. Níveis de concentração de fármaco não estável, de equilíbrio e mínima eficaz (adaptado de [9]).

Durante a segunda geração, foram desenvolvidas outras tecnologias de entrega de medicamentos e os denominados de polímeros e hidrogéis "inteligentes" foram expandidos de forma a criar sistemas de entrega que eram desencadeados por mudanças de fatores ambientais, como pH, temperatura ou concentração de glicose. Micropartículas biodegradáveis, implantes sólidos e implantes de formação de gel *in situ* foram utilizados para fornecer péptidos e proteínas durante meses. Zoladex® Depot foi o primeiro implante que foi introduzido em 1989 para entregar acetato de goserelina (análogo da hormona libertadora de gonadotrofina, responsável pela diminuição da produção de hormonas sexuais) durante um a três meses. Desde então, cerca de dez produtos clínicos foram introduzidos para administrar outros péptidos e

proteínas, o que refletia as dificuldades associadas ao desenvolvimento do produto. A última década da segunda geração dedicou-se ao desenvolvimento de sistemas de entrega de medicamentos baseados em nanotecnologia.

Os sistemas de entrega de fármacos da terceira geração surgiram em 2010, no entanto, foi preciso ultrapassar algumas barreiras físico-químicas e biológicas [9], nomeadamente, os problemas físico-químicos que resultavam da fraca solubilidade dos fármacos em meio aquoso, do elevado peso molecular de fármacos de péptidos e proteínas, e do difícil controlo da cinética na libertação de fármacos. No que diz respeito às barreiras biológicas, estas deviam-se sobretudo à distribuição dos sistemas de administração de fármacos pelo organismo, o que limitou a entrega do composto terapêutico a um alvo específico no organismo [3]. Além disso, a própria reação do organismo às formulações administradas limitava as suas funções *in vivo* no indivíduo, uma vez que poderia levar à degradação prematura da substância ativa [3,4]. Porém, a terceira geração de entrega de fármacos ainda não foi definida, sendo que a tabela I-1 evidencia apenas previsões [9].

Na tabela I-1 são descritas as três gerações de entrega de fármacos.

Tabela I-1. Evolução dos sistemas de entrega de fármacos a partir do ano de 1950 [9].

Year	
1950	1980
1st Generation	2nd Generation
<u>Basics of Controlled Release</u>	<u>Smart Delivery Systems</u>
Oral Delivery Twice-a-day or once-a-day	Zero-Order Release Zero vs first-order release
Transdermal Delivery Once-a-day, once-a-week	Smart Polymers & Hydrogels Environment-sensitive Self-Regulated Release
Drug Release Mechanisms Dissolution, diffusion, osmosis, and ion-exchange	Peptide & Protein Delivery Biodegradable depot
	Nanoparticles Tumor-targeted delivery Gene delivery
	3rd Generation
	<u>Modulated Delivery Systems</u>
	On-Off Insulin Release Glucose-sensitive release
	Targeted Delivery Anticancer drugs, siRNA
	Long-Term Delivery Systems 6-12 months with the minimal initial burst effect
	In Vitro-In Vivo Correlation Prediction of PK profiles from in vitro release study

1.3. Desafios atuais

Um dos principais problemas dos sistemas de entrega controlada e/ou dirigida de fármacos é a perda de atividade de vários medicamentos antes de atingirem o tecido alvo, devido à degradação prematura da substância ativa. De modo a reverter este obstáculo, surgiram sistemas que respondem a estímulos com libertação prematura nula; tratamentos a longo prazo que podem originar aumento ou diminuição da taxa de libertação do fármaco; sistemas de implantes que respondem a estímulos externos como campos magnéticos ou alterações internas do pH; sistemas de implantes de administração de fármacos que favorecem a libertação local dos mesmos no tecido alvo (como seja o tecido ósseo). Outra das estratégias para o controlo efetivo da libertação do fármaco é a funcionalização da superfície dos transportadores porosos

com espécies hidrofóbicas. Neste caso, as interações entre o fármaco e a superfície não são necessariamente aumentadas, mas o transporte de fármaco fora da matriz é impedido, uma vez que o meio aquoso não penetra facilmente dentro dos poros [4].

Os sistemas de entrega de fármacos de distribuição controlada têm que conseguir adaptar-se ao ambiente fisiológico durante a ingestão ou administração/implantação. Neste tipo de situações, exige-se ausência de toxicidade, em que após a administração/implantação do sistema de entrega de fármaco, este tem de conseguir incorporar-se no organismo durante um certo período de tempo, bem como restaurar, aumentar ou substituir determinadas funções de tecidos vivos ou órgão. É ainda de salientar que a função do material implantado é restringida pela sua biocompatibilidade a longo prazo, uma vez que depende dos efeitos do hospedeiro no material e dos efeitos do material no hospedeiro, o que origina um processo dinâmico e bidirecional. Desta forma, qualquer material implantado depende de determinados parâmetros, nomeadamente da forma, do tamanho e da composição química de material usado no implante em causa [4,14].

Os materiais implantados ou sistemas de entrega de fármaco implantáveis pretendem e tentam criar um equilíbrio adequado entre a resposta biológica que se idealiza e a libertação do fármaco de forma a atuar na inflamação ou processo de encapsulação [15]. Esta encapsulação resulta de uma resposta imunológica por parte das células, de modo a proteger o organismo. Há assim encapsulação do corpo estranho (implante) numa cápsula fibrosa. Esta cápsula pode ser considerada uma barreira, pois impede a difusão e libertação do fármaco, o que dificulta o efeito terapêutico. Um exemplo disso, é quando o sistema implantado com o fármaco é exposto à corrente sanguínea, nessa situação o sistema contacta com a corrente sanguínea, ocorre rápida adsorção de proteínas junto à superfície do mesmo, seguindo-se de adesão plaquetária, inserindo o sistema numa cápsula fibrosa. Este processo é assim um mecanismo de proteção do organismo, por parte de células imunológicas e inflamatórias [4,15].

Estes sistemas de entrega de fármaco implantáveis são criados de forma a armazenar e entregar doses pequenas e precisas de fármaco na corrente sanguínea ou em locais específicos de tecido, substituindo assim a administração diária de fármaco fundamental no tratamento de inúmeras patologias [14].

1.4. Nanopartículas na entrega de fármacos

Há mais de uma década que as nanopartículas - moléculas com um tamanho entre 1 e 100 nm [10] - têm sido um tema muito estudado no campo da investigação da entrega de fármacos. Dentro das nanopartículas, é importante destacar as nanopartículas porosas com elevada área superficial. Este tipo de transportadores foi identificado como sendo algo revolucionário nos sistemas de entrega de fármacos. Inicialmente, embora não houvesse evidência de que as nanopartículas fossem materiais adequados na utilização dos sistemas de entrega de fármacos, estes apresentavam propriedades “diferentes”, como uma grande área

superficial, um elevado volume poroso, a possibilidade de controlo do tamanho da partícula e uma boa biodisponibilidade ^[9,16], tornando-os assim potencialmente interessantes.

As nanopartículas com elevada área superficial podem ser úteis para determinadas aplicações, como por exemplo, para o aumento da taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis. O desenvolvimento da nanotecnologia envolvendo materiais ao nível da nanoescala tem-se revelado fundamental em inúmeras aplicações médicas, nomeadamente, na administração de fármacos e no diagnóstico de diversas patologias ^[9,16]. Desta forma, surgiu a necessidade de saber se os sistemas de entrega de fármacos baseados em nanopartículas, alcançariam uma entrega de fármacos direcionada. Diversos estudos na área da oncologia têm mostrado que existem sistemas de nanopartículas que permitem acumular mais fármaco no local do tumor quando comparados com outras formulações ^[9].

Foram feitos avanços significativos relativamente à manipulação das propriedades de nanopartículas, uma vez que estas podem ser administradas diretamente na corrente sanguínea com o intuito de entregar a maior parte da substância para o sítio alvo. Salienta-se ainda que o sucesso do tratamento tumoral e da terapia genética, entre outros, depende da capacidade que os sistemas de entrega de fármacos têm para atingir os objetivos pretendidos. Desta forma, o objetivo do estudo do uso de nanopartículas em sistemas de entrega de fármacos é produzir formulações com capacidade para exercer efeito terapêutico nas diversas patologias ^[9].

As propriedades físico-químicas e biológicas de um fármaco são responsáveis pela escolha do sistema de entrega do fármaco ^[3]. Por norma, a administração oral é a via mais utilizada na administração de fármacos. Porém fármacos com baixa solubilidade em água ou com permeabilidade muito fraca nas células, dificultam o desenvolvimento de formulações orais ^[3].

A produção de nanopartículas, assim como a modificação das propriedades físico-químicas e superficiais das mesmas, contribui para a formação de nanopartículas ‘‘inteligentes’’, permitindo desta forma uma entrega direcionada do fármaco. Os estudos relativos a este tema, centram-se sobretudo na administração e entrega direcionada de fármacos anti tumorais ^[3], visto que estas nanopartículas possuem determinadas propriedades que originam um melhor direcionamento do fármaco para o tecido tumoral, e conseqüentemente, menores efeitos adversos e toxicidade. Estas propriedades devem-se sobretudo à farmacocinética, farmacodinâmica e entrega intracelular ativa ^[10].

As nanopartículas de sílica nanoporosa, apresentam determinadas características a nível da porosidade e do tamanho de partícula, o que tem suscitado interesse por parte da comunidade científica, tornando-as excelentes materiais para a entrega de fármacos. Elas possuem mesoporos internos bem ordenados, com valores entre 2 a 6 nm, elevado volume de poros, normalmente de 0,6 a 1000 m²/g, uma área de superfície entre 700 a 1000 m²/g, um tamanho ajustável, forma robusta e ainda uma superfície fácil de modificar, o que as torna ideais no desenvolvimento de nanossistemas multifuncionais ^[17].

O estudo destas nanopartículas é importante, já que apresentam inúmeras vantagens na entrega de fármacos, tais como ^[17]:

- ter uma boa capacidade de interação com sistemas vivos;
- Ter uma similaridade em termos de tamanho, à escala micrométrica, com uma grande variedade de células;
- apresentar um bom controle do perfil farmacocinético do agente terapêutico incorporado, conseguindo manter uma concentração ideal e constante de fármaco por longos períodos de tempo, o que evita oscilações de concentração de fármaco na corrente sanguínea, diminuindo os possíveis efeitos adversos;
- conferir proteção aos agentes terapêuticos durante o seu percurso no organismo até atingir o alvo terapêutico pretendido, de forma a evitar qualquer degradação de fármaco incorporado;
- possuir boa capacidade para transportar mais do que um fármaco, o que permite atuar em terapias combinadas e combater tumores multirresistentes;
- integrar determinados agentes de contraste, que permitem acompanhar a evolução do tratamento em tempo real;
- responder a determinados estímulos, o que confere um maior controlo na libertação do fármaco, evitando assim a libertação prematura do agente terapêutico.

1.5. Objetivos do trabalho

A investigação na área da entrega de fármacos é bastante vasta devido, por um lado, ao elevado número e natureza de transportadores que podem ser considerados e, por outro, à elevada diversidade de agentes terapêuticos, candidatos a fármacos, e de aplicações médicas a estudar. Envolve necessariamente áreas diversas, embora relacionadas, como sejam a química, a ciência dos materiais, as ciências farmacêuticas e a medicina.

Tendo em atenção, que é impossível abranger toda a bibliografia, já que esta é uma área tão vasta, optou-se, devido à sua importância ao nível da investigação bem como às potencialidades de aplicação clínica, por se centrar apenas na análise bibliográfica desta monografia na entrega de fármacos, usando como transportadores materiais siliciosos micro e mesoporosos, tais como zeólitos e sílicas mesoporosas ordenadas do tipo MCM-41 e SBA-15. Será assim apresentada a bibliografia mais relevante no que diz respeito às diversas etapas dos estudos de entrega de fármacos envolvendo estes materiais.

II. SÍLICAS MESOPOROSAS ORDENADAS E MATERIAIS ZEOLÍTICOS

Ao longo dos anos, os estudos que envolvem sílica mesoporosa e zeólitos têm vindo a sofrer um crescimento evidente. Estes materiais têm sido testados como base para diversas aplicações biomédicas e usados como suporte na imobilização enzimática, em sensores óticos e eletroquímicos, na catálise heterogénica e na separação biomolecular [11,18–22].

No entanto, só em 2000, é que houve um crescimento relativamente ao uso de materiais derivados de sílica para fins biomédicos [22]. Os materiais começaram a ser estudados como sistemas de entrega de fármacos, uma vez que foi demonstrada a sua biocompatibilidade com os sistemas celulares durante este processo de entrega dos agentes terapêuticos [4,23–26]. Este tipo de sistemas permite, em determinadas condições, uma libertação controlada de fármacos. Neste contexto têm sido testados materiais como o MCM-41, SBA-15 e MCM-48, que apresentam determinadas características importantes para a entrega de fármacos, quer em sistemas de entrega sistémica, quer em dispositivos de entrega local sob a forma de implantes [4].

Este tipo de sistemas meso-estruturados foi classificado como sendo sistemas de entrega potencialmente eficazes [22], devido às suas características estruturais como a elevada área superficial, o volume de poro e porosidade, que proporcionavam um maior controlo a nível da libertação controlada e sustentável de diferentes substâncias farmacologicamente ativas [22,27–34].

A biocompatibilidade de um sistema de entrega de fármacos é essencial de modo a garantir a segurança e eficácia da substância ativa e também a adsorção e incorporação da mesma no sistema, evitando uma possível libertação do agente terapêutico antes de se atingir o tecido ou célula alvo. Como já foi referido, o uso destes sistemas tinha como objetivo a libertação controlada e sustentada das moléculas terapêuticas, cumprindo uma taxa de libertação ideal de modo a ser atingida a atividade terapêutica pretendida e com o menor número de efeitos adversos [22,35–39].

A dosagem e a taxa de libertação de um determinado fármaco pode ser controlada de forma eficaz, a partir da modificação de um ou mais parâmetros como a estrutura e composição da matriz [40,41], o tamanho do poro [42] [43], a entrada do poro [44,45] e da interação química entre o hospedeiro [46].

2.1. Materiais do tipo MCM-41 e SBA-15

2.1.1. Características estruturais

Sílicas mesoporosas ordenadas são sílicas que à escala atómica são amorfas, mas, que devido ao processo de preparação, apresentam um sistema ordenado de canais cujo diâmetro pode atingir mais de 100 Å. Os materiais mais representativos desta família são o MCM-41 (com

diâmetro de poro tipicamente de ca. 30 Å) e o SBA-15 (com diâmetro de poro entre 50 e 100 Å). Na sua preparação são usados surfatantes (MCM-41) ou polímeros de blocos anfifílicos (SBA-15), que nas condições de síntese formam um sistema micelar, o qual serve de molde à condensação da sílica. Este sistema micelar, depois de removido por extração com solventes apropriados ou calcinação resulta no sistema poroso final (figura II-1). Dependendo das condições de síntese e dos aditivos adicionais, podem ser preparados materiais com diâmetro de poro e de partícula variáveis.

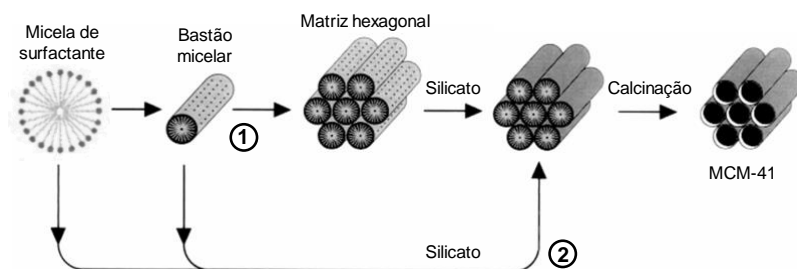


Figura II-1. Mecanismo da estruturação do MCM-41 ^[47].

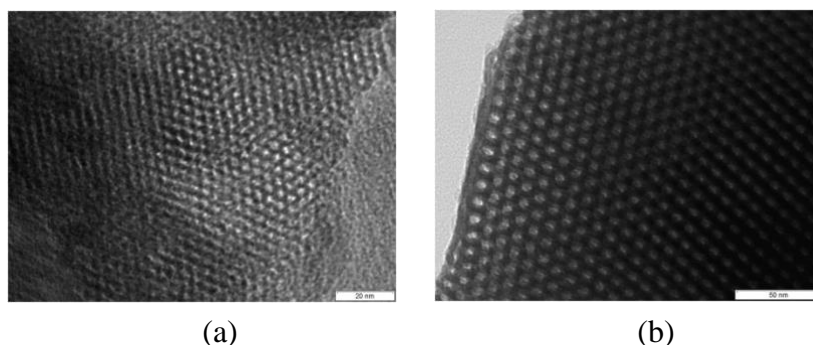


Figura II-2. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de MCM-41 (a) e SBA-15 (b) (adaptado de ^[48]).

Este tipo de materiais tem revelado um elevado potencial de aplicação em diversas áreas em que se incluem a química, a nanotecnologia e a medicina. A estrutura porosa que apresentam, com o sistema ordenado de canais de grandes dimensões, dá origem a uma área superficial que pode ultrapassar os 1000 m²/g. Estas características, associadas à flexibilidade de funcionalização da superfície, e devido à presença de grupos OH terminais, justificam o interesse no seu uso como suporte de catalisadores em que funcionam como nanorreactores e em sistemas de entrega de fármacos ^[49–52].

2.1.2. Funcionalização

As sílicas mesoporosas ordenadas, nomeadamente MCM-41 e SBA-15, apresentam propriedades texturais excepcionais que potenciam o seu uso em áreas que incluem a catálise,

suportes para cromatografia, libertação controlada de fármacos ou agroquímicos e desenvolvimento de implantes médicos. Para a utilização deste tipo de materiais nestas aplicações é necessário não só o controlo das suas propriedades texturais, mas também efetuar e controlar a funcionalização da superfície com moléculas orgânicas. De uma maneira geral, os grupos funcionais orgânicos podem ser imobilizados na superfície da sílica através de interações covalentes ou não covalentes, sendo que as ligações covalentes são na maioria dos casos as preferidas [53].

Uma das vantagens destes materiais é a existência de duas superfícies diferentes, a superfície exterior das partículas e a superfície interna dos canais. A estrutura mesoporosa oferece um efeito de confinamento cujo microambiente permite um encapsulamento de moléculas orgânicas protegidas do ambiente exterior.

A funcionalização deve ser decidida em função das características da superfície requeridas para determinada aplicação no que diz respeito às interações com o meio circundante. Por exemplo, pode ser considerada a imobilização de moléculas pequenas, péptidos ou anticorpos de modo a conseguir interações específicas com células e tecidos. A composição global tem um elevado impacto na farmacocinética das partículas num ambiente fisiológico.

De uma maneira geral a funcionalização pode ser feita por dois processos: co-condensação e modificação pós-síntese, visível na figura II-3.

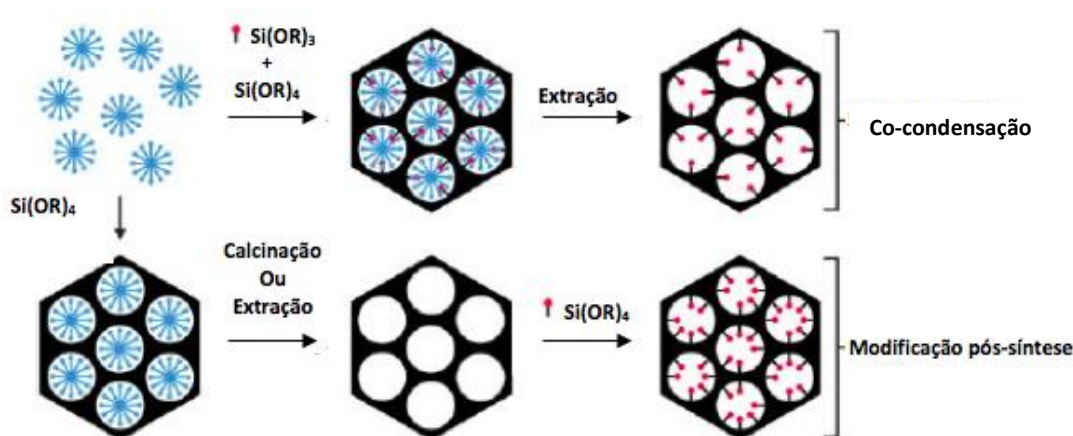


Figura II-1. Funcionalização da sílica mesoporosa pelos métodos da co-condensação e modificação pós-síntese (adaptado de [144]).

No método de co-condensação, um precursor com o grupo funcional desejado é adicionado à mistura que contém os componentes para a síntese da sílica mesoporosa. Deste modo, o produto final contém grupos orgânicos ancorados covalentemente às paredes dos poros de uma forma homogénea. Na maior parte dos casos, são usados organosilanos do tipo $\text{R-Si}(\text{OR}')_3$ como precursores. A razão para esta escolha é que estes compostos formam ligações

Si-C com alguma facilidade, facilitando a incorporação de uma grande variedade de grupos funcionais. Deve ser ainda notado que como a funcionalização é efetuada durante a síntese não ocorre geralmente o bloqueio dos poros. No entanto, esta abordagem tem como limitação a quantidade de organoalkoxisilano que pode ser incorporada, uma vez que estes podem ter um efeito significativo sobre as propriedades texturais do material mesoporoso. No processo de funcionalização por este método, a remoção do estruturante tem que ser obrigatoriamente efetuada através da extração com solventes.

A modificação pós-síntese é efetuada após a remoção do agente estruturante, baseia-se na reação de condensação de um determinado organosilano como $\text{RSi(OR}^{\prime})_3$, RSiCl_3 , ou $\text{HN(SiR}_3)$ e um silanol livre ($\equiv \text{Si-OH}$) ou geminal ($=\text{Si(OH)}_2$) da superfície, num solvente apolar como o benzeno ou tolueno. Embora uma grande variedade de grupos funcionais possa ser introduzida, verifica-se que ocorre com frequência alguma heterogeneidade na distribuição destas moléculas. Este comportamento tem sido atribuído a limitações difusionais associadas à estrutura porosa. Tendo em atenção que os silanóis localizados na superfície externa e abertura de poros são cineticamente mais acessíveis, a maioria dos grupos funcionais são incorporados na superfície externa das partículas e nas aberturas dos poros, o que pode levar ao bloqueio dos poros ^[54].

Existem ainda diversas variantes de funcionalização, quer por co-condensação quer por modificação pós-síntese, que permitem obter materiais com características diferenciadas e que podem envolver, por exemplo, a formação de uma cobertura polimérica das partículas ^[55,56].

2.2. Zeólitos

2.2.1 Características estruturais

Zeólitos, termo introduzido pela primeira vez pelo mineralogista Axel Fredrik ^[57], são compostos caracterizados por serem materiais microporosos, aluminossilicatos (minerais compostos por alumínio, silício e oxigénio) cristalinos que possuem uma estrutura com uma rede tridimensional bem definida ^{[58][59][60][61]}. A sua estrutura é constituída por tetraedros (TO_4) de SiO_4 e AlO_4^- , que se ligam entre si pelos vértices. Os tetraedros de Si e Al estão dispostos por diversos arranjos tridimensionais, o que origina um sistema de poros com um tamanho entre 4 a 12 Å, canais e cavidades, com uma elevada área superficial interna. Quando o Al se encontra presente na estrutura tetraédrica, a presença de catiões no interior dos poros e canais torna-se um requisito essencial uma vez que as cargas negativas dos tetraedros de AlO_4^- têm de ser compensadas ^{[58][60]}. Esses catiões de compensação, são por norma metais leves como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e prótons H^+ . Os poros dos zeólitos podem ainda ter no seu interior outras espécies, como grupos hidroxilo e espécies de alumínio extra-rede ^[58].

Os zeólitos apresentam uma grande variedade estrutural, sendo classificados de acordo com as dimensões dos seus poros. Existem zeólitos de poros pequenos, médios e constituídos

por anéis de 8,10 ou 12 átomos T ^[60]. A figura II-4 ilustra algumas das estruturas mais representativas da família dos zeólitos.

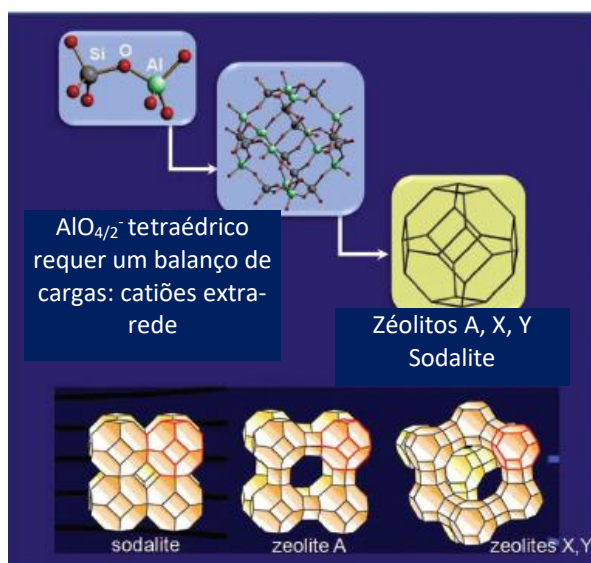


Figura II-2. Estruturas dos zeólitos ,A Xe e Y (adaptado de ^[114]).

Os zeólitos não apresentam toxicidade e têm boa biocompatibilidade, o que os torna úteis em aplicações biomédicas. A sua estrutura microporosa, ordenada e com uma elevada área superficial, faz com que sejam potenciais sistemas de entrega de fármacos, uma vez que quando comparados com materiais não porosos, permitem uma elevada incorporação de fármaco nos canais microporosos. Também a variedade de grupos funcionais que podem ser incorporados nestes compostos favorece uma melhor interação com o fármaco (normalmente por ligações de hidrogénio), o que possibilita uma melhor controlo da incorporação e libertação do fármaco ^[62].

A família dos zeólitos não consiste apenas em zeólitos convencionais com Si e Al, uma vez que a substituição isomórfica destes átomos origina outras estruturas. Existem assim análogos dos zeólitos, com outras composições e designados por zeótipos. Destes zeótipos destaca-se uma nova classe de aluminofosfatos (ALPOs). Esta foi descoberta nos anos oitenta e é formada por tetraedros de AlO₄ e PO₄, em que muitas das estruturas são análogos de zeólitos já conhecidos. A proporção entre alumínio e fósforo é muito próxima de um, o que indica que estas estruturas são eletro-neutras e não precisam de cátions de compensação. Quando uma parte dos átomos de P ou Al e P é substituído por átomos de Si, origina-se uma outra classe denominada de SAPOs - sílico-aluminofosfatos. Neste caso são necessários cátions de compensação, que sendo prótons originam sítios ácidos ^{[58][60]}.

Comparando as estruturas ALPO com os zeólitos, as ALPOs têm uma menor robustez, o que dificulta o tratamento térmico e/ou hidrotérmico, no entanto, têm uma maior facilidade na introdução de iões de metais de transição (Mn, Fe, Co) na rede cristalina, o que origina vantagens significativas na catalise de oxidação ^[60].

Os zeólitos possuem propriedades únicas, como a presença de centros ácidos, de grandes áreas superficiais (300-600 m²/g), alta capacidade para permuta iônica, alta estabilidade térmica e a existência de sistemas poros regulares que possibilitam a realização de reações catalíticas. A acidez da superfície tem-se revelado como uma das propriedades mais importantes destes compostos. Os tetraedros AlO₄⁻ conferem uma carga negativa, carga essa que tem de ser compensada pela existência de um catião metálico ou por um próton, o que origina um centro de Lewis ou um centro ácido de Bronsted, respetivamente. Nas pontes de oxigénio entre o átomo de alumínio e silício, estão localizados os prótons hidroxílicos. O reajuste da densidade eletrónica torna as ligações Al-O e Si-O praticamente idênticas e no caso dos zeótipos, a interação forte entre o Al-O enfraquece a ligação O-H, tornando o próton num ácido forte.

2.2.2. Síntese e modificação

Relativamente à sua síntese, os zeólitos são sintetizados em condições hidrotérmicas, onde um gel de sílico-alumina, de elevado pH, contendo fontes de Si, Al e catiões adequados, é sujeito a temperaturas entre 80 e 200°C e pressão moderadas, sofrendo um processo de cristalização lenta. Muitas vezes, usa-se um agente estruturante orgânico, como sal de amónio quaternário, de forma a direcionar a estrutura resultante do processo de cristalização numa estrutura com a arquitetura específica pretendida. Após a síntese, o zeólito é lavado e calcinado a temperaturas entre os 300 e 500°C, o que permite a eliminação de água, do agente estruturante e de outras moléculas existentes nos poros [58][59].

Algumas das características dos zeólitos podem ser, dentro de determinados limites, estabelecidas durante o processo de síntese. Entre estas características está a razão Si/Al que condiciona a acidez final, que em termos de número de centros ácidos que na natureza desses centros ácidos. No entanto, para uma parte significativa das aplicações são necessárias também modificações pós-síntese. A mais simples e mais comum é a permuta iônica em que os catiões de compensação são substituídos pelos mais adequados à função a que se destinam. Outras modificações mais severas e que podem implicar modificações estruturais são a remoção de átomos de Si ou Al da estrutura cristalina e que podem ou não ser substituídos por outros átomos.

A saída do silício (dessilicação) ou do alumínio (desaluminação) da estrutura do zeólito vai originar mesoporosidade. No entanto, há que ter em atenção que estas remoções podem danificar a estrutura do zeólito. Na figura II-5 e II-6 são visíveis os processos de dessilicação e desaluminação [59].

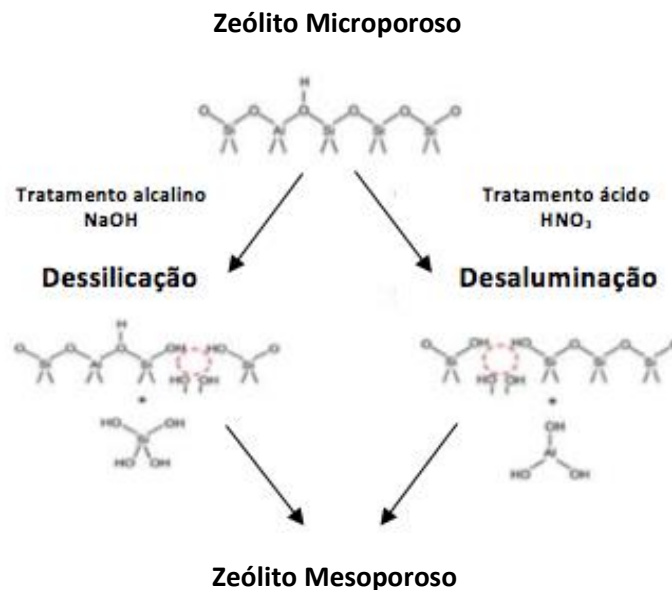


Figura II-3. Método de dessilicação e desaluminação (adaptado de [59]).

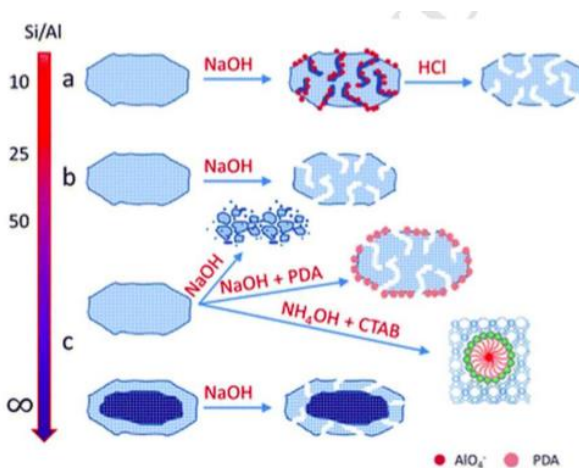


Figura II-4. Método de dessilicação (adaptado de [59]).

A dessilicação é um processo que ocorre em meio alcalino e consiste na perda de átomos de silício presente no zeólito. Este processo gera uma porosidade secundária no zeólito. Obtém-se assim um sistema secundário com mesoporos, mantendo-se o seu caráter microporoso e propriedades ácidas. A introdução deste sistema adicional de poros vai interferir nas propriedades estruturais e ácidas do material obtido, e por sua vez, essas novas propriedades afetam simultaneamente a atividade, seletividade e vida útil dos zeólitos usados no processo de catálise [59].

A desaluminação é um método de pós-síntese que consiste na perda de átomos de alumínio contido na estrutura do zeólito, para isso são precisos agentes químicos ou pode ser feito por tratamento hidrotérmico. Sempre que ocorre perda ou saída dos átomos de alumínio, há rutura parcial da estrutura do zeólito, com formação de lacunas. Essas originam uma

porosidade adicional, sobretudo na estrutura microporosa do zeólito. Porém é de notar que a remoção dos átomos de alumínio pode originar alterações nas propriedades ácidas do zeólito [59].

III. SÍLICAS MESOPOROSAS ORDENADAS NA ENTREGA DE FÁRMACOS

3.1. Importância das características estruturais

As matrizes mesoporosas têm demonstrado um elevado potencial para serem usadas como transportadores de fármacos. Estes transportadores são caracterizados por possuírem [4]:

- uma rede de poros ordenada, de tamanho homogéneo, o que permite um controlo cinético do encapsulamento e libertação do fármaco;
- um volume de poros considerável, com o intuito de suportar a quantidade necessária do fármaco;
- uma área superficial elevada, imprescindível à adsorção de fármacos;
- uma superfície com silanol que pode ser funcionalizada, permitindo assim um melhor controlo a nível da carga e libertação de fármacos.

Ao colocar-se a questão “Como é que os medicamentos devem ser incorporados numa matriz mesoporosa?” [4], chega-se à resposta que a partir da “imersão” da matriz mesoporosa numa solução de fármaco altamente concentrada, há adsorção do fármaco no sistema, o que sugere a incorporação de uma determinada substância ativa no sistema mesoporoso, baseando-se sobretudo nas propriedades de adsorção dos materiais mesoporosos [4].

Desta forma, as características atrás mencionadas tornam assim os materiais mesoporosos excelentes candidatos a sistemas controlados de entrega de fármacos.

3.1.1. Tamanho dos poros

O tamanho dos poros dos materiais mesoporosos influencia e determina o tamanho da molécula que pode ser adsorvida nos mesoporos, deste modo, a adsorção de moléculas na matriz mesoporosa é influenciada pela seletividade relativa do tamanho dos mesmos.

Poros com diâmetros ligeiramente maiores que as dimensões das moléculas do fármaco, numa razão de $\frac{\text{diâmetro do poro}}{\text{tamanho da molécula de F}} > 1$, permitem a adsorção de fármacos no interior dos poros. Uma das características mais importantes dos materiais mesoporosos é o facto de o diâmetro dos mesoporos poderem ser ajustados a partir de 1,5 nm até várias dezenas de nanómetros, podendo ser conseguido através da alteração do comprimento da cadeia do surfactante [63,64]. O processo de síntese destes materiais permite uma adaptação da estrutura

porosa, o que contribui para um melhor controlo da incorporação e da libertação de pequenas moléculas de fármaco nas mesmas ou até de macromoléculas, como proteínas. Isto acontece, já que a superfície pode ser facilmente modificada, o que origina a entrega controlada e direcionada de fármaco, contribuindo para uma melhor eficácia terapêutica com a diminuição de toxicidade [4,16].

As propriedades e peneiro molecular das sílicas mesoporosas e a polaridade do solvente são fatores fundamentais para a incorporação de fármacos. No entanto, quando os materiais mesoporosos são usados como sistemas de entrega de fármacos, o tamanho dos poros não exerce apenas uma função de peneiração molecular, mas também controla a taxa de libertação do fármaco.

Assim sendo, a importância do tamanho de poro foi evidenciada em vários estudos ao longo dos últimos anos. Quando o MCM-41 foi testado pela primeira vez como sistema de entrega do fármaco ibuprofeno [4,65] usou-se C12TAB - brometo de dodeciltrimetilamónio- e C16TAB – hexadeciltrimetilamónio, como agentes estruturantes da matriz. Este último originou uma matriz mesoporosa com um diâmetro superior à do produto preparado com C12TAB.

No primeiro caso, houve libertação de 55% de fármaco após um período de 24 horas, no segundo caso, libertou-se apenas 68% do fármaco também no mesmo período de tempo. Estes resultados confirmam assim a importância do tamanho dos poros no controlo da entrega e libertação de medicamentos [42], como é visível na figura III-1, em que o maior tamanho dos poros, permite uma maior taxa de libertação do fármaco, neste caso do ibuprofeno [4].

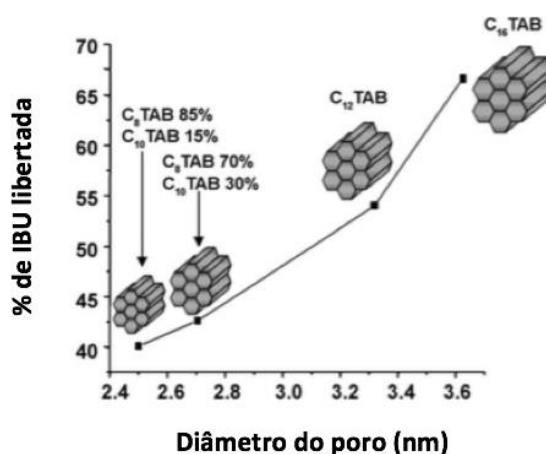


Figura III-1. Percentagem de libertação do ibuprofeno a partir do sistema de entrega de fármacos MCM-41 após 24 horas de administração, de acordo com o diâmetro do poro (adaptado de [4]).

Estudou-se também a incorporação de ibuprofeno numa estrutura mesoporosa MCM-48, que é uma estrutura cúbica com formato 3D. Foram usadas duas sílicas com tamanho de poro de 3,6 nm e 5,7 nm [4,66]. Incorporou-se o ibuprofeno nestas duas estruturas e verificou-se

que a libertação do fármaco foi mais rápida na que apresenta maior poro, o que indica que o tamanho do poro neste tipo de simetria também influencia a libertação [67].

A estabilidade da estrutura dos poros varia de acordo com o tratamento térmico efetuado para a remoção do agente estruturante. Este processo pode alterar a estrutura de poros e consequentemente a cinética de libertação do fármaco [7]. Embora o diâmetro e a forma dos poros influenciem fortemente a cinética de administração do fármaco, a quantidade adsorvida depende na maior parte dos casos da área superficial disponível para a essa adsorção e com as interações que são estabelecidas com a superfície.

Ladan Rashidi et. al. [68] prepararam sílicas mesoporosas do tipo MCM-41 com tamanho de poro variável nas quais adsorveram ácido gálico, um composto com propriedades antioxidantes e de importância farmacológica, nomeadamente potencial citotóxico, antifúngico, antiviral e anti-inflamatório e sem causar efeitos adversos nas células saudáveis. Neste caso, os resultados mostraram que a capacidade de adsorção depende do tamanho do poro e da química da superfície.

Avaliou-se o potencial de nanopartículas de sílica mesoporosa como nanotransportadores de moléculas de fármaco, ao nível de adsorção e libertação do mesmo e ainda a capacidade antioxidante do ácido gálico. Sintetizou-se nanopartículas de sílica com diferentes tamanhos de poro. Em seguida, simulou-se diferentes fluidos - fluído gástrico simulado (SGF) com um valor de pH de 1,2; fluído intestinal simulado (SIF) com um pH entre 6,8 e 7,4; fluído corporal simulado (SBF) com pH a 7,4 e fluído do trato gastrointestinal simulado (SGTIF) - e verificou-se a capacidade de adsorção das nanopartículas nos mesmos.

Tabela III-1. Parâmetros texturais das diversas amostras preparadas (MSN, MSN-GA, P1-MSN, P1-MSN-GA, P2-MSN E P2-MSN-GA (adaptado de [68]).

Amostra	Área de superfície BET (m²g⁻¹)	Volume de adsorção do poro (cm³g⁻¹)	Diâmetro do poro (nm)	Área de adsorção do poro (m²g⁻¹)
MSN	1206.6	0.8321	2.40	1178.9
MSN-GA	896.3	0.697	2.36	857.05
P1-MSN	1011.13	0.8472	2.44	1186.67
P1-MSN-GA	745.8	0.664	2.24	820.45
P2-MSN	992.4	1.037	3.44	1251.2
P2-MSN-GA	669.6	0.628	3.12	759.8

Na tabela III-1, foram preparadas amostras com diferentes diâmetros de poros e área superficial. Verificou-se que a área superficial e o volume poroso são menores nas nanopartículas de sílica com ácido gálico incorporado. Esta incorporação indica que houve uma

reação que modificou a superfície com consequente preenchimento dos poros das nanopartículas por ácido gálico.

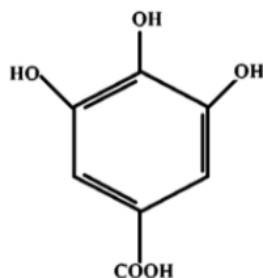


Figura III-2. Estrutura química do ácido gálico [68].

O espectro de FTIR das MSN [68] possui bandas de absorção características, que resultam da frequência vibracional de alongação dos grupos silanol existentes nas MSN [68].

A figura III-2 evidencia a estrutura química do ácido gálico, que é composto por três grupos hidroxílicos e um grupo carboxílico. Este composto associa-se às nanopartículas de sílica mesoporosa a partir dos átomos de silício. Assim sendo, a ligação das moléculas de ácido gálico à superfície de sílica diminuem o número de grupos silanol livres, reduzindo a intensidade das bandas de absorção das MSN, como é visível na figura III-3.

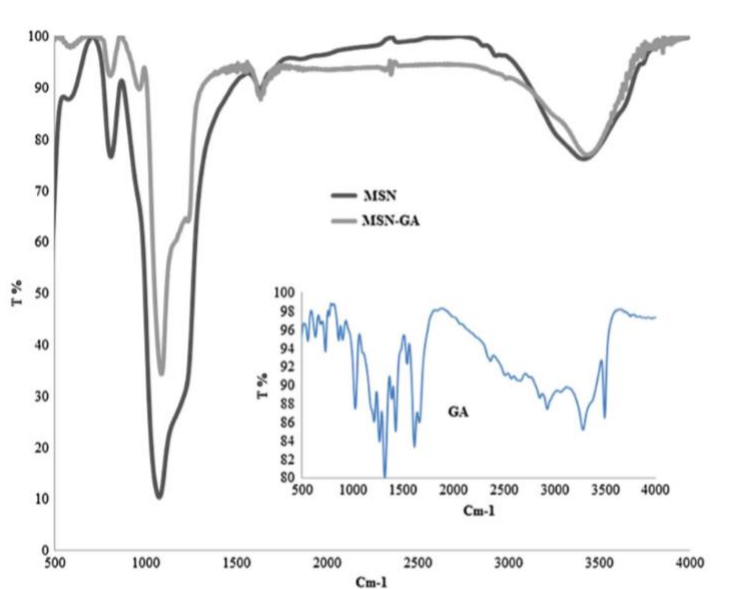


Figura III-3. Espectro de FTIR da MSN, MSN-GA e GA. Nesta figura são visíveis quatro bandas características, uma banda a 1628, 970 e 460 cm^{-1} que se devem à vibração resultante da flexão entre Si-OH e uma banda a 804 cm^{-1} que se associa ao alongamento simétrico de Si-OH. Nas MSN-GA verifica-se uma diminuição da intensidade das bandas. [68]

Na figura III-4, constatou-se que a libertação de ácido gálico aumenta proporcionalmente com o aumento do diâmetro do poro (MSN-GA < P1-MSN-GA < P2-MSN-

GA). Avaliou-se a liberação de ácido gálico num fluido gastrointestinal simulado (SGITF), cujos resultados estão na tabela III-2. Desta forma, à medida que o tamanho de poro aumenta, maior vai ser a quantidade de fármaco libertado. O ácido gálico encontra-se na sua forma aniônica em valores de pH entre 5-8 [69]. Fazendo ainda uma contextualização a nível dos fluidos simulados, sabe-se que a um pH superior a 7, vai haver desprotonação dos grupos hidroxilo e produzem-se todas as formas iônicas do ácido gálico [69]. Os grupos silanol das nanopartículas ficam desprotonados, originando uma forte repulsão eletrostática entre o agente terapêutico e a superfície de nanopartículas de sílica o que leva a uma maior liberação de composto terapêutico. Por outro lado, em meios com pH inferior a 5, como no caso de um fluido gástrico (pH = 1,2), apenas o grupo carboxílico do ácido gálico se encontra negativamente carregado [70], ocorrendo interação iônica entre o grupo carboxílico e os grupos OH da superfície de sílica e desta forma há menor liberação de fármaco.

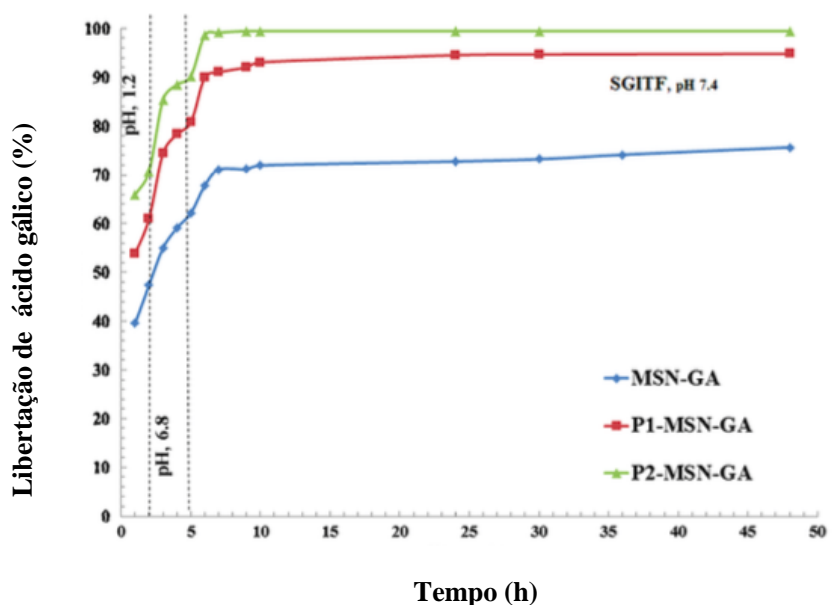


Figura III-4. Perfis de liberação de MSN-GA, P1-MSN-GA e P2-MSN-GA num fluido gastrointestinal simulado (adaptado de [68]).

Tabela III-2. Valores de liberação de ácido gálico contidos no MSN-GA, P1-MSN-GA e P2-MSN-GA, nos diferentes fluidos simulados

Amostra	Fluido gástrico simulado, pH = 1,2; após 2 horas (%)	Fluido intestinal simulado, pH = 6,8 – 7,4; após 5 horas (%)	Colon simulado, pH = 7,4; após 48 horas (%)
MSN-GA	47,3	62	75,6
P1-MSN-GA	55,6	82,2	96,2
P2-MSN-GA	62	90	99,7

Na figura III-5 avalia-se o poder antioxidante do composto terapêutico e é visível que este aumenta com o aumento do tamanho dos poros e com o aumento gradual da concentração de ácido gálico.

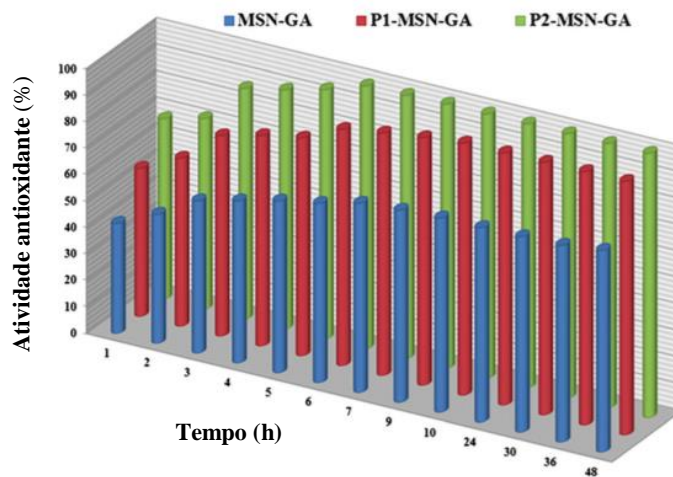


Figura III-5. Atividade antioxidante do ácido gálico libertado num fluido gastrointestinal simulado (adaptado de [68]).

A. Martín et. al. [22] estudou a incorporação de succinato de metilprednisolona sódica - composto com propriedades imunossupressores e anti-inflamatórias - em diversos materiais de sílica mesoporosa e como o tamanho do poro influenciaria a adsorção no mesmo.

De forma a compreender a capacidade de adsorção de fármacos, neste caso de corticóides, estudou-se o comportamento de diversos materiais de sílica mesoporosa, nomeadamente a relação entre as propriedades texturais e a capacidade de adsorção. O diâmetro dos poros do material de sílica influencia o acesso do fármaco aos sítios de adsorção. A partir da tabela III-3 e da figura III-6 conclui-se que valores de poros com maior diâmetro, como presente nos sistemas LP-SBA-15, ULP-SBA-15 e amostras de MCF, conseguem incorporar maior carga de fármaco enquanto que sistemas com menor diâmetro de poro, como SBA-3, MCM-41, SBA-16 e materiais de sílica MH, têm uma capacidade reduzida de incorporação, porém este último, ao ter uma morfologia helicoidal e alongado, é uma exceção, visto que tem um tamanho de poro reduzido, no entanto, consegue sustentar uma considerável quantidade de fármaco [22].

Tabela III-3. Quantidade de fármaco adsorvida em materiais de sílica mesoporosa (adaptado de [22]).

Material	Dp (Å)	Fármaco adsorvido (mg.g ⁻¹)	Fármaco adsorvido/ S _{BET} (mg.g ⁻¹)
SBA-3	18	59	0,041
MCM-41	28	70	0,066
MH	22	116	0,154
SBA-16	65	61	0,071
LP-FDU-12	123	95	0,219
SBA-15	83	109	0,147
PHTS	63	110	0,184
LP-SBA15	130	156	0,214
MCF	264	140	0,219
ULP-SBA15	300	122	0,314

Comparando materiais de sílica de estrutura hexagonal 2D (SBA-15 e LP-SBA-15) e estrutura cúbica 3D (SBA-16 e LP-FDU-12), observa-se que o material de sílica 2D tem melhor capacidade de adsorver moléculas de fármaco. Porém a divisão da quantidade de metilprednisolona que é adsorvida pela área superficial (fármaco adsorvido/ superfície BET), refere que adsorção depende unicamente do tamanho do poro do sistema de sílica mesoporo e não do tipo de estrutura. A figura III-6 relaciona a quantidade de fármaco adsorvido por unidade de área de superfície BET e o tamanho dos poros de um determinado sistema mesoporoso. Como é visível na mesma figura, materiais com um tamanho inferior, como o SBA-3 e MCM-41, têm impedimentos estéreos a nível da penetração das moléculas de fármaco nos poros, tendo menor adsorção. Em materiais de sílica com tamanho de poro intermédio como SBA-15 e PHTS não são visíveis impedimentos estéreo químicos. Relativamente ao material SBA-16, embora possua um elevado valor de tamanho de poro, a difusão de fármaco encontra-se comprometida, logo não é possível adsorver grandes quantidades de moléculas de fármaco. Por fim, materiais com tamanho de poro elevado como LP-FDU-12, LP-SBA-15, MCF, ULPSBA-15, possuem uma mesoporosidade que permite a entrada e a difusão de moléculas de fármaco, independentemente da sua mesoestrutura [22].

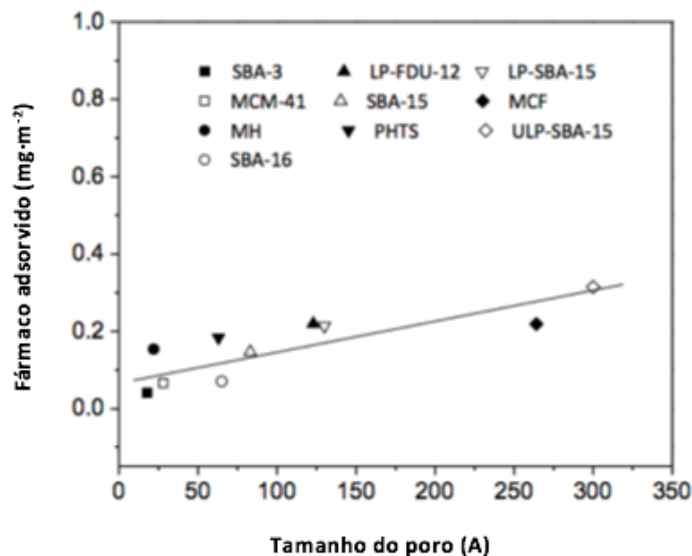


Figura III-6. Quantidade de fármaco adsorvido por unidade de área de superfície BET vs o tamanho dos poros de um determinado sistema (adaptado de ^[22]).

Num estudo feito por Qu et al. ^[71] foram sintetizados três sistemas de entrega - MCM-41₁₆, MCM-41₁₂ e SBA-15, que se associavam a três surfactantes diferentes C16TAB, C12TAB, e EO₂₀PO₇₀EO₂₀, respetivamente, e verificou-se uma vez mais, que o tamanho dos poros influencia a adsorção de compostos farmacológicos, neste caso do catopril - inibidor da enzima de conversão de angiotensina (IECA) - usado no tratamento de hipertensão arterial e insuficiência cardíaca.

Embora os sistemas MCM-41₁₂ e SBA-15 apresentem um tamanho de poro diferente, 2,01 nm e 9,37 nm, respetivamente, conseguem incorporar uma quantidade de fármaco semelhante, como verificado na figura III-7 e em trinta minutos conseguem atingir a carga máxima de fármaco. Ainda que o MCM-41₁₆ e SBA-15, revelem uma morfologia semelhante, a quantidade de fármaco incorporada é distinta, já que o MCM-41₁₆ possui um tamanho de poro menor, necessitando duas horas para atingir a carga máxima. Desta forma é possível afirmar que a incorporação rápida de fármaco pode ser alcançada a partir do aumento do tamanho de poro, como no caso do sistema SBA-15, ou a partir do tamanho reduzido das partículas de fármaco, como demonstrado no sistema MCM-41₁₂.

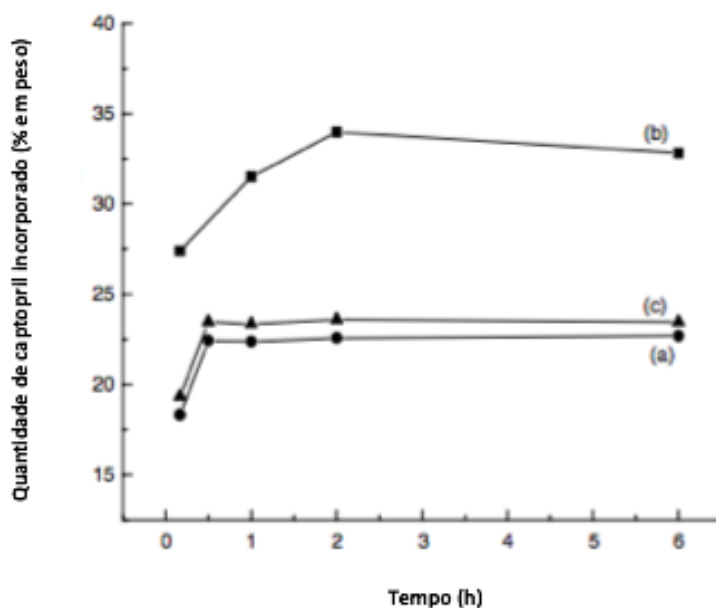


Figura III-7. Quantidade de captopril incorporado nas diferentes amostras de sílica mesoporosa. a) SBA-15, b) MCM-4116, c) MCM-4112, em função do tempo (adaptado de ^[71]).

A figura III-8 revela assim a taxa de libertação do fármaco da sílica mesoporosa num fluido de estômago simulado (pH=1,3). Constata-se que após trinta minutos, é atingida a carga máxima de fármaco (60%) no sistema CapH₂/SBA-15, e passadas duas horas, cerca de 78% do fármaco foi libertado e após dezasseis horas, tinha ocorrido a libertação total do mesmo. No caso do CapH₂/MCM-4116, ao fim de duas horas, houve uma incorporação máxima de fármaco (47%), porém para se atingir os 78% foram necessárias mais de doze horas, verificando-se uma libertação completa ao fim de 30 horas. Relativamente ao CapH₂/MCM-4112, a figura 16 (c) mostra que o fármaco teve uma rápida libertação, cerca de 20 horas, e sabendo que apresentava um tamanho e comprimento de poros inferior ao CapH₂/MCM-4116, é possível afirmar que esta taxa de libertação se devia ao menor comprimento do poro, uma vez que este é mais curto e permite assim uma mais rápida libertação do fármaco.

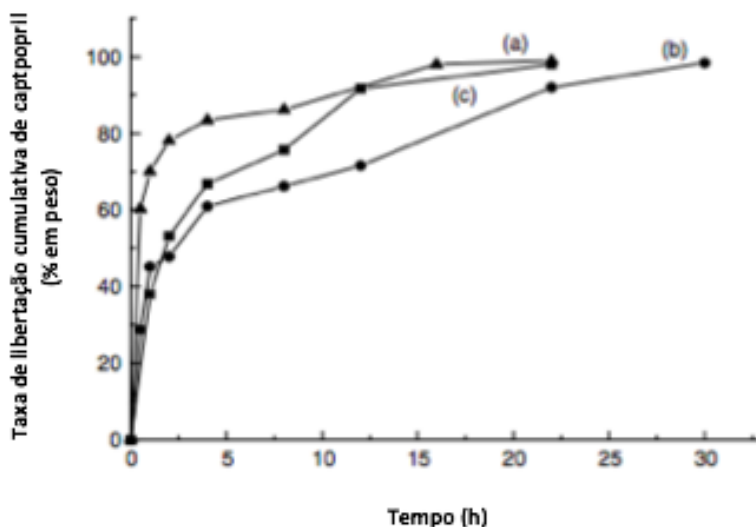


Figura III-8. Taxa de liberação do captopril em sílica mesoporosa. a) CapH₂/SBA-15, b) CapH₂/MCM-41₁₆, c) CapH₂/MCM-41₁₂ (adaptado de [71]).

3.1.2. Área superficial

Uma vez que a incorporação de fármacos se baseia sobretudo nas propriedades de adsorção, a área superficial do material mesoporoso torna-se o fator mais determinante para a quantidade de composto terapêutico a ser adsorvido. De um modo geral, é necessário incorporar determinadas quantidades de fármaco ou ter a possibilidade de incorporar fármaco na matriz, seja em doses altas ou baixas [7]. Assim sendo, sistemas mesoporosos com uma grande área superficial vão ter um maior potencial de adsorção e incorporação de medicamento no interior dos mesoporos [16].

A incorporação de fármacos pode ser abordada a partir de dois métodos diferentes: aumentando e/ ou reduzindo a área superficial ou modificando a afinidade entre a área de superfície e o fármaco a administrar. A primeira abordagem relaciona-se com a superfície disponível para as moléculas de fármaco, isto porque, enquanto que o tamanho dos poros permite que o fármaco seja incorporada na matriz, uma maior superfície contribui para uma maior adsorção de fármaco [4]. Outra forma de controlar a quantidade de fármaco adsorvido é através da funcionalização da superfície, que será discutida num ponto posterior.

Qu et al [71] sintetizaram um material mesoporo com estrutura hexagonal 2D – MCM-41 e SBA-15 - com valores de 1157 e 719 m²/g para a área S_{BET}, respetivamente. Ambas as matrizes foram carregadas com alendronato nas mesmas condições e os valores obtidos de adsorção máxima de fármaco foram 139mg/g para o MCM-41 e 83 mg/g para o SBA-15 [72]. Assim sendo, pode-se afirmar que a área superficial da matriz se relaciona com a adsorção de fármaco na matriz.

Tabela III-4. Exemplos de estrutura e dados químicos de sílica mesoporosa incorporada com captopril (adaptado de [71]).

Amostra	Morfologia	Parâmetro de rede d (nm)	Diâmetro do poro (nm)	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	Volume do poro (cm ³ g ⁻¹)	Captopril (wt %)
SBA-15	Rod-like	10,26	9,37	910	1,20	22,57
CapH ₂ /SBA-15	Rod-like	10,03	7,39	592	0,98	22,57
MCM-41 ₁₆	Rod-like	3,98	2,79	1211	1,18	33,99
CapH ₂ /MCM-41 ₁₆	Rod-like	3,91	2,17	914	0,58	33,99
MCM-41 ₁₂	Particle-like	3,09	2,01	940	0,82	23,60
CapH ₂ /MCM-41 ₁₂	Particle-like	3,09	1,65	580	0,55	23,60

A tabela III-4 permite comparar os valores do diâmetro de poro, da área superficial, do volume de poro e da percentagem de fármaco incorporado nas amostras - SBA-15, MCM-41₁₆, MCM-41₁₂ – com as amostras com o fármaco já incorporado – CapH₂/SBA-15, CapH₂/MCM-41₁₆, CapH₂/MCM-41₁₂. Em todos os materiais com a carga de fármaco, os valores do diâmetro de poro, da área de superfície e o volume do poro diminuíram. Esta diminuição em todos os parâmetros avaliados sugere que houve incorporação das moléculas de captopril, mantendo-se sempre a estrutura do mesoporo. Comparando ainda CapH₂/SBA-15 e CapH₂/MCM-41₁₆ é visível que o sistema CapH₂/SBA-15 possui um diâmetro do poro maior e uma menor área S_{BET} que o sistema CapH₂/MCM-41₁₆. Porém possui menor incorporação de fármaco (22,57%), logo é possível afirmar que a carga de fármaco depende sobretudo da área de superfície. Desta forma, o sistema CapH₂/MCM-41₁₆ é aquele que tem maior carga de fármaco, uma vez que é o que tem maior área de superfície.

3.1.3. Volume de poro

Os materiais de sílica mesoporosa apresentam um volume de poro até 1,2 cm³ g⁻¹ [71].

A interação entre o fármaco e os mesoporos é um fenómeno superficial, no entanto, as fracas interações medicamentosas podem favorecer condições de incorporação e ainda levar ao preenchimento dos poros. Neste caso, o volume de poros é um fator fundamental na determinação da quantidade de fármaco adsorvida. A existência de várias cargas consecutivas de fármaco em materiais mesoporos ordenados originam um maior preenchimento dos mesoporos, o que se deve sobretudo ao aumento das interações intermoleculares de fármacos com o interior dos poros, pelo que poros de maior volume podem contribuir para uma melhor adsorção e, conseqüentemente, numa maior carga de fármaco [4,16,73].

3.2. Funcionalização de sistemas de entrega de fármacos mesoporoso

O desenvolvimento de materiais de sílica mesoporosos na libertação controlada e entrega de fármacos baseia-se principalmente na modificação ou funcionalização da superfície através de grupos orgânicos [44,74–76]. Este processo origina inúmeras possibilidades a nível do controlo de adsorção e libertação de fármacos. A sílica mesoporosa revelou ter uma alta densidade de grupos silanol, que podem ser utilizados para obter superfícies com diferentes características através da ligação a diversos grupos funcionais. Na figura III-9 são observados alguns dos grupos funcionais mais comuns e alguns fármacos a eles associados, estudados por Vallet-Regí M et al. [4], em 2007. A libertação de fármaco pode ser controlada por diferentes métodos, sendo que o mais usado se baseia no tipo de interação entre o fármaco e a superfície. Nesta abordagem, a superfície submete-se a uma funcionalização com grupos funcionais, o que permite a ligação das moléculas do fármaco a partir de ligações iónicas ou covalentes, como por exemplo, através de grupos éster [4,77].

A introdução dos grupos amina na superfície de sílica, um dos grupos funcionais mais usuais, pode ocorrer a partir de dois métodos – co-condensação [46,78] e pós-síntese [79,80] – sendo que o acesso aos grupos funcionais introduzidos é maior no segundo método, que resulta da interação de espécies de organosilano com os grupos silanol na superfície de sílica, originando fortes interações entre as moléculas de fármaco e as porções organosilano introduzidas na superfície de sílica [45] [81] [82]. A adsorção de moléculas de fármacos a grupos funcionalizados de amina ocorre essencialmente através de interações eletrostáticas, pontes de hidrogénio e interações hidrofílicas – hidrofóbicas. Para além da adsorção, a incorporação de grupos amina também permite controlar a libertação de moléculas de fármaco.

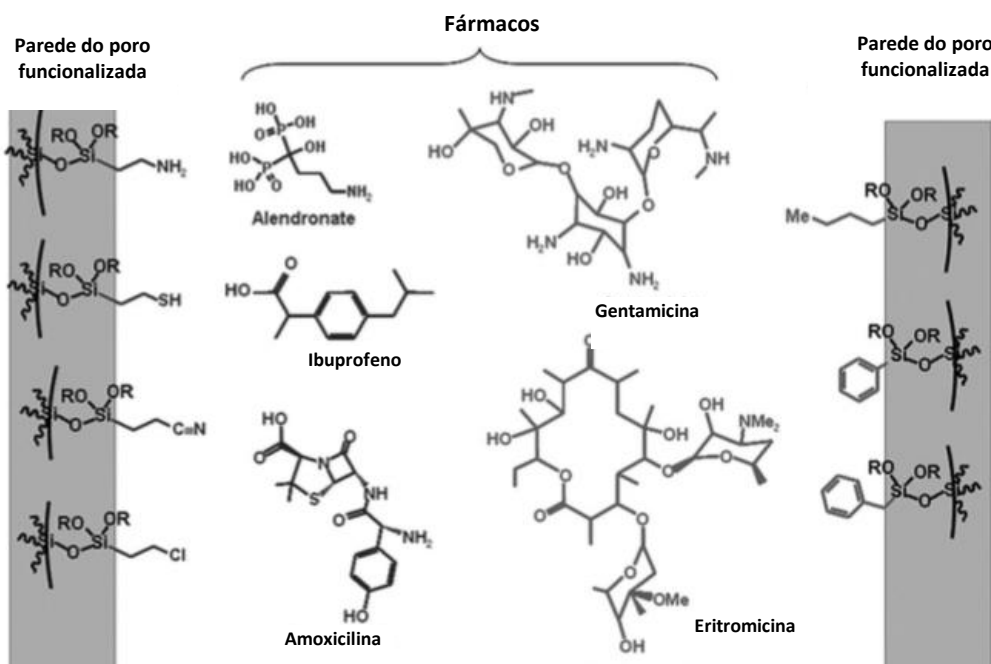


Figura III-7. Funcionalidade da parede dos poros em materiais mesoporosos de sílica e estrutura molecular de determinados fármacos de usados nesses sistemas (adaptado de [4]).

Vallet-Regí M et al. ^[4]^[83] realizaram um estudo sobre uma amina funcionalização de materiais baseados em sílica mesoporosa como MCM-41 e SBA-15. Ambos os sistemas de entrega continham alendronato - composto usado para reparação e regeneração óssea, que pertence aos bisfosfonatos, responsável pela inibição da reabsorção óssea por parte dos osteoclastos. Os dois sistemas sofreram uma modificação amina a nível da superfície das paredes dos poros. Após um período de 24 horas numa solução aquosa de alendronato, os materiais modificados com grupos amino revelaram ter uma carga de fármaco três vezes superior à verificada em materiais não modificados. Este comportamento pode ser explicado pelas diferentes interações entre os grupos fosfonatos no alendronato com os grupos silanol nos materiais não modificados e com os grupos amino que rodeiam a superfície dos mesoporos nos materiais modificados. Em condições de incorporação de fármaco, a pH de 4,8, a interação entre os grupos silanol de um material não modificado com o grupo fosfonato do fármaco adsorvido é mais fraca que a interação observada entre os grupos amino do material modificado e os grupos fosfonato do fármaco. A adsorção de alendronato em materiais modificados com grupos amino foi 22% em SBA-15-NH₂ e 37% em MCM-41-NH₂. Nos materiais não modificados as cargas de alendronato foram de 8% no SBA-15 e 14% no MCM-41, é assim possível afirmar que a carga de fármaco é maior em materiais modificados e que a taxa de libertação de bifosfonato, que é adsorvido pode ser influenciada pela modificação da superfície do poro, através de moléculas orgânicas. Porém, a pH fisiológico (7,4), as diferenças de polaridade entre a superfície de sílica com ou sem amina modificação com o bifosfonato, induzem a uma mais fraca adsorção de moléculas de fármaco, que por sua vez são também libertadas mais lentamente ^[4].

Outra estratégia usada para melhorar o controlo da libertação de fármacos foi a funcionalização da superfície através de espécies hidrofóbicas. Neste tipo de situações, as interações entre a superfície e o fármaco, não são necessariamente aumentadas, impedindo a libertação de fármaco para fora da matriz, uma vez que o meio aquoso tem dificuldade em atingir os mesoporos. Um exemplo disso é a funcionalização da superfície de SBA-15 ^[84], com grupos octil e octadecil de alcóxissilanos, o que origina uma diminuição do tamanho dos poros, assim como a diminuição da molhabilidade da superfície por soluções aquosas. Esta estratégia permitiu que houvesse libertação controlada de determinados fármacos, como por exemplo de eritromicina. Desta forma, adaptando as propriedades da sílica mesoporosa, consegue-se assim controlar a libertação de fármacos.

A. Martín et. al. ^[22] estudaram a incorporação de grupos amino - através do composto 1-[3-(trimetoxissilil)propil]dietilenotriamina (DT) na superfície de sílica. Neste estudo verificou-se a partir de TEM, que após funcionalização com grupos amina DT, a sílica mesoporosa apresentava uma mesoestrutura cúbica e hexagonal bem organizada ^[22].

A tabela 6 sintetiza as propriedades a nível estrutural, os valores do potencial zeta e o teor de nitrogénio em amostras funcionalizadas com grupos amina. Comparando a tabela III-5 com a tabela III-6, verifica-se que a incorporação de grupos amina influencia as propriedades a

nível de textura, devendo-se sobretudo à ligação dos grupos amina com o silanol da superfície de sílica. Existe uma diminuição acentuada nas amostras SBA-15-10DT, MCM-41-10DT e MCF-10DT, em que a área superficial diminuiu de 743 para 337 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, de 1056 para 433,2 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ e 640 para 272 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, respetivamente [22]. No entanto, é de referir que esta diminuição não contribuiu para o bloqueio dos poros, uma vez que o volume dos mesmos permaneceu elevado.

Para observar o efeito dos grupos amina incorporados na superfície de sílica pura, mediu-se os valores de potencial zeta dos diferentes materiais de sílica (sílica funcionalizada e não funcionalizada com DT) – tabela III-5 e III-6 e apurou-se que os valores de potencial zeta e das cargas da superfície de sílica ficavam positivos após síntese com grupos amina. O potencial zeta também se tornou mais elevado, o que originou maiores interações eletrostáticas entre as moléculas de fármaco e os materiais de sílica modificada. Estes valores confirmam assim a forte ligação covalente entre os grupos silanol e os grupos DT.

Tabela III-5 – Propriedades a nível das propriedades estruturais em materiais de sílica modificados com amina (adaptado de [22])

Material	S_{BET} ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	V_p ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Dp (Å)	Potencial Z (mV) pH = 7,4	Conteúdo de N ($\text{mmolH/g}_{\text{MAT}}$)	Rendimento do conteúdo orgânico (%)
SBA-3-10DT	371	0,19	11,4	13,9	4,43	98,4
MCM-41-10DT	433	0,41	21,0	13,2	4,4	97,8
MH-10DT	168	0,16	21,6	10,3	4,00	88,9
SBA-16-10DT	86	0,11	58,1	13,6	4,40	97,8
LP-FDU-12-10DT	110	0,25	82,5	10,3	4,00	88,9
SBA-15-10DT	371	0,62	70,0	13,3	4,43	97,8
SBA-15-30DT	263	0,50	65,0	15,7	5,50	65,0
PHTS-10DT	112	0,17	55,6	12,8	4,26	94,7
LP-SBA-15-10DT	259	0,68	98,4	13,8	4,48	99,6
LP-SBA-15-30DT	187	0,50	93,2	14,2	4,90	74,0
MCF-10DT	272	1,32	207	12,9	4,22	93,8
MCF-30DT	196	0,97	159	13,6	5,21	69,0
ULP-SBA-15-10DT	84	0,30	280	12,9	4,28	95,1

Tabela III-6 – Quantidade de fármaco adsorvida por diferentes materiais de sílica mesoporosa não funcionalizada (adaptado de ^[22]).

Amostra	Estrutura	S _{BET} (m ² .g ⁻¹)	V _p (cm ³ .g ⁻¹)	Dp (Å)	Potencial Z (mv) pH = 7,4
SBA-3	2D hexagonal	1422	0,65	18	-10,8
MCM-41	2D hexagonal	1056	0,87	28	-16,1
MH	2D hexagonal	752	0,64	22	-10,3
SBA-16	3D cúbica	858	0,66	65	-8,85
LP-FDU-12	3D cúbica	433	0,60	123	-15,5
SBA-15	2D hexagonal	743	1,09	83	-15,9
PHTS	2D hexagonal	598	0,62	63	-12,6
LP-SBA-15	2D hexagonal	730	1,22	130	-13,8
MCF	3D cúbica	640	2,33	264	-13,9
ULP-SBA-15	2D hexagonal	388	0,78	300	-12,4
Metilprednisolona	-	-	-	-	-23

Tabela III-7. Quantidade de fármaco adsorvido após amino-modificação de amostras de sílica (adaptado de ^[22]).

Amostra	Dp (Å)	Fármaco adsorvido (mg.g ⁻¹)	Fármaco adsorvido/ conteúdo de N (mg.mmol N ⁻¹)
SBA-3-10DT	11,4	249	56,2
MCM-41-10DT	21,0	421	95,7
MH-10DT	21,6	353	88,2
SBA-16-10DT	58,1	404	91,8
LP-FDU-12-10DT	82,5	474	118,5
SBA-15-10DT	70,0	460	103,8
PHTS-10DT	55,6	450	105,6
LP-SBA-15-10DT	98,4	469	104,7
MCF-10DT	207	500	118,5
ULP-SBA-15-10DT	280	465	108,6

Analisaram-se materiais de sílica mesoporosa com diferentes teores de grupos amina – 10% (SBA-15-10DT E MCF-10DT) e 30% (SBA-15-30DT E MCF-30DT) - e é demonstrado na tabela III-5, que materiais de sílica com um teor 30% origina uma maior adsorção de fármaco e uma menor libertação do mesmo. Os resultados são explicados pelas interações mais fortes entre as porções de fármaco e a dietiletriamina incorporada nos materiais de sílica. Em materiais de sílica com um teor de 10% não existem silanóis para reagir com os grupos de amino-organosilanos ou o acesso aos de organosilanos é impedido. Esta funcionalização contribui assim para a formação de um maior número de sítios de adsorção, aumentando a adsorção do fármaco.

A tabela III-7 evidencia a quantidade de fármaco que é adsorvido por miligrama de material de sílica funcionalizada e por quantidade de azoto contida nos diferentes materiais de sílica modificada com grupos amina. É assim visível que os materiais de sílica funcionalizada

apresentam maior carga de fármaco quando comparados com os materiais de sílica não funcionalizados. Este resultado deveu-se ao facto de as interações eletrostáticas entre o fármaco adsorvido, neste caso a metilprednisolona e as superfícies de sílica - amina serem mais fortes, do que as interações eletrostáticas obtidas entre o fármaco em estudo e o material de sílica não funcionalizado.

Sendo que o processo de funcionalização de materiais de sílica mesoporosa pode melhorar a capacidade de adsorção e libertação de um determinado fármaco, K. Yoncheva et al. [85] sintetizaram amostras de sílica mesoporosa amina ou não amina funcionalizada, onde adicionou carbopol - agente modificador - com capacidade de criar fortes interações que poderiam prolongar a permanência do fármaco no tecido ou órgão alvo. Neste caso, utilizou-se budenosida, fármaco com um potente efeito anti-inflamatório, usado no tratamento da asma, de rinite não infecciosa e de doenças inflamatórias intestinais, como por exemplo, a doença de Crohn. Essa inflamação pode afetar o trânsito intestinal e ainda a absorção do fármaco, quando administrado por via oral, daí a necessidade de incorporar moléculas de budenosida em nanopartículas. Logo, uma terapêutica oral eficiente com este fármaco depende da capacidade do sistema de entrega para libertar o fármaco e da capacidade de prolongar o seu tempo de permanência no local pretendido [86].

A modificação das nanopartículas de sílica com carbopol pretende diminuir a libertação imediata de budenosida e prolongar o seu tempo de permanência no tecido inflamado [87]. Contudo, este revestimento do material de sílica pelo polímero, só seria benéfico após incorporação do fármaco, pois se o revestimento acontecesse primeiro, os transportadores de sílica ficariam bloqueados, o que impedia a incorporação do fármaco. Quantificou-se a quantidade de budenosida incorporada nos mesoporos das nanopartículas. O MCM-41 não funcionalizado tinha uma menor capacidade de adsorção (40%), contrariamente ao MCM-41-NH₂ que teve uma capacidade de adsorção superior (49%) – figura III-10. (B). Conclui-se que há maior incorporação de fármaco em sílicas amina funcionalizadas, devido às interações por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo da budenosida e grupos amina da superfície funcionalizada.

Simulou-se um meio *in vivo* do trato gastrointestinal – valores de pH de 1,2 e 6,8 - em condições de revestimento com ou sem carbopol. Por norma, a budenosida é maioritariamente adsorvida pelos poros dos transportadores amina. A carga de budenosida em MCM-41-NH₂-bud e MCM-41-NH₂-budC é muito semelhante (figura III-10. (B)), porém o perfil de libertação varia, ou seja, enquanto o fármaco incorporado em MCM-41-budC é libertado num período de 3 horas, o fármaco carregado em MCM-41-NH₂-budC sofre libertação em 24 horas, o que sugere uma maior estabilidade da camada de revestimento devido às ligações COO-NH₃ entre os grupos carboxilo do carbopol e grupos amina da sílica funcionalizada. Conclui-se que o carbopol influencia essencialmente a taxa de libertação do fármaco e não a adsorção.

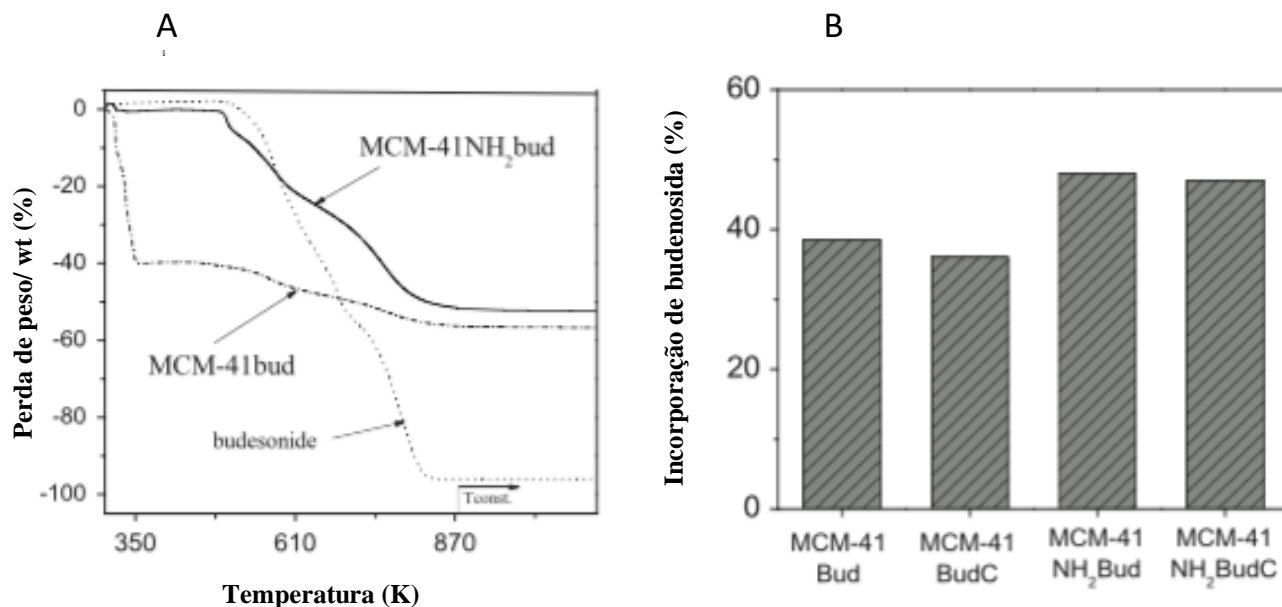


Figura III-10. (A) Perfis termogravimétricos de nanopartículas amino-funcionalizadas e não amino-funcionalizadas carregadas com budesonida (MCM-41bud e MCM-41NH₂bud). (B) Comparação da carga de budesonida nas diferentes nanopartículas (adaptado de ¹⁸⁵¹).

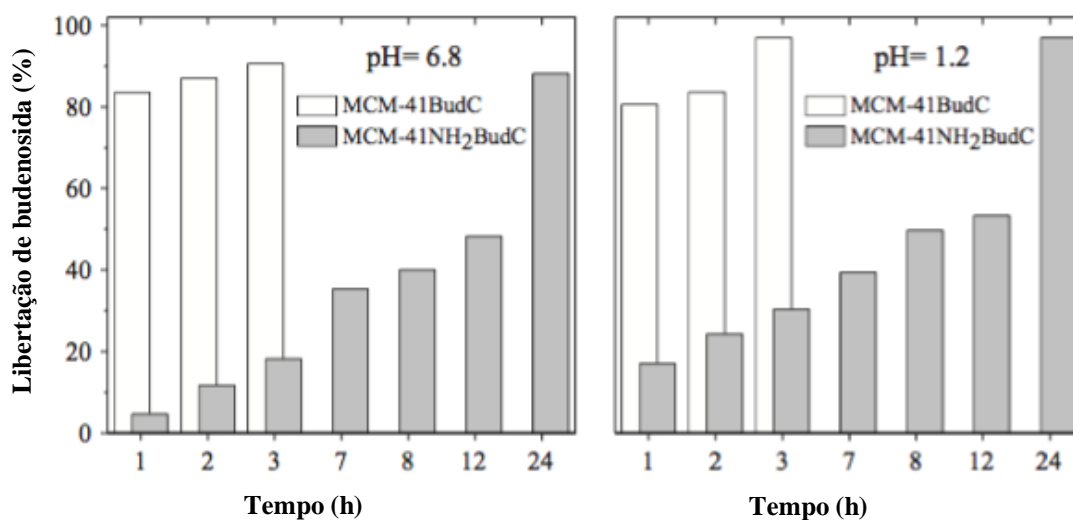
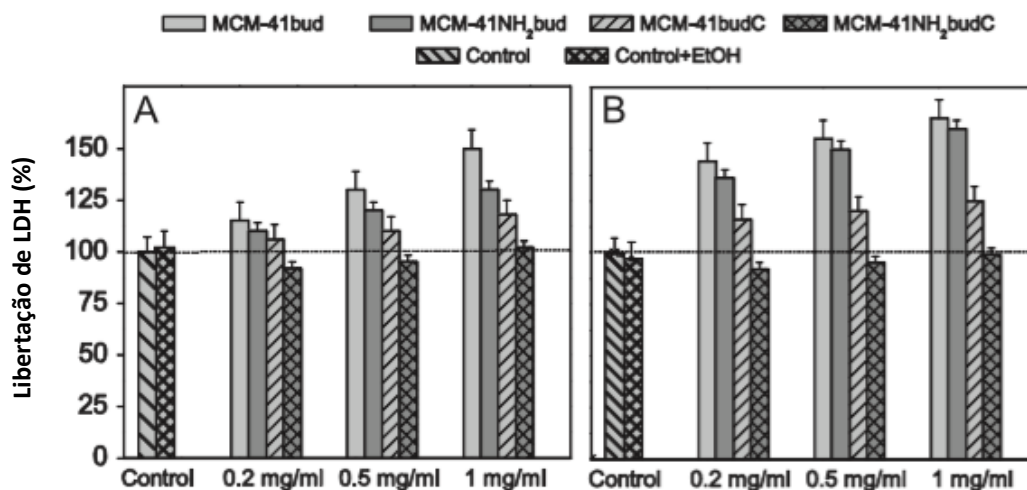


Figura III-11. Liberação *in vitro* de budesonida a partir de MCM-41budC revestido com carbopol e de MCM-41 amino-funcionalizado com carbopol MCM-41NH₂budC a valores de pH de 6,8 (A) e 1,2 (B) (adaptado de ¹⁸⁵¹).

A amina funcionalização seguida do revestimento com carbopol também influencia a citotoxicidade e citoproteção. Para comprovar isso, usaram-se células HEPG2 - idênticas aos hepatócitos normais - para avaliar a citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas mesoporosas. Avaliou-se a liberação LDH (ensaio lactato desidrogenase) a fim de verificar a integridade da membrana celular. Primeiramente, observou-se que os transportadores e o fármaco em estudo não interferiam com a integridade da membrana celular. Em seguida, incubaram-se nanopartículas de sílica amina funcionalizadas com budesonida, com ou sem revestimento, em células HEPG2 em períodos de 24 e 48 horas. Tal como é visível na figura III-12, constata-se

que em nanopartículas de MCM-41 e MCM-41-NH₂, com incorporação de fármaco sem qualquer revestimento (MCM-41-bud e MCM-41-NH₂-bud) houve elevada liberação de LDH, o que indica mudanças na integridade. Contrariamente, em nanopartículas onde foi incorporado o fármaco, seguindo-se do revestimento com carbopol ((MCM-41-budC e MCM-41-NH₂-budC) houve um decréscimo da liberação de LDH. Ou seja, o revestimento das nanopartículas de sílica com carbopol contribui para a diminuição da toxicidade de um sistema mesoporoso.



.Figura III-12. Liberação de LDH de células HEP G2 tratadas com nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com budesonida: A) exposição de 24 e B) exposição de 48 h (A e B, respectivamente) (adaptado de [85]).

Ainda no âmbito da funcionalização química de nanopartículas de sílica com grupos orgânicos, Yongju He et al. [88] sintetizaram transportadores do cloridrato de doxorrubicina (DOX) - DOX@MSN-NH₂. Estudou-se assim as propriedades, a morfologia e a estrutura do MSN-NH₂ e do DOX incorporado no MSN-NH₂ (DOX@MSN-NH₂) e como estas influenciam a incorporação e liberação de fármacos anticancerígenos.

Na tabela III-8 há uma diminuição do tamanho e volume dos poros, da área de superfície e a alteração do potencial zeta, de negativo para positivo, o que evidencia o sucesso da incorporação dos grupos amina na superfície de sílica mesoporosa. Por sua vez, a diminuição de valores de MSN-NH₂ para MSN-NH₂-DOX o que confirma a carga da molécula de fármaco nos mesoporos.

Tabela III-8. Parâmetros e características dos poros de MSN, MSN-NH₂ e DOX @ MSN-NH₂ (adaptado de [88])

Amostra	Área superficial (m ² /g)	Volume de poro (cm ³ /g)	Tamanho de poro (nm)	Tamanho (nm)	Potencial zeta (mV)
MSN	956,22	0,76	3,05	210,8 +/- 2,6	-23,12 +/- 0,37
MSN-NH ₂	647,57	0,49	2,42	222,2 +/- 4,2	22,78 +/- 0,32
DOX@ MSN-NH ₂	596,15	0,47	1,92	235,7 +/- 2,2	24,26 +/- 0,14

Tendo o sistema de MSN-NH₂ um valor de pH elevado (9,3) e superior ao valor de pka da doxorrubicina (8,3) [89], origina assim a diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas de DOX, o que facilita a adsorção das mesmas pelos mesoporos das MSN-NH₂ [90].

Verificou-se que a funcionalização das superfícies de sílica permitiu uma maior fixação de doxorrubicina, uma vez que a interação entre os grupos amina e a doxorrubicina era mais forte que a interação entre os grupos hidroxilo e a doxorrubicina, deste modo confirma-se a influência do efeito da densidade de grupos amina no carregamento do fármaco. Ainda relativamente ao efeito da densidade de grupos amina, constata-se que quanto maior é a densidade de grupos amina, maior será a eficiência na retenção de DOX, tal como é observável na tabela III-9.

Tabela III-9 – Valores da eficiência da retenção de doxorrubicina em MSN e MSN-NH₂ com diferentes densidades de grupos amina. (adaptado de [88]).

	MSN/APTES (mg/mL)	Amina densidade (mmol/g)	Eficiência (%)
MSN	-	0	83,72 +/- 0,050
MSN-NH ₂	6000	0.23	88.95 +/- 0.023
MSN-NH ₂	275	1.69	94.37 +/- 0.049
MSN-NH ₂	250	1.85	96.48 +/- 0.071
MSN-NH ₂	100	2.33	98.93 +/- 0.039

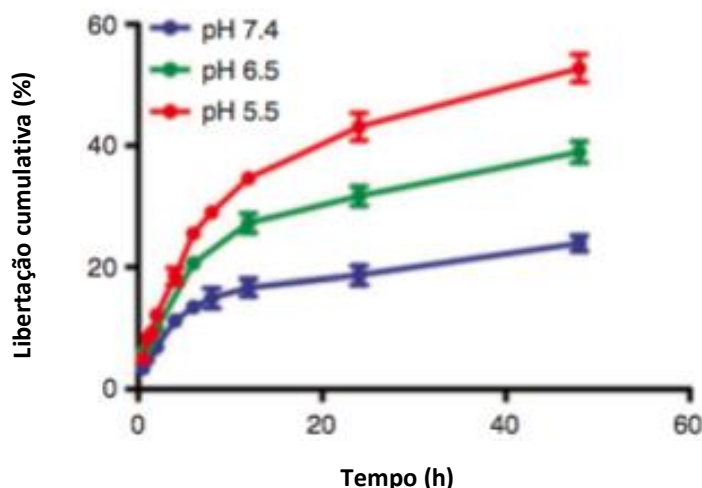
APTES: 3-aminopropiltrietoxisilano

A partir da interpretação da tabela III.10, conclui-se que quanto menor é a razão MSN-NH₂/DOX, maior vai ser a quantidade de fármaco carregado no MSN-NH₂ e houve ainda um aumento considerável ao nível da incorporação de fármaco no sistema, de 0,82% para 39,56%. Porém, relativamente à eficiência de fixação, esta manteve-se constante, não dependendo desta razão. Desta forma verificou-se que a densidade de grupos amina e a razão MSN-NH₂/ DOX influenciavam a incorporação da doxorrubicina no sistema de nanopartículas mesoporosas.

Tabela III-10 – Valores de carga de DOX e da eficiência de DOX @MSN-NH₂ (adaptado de ^[88]).

MSN-NH ₂ /DOX (relação massa)	Conteúdo incorporado (%)	Eficiência (%)
10	0.82 +/- 0.022	98.54 +/- 0.048
8	11.08 +/- 0.035	99.67 +/- 0.090
4	19,72 +/- 0.056	98.31 +/- 0.064
3	22.50 +/- 0.054	98.17 +/- 0.035
1.5	39.56 +/- 0.029	98.93 +/- 0.039

Para melhor compreender o comportamento *in vitro* do DOX @ MSN-NH₂ enquanto sistema de entrega de fármaco, estudou-se o perfil de liberação do mesmo em três tampões simulados com diferentes valores de pH (7,4; 6,5 e 5,5). A partir da figura III-13 é visível que a liberação da doxorrubicina aumenta à medida que o valor de pH diminui. Em meio ácido há aumento da protonação de grupos amina presentes na superfície de sílica funcionalizada e do DOX absorvido, o que origina repulsão eletrostática com consequente dissociação entre o sistema MSN-NH₂ e o fármaco e liberação do DOX para o meio.

Figura III-13. Perfis de liberação de DOX do DOX @ MSN-NH₂. MSN-NH₂. (adaptado de ^[88]).

Nesse mesmo estudo avaliou-se a citotoxicidade celular *in vitro* dos compostos MSN-NH₂, DOX@MSN-NH₂ e DOX livre relativamente às células A549 (human non-small-cell lung cancer cells).

Na figura III-14 é perceptível que as nanopartículas de sílica amina funcionalizadas sem doxorrubicina e com diferentes concentrações, não apresentam qualquer tipo de citotoxicidade

ao longo do tempo, evidenciando uma viabilidade celular sempre superior a 80-90%. Contrariamente, na figura III-15, verifica-se que a DOX livre e DOX@MSN-NH₂ possuem citotoxicidade à medida que o tempo de incubação e concentração de fármaco aumentava, sendo que a toxicidade era superior na doxorrubicina livre. Também é visível que o IC₅₀ (concentração de fármaco necessária para reduzir o crescimento das células em 50%) é menor em períodos de incubação maior, ou seja, após 72 horas, o valor de IC₅₀ era consideravelmente menor que o valor de IC₅₀ após 48 horas e 24 horas de incubação. Estes valores indicam que quanto maior o tempo de incubação, maior a citotoxicidade do fármaco. O valor de citotoxicidade após 72 horas é consideravelmente maior e quase idêntico ao valor de toxicidade da doxorrubicina na sua forma livre.

Embora a DOX-livre apresente maior valor de citotoxicidade *in vitro* do que o DOX@MSN-NH₂, a sua falta de especificidade para células anti-cancerígenas, origina um elevado número de efeitos adversos. Assim sendo, o uso de DOX@MSN-NH₂ demonstrou ser mais benéfico, já que revelou citotoxicidade e especificidade em relação a células A549, podendo ser assim classificado como um potente transportador de fármacos citotóxicos, uma vez que consegue libertar fármacos com atividade tumoral de forma sustentada e controlada e com menores efeitos adversos associados, o que proporciona uma maior eficácia terapêutica e atividade anti tumoral de longa duração.

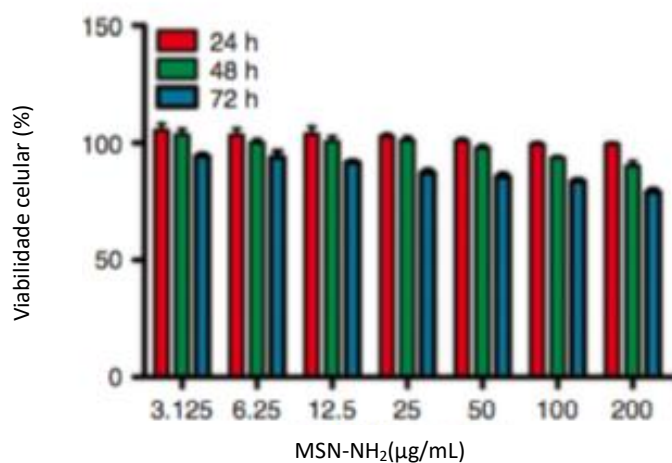


Figura III-14 - Viabilidade celular de células A549 expostas a diferentes concentrações de MSN-NH₂. (adaptado de [88]).

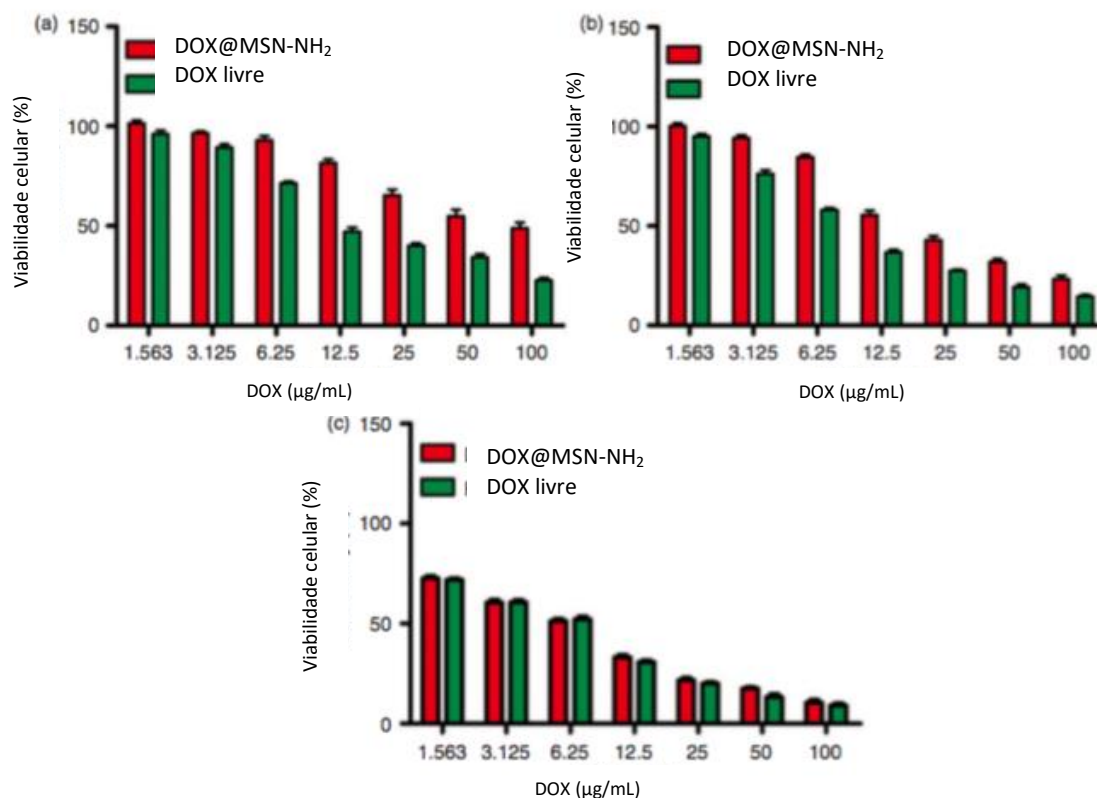


Figura III-15. Viabilidade celular de células A549 expostas a diferentes concentrações de DOX @ MSN-NH₂ e DOX livre após 24 horas de incubação (a), 48 horas de incubação (b) e 72 horas de incubação (c) (adaptado de [88]).

Muitos outros estudos sobre entrega de fármacos envolvendo silicas mesoporosas funcionalizadas podem ser encontrados na literatura (por exemplo, os descritos nas referências [45] e [91]) bem como os exemplos atrás apresentados, permitem facilmente concluir a importância e flexibilidade da funcionalização, provocando não só um controle do tipo e quantidade de fármaco adsorvido, mas também da cinética de libertação e, conseqüentemente, efeito terapêutico. Por vezes, pode ainda verificar-se a diminuição de efeitos secundários devido à proteção do fármaco no ambiente confinado dos canais do transportador.

3.3 Dosagem em Materiais Mesoporosos

Uma das questões que se deve ter em conta durante o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos é “Qual a dosagem mais adequada de fármaco que deve alcançar o sítio alvo?” [4]. As características do paciente, a biodisponibilidade, no caso de entrega por via oral, e duração do tratamento são alguns dos fatores que influenciam a dosagem de fármaco a ser administrado. Para sistemas de entrega de fármacos orais, é necessário desenvolver formulações com matrizes "once-daily". Supondo que todo o fármaco é libertado de acordo com uma cinética de ordem zero, é fundamental indicar a dose diária recomendada [4], uma vez que essa dose, já

tem em conta a biodisponibilidade do medicamento administrado. Por exemplo, o captopril é um fármaco que inibe a conversão da angiotensina e é usado para o tratamento de hipertensão e insuficiência cardíaca. A dose recomendada varia entre 50 a 100 mg por dia e sabendo que até 32% deste fármaco pode ser incorporado num sistema com MCM-41, é possível afirmar que um comprimido de 300 mg de captopril pode conter a dose máxima recomendada, sendo assim libertada num período de 24 horas pelo fluido estomacal.

Os sistemas de entrega de fármacos mesoporosos podem libertar o seu conteúdo terapêutico ao longo de vários dias ou semanas para alcançar a dose efetiva de fármaco no tecido alvo, no entanto, isto só se verifica quando há uma libertação com cinética adequada, uma vez que a “vida útil” de um sistema depende não apenas da quantidade de fármaco incorporado, mas também da sua taxa de libertação [7].

Na figura III-16 são visíveis os diversos perfis de libertação em materiais mesoporosos. O **perfil a** é observado para matrizes não funcionalizadas, que inicialmente têm um efeito de explosão seguido por uma libertação de fármaco muito lenta [65], este tipo de perfil pode ser útil quando é necessária uma dose alta imediata, por exemplo, para infeções agudas ou inflamações. O **perfil b** descreve processos de difusão ou dissolução, um exemplo disso é o caso do sistema MCM-41 com incorporação de alendronato, onde a libertação do fármaco é proporcional à área superficial. O **perfil c** aplica-se a um processo de libertação de cinética de ordem zero, ou seja, que depende unicamente do tempo. Este tipo de perfil é o mais razoável para sistemas de entrega de fármacos de administração prolongada. O **perfil d** representa um sistema em que a entrega do fármaco ocorre devido a um estímulo, tais como alterações do valor de pH, temperatura, campo magnético, o que contribui para o desenvolvimento de sistemas de entrega “inteligentes” [4], estímulos esses que serão abordados no ponto 3.4.

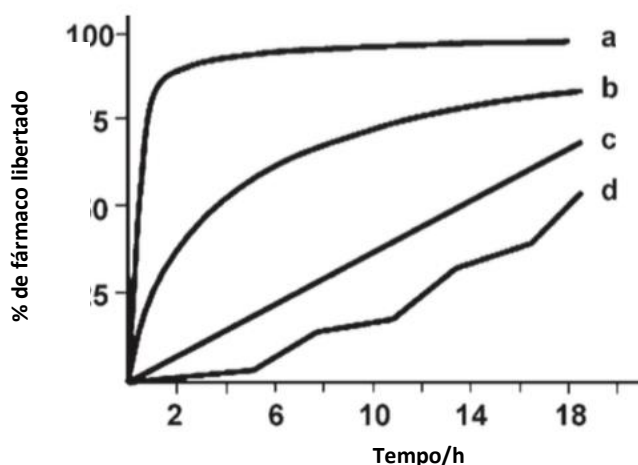


Figura III-16. Perfil de entrega de fármacos de materiais mesoporosos (adaptado de [4]).

3.4. Liberação estimulada do fármaco

Contrariamente aos sistemas mesoporosos convencionais, onde a liberação de fármaco adsorvido segue uma cinética sustentada, que ocorre de acordo com o fármaco que é adsorvido ao longo dos canais mesoporosos e que depende das características da molécula e da matriz de sílica, verifica-se ainda que há certas moléculas de fármacos adsorvidas que precisam de determinados estímulos ambientais, já referidos anteriormente, para sofrerem liberação e exercerem efeito terapêutico. Este tipo de sistemas possui grupos funcionais com capacidade para responder a estímulos, o que influencia e modifica a adsorção e liberação de fármaco. Existem também sistemas seletivos de entrega de fármacos onde as moléculas de fármaco são apenas libertadas quando estão em contacto com as células ou tecidos alvos - sistemas de *“zero premature release”*.

Após atingida a corrente sanguínea, os nanossistemas tornam-se aptos para ficarem no tecido tumoral [92][93], sendo este composto por diversas células (cancerígenas, células imunitárias, entre outras) [94]. Desta forma, para que haja eliminação das células cancerígenas é necessário recorrer ao uso de nanossistemas com capacidade de distinguir células tumorais de células saudáveis.

Existem duas estratégias capazes de aumentar a seletividade para o tecido tumoral, uma delas consiste na adição de moléculas à superfície das nanopartículas de sílica e a outra, na introdução de ligandos *“targeting”*. A primeira pretende interagir seletivamente com recetores específicos e sob expressos na membrana das células tumorais e a segunda, aumentar a afinidade do sistema para os vasos sanguíneos que irrigam o tecido tumoral, tendo como objetivo *“interromper”* o suprimento de nutrientes e oxigénio às células tumorais, destruindo-as. É ainda possível adicionar dois agentes *“targeting”* para o mesmo transportador, com a finalidade de aumentar ainda mais a seletividade para essa célula.

Uma das restrições do uso de transportadores, é o facto de estes terem pouca capacidade para invadir a *“massa”* tumoral, uma vez que a matriz extracelular de células tumorais é rica em colagénio - composto que dificulta a introdução dos transportadores. Surge assim a necessidade de se criarem alternativas para aumentar o grau de penetração em zonas tumorais. O primeiro método consiste na síntese e incorporação de nanocápsulas de colagenase sensíveis ao pH, na superfície de nanopartículas [95], uma vez que a colagenase é uma enzima proteolítica com capacidade para digerir a matriz extracelular, o que aumenta a penetração do nanossistemas e favorece o efeito terapêutico. Em pH ácido, há rutura das nanocápsulas com posterior liberação da colagenase, degradação da matriz extracelular e incorporação de sistemas de sílica mesoporosa. A segunda estratégia baseia-se no uso de células mesentéricas humanas com capacidade de se difundirem através no tecido tumoral [96] e de serem bons transportadores de sílica mesoporosa, alcançando as regiões mais profundas dos tecidos tumorais [97].

Em sistemas com características *“zero premature release”*, o uso de *“gatekeepers”* é responsável por bloquear a superfície dos poros, porém na presença de um estímulo, seja interno

ou externo (figura III-17), ocorre clivagem de “*gatekeepers*”, com consequente libertação do fármaco. Exemplos de estímulos são o pH, o potencial redox, sub-expressão de determinadas enzimas, o campo magnético e a luz.

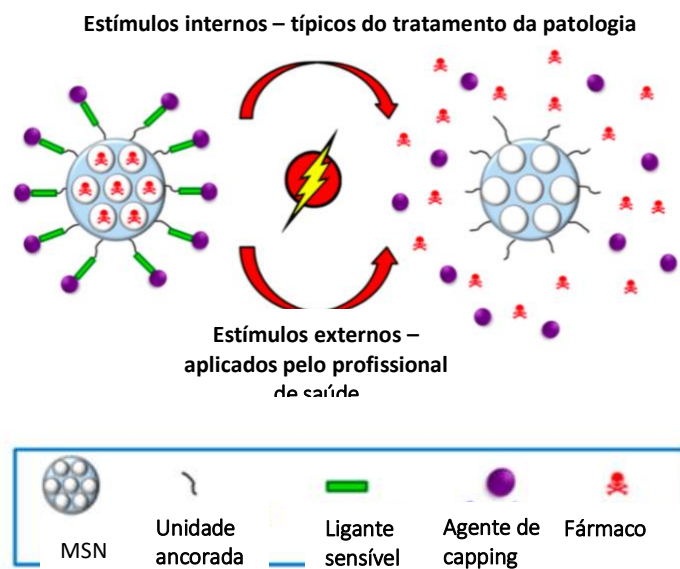


Figura III-17 - Estímulos internos ou externos que estimulam os sistemas de entrega de fármaco de nanopartículas mesoporosas de sílica. (adaptado de ¹⁷¹)

O conhecimento de processos bioquímicos e metabólicos associados a uma determinada patologia, favoreceu o desenvolvimento de nanossistemas “inteligentes” de *drug de delivery* sensíveis a estímulos endógenos ^[98–100]. Este tipo de sistemas consegue incorporar um ligante sensível e /ou um agente de *capping*. Na presença de estímulos, o ligante é responsável pela clivagem, degradação ou alteração da conformação do sistema nanoparticulado, por sua vez o agente de *capping* – nanopartículas inorgânicas, polímeros ou macromoléculas - permite bloquear a entrada dos mesoporos, dificultando a libertação prematura do fármaco. Ainda se podem usar determinados revestimentos de origem inorgânica ou orgânica capazes de bloquear os poros e que sofrem clivagem aquando a presença de estímulos, havendo esvaziamento dos poros e posterior libertação das moléculas de fármaco (figura III-18).

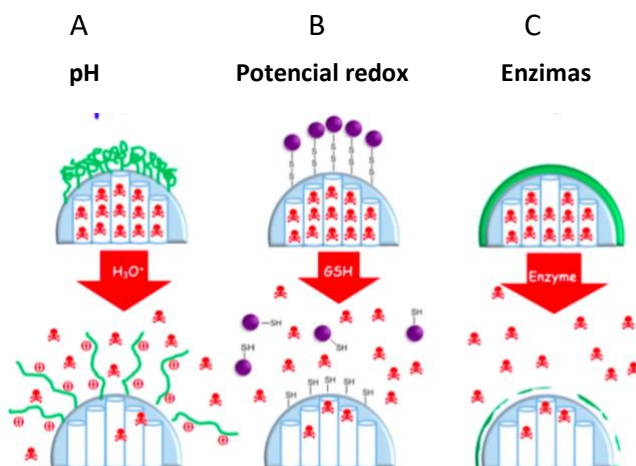


Figura III-18. Entrega de fármacos sensíveis a estímulos internos. A) nanossistema sensível ao pH baseado em MSNs revestidos por polímeros; B) nanossistema sensível ao potencial redox, com base em MSNs funcionalizados com ligações dissulfeto e com nanopartículas inorgânicas; C) nanossistema sensível a enzimas, com base em MSNs revestidos com um polímero degradável (adaptado de [17]).

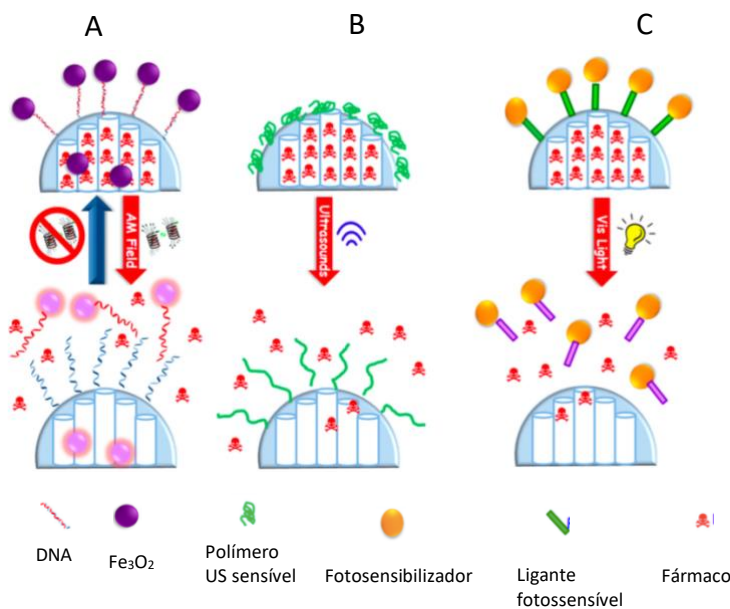


Figura III-19 - Entrega de fármacos sensíveis/responsivos a estímulos externos, através de A) campos magnéticos alternativos (AM Field), B) ultrassons e C) luz visível (adaptado de [17]).

Na figura III-19 são visíveis nanopartículas de sílica mesoporosas sensíveis a estímulos externos, como campos magnéticos, ultrassons e luz.

O uso de campos magnéticos tem vindo a revelar-se benéfico, uma vez que estes exercem diferentes efeitos sobre os nanossistemas, conseguindo direcionar permanentemente as nanopartículas [99]. As nanopartículas de óxidos de ferro superparamagnéticos (SPIONs) são as mais usadas e têm a capacidade de converter a energia magnética em calor. A maioria das estratégias usadas recorre ao encapsulamento de (SPIONs) em nanopartículas de sílica, originando o aumento de temperatura. As MSNs também podem incorporar “moléculas”

sensíveis à temperatura e que funcionam com *gatekeepers*, capazes de responder a mudanças físico-químicas, o que induz a libertação do fármaco.

Na figura III-19 é perceptível a incorporação de fármaco no MSN magnético. Este é revestido por uma cadeia de DNA simples, que atua como um agente de capping, uma vez que sofre hibridação com nanopartículas de óxidos de ferro superparamagnéticas funcionalizadas com a cadeia de DNA complementar. Desta forma, quando sujeitas a um campo magnético alternado, o calor origina a desbridação do DNA, levando à libertação de fármaco [101].

María Vallet-Regí et al [4] também estudaram a presença de um *agente de capping* - partículas de magnetite (Fe_3O_4) - na superfície dos poros. Neste caso, a sílica mesoporosa é funcionalizada por co-condensação com moléculas que contêm grupos SH e posteriormente com uma molécula contendo uma ligação dissulfureto. A sílica funcionalizada é colocada numa solução aquosa contendo o *agente de capping* e o fármaco, cujas partículas de magnetite são responsáveis pelo bloqueio dos poros. Quando o sistema é sujeito a um campo magnético, as partículas de magnetite são removidas, libertando assim o fármaco. O controlo da libertação é baseado na quebra das ligações dissulfureto entre a sílica e as partículas de magnetite por agentes redutores.

Também os ultrassons podem ser usados como estímulo para promover a libertação de fármacos. Neste caso verificou-se ser possível controlar o local de libertação do fármaco bem como do momento de libertação. Este método evita possíveis efeitos colaterais em células saudáveis, não é invasivo, não integra radiações ionizantes e permite uma fácil incorporação no tecido através de ajustes ultrassónicos, nomeadamente, a frequência, ciclos e tempos de exposição [99] [102]. As ondas ultrassónicas têm ainda a capacidade de desencadear a libertação de fármaco através do efeito térmico. Os ‘*mechanophores*’ são ligações químicas que são clivadas pela ação de ultrassons e são usadas na criação de nanopartículas sensíveis a radiações ultrassónicas. Exemplo disso é o 2-tetrahidropiranyl-metacrilato, que é um monómero hidrofóbico sensível a radiações ultrassónicas, consegue transformar-se em ácido metacrílico hidrofílico [103] [104] e ser usado na síntese de MSN sensíveis a esse estímulo.

As MSN sensíveis à luz solar permitem a libertação de fármacos sob iluminação a um comprimento de onda específico (UV, visível, UV-vis, IV) [44] [105]. O uso deste tipo de MSN mostrou ser benéfico, visto que o uso de luz é de fácil aplicação, de baixa toxicidade e consegue ser direcionada para o local pretendido. Porém, a sua baixa capacidade de penetração nos tecidos, faz com que este sistema apresente algumas limitações [106–109]. A luz UV tem sido a mais usada para desencadear a libertação de fármacos [44,105] pois tem uma elevada capacidade para quebrar as ligações existentes. Contudo devido às suas limitações, como a sua toxicidade e baixa penetração nos tecidos [106–109], tem vindo a ser substituída pela radiação visível, uma vez que esta evidencia ter uma maior taxa de penetração e menos prejudicial. Também na figura III-19 é evidenciado um sistema de entrega de fármaco de MSNs sensíveis à luz visível [110]; neste exemplo, as MSN estão revestidas por *nanocaps* de porfirina através de ligações que podem ser clivadas por espécies reativas de oxigénio. Desta forma, na presença de um estímulo

de luz visível, os *nanocaps* de porfirina facilitam a formação de moléculas de oxigénio singlete (espécies reativas de oxigénio molecular) que quebram o ligante sensível e originam a abertura de mesoporos, com conseqüente libertação do fármaco.

Um exemplo interessante de libertação estimulada foi apresentado por Xiao et al. [111]. Neste caso, o fármaco utilizado foi a vancomicina. A superfície da sílica mesoporosa, SBA-15, sofreu funcionalização com ácidos carboxílicos de cadeia longa. A pH elevado, as moléculas de vancomicina estão envolvidas por policatiões PDDA – (poli-(cloreto de dimetildialquilamónio)) - que por sua vez estabelecem ligações iónicas com os grupos carboxilato da superfície SBA-15 modificada.

Os policatiões funcionam como uma barreira, que impede a saída de fármaco, armazenando-o nos poros da matriz. Após uma diminuição de pH, os ácidos carboxílicos ionizados são protonados, os policatiões sofrem modificação e há libertação das moléculas de fármacos, como visível na figura III-20.

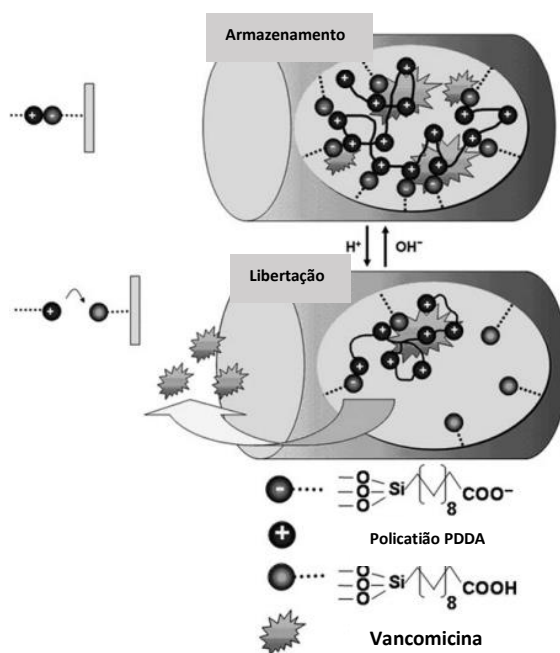


Figura III-20. Sistema de entrega de fármacos sensível ao pH, a partir de uma interação entre policatiões PDPA e as partículas de sílica modificadas com ácido carboxílico negativamente carregado (adaptado de [4]).

IV. MATERIAIS ZEOLÍTICOS

4.1. Estudo e potencial desenvolvimento

Os zeólitos são compostos considerados promissores em diversas áreas. Um zeólito enquanto sistema de entrega de fármacos é, tal como já apresentado para as sílicas mesoporosas,

um sistema que pretende melhorar a biodisponibilidade do fármaco, prevenir a sua degradação prematura e potencializar o seu efeito ^[112], mantendo as concentrações do fármaco dentro da sua janela terapêutica e tendo o máximo controlo a nível das taxas de libertação e do direcionamento do fármaco para o tecido afetado ^[31,113].

Estes materiais, devido às suas características estruturais, conseguem incorporar determinados compostos terapêuticos. Possuem ainda outras potencialidades tais como proteger os fármacos incorporados do meio envolvente; exercer efeito terapêutico em animais, melhorando o seu estado nutricional e imunogenicidade, e funcionar como biomarcadores de forma a identificar determinadas patologias ^[57] ^[114].

Ao longo deste tópico abordar-se-á alguns dos estudos com determinados compostos terapêuticos incorporados em compostos zeolíticos.

4.1.1 Efeitos antioxidantes, anti-apoptóticos e anti-inflamatórios dos zeólitos

Os zeólitos revelam uma atividade antioxidante significativa com aplicações úteis na área da medicina. O composto clinoptilolite quando introduzido nos hepatócitos de ratos por hepatectomia parcial, revelou ter efeitos antioxidantes ^[57], que foram comprovados pela diminuição do nível de malondialdeído, marcador característico do stress oxidativo presente no tecido hepático, e pelo aumento significativo de outras moléculas antioxidantes como superóxido dismutase e glutatona ^[115]. Além da ação antioxidante, o zeólito clinoptilolite quando incorporava o fármaco doxorubicina, também mostrava ter propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, pois o seu uso favorecia a redução acentuada da produção de citocinas inflamatórias e da apoptose em hepatócitos, facto que conferia proteção a estas células.

Os zeólitos chabazite, phillipsite e análcime contribuíram para o aumento dos níveis sanguíneos de enzimas antioxidantes (glutatona peroxidase, superóxido dismutase e glutatona redutase) e reduziram ainda a peroxidação lipídica ^[116]. Outros zeólitos como faujasite (NaY) e ferrierite, em condições *in vitro*, limitaram o efeito das espécies reativas de oxigénio, devido à conversão dessas mesmas espécies reativas em moléculas de água dentro dos zeólitos ^[117].

Estas propriedades antioxidantes podem ainda ser benéficas no tratamento da doença de Alzheimer. Fizeram-se estudos, *in vitro*, em células neuronais SH-SY5Y bem como, *in vivo*, em ratinhos transgénicos APP^{swe}PS1^{dE9}, modelo animal de neuroregeneração relacionado com o envelhecimento. O estudo identificou que zeólitos clinoptilolite micronizada incorporados na dieta, diminuía a produção de espécies reativas de oxigénio de mitocôndrias, o que favorecia a atividade do superóxido dismutase com a consequente redução dos níveis da proteína beta-amilóide e da placa beta-amilóide, no cérebro dos ratinhos ^[118], evitando assim a morte neuronal.

O uso de zeólitos também revelou ser importante na proteção da pele contra radiações ultravioletas, exemplo disso, é o zeólito NaY, que conseguiu diminuir a atividade fotocatalítica

do TiO₂ (componente presente em alguns protetores solares). Este zeólito conseguiu prevenir possíveis lesões nos fibroblastos da pele causados por espécies reativas de oxigênio provenientes do TiO₂ presente na radiação no UV [119]. Desta forma, começou-se a usar compostos zeolíticos para desenvolvimento de novos protetores solares.

Em ensaios de clinoptilolite usado no tratamento da dislipidemia, verificou-se a partir das concentrações de colesterol total, colesterol LDL e HDL, que o uso deste mineral melhorava significativamente o perfil lipídico no sangue de pacientes dislipidêmicos [120].

4.1.2. Efeito dos zeólitos na hemóstase/ zeólitos hemostáticos

Os zeólitos como têm uma boa capacidade de adsorção, podem ser usados como potentes hemostáticos. Eles conseguem reter exotermicamente um volume considerável de água no interior dos poros e ainda reter fatores de coagulação e plaquetas durante uma hemorragia [121]. Exemplo disso, é o zeólito hemostático QuickClot®, que tem a capacidade de acelerar a coagulação do sangue e diminuir o tempo de formação do coágulo [122]. No entanto, o efeito hemostático dos zeólitos associa-se a uma reação exotérmica responsável pelo aumento da temperatura dos zeólitos (até 90°C), o que leva a efeitos adversos, como queimaduras nos tecidos adjacentes. Para reverter este problema, recorreu-se à pré-hidratação de zeólitos, de modo a conseguirem absorver água. Outra forma que permitiu diminuir a reação exotérmica e assim reduzir a temperatura do local da hemorragia foi a introdução do mineral bentonite no zeólito, originando uma conformação denominada de CoolClot®. Esta última seria responsável pela diminuição do tempo de coagulação e de hemorragia em amostras de sangue humano *in vitro* [123], e favorecia a cicatrização de feridas em ratos *in vivo*, sem que houvesse aumento da temperatura na mesma [124].

4.2. Potenciação do 5-fluorouracilo encapsulado em zeólitos no tratamento do carcinoma colon-retal

O 5-fluorouracilo (5-FU) é um anti metabolito, análogo da pirimidina, com um espectro de ação com atividade contra o cancro da mama, cancro colon-retal, cancro do fígado e do cérebro, podendo ser usado isoladamente ou em associação a outros agentes quimioterapêuticos [125–127]. Este tem uma estrutura que interfere no metabolismo dos nucleosídeos e pode ser incorporado no RNA e DNA, o que origina citotoxicidade e morte celular [125]. Porém, o 5-FU apresenta algumas limitações, nomeadamente absorção gastrointestinal variável e rápida degradação, o que compromete o seu tempo de semi vida, originando resistências e problemas de citotoxicidade para células saudáveis [126–128]. Há assim necessidade de criar terapêuticas menos prejudiciais, como o encapsulamento do 5-FU em sistemas de entrega de fármaco.

Como referido anteriormente, no ponto 2.2.1., as características estruturais dos zeólitos permitem que este tipo de sistemas tenha uma libertação controlada de fármaco no tecido alvo, evitando a degradação do mesmo [129–131].

Natália Vilaça et al. [132], estudaram a encapsulação de 5-FU em dois zeólitos diferentes – zeólito L e zeólito Y – como propriedades texturais diferentes. Por um lado, o zeólito L é um aluminossilicato com canais paralelos unidimensionais com aberturas de poros com 0,71 nm de diâmetro e com capacidade para integrar uma elevada variedade de pequenas moléculas [133] por outro lado, o zeólito Y consiste em super cavidades com um diâmetro de 1,18 nm e com uma abertura de 0,74 nm [134], capaz de incorporar compostos de maiores dimensões [134–137].

Para verificar o efeito do agente quimioterapêutico (5-FU) nos zeólitos, escolheram-se as células HCT-15 e RKO, como modelo do carcinoma colon-retal e prepararam-se assim três sistemas de entrega de fármaco - NaY (estrutura 3D, com um tamanho de partícula de 700 nm), nanoNaY (com um tamanho de partícula de 150 nm) e LTL (estrutura D1, com um tamanho de partícula de 80 nm). Em todos os sistemas foi encapsulada a mesma quantidade de 5-FU e a partir da tabela IV-1 é visível que o sistema NaY tinha maior capacidade de encapsulamento, seguindo-se do nanoNaY e LTL, com valores de encapsulação semelhante (55%). Estes resultados sugeriam que o NaY apresentava um maior volume de microporo, tendo assim uma maior capacidade de carga.

A libertação rápida do composto 5-FU depende do tamanho do fármaco e das suas interações com o zeólito. Conhecendo as dimensões do 5-FU ($4,936\text{Å} \times 5,387\text{Å} \times 5,043\text{Å}$), sabe-se que é uma molécula de pequenas dimensões e que se pode difundir facilmente nos microporos da faujasite e do zeólito L. Estas duas estruturas apresentam um diâmetro de poro idêntico, o que leva a uma maior libertação de fármaco.

Tabela IV-1. Incorporação de 5-FU nos sistemas de entrega de fármaco (adaptado de [132]).

Sistema de entrega de fármaco	5-FU (mmol) ^a	5-FU (mmol) ^b	Produto (%) ^c
5-FU@NaY	0,99	0,72	71,3
5-FU@nanoNaY	0,99	0,55	55,6
5-FU@LTL	0,99	0,52	52,5

^a Quantidade inicial de 5-FU na solução.

^b Carga de 5-FU num zeólito determinado por TGA.

^c Eficiência de encapsulação de 5-FU nos diferentes zeólitos.

Na figura IV-1 e IV-2 são apresentados os resultados da viabilidade celular em ambas as linhagens, tanto para o 5-FU não encapsulado como para o 5-FU encapsulado nos sistemas zeolíticos, tendo em conta a quantidade de fármaco presente nos sistemas de entrega de fármaco. Se compararmos os controlos (sem zeólito) com os zeólitos em diferentes concentrações, pode-se concluir que estes não apresentam qualquer tipo de toxicidade para as células durante o período de incubação, uma vez que a viabilidade se aproxima sempre dos 100%. Por outro lado,

se compararmos com os zeólitos isolados, é visível uma redução da viabilidade celular à medida que se vai aumentando as concentrações de 5-FU presente no sistema zeolítico, em ambas as linhagens.

A linhagem celular HCT-15 (figura IV-1) mostra a redução evidente da viabilidade celular, após a encapsulação de 5-FU nos diferentes sistemas zeolíticos, de 64% para 34%, de 66% para 43% e de 67% para 46% nos sistemas NaY, nanonNaY e LTL, respetivamente. Relativamente às células RKO (figura IV-2), a incorporação de 5-FU nos sistemas zeólitos resultou também numa diminuição da viabilidade celular, mas mais significativa, de 58% para 27% no 5-FU@NaY, de 80% a 29% no 5-FU@ nanonNaY e de 54% a 28% no 5-FU@LTL. Isto mostra que o zeólito sem fármaco não é tóxico e que a viabilidade celular diminui quando se incorpora fármaco no zeólito.

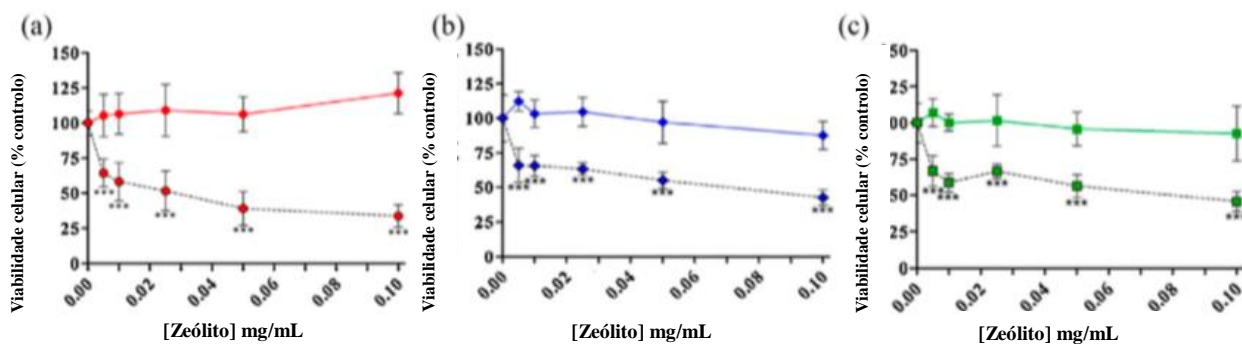


Figura IV-1. Efeito dos zeólitos NaY (a), nanoNaY (b) e LTL (c) e dos sistemas de drug delivery na viabilidade de células HCT-15 do carcinoma do cólon. Incubação de células HCT-15 com zeólitos e com sistemas de drug delivery a diferentes durante 48 h. Zeólito sem fármaco (linha colorida), Sistema de drug delivery (linha preta) (adaptado de ^[132]).

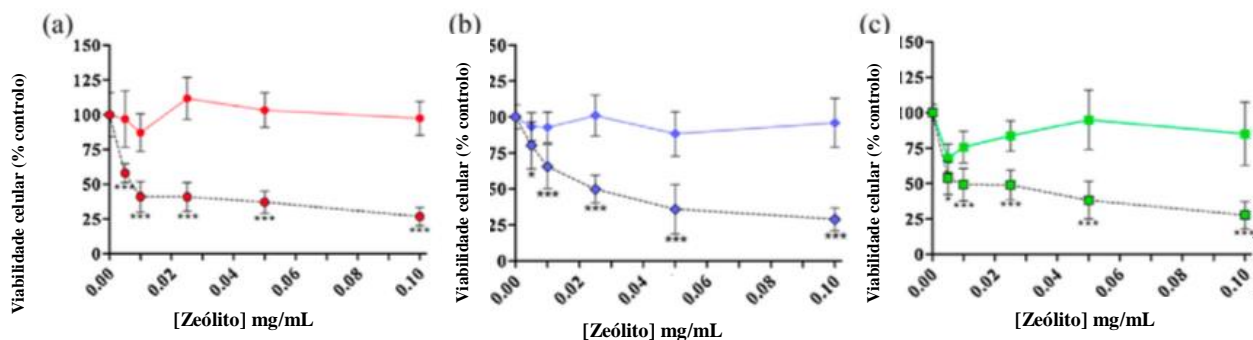


Figura IV-2. Efeito dos zeólitos NaY (a), nanoNaY (b) e LTL (c) e dos sistemas de drug delivery na viabilidade de células RKO de carcinoma do cólon. Incubação de células RKO com zeólitos e com sistemas de drug delivery a diferentes durante 48 h. Zeólito sem fármaco (linha colorida), Sistema de drug delivery (linha preta) (adaptado de ^[132]).

A partir da tabela IV-2 é possível afirmar que a diminuição da viabilidade celular depende da dose de 5-FU incorporado, sendo os valores de IC 50 para o 5-FU isolado de 0,61 mM e 0,14nM, para as células da linhagem HCT-15 e RKO, respetivamente. Ainda comparando

os resultados obtidos com o 5-FU incorporado ou não no zeólito, conclui-se que o fármaco encapsulado origina uma potencialização do efeito do mesmo, visto que há um aumento na eficiência em ambas as linhagens (de 1,9 a 7,6 para a linhagem HCT-15; 1,6 para 4,3 na linhagem RKO).

De modo a avaliar a interação entre os zeólitos e as células características do cancro colon-retal, realizaram-se ensaios de microscopia de fluorescência (figura IV-3). A figura remete para os resultados do zeólito NaY incorporado com rodamina B, um composto fluorescente, em células HCT-15 e RKO. A imagem apresenta a interação do sistema NaY com o composto de fluorescência (rodaminaB@NaY) comprovando-se a integração do zeólito no citoplasma celular. Uma vez que os sistemas nanoNaY e LTL apresentam dimensões ainda mais reduzidas, deduz-se que este composto de fluorescência também aí possa ser inserido.

Ao encapsular o composto quimioterapêutico 5-FU em sistemas zeolíticos, aumenta-se a eficiência, a biodisponibilidade, a facilidade do mesmo entrar nas células e consequentemente um aumento da potência do fármaco.

Tabela IV-2. Valores IC_{50} de 5-FU, 5-FU @ NaY, 5-FU @ nanoNaY e 5-FU @ LTL para linhagens HCT-15 e RKO, (adaptado de ^[132]).

	HCT-15		RKO	
	IC_{50} (mM)	Potencialização	IC_{50} (mM)	Potencialização
5-FU	0,61	-	0,13	-
5-FU@NaY	0,08	7,6	0,03	4,3
5-FU@nanoNaY	0,21	2,9	0,08	1,6
5-FU@LTL	0,31	1,9	0,03	4,3

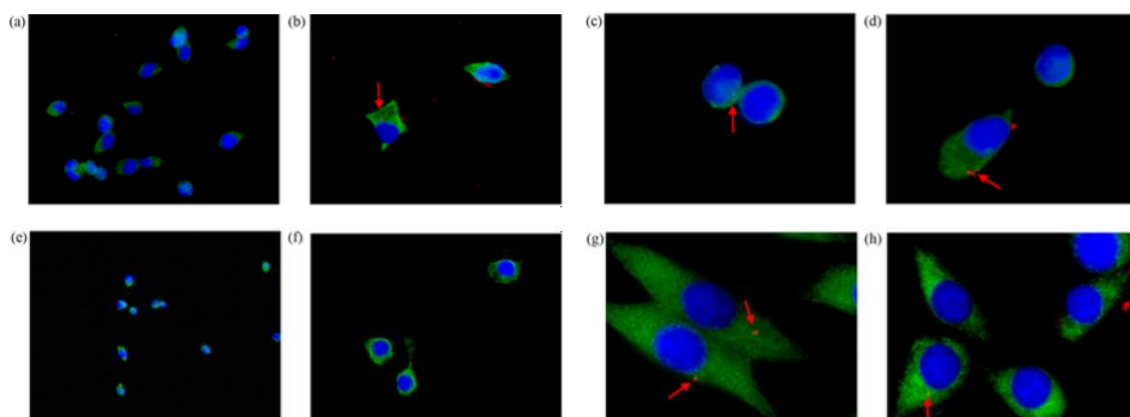


Figura IV-3. Localização celular do zeólito NaY carregado com Rodamina B em linhas celulares de carcinoma do colon retal (setas a vermelho). **Linha celular HCT-15:** (a) - (d); **Linha celular de RKO:** (e) - (h); **Controle:** (a), (e) e (f); **RB @ NaY:** (b), (c), (d), (g) e (h) (adaptado de ^[132]).

Ainda para o mesmo agente terapêutico foi feito outro estudo ^[112], mas usando outras estruturas de sílica mesoporosa, diferentes a nível de topologia e tamanho de poros, e com alumínio ou titânio na sua estrutura. Estudaram-se três zeólitos com uma estrutura 3D e com

diferentes tamanhos de poros: FAU (NaY) com poros grandes; MFI com poros médios e LTA (NaA) com poros pequenos [138]. Sintetizou-se também o sistema ETS-10 que tem uma estrutura 3D e poros de titânio de grandes dimensões [139], e o seu “progenitor” (NH₄) ZSM5 (MFI), foi modificado de modo a obter HZSM5 e NaZSM5.

O zeólito NaY foi usado em estudos anteriores e serve de comparação com as restantes estruturas [132]. Relativamente ao tamanho dos poros, subdividem-se em partículas maiores, com um tamanho de partícula superior a 100nm – NaY com 700 nm [132], ZSM5 com 880 nm, NaA com 2700 nm e ETS-10 com 2600 nm – e partículas menores, com um tamanho de partícula inferior a 100 nm – LTL com 80 nm [132]. Também as áreas superficiais foram determinadas para os diferentes sistemas, chegou-se os valores de 792 m²g, 566 m²g, 395 m²g e 290 m²g para NaY, LTL, ZSM5 e NaA, respetivamente.

A tabela IV-3 evidencia a carga de 5-FU nas diversas estruturas de sílica onde se constata que a incorporação do fármaco depende da estrutura porosa do sistema, pelo que estruturas com poros maiores (NaY e ETS-10) têm maior capacidade de carga; estruturas de poros intermédios (HZSM5 e NaZSM5) possuem uma carga intermédia e NaZSM5 apresenta carga inferior devido à incorporação de sódio (Na) (figura IV-2), seguindo-se a estrutura NaA, com menor tamanho de poro e conseqüentemente, menor incorporação de fármaco.

Tabela IV-3. Incorporação de 5-FU em sistemas de entrega de fármacos, (adaptado de [112]).

Hospedeiro	Sistema de <i>drug delivery</i>	5-FU (mmol por g _{hospedeiro})
NaY	5-FU@ NaY	7,5
HZSM5	5-FU@ HZSM5	7,4
NaZSM5	5-FU@ NaZSM5	6,8
NaA	5-FU@ NaA	5,8
ETS-10	5-FU@ ETS-10	7,6

Estudou-se o perfil de libertação do agente terapêutico 5-FU, num período de 360 minutos, em todos os sistemas e em meios de pH diferente de forma a simular o fluxo sanguíneo (pH de 7,4), intestinal (pH de 5,8) e estomacal (pH de 2) [140]. Observou-se que a concentração de fármaco permaneceu constante após 1 hora e que o fármaco era facilmente libertado dos diferentes sistemas microporosos estudados [132].

A figura IV-4 e IV-5 mostram o perfil de libertação a pH 7,4 nos sistemas ETS-10, NaY e NaA, e nos sistemas ZM5S e NaZMS5 e verifica-se que quase todo o fármaco, que é adsorvido em todos os sistemas de entrega, sofre libertação após 40 minutos. Comparando os sistemas de maiores dimensões, é visível que a libertação a partir de ETS-10 ligeiramente mais rápida.

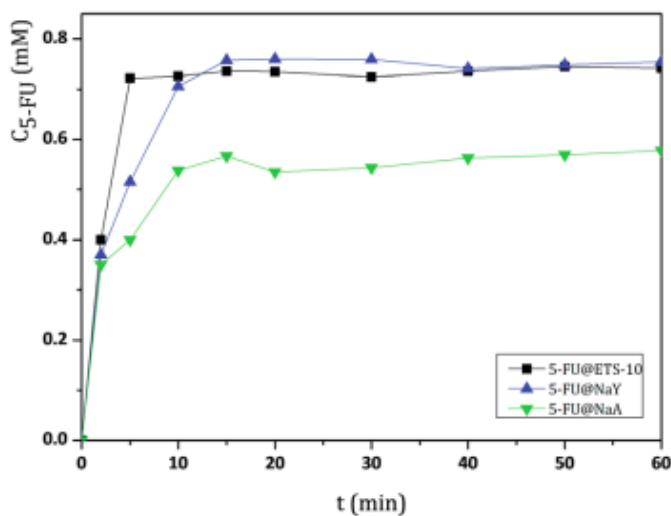


Figura IV-4. Perfil de liberação de sistemas de entrega de fármaco (5-FU@ETS-10, 5-FU@NaY e 5-FU@NaA) a pH de 7,4 e a 37°C durante 60 minutos ^[112].

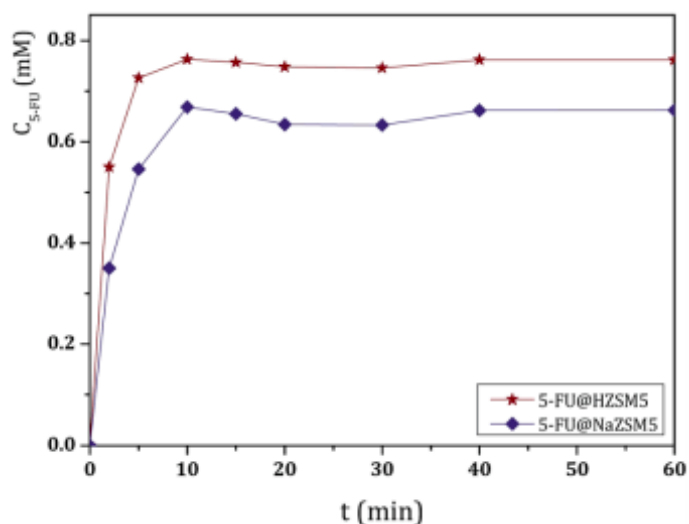


Figura IV-5. Perfil de liberação de 5-FU@HZSM5 e de 5-FU@NaZSM5 numa solução a pH = 7,4 e a 37°C durante 60 minutos ^[112].

Em seguida, foi também avaliado o efeito do pH para valores de 5,8 e 2,0 na liberação do fármaco. O 5-fluoracilo é um ácido fraco com um pka de 7,94 e em meios mais ácidos a estabilidade do sistema de entrega de fármaco pode ser afetada.

Pela figura IV-6 pode-se confirmar que a molécula de 5-FU não sofreu degradação, logo não é influenciada pela variação dos valores de pH entre 2,0 a 7,4. Sabendo que estruturas microporosas são essenciais para a proteção do fármaco incorporado, avaliou-se ainda a estabilidade das mesmas em pH mais ácido (2,0). As figura IV-7 a) e b) dizem respeito ao espectro de FITR de NaY e EST-10, respetivamente, antes e depois do tratamento a pH 2, não

se registrando por isso alteração nas bandas vibracionais a pH 2, não alterando a estabilidade do sistema ^[112].

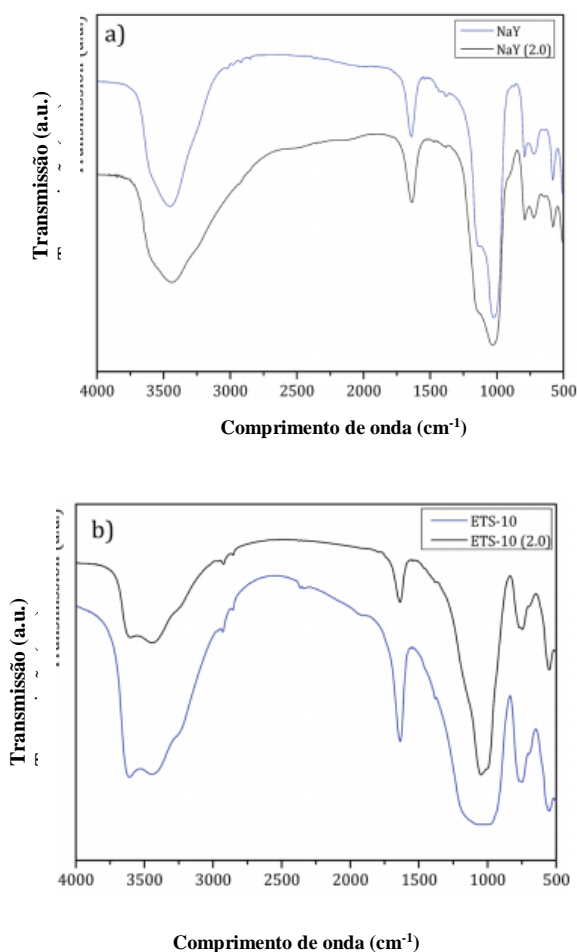


Figura IV-7. Espectro de FTIR de a) NaY e b) ETS-10, antes e após tratamento a pH 2 (adaptado de ^[112]).

Avaliou-se a viabilidade celular dos sistemas microporosos de maior poro - NaY e ETS-10 - em células do cancro colon-retal (HCT-15 e RKO) e em células do cancro da mama (MDA-MB-468). Pretendeu-se assim verificar a potencialização do agente quimioterapêutico 5-FU quando encapsulado. Na figura IV-8 observa-se a capacidade de libertação de 5-FU em 5-FU@ETS-10 e 5-FU@NaA e como a viabilidade celular de RKO é influenciada pela a incorporação do fármaco citotóxico, em concentrações crescentes, provocando assim uma diminuição da viabilidade.

A tabela IV-4 evidencia o parâmetro de IC₅₀ relativamente à viabilidade em células RKO e HCT-15, após tratamento com sistemas microporosos, onde se verificava uma potenciação do efeito do fármaco 5-FU em sistemas microporosos em ambas as linhagens celulares. Nas células RKO, o valor mais alto é 6,5, sendo observável nas estruturas tridimensionais EST-10, NaY e ZSM5; por outro lado, nas células de HTC-15, o valor é 6,8 e

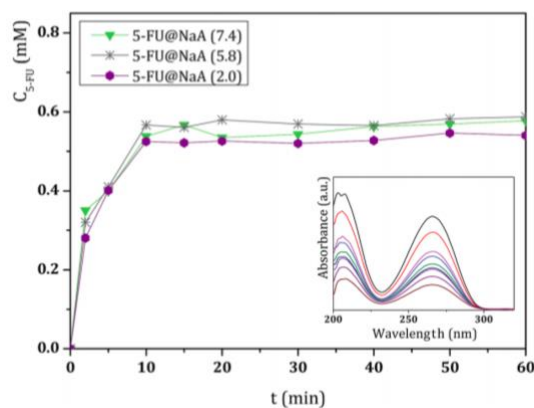


Figura IV-6. Perfil de libertação de 5-FU@NaA em soluções a pH de 7,4; 5,8 e 2 a 37°C, durante 60 minutos (adaptado de ^[112]).

verifica-se no sistema ZSM5. Na última linhagem eram as estruturas que favoreciam a potenciação, ao contrário do observado em RKO, que se devia à quantidade de carga de fármaco.

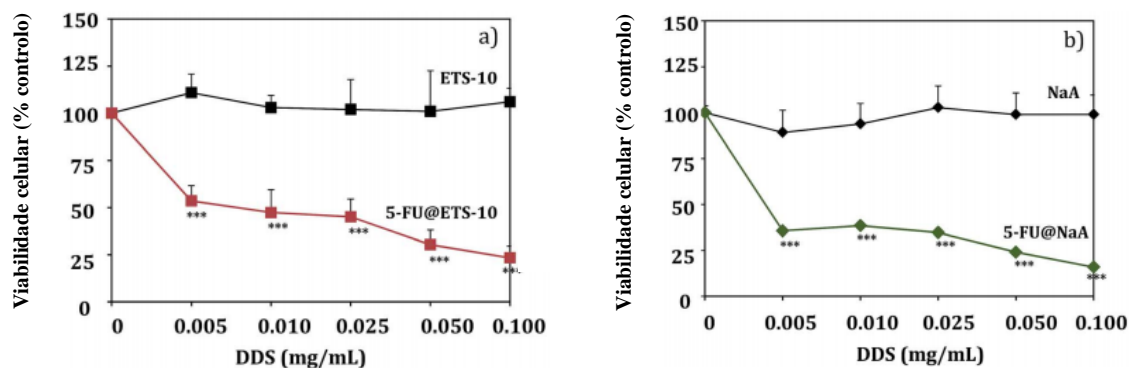


Figura IV-8. Efeito de a) ETS-10 e b) NaA e de sistemas de entrega de fármacos em células RKO (adaptado de ^[112]).

Tabela IV-4. Valores de IC_{50} para as linhagens RKO e HCT-15 com o 5-FU livre e incorporado em sistemas de entrega de fármaco (adaptado de ^[112]).

	HCT-15		RKO	
	IC_{50} (mM)	Potencialização	IC_{50} (mM)	Potencialização
5-FU	0,13	-	0,61	-
5-FU@NaY	0,02	6,5	0,10	6,1
5-FU@HZSM5	0,02	6,5	0,09	6,8
5-FU@NaZSM5	0,08	1,6	0,20	3,1
5-FU@NaA	0,11	1,2	0,11	5,5
5-FU@ETS-10	0,02	6,5	0,12	5,1
5-FU@LTL	0,03	4,3	0,31	1,9

Embora a incorporação de 5-FU varie para cada sistema de entrega de fármaco, o sistema microporoso mais adequado para o tratamento do cancro da mama em células MDA-MB-468 é o EST-10, uma vez que a potencialização observada, é quase o dobro quando comparada com os restantes sistemas zeolíticos (tabela IV-5).

Por outro lado, partículas de menores dimensões (LTL, como poros inferiores a 100 nm) são mais adequadas na administração sistémica, como administração IV ou inalatória, enquanto que partículas de maiores dimensões, como NaY, EST-10 e ZSM5 têm maior potencial na administração tópica.

Tabela IV-5. Valores de IC_{50} para células MDA-MB-468 com o 5-FU livre e incorporado em sistemas de entrega de fármaco (adaptado de [112]).

	MDA-MB-468	
	IC_{50} (mM)	Potencialização
5-FU	3,80	-
5-FU@NaY	0,38	10,0
5-FU@NaA	0,37	10,2
5-FU@ETS-10	0,19	19,9

4.3. Incorporação e liberação de óxido nítrico (NO) em sistemas microporosos EST-10 e análogos com alumínio (ETAS-10) e gálio (ETGS-10)

Moises L. Pinto et al. [139] estudaram a administração de óxido nítrico (NO) através de sistemas microporosos ETAS-10 contendo alumínio e ETGS-19 contendo gálio. Estes dois sistemas foram testados em substituição do EST-10 (que apenas contém silício e titânio), uma vez que tinham maior capacidade de incorporação de 95% e 55%, respetivamente. Desta forma, foi possível averiguar a influência da composição química no armazenamento e liberação de óxido nítrico.

O óxido nítrico é uma molécula essencial na regulação de sistemas cardiovasculares e está envolvida em processos fisiológicos como vasodilatação, prevenção da agregação plaquetária, formação de trombos, neurotransmissão e cicatrização de feridas [141]. Porém, este composto em concentrações elevadas revela ser muito tóxico, remetendo assim para a necessidade de haver um controlo na entrega direcionada e nos valores de concentração de modo a superar a toxicidade. O óxido nítrico deve ser libertado durante um determinado período de tempo e a uma taxa de libertação constante e de libertação lenta, de forma a haver um maior controlo da concentração de fármaco em longos períodos de tempo.

Como visível na figura IV-9, todos os compostos titanossilicato apresentam uma boa capacidade de adsorção. O ETS-10 tem uma maior área superficial ($356 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) e volume microporoso ($0,146 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$), seguindo-se o ETAS-10 com $276 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ de área superficial e $0,117 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ de volume do poro e o ETGS-10 com $250 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ e $0,104 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ de área superficial e volume do poro, respetivamente.

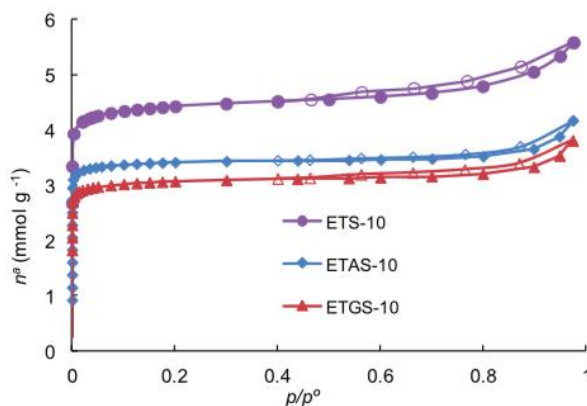


Figura IV-9. Estudo da adsorção de nitrogénio em compostos titanossilicato a -196°C (adaptado de [139]).

Passadas 72 horas, quando comparados com EST-10, os materiais ETAS-10 e ETGS-10 apresentam um aumento de adsorção de óxido nítrico de 95% e 55%, respetivamente, sendo que a adsorção de NO dependia da estrutura química da superfície dos sistemas e não da porosidade. Pela observação da figura IV-10, é visível um perfil de libertação de NO semelhante por parte dos sistemas ETS-10 e ETGS-10, até às 20 horas, e um perfil de libertação maior pelo ETAS-10. Embora ETGS-10 incorpore mais 55% de NO do que EST-10 (figura IV-11), a figura 38 mostra que a quantidade de NO libertado pelos dois sistemas é idêntica, concluindo-se que quantidade de fármaco libertado não depende da quantidade de NO adsorvido.

ETAS-10 possui um perfil de libertação mais lento, conseguindo libertar maiores quantidades. Desta forma, este sistema é bastante útil em aplicações terapêuticas, onde é precisa uma libertação lenta de NO por longos períodos de tempo. Por sua vez, ETS-10 e ETGS-10 revelam ser mais adequados quando se pretende uma libertação um pouco mais rápida de fármaco.

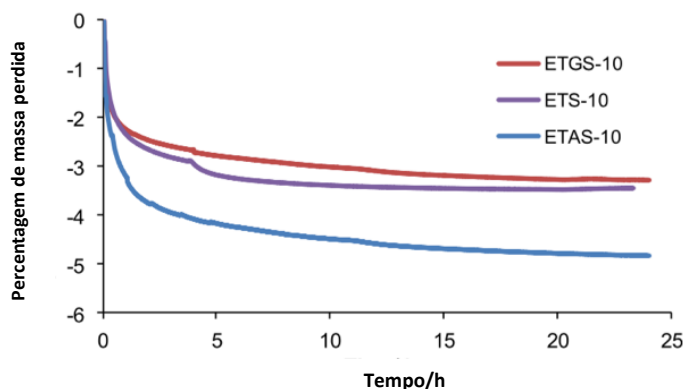


Figura IV-10. Perfil cinético da desadsorção de NO em microporos titanossilicatos em alto vácuo a 25°C , após adsorção a 80 kPa (adaptado de [139]).

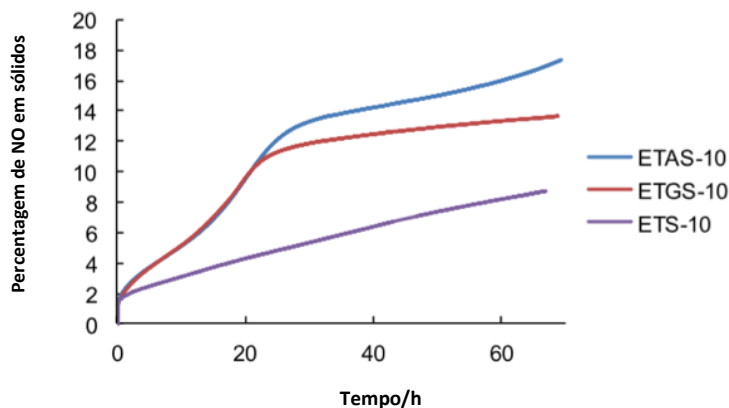


Figura IV-8. Perfil cinético da adsorção de NO em microporos titanossilicatos a 80 kPa e a 25°C (adaptado de ^[139]).

A partir de alterações espectrais de soluções de hemoglobina, quando em contacto com sistemas microporosos com NO incorporado, foi possível avaliar a quantidade de NO libertada na fase líquida, como visível na figura IV-12. O efeito biológico do NO baseou-se na reação de oxihemoglobina com NO de forma a originar metemoglobina e nitrato ^[142]. Após uma hora observam-se alterações no espectro UV-Vis da solução de oxihemoglobina, indicando que esta tinha sido consumida e transformada em metemoglobina, originando diminuição da intensidade das bandas de absorção a 542 e 577 nm. A forma das bandas de 500 e 630 nm indica a formação de metemoglobina, o que confirma a reação de oxihemoglobina com NO ^[142]. Na mesma figura vê-se que a concentração de NO na fase líquida, após uma hora, aumentou para 2,7; 2,1 e 2,8 nM para ETS-10, ETAS-10 e ETGS-10, respetivamente.

Como mostra a figura IV-13, o ETAS-10 é aquele que liberta mais rapidamente NO na fase líquida, atingindo um valor de libertação máxima a 0,25h. O ETS-10 é o sistema que liberta NO de forma mais lenta, uma vez que só atinge o seu valor máximo de libertação passada 1 hora e o ETSG-10 atinge uma libertação máxima após 0,7 horas. A taxa de libertação inicial de NO é 0,046 min⁻¹ para ETAS-10 e de 0,011 min⁻¹ para os restantes sistemas. Desta forma, pode-se concluir que a introdução de Al na estrutura ETS-10 origina uma libertação mais rápida de NO na fase líquida.

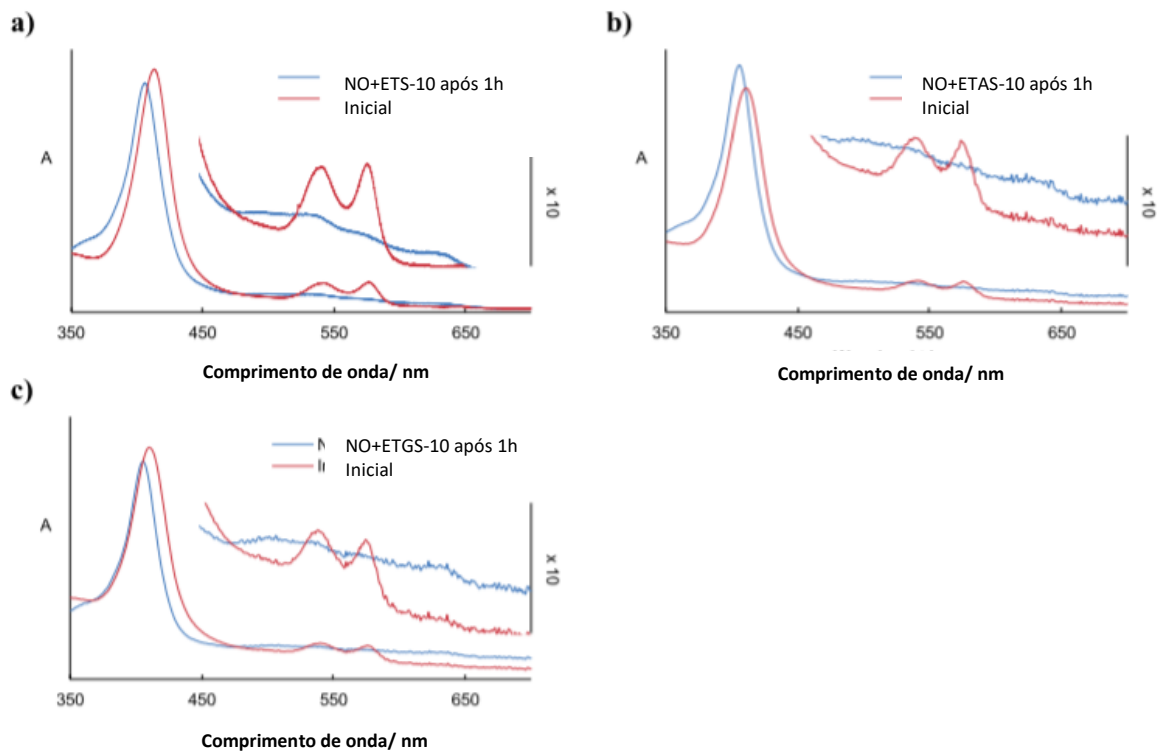


Figura IV-9. Espectro UV/vis de uma solução de oxihemoglobina introduzida em materiais com NO como a) ETS-10, b) ETAS-10 e c) ETGS-10 (adaptado de [139]).

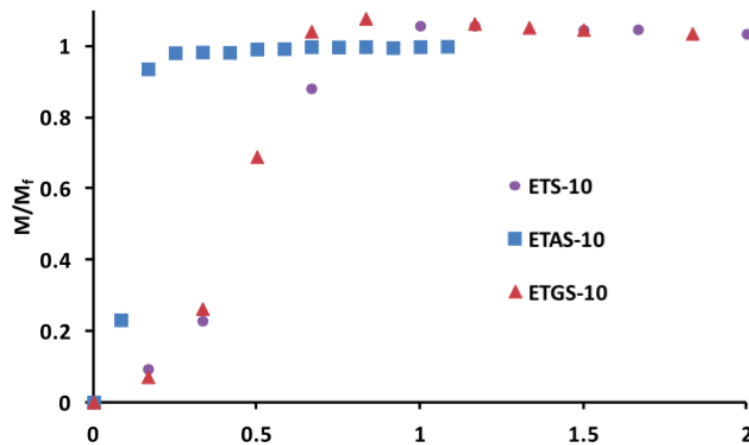


Figura IV-10. Liberação de NO vs tempo na fase líquida (adaptado de [139]).

4.4. Zeólitos ZSM-5 como sistemas de *drug delivery* e gentamicina

Atualmente, a administração de antibióticos por administração oral ou intravenosa é uma das formas de tratamento de várias patologias, porém a eficácia terapêutica nem sempre é a pretendida devido ao fraco aporte sanguíneo ou à pouca concentração de fármaco no sítio alvo [62,143]. O zeólito ZSM-5 possui poros de dimensões moleculares que tem inúmeras aplicações,

nomeadamente na catálise, na permuta iónica e na adsorção [61,62].

A gentamicina é um antibiótico usada na prevenção de infeções, apresentando um amplo espectro com ação bactericida, boa estabilidade e uma pequena taxa de resistência a corpos estranhos. Porém, a sua administração sistémica provoca alguns efeitos secundários como nefrotoxicidade e ototoxicidade. Desta forma, fez-se um estudo com o objetivo de verificar a biocompatibilidade, a propriedade de *drug delivery* e bactericida do ZSM-5, usando o zeólito ZSM-5 e partículas de hidroxiapatite (HAPs) como controlo.

Na figura IV-14 é visível a eficiência da incorporação do fármaco no zeólito e nas HAPs, baseando-se na quantidade de fármaco incorporado. A figura IV-14 a) permite afirmar que a eficiência é maior nos zeólitos ZSM-5, tendo um valor de 73%, enquanto que nos HAPs é visível apenas 26,6%; verifica-se ainda que a quantidade de fármaco libertado é 2,19 mg/g e 0,798mg/g nos zeólitos ZSM-5 e HAPs, respetivamente. Estes dados comprovam que a eficiência da incorporação de fármaco nos zeólitos ZSM-5 é três vezes maior que nas HAPS, o que se deve sobretudo à estrutura microporosa ordenada, à boa área superficial e aos grupos funcionais que possui.

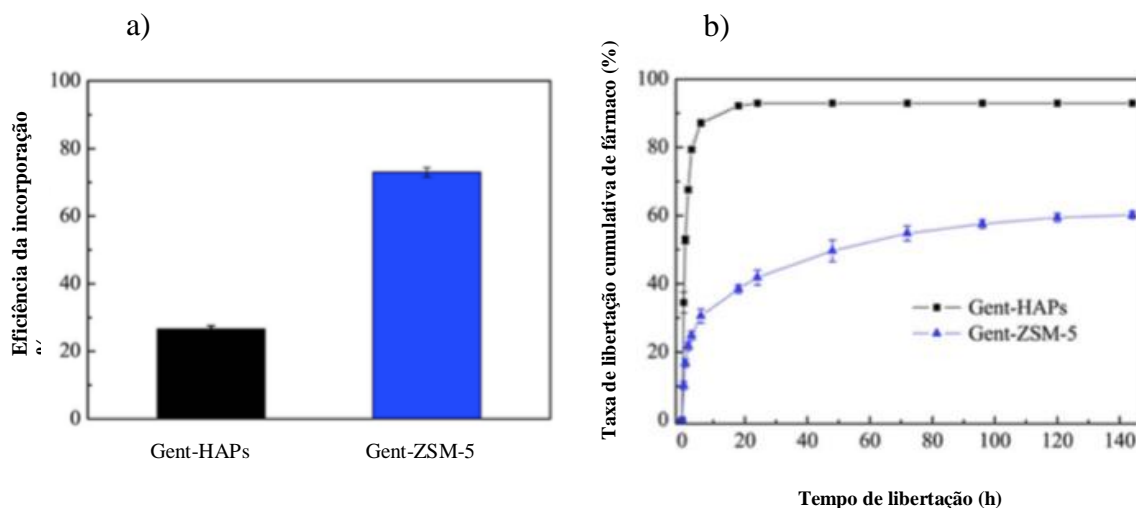


Figura IV-11. a) Eficiência da incorporação do fármaco nos zeólitos HAP e ZSM-5, numa solução de gentamicina com concentração =,216g/L; b) perfil de libertação do fármaco in vitro no Gent-HAPs e Gent-ZSM-5 (adaptado de [62]).

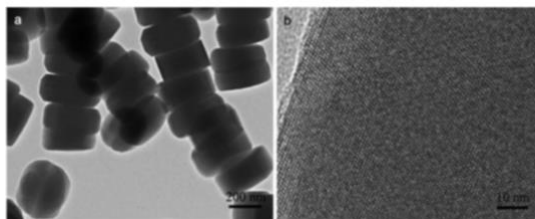


Figura IV-12. a) e b) Imagens obtidas a partir do TEM, de zeólitos ZSM-5 em diferentes ampliações (adaptado de [62]).

O fármaco usado neste estudo foi a gentamicina e tem como dimensões 0,43 x 0,91 nm. Por sua vez, o zeólito ZSM-5 tem um tamanho de poro de 0,55nm (figura IV.15), logo a gentamicina tem a capacidade de se inserir nos microporos.

Estruturalmente este zeólito apresenta uma área superficial de 380 m²/g e um número elevado de grupos hidroxilo e silanol (figura IV-16). Desta forma, a molécula de gentamicina vai ser adsorvida pelos zeólitos a partir da ligação de hidrogénio, uma vez que a gentamicina possui inúmeros grupos funcionais, como sejam grupos amina e hidroxilo.

O ZSM-5 enquanto transportador de fármaco possui uma nanoestrutura de estrutura microporosa e elevada área de superfície, o que favorece uma incorporação adequada de gentamicina nos canais microporosos bem como uma boa adsorção à área de superfície do zeólito, contrariamente às HAPs que possuem um comprimento de 160 nm e um diâmetro com 30 nm. Estas não apresentam uma estrutura porosa e ordenada e têm ainda uma pequena área de superfície de 8,1m²/g, o que dificulta a incorporação de fármacos.

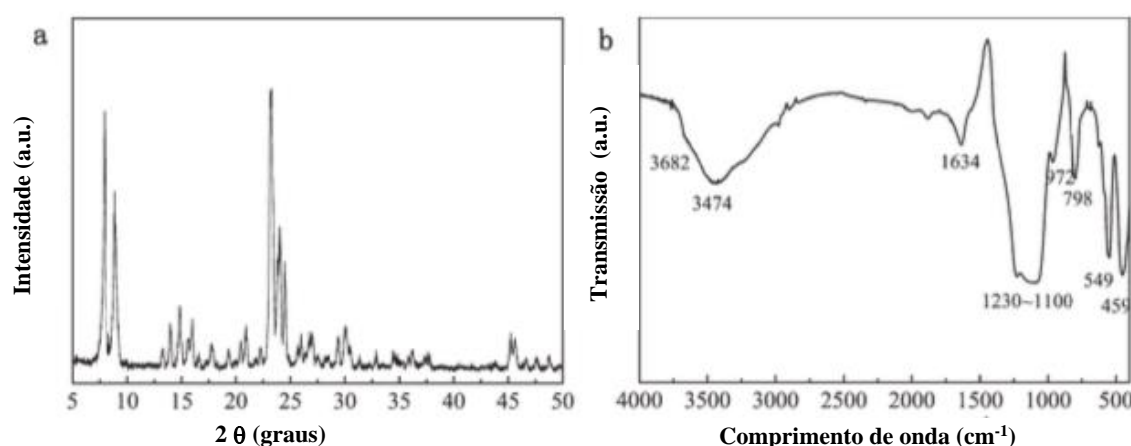


Figura IV-16. a) Padrão de XDR; b) Espectro de FTIR de zeólitos (adaptado de ¹⁶²¹).

Fez-se um teste onde se verificava a libertação do fármaco *in vitro*, tanto nos Gent-ZSM-5 como nos Gent-HAPs. A quantidade de fármaco libertada foi analisada a partir de métodos calorimétricos, onde foi visível valores de libertação de fármacos bastante diferentes, como descrito na figura IV-16 b). Inicialmente, nos Gent-HAPs havia uma libertação imediata do fármaco, ou seja, mais de 90% do fármaco incorporado era libertado num período de 6 horas e, após esse tempo, atingia-se uma situação de equilíbrio na libertação. Por sua vez, a libertação de fármaco no Gent-ZSM-5 apresentava um percurso lento e sustentado, aquando a libertação do mesmo por um período superior a 6 dias, o tempo suficiente para que houvesse um tratamento profilático, cujo máximo de libertação da gentamicina era 60,2%.

Para avaliar a propriedade anti-infecciosa de Gent-HAPs e Gent-ZSM-5 observaram-se culturas *Staphylococcus epidermidis*. As placas de petri 1 e 3 continham a bactéria e o transportador, ZSM-5 e HAPs, correspondentemente, e como se pode comprovar na figura IV-17a), a cor verde fluorescente dessas placas indica a presença de células viáveis, com consequente formação de biofilmes. Nas restantes placas 2 e 4 estava a bactéria juntamente com Gent-HAPs ou Gent-ZSM-5. Verificou-se que após um período de 24 horas, as placas apresentaram uma diminuição considerável da população bacteriana, sendo esta mais evidente

nas placas com Gent-ZSM-5. Deste modo, como é visível na figura IV-17b) a capacidade anti bactericida é quatro vezes superior na placa com Gent-ZSM-5, o que indica que este possui boas propriedades bactericidas, devendo-se às suas características enquanto transportador de fármaco.

Neste caso o zeólito, para além de permitir uma melhor incorporação e libertação sustentada de fármaco, também possui boas propriedades bactericidas, que favorecem a redução bacteriana.

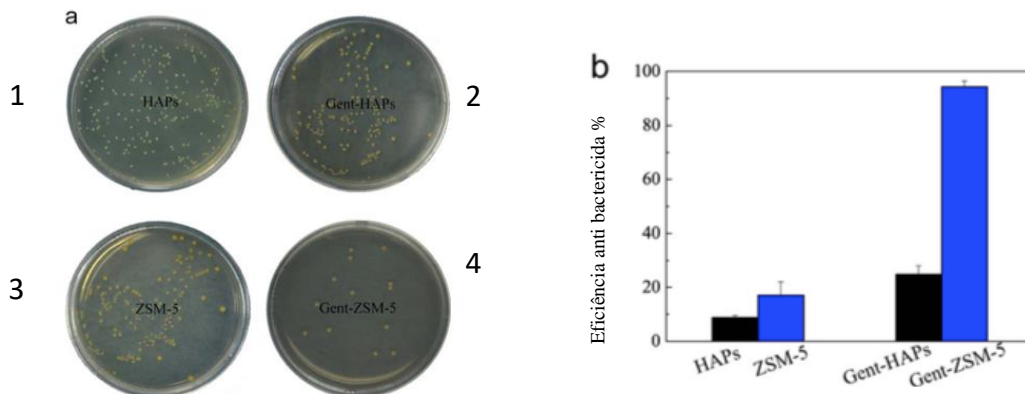


Figura IV-17. a) Imagens representativas do crescimento de bactérias nas HAPs (1), Gent-HAPs (2), ZSM-5 (3) e Gent-ZSM-5 (4), após um período de 24 horas; b) Eficiência antibacteriana contra a culturas *Staphylococcus epidermidis* (adaptado de ¹⁶²).

V. CONCLUSÃO

Os sistemas de entrega de fármacos – sistemas de *drug delivery* – vieram revolucionar a entrega de agentes terapêuticos. Novos suportes serviram como transportadores de novas moléculas de fármaco e têm permitido ainda ultrapassar determinadas barreiras sofridas durante a entrega de fármacos. Estes sistemas originaram uma administração efetiva e eficaz, o que proporcionou a entrega direcionada e controlada do fármaco, sempre com o objetivo de obter o máximo de benefício terapêutico e menor efeitos adversos associados.

Embora o uso de sistemas de *drug delivery* tenha revelado vantagens relativamente à administração convencional de fármacos, apresentava também algumas desvantagens. Por vezes, durante a entrega do agente terapêutico, poderia haver perda da atividade por parte do fármaco e ainda sofrer degradação pelo meio circundante ou, até mesmo, atuar em células e tecidos não alvo, devido à falta de especificidade. Desta forma, surgiu a necessidade de se criarem sistemas com uma libertação prematura nula ‘*zero premature release*’, onde a libertação das moléculas de fármaco ocorria unicamente quando se atingia o tecido alvo; sistemas que respondem a determinados estímulos (campo magnético, alterações de pH); sistemas de implantes e ainda sistemas onde a superfície sofreu funcionalização com a finalidade de aumentar a adsorção e libertação de agentes terapêuticos.

O uso de nanopartículas revelou-se fundamental a nível de terapêuticas farmacológicas, uma vez que estas possuem determinadas características e propriedades que aumentam a sua eficácia, diminuem problemas de toxicidade, tornando-as melhor que outras terapêuticas convencionais. Os estudos realizados em sistemas nanoparticulares revelaram alguns efeitos adversos, como por exemplo, o facto de os sistemas nem sempre atuarem no organismo humano como previsto em ensaios clínicos. Dever-se-á assim realizar mais ensaios até que se alcance e determine quais as características ideais das nanopartículas a nível do tamanho, do número de ligandos de segmentação, da incorporação do fármaco, da penetração do sistema no tecido tumoral, entre outras.

As nanopartículas de sílica mesoporosa como MCM-41 e SBA-15 demonstram ter biocompatibilidade com os sistemas celulares durante a entrega de determinados fármacos, o que garante a segurança e eficácia dos mesmos e uma melhor adsorção e incorporação do agente terapêutico, sem que exista libertação precoce do fármaco. Os sistemas de sílica apresentam determinadas características nomeadamente, uma estrutura mesoporosa que permite a incorporação de fármacos e que os protege do meio exterior, uma elevada área de superfície que facilita a adsorção, um grande volume e tamanho de poro e ainda a capacidade de a superfície e a entrada de poros poder sofrer funcionalização por parte de compostos orgânicos. Quanto ao processo de funcionalização da superfície, este é ainda responsável por favorecer a adsorção e a libertação controlada de fármacos. A sílica mesoporosa tem uma elevada densidade de grupos silanol, estes permitem a incorporação de diferentes grupos funcionais, o que condiciona a interação química entre o hospedeiro e o fármaco e que origina a obtenção de

superfícies com características diferentes. Um dos grupos mais introduzidos na superfície de sílica é o grupo amina. Diversos estudos mostraram que a amina funcionalização contribuiu para uma maior carga de fármaco, uma vez que após funcionalização, a superfície de sílica ficava com cargas positivas e com potencial zeta mais elevado, o que favorecia uma maior interação entre as moléculas de fármaco e os materiais de sílica mesoporosa. Para além disso, outra finalidade da funcionalização era originar uma libertação mais longa e controlada de fármaco. Num estudo feito por Yongju He et al. verificou-se que o uso de sistemas amina funcionalizados, também originava maior citotoxicidade e especificidade para células alvo, quando comparado com o fármaco na sua forma livre, o que proporcionava uma eficácia terapêutica e atividade anti tumoral e com menos efeitos adversos.

Por sua vez, os zeólitos também apresentam uma boa biocompatibilidade, no entanto, diferem das sílicas mesoporosas por serem materiais microporosos, nomeadamente o diâmetro de poro, o que tem algumas implicações a nível da funcionalização.

Relativamente aos zeólitos, os dois estudos realizados para o composto o 5-fluoracilo, permitem referir que quanto maior o volume dos poros, maior a carga de fármaco. Uma maior dose de fármaco contribuiria assim para uma diminuição acentuada da viabilidade celular, e consequentemente, maior potencialização do efeito citotóxico. Num outro estudo, envolvendo zeólitos e NO, verificou-se que os zeólitos podem ser satisfatoriamente utilizados no processo de incorporação e libertação de óxido nítrico embora seja necessário otimizar as suas características para um melhor desempenho.

Numa outra abordagem, usou-se o zeólito ZSM-5 e HAPs e verificou-se que o primeiro tem uma maior capacidade de carga para a gentamicina, devido à sua estrutura microporosa ordenada, boa área superficial e aos grupos funcionais que possui. O uso de Gent-ZSM-5 favorecia uma libertação lenta e sustentada e revelava uma boa capacidade anti bactericida.

De salientar que o tamanho dos poros poderá revelar alguns inconvenientes nomeadamente, poros de tamanho inferior, pois podem apresentar alguns impedimentos estéreos a nível da penetração das moléculas de fármaco nos poros do sistema de entrega de fármaco, o que influenciará a adsorção e libertação.

Pode-se assim concluir que tanto os sistemas envolvendo sílica mesoporosa como os sistemas envolvendo compostos zeolíticos, devido às suas características estruturais revelam um enorme potencial no desenvolvimento de vias inovadoras de entrega de fármacos.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S.K. Bannerjee, 2 (2012).
- [2] H.J. Lee, N. Choi, E.S. Yoon, I.J. Cho, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2017).
- [3] Y.H. Yun, B.K. Lee, K. Park, *J. Control. Release.* 219 (2015) 2–7.
- [4] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 7548–7558.
- [5] M. Sheikhpour, L. Barani, A. Kasaeian, *J. Control. Release.* 253 (2017) 97–109.
- [6] J.L. Vivero-Escoto, I.I. Slowing, B.G. Trewyn, V.S.-Y. Lin, *Small.* 6 (2010) 1952–1967.
- [7] M. Vallet-Regí, *Chem. - A Eur. J.* 12 (2006) 5934–5943.
- [8] D.D. Breimer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 33 (1998) 265–268.
- [9] K. Park, *J. Control. Release.* 190 (2014) 3–8.
- [10] M.E. Davis, Z. Chen, D.M. Shin, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 771–782.
- [11] V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Lindén, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 689–702.
- [12] L. P, J. -X, Li, Evolution of oral controlled release dosage forms, in: H.Wen, K.Park (Eds.), *Oral Control. Release Formul. Des. Drug Deliv.* John Wiley Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2010: pp. 21–31.
- [13] K.P. Hong Wen, (2011) 72.
- [14] D. Fitzpatrick, *Implant. Electron. Med. Devices.* (2015) 139–157.
- [15] L. Tang, J.W. Eaton, *Am. J. Clin. Pathol.* 103 (1995) 466–471.
- [16] Y. Wang, Q. Zhao, N. Han, L. Bai, J. Li, J. Liu, E. Che, L. Hu, Q. Zhang, T. Jiang, S. Wang, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11 (2015) 313–327.
- [17] M. Vallet-Regí, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Manzano, *Molecules.* 23 (2018) 1–19.
- [18] M. Moritz, M. Gieszke-Moritz, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 49 (2015) 114–151.
- [19] R.A. García-Muñoz, V. Morales, M. Linares, B. Rico-Oller, *Langmuir.* 30 (2014) 881–890.
- [20] R.A. García, V. Morales, T. Garcés, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 2607–2615.
- [21] V. Morales, J.A. Villajos, R.A. García, *J. Mater. Sci.* 48 (2013) 5990–6000.
- [22] A. Martín, V. Morales, J. Ortiz-Bustos, M. Pérez-Garnes, L.F. Bautista, R.A. García-Muñoz, R. Sanz, *Microporous Mesoporous Mater.* 262 (2018) 23–34.
- [23] P. Kortesuo, M. Ahola, S. Karlsson, I. Kangasniemi, A. Yli-Urpo, J. Kiesvaara, *Biomaterials.* 21 (2000) 193–198.
- [24] S. Chia, J. Urano, F. Tamanoi, B. Dunn, J.I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 6488–6489.
- [25] S. Radin, G. El-Bassyouni, E.J. Vresilovic, E. Schepers, P. Ducheyne, *Biomaterials.* 26 (2005) 1043–1052.
- [26] C.Y. Lai, B.G. Trewyn, D.M. Jeftinija, K. Jeftinija, S. Xu, S. Jeftinija, V.S.Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4451–4459.
- [27] S. Wang, *Microporous Mesoporous Mater.* 117 (2009) 1–9.
- [28] I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regí, *Microporous Mesoporous Mater.* 132 (2010) 442–452.
- [29] X. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Tang, J. He, *Biomaterials.* 31 (2010) 438–448.
- [30] Q. He, J. Shi, F. Chen, M. Zhu, L. Zhang, *Biomaterials.* 31 (2010) 3335–3346.
- [31] Y. Zhang, H.F. Chan, K.W. Leong, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 104–120.
- [32] M. Colilla, B. González, M. Vallet-Regí, *Biomater. Sci.* 1 (2013) 114–134.
- [33] D.M. Schlipf, S.E. Rankin, B.L. Knutson, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 (2013) 10111–10117.
- [34] V. Morales, M. Gutiérrez-Salmerón, M. Balabasquer, J. Ortiz-Bustos, A. Chocarro-

- Calvo, C. García-Jiménez, R.A. García-Muñoz, *Adv. Funct. Mater.* 26 (2016) 7291–7303.
- [35] J.M. Rosenholm, M. Lindén, *J. Control. Release.* 128 (2008) 157–164.
- [36] P. Yang, Z. Quan, L. Lu, S. Huang, J. Lin, *Biomaterials.* 29 (2008) 692–702.
- [37] G. Wang, A.N. Otuonye, E.A. Blair, K. Denton, Z. Tao, T. Asefa, *J. Solid State Chem.* 182 (2009) 1649–1660.
- [38] R. Mortera, S. Fiorilli, E. Garrone, E. Verné, B. Onida, *Chem. Eng. J.* 156 (2010) 184–192.
- [39] J. Salonen, L. Laitinen, A.M. Kaukonen, J. Tuura, M. Björkqvist, T. Heikkilä, K. Vähä-Heikkilä, J. Hirvonen, V.P. Lehto, *J. Control. Release.* 108 (2005) 362–374.
- [40] A.L. Doadrio, E.M.B. Sousa, J.C. Doadrio, J. Pérez Pariente, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, *J. Control. Release.* 97 (2004) 125–132.
- [41] Q. He, J. Shi, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 5845–5855.
- [42] P. Horcajada, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí, *Microporous Mesoporous Mater.* 68 (2004) 105–109.
- [43] H. Hata, S. Saeki, T. Kimura, Y. Sugahara, K. Kuroda, *Chem. Mater.* 11 (1999) 1110–1119.
- [44] N.K. Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka, *Nature.* 421 (2003) 350–353.
- [45] V. Morales, M.N. Idso, M. Balabasquer, B. Chmelka, R.A. García-Muñoz, *J. Phys. Chem. C.* 120 (2016) 16887–16898.
- [46] B. Muñoz, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, I. Díaz, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.* 15 (2003) 500–503.
- [47] W.J. Roth, J.C. Vartuli, *Stud. Surf. Sci. Catal.* (2005) 91–110.
- [48] A.J.. Bento, Desenvolvimento de nanocompósitos de polietileno de elevada prestação mecânica, utilizando materiais mesoporosos e polimerização “in-situ”, Instituto Superior Técnico, 2013.
- [49] J.M. Thomas, R. Raja, *J. Organomet. Chem.* 689 (2004) 4110–4124.
- [50] R. Mellaerts, R. Mols, P. Kayaert, P. Annaert, J. Van Humbeeck, G. Van den Mooter, J.A. Martens, P. Augustijns, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 169–179.
- [51] R. Mellaerts, R. Mols, J.A.G. Jammaer, C.A. Aerts, P. Annaert, J. Van Humbeeck, G. Van den Mooter, P. Augustijns, J.A. Martens, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 223–230.
- [52] R. Mellaerts, K. Houthoofd, K. Elen, H. Chen, M. Van Speybroeck, J. Van Humbeeck, P. Augustijns, J. Mullens, G. Van den Mooter, J.A. Martens, *Microporous Mesoporous Mater.* 130 (2010) 154–161.
- [53] H.-T. Chen, S. Huh, V.S. -Y. Lin, “Fine-Tuning the Functionalization of Mesoporous Silica”, in: J. Regalbuto (Ed.), *Catal. Prep. Sci. Eng.* CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [54] M.H. Lim, A. Stein, *Chem. Mater.* 11 (1999) 3285–3295.
- [55] N. Ayres, S.G. Boyes, W.J. Brittain, *Langmuir.* 23 (2007) 182–189.
- [56] R.-V. Ostaci, D. Damiron, S. Capponi, G. Vignaud, L. Léger, Y. Grohens, E. Drockenmuller, *Langmuir.* 24 (2008) 2732–2739.
- [57] L. Bacakova, M. Vandrovcova, I. Kopova, I. Jirka, *Biomater. Sci.* 6 (2018) 974–989.
- [58] B. Jha, D.N. Singh, B. Jha, D.N. Singh, *Fly Ash Zeolites, Advanced Structered Materials* 78, Chapter 2 “Basic of Zeolites”, Springer, Singapore, 2016 ISBN: 978-981-10-1404-8.
- [59] A. Feliczak-Guzik, *Microporous Mesoporous Mater.* 259 (2018) 33–45.
- [60] R.G. Bell, Chapter 1 - Structure Prediction of Microporous Materials, in: R. Catlow, V. Van Speybroeck, R.A. van Santen (Eds.), *Model. Simul. Sci. Micro- Meso-Porous Mater.*, Elsevier, 2018: pp. 1–25.
- [61] S.C. Larsen, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 18464–18474.

- [62] Y.-P. Guo, T. Long, Z.-F. Song, Z.-A. Zhu, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 102 (2014) 583–591.
- [63] J.S. Beck, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10834–10843.
- [64] J. Fan, C. Yu, F. Gao, J. Lei, B. Tian, L. Wang, Q. Luo, B. Tu, W. Zhou, D. Zhao, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 42 (2003) 3146–3150.
- [65] M. Vallet-Regí, A. Rámila, R.P. Del Real, J. Pérez-Pariente, *Chem. Mater.* 13 (2001) 308–311.
- [66] I. Izquierdo-Barba, Á. Martínez, A.L. Doadrio, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (2005) 365–373.
- [67] T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.* 52 (1963) 1145–1149.
- [68] L. Rashidi, E. Vasheghani-Farahani, K. Rostami, F. Ganji, M. Fallahpour, *ASIA-PACIFIC J. Chem. Eng.* (2014) 845–853.
- [69] E. Giannakopoulos, P. Stathi, K. Dimos, D. Gournis, Y. Sanakis, Y. Deligiannakis, *Langmuir.* 22 (2006) 6863–6873.
- [70] D. Sławińska, P. Rolewski, J. Sławiński, *Int. Agrophysics.* 21 (2007) 199–208.
- [71] F. Qu, G. Zhu, S. Huang, S. Li, J. Sun, D. Zhang, S. Qiu, *Microporous Mesoporous Mater.* 92 (2006) 1–9.
- [72] M. Vallet-Regí, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano, *Drug Metab. Lett.* 1 (2007) 37–40.
- [73] T. Azais, C. Tourné-Péteilh, F. Aussenac, N. Baccile, C. Coelho, J.M. Devoisselle, F. Babonneau, *Chem. Mater.* 18 (2006) 6382–6390.
- [74] M. Vallet-Regí, *Dalt. Trans.* (2006) 5211–5220.
- [75] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45 (2006) 3216–3251.
- [76] V.S.Y. Lin, C.Y. Lai, J. Huang, S.A. Song, S. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 11510–11511.
- [77] C. Tourné-Péteilh, D. Brunel, S. Bégu, B. Chiche, F. Fajula, D.A. Lerner, J.M. Devoisselle, *New J. Chem.* 27 (2003) 1415–1418.
- [78] S.W. Song, K. Hidajat, S. Kawi, *Langmuir.* 21 (2005) 9568–9575.
- [79] W. Zeng, X.F. Qian, Y.B. Zhang, J. Yin, Z.K. Zhu, *Mater. Res. Bull.* 40 (2005) 766–772.
- [80] W. Zeng, X.F. Qian, J. Yin, Z.K. Zhu, *Mater. Chem. Phys.* 97 (2006) 437–441.
- [81] J. Ortiz-Bustos, A. Martínez, V. Morales, R. Sanz, R.A. García-Muñoz, *Microporous Mesoporous Mater.* 240 (2017) 236–245.
- [82] D. A.L., S. A.J., S.-M. J.M., V.-R. M., *Res. Support. Non-U.S. Gov't, Rev. J. Artic.* 21 (2015) 6213–6819.
- [83] F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regí, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 8116–8117.
- [84] J.C. Doadrio, E.M.B. Sousa, I. Izquierdo-Barba, A.L. Doadrio, J. Perez-Pariente, M. Vallet-Regí, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 462–466.
- [85] K. Yoncheva, M. Popova, A. Szegedi, J. Mihaly, B. Tzankov, N. Lambov, S. Konstantinov, V. Tzankova, F. Pessina, M. Valoti, *J. Solid State Chem.* 211 (2014) 154–161.
- [86] U. Klotz, M. Schwab, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 267–279.
- [87] B. Moulari, D. Pertuit, Y. Pellequer, A. Lamprecht, *Biomaterials.* 29 (2008) 4554–4560.
- [88] Y. He, L. Luo, S. Liang, M. Long, H. Xu, *J. Biomater. Appl.* 32 (2017) 524–532.
- [89] A. Choucair, P.L. Soo, A. Eisenberg, *Langmuir.* 21 (2005) 9308–9313.
- [90] B. Chang, X. Sha, J. Guo, Y. Jiao, C. Wang, W. Yang, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 9239–9247.
- [91] A. Wani, E. Muthuswamy, G.H.L. Savithra, G. Mao, S. Brock, D. Oupický, *Pharm. Res.* 29 (2012) 2407–2418.

- [92] Y. Matsumura, H. Maeda, 46 (1986) 6387–6392.
- [93] F. Danhier, O. Feron, V. Préat, J. Control. Release. 148 (2010) 135–146.
- [94] M. Egeblad, E.S. Nakasone, Z. Werb, Dev. Cell. 18 (2010) 884–901.
- [95] M.R. Villegas, A. Baeza, M. Vallet-Regí, ACS Appl. Mater. Interfaces. 7 (2015) 24075–24081.
- [96] I. Vegh, M. Grau, M. Gracia, J. Grande, P. De La Torre, A.I. Flores, Cancer Gene Ther. 20 (2013) 8–16.
- [97] J.L. Paris, P.D. La Torre, M. Manzano, M.V. Cabañas, A.I. Flores, M. Vallet-Regí, Acta Biomater. 33 (2016) 275–282.
- [98] A. Baeza, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Expert Opin. Drug Deliv. 12 (2015) 319–337.
- [99] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Nat. Mater. 12 (2013) 991–1003.
- [100] V.P. Torchilin, Nat. Rev. Drug Discov. 13 (2014) 813–827.
- [101] E. Ruiz-Hernández, A. Baeza, M. Vallet-Regí, ACS Nano. 5 (2011) 1259–1266.
- [102] S.R. Sirsi, M.A. Borden, Adv. Drug Deliv. Rev. 72 (2014) 3–14.
- [103] J. Wang, M. Pelletier, H. Zhang, H. Xia, Y. Zhao, Langmuir. 25 (2009) 13201–13205.
- [104] J. Xuan, O. Boissière, Y. Zhao, B. Yan, L. Tremblay, S. Lacelle, H. Xia, Y. Zhao, Langmuir. 28 (2012) 16463–16468.
- [105] D.P. Ferris, Y.L. Zhao, N.M. Khashab, H.A. Khatib, J.F. Stoddart, J.I. Zink, J. Am. Chem. Soc. 131 (2009) 1686–1688.
- [106] Z. Wang, M. Boudjelal, S. Kang, Nat. Med. 5 (1999) 0–4.
- [107] M. Podda, M.G. Traber, C. Weber, L.J. Yan, L. Packer, Free Radic. Biol. Med. 24 (1998) 55–65.
- [108] Y. Shindo, E. Witt, L. Packer, J. Invest. Dermatol. 100 (1993) 260–265.
- [109] J. Olejniczak, C.J. Carling, A. Almutairi, J. Control. Release. 219 (2015) 18–30.
- [110] M. Martínez-Carmona, D. Lozano, A. Baeza, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Nanoscale. 9 (2017) 15967–15973.
- [111] Q. Yang, S. Wang, P. Fan, L. Wang, Y. Di, K. Lin, F.S. Xiao, Chem. Mater. 17 (2005) 5999–6003.
- [112] N. Vilaça, A.F. Machado, F. Morais-Santos, R. Amorim, A. Patrícia Neto, E. Logodin, M.F.R. Pereira, M. Sardo, J. Rocha, P. Parpot, A.M. Fonseca, F. Baltazar, I.C. Neves, RSC Adv. 7 (2017) 13104–13111.
- [113] N.A. Peppas, Adv. Drug Deliv. Rev. 65 (2013) 5–9.
- [114] L. Bacakova, M. Vandrovcova, I. Jirka, (2018) 974–989.
- [115] K. Saribeyoglu, E. Aytac, S. Pekmezci, S. Saygili, H. Uzun, G. Ozbay, S. Aydin, H.O. Seymen, Asian J. Surg. 34 (2011) 153–157.
- [116] G. Dogliotti, A.E. Malavazos, S. Giacometti, U. Solimene, M. Fanelli, M.M. Corsi, E. Dozio, J. Clin. Biochem. Nutr. 50 (2012) 195–198.
- [117] P. Pellegrino, B. Mallet, S. Delliaux, Y. Jammes, R. Guieu, O. Schäf, Biochem. Biophys. Res. Commun. 410 (2011) 478–483.
- [118] M. Montinaro, D. Uberti, G. MacCarinelli, S.A. Bonini, G. Ferrari-Toninelli, M. Memo, Life Sci. 92 (2013) 903–910.
- [119] B. Shen, J.C. Scaiano, A.M. English, Photochem. Photobiol. 82 (2006) 5.
- [120] M. Cutovic, M. Lazovic, V. Vukovic-Dejanovic, D. Nikolic, I. Petronic-Markovic, D. Cirovic, J. Altern. Complement. Med. 00 (2017) acm.2016.0414.
- [121] S. Pourshahrestani, E. Zeimaran, I. Djordjevic, N.A. Kadri, M.R. Towler, Mater. Sci. Eng. C. 58 (2016) 1255–1268.
- [122] J. Li, W. Cao, X.X. Lv, L. Jiang, Y.J. Li, W.Z. Li, S.Z. Chen, X.Y. Li, Acta Pharmacol. Sin. 34 (2013) 367–372.
- [123] S. Mortazavi, A. Tavasoli, M. Atefi, N. Tanide, N. Radpey, P. Roshan-Shomal, H. Moradi, S. Taeb, World J. Emerg. Med. 4 (2013) 123–7.

- [124] H. Khoshmohabat, B. Dalfardi, A. Dehghanian, H.R. ez. Rasouli, S.M. ohamma. J. Mortazavi, S. Paydar, J. Surg. Res. 200 (2016) 732–737.
- [125] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, Nat. Rev. Cancer. 3 (2003) 330–338.
- [126] N. Zhang, Y. Yin, S.J. Xu, W.S. Chen, Molecules. 13 (2008) 1551–1569.
- [127] K. Yoneda, T. Yamamoto, E. Ueta, T. Osaki, 137 (1999).
- [128] J.L. Arias, M.A. Ruiz, M. López-Viota, Á. V. Delgado, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 62 (2008) 64–70.
- [129] F.H. Lin, Y.H. Lee, C.H. Jian, J.M. Wong, M.J. Shieh, C.Y. Wang, Biomaterials. 23 (2002) 1981–1987.
- [130] J.L. Arias, Molecules. 13 (2008) 2340–2369.
- [131] Y. Zhu, T. Ikoma, N. Hanagata, S. Kaskel, Small. 6 (2010) 471–478.
- [132] N. Vilaça, R. Amorim, A.F. Machado, P. Parpot, M.F.R. Pereira, M. Sardo, J. Rocha, A.M. Fonseca, I.C. Neves, F. Baltazar, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 112 (2013) 237–244.
- [133] G. Calzaferri, S. Huber, H. Maas, C. Minkowski, Angew. Chemie - Int. Ed. 42 (2003) 3732–3758.
- [134] L. Ferreira, A.M. Fonseca, G. Botelho, C.A. Aguiar, I.C. Neves, Microporous Mesoporous Mater. 160 (2012) 126–132.
- [135] I. Kuźniarska-Biernacka, K. Biernacki, A.L. Magalhães, A.M. Fonseca, I.C. Neves, J. Catal. 278 (2011) 102–110.
- [136] I.C. Neves, C. Cunha, M.R. Pereira, M.F.R. Pereira, A.M. Fonseca, J. Phys. Chem. C. 114 (2010) 10719–10724.
- [137] A. Datt, D. Fields, S.C. Larsen, J. Phys. Chem. C. 116 (2012) 21382–21390.
- [138] U. do Algarve, .
- [139] M.L. Pinto, A.C. Fernandes, F. Antunes, J. Pires, J. Rocha, Microporous Mesoporous Mater. 229 (2016) 83–89.
- [140] M.R.C. Marques, R. Loebenberg, M. Almukainzi, Dissolution Technol. (2011) 15–28.
- [141] M. S., P. R.M, Higgs E.A., Pharmacol Rev. 43 (1991) 109–42.
- [142] M. Feelisch, D. Kubitzek, J. Werringloer, No Title, in: M. Feelisch, J.S. Stamler (Eds.), Nitric Oxide Res., John Wiley Sons, Ltd., New York, 1996: pp. 455–478.
- [143] A. Lucas-Girot, M.C. Verdier, O. Tribut, J.C. Sangleboeuf, H. Allain, H. Oudadesse, J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater. 73 (2005) 164–170.
- [144] D. Brühwiler, Nanoscale. 2 (2010) 887–892.