



CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Dissertação de Mestrado

Síntese e caracterização de sólidos de coordenação biocompatíveis
para incorporação de fármacos

RENATA CAROLINA ALVES

Araraquara
2017

RENATA CAROLINA ALVES

**Síntese e caracterização de sólidos de coordenação biocompatíveis
para incorporação de fármacos**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestra em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Renata Carolina
A474s Síntese e caracterização de sólidos de coordenação
biocompatíveis para incorporação de fármacos / Renata
Carolina Alves. – Araraquara : [s.n.], 2017
89 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Regina Célia Galvão Frem

1. Materiais porosos. 2. Ions complexos.
3. Biocompatibilidade. 4. Adenina. 5. Tecnologia de
liberação controlada. I. Título.

RENATA CAROLINA ALVES

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 20 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Regina Célia Galvão Frem (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Marllus Chorilli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Renata Carolina Alves

Data de Nascimento: 27 de maio de 1988

Naturalidade: São Carlos – SP

Nacionalidade: Brasileira

Filiação: Pai: Valdecir Alves Junior Mãe: Gislaine Cristina Nóbrega Alves

Nome em citações bibliográficas: Alves, R. C.

Endereço profissional

Departamento de Química Geral e Inorgânica, Instituto de Química de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Rua Prof. Francisco
Degni, 55, Bairro Quitandinha, CEP: 14800-060 – Araraquara, SP

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2015-2017: Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Inorgânica.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IQ-UNESP, Araraquara.

Dissertação: Síntese e caracterização de BioMOFs (*Metal Organic Frameworks* Biocompatíveis) para incorporação de fármacos.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Bolsa: CAPES.

2009-2014: Bacharelado em Química com ênfase tecnológica.

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar

Monografia: Toxicidade de metais em brinquedos.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Apresentações de trabalhos

ALVES, R.C.; FREM, R. C. G.; LUCENA, G. N. Drug delivery of diclofenac sodium by Zn(II)-based BioMOF. In: XVIII BMIC, Hotel Colina Verde – São Pedro, 2016.

ALVES, R.C.; FREM, R. C. G.; LUCENA, G. N. Cu(II) cluster based on mixed ligands for drug delivery of diclofenac sodium. In: XVIII BMIC, Hotel Colina Verde – São Pedro, 2016.

ALVES, R. C.; FREM, R. C. G.; LUCENA, G. N. Synthesis, characterization and luminescent properties of a Bio-Metal Organic Framework based on adenine ligand. In: Workshop Australia-Unesp: building a task force on materials for life, Araraquara, 2015.

ALVES, R. C.; SILVA, M. M.; BATISTA, A. A.; DINELLI, L. R. Eletrodo modificado com a supramolécula {Zn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄} aplicado na detecção de dopamina. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2012.

ALVES, R. C.; SILVA, M. M.; BATISTA, A. A.; DINELLI, L. R. Eletrodo de pasta de carbono modificado com a supramolécula {Mn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄}CH₃COO, aplicado na detecção do sildenafil (Viagra). In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2012.

Participação em eventos científicos

VIII Semana da Química, realizado no período de 01 a 05 de agosto de 2011, Departamento de Química, UFSCar - São Carlos.

Workshop Austrália-Unesp: Materials for Life, realizado no dia 16 de julho de 2015, Instituto de Química, UNESP-Araraquara.

35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizado no período de 28 a 31 de maio de 2012, Águas de Lindóia.

Workshop Internacional Year of Light, realizado no dia 5 de março de 2015, Instituto de Química, UNESP-Araraquara.

XVIII Brazilian Meeting in Inorganic Chemistry (BMIC), realizado no período de 25 a 30 de setembro de 2016, Hotel Colina Verde – São Pedro, 2016.

XVII Disciplina Intersemestral “Química Forense: Uma análise prática da Química que soluciona crimes”, realizado no período de 04 a 08 de fevereiro de 2013, Departamento de Química da FFCLRP/USP, Campus de Ribeirão Preto.

Patente

MANSUR, M. T. M. N.; SILVA, M. F. G. F.; ALVES, R. C.; GONÇALVES, D. M.; OLIVEIRA, K. R. P. Método de avaliação da atividade antimicrobiana de uma composição sobre fitopatógenos e composição antibacteriana. Situação: depositada.

Capítulo de livro

FREM, R. C. G.; ALVES, R. C.; LUCENA, G. N.; ARROYOS, G.; FLOR, J. B. S.; FÁVARO, M. A.; COURA, M. F. **The Fascinating Chemistry of MOFs**. IN: Recent Advances in Complex Functional Materials. From Design to Application. Editors: Longo, Elson, La Porta, Felipe de Almeida (Eds.) Springer, 2017 (*in press*).

4. ESTÁGIOS E BOLSAS

Bolsa no Programa de Educação Tutorial – PET concedida pelo MEC de janeiro de 2010 a novembro de 2013.

Estágio não obrigatório na empresa Dissoltex Indústria Química LTDA (São Carlos – SP), realizado no período de janeiro a fevereiro de 2011.

Estágio curricular obrigatório na empresa Faber – Castell (São Carlos – SP), realizado no período de dezembro de 2013 a junho de 2014.

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Professora particular de Química na escola Maquifísica (São Carlos – SP), outubro de 2014 a dezembro de 2014.

Dedico este trabalho ao meu falecido avô José Jesuito Nobrega que foi desde muito cedo o grande incentivador de tudo isso.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigado....

Aos meus pais Valdecir e Gislaine e irmã Fernanda, por todo apoio, carinho, admiração, horas de conselhos e por me darem coragem de prosseguir e nunca desistir dos meus sonhos e objetivos. Aqui gostaria de deixar minha eterna gratidão à minha mãe, pois sem ela, eu não teria conseguido enfrentar todas as dificuldades vivenciadas não só nestes dois anos, mas em toda minha vida. Muito obrigada por tudo que você representa em minha vida e me desculpa pelas noites que não te deixava dormir quando meus experimentos davam errado, pelas horas que passávamos no telefone pois queria contar todos os detalhes que acontecia no laboratório e você tinha suas coisas para fazer. Só tenho a agradecer por todo o apoio;

A Profa. Dra. Regina Frem pela orientação, confiança, paciência, amizade, por todos os ensinamentos que pude adquirir nesses dois anos, pois apesar de discordarmos às vezes, eu aprendi muito com você e hoje posso dizer que sei um pouquinho sobre os MOFs. Gostaria de agradecer também pelas horas de conversa e psicologia, pois muitas vezes quando estava cansada ou com problemas você me chamava em sua sala e parava tudo só para me dar atenção e muitas vezes me tratava como se fosse sua filha, então muito obrigada mesmo por me aguentar, pois sei que não é fácil e me desculpe por qualquer coisa. Mas quero que saiba que você foi e será uma pessoa muito importante tanto na minha vida profissional quanto pessoal;

Ao meu grande amigo Guilherme (Gibbs), por toda a paciência que teve comigo desde o momento que cheguei, aos dias que ligava a noite porque não estava conseguindo plotar um gráfico. Ao apoio e parceira nos dias de trabalho. Muito obrigada, pois mesmo quando tudo estava dando errado no laboratório era você que me pedia para ter paciência e continuar;

Ao técnico do laboratório Rafael que teve muita paciência, pois sempre pedia para fazer um infra com rapidez. Ou então porque não achava algo no laboratório e acabava virando piada pois estava bem perto de mim e mesmo assim eu nunca encontrava;

Ao José Augusto, do grupo LATIG (análise térmica) pelas medidas de TG-DTA que sempre vinham muito bem feitas e com rapidez. E também pela amizade e parceria em me ajudar a analisar os dados;

A Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci e a sua aluna de doutorado Marina Paiva Abuçafy da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp Araraquara pelos ensaios de drug delivery;

A Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira do Instituto de Química – USP – São Paulo pelo auxílio nos experimentos de EPR;

A Danubia Gava pelos difratogramas de raios –X pelo método do pó e também por sempre dar um jeitinho de analisar minhas amostras quando estava com muita pressa;

Aos funcionários Serginho e Valéria pela atenção, auxílio e convívio no Departamento de Química Geral e Inorgânica;

Aos Profs. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto, Antônio Mauro e Vânia Martins Nogueira pelo convívio, incentivo e por sempre se preocuparem com meu trabalho e bem-estar;

Ao Prof. Dr. Fernando Pavan do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp pela parceria, amizade e disponibilidade de realizar os experimentos de citotoxicidade;

A aluna de pós-doutorado Patrícia Bento da Silva do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp, por todo apoio, carinho, dedicação e atenção. Muito obrigada pela ajuda que me deu mesmo quando não nos conhecíamos, obrigada pelas sugestões no exame de qualificação, pois elas foram de fundamental importância para que este trabalho chegasse onde chegou. Obrigada também por todo o carinho e amizade que desenvolvemos neste curto período de tempo, mas que foi de fundamental importância para mim;

A minha amiga Juliana Souza que sempre me apoiou e quando estava estressada me ligava para me acalmar. E apesar de não estudarmos mais todos os dias juntas, sempre damos nosso jeitinho de se ver.

A minha grande amiga e quase irmã Andreia Monteiro, que tive a grande felicidade de conhecer no mestrado e que me ajuda em todos os momentos seja felizes ou tristes. Muito obrigada por

ser essa pessoa maravilhosa e sempre me apoiar em tudo e ser essa super amiga que você é. Te adoro muito!!!

Aos meus amigos de laboratório Gabriela (minha parte loira), Nathália (Naty), Marcelo (Morto), Elaine, Jader, Fillipe, Carol, Thales, Ronan, Débora, Renan, Gislaine (Gi) e Marcelo Fávaro pelo convívio, risadas e experiências compartilhadas. E de um modo muito especial, ao Renan Lira, sem a ajuda do qual não conseguiria ter desenhado a proposta estrutural do cluster CUBA;

Ao Richard, pelo companheirismo, amizade, compreensão e apoio ao longo do processo de construção deste trabalho. Obrigada por sempre me ajudar nos momentos mais difíceis e por não deixar que eu desistisse dos meus sonhos.

As funcionárias da Seção de Pós-graduação em Química do Instituto de Química, pela atenção e cordialidade;

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Química de Araraquara pela atenção e cordialidade;

A todos que não estão aqui citados, mas, que de alguma forma fizeram parte desse trabalho, muito obrigada!

A Capes pela bolsa concedida;

Aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro;

A Deus por me conceder a vida.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota. ”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Dentre os sólidos de coordenação, destacam-se os *Metal-Organic Frameworks* (MOFs), que são polímeros de coordenação com estrutura aberta contendo poros potencialmente vazios. Por serem cristalinos, porosos, leves e possuírem valores elevados de área superficial e considerável estabilidade térmica, essa nova classe de compostos vem sendo aplicada em diversas áreas como armazenamento e separação de gases, catálise heterogênea, *drug delivery*, sensores químicos, entre outras. A possibilidade de construção desses materiais porosos usando bioelementos e ligantes orgânicos biocompatíveis ou com atividade biológica deu origem aos BioMOFs (*Metal-Organic Frameworks* Biocompatíveis). Esses compostos, além das características já descritas anteriormente, possuem baixa ou nenhuma citotoxicidade frente a células humanas, sendo adequados então para serem investigados como sistemas de liberação de fármaco. Dentro dessa perspectiva, o objetivo principal deste trabalho consistiu na síntese, caracterização e avaliação do potencial de liberação do fármaco modelo diclofenaco de sódio de sólidos de coordenação baseados no ligante biológico adenina e íons cobre (II). Foram sintetizados dois compostos, **CUBA** e **BioMOF-Cu**, sendo o primeiro um cluster heptanuclear inédito e o segundo, um BioMOF já reportado na literatura. Experimentos de fisissorção de N₂ revelaram a natureza não porosa do cluster **CUBA** e baixa área superficial de 55,13 m² g⁻¹. No entanto, há poros de superfície com diâmetro médio de 35,87 nm. No que se refere ao **BioMOF-Cu**, este apresenta natureza microporosa com área superficial de 505 m² g⁻¹. Ensaio de *drug delivery* mostraram que ambos os compostos têm alta capacidade de adsorção de diclofenaco de sódio (60,7% e 84,7% para **CUBA** e **BioMOF-Cu**, respectivamente), porém apresentam uma baixa taxa de liberação (~ 20%), provavelmente associada à coordenação do fármaco ao centro metálico nos dois materiais. Foi também determinada neste trabalho a citotoxicidade de ambos os compostos e da adenina e os resultados não mostraram toxicidade frente a linhagem celular MRC-5. Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, podemos dizer que o objetivo principal foi alcançado, uma vez que foram obtidos sólidos de coordenação porosos, de baixa citotoxicidade e que apresentaram uma liberação sustentada frente ao fármaco diclofenaco de sódio.

Palavras Chave: BioMOFs. Blocos de construção biocompatíveis. Cluster metálico. Adenina. Sistemas de liberação de fármacos

ABSTRACT

Among the coordination solids, we highlight the Metal-Organic Frameworks (MOFs), which are coordination polymers that have open structure containing potentially void pores. Because they are crystalline, porous, light and have high surface area values and considerable thermal stability, this new class of compounds has been applied in several areas such as gas separation, heterogeneous catalysis, drug delivery, chemical sensors, among others. The possibility of building porous materials using biocompatible or biologically active organic elements and binders gave rise to BioMOFs (Biocompatible Metal-Organic Frameworks). These compounds, in addition to the features already described above, do not require any cytotoxicity to human cells, being suitable for the drug delivery systems. In this perspective, the main objective of this work was to synthesize, characterize and evaluate the release potential of the diclofenac sodium model of coordination solids based on the biological binder adenine and copper (II) ions. Two compounds, **CUBA** and **BioMOF-Cu**, were synthesized, the first being an unpublished heptanuclear cluster and the second, a BioMOF already reported in the literature. Nitrogen adsorption experiments revealed a non-porous nature of the **CUBA** cluster and surface area of $55.13 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. However, there are surface pores with an average diameter of 35.87 nm. With regard to **BioMOF-Cu**, it has a microporous nature with a surface area of $505 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. (60.7% and 84.7% for **CUBA** and **BioMOF-Cu**, respectively). However, a low release rate ($\sim 20\%$) was associated with the coordination of the drug in the metallic center of the two materials. The cytotoxicity of both compounds and adenine was also determined in the present study and the results showed no toxicity against the MRC-5 cell line. In view of the results obtained in this work, we can say that the main objective was achieved, since they were obtained a porous, low-cytotoxic, porous coordination solids and sustained release against the diclofenac sodium drug.

Keywords: BioMOFs. Biocompatible building blocks. Metallic cluster. Adenine. Drug delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Topologias típicas de MOFs de primeira geração. Ligantes orgânicos (azul) conectam íons metálicos (vermelho) formando redes de coordenação com diferentes topologias.	20
Figura 02 - Principais SBUs para construção de MOFs de segunda geração. a) cluster paddle-wheel quadrado de fórmula geral $[M_2(O_2CR)_4L_2]$ (M= metal de transição, L= ligante axial); b) cluster trimetálico μ_3 -oxo do tipo $[M_3O(O_2CR)_6L_3]$, podendo atuar como um triângulo molecular ou um prisma triangular (d); c) cluster tetrametálico μ_4 -oxo hexacarboxilato, $[M_4O(O_2CR)_6]$, protótipo para um octaedro molecular.....	21
Figura 03 - MOFs de terceira geração. Em cima: Nanobola metalorgânica com 24 trímeros tetrazóicos de Cu^{2+} (triângulos vermelhos no esquema) em torno na periferia. Em baixo: um único trímero conectado a três nanobolasSBBs.	22
Figura 04 - Potenciais sítios de coordenação da adenina.	27
Figura 05 - Representação dos diferentes modos de coordenação da adenina.	28
Figura 06 - Os quatro tautômeros mais estáveis da adenina. O termo anti é referente à posição dos prótons nos nitrogênios N1 e N6.	29
Figura 07 - Estrutura molecular do diclofenaco de sódio.....	30
Figura 08 - Espectros vibracionais no infravermelho dos ligantes e do material obtido (CUBA).	40
Figura 09 - Microscopia eletrônica de varredura do composto: a) 500x; b) 5.000x e c) 10.000x.	42
Figura 10 - Padrão de difração de raios-X de pó para o CUBA, antes e após a ativação.	43
Figura 11 - Curvas TG e DTA obtidas para o CUBA não ativado.....	44
Figura 12 - Curvas TG e DTA obtidas para o CUBA-ativado.	45
Figura 13 - Comparação entre o padrão de difração de raios-X do resíduo da TG do CUBA e os padrões obtidos pelo banco de dados ICSD de CuO e Cu_4O_3	46
Figura 14 - Isoterma de fissoção de N_2 para o CUBA-ativado.....	47
Figura 15 - Curva de distribuição do diâmetro de poro (BJH) para o CUBA-ativado.....	48
Figura 16 - Espectro EPR do composto CUBA, no estado sólido a 77 K.....	49
Figura 17 - Representação de uma possível estrutura para o cluster CUBA (o programa utilizado para otimização da estrutura 3D foi o Accelrys Discovery Studio 4.1, que	

possui parametrização para o cobre). Nestes arquivos os hidrogênios estão omitidos para melhor visualização.....	51
Figura 18 - Espectros vibracionais no infravermelho da adenina e do BioMOF-Cu.	52
Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura do composto: a) 1.500x; b) 50.000x, c) 10.000x, d) bio-MOF [Cu(ade)(OAc)]·0,88H ₂ O·0,50HOAc ⁵³	54
Figura 20 - Padrão de difração de raios-X de pó para o BioMOF-Cu: ICSD, sem ativar e ativado.....	55
Figura 21 - Estrutura cristalina do bio-MOF [Cu(ade)(OAc)]·0,88H ₂ O·0,50HOAc: a) SBU com geometria paddle-wheel ligados pelos nitrogênios N ₃ e N ₉ da adenina; b) SBU infinita do bio-MOF e c) Estrutura tridimensional da rede.....	56
Figura 22 - Curvas TG e DTA obtidas para o BioMOF-Cu não ativado.	57
Figura 23 - Curvas TG e DTA obtidas para o BioMOF-Cu-ativado.....	58
Figura 24 - Isoterma de fisissorção de N ₂ para o bio-MOF [Cu(ade) (OAc)]·0,88H ₂ O·0,50 HOAc.	59
Figura 25 - Padrão de difração de raios-X de pó para o CUBA-ativado, DS@CUBA2, DS@CUBA4 e DS@CUBA7.	61
Figura 26 - Espectros no infravermelho do diclofenaco de sódio livre, CUBA-ativado, DS@CUBA2, DS@CUBA4 e DS@CUBA7.	62
Figura 27 - Espectros no infravermelho do diclofenaco de sódio livre, CUBA-ativado, DS@CUBA2, DS@CUBA4 e DS@CUBA7.	63
Figura 28 - Curvas TG e DTA dos compostos DS@CUBA2, DS@CUBA4 e DS@CUBA7.	66
Figura 29 - Curvas TG e DTA do diclofenaco de sódio.....	67
Figura 30 - Espectro de absorção eletrônica no ultravioleta do DS@CUBA2, DS@CUBA4 e DS@CUBA7.....	69
Figura 31 - Curva de calibração do diclofenaco em solução aquosa.	69
Figura 32 - Padrão de difração de raios-X de pó para o BioMOF-Cu-ativado e BioMOF-Cu-4D.....	71
Figura 33 - Espectros no infravermelho do diclofenaco de sódio livre, BioMOF-Cu-ativado e DS@BioMOF-Cu-4D.	72
Figura 34 - Curvas TG e DTA do composto DS@BioMOF-Cu-4D.....	73
Figura 35 - Espectro de absorção eletrônica no ultravioleta do DS@BioMOF-Cu-4D.....	74
Figura 36 - Curva de calibração do diclofenaco em tampão fosfato.....	77

Figura 37 - Perfil de liberação do fármaco noDS@CUBA2, DS@CUBA4, DS@CUBA7eBioMOF-Cu-4D.	78
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Compostos à base de íons cobre (II) contendo fármacos como ligantes ou aplicados em <i>drug delivery</i>	23
Tabela 02 - Exemplos de sistemas de <i>drug delivery</i> aprovado pela FDA e disponíveis no mercado.	25
Tabela 03 - Reagentes e solventes utilizados no trabalho.	32
Tabela 04 - Principais frequências na região do infravermelho dos ligantes livres e do material obtido (CUBA).	41
Tabela 05 - Dados referentes à análise térmica dos compostos CUBA- sem ativar e ativado.	45
Tabela 06 - Resumo dos dados obtidos pela medida de fisissorção de N ₂ para o CUBA-ativado.	48
Tabela 07 - Análise elementar e teor metálico para o CUBA	50
Tabela 08 - Principais frequências na região do infravermelho do ligante adenina e do material obtido.	53
Tabela 09 - Dados referentes à análise térmica dos compostos BioMOF-Cu-sem ativar e ativado.	58
Tabela 10 - Resumo dos dados contidos na literatura ⁶¹ obtidos pela medida de fisissorção de N ₂	60
Tabela 11 - Dados referentes à análise térmica dos compostos CUBA-ativado, DS@CUBA2, DS@CUBA4 e DS@CUBA7.....	68
Tabela 12 - Resumo dos dados do ensaio de encapsulação do diclofenaco após 2, 4 e 7 dias de experimento.	70
Tabela 13 - Dados referentes à análise térmica dos compostos BioMOF-Cu-ativado e DS@BioMOF-Cu-4D.....	74
Tabela 14 - Resumos dos dados do ensaio de encapsulação do diclofenaco para os compostos CUBA e BioMOF-Cu.	75
Tabela 15 - Dados referentes ao encapsulamento do diclofenaco em diferentes matrizes.....	76
Tabela 16 - Resultados da citotoxicidade (IC ₅₀) sobre a linhagem celular MRC-5 dos ligantes livres, diclofenaco de sódio e compostos de Cu(II) em THF.	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	<u>Design dos MOFs</u>	19
1.2	<u>Compostos de Cu (II) e suas propriedades biológicas</u>	22
1.3	<u>Sistemas para liberação de fármaco</u>	24
1.3.1	MOFs como sistemas de liberação de fármaco.....	26
1.4	<u>Bases nitrogenadas como ligantes para construção de BioMOFs</u>	27
1.5	<u>Diclofenaco de Sódio</u>	29
2	OBJETIVOS	31
2.1	<u>Objetivo geral</u>	31
2.2	<u>Objetivos específicos</u>	31
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	32
3.1	<u>Reagentes e solventes</u>	32
3.2	<u>Sínteses</u>	32
3.2.1	CUBA.....	32
3.2.2	BioMOF-Cu	32
3.3	<u>Caracterizações</u>	33
3.3.1	Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR).....	33
3.3.2	Difração de raios-X de pó (DRX).....	33
3.3.3	Análise térmica	33
3.3.4	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG).....	33
3.3.5	Análise elementar	34
3.3.6	Espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis.....	34
3.3.7	Ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	34
3.4	<u>Avaliação textural do cluster CUBA: obtenção de isotermas de adsorção de N₂</u> ..	34
3.5	<u>Análise do teor de cobre por complexometria com EDTA</u>	35
3.6	<u>Metodologia Computacional para proposição estrutura do CUBA</u>	35
3.7	<u>Drug Delivery</u>	36
3.7.1	Ensaio de encapsulação do fármaco diclofenaco de sódio	36
3.7.2	Ensaio de liberação do fármaco diclofenaco de sódio.....	36
3.7.3	Ensaio de citotoxicidade	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	<u>Cluster heptanuclear de cobre(II) (CUBA)</u>	39
4.1.1	Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR).....	39
4.1.2	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução.....	42

4.1.3	Difração de raios-X de pó	42
4.1.4	Análise térmica	43
4.1.5	Fisissorção de N ₂	47
4.1.6	Ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	49
4.1.7	Análise elementar e fórmula mínima	50
4.2	<u>BioMOF-Cu</u>	52
4.2.1	Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)	52
4.2.2	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução.....	54
4.2.3	Difração de raios-X de pó	55
4.2.4	Análise térmica	56
4.2.5	Fisissorção de N ₂	59
4.3	<u>Estudo em <i>Drug Delivery in vitro</i></u>	60
4.3.1	Ensaio de encapsulamento do fármaco Diclofenaco de Sódio.....	60
4.3.2	Ensaio de liberação do fármaco Diclofenaco de Sódio	77
4.3.3	Ensaio de citotoxicidade	79
5	CONCLUSÕES	80
6	PERSPECTIVAS	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

Metal Organic Frameworks (MOFs) são polímeros ou redes de coordenação que possuem estrutura aberta, contendo poros que podem ser potencialmente vazios.¹ Possuindo alta cristalinidade, elevada área superficial e boa estabilidade térmica, essa classe de materiais porosos é uma das áreas da Química que está em pleno crescimento nos dias atuais. Por serem sólidos de coordenação, é possível também modular a estrutura interna dos poros e/ou a funcionalidade da superfície, dependendo do tipo de propriedade desejada.²

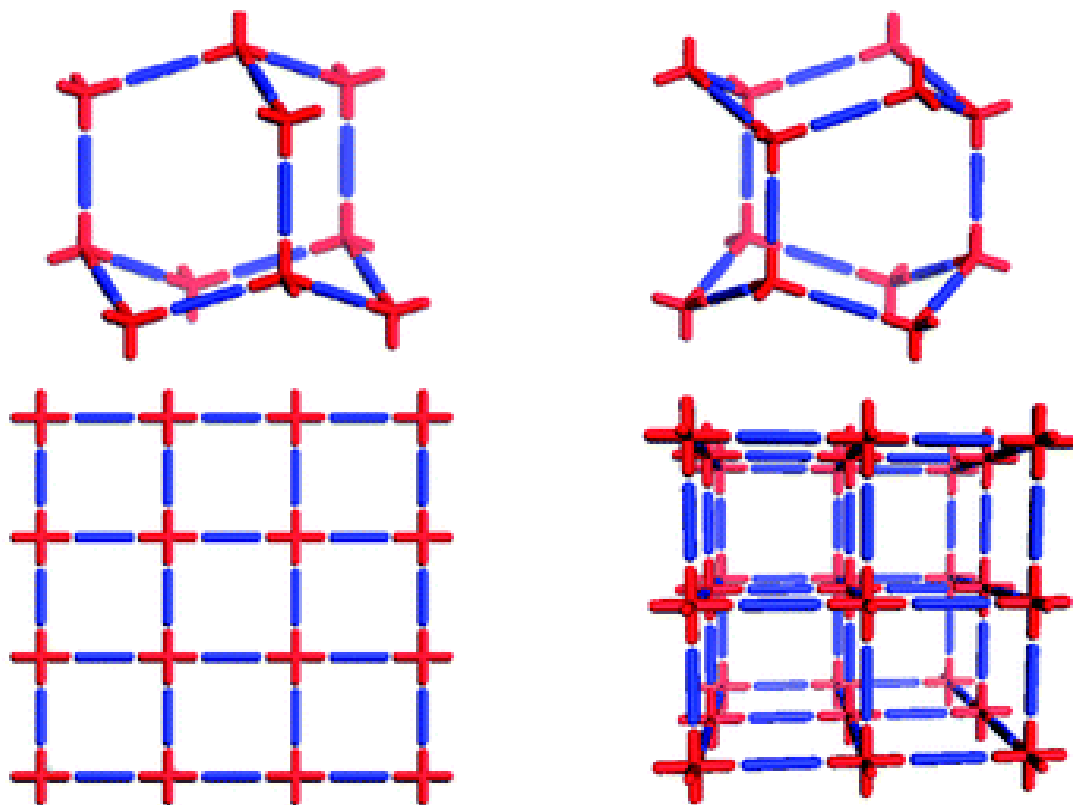
O grande interesse nesta classe de materiais se fundamenta em algumas características importantes, tais como: o número quase ilimitado de combinações entre os blocos de construção (cátions ou *clusters* metálicos) e ligantes multitópicos, a possibilidade de uso de diferentes métodos de síntese Química – convencional, solvotérmica, difusão, mecanossíntese, além daquelas assistidas por microondas e ultrassom- para a sua preparação,³ além da gama de aplicações como armazenamento e separação de gases, catálise heterogênea, *drug delivery*, sensores químicos, dentre outras.

1.1 Design dos MOFs

Dependendo da natureza do centro metálico, das características eletrônicas e estruturais dos ligantes adicionados no meio reacional, dos parâmetros experimentais de síntese (razão molar metal:ligante, pH, solvente, temperatura, etc.), o processo de auto-montagem (*self-assembly*) pode levar à formação de MOFs que podem ser classificados como de primeira, segunda ou terceira geração.

Os MOFs de primeira geração consistem em compostos nos quais íons metálicos funcionam como vértices, interconectados por ligantes com mais de um sítio de coordenação disponível, formando uma rede de coordenação porosa tridimensional como mostrado na **Figura 1**.

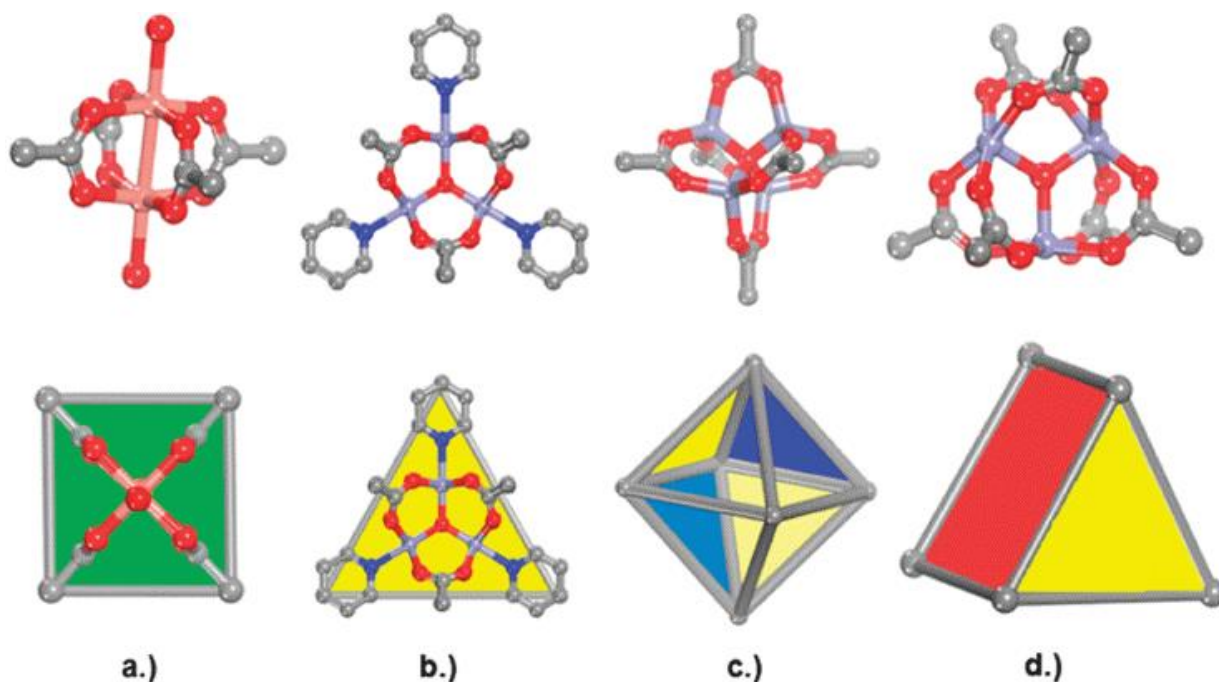
Figura 1 - Topologias típicas de MOFs de primeira geração. Ligantes orgânicos (azul) conectam íons metálicos (vermelho) formando redes de coordenação com diferentes topologias.



Fonte: Perry et al., 2009.⁴

Nas estruturas de segunda geração, os vértices da rede de coordenação são formados por clusters de íons metálicos de diferentes geometrias, chamados *Secondary Building Units* – SBUs (ver alguns exemplos na **Figura 2**). Esses blocos de construção conferem uma maior estabilidade aos MOFs em comparação aos de primeira geração, devido a maior robustez alcançada pela presença dos clusters.⁵

Figura 2 - Principais SBUs para construção de MOFs de segunda geração. a) cluster paddle-wheel quadrado de fórmula geral $[M_2(O_2CR)_4L_2]$ (M= metal de transição, L= ligante axial); b) cluster trimetálico μ_3 -oxo do tipo $[M_3O(O_2CR)_6L_3]$, podendo atuar como um triângulo molecular ou um prisma triangular (d); c) cluster tetrametálico μ_4 -oxo hexacarboxilato, $[M_4O(O_2CR)_6]$, protótipo para um octaedro molecular.

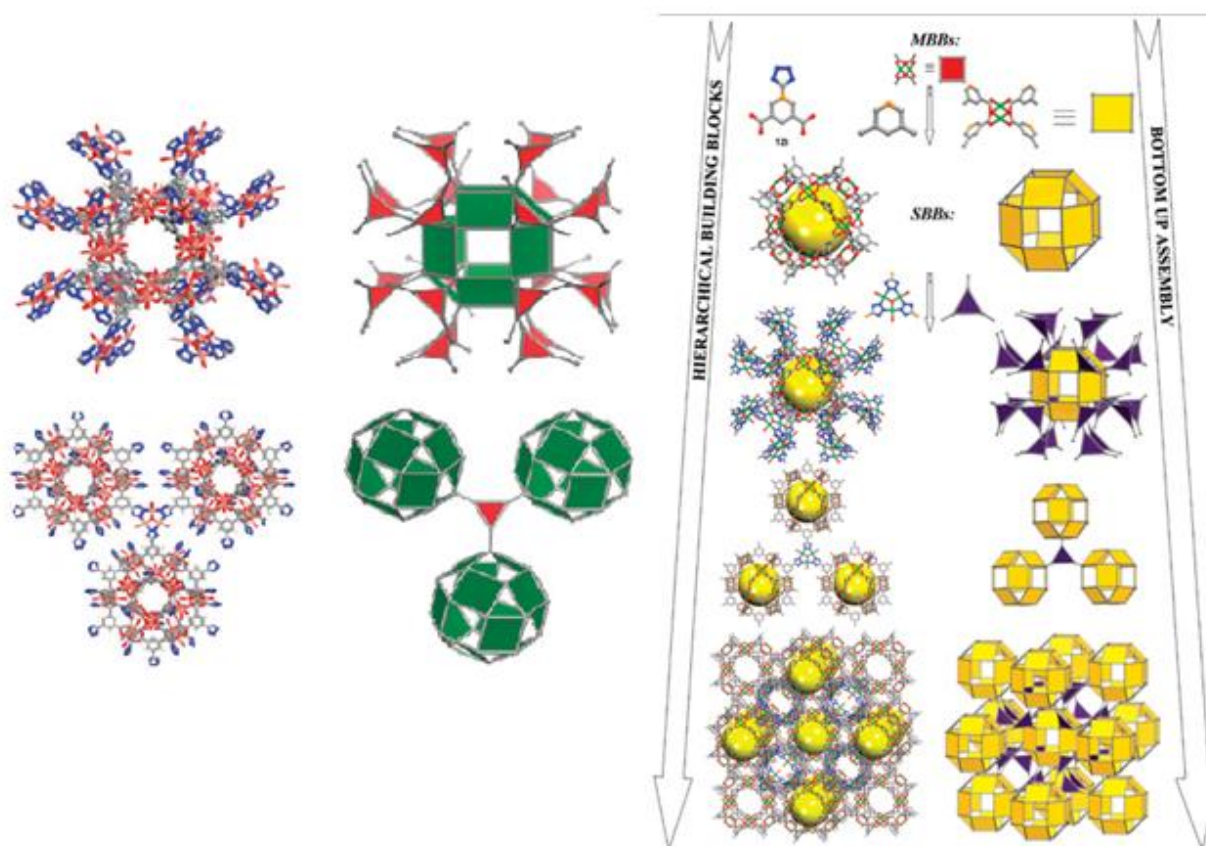


Fonte: Perry et al., 2009.⁴

Há pelo menos dois importantes requisitos que devem ser preenchidos para que um cluster metálico possa ser usado como SBU.⁶ A estrutura do núcleo M-O-C tem que ser uma SBU cuja forma é definida por aqueles átomos que representam pontos de extensão para outras SBUs, que geralmente são separadas apenas por espaçadores. Ou seja, tais átomos definem a geometria básica da SBU e serão relevantes para prever a topologia da rede formada. Além disso, cada monocarboxilato no complexo, a princípio, ser substituído por um di-, tri- ou multicarboxilato a fim de polimerizar a SBU em uma rede estendida. Contudo, o modo de coordenação de cada ligante no complexo fornece informações (geométrica e conformacional) que são igualmente importantes para a previsão da topologia da rede resultante.

Nos MOFs de terceira geração, blocos de construção maiores e de alta simetria chamados *Metal Organic Polyhedra* (MOPs) são usados para a construção dessa classe de materiais porosos, como ilustrado na **Figura 3**. Essas unidades de construção têm sido chamadas por alguns autores de *Supramolecular Buildings Blocks* (SBBs). A intenção de adotá-los está ligada à possibilidade de um controle maior sobre a topologia, assim como a obtenção de um novo nível de escala para o sólido resultante.⁴

Figura 3 - MOFs de terceira geração. Em cima: Nanobola metalorgânica com 24 trímeros tetrazóicos de Cu^{2+} (triângulos vermelhos no esquema) em torno na periferia. Em baixo: um único trímero conectado a três nanobolasSBBs.



Fonte: Perry et al., 2009.⁴

1.2 Compostos de Cu (II) e suas propriedades biológicas

O cobre é o terceiro elemento de transição mais abundante no corpo humano (80 – 120 mg) depois do ferro (4,0 – 5,0 g) e do zinco (1,4 – 2,3 g).⁷ A biodisponibilidade geral e o destino metabólico do cobre em dietas de humanos são bem compreendidos.⁸ A ingestão diária de Cu em humanos é aproximadamente 1,5 – 3,0 mg. O corpo de um homem adulto saudável médio (70 Kg) contém aproximadamente 110 mg de cobre, do qual grande parte está no esqueleto (946 mg), músculo esquelético (26 mg), fígado (10 mg), cérebro (8,8 mg) e sangue (6 mg).⁹

O uso medicinal do cobre é de fato, milenar. Em cerca de 3000 a.C., os egípcios utilizavam o cobre como um antisséptico para esterilizar água de beber.¹⁰ Em torno de 1500 a.C., há relatos do uso medicinal de ungentos à base de cobre. É conhecido há muito tempo, também, o uso de braceletes de cobre como um remédio popular para o tratamento de artrite.¹¹

No entanto, o cobre foi reconhecido pela primeira vez como um elemento biológico essencial apenas em 1920, quando foi descoberto que dietas eficientes em cobre administradas

a animais causavam anemia e que, além disso, sais de cobre corrigiam a doença. O reconhecimento do cobre como um elemento necessário para o desempenho de certas funções biológicas aconteceu nesta mesma década. Assim sendo, este metal é um componente catalítico para muitas enzimas, que atua exibindo atividade redutase-oxidativa e hidroxilases, auxiliando no transporte de elétrons na citocromo oxidase, atuando como co-fator em processos metabólicos envolvendo tecido articular/conectivo, co-fator para melanogênese e o sistema imunológico (seu papel como anti-inflamatório), entre outros.¹²

Com base nisso tem havido na literatura um interesse crescente na investigação de compostos de cobre (II) que utilizam fármacos como ligantes ou para aplicação em *drug delivery*, uma vez que este metal é um bioelemento e pode acarretar na redução da toxicidade dos materiais, além das propriedades que este metal confere por ser um metal de transição, uma vez que na teoria dos compostos de coordenação é bem sabido que íons de Cu (II) possuem configuração eletrônica $3d^9$, com números de coordenação de 4 a 6, que incluem as geometrias quadrado planar, tetraédrica, bipirâmide trigonal, pirâmide de base quadrada e octaédrica.

A **Tabela 1** mostra alguns materiais a base de íons Cu (II) que utilizam fármacos como ligantes ou ainda são aplicados em *drug delivery*.

Tabela 1 – Compostos à base de íons cobre (II) contendo fármacos como ligantes ou aplicados em *drug delivery*.

Compostos	Fármaco	Utilização do fármaco	Referência
Complexos Metálicos			
[Cu ₂ (mef) ₂ (H ₂ O) ₂]	Ácidomefenâmico	Ligante	13
[Cu ₂ (ibf) ₂ (H ₂ O) ₂]	Ibuprofen	Ligante	14
[Cu ₂ (naprox) ₂ (H ₂ O) ₂]	Naproxeno	Ligante	14
[Cu ₂ (dicl) ₂ (H ₂ O) ₂]	Diclofenaco	Ligante	14
MOFs			
[Cu ₂ (L ₂)(H ₂ O) ₂] _n	5-Fluorouracil	<i>Drug Delivery</i>	15
[Cu(L'')(4,4'-bipy)(H ₂ O)] _n	5-Fluorouracil	<i>Drug Delivery</i>	16

L = 2,5-di(3',5'-dicarboxilfenil) piridina; L'' = ácido difenilmetano-4,4'-dicarboxílico.

Fonte: Autor

1.3 Sistemas para liberação de fármaco

Sistemas para liberação de fármaco têm desempenhado importante papel no que se refere à modos alternativos de administração de fármacos, vacinas e agentes de diagnóstico. Apesar do grande avanço da indústria farmacêutica observado no último século, as formulações atuais são, via de regra, incapazes de se localizar em grande quantidade nos sítios específicos de ação. Quando um fármaco é administrado, via de regra, suas moléculas se difundem e se distribuem por todo o corpo, resultando em efeitos colaterais indesejáveis. Portanto, distribuição não específica e o acúmulo inadequado de agentes terapêuticos continuam sendo grandes desafios para o desenvolvimento de fármacos.¹⁷

Atualmente, abordagens que buscam a administração controlada e em sítios específicos de ação mostram-se mais favoráveis frente aos métodos tradicionais. A melhoria nos resultados terapêuticos centra-se principalmente em fatores como baixas dosagens, distribuição específica, redução na biodegradação, diminuição na frequência de administração, manutenção do nível terapêutico e, conseqüentemente, redução nos efeitos colaterais e melhor adesão do paciente ao tratamento.^{18,19}

O *design* e a síntese de sistemas eficientes para aplicação em *drug delivery* são de vital importância para a medicina e saúde. Desde a aprovação dos primeiros sistemas para *drug delivery* pela FDA (*US Food and Drug Administration*) em 1989, a saber, Zoladex para câncer de próstata e mama, e Lupron Depot para câncer de próstata e endometriose, diversos sistemas estão agora disponíveis comercialmente para o tratamento de vários tipos de câncer, infecções e degeneração muscular.²⁰

As inovações que vêm sendo observadas na área de Química de Materiais aliadas a Nanotecnologia vêm auxiliando no desenvolvimento de diversos sistemas para *drug delivery*, criando transportadores biodegradáveis, biocompatíveis, direcionáveis e que apresentam respostas a diversos estímulos. Entretanto, alguns fatores devem ser levados em consideração antes do desenvolvimento desses sistemas, entre eles, a difusão, a estrutura da matriz, capacidade de adsorção, cinética e estímulos para a liberação.^{21,22}

A **Tabela 2** mostra um histórico da aprovação de alguns sistemas para *drug delivery* pela FDA. Na tabela consta também o nome comercial e o tipo de material, ano de aprovação, tecnologia e indicação.

Tabela 2 - Exemplos de sistemas de *drug delivery* aprovado pela FDA e disponíveis no mercado.

Nome Comercial	Ano de Aprovação	Tecnologia	Indicação
Lipossomas e Micelas			
Daunoxoma	1996	DaunorrubicinaLipossomal	Sarcoma de Kaposi e HIV
Depocyt	1997	CitarabinaLipossomal	Meningite por linfoma
Visudyne	1999	VerteporfinaLipossomal	Degeneração muscular
DepoDur	2004	Sulfato de Morfina Lipossomal	Dor pós-operatória
Materiais Biodegradáveis			
Zoladex	1989	PLGA/Acetato de Gossirelina	Câncer de próstata e mama
LupronDepot	1989	PLGA/Acetato de Leuprolida	Câncer de próstata e endometriose
Gliadel	1996	Polifeprosan 20/Carmustina	Glioblastoma multiforme
Vivitrol	2006	PLGA/Naltrexona	Dependência de álcool e ópio
Proteínas			
Zevalin	2002	Anti-CD20/Ítrio-90	Linfoma não-Hodgkin
Bexxar	2003	Anti-CD20/iodo-131	Linfoma não-Hodgkin
Abraxane	2005	Albumina/Paclitaxel	Câncer de mama
Polímeros			
Oncaspar	1994	PEG/L-asparaginase	Leucemia linfoblástica aguda
PEG-intron	2001	PEG/Interferon alfa-2b	Hepatite crônica C
Krystexxa	2010	PEG/Urato Oxidase	Gota
Omontys	2012	PEG/Peginesatide	Anemia

Fonte: adaptado de Zang et al., 2009.²⁰

Apesar desses avanços, nos últimos anos é crescente a busca por novos materiais com propriedades distintas que possam ser empregados em sistemas de *drug delivery*. Isto pode aumentar de forma significativa a eficiência de diversos fármacos e agentes terapêuticos já existentes. Além disso, pesquisas mostram a viabilidade econômica e temporal do desenvolvimento desses sistemas. Enquanto o desenvolvimento de um sistema de *drug delivery* tem um custo médio de US\$ 20-50 milhões com duração de 3-4 anos, um novo fármaco custa em média US\$ 500 milhões com o tempo médio de 10 anos.²³

Entre tais materiais, os MOFs apresentam-se como um dos mais promissores. Entre as vantagens oferecidas estão a possibilidade de ajuste da estrutura e tamanho de poro pela mudança dos centros metálicos e/ou ligantes orgânicos, elevado volume de poro, porosidade regular, presença de sítios ativos de ligação dentro da estrutura o que permite uma fácil adsorção de moléculas hóspedes, oferecendo oportunidades únicas para seu uso em áreas como a medicina e a biomedicina.^{24,25}

1.3.1 MOFs como sistemas de liberação de fármaco

A primeira família utilizada como sistemas de liberação de fármacos foi aquela denominada **MIL** (*Materials of Institut Lavoisier*), desenvolvida por Fèrey e colaboradores. O estudo consistia na liberação controlada do fármaco ibuprofeno incorporado nesta família de MOFs, mais especificamente o **MIL-53 (Fe)**, e o estudo evidenciou o grande potencial deste MOF não tóxico em *drug delivery*. Ibuprofeno foi incorporado numa proporção de 0,210 g.g⁻¹ de **MIL-53 (Fe)** e a sua cinética de liberação investigada em tampão SBF (*simulated body fluid*) a 37°C. A completa liberação do fármaco ocorreu após três semanas e o longo tempo de liberação foi atribuído à flexibilidade do MOF e as fortes interações não covalentes entre o fármaco e a matriz porosa.²⁶

Desde então é crescente o desenvolvimento de MOFs para serem aplicados na liberação controlada dos mais diversos agentes terapêuticos como a doxorrubicina,²⁷ gencitabina,²⁸ 5-Fluoracil,²⁹ imatinib,³⁰ ibuprofeno,³¹ óxido nítrico,³² entre outros. Adicionalmente, vem sendo relatado que a cinética de liberação pode ser afetada por diversos estímulos, entre eles a luz,³³ o pH,³⁴ concentração exógena de cátions³⁵ e temperatura.³⁶

No entanto, em aplicações biológicas como *drug delivery*, é recomendável o uso de materiais biocompatíveis. Para tal, busca-se o uso de blocos de construção que sejam biológica e ambientalmente compatíveis a fim de minimizar a toxicidade dos MOFs e aumentar a biocompatibilidade, sendo normalmente utilizados os BioMOFs.³⁷ Esses compostos envolvem o uso de metais biocompatíveis tais como cobre, zinco, magnésio, cálcio, ferro, dentre outros e bioligantes como aminoácidos, peptídeos, açúcares, vitamina B₃, DNA, nucleotídeos, bases nitrogenadas, etc.^{38,39}

Um dos primeiros MOFs dentro deste contexto foi o **BioMOF-1** utilizado para incorporação do fármaco procainamida. Este material é formado por gaiolas (*cages*) de adeninato de zinco [Zn₈(adenina)₄] interligadas pelo ácido 4-4'-bifenildicarboxílico. A procainamida foi incorporada numa proporção de 0,22 g.g⁻¹ de material e sua cinética de liberação avaliada em tampão fosfato (PBS-*phosphate buffered saline*). A liberação manteve-se constante até 20 horas, atingindo 100% a partir de 60 horas. A liberação da procainamida ocorre pelo processo de troca catiônica, evidenciando que este processo pode ser ativado pela concentração fisiológica de cátions como Na⁺ e K⁺.⁴⁰

Uma abordagem alternativa consiste no uso de fármacos como ligantes orgânicos na construção do MOF, o que pode evitar a necessidade de grande área superficial para a adsorção de uma elevada quantidade de fármaco.⁴¹ Diversos BioMOFs vêm sendo com sucesso

construídos usando tal estratégia. Entre os mais notáveis está o MOF chamado **BioMIL-5**, baseado em íons Zn^{2+} e ácido azelaico, com interessantes propriedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*;⁴² um MOF com propriedades antioxidantes sintetizado a partir de íons magnésio e ácido gálico;⁴³ e o **medi-MOF-1**, baseado em zinco e no bioligante curcumina que apresenta excelentes propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antineoplásicas e anti-HIV.⁴⁴

1.4 Bases nitrogenadas como ligantes para construção de BioMOFs

Bases nitrogenadas possuem átomos de nitrogênio e oxigênio com pares de elétrons isolados que permitem a essas biomoléculas agirem como ligantes multidentados. Assim, sua rica capacidade de ligar-se a metais, assim como de formar ligações de hidrogênio, aliada à rigidez de sua estrutura molecular, fazem delas ligantes ideais para a construção de diversos BioMOFs.⁴⁵ Neste contexto, a adenina por apresentar cinco potenciais sítios de coordenação, sendo dois imidazolatos, dois pirimidinatos e um grupo NH_2 , cuja ordem de basicidade é dada por: $\text{N}_9 > \text{N}_1 > \text{N}_7 > \text{N}_3 > \text{N}_{10}$, como mostrado na **Figura 4**, tem sido a base nitrogenada mais extensivamente utilizada na construção de BioMOFs.⁴⁶

Figura 4 - Potenciais sítios de coordenação da adenina.

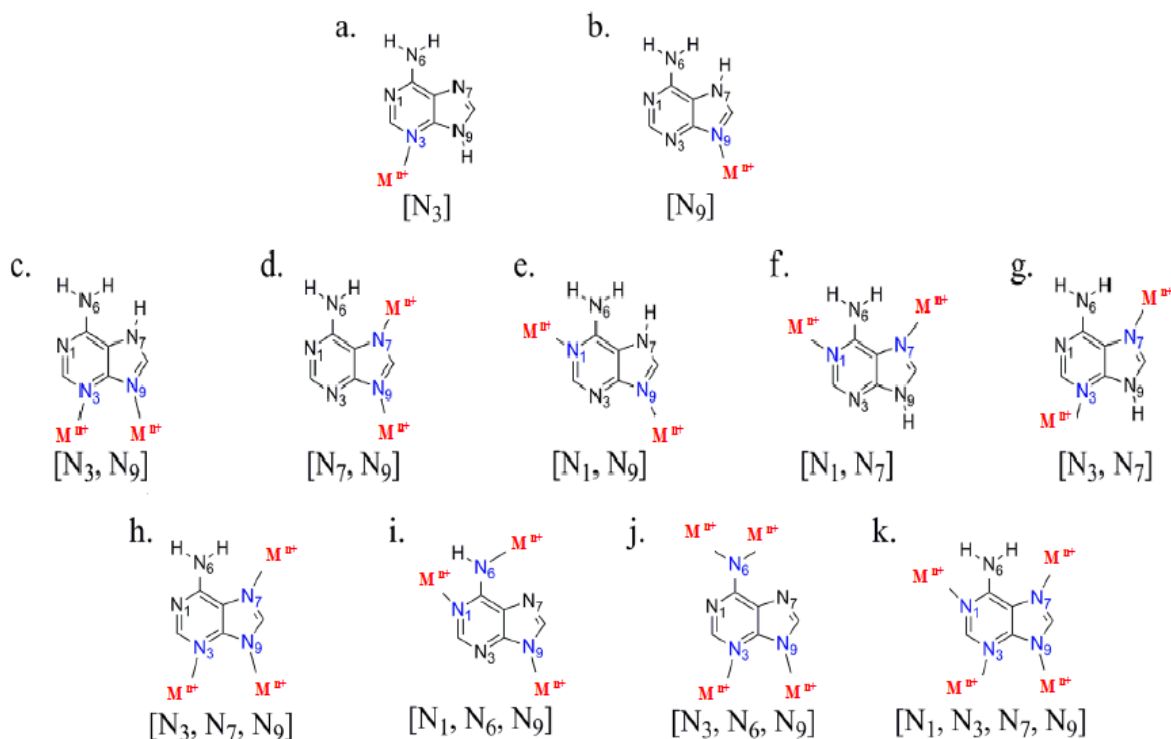


Fonte: Burneo et al., 2015.⁴⁶

Como mostrado na **Figura 5**, a adenina pode apresentar vários modos de coordenação. Em **a** e **b**, a adenina atua como um ligante monodentado, principalmente através das posições N_3 e N_9 . Esta base nitrogenada também pode atuar como um ligante bidentado, apresentando uma variedade de combinações, dependendo dos sítios de N que participam nas ligações com os metais. Em geral, as combinações possíveis estão mostradas em **c**, **d**, **e**, **f** e **g**. Além de atuar como um ligante bidentado, a adenina também pode se coordenar por meio de mais de dois sítios de nitrogênio. Para MOFs, o modo de coordenação mais comumente encontrado é

[N3,N7,N9], sendo mostrado pela letra **h** na **Figura 5**. Vale ressaltar que os modos menos usuais de coordenação da adenina são o **i** e o **j** e que ela ainda pode estar coordenada por quatro íons metálicos como mostrado em **k**.

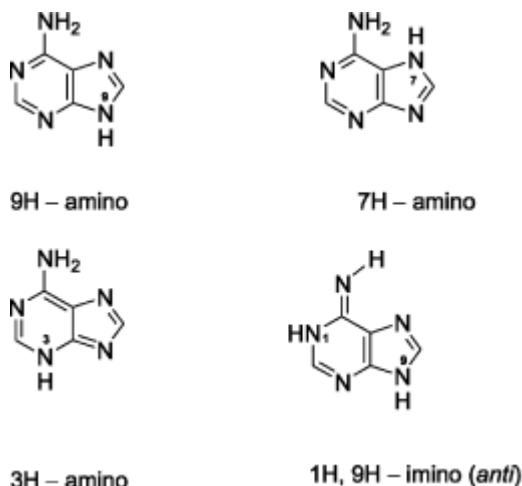
Figura 5 - Representação dos diferentes modos de coordenação da adenina.



Fonte: Burneo et al., 2015.⁴⁶

A adenina apresenta ainda 14 tautômeros não substituídos, dos quais o 9H-amino é a espécie mais estável em fase gasosa, em água e no estado sólido. O segundo tautômero mais estável em fase gasosa e aquosa é a espécie 7H-amino. De acordo com cálculos teóricos, o tautômero 3H-amino e 1H,9H-imino são os próximos nessa ordem de estabilidade (ver **Figura 6**).⁴⁷

Figura 6 - Os quatro tautômeros mais estáveis da adenina. O termo anti é referente à posição dos prótons nos nitrogênios N1 e N6.



Fonte: Lippert & Gupta, 2009.⁴⁷

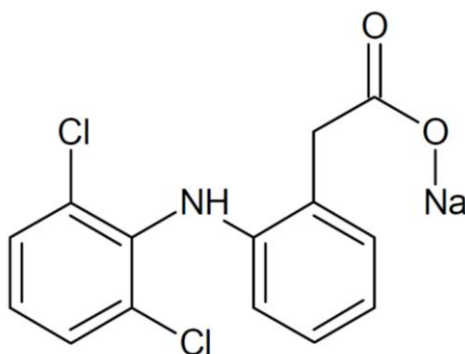
O equilíbrio entre esses quatro tautômeros da adenina pode ser afetado por fatores como temperatura, polaridade do solvente, pKa do próton “móvel” e modificações Químicas no esqueleto. Aliado a isso, a possibilidade de três diferentes modos de coordenação, faz da adenina um ligante ideal na obtenção de MOFs, uma vez que pequenas modificações em parâmetros de síntese como solvente, pH e temperatura podem conduzir à formação de compostos com topologias e propriedades distintas.

1.5 Diclofenaco de Sódio

O diclofenaco de sódio (**Figura 7**) é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) com tempo de meia-vida biológica de 1-2 horas e consequentemente requer doses múltiplas para manter o nível terapêutico do fármaco no sangue.⁴⁸

Baseado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), o diclofenaco pode ser classificado como um fármaco de Classe II. Fármacos de Classe II são aqueles com alta permeabilidade, mas com solubilidade em meio aquoso insuficiente para dissolver a dose inteira no trato gastrointestinal. Para estes fármacos a dissolução é, portanto, o passo limitante na absorção.⁴⁹

Figura 7 - Estrutura molecular do diclofenaco de sódio.



Fonte: Autor

O diclofenaco de sódio é um AINE, da classe do ácido fenilacético, sendo largamente prescrito para o tratamento de doenças inflamatórias tais como artrite reumatoide e osteoartrite.⁵⁰ Porém seu uso é limitado pela alta incidência de efeitos indesejados, principalmente, sobre o trato gastrointestinal, que incluem irritação, sangramento, ulceração e, eventualmente, perfuração na parede gástrica. Além disso, esse fármaco é pouco solúvel em água e em pH ácido (< 3), mas é muito solúvel na faixa de pH entre 5 – 8.⁵¹

Desta forma, estratégias que possam diminuir a super dosagem do fármaco, por meio da liberação controlada, são de extrema importância para aumentar a sua absorção pelo paciente e diminuir os efeitos adversos.⁵²

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Sintetizar, caracterizar, realizar avaliação textural e avaliar o potencial em *drug delivery* de dois sólidos de coordenação baseados em íons cobre (II) e adenina, frente ao fármaco diclofenaco de sódio.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar compostos de cobre (II) contendo o ligante adenina, bem como caracterizá-los por meio de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, difratometria de raios-X de pó, análise térmica, análise elementar, análise de cobre, microscopia eletrônica de varredura e ressonância paramagnética eletrônica.
- Realizar experimentos de adsorção de nitrogênio para avaliação textural.
- Estudar a capacidade dos compostos obtidos em encapsular o fármaco diclofenaco de sódio.
- Avaliar o potencial destes materiais na liberação controlada do diclofenaco de sódio *in vitro*.
- Determinar a citotoxicidade (IC₅₀) dos compostos obtidos frente à linhagem MRC-5 (células normais de fibroblastos pulmonares).

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes usados no trabalho, por apresentarem elevada pureza, foram utilizados sem nenhum tratamento ou purificação prévia e estão listados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Reagentes e solventes utilizados no trabalho.

Reagente/Solvente	Procedência
N,N-Dimetilformamida (DMF)	Merck
Água Destilada	-
Ácido Nítrico	Vetec
Ácido 4-4'-Bifenildicarboxílico (bpdc)	Aldrich
Adenina	Aldrich
Acetato de Cobre	Aldrich

Fonte: autor

3.2 Sínteses

3.2.1 CUBA

Adenina (0,125 mmol), bpdc (0,25 mmol), acetato de cobre monohidratado (0,375 mmol), ácido nítrico (1 mmol), DMF (13,5 mL) e água (1 mL) foram adicionados em um tubo de teflon® e mantidos sob agitação por 30 minutos. O tubo foi então selado em um reator para síntese solvotérmica, colocado em estufa de programação controlada e mantido a 130°C por 24 horas. O sólido cinza esverdeado obtido foi filtrado e lavado três vezes com uma mistura DMF:H₂O (13:1) e seco sob vácuo por 8 horas. Programação da estufa: 30-130°C em 2 horas; 130°C por 24 horas; 130-30°C em 12 horas (taxa de arrefecimento = 7,2 °C.min⁻¹). Após a secagem, o material foi submetido ao processo de ativação via aquecimento do composto a 160°C por 24 horas sob vácuo. O composto foi então denominado de **CUBA-ativado**.

3.2.2 BioMOF-Cu⁵³

Adenina (1 mmol), acetato de cobre monohidratado (1 mmol) e água (80 µL) foram adicionados a um reator mecanoquímico e este permaneceu agitando a uma frequência de 25 Hz por 1 minuto, em temperatura ambiente. Após o tempo de agitação, foi obtido um sólido

verde que foi posteriormente lavado com água e ácido acético na proporção de 1:1 e seco sob vácuo. Após a secagem, o material foi submetido ao processo de ativação para retirada dos solventes presentes nos poros. O processo de ativação deu-se por meio de aquecimento do material a 110°C por 24 horas sob vácuo. O composto foi então denominado **BioMOF-Cu-ativado**.

3.3 Caracterizações

3.3.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Nicolet IS5 thermo Scientific (4000-400 cm^{-1}), com resolução de 4 cm^{-1} , usando pastilhas de KBr.

3.3.2 Difração de raios-X de pó (DRX)

Os difratogramas foram obtidos no difratômetro Siemens, modelo D5000, DIFRAC PLUS XRD COMMANDER, instalado do Departamento de Físico-Química deste Instituto.

3.3.3 Análise térmica

As curvas TG-DTA foram obtidas utilizando o equipamento SDTQ600 da TA Instruments, em cadinhos de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (40 μL) para amostra e referência, que foram aquecidos desde a temperatura ambiente até 800°C, obedecendo uma razão de aquecimento de 10°C min^{-1} . Ar sintético foi utilizado como atmosfera do forno, com vazão média de 150 mL min^{-1} .

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um microscópio de alta resolução (TOPCON SM-300) operando entre 10 e 20 kV. As amostras foram colocadas em suporte, cobertas com uma fina camada de carbono.

3.3.5 Análise elementar

As análises elementares foram realizadas pela Central Analítica do IQ-USP-SP usando um microanalisador ELEMENTAR ANALYSER CHN modelo 2400 Perkin-Elmer, que permite a determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de $\pm 0,5 \%$.

3.3.6 Espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Vis

Os espectros eletrônicos foram obtidos em solução aquosa para os ensaios de encapsulação e em tampão PBS para os ensaios de liberação do fármaco diclofenaco de sódio, utilizando-se o equipamento Thermo Scientific UV-Vis Spectrophotometer-Evolution array e cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

3.3.7 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, do Instituto de Química de São Paulo – USP. Os espectros de EPR foram obtidos no espectrômetro BRUKER, modelo EMX, operando na banda X (9,33 GHz), com potência de 20 mW e frequência de modulação de 100 kHz. Os experimentos foram realizados à 77K, no estado sólido.

3.4 Avaliação textural do cluster CUBA: obtenção de isotermas de adsorção de N₂

Informações sobre a textura porosa das amostras foram obtidas através dos dados de adsorção-dessorção de N₂, usando o método volumétrico estático e intervalo de pressão relativa entre 0,002 e 0,998, e o equipamento ASAP 2020- Micrometrics, equipado com transdutores para baixas ($p < 10\text{mmHg}$) e altas pressões ($10 < p < 1000\text{mmHg}$). As amostras foram pré-tratadas a 160°C sob vácuo da ordem de 10^{-3} mmHg durante 24h, para eliminar vapores adsorvidos nas cavidades. Importante salientar que antes da realização dessas medidas, o material (**CUBA**) foi previamente ativado em estufa à vácuo, por 24h e temperatura de 160°C, com a finalidade de retirar as moléculas de solvente presente nos poros do composto.

3.5 Análise do teor de cobre por complexometria com EDTA⁵⁴

Para a análise do teor de cobre foram pesados 5 mg da amostra em uma balança analítica com incerteza de 0,01 mg. A amostra foi aberta pela adição de 5 gotas de solução aquosa de HNO₃ (70 % m/m) a quente. Após o resfriamento, adicionou-se 1 mL de solução tampão de acetato de amônio 2 mol/L e, em seguida, um excesso conhecido de solução de EDTA 0,01 mol/L, suficiente para complexar todo o cobre (II) presente na amostra. Seguiu-se o ajuste do pH para $5 \pm 0,1$ e a adição do indicador alaranjado de xilenol, em quantidade suficiente para observar a cor amarela. Em seguida, a mesma foi submetida à titulação com solução ZnCl₂ 0,01 mol/L, previamente padronizada com EDTA. A viragem foi observada pelo aparecimento da cor rosa. O teor de cobre foi calculado através da **Equação 1**:

Equação 1:
$$T_{Cu} = MM_{Cu} \times (C_{EDTA} \times V_{EDTA} - C_{ZnCl_2} \times V_{ZnCl_2}) \div m_{amostra}$$

Onde, T_{Cu} = teor de cobre

MM_{Cu} = concentração da solução de EDTA

C_{EDTA} = concentração da solução de EDTA

V_{EDTA} = volume da solução de EDTA

C_{ZnCl_2} = concentração da solução de cloreto de zinco

V_{ZnCl_2} = volume da solução de cloreto de zinco

$M_{amostra}$ = massa da amostra pesada

3.6 Metodologia Computacional para proposição estrutura do CUBA

Os dados de composição elementar teórica foram gerados através do programa ACD/Chemsketch version 12.0.⁵⁵ O esquema 2-D do cluster de cobre foi planejado no programa BIOVIA Discovery Studio.⁵⁶ Finalmente, para otimização 3-D fez-se uso de mecânica molecular através da parametrização CHARMM.⁵⁷ O arquivo de saída foi salvo no formato MDL molfile.

3.7 Drug Delivery

3.7.1 Ensaio de encapsulação do fármaco diclofenaco de sódio

O fármaco diclofenaco de sódio (**DS**) foi encapsulado em ambos os compostos obtidos neste trabalho, através do seguinte procedimento experimental:

Foram dissolvidos 200 mg de diclofenaco de sódio em 42 mL de água Mili-Q (4,7612 mg.mL⁻¹). Posteriormente nesta solução foi disperso 60 mg do **CUBA-ativado** e **BioMOF-Cu-ativado**. Os recipientes foram fechados e mantidos sob agitação por um período de contato de 2, 4 e 7 dias, para o composto **CUBA-ativado** e 4 dias para o composto **BioMOF-Cu-ativado**. Ao final, as suspensões foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram recolhidos e submetidos à análise por espectroscopia de absorção eletrônica no UV para determinação indireta da quantidade de diclofenaco adsorvida. Foi construída, então, uma curva de calibração nas concentrações de 2,5, 5, 15, 25 e 35 µg.mL⁻¹ com medidas de absorbância realizadas em $\lambda = 275$ nm (máximo de absorção do diclofenaco), utilizando água Milli-Q como branco. Os pellets obtidos após centrifugação foram lavados várias vezes com uma solução água/etanol (1:1) e secos em dessecador e submetidos à espectroscopia no infravermelho, difração de raios-X de pó e análise térmica. Depois desse processo, os pellets foram chamados, de **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4**, **DS@CUBA7** (para os tempos de contato de 2, 4 e 7 dias) e **DS@BioMOF-Cu4** (para o tempo de contato de 4 dias).

3.7.2 Ensaio de liberação do fármaco diclofenaco de sódio

Em 10 mL de tampão PBS pH 7,4 foram dispersos 5 mg de **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4**, **DS@CUBA7** e **DS@BioMOF-Cu4**. Essas dispersões foram mantidas sob agitação branda a temperatura de 37°C, e aos tempos de 0,5; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24; 36; 48; 60; 72; 84; 96; 108; 120; 132; 144; 156; 168 e 192 horas, foram centrifugadas e uma alíquota de 4 mL dos sobrenadantes foram retiradas para determinação do teor de diclofenaco de sódio e posteriormente foram adicionados 4mL de tampão PBS pH 7,4. As alíquotas retiradas foram então submetidas à análise de espectroscopia de absorção molecular no UV para determinação do teor de diclofenaco e posterior construção da curva de liberação do diclofenaco em função do tempo a partir do **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4**, **DS@CUBA7** (para os tempos de contato de 2, 4 e 7 dias) e **DS@bioMOF-Cu4** (para o tempo de contato de 4 dias). Para determinação da concentração de diclofenaco foi construída uma curva de calibração nas concentrações de 1,25,

2.5, 5, 15, 25 e 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com medidas de absorvância em $\lambda = 275 \text{ nm}$ (máximo de absorção do diclofenaco), utilizando tampão PBS pH 7,4 como branco.

3.7.3 Ensaio de citotoxicidade

Em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Pavan e a pós-doutoranda Patrícia Bento da Silva, do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, foram realizados ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular *in vitro* frente a linhagem MRC-5 (células normais de fibroblastos pulmonares) para todos os compostos obtidos neste trabalho, com o intuito de determinar o valor de IC_{50} , que corresponde à concentração mínima necessária para matar 50% das células.

Cultura de Células

As células MRC-5 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA) e incubadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; streptomomicina 100 $\mu\text{g/mL}$). As culturas foram mantidas num ambiente umidificado a 37 °C com 5% de CO_2 e subcultivadas duas vezes por semana.

Testes de Citotoxicidade

Foi utilizado um ensaio de redução da resazurina para investigar a citotoxicidade de toda a série de compostos obtidos neste trabalho (**CUBA**, **BioMOF-Cu**, **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4**, **DS@CUBA7**, **BioMOF-Cu-4D** juntamente com o ligante adenina e a doxorubicina como controle positivo) em relação às células MRC-5. O ensaio baseia-se na redução do corante indicador, resazurina, na resorufina altamente fluorescente por viabilidade celular. As células não viáveis perdem rapidamente a capacidade metabólica para reduzir a resazurina e assim não produzem um sinal fluorescente. Resumidamente, as células foram separadas por tratamento com tripsina / EDTA 0,25% (VitroCell, Brasil) e $2,5 \times 10^4$ células foram colocadas em cada poço de uma placa de cultura celular de 96 poços (Costar, EUA) num volume total de 100 μL . As células foram deixadas aderir durante a noite e depois foram tratadas com diferentes concentrações de fármacos. Após 24 h de incubação na presença dos compostos, removeu-se o meio de adicionaram-se 50 μL de resazurina (Sigma-Aldrich, Alemanha) 0,01% p/v em DMEM a cada poço e incubaram-se as placas a 37 °C durante 3 h.

A fluorescência foi medida em leitor de placas Biotek Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT) utilizando um comprimento de onda de excitação de 530 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. As células não tratadas constituíram o controle negativo (células viáveis) e as células tratadas com doxorubicina a 100 nmol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) constituíram o controle positivo (células mortas). Todos os testes foram realizados em triplicata. Os valores de IC_{50} representam as concentrações das amostras necessárias para inibir 50% da proliferação celular e foram calculadas a partir de uma curva de calibração por curvas de regressão utilizando GraphPad Prism versão 5.01.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cluster heptanuclear de cobre(II) (CUBA)

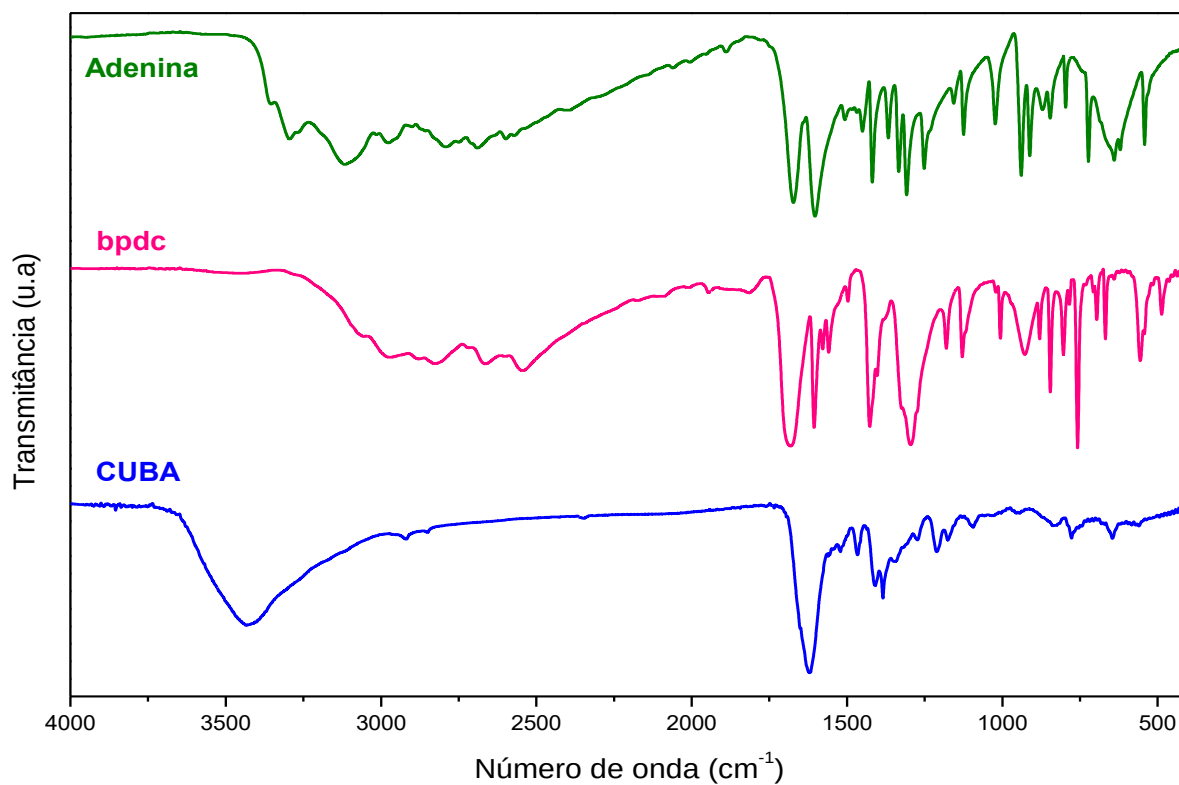
Para síntese deste material, foram testadas diversas condições experimentais (variação da concentração metal:ligante, mudança na temperatura de resfriamento da síntese e adição de surfactantes) na tentativa de obtenção de um BioMOF. Porém foram enfrentados alguns problemas na execução desta síntese, uma vez, que há uma dificuldade muito grande em reproduzir este material, além disso era necessário realizar uma limpeza minuciosa dos copos de teflon utilizados para síntese solvotérmica, para diminuir os contaminantes e também obtenção do mesmo material.

Além disso, na síntese dos MOFs são utilizados ligantes pontes para ajudar no crescimento tridimensional da rede, sendo que neste trabalho foi utilizado o ligante bpdc, que posteriormente foi visto sua não incorporação na estrutura, culminando na não formação do MOF desejado. Uma possível explicação para não coordenação do bpdc aos íons de cobre (II) se deve muito provavelmente à menor força de ligação Cu-O, quando comparada à ligação Cu-N e uma possibilidade de compensar isso seria aumentar muito a quantidade desse ligante em relação à adenina. Uma outra possibilidade seria substituir o acetato de cobre usado como material de partida por outra fonte de íons Cu(II) como nitrato ou cloreto.

4.1.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho dos ligantes bpdc e adenina e do CUBA estão ilustrados na **Figura 8**.

Figura 8 - Espectros vibracionais no infravermelho dos ligantes e do material obtido (**CUBA**).



Fonte: Autor

As principais frequências vibracionais observadas nos espectros dos ligantes⁵⁸⁻⁶⁰ e do material obtido, bem como as suas atribuições, são mostradas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Principais frequências na região do infravermelho dos ligantes livres e do material obtido (CUBA).

Atribuição	Frequência / cm^{-1}		
	bpdc	adenina	CUBA
vOH	–	–	3358s 3433s
$\nu_{\text{as}}\text{NH}$	–	3269m	3262
$\nu_{\text{s}}\text{NH}$	–	3120b	3108
νCH	2972w, 2822w	2972s	2920w, 2853w
$\nu\text{C}=\text{N7}$	–	1672s	–
$\nu_{\text{as}}\text{COO}$ (acetato)*	1680s, 1603s	–	1622vs
$\delta\text{CH} + \delta\text{CN}$	–	1454m	1468m
δNCH	–	1414s	1410m
$\nu_{\text{s}}\text{COO}$	–	–	1384m
$\gamma\text{C8-H} + \gamma\text{C2-H}$	–	1365m	–
$\nu\text{C-N-C}$	–	1334s	1341w
$\nu\text{NC} + \delta\text{CH}$	–	–	1277w
νCNH_2	–	1249m	1210m
$\nu\text{NC} + \delta\text{CH}$	–	1027w	1034vw
$\nu\text{NC} + \tau\text{NH}_2$	846s (δCH)	845s	832w
δOCO (acetato)*	757s	–	743vw
$\delta_{\text{fp}}\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$	–	–	777m
δ_{anel}	–	642b	644m

*Ver a seguir

ν = estiramento, δ = deformação angular, γ = deformação fora do plano, r = balanço (rocking), np = no plano, fp = fora do plano.
 b= broad, m= médium, s= strong, v= very, w= weak.

Fonte: Mathlouthi et al., 1984; Sienkiewicz-Gromiuk et al., 2014 e Silverstein et al., 2005.

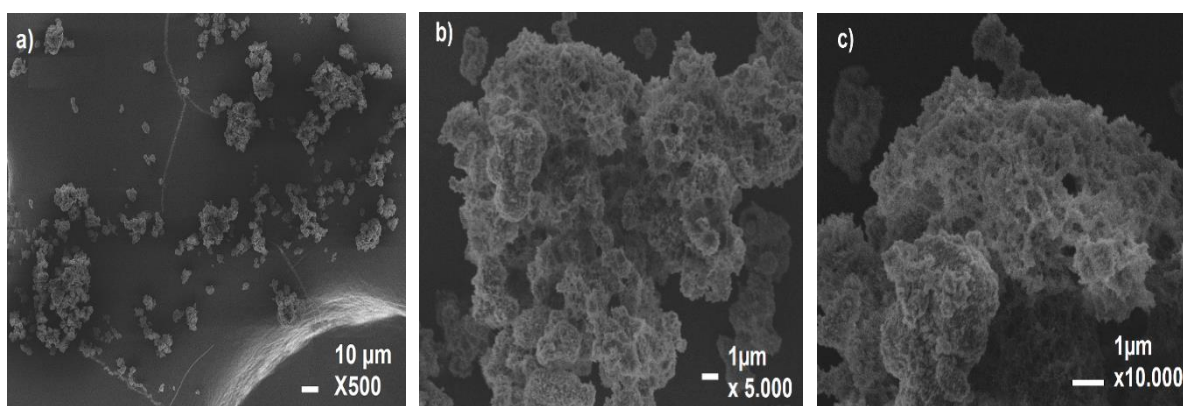
As principais observações que podem ser tiradas da comparação entre esses espectros vibracionais, mostrados na **Figura 8**, são que apenas o ligante nitrogenado está presente na esfera de coordenação dos íons cobre (II), que é completada com a coordenação de íons acetato (presença de bandas em 1622, 1384 e 743 cm^{-1} , associadas respectivamente aos modos vibracionais $\nu_{\text{as}}\text{COO}$, $\nu_{\text{s}}\text{COO}$ e δOCO) proveniente do sal precursor. Já a presença do ligante adenina pode ser confirmada principalmente pela presença das bandas: estiramento assimétrico NH em 3262 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{NH}$); estiramento simétrico NH em 3108 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{NH}$); estiramento carbono-nitrogênio em 1341 cm^{-1} ($\nu\text{C-N-C}$) e estiramento carbono-amina em 1210 cm^{-1} ($\nu\text{C-NH}_2$).

NH₂). Além disso, pode ser observada também no espectro vibracional do composto, uma banda intensa centrada em 3433 cm⁻¹, que deve estar relacionada à presença de moléculas de água, que corresponde a quase 10% do material, como foi depois verificado por análise térmica.

4.1.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

A **Figura 9** ilustra as imagens de microscopia MEV-FEG do **CUBA**.

Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura do composto: a) 500x; b) 5.000x e c) 10.000x.



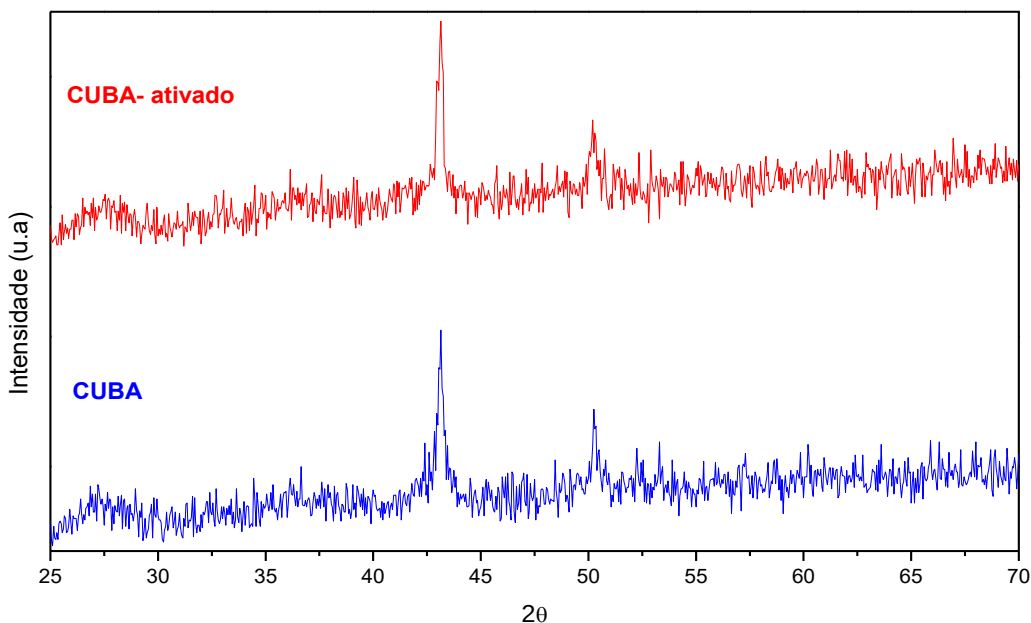
Fonte: Autor

As imagens MEV-FEG evidenciaram a formação de um material de baixa cristalinidade (resultados esses que por si já apontavam para a não obtenção do MOF desejado) formado por aglomerados de dimensão nanométrica, que se organizam em uma estrutura maior, semelhante à de um coral, o que confere ao material uma alta porosidade de superfície. Devido a esta propriedade, o composto foi posteriormente investigado como transportador do agente terapêutico diclofenaco de sódio.

4.1.3 Difração de raios-X de pó

A **Figura 10** apresenta os padrões de difração do **CUBA** antes e após a ativação do material, que foi realizada em estufa a vácuo, a 160°C, durante 24 h.

Figura 10 - Padrão de difração de raios-X de pó para o **CUBA**, antes e após a ativação.



Fonte: Autor

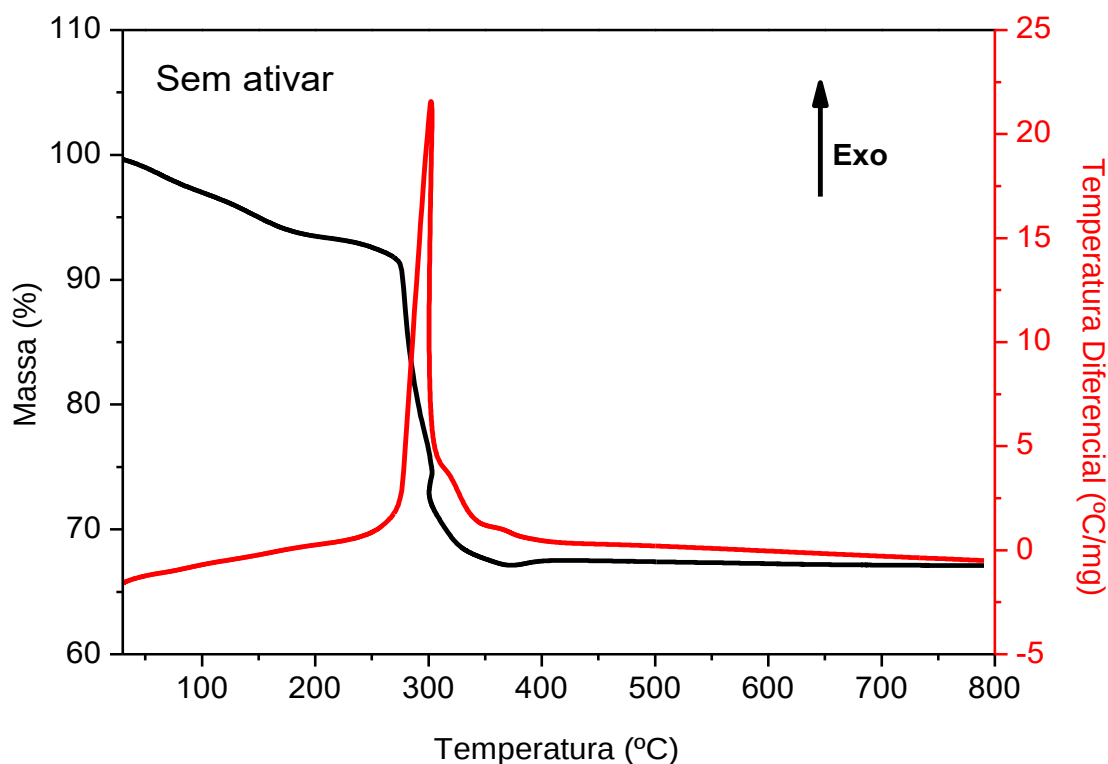
Com esta técnica foi possível verificar a baixa cristalinidade do composto obtido, o que já era o primeiro indício de que não deveria tratar-se de um BioMOF, uma vez que os MOFs são materiais altamente cristalinos. Por outro lado, a **Figura 10** evidencia que após a ativação, o **CUBA** manteve o mesmo padrão de difração observado para o composto não ativado, sendo que em ambos os difratogramas os picos de difração puderam ser observados no mesmo valor de 2θ ($43,17^\circ$ e $50,26^\circ$). Este resultado é bastante positivo, uma vez que a ativação não alterou a natureza do composto.

4.1.4 Análise térmica

A **Figura 11** apresenta as curvas TG e DTA do **CUBA** antes da ativação. A primeira perda de massa (8,61 %) pode ser observada entre 30 e 274°C e pode ser atribuída à saída de moléculas de solvente, sendo eles, água, DMF e cátions dimetilamônio oriundos da decomposição térmica do DMF em condições solvotérmicas. A segunda perda de 23,95% de massa ocorre no intervalo de $274 - 398^\circ\text{C}$ pode estar relacionada com a eliminação da matéria orgânica contida no material, sendo acompanhada por um evento exotérmico em 302°C . Houve na etapa final da decomposição do material, a formação de um resíduo, correspondendo a 67,44% da massa inicial.

A temperatura *onset* (T_{onset}), encontrada para o **CUBA**, que tem sido utilizada como indicativo da estabilidade térmica de um composto, é igual a 274 °C.

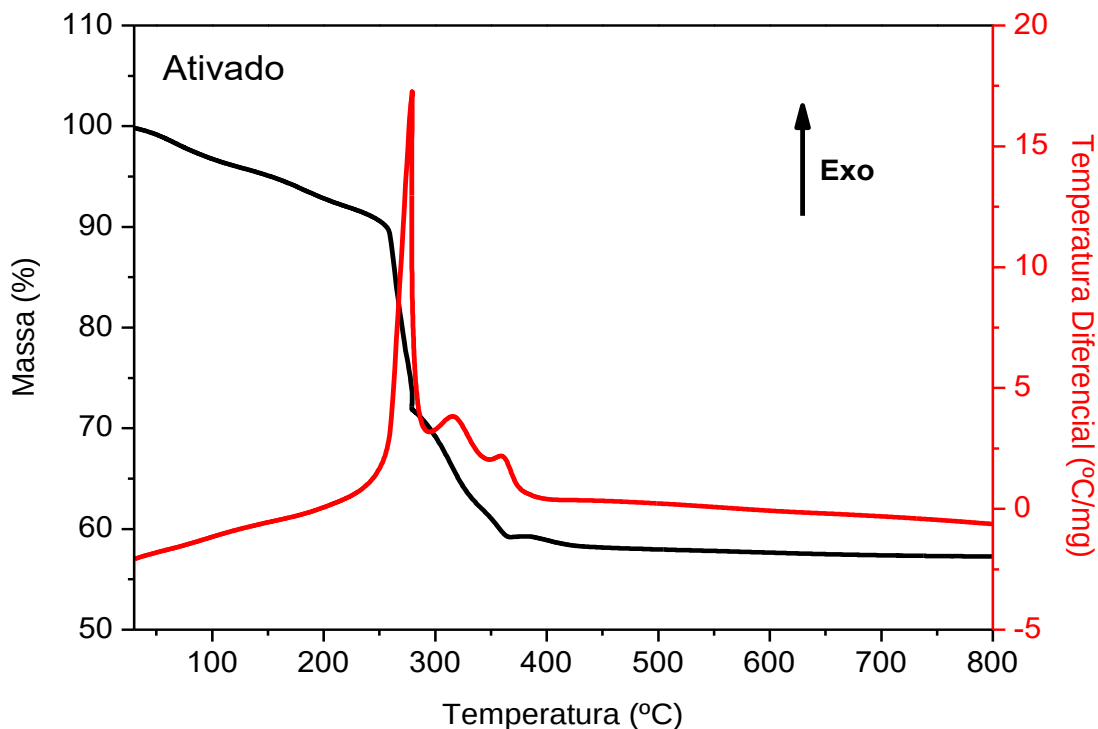
Figura 11 - Curvas TG e DTA obtidas para o **CUBA** não ativado.



Fonte: Autor

A **Figura 12** mostra as curvas TG e DTA obtidas para o **CUBA-ativado**. Após processo de ativação a 160 °C por 24 horas sob vácuo foi possível observar a variação da T_{onset} de 274 para 255 °C e, também uma perda de massa de 10,01% entre a temperatura ambiente e 255 °C referente à saída das moléculas de água (como o IV já havia mostrado), juntamente com o DMF e cátions dimetilamônio oriundos da decomposição térmica do DMF em condições solvotérmicas. A segunda perda entre 255–363 °C pode estar relacionada com a eliminação da matéria orgânica contida no material, cuja perda de massa foi de 30,72%, sendo acompanhada por três eventos exotérmicos em 278, 316 e 360 °C, respectivamente (dois dos quais, também observado na **Figura 11** com intensidades bem mais baixas). Na etapa final da decomposição térmica do material, houve a formação do resíduo, sendo este, 59,27% da massa inicial.

Figura 12 - Curvas TG e DTA obtidas para o **CUBA-ativado**.



Fonte: Autor

A **Tabela 5** resume os dados obtidos das curvas TG e DTA para os compostos **CUBA-sem ativar** e **CUBA-ativado**.

Tabela 5 – Dados referentes à análise térmica dos compostos **CUBA- sem ativar** e **ativado**.

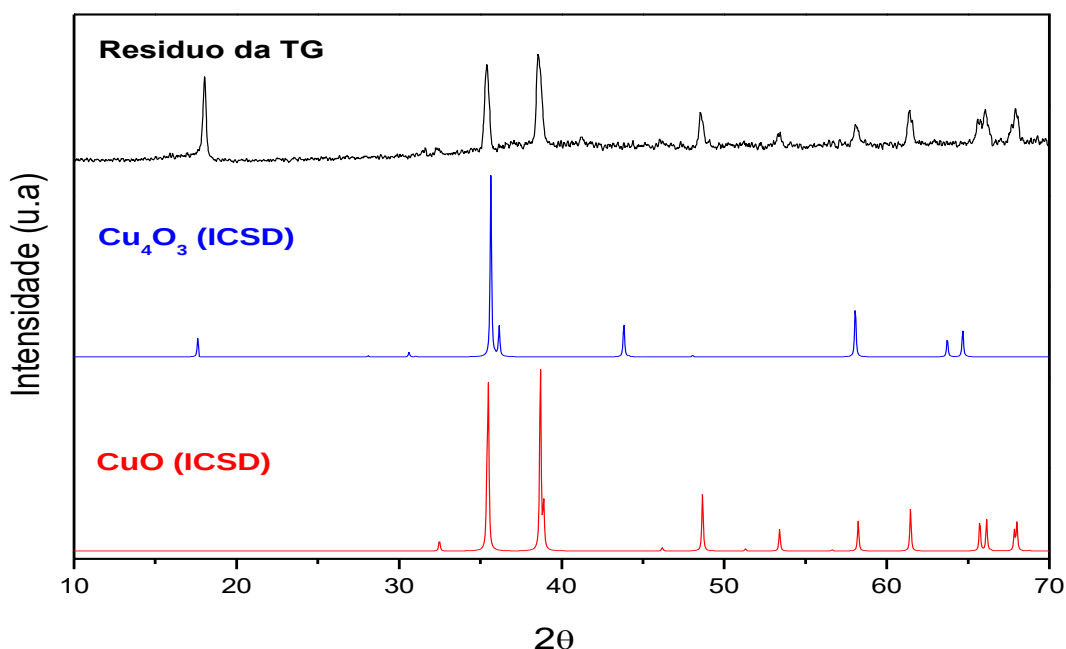
Composto	Atribuição	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)	Picos Exotérmicos (°C)
CUBA-sem ativar	Solventes	T _{amb.} – 274	8,61	—
	Eliminação matéria orgânica	274 – 398	23,95	302
	Resíduo	398 – 800	67,44	—
CUBA-ativado	Solventes	T _{amb.} – 255	10,01	—
	Eliminação matéria orgânica	255 – 363	30,72	278, 316 e 360
	Resíduo	352 – 800	59,27	—

Fonte: Autor

Vale ressaltar que em ambos os termogramas do material (ativado e sem ativar), a porcentagem residual encontrada é muito elevada, quase 70% da massa inicial do **CUBA**, sugerindo tratar-se de um cluster de cobre. Com base nesses resultados, foi obtido o DRX de

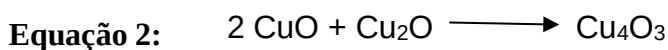
pó do resíduo da decomposição térmica do material, e comparado com um banco de dados, para tentar identificar os possíveis compostos que poderiam estar presentes no sólido. A **Figura 13** mostra o difratograma referente ao resíduo gerado na análise térmica, além de dois padrões de difração de raios-X obtidos através da base de dados - *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD) - referentes às possíveis estruturas que podem estar presentes no resíduo do **CUBA**.

Figura 13 - Comparação entre o padrão de difração de raios-X do resíduo da TG do **CUBA** e os padrões obtidos pelo banco de dados ICSD de CuO e Cu₄O₃.



Fonte: Autor

Com base na **Figura 13**, podemos inferir que o resíduo da análise térmica consiste em uma mistura de óxido de cobre (II) e o cluster metálico paramelaconita (Cu₄O₃). Uma vez que na síntese deste material utilizou-se um sal de cobre (II), é de se esperar a formação do óxido de cobre (II) (CuO), e este quando aquecido a temperaturas de 500-600 °C há uma leve decomposição do CuO em Cu₂O.⁶¹ O óxido de cobre (II) quando na presença do óxido de cobre (I) irá reagir para a formação do cluster metálico.^{62,63} Como a análise térmica do material foi realizada até 900°C foi possível a formação dos dois óxidos, uma vez que o cluster pode ter se formado a partir da reação representada pela **Equação 2**.

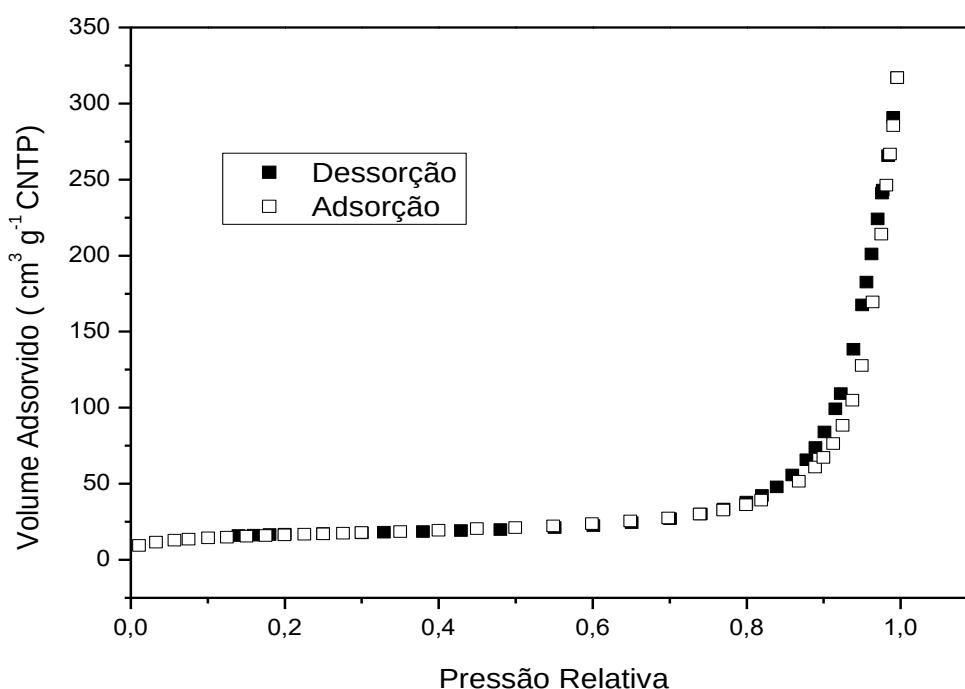


4.1.5 Fisissorção de N₂

A **Figura 14** ilustra a isoterma de fisissorção de N₂ obtida pelo método BET do **CUBA-ativado** (160 °C, 24 horas, sob vácuo). Como esperado, a isoterma obtida apresentou comportamento do tipo III, típico de sólidos não porosos.⁶⁴

As isotermas do tipo III se originam sob condições nas quais as moléculas de gás têm maior afinidade umas pelas outras do que pela superfície do adsorvente, sendo que, as interações adsorvente-adsorvato são relativamente fracas.⁶⁵

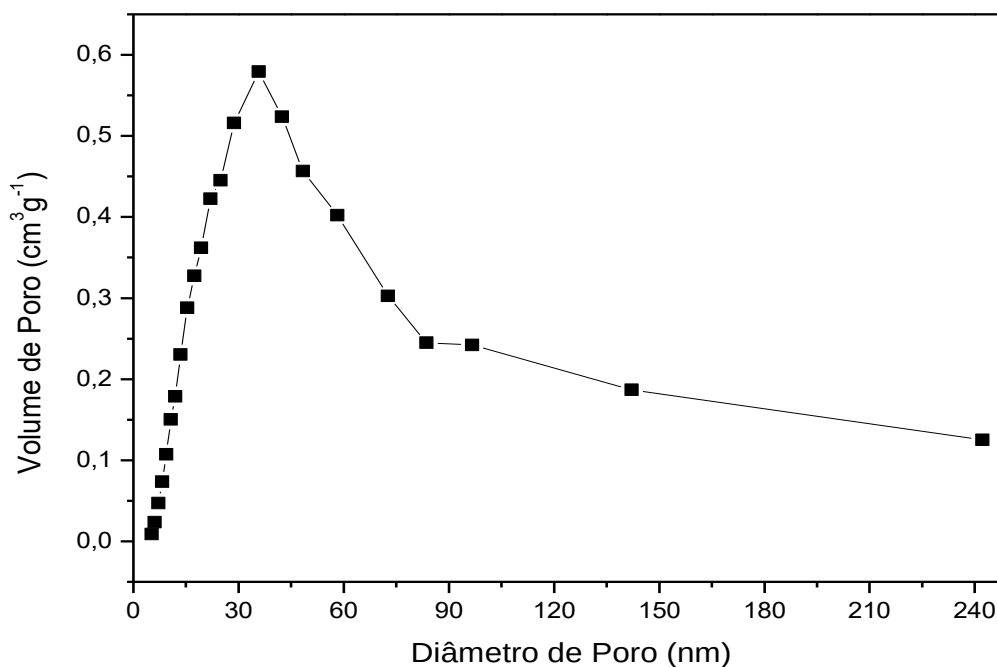
Figura 14 - Isotherma de fisissorção de N₂ para o **CUBA-ativado**.



Fonte: Autor

Apesar do **CUBA-ativado** apresentar uma isoterma do tipo III, típica de sólidos não porosos, as imagens de microscopia eletrônica de varredura (ver **Figura 9**) evidenciaram a presença de poros de superfície. A **Figura 15** ilustra a distribuição do diâmetro de poro obtida pelo método de BJH para o material. O diâmetro dos poros varia de 6,83-83,58nm, com diâmetro médio de 35,87 nm.

Figura 15 - Curva de distribuição do diâmetro de poro (BJH) para o **CUBA-ativado**.



Fonte: Autor

A **Tabela 6** resume os dados relacionados à porosidade do **CUBA-ativado** obtidos pela medida de adsorção de N₂, bem como o valor da área superficial calculada pelo método de BET.

Tabela 6– Resumo dos dados obtidos pela medida de fisissorção de N₂ para o **CUBA-ativado**.

Área Superficial (BET)	55,13 m ² g ⁻¹
Volume de Poro (BJH)	0,49 cm ³ g ⁻¹
Diâmetro Médio de Poro (BJH)	35,87 nm

Fonte: Autor

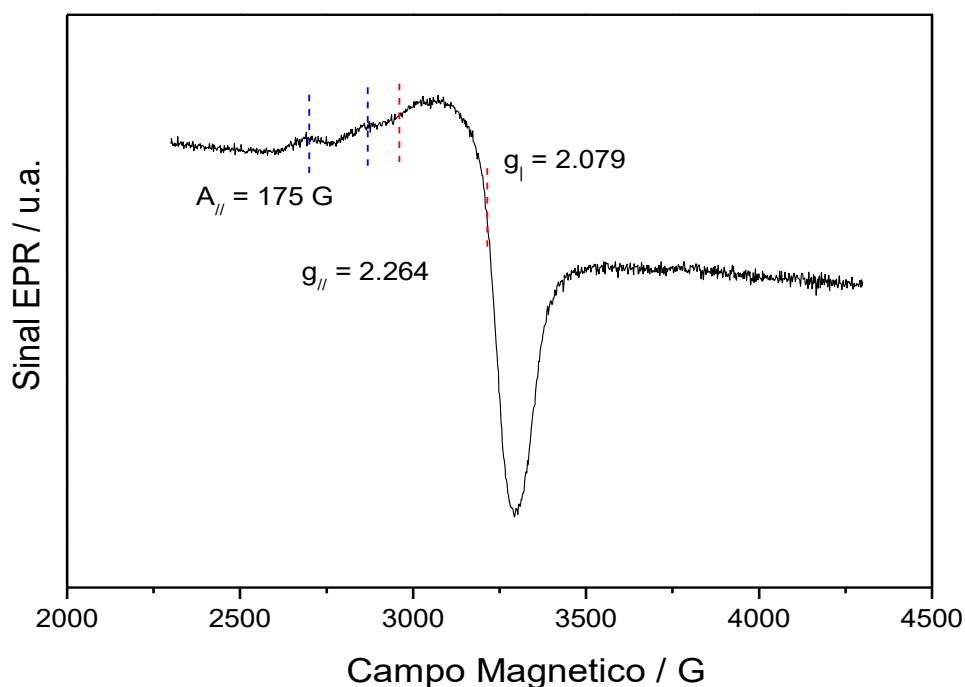
Com os dados obtidos, pode-se inferir que o material obtido realmente não é um MOF já que apresenta uma baixa área superficial, além de sua isoterma ser característica de sólidos não porosos. Em contrapartida, o material apresenta poros de superfície, o que justifica seu uso como uma matriz em ensaios de *drug delivery*.

4.1.6 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

É bem sabido que os espectros de EPR podem auxiliar no diagnóstico da geometria de coordenação de sistemas paramagnéticos bem como elucidar a natureza das distorções das simetrias ideais.⁶⁶ O cobre (^{63}Cu ou ^{65}Cu) tem spin nuclear $I = 3/2$, o qual dá origem ao desdobramento hiperfino entre o elétron desemparelhado e o próprio núcleo. Assim, um espectro de EPR de complexos de Cu (II) consiste de quatro linhas largas $\{(2I + 1) = 2(3/2) + 1 = 4\}$. Mas, para muitos compostos, os elétrons d estão deslocalizados em uma considerável extensão por sobre os ligantes e, assim, se os átomos dos ligantes tiverem eles mesmos um spin nuclear, então se pode esperar por padrões de desdobramento superhiperfino sobrepostos a estas linhas.^{67,68}

A **Figura 16** apresenta o espectro de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) obtido para o composto **CUBA**, no estado sólido, a 77 K.

Figura 16 - Espectro EPR do composto **CUBA**, no estado sólido a 77 K.



Fonte: Autor

O espectro de EPR obtido para o composto indica uma simetria axial, ou seja, o ambiente ao redor do íon Cu (II) no eixo z é diferente do ambiente nos eixos xy , que são iguais e o parâmetro $g_{||}$ tem maior valor do que o $g_{\perp}$.⁶⁹ Sendo assim, obteve-se uma relação $g_{||} > g_{\perp} > 2$ para o composto, sugerindo um sítio de coordenação com geometria tetragonal distorcida.

A relação $g_{||}/A_{||}$ estima o grau de distorção da espécie quadrado planar de cobre(II). Os valores de $g_{||}/A_{||}$ entre 110-120 cm são típicos de complexos planares, enquanto que o intervalo de 130-150 cm é característico de pequena para moderada distorção, enquanto que o intervalo de 180-250 cm indica considerável distorção tetraédrica.⁷⁰ Para o composto **CUBA** obteve-se um valor igual a 130 cm, sugerindo que a geometria ao redor do íon é quase quadrado planar. Além disso, nenhuma banda correspondente às transições $\Delta M_s = \pm 2$ (em campos $\sim 1500G$) foi observada no espectro, sugerindo que não há interação Cu – Cu.⁷¹ Portanto os íons metálicos no clusters interagem via os ligantes em ponte, como era esperado.

4.1.7 Análise elementar e fórmula mínima

Devido à formação dos óxidos CuO e Cu₄O₃ no resíduo da análise térmica, houve a necessidade de determinar o teor de cobre no composto **CUBA** através da técnica de complexometria com EDTA.

A titulação complexométrica foi realizada em triplicata, sendo encontrado um valor médio de 50,10 % de cobre. Esse valor foi obtido utilizando a **Equação 1** já apresentada anteriormente:

Equação 1: $T_{Cu} = MM_{Cu} \times (C_{EDTA} \times V_{EDTA} - C_{ZnCl2} \times V_{ZnCl2}) \div m_{amostra}$

A **Tabela 7** apresenta os resultados da análise elementar e do teor de cobre para esse material.

Tabela 7 – Análise elementar e teor metálico para o **CUBA**.

Resultados	% dos elementos				
	C	H	N	O*	Cu
Teórico	19,40	1,90	14,20	19,40	45,00
Experimental	20,81	1,66	16,93	10,50	50,10

$\%O = \%(100 - Cu - C - N - H)$

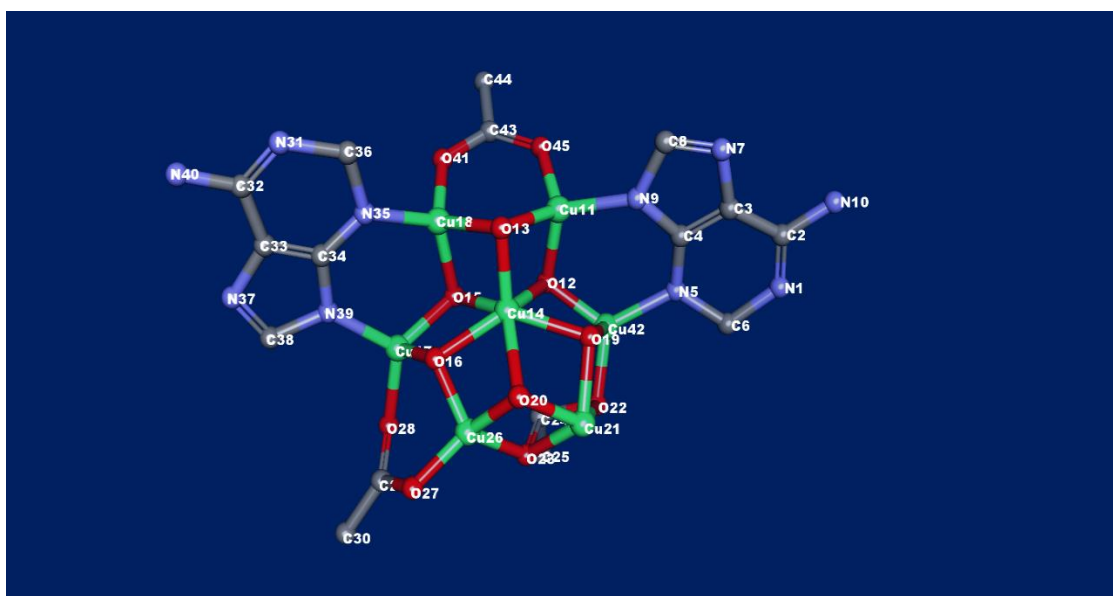
Fonte: Autor

A partir dos resultados analíticos mostrados na **Tabela 7**, bem como dos dados espectroscópicos, foi possível tentativamente propor para o composto **CUBA** a fórmula mínima

$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{Cu}_7$. Cabe salientar que a caracterização estrutural do cluster não foi possível por causa da baixa cristalinidade do sólido (ver **Figura 10**).

De qualquer modo, uma das possibilidades estruturais está ilustrada na **Figura 17**, onde pode ser observada a presença de um cluster contendo sete íons metálicos, no estado de oxidação 2+, no qual o íon central encontra-se em um ambiente octaédrico distorcido, enquanto os demais átomos de cobre apresentam-se com geometria quadrática planar notavelmente distorcida (em alguns casos é denominado como quadrado planar tetraedricamente distorcido). A conexão entre os metais no cluster $[\text{Cu}_7\text{O}_6(\text{Ac}^-)_3(\text{adenina})_2]$ é feita então pelos ânions oxo em ponte, ânions acetato e duas moléculas de adenina coordenada através dos átomos de nitrogênio N3 e N9.

Figura 17 - Representação de uma possível estrutura para o cluster **CUBA** (o programa utilizado para otimização da estrutura 3D foi o *Accelrys Discovery Studio 4.1*, que possui parametrização para o cobre). Nestes arquivos os hidrogênios estão omitidos para melhor visualização.



Fonte: Autor

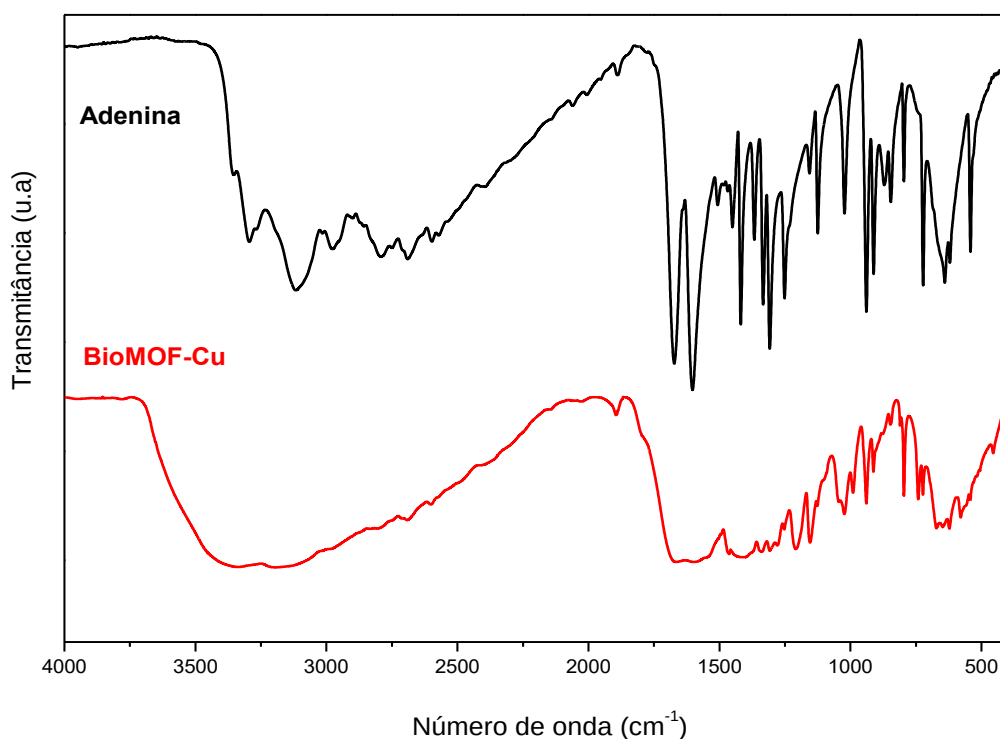
4.2 BioMOF-Cu

A repreparação deste MOF, já descrito na literatura, permitiu utilizar neste trabalho uma metodologia sintética diferente da técnica solvotérmica (usada para a síntese do cluster **CUBA**), que consistiu no uso da Mecanoquímica. Em consonância com os princípios da Química Inorgânica Verde, através dessa estratégia sintética pode-se obter o material desejado a temperatura e pressão ambientes, em um tempo muito curto de reação (apenas alguns minutos), além de evitar o uso de solventes orgânicos.

4.2.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho do ligante adenina e do **BioMOF-Cu** estão ilustrados na **Figura 18**.

Figura 18 - Espectros vibracionais no infravermelho da adenina e do **BioMOF-Cu**.



Fonte: Autor

As atribuições das frequências vibracionais presentes no ligante^{58,60} e no material obtido são mostradas na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Principais frequências na região do infravermelho do ligante adenina e do material obtido.

Atribuição	Frequência/ cm^{-1}	
	Adenina	BioMOF-Cu
$\nu_{\text{as}}\text{OH}$	3358 w	3372 br
$\nu_{\text{as}}\text{NH}$	3269 m	3200 br
$\nu_{\text{s}}\text{NH}$	3120 b	3170 br
$\nu\text{CH}_{\text{alifático}}$	2972 m	2956 w
$\nu_{\text{as}}\text{COO}$ (acetato)	1672 s	1669 br
$\nu\text{C}=\text{C} + \delta\text{NH}_2$	1603 s	1600 br
δNCH	1414 s	1409 br
$\gamma\text{C8-H} + \gamma\text{C2-H}$	1365 m	1340 w
$\nu\text{C-N} + \nu\text{C=N}$	1310 s	1304 w
νCNH_2	1249 m	1206 m
δ_{anel}	1122 w	1147 m
$\nu\text{NC} + \tau\text{NH}_2$	849 s	844 w
δ_{anel}	638 b	649 w

ν = estiramento, δ = deformação angular, γ = deformação fora do plano.

b = broad, m = médium, s = strong, v = very, w = weak.

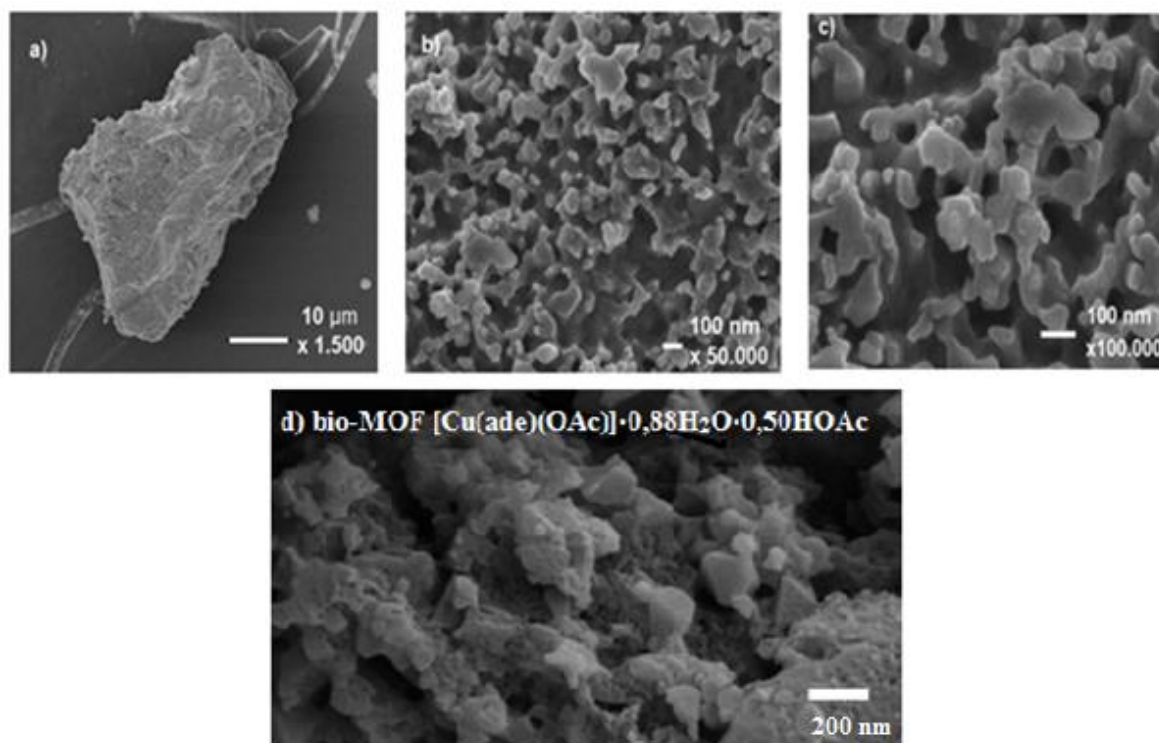
Fonte: Autor

A partir da observação dos espectros vibracionais da adenina e do **BioMOF-Cu** mostrados na **Figura 18**, podemos inferir a presença do ligante na esfera de coordenação dos íons cobre (II), devido a presença das bandas características da adenina no espectro do composto obtido.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

A **Figura 19** ilustra as imagens de MEV-FEG do **BioMOF-Cu**.

Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura do composto: a) 1.500x; b) 50.000x, c) 10.000x, d) **bio-MOF** $[\text{Cu}(\text{ade})(\text{OAc})]\cdot 0,88\text{H}_2\text{O}\cdot 0,50\text{HOAc}$ ⁵³.



Fonte: Autor

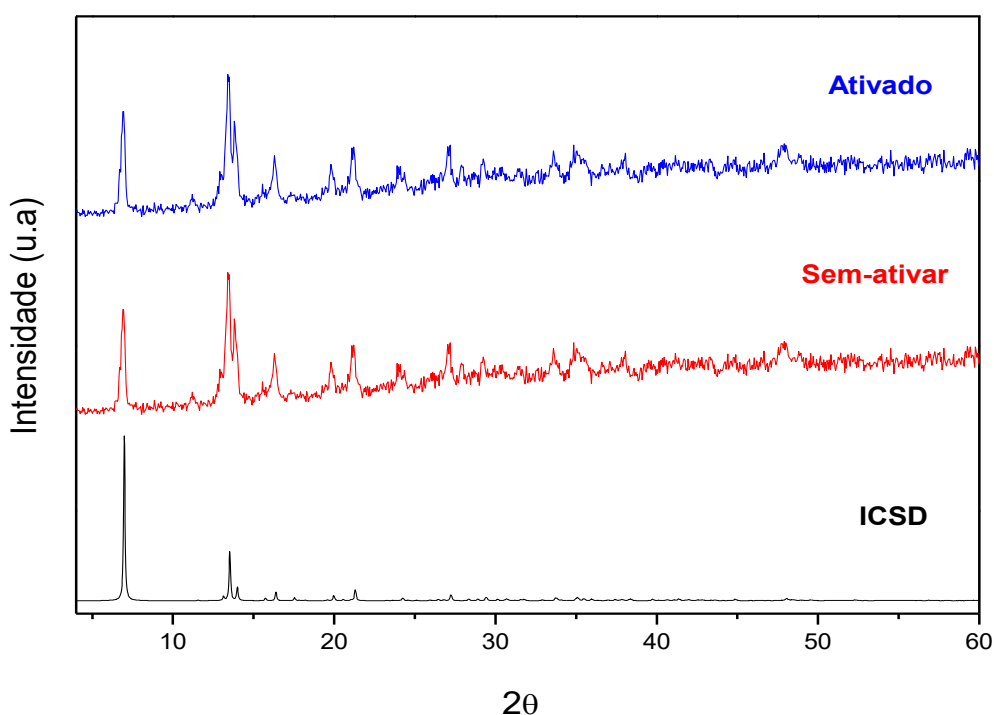
De acordo com Chunmei Jia e colaboradores⁵³ a imagem de microscopia (**Figura 19d**) evidenciou a formação de um material em escala nanométrica com uma textura rugosa e homogênea conferindo ao material uma alta porosidade. Quando se compara esta imagem com as obtidas no presente trabalho (**Figuras 19a-c**), podemos perceber características morfológicas semelhantes. Com base na estrutura porosa deste material, podemos inferir que ele apresenta uma potencialidade para aplicação em *drug delivery*.

4.2.3 Difração de raios-X de pó

Uma vez que a síntese utilizada neste trabalho foi uma síntese já reportada na literatura⁵³, houve a necessidade de verificar se o padrão de difração se manteve inalterado após a reprodução do material.

A **Figura 20** apresenta os padrões de difração do **BioMOF-Cu sem ativar**, **BioMOF-Cu-ativado** e o padrão de difração obtido através da base de dados ICSD.

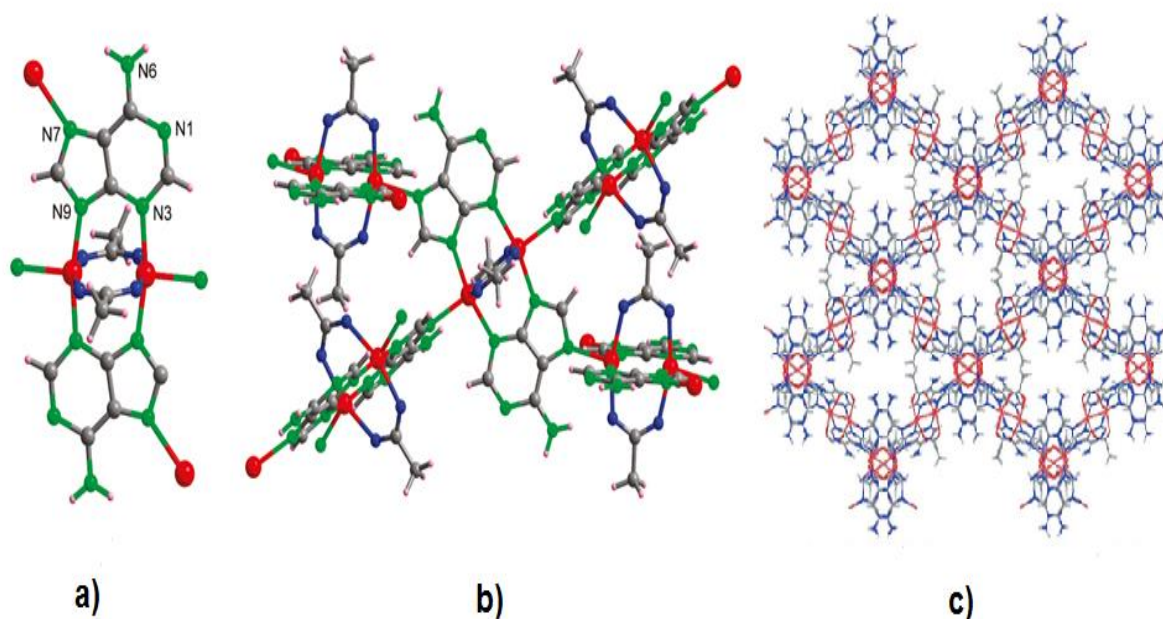
Figura 20 - Padrão de difração de raios-X de pó para o **BioMOF-Cu**: ICSD, sem ativar e ativado.



Fonte: Autor

Analisando os difratogramas, podemos inferir que após a realização da síntese o perfil cristalino do material obtido se manteve o mesmo quando comparado com o da literatura, indicando a formação do mesmo material, sendo neste caso o **bio-MOF [Cu(ade)(OAc)]·0,88H₂O·0,50HOAc**,^{53,64} chamado neste trabalho de **BioMOF-Cu**. A estrutura cristalina do **bio-MOF[Cu(ade)(OAc)]·0,88H₂O·0,50HOAc** pode ser vista na **Figura 21**.

Figura 21 - Estrutura cristalina do **bio-MOF** $[\text{Cu}(\text{ade})(\text{OAc})]\cdot 0,88\text{H}_2\text{O}\cdot 0,50\text{HOAc}$: a) SBU com geometria *paddle-wheel* ligados pelos nitrogênios N₃ e N₉ da adenina; b) SBU infinita do bio-MOF e c) Estrutura tridimensional da rede



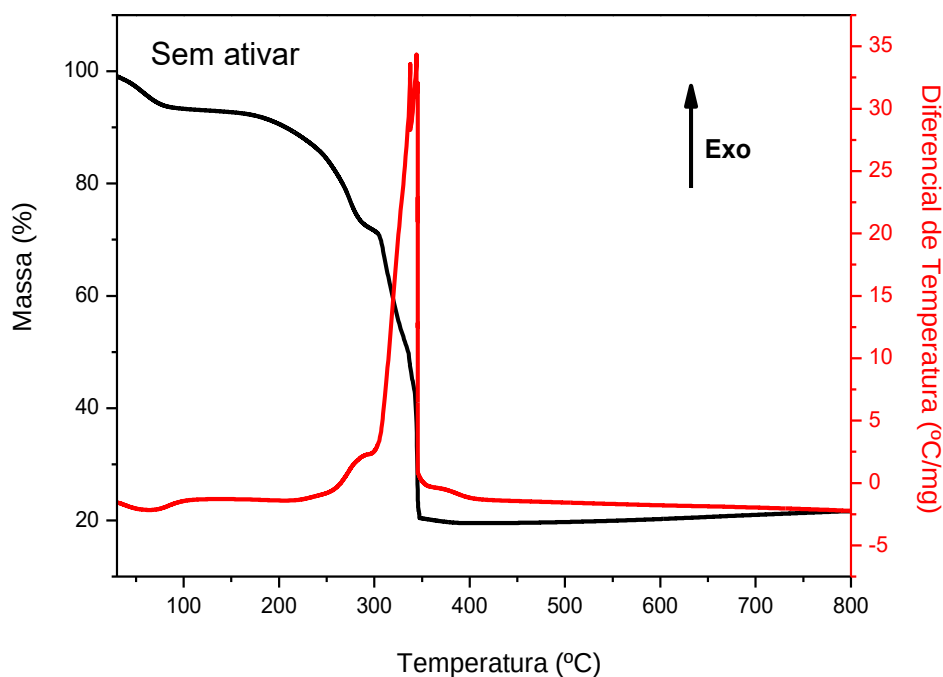
Fonte: Sonia Pérez-Yáñez et al.⁶⁴

Vale ressaltar que após o processo de ativação (110°C, 24h, vácuo) o **BioMOF-Cu** manteve o mesmo padrão de difração observado para o composto sem ativar, sendo este um resultado bastante positivo, uma vez que a ativação não alterou a natureza cristalina do composto.

4.2.4 Análise térmica

A **Figura 22** apresenta as curvas TG e DTA do **BioMOF-Cu-sem ativar**. A perda de 6,65% em massa observada a partir da temperatura ambiente até 87 °C pode ser atribuída à saída das moléculas de água contidas nos poros do material, sendo acompanhada por um pico endotérmico em 62 °C. A segunda perda, correspondente a 73,18% de massa, foi observada entre 87–349 °C e pode ser referente à eliminação da matéria orgânica contida no material, sendo acompanhada por dois picos exotérmicos em 337 e 346 °C. Houve na etapa final da decomposição térmica do material a formação do resíduo, sendo este, 20,17% da massa inicial. A temperatura *onset* (T_{onset}), encontrada para o **BioMOF-Cu** sintetizado neste trabalho, é igual a 302 °C.

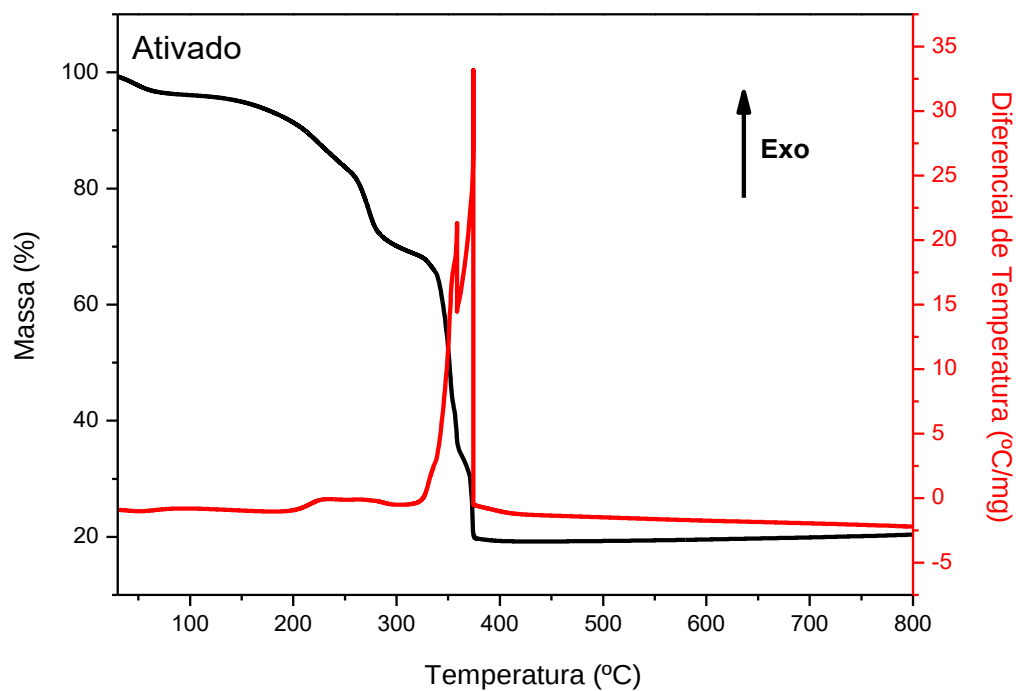
Figura 22 - Curvas TG e DTA obtidas para o **BioMOF-Cu** não ativado.



Fonte: Autor

A **Figura 23** mostra as curvas TG e DTA obtidas para o **BioMOF-Cu-ativado**. Após processo de ativação a 110 °C por 24 horas sob vácuo, foi possível observar a variação da T_{onset} de 302 para 338°C e também uma perda de massa de 2,46% entre a temperatura ambiente até 63 °C referente à saída das moléculas de água contidas nos poros do material. Essa perda de 2,46% apresentada na curva TG do **BioMOF-Cu-ativado** é bem inferior aos 6,65% de perda de massa observada no **BioMOF-Cu-sem ativar**. A segunda perda, correspondente a 77,93% de massa, foi observada entre 63–375 °C e pode ser referente à eliminação da matéria orgânica contida no material, sendo acompanhada por dois picos exotérmicos em 356 e 376 °C. Houve na etapa final da decomposição térmica, a formação do resíduo, sendo este, 19,61% da massa inicial. Com base nos dados apresentados, podemos inferir que o processo de ativação foi eficiente (mas não completo, ver a seguir) na remoção das moléculas de água oclusas na estrutura porosa do material.

Figura 23 - Curvas TG e DTA obtidas para o **BioMOF-Cu-ativado**.



Fonte: Autor

A **Tabela 9** resume os dados obtidos das curvas TG e DTA para os compostos **BioMOF-Cu-sem ativar** e **BioMOF-ativado**.

Tabela 9 – Dados referentes à análise térmica dos compostos **BioMOF-Cu-sem ativar** e **ativado**.

Composto	Atribuição	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)	Picos Exotérmicos (°C)
BioMOF-Cu-sem ativar	Água	$T_{amb.} - 87$	6,65	62 (endotérmico)
	Eliminação matéria orgânica	87 – 349	73,18	337 e 346
	Resíduo	349 – 800	20,17	—
BioMOF-Cu-ativado	Água	$T_{amb.} - 63$	2,46	—
	Eliminação matéria orgânica	63 – 375	77,93	356 e 376
	Resíduo	375 – 800	19,61	—

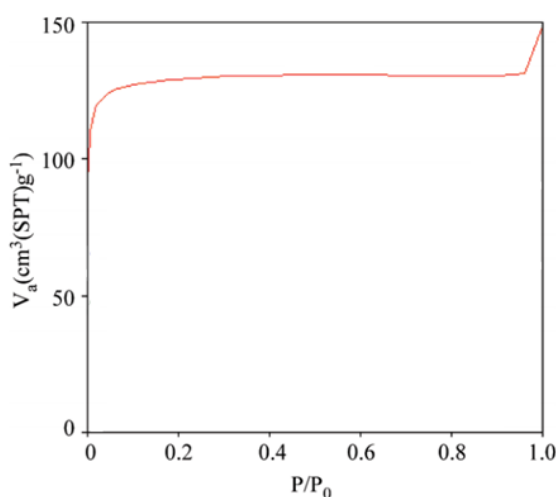
Fonte: Autor

4.2.5 Fisissorção de N₂

Com base nas caracterizações apresentadas para o **BioMOF-Cu** e valendo-se do fato que este material foi sintetizado com base na literatura,^{53,64} há evidências que houve a formação do **bio-MOF[Cu(ade)(OAc)]·0,88H₂O·0,50HOAc**, como já havia sido previsto anteriormente, uma vez que as caracterizações obtidas neste trabalho estão de acordo com as da literatura. Segundo Sonia Pérez-Yáñez e colaboradores⁶⁴ o **bio-MOF[Cu(ade)(OAc)]·0,88H₂O·0,50HOAc** apresenta curvas de adsorção que se assemelham a uma isoterma do tipo I, sendo característico de um sólido cristalino microporoso (≤ 2 nm) com distribuição de tamanho de poro uniforme.

Para sólidos microporosos, a isoterma do tipo I (**Figura 24**) mostra um ramo quase vertical na primeira região da curva. Isto se deve à grande facilidade de adsorção em poros com diâmetros menores que 20 Å. Após o preenchimento dos microporos, que acontece em ordem crescente de tamanho, praticamente não há outras regiões onde a adsorção seja significativa. A curva, portanto, mostra uma região quase constante que volta a crescer quando o fenômeno de condensação começa a ocorrer.⁶⁵

Figura 24 - Isotherma de fisissorção de N₂ para o **bio-MOF [Cu(ade)(OAc)]·0,88H₂O·0,50HOAc**.



Fonte: Sonia Pérez-Yáñez et al.⁶⁴

A **Tabela 10** resume os dados experimentais e teóricos relacionados à porosidade do material obtido por Sonia Pérez-Yáñez e colaboradores⁶⁴ pela medida de adsorção de N₂, bem como o valor da área superficial calculada pelo método de BET. Vale ressaltar que não foi possível comparar os dados da literatura com os obtidos neste trabalho, uma vez que, houve problemas no equipamento, ocasionando ao não recebimento do resultado a tempo de serem

colocados nesta dissertação. Porém, espera-se valores muito próximos aos da literatura por haver evidências da formação do mesmo material.

Tabela 10 – Resumo dos dados contidos na literatura⁶⁴ obtidos pela medida de fisissorção de N₂.

Teórico	
Área Superficial (BET)	654,8 m ² g ⁻¹
Volume de Poro (BJH)	0,286 cm ³ g ⁻¹
Experimental	
Área Superficial (BET)	505 m ² g ⁻¹
Volume de Poro (BJH)	0,173 cm ³ g ⁻¹

Fonte: Pérez-Yáñez et al., 2011.⁶⁴

Materiais porosos com alta área superficial, como o obtido neste trabalho vêm sendo cada vez mais estudados na formulação de agentes de liberação controlada de fármacos em sistemas biológicos. Essa classe de materiais oferece várias características atraentes para a liberação controlada de fármacos, tais como uma alta capacidade de adsorção, capacidade dos poros em alterar o estado cristalino de um fármaco para amorfo, possibilidade de estabilizar fármacos incorporados dentro desses poros e a facilidade de alterar as dimensões dos poros para controlar a cinética de liberação de fármacos.⁷² Por essa razão, esse material também foi submetido a ensaios de encapsulação e liberação do fármaco diclofenaco de sódio.

4.3 Estudo em Drug Delivery in vitro

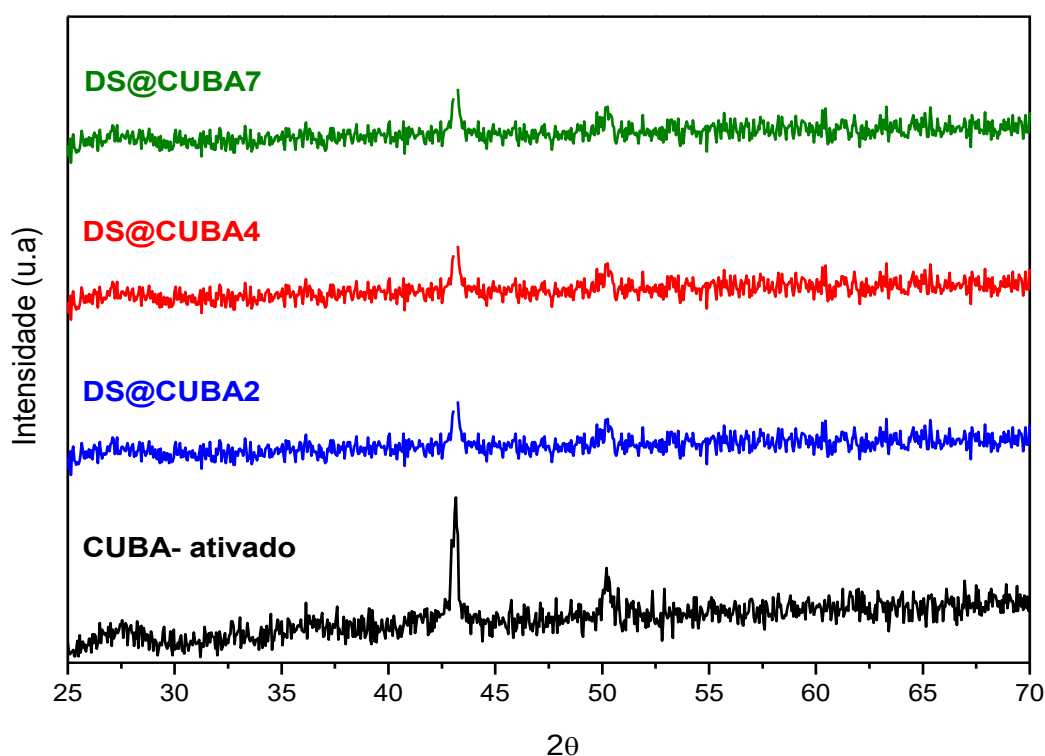
4.3.1 Ensaio de encapsulamento do fármaco Diclofenaco de Sódio

Em função das características porosas do **CUBA-ativado** (poros superficiais) e do **BioMOF-Cu-ativado** (microporos), os mesmos foram submetidos a ensaio de encapsulação do fármaco diclofenaco de sódio, que possui um comprimento máximo de 10,841 Å (1,0841 nm)⁷³ possibilitando então a entrada deste fármaco nos poros de ambos os materiais obtidos neste trabalho.

❖ CUBA

A **Figura 25** ilustra os difratogramas de raios-X de pó do **CUBA-ativado**, bem como dos pellets obtidos após 2, 4 e 7 dias de contato com o fármaco (**DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**). Com base nos resultados obtidos por essa técnica, podemos inferir que após o encapsulamento, independentemente do tempo de contato, o padrão de difração do **CUBA-ativado** manteve-se inalterado, indicando que o processo de encapsulação não alterou a estrutura do material.

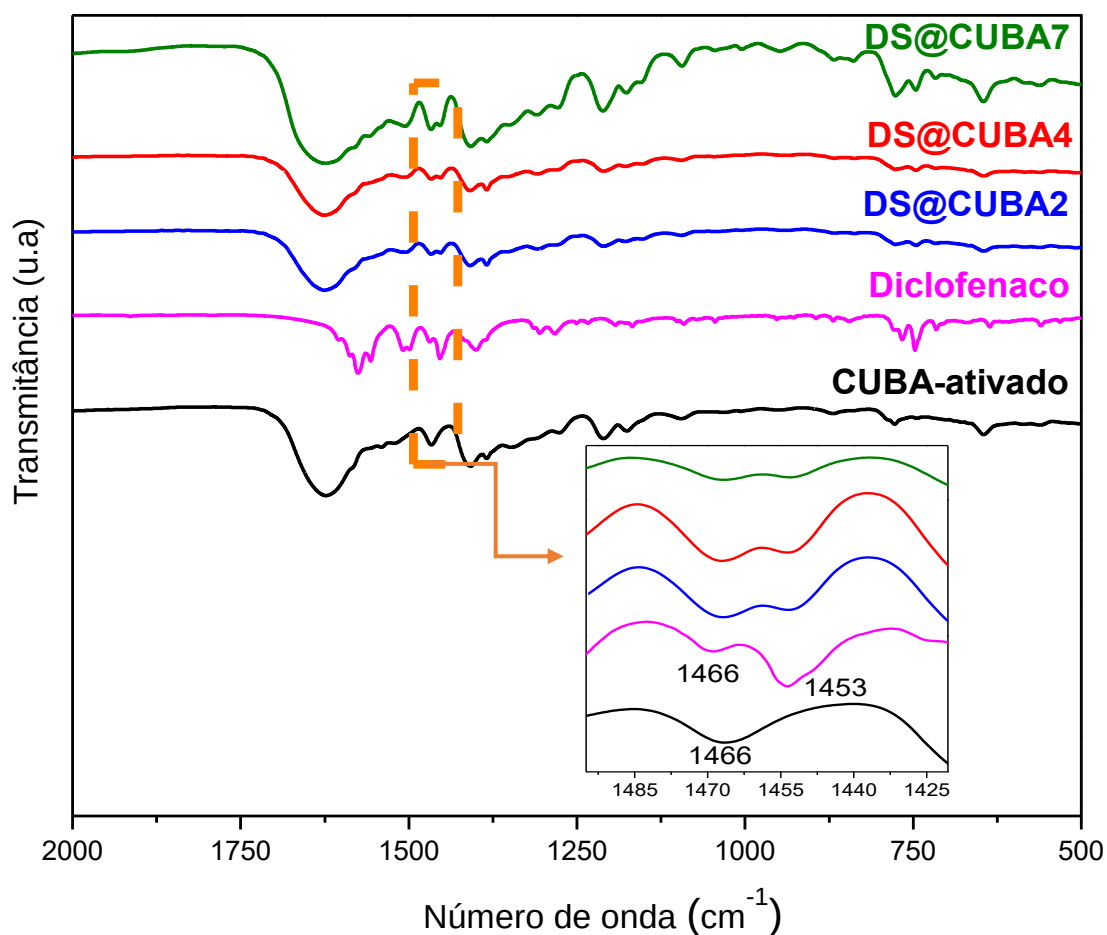
Figura 25 - Padrão de difração de raios-X de pó para o **CUBA-ativado**, **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**.



Fonte: Autor

A **Figura 26** mostra um estudo comparativo entre os espectros no infravermelho das amostras **DS@CUBA7**, **DS@CUBA4**, **DS@CUBA2**, diclofenaco livre e **CUBA-ativado**. Como destacado na figura, a presença do fármaco na matriz pode ser observada pelo aparecimento da banda em 1453 cm^{-1} referente à deformação angular $\delta(\text{CH}_2)^{74}$ do diclofenaco de sódio.

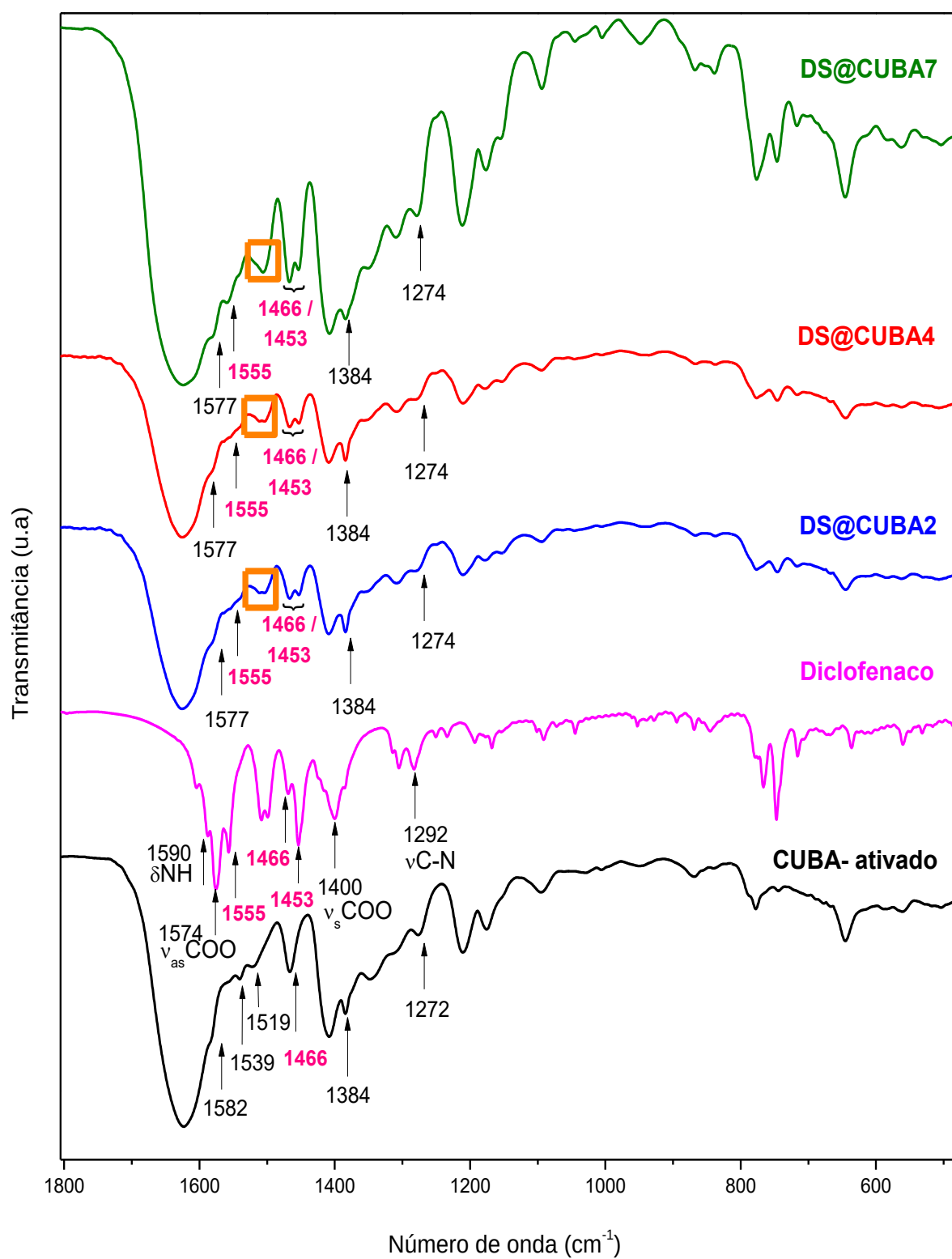
Figura 26 - Espectros no infravermelho do diclofenaco de sódio livre, **CUBA-ativado**, **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**.



Fonte: Autor

Outro ponto relevante deste estudo é analisar se houve a interação do fármaco com a matriz de cobre; com base nisso, foram analisados os espectros na região do infravermelho do diclofenaco de sódio livre, do **CUBA-ativado**, **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**, (ver **Figura 27**), com o intuito de verificar os possíveis deslocamentos das bandas associadas aos modos dos grupos coordenantes NH e COO (sítios de coordenação em potencial) do fármaco quando associados à matriz.

Figura 27 - Espectros no infravermelho do diclofenaco de sódio livre, **CUBA-ativado**, **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**.



Fonte: Autor

As principais observações obtidas a partir da comparação entre os espectros vibracionais^{74,75} da **Figura 27** são: a) não é possível verificar os deslocamentos das bandas associadas aos modos dos grupos coordenantes do fármaco associado à matriz, uma vez que há bandas características do ligante adenina e dos íons acetato nestas regiões; b) aparecimento das bandas em 1453 cm^{-1} (deformação angular $\delta(\text{CH}_2)$) e 1555 cm^{-1} (estiramento do anel) do diclofenaco livre nos compostos **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**; c) aparecimento da banda em 1505 cm^{-1} nos espectros do **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7** (mostrado no retângulo em laranja) pode estar associada a formação de ligações de hidrogênio entre a adenina do cluster e o diclofenaco,⁷⁶ uma vez que a literatura atribui esta banda à ligações de hidrogênio da adenina com a água.

A curva TG do **CUBA-ativado** mostrada na **Figura 12** evidenciou que a saída das moléculas de solvente ocorre até 255°C. A **Figura 28** apresenta as curvas TG e DTA dos compostos **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**, com base nos termogramas dos compostos obtidos, podemos sugerir as seguintes atribuições: Na curva do composto **DS@CUBA2** a perda de 11,70% em massa observada a partir da temperatura ambiente até 231 °C pode ser atribuída à saída de moléculas de solvente, sendo eles, água, DMF e cátions dimetilamônio oriundos da decomposição térmica do DMF em condições solvotérmicas. A segunda perda de massa de 36,57% entre 231–450 °C pode estar relacionada a eliminação da matéria orgânica contida no material, sendo acompanhada por dois picos exotérmicos em 273 e 333 °C.

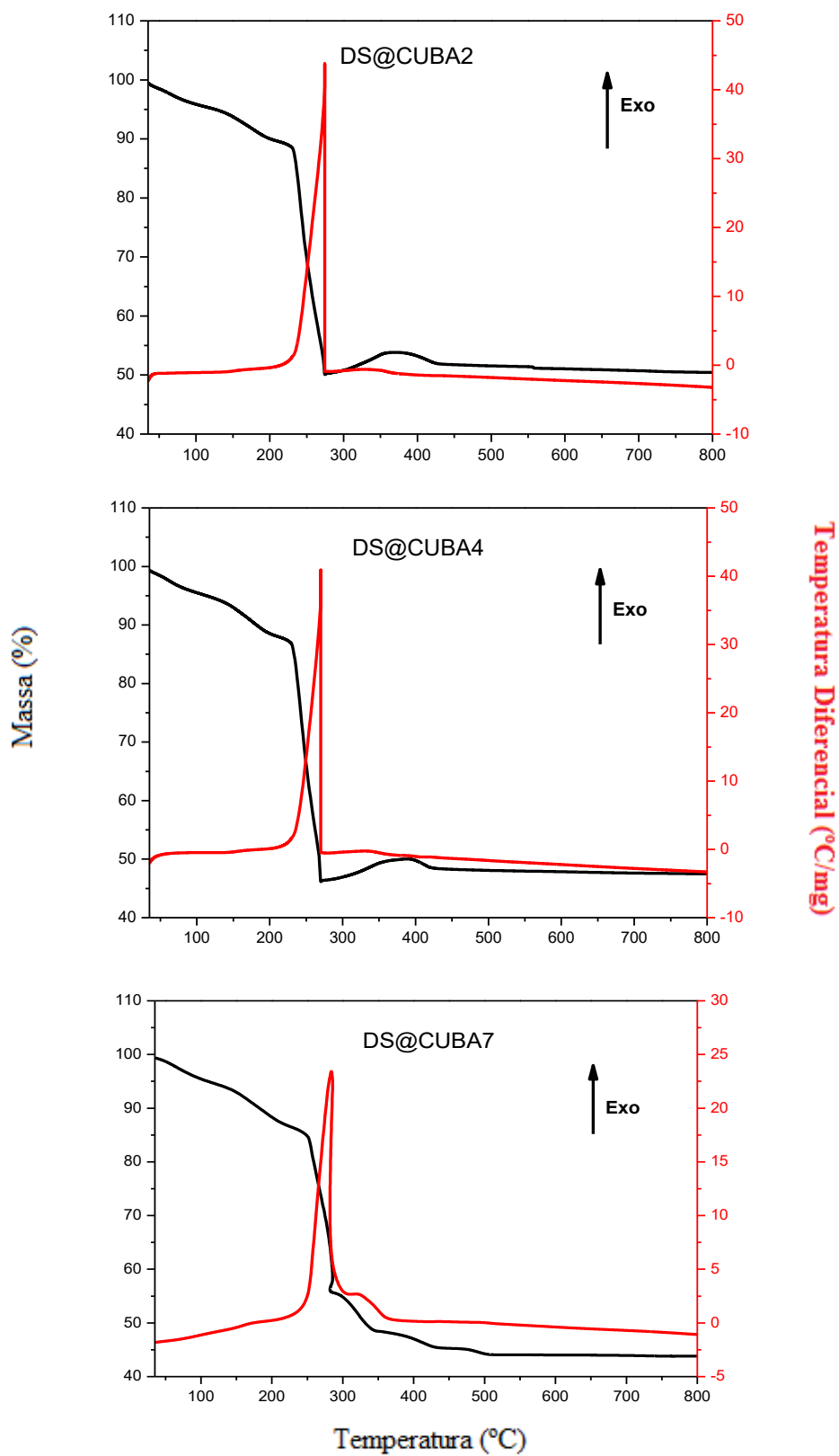
No composto **DS@CUBA4** a primeira perda de massa de 13,35 % entre a temperatura ambiente e 230 °C pode ser atribuída à saída de moléculas de solvente (H_2O e DMF). A segunda perda de massa entre 230–450°C pode estar relacionada a eliminação da matéria orgânica, cuja perda de massa foi de 38,40% sendo acompanhada por dois eventos exotérmicos em 271 e 332 °C. Vale ressaltar que em ambos os termogramas (**DS@CUBA2** e **DS@CUBA4**) há um aumento de massa entre as temperaturas 303–425°C provavelmente associado à oxidação do resíduo metálico formado após a queima da matéria orgânica.

DS@CUBA7 a primeira perda de massa de 13,98% entre a temperatura ambiente e 249°C pode ser atribuída à saída de moléculas de solvente (H_2O e DMF). A segunda perda entre 249–520°C pode estar relacionada a eliminação da matéria orgânica, cuja perda de massa foi de 41,90 % sendo acompanhada por dois picos exotérmicos em 283 e 332 °C.

Quando se compara os três termogramas percebe-se que no termograma do composto **DS@CUBA7** as perdas de massa estão melhor definidas, isso se deve muito provavelmente ao fato de o material com tempo de contato de 7 dias ter apresentado uma maior taxa de

incorporação do fármaco diclofenaco de sódio, tornando as perdas de massa mais evidentes. Além disso, percebe-se um aumento da perda de massa referente a eliminação da matéria orgânica quando se compara os compostos encapsulados com o **CUBA-ativado**, sendo que este aumento pode estar relacionado a incorporação do fármaco a matriz.

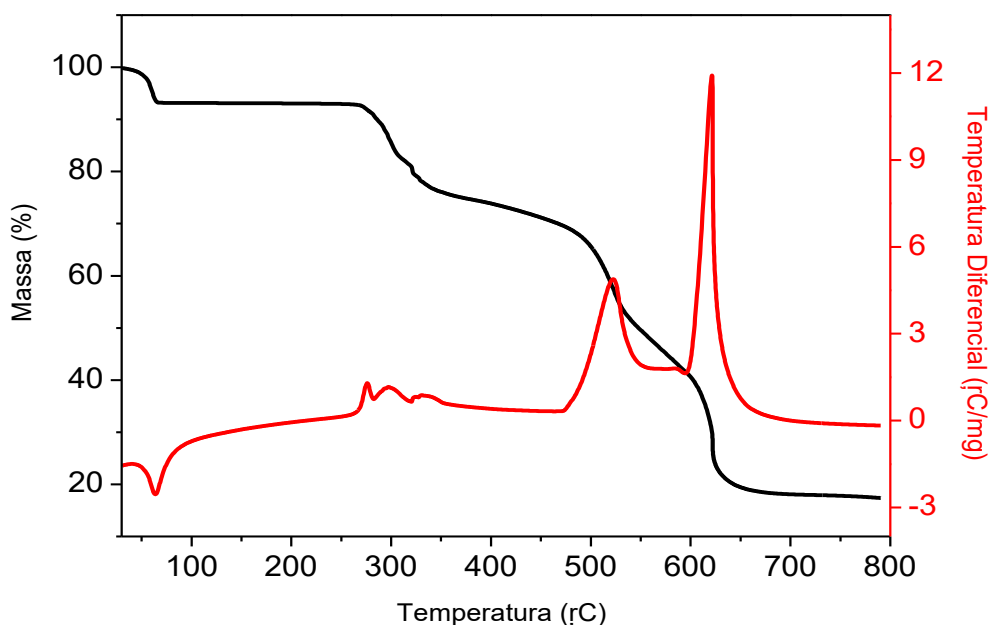
Figura 28 - Curvas TG e DTA dos compostos **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**.



Fonte: Autor

Como mostrado na **Figura 29**, a decomposição térmica do diclofenaco de sódio ocorre em 270 °C acompanhada por processo exotérmico em 275 °C. A decomposição do diclofenaco livre ocorre em temperatura maior do que quando adsorvido, provavelmente em função do fato de as forças intermoleculares serem mais fortes quando o fármaco está em seu estado sólido livre do que quando adsorvido sob sua forma aniônica em uma matriz com poros como a do **CUBA-ativado**.

Figura 29 - Curvas TG e DTA do diclofenaco de sódio.



Fonte: Autor

A **Tabela 11** resume os dados obtidos nas curvas TG e DTA para os compostos **CUBA-ativado**, **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**.

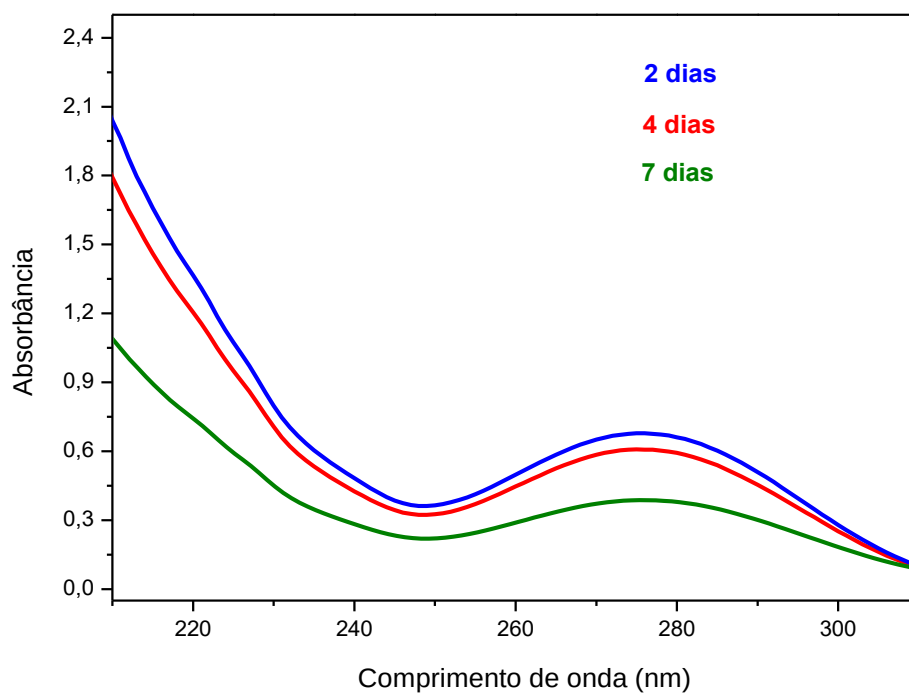
Tabela 11 – Dados referentes à análise térmica dos compostos **CUBA-ativado**, **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**.

Composto	Atribuição	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)	Picos Exotérmicos (°C)
CUBA-ativado	Solventes	T _{amb.} – 255	10,01	—
	Eliminação matéria orgânica	255 – 352	30,72	278, 316 e 360
	Resíduo	352 – 800	59,27	—
DS@CUBA2	Solventes	T _{amb.} – 231	11,70	—
	Eliminação matéria orgânica	231 – 450	36,57	273 e 333
	Resíduo	450 – 800	51,73	—
DS@CUBA4	Solventes	T _{amb.} – 230	13,35	—
	Eliminação matéria orgânica	230 – 450	38,40	271 e 332
	Resíduo	425 – 800	48,25	—
DS@CUBA7	Solventes	T _{amb.} – 249	13,16	—
	Eliminação matéria orgânica	249 – 520	41,90	283 e 332
	Resíduo	520 – 800	44,94	—

Fonte: Autor

A **Figura 30** mostra os espectros de absorção no UV da solução sobrenadante após 2, 4 e 7 dias de incorporação do diclofenaco no **CUBA-ativado**. É possível observar que a característica espectral do diclofenaco foi mantida em ambos os ensaios, evidenciando que a interação com o material obtido não degrada a estrutura química do fármaco. A absorbância medida em 275 nm, que corresponde ao máximo de absorção do diclofenaco, foi de 0,68; 0,61 e 0,37 para 2, 4 e 7 dias, respectivamente.

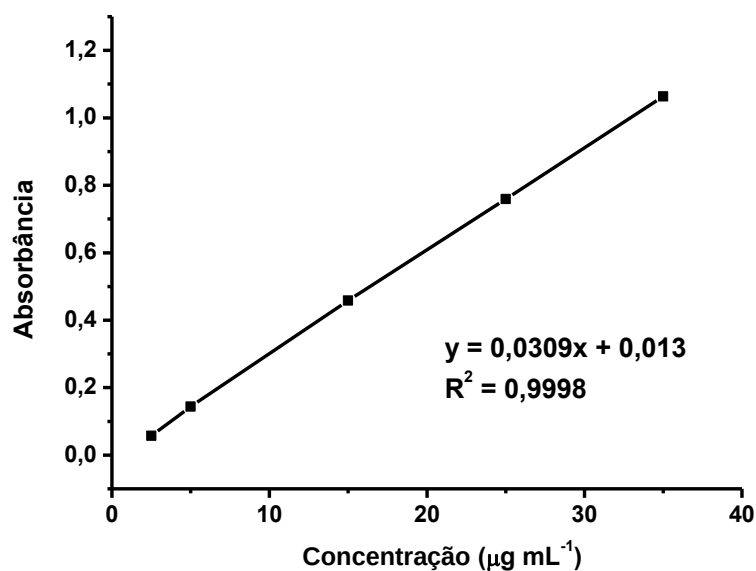
Figura 30 - Espectro de absorção eletrônica no ultravioleta do **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**.



Fonte: Autor

A partir desses valores de absorção e com a equação da reta mostrada na curva de calibração apresentada na **Figura 31**, foi possível determinar a concentração do diclofenaco no sobrenadante (e indiretamente a quantidade de fármaco adsorvido no material).

Figura 31 - Curva de calibração do diclofenaco em solução aquosa.



Fonte: Autor

Substituindo o valor de y pela absorbância medida (as amostras foram lidas em triplicata) e considerando o fator de diluição igual a 150, as concentrações de diclofenaco no sobrenadante, após tempos de contato matriz/fármaco iguais a 2, 4 e 7 dias, são 3,3583 mg/mL; 3,0123 mg/mL e 1,8706 mg/mL, respectivamente. Como a concentração inicial do diclofenaco era de 4,761 mg/mL, significa que as concentrações finais do sobrenadante após 2, 4 e 7 dias de contato correspondem a 70,53%; 63,26% e 39,28% respectivamente, da concentração inicial. Desta forma, a quantidade de fármaco incorporado por material foi de 29,47% para o **DS@CUBA2**, 36,74% para **DS@CUBA4** e 60,72% para o **DS@CUBA7**.

A **Tabela 12** resume os dados do ensaio de encapsulação realizados neste trabalho para o composto **CUBA**.

Tabela 12 – Resumo dos dados do ensaio de encapsulação do diclofenaco após 2, 4 e 7 dias de experimento.

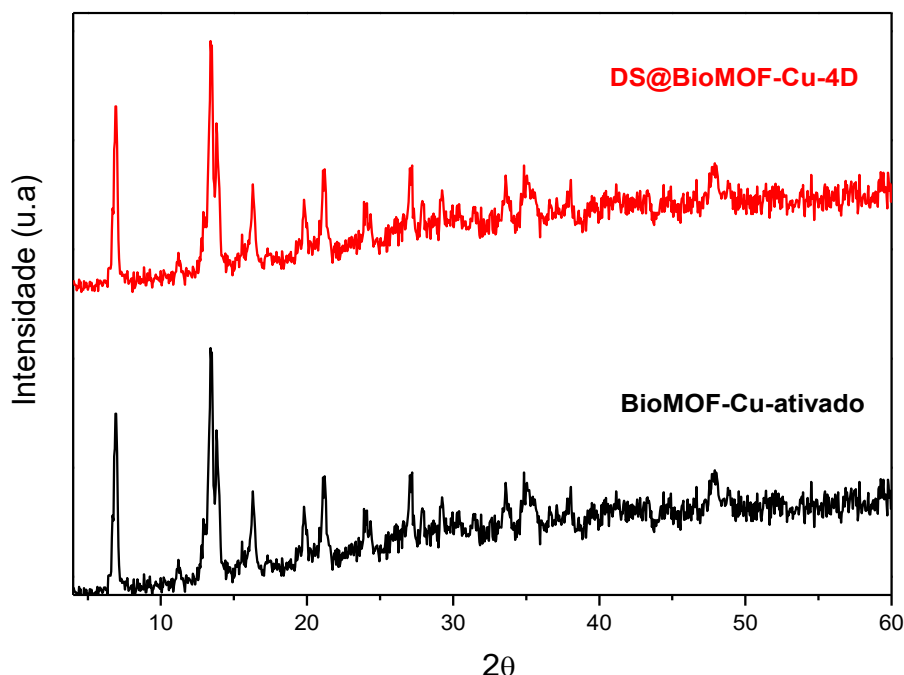
Tempo de Incorporação	% de Encapsulamento	Razão diclofenaco:Composto (g.g ⁻¹)
DS@CUBA2	29,47	0,99
DS@CUBA4	36,74	1,22
DS@CUBA7	60,72	2,00

Fonte: Autor

❖ **BioMOF-Cu**

A **Figura 32** ilustra os difratogramas de raios-X de pó do **BioMOF-Cu-ativado**, bem como do pellet obtido após 4 dias de contato com o fármaco (**BioMOF-Cu-4D**). Com base nos resultados obtidos por essa técnica, podemos inferir que após o encapsulamento, o padrão de difração do **BioMOF-Cu-ativado** manteve-se inalterado, indicando que o processo de encapsulação não alterou a estrutura do material.

Figura 32 - Padrão de difração de raios-X de pó para o **BioMOF-Cu-ativado** e **BioMOF-Cu-4D**.

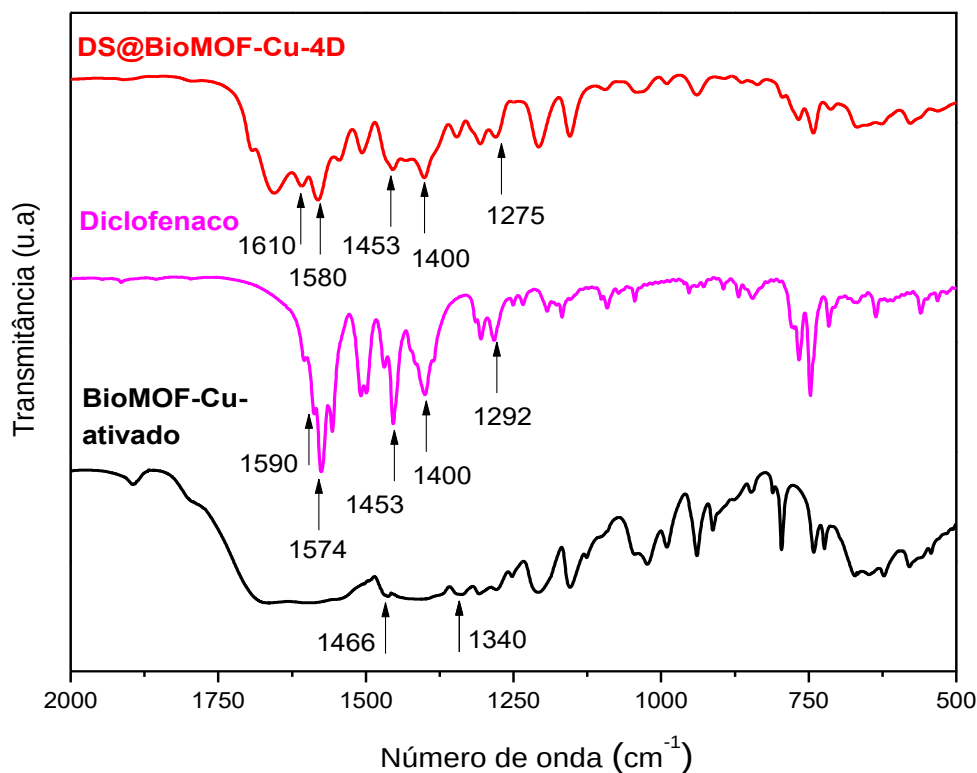


Fonte: Autor

A **Figura 33** mostra um estudo comparativo entre os espectros no infravermelho do **DS@BioMOF-Cu-4D**, diclofenaco livre e **BioMOF-Cu-ativado**. Como destacado na figura, a presença do fármaco na matriz pode ser observada pelo aparecimento das bandas em 1453 e 1400 cm^{-1} referente à deformação angular $\delta(\text{CH}_2)$ e ao estiramento simétrico da carbonila $\nu_s(\text{COO}^-)$ do diclofenaco de sódio livre, respectivamente. Além disso houve o deslocamento de algumas bandas quando se compara o espectro do fármaco livre com o **DS@BioMOF-Cu-4D**.

As bandas do diclofenaco livre que se deslocaram quando incorporadas à matriz porosa (**DS@BioMOF-Cu-4D**) foram: a) estiramento carbono-nitrogênio $\nu(\text{C-N})$ que deslocou de 1292 cm^{-1} para 1275 cm^{-1} ; b) estiramento assimétrico da carbonila $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ que deslocou de 1574 cm^{-1} para 1580 cm^{-1} e por fim a banda referente a deformação angular $\delta(\text{NH})$, que deslocou de 1590 cm^{-1} para 1610 cm^{-1} , indicando portanto a coordenação do fármaco à matriz porosa.

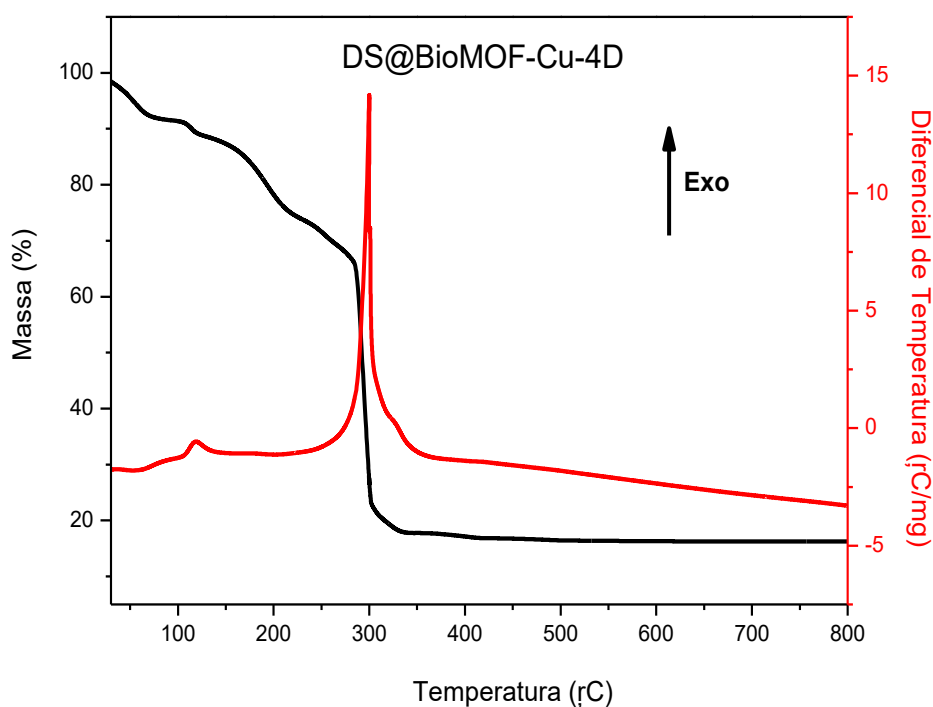
Figura 33 - Espectros no infravermelho do diclofenaco de sódio livre, **BioMOF-Cu-ativado** e **DS@BioMOF-Cu-4D**.



Fonte: Autor

A **Figura 34** apresenta as curvas TG e DTA do composto após ensaio de encapsulação do fármaco diclofenaco, com tempo de contato de 4 dias (**DS@BioMOF-Cu-4D**). A primeira perda de massa entre a temperatura ambiente e 67 °C pode ser atribuída à saída das moléculas de água contidas nos poros do material. A segunda perda de massa, correspondente a 79,15%, entre 70–340 °C pode ser referente à eliminação da matéria orgânica contida no material, sendo acompanhada por dois picos exotérmicos em 118 e 300 °C. Quando compara este termograma com o do **BioMOF-Cu-ativado**, percebe-se que houve um aumento na perda de massa referente a eliminação da matéria orgânica, este aumento pode estar relacionado a presença do fármaco a matriz porosa.

Figura 34 - Curvas TG e DTA do composto **DS@BioMOF-Cu-4D**.



Fonte: Autor

Como já foi mostrado na **Figura 29**, a decomposição térmica do diclofenaco de sódio livre inicia em 270 °C acompanhada por um processo exotérmico em 275 °C. A decomposição do diclofenaco livre ocorre em temperatura maior do que quando adsorvido, provavelmente em função do fato de as forças intermoleculares serem mais fortes quando o fármaco está em seu estado sólido livre do que quando adsorvido sob sua forma aniônica em uma matriz porosa como a do **BioMOF-Cu-ativado**.

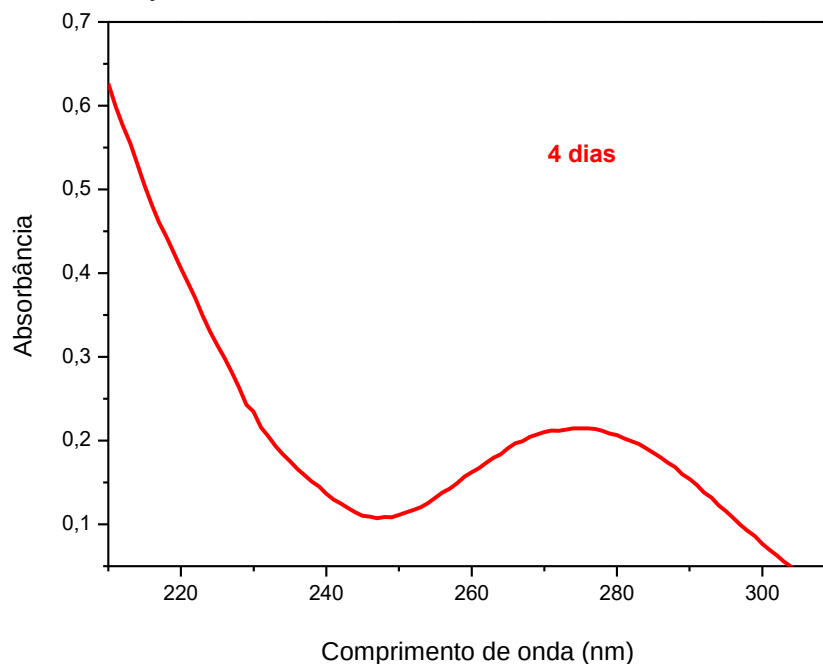
A **Tabela 13** resume os dados obtidos nas curvas TG e DTA para os compostos **BioMOF-Cu-ativado** e **DS@BioMOF-Cu-4D**.

Tabela 13 – Dados referentes à análise térmica dos compostos **BioMOF-Cu-ativado** e **DS@BioMOF-Cu-4D**.

Composto	Atribuição	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)	Picos Exotérmicos (°C)
BioMOF-Cu-ativado	Água	T _{amb.} – 63	2,46	—
	Eliminação matéria orgânica	63 – 349	77,93	356 e 376
	Resíduo	375 – 800	19,61	—
DS@BioMOF-Cu-4D	Água	T _{amb.} – 67	4,09	—
	Eliminação matéria orgânica	67 – 340	79,15	118 e 300
	Resíduo	340 – 800	16,76	—

Fonte: Autor

A **Figura 35** mostra o espectro de absorção no UV da solução sobrenadante resultante após 4 dias de contato entre o material poroso ativado e o fármaco. É possível observar que a característica espectral do diclofenaco foi mantida após o ensaio, evidenciando que a interação com o material poroso não degrada a estrutura química do fármaco. A absorbância medida em 275 nm, o máximo de absorção da banda do diclofenaco, foi de 0,21.

Figura 35 - Espectro de absorção eletrônica no ultravioleta do **DS@BioMOF-Cu-4D**.

Fonte: Autor

A partir desse valor de absorção e com a equação da reta mostrada na curva de calibração apresentada na **Figura 31**, foi possível determinar a concentração do diclofenaco no sobrenadante (e indiretamente a quantidade de fármaco adsorvido no material).

Substituindo o valor de y pela absorbância medida (a amostra foi lida em triplicata) e considerando o fator de diluição igual a 100, a concentração de diclofenaco no sobrenadante, após tempo de contato matriz/fármaco igual a 4 dias, foi 0,729 mg/mL. Como a concentração inicial do diclofenaco era de 4,761 mg/mL, significa que a concentração final do sobrenadante após 4 dias de contato corresponde a 15,32% da concentração inicial. Desta forma, a quantidade de fármaco incorporado pelo material **DS@BioMOF-Cu-4D** foi 84,68%.

A **Tabela 14** resume os dados do ensaio de encapsulação para ambos os compostos obtidos neste trabalho (**CUBA** e **BioMOF-Cu**).

Tabela 14 – Resumos dos dados do ensaio de encapsulação do diclofenaco para os compostos **CUBA** e **BioMOF-Cu**.

Tempo de Incorporação	% de Encapsulamento	Razão diclofenaco:Composto (g.g ⁻¹)
DS@CUBA2	29,47	0,99
DS@CUBA4	36,74	1,22
DS@CUBA7	60,72	2,00
BioMOF-Cu-4D	84,68	2,82

Fonte: Autor

O fármaco diclofenaco vem sendo utilizado em sistemas de *drug delivery* que utilizam diversas matrizes como hospedeiros. Exemplos vão desde nanopartículas à base de amido até os surfactantes não-aniônicos SPAN® 60 e TWEEN® 60. A **Tabela 15** traz alguns resultados de estudos de encapsulamento do diclofenaco, bem como a matriz hospedeira utilizada e a quantidade de fármaco encapsulado (razão fármaco/hospedeiro).

Tabela 15 - Dados referentes ao encapsulamento do diclofenaco em diferentes matrizes.

Hospedeiro	Razão Fármaco/Matriz (g.g-1)	Referência
Nanopartícula de amido	0,0182	77
SPAN® 60 (Estereatosorbitano)	0,073	78
TWEEN® 60 (Monoestereatosorbitano polietileno glicol)	0,020	78
MOF MIL-53(Fe)	0,632	79
MOF ZJU-800	0,588	80

Fonte: Autor

Apesar de eficientes no encapsulamento do diclofenaco, pois este fármaco possui caráter anfifílico, podendo interagir com porções hidrofóbicas e hidrofílicas da matriz,⁷⁶ estes hospedeiros apresentam uma eficiência bem menor no encapsulamento de diclofenaco quando comparado aos resultados obtidos neste trabalho, sendo que apesar do **CUBA** não ser um MOF, seus poros de superfície conseguem adsorver quantidades de fármaco comparáveis à dos MOFs.

De fato, nos últimos anos, os MOFs têm sido capazes de encapsular diversos fármacos em sua estrutura porosa e entregá-los de forma eficiente às células em sistemas *in vitro*. Exemplos são os trabalhos de Horcajada et al. (2009) que relataram o encapsulamento de diferentes agentes anticâncer dentro de MOFs;⁸¹ McKinlay et al. (2008) que incorporaram e verificaram a liberação do agente vasodilatador óxido nítrico (NO)⁸² e He et al. (2014) usando MOF como matriz para incorporação da molécula antitumoral *cis-platina*, assim como o agente de reconhecimento siRNA, com o objetivo de aprimorar as atividades terapêuticas.⁸³

Algumas das principais vantagens dos MOFs como agentes para *drug delivery* - quando comparados com sistemas orgânicos como lipossomas, micelas e surfactantes ou inorgânicos como zeólitas e sílicas mesoporosas - são sua alta capacidade de carga, possibilidade de funcionalização pós-síntese e uso de ligantes que podem aumentar a afinidade entre o fármaco e as células alvo.

Ainda em relação à capacidade de carregamento de fármacos, foi realizado muito recentemente estudos computacionais mostrando que MOFs podem encapsular até 2 g de fármaco por grama de material poroso, uma capacidade, como corrobora nosso trabalho, muito maior que o potencial encontrado em outras matrizes orgânicas e sílicas mesoporosas que apresentam capacidade tipicamente de 0,3 mg.g⁻¹.^{84,85}

Porém vale evidenciar que o **DS@BioMOF-Cu** conseguiu incorporar uma razão de diclofenaco por grama de material maior que 2 g. Além disso quando comparado com os MOFs

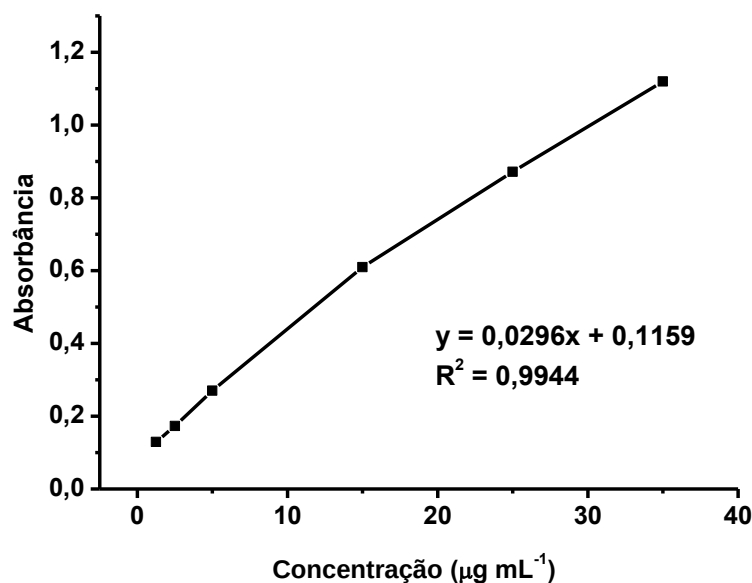
MIL-53 (Fe) e **ZJU-800** percebe-se que a taxa de encapsulação para o **BioMOF-Cu** está muito acima dos demais MOFs citados acima, uma vez que a razão de incorporação de diclofenaco por grama desses materiais fica em torno de 0,6 g.

Um fator que deve ser levado em consideração e que foram utilizadas metodologias diferentes para quantificação da quantidade de diclofenaco encapsulado nos materiais, o que pode ter ocasionado em um resultado super estimado para o **DS@BioMOF-Cu-4D** uma vez que a metodologia utilizada era mais factível a erros, por não ser mecanizada como realizado nos MOFs **MIL-53 (Fe)** e **ZJU-800**.

4.3.2 Ensaio de liberação do fármaco Diclofenaco de Sódio

Devido à forte afinidade do **CUBA** e do **BioMOF-Cu** pelas moléculas de diclofenaco, avaliou-se o potencial de liberação deste fármaco encapsulado nos materiais obtidos em tampão fosfato (*Phosphate Buffered Saline* – PBS) em pH 7,4. Para determinação da concentração de diclofenaco que foi liberada foi construída uma curva de calibração, como mostrado na **Figura 36**.

Figura 36 - Curva de calibração do diclofenaco em tampão fosfato.

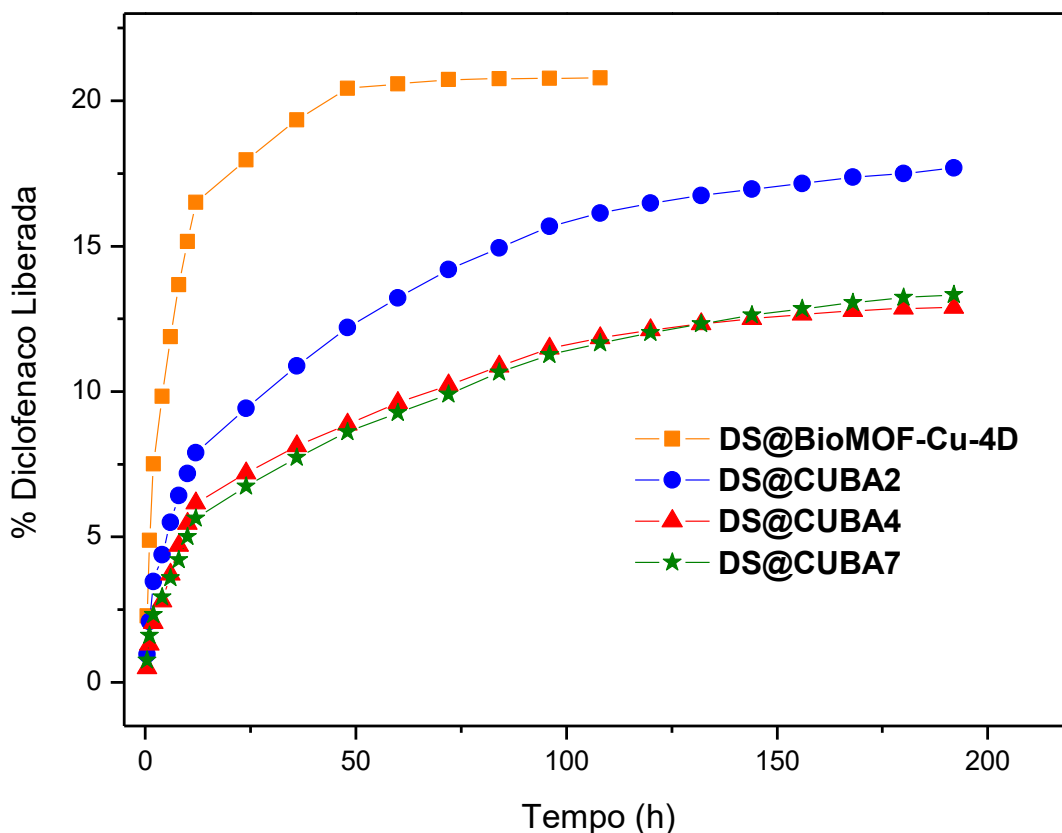


Fonte: Autor

Substituindo o valor de y pela absorbância medida nos diferentes intervalos de tempo, foi possível determinar a concentração de diclofenaco de sódio presente no sobrenadante coletado em 2, 4 e 7 dias para o **CUBA** e 4 dias para o **BioMOF-Cu** e então calcular a

porcentagem de fármaco liberado, como mostrado na **Figura 37**. Vale ressaltar que as medidas foram realizadas em triplicata.

Figura 37 - Perfil de liberação do fármaco no **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4**, **DS@CUBA7** e **BioMOF-Cu-4D**.



Fonte: Autor

A partir da **Figura 37** observa-se que para os compostos do **CUBA** a liberação do fármaco manteve-se crescente até aproximadamente 84 horas de ensaio, devido provavelmente as moléculas fisicamente adsorvidas na estrutura porosa do material, sendo que a liberação máxima do diclofenaco foi próxima a 18%, 13% e 13% para os materiais **DS@CUBA2**, **DS@CUBA4** e **DS@CUBA7**, respectivamente, depois de 192 h de experimento. Já para o **BioMOF-Cu-4D** a liberação manteve-se crescente até 36 horas de ensaio e a taxa de liberação do fármaco foi de aproximadamente 21%, após 108 horas de experimento.

O fato de obtermos uma baixa taxa de liberação para todos os compostos obtidos pode estar relacionada com a coordenação do fármaco as matrizes. Pois como mostrado na **Figura 33** houve a coordenação do diclofenaco ao **BioMOF-Cu-ativado** e acredita-se que o mesmo tenha ocorrido com o **CUBA-ativado**, porém não foi possível verificar os deslocamentos das

bandas associadas aos modos dos grupos coordenantes (comprovando a coordenação) do fármaco associado à esta matriz, devido a presença de bandas características do ligante adenina e dos íons acetato na mesma região.

Outra explicação pode estar relacionada ao fato de que o fármaco sai muito lentamente da estrutura porosa impossibilitando observar a variação da sua concentração pois esta ocorre a valores muito baixos não sendo possível detectá-los por espectroscopia de absorção eletrônica no UV.

4.3.3 Ensaios de citotoxicidade

Os valores de IC_{50} obtidos para toda a série de compostos investigados nesse trabalho, incluindo os ligantes e fármacos livres, frente à linhagem MRC-5 (ATCC-CCL-171) estão sumarizados na **Tabela 16**.

Tabela 16 - Resultados da citotoxicidade (IC_{50}) sobre a linhagem celular MRC-5 dos ligantes livres, diclofenaco de sódio e compostos de Cu(II) em THF.

Composto	IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Adenina	> 100
CUBA	> 100
Diclofenaco de sódio	> 100
DS@CUBA2	> 100
DS@CUBA4	> 100
DS@CUBA7	> 100
BioMOF-Cu	> 100
BioMOF-Cu-4D	> 100
Doxorrubicina	1,90

Fonte: Autor

Ao analisar os resultados de citotoxicidade frente à linhagem celular MRC-5 (fibroblasto pulmonar), foi observado o mesmo valor de IC_{50} para todas as amostras analisadas (ligantes livres, diclofenaco de sódio e compostos de cobre(II)). Valores de IC_{50} superiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ revelam que os compostos não apresentaram toxicidade frente a essa linhagem celular. Importante destacar que para a realização do ensaio, utilizou-se o fármaco padrão doxorrubicina como controle positivo e obteve-se o valor de $1,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o IC_{50} , mostrando que este composto é altamente tóxico para essa linhagem celular e como controle positivo valida o teste.⁸⁶

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho utilizou-se duas metodologias de sínteses diferentes, a solvotérmica e a mecanoquímica, obtendo dois compostos diferentes de íons Cu (II), sendo um deles inédito (o cluster **CUBA**). Na síntese solvotérmica, foram utilizados dois ligantes diferentes, um N-doador (adenina) e o ácido 4,4'-bifenildicarboxilato (O-doador), e através dela foi possível obter um material de coloração cinza esverdeado, denominado **CUBA**, no qual há indícios de coordenação apenas do ligante biológico. Através das técnicas utilizadas para caracterizar o material obtido, sugere-se que tenha se formado um cluster heptanuclear (provavelmente uma unidade de construção secundária, SBU), uma vez que a isoterma de fisissorção de N₂ não caracteriza material poroso e há uma grande quantidade de metal presente no composto. Em contrapartida, o composto obtido apresenta poros de superfície em escala mesoporosa, o que culminou na sua aplicação em ensaios de *drug delivery*.

Em uma segunda etapa do trabalho e com a utilização da síntese mecanoquímica, obteve-se um BioMOF de cor verde escuro (**BioMOF-Cu**) contendo Cu(II) e adenina, já reportado na literatura. Este material possui características microporosas e elevada área superficial (505 m² g⁻¹).

Com base nas características de ambos os materiais obtidos, realizou-se experimentos de *drug delivery*. Tanto o **CUBA** quanto o **BioMOF-Cu** apresentaram resultados bastante satisfatórios no que diz respeito à encapsulação do fármaco diclofenaco de sódio, 60,7% e 84,7%, respectivamente. Porém, quando estes materiais foram submetidos aos ensaios de liberação, percebeu-se uma baixa taxa de liberação do agente terapêutico, indicando nos dois casos a coordenação do fármaco na matriz (como evidenciado nos experimentos de espectroscopia vibracional). Vale ressaltar que apesar da baixa taxa de liberação, o fármaco possuiu uma liberação sustentada quando utilizado nessas matrizes apresentando uma grande potencialidade para a aplicação em sistemas de liberação controlada.

Além disso, esses materiais não se mostraram tóxicos frente a linhagem celular MRC-5, atingindo, portanto, o objetivo inicial do trabalho que era desenvolver compostos que fossem ambiental- e biologicamente biocompatíveis na tentativa de diminuir a toxicidade dos mesmos, para sistemas de liberação controlada de fármacos.

6 PERSPECTIVAS

- Realização de estudos in situ das cinéticas de adsorção e liberação do fármaco, usando espectroscopia no UV-Vis;
- Proposição da composição estequiométrica dos materiais encapsulados;
- Obtenção do **CUBA** e **BioMOF-Cu** em escala nanométrica;
- Realização de estudos de *drug delivery in vivo*.
- Tentativa de obtenção de MOF de cobre(II) utilizando o diclofenaco como espaçador orgânico;

REFERÊNCIAS

- 1 BATTEN, S. R. et al. Terminology of metal-organic frameworks and coordination polymers (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 1715-1724, 2013.
- 2 DENG, H. et al. Multiple functional groups of varying ratios in metal-organic frameworks. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 848-850, 2010.
- 3 DEY, C. et al. Crystalline metal-organic frameworks (MOFs): synthesis, structure and function. **Acta Crystallographica Section B**, v. 70, p. 3-10, 2014.
- 4 PERRY, J. J. IV; PERMAN, J. A.; ZAWOROTKO, M. J. Design and synthesis of metal-organic frameworks using metal organic polyhedra as supermolecular building blocks. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 1400-1417, 2009.
- 5 YAGHI, O. M. et al. Synthetic strategies, structure patterns, and emerging properties in the chemistry of modular porous solids. **Accounts of Chemical Research**, v. 31, n. 8, p. 474-484, 1998.
- 6 ROSI, N. L. et al. Hydrogen storage in microporous metal-organic frameworks. **Science**, v. 300, n. 5622, p. 1127-1129, 2003.
- 7 HATHAWAY, B. J. **Comprehensive coordination chemistry**: the synthesis, reaction, properties and applications of coordination compounds. Oxford: Pergamon Press, 1987. v. 5, 634 p.
- 8 WAPNIR, R. Copper absorption and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 5, p. S1054-S1060, 1998.
- 9 LINDER, M. C. et al. Copper transport. **American Journal of Clinical**, v. 67, n. 5, p. S965-S971, 1998.
- 10 SORENSON, J. Jr. Copper complexes offer a physiological approach to treatment of chronic diseases. **Progress in Medical Chemistry**, v. 26, p. 437-568, 1989.
- 11 WEDER, J. E. et al. Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, p. 95-126, 2002.
- 12 SILVA, P. B. **Síntese, caracterização e investigação das atividades biológicas de complexos de cobre (II) contendo moléculas bioativas e ligantes nitrogenados**. 2012. 217 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- 13 DIMIZA, F. et al. Non-steroidal antiinflammatory drug-copper (II) complexes: structure and biological perspectives. **Dalton Transactions**, v. 40, p. 8555-8568, 2011.
- 14 TRINCHERO, A. et al. Spectroscopic behavior of copper complexes of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Biopolymers**, v. 74, p. 120-124, 2004.

- 15 LIU, J. Q. et al. A combined experimental and computational study of novel nanocage-based metal–organic frameworks for drug delivery. **Dalton Transactions**, v. 44, p. 19370-19382, 2015.
- 16 LIU, J. Q. et al. Two isorecticular metal–organic frameworks with CdSO₄-like topology: selective gas sorption and drug delivery. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 17265-17273, 2014.
- 17 BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015.
- 18 JOSHI, D. et al. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p. 363-377, 2016.
- 19 OGAWA, C. A.; PLEPIS, A. M. Liberação in vitro de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita:colágeno. **Polímeros**, v. 12, n. 2, p. 115-122, 2002.
- 20 ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 104-120, 2013.
- 21 ITOKAZU, M. et al. Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 39, n. 4, p. 536-538, 1998.
- 22 DIARRA, M. et al. Elaboration and evaluation of an intraoral controlled release delivering system. **Biomaterials**, v. 19, n. 16, p. 1523-1527, 1998.
- 23 VERMA, R. K. G.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. **Pharmaceutical Technology**, v. 25, n. 2, p. 1-14, 2001.
- 24 LU, W. et al. Tuning the structure and function of metal-organic frameworks via linker design. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 16, p. 5561-5593, 2014.
- 25 BAG, P. P. et al. Outstanding drug loading capacity by water stable microporous MOF: a potential drug carrier. **Chemical Communications**, v. 52, n. 18, p. 3669-3672, 2016.
- 26 HORCAJADA, P. et al. Flexible porous metal-organic frameworks for a controlled drug delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 21, p. 6774-6780, 2008.
- 27 KANDU, T. et al. Mechanical downsizing of a gadolinium(III)-based metal–organic framework for anticancer drug delivery. **Chemistry – A European Journal**, v. 20, n. 33, p. 10514-10518, 2014.
- 28 RODRIGUEZ-RUIZ, V. et al. Efficient “green” encapsulation of a highly hydrophilic anticancer drug in metal–organic framework nanoparticles. **Journal of Drug Targeting**, v. 23, n. 7/8, p. 759-767, 2015.
- 29 GU, C. et al. Rational synthesis of a porous polyhedral metal-organic framework carrier for controllable drug release. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 71, p. 26-29, 2016.

- 30 ABBASI, A. R. et al. Controlled uptake and release of imatinib from ultrasound nanoparticles $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ metal–organic framework in comparison with bulk structure. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 471, p. 112-117, 2016.
- 31 LIAN-QIANG, W. et al. A porous metal–organic framework with a unique hendecahedron-shaped cage: structure and controlled drug release. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 9, p. 3694-3697, 2016.
- 32 MILLER, R. S. et al. A rare example of a porous Ca-MOF for the controlled release of biologically active NO. **Chemical Communications**, v. 49, n. 71, p. 7773-7775, 2013.
- 33 NAZARI, M. et al. Metal-organic-framework-coated optical fibers as light-triggered drug delivery vehicles. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 19, p. 3244-3249, 2016.
- 34 YANG, Y. et al. A large capacity cationic metal–organic framework nanocarrier for physiological pH responsive drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 2782-2786, 2016.
- 35 TAN, L. L. et al. Ca^{2+} , pH and thermo triple-responsive mechanized Zr-based MOFs for on-command drug release in bone diseases. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, p. 135-140, 2016.
- 36 NAGATA, S.; KOKADO, K.; SADA, K. Metal–organic framework tethering PNIPAM for on–off controlled release in solution. **Chemical Communications**, v. 52, n. 41, p. 8614-8617, 2015.
- 37 ORIVE, G. et al. Drug delivery in biotechnology: present and future. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 659-664, 2003.
- 38 IMAZ, I. et al. Metal-biomolecule frameworks (MBioFs). **Chemical Communications**, v. 47, p. 7287-7302, 2011.
- 39 HORCAJADA, P. et al. Metal-organic frameworks in biomedicine. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 1232-1268, 2012.
- 40 AN, J. et al. Cation-triggered drug release from a porous zinc-adeninate metal-organic framework. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 24, p. 8376-8377, 2009.
- 41 MILLER, S. R. et al. Biodegradable therapeutic MOFs for the delivery of bioactive molecules. **Chemical Communications**, v. 46, n. 25, p. 3634-3640, 2010.
- 42 TAMAMES-TABAR, C. et al. A Zn azelate MOF: combining antibacterial effect. **Crystal Engineering Community**, v. 17, n. 2, p. 456-462, 2015.
- 43 COOPER, L. et al. A biocompatible porous Mg-gallate metal-organic framework as an antioxidant carrier. **Chemical Communications**, v. 51, n. 27, p. 5848-5851, 2015.
- 44 SU, H. et al. A highly porous medical metal-organic framework constructed from bioactive curcumin. **Chemical Communications**, v. 51, n. 26, p. 5774-5777, 2015.
- 45 SIVAKOVA, S.; ROWAN, S. J. Nucleobases as supramolecular motifs. **Chemical Society Reviews**, v. 34, n. 1, p. 9-21, 2005.

- 46 BURNEO, I. et al. Two new adenine-based Co(II) coordination polymers: synthesis, crystal structure, coordination modes, and reversible hydrochromic behavior. **Crystal Growth & Design**, v. 15, n. 7, p. 3182-3189, 2015.
- 47 LIPPERT, B.; GUPTA, D. Promotion of rare nucleobase tautomers by metal binding. **Dalton Transitions**, v. 24, p. 4619-4634, 2009.
- 48 SALMANN, A. R. et al. The history of diclofenac. **American Journal of Biomedical Sciences**, v. 80, p. 29-33, 1986. Suppl. 4B.
- 49 U. S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system: guidance for industry**. Rockville, 2000. 13 p.
- 50 GIAGOUDAKIS, G.; MARKANTONIS, S. L. An alternative high-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 1, p. 897-901, 1998.
- 51 MULLER, C. P. et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v. 27, p. 555-560, 2004.
- 52 MANJUNATHA, K. M.; RAMANA, M.V.; SATYANARAYANA, D. Design and evaluation of diclofenac sodium controlled drug delivery systems. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 3, p. 384-389, 2007.
- 53 JIA, C. et al. Efficient vapour-assisted aging and liquid-assisted grinding synthesis of a microporous copper-adeninate framework. **Crystal Engineering Community**, v. 16, p. 6552-6555, 2014.
- 54 OLIVEIRA, C. N.; IONASHIRO, M.; GRANER, C. A. F. Titulação complexométrica de zinco, cobre e cobalto. **Eclética Química**, v. 10, p. 7-10, 1985.
- 55 ACD/LABS. **ChemSketch**. Version 12. Toronto, 2009.
- 56 DASSAULT SYSTEMES BIOVIA. **Discovery studio modeling environment**. Release 2017. San Diego, 2016.
- 57 BROOKS, B. R. et al. A program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations. **Journal of Computer Chemistry**, v. 4, p. 187-217, 1983.
- 58 MATHLOUTHI, M.; SEUVRE, A.M.; KOENIG, J. L. FTIR and laser-Raman spectra of adenine and adenosine. **Carbohydrate Research**, v. 131, n.1, p. 1-15, 1984.
- 59 SIENKIEWICZ-GROMIUK, J. et al. Synthesis, structural, spectroscopic and thermal characteristics of disubstituted biphenyl derivative: biphenyl-4,4'-diacetic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 1070, p. 110-116, 2014.
- 60 SILVERSTEIN, R. M. et al. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, c2000. 460 p.
- 61 LUPU, A. Thermogravimetry of copper and copper oxides (Cu₂O-CuO). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 2, p. 445-458, 1970.

- 62 ZHAO, L. et al. Facile solvothermal synthesis of phase-pure Cu_4O_3 microspheres their lithium storage properties. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 6, p. 1136-1142, 2012.
- 63 MORGAN, P. E. D. et al. Synthesis of paramelaconite: Cu_4O_3 . **Journal of Solid State Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 33-37, 1996.
- 64 PÉREZ-YÁÑEZ, S. et al. Open-framework copper adeninate compounds with three-dimensional microchannels tailored by aliphatic monocarboxylic acids. **Inorganic Chemistry**, v. 50, p. 5330-5332, 2011.
- 65 TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, p. 808-818, 2001.
- 66 REEDIJK, J. et al. Pyrazoles and imidazoles as ligands. Part IX. Some adducts formed between Cu(II) salts and substituted pyrazoles. **Recueil**, v. 111, p. 234-251, 1971.
- 67 JAMESON, R. F. Coordination chemistry of copper with regard to biological systems. **Metal Ions in Biological Systems**, v. 12, p. 1-30, 1981.
- 68 PILBROW, J. R. **Transition ion electron paramagnetic resonance**. New York: Oxford, 1990. 717 p.
- 69 CHANDRA, S.; GUPTA, L. K. EPR and electronic spectral studies on Co(II) , Ni(II) and Cu(II) complexes with a new tetradentate [N4] macrocyclic ligand and their biological activity. **Spectrochimica Acta, Part A**, v. 60, p. 1563-1571, 2004.
- 70 RYBAK-AKIMOVA, E. V. et al. Synthesis, characterization, redox properties, and representative X-ray structures of four- and five-coordinative copper(II) complexes with polydentate aminopyridine ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 324, p. 1-15, 2001.
- 71 CHANDRA, S.; GUPTA, L. K.; SHARMA, S. Synthesis and spectral studies of transition metal complexes with 5,7,12,14-tetrametil-1,4,8,11-tetraazacyclotetradeca-4,7,11,14-tetraene, a fourteen membered tetradentate macrocyclic ligand. **Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry**, v. 31, p. 1205-1215, 2001.
- 72 BORBANE, S. A. et al. Design and fabrication of ordered mesoporous alumina scaffold for drug delivery of poorly water soluble drug. **Austin Therapeutics.**, v. 2, p. 1015-1019, 2015.
- 73 TONUCCI, M. C. **Adsorção de diclofenaco, estradiol e sulfametoxazol em carvões ativados e nanotubos de carbono: estudos cinéticos e termodinâmicos**. 2014. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.
- 74 BRATU, I. et al. FTIR and X-ray spectroscopic investigations of Na-diclofenac-cyclodextrins interactions. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 54, p. 191-196, 1998.
- 75 KENAWI, I. M.; BARSOUM, B. N.; YOUSSEF, M. A. Cetirizine dihydrochloride interaction with some diclofenac complexes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 341-348, 2005.

- 76 TERPSTRA, P. A.; OTTO, C.; GREVE, J. Non-coincidence splitting of the 1505 cm⁻¹ adenine base vibration is due to coupling to water via hydrogen bonding. **The Journal of Chemical Physics**, v. 106, p. 846-848, 2015.
- 77 EL-NAGGAR, M. E. et al. Synthesis, characterization, release kinetics and toxicity profile of drug-loaded starch nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 718-729, 2015.
- 78 LOELE, G. et al. Photostability and ex-vivo permeation studies on diclofenac in topical niosomal formulations. **International Journal of Applied Pharmaceutical**, v. 494, p. 490-497, 2015.
- 79 LIU, K. et al. Photoreactivity of metal–organic frameworks in aqueous solutions: metal dependence of reactive oxygen species production. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 3634-3640, 2016.
- 80 JIANG, K. et al. Pressure controlled drug release in a Zr-cluster-based MOF. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, p. 6398-6401, 2016.
- 81 HORCAJADA, P. et al. Porous metal–organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. **Nature Materials**, v. 9, p. 172-178, 2010.
- 82 McKINLAY, A. C. et al. Exceptional behavior over the whole adsorption-storage-delivery cycle for NO in porous metal organic frameworks. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 10440-10444, 2008.
- 83 HE, C. et al. Nanoscale metal–organic frameworks for the co-delivery of cisplatin and pooled siRNAs to enhance therapeutic efficacy in drug-resistant ovarian cancer cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 5181-5184, 2014.
- 84 BERNINI, M. C. et al. Screening of bio-compatible metal–organic frameworks as potential drug carriers using Monte Carlo simulations. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, p. 766-774, 2014.
- 85 ORELLANA-TRAVA, C. et al. Amorphous metal–organic frameworks for drug delivery. **Chemical Communications**, v. 51, p. 13878-13881, 2015.
- 86 MALEK, S. N. A. et al. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Alpinia mutica* rhizomes. **Molecules**, v. 16, p. 583-589, 2011.