

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Química – Araraquara

RENAN AUGUSTO MARSON ARMANDO

Síntese e caracterização de BioMOFs (Biocompatible Metal-Organic Frameworks) de Zn(II) para aplicação em *drug delivery* de metalofármacos anticancerígenos

Araraquara-SP

2022

RENAN AUGUSTO MARSON ARMANDO

Síntese e caracterização de BioMOFs (Biocompatible Metal-Organic Frameworks) de Zn(II) para aplicação em *drug delivery* de metalofármacos anticancerígenos

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química pelo Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – Unesp.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Célia Galvão Frem

Araraquara – SP

2022

RENAN AUGUSTO MARSON ARMANDO

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química pelo Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – Unesp.

Araraquara, 20 de Janeiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Regina Célia Galvão Frem (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Prof Dr Arnaldo Sarti
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Prof Dr Elias de Souza Monteiro Filho
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP

Dedico este trabalho ao meu querido avô Benedito Armando que para mim é um exemplo de força e resiliência, e sempre foi um grande incentivador de tudo isso.

“Lutar, buscar, encontrar”.

Alfred Lord Tennyson

AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigado....

Aos meus pais Helaine e Mário e irmã Tainah, por todo apoio, carinho, admiração e sacrifício, pois sem eles, com certeza o caminho até aqui teria sido muito mais árduo. Muito obrigado por tudo o que vocês representam em minha vida e por sempre acreditarem em mim.

A minha companheira de vida Natalia, por caminhar junto a mim desde o início da graduação, compartilhando momentos de imensa alegria e também de grande dificuldade, sempre me aconselhando e extraindo o melhor de mim como pessoa. Obrigado por ter me ajudado tanto durante essa caminhada, você foi fundamental para essa conquista.

A Profa. Dra. Regina Frem, minha segunda mãe, pela orientação, pela amizade e por ter acreditado no meu trabalho. Minha admiração por você vai além da excelente professora ou da exímia cientista, você me conquistou pela pessoa generosa que é. Foram 4 anos de puro aprendizado. Este trabalho não teria saído sem você. Minhas conquistas são suas também. Obrigado!

Aos meus avós Anita, Nilda, Hélio e Benedito, que sempre me deram o carinho e o suporte necessário para seguir em frente. Vocês são grandes exemplos para mim.

A minha família querida, por todo apoio e incentivo desde que dedici recomeçar minha trajetória ingressando novamente em uma universidade.

A minha grande amiga Marina Paiva Abuçafy, pelo incrível companheirismo de todos esses anos. Por todo suporte fornecido dentro do laboratório me auxiliando em meus experimentos, como também na elaboração de relatórios, publicações e deste trabalho. Pelas risadas e por nunca ter me deixado desanimar.

Aos meus colegas de laboratório Rafael Domenegueti, Renan Lira, Guilherme Arroyos, Caroline Moraes, Renata Alves, Christian Quijia, Valesca Pizone, Gil Hanck, Camila Lima, Isabela Rossi, Lucas Theodoroviez, Olavo Verruma e Augusto, pela convivência, apoio, risadas e troca de experiência que vou levar comigo para sempre.

A Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp por gentilmente ceder seu laboratório para a realização dos ensaios de drug delivery.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Usp por ter cedido o complexo de rutênio para a realização dos experimentos de drug delivery.

A todos os professores que tive ao longo dessa jornada, por todos os ensinamentos que puderam me transmitir. Serão levados comigo para sempre.

Aos funcionários da Seção de Graduação do Instituto de Química, pela atenção e cordialidade;

Enfim, a Fapesp pela bolsa concedida e aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda”.

Paulo Freire

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”.

Marie Curie

RESUMO

Um dos maiores desafios da medicina moderna nas últimas décadas tem sido o desenvolvimento e uso de carreadores biocompatíveis que garantam uma liberação de moléculas bioativas no corpo humano de forma eficiente. A maioria dos carreadores existentes demonstram algumas desvantagens como baixa capacidade de carregamento e rápida liberação com efeito *burst*. Nesse contexto, uma sub-classe de polímeros de coordenação, conhecida como Metal-Organic Frameworks (MOFs), tem atraído a atenção de pesquisadores do mundo todo posto que as propriedades físicas características das MOFs, principalmente porosidade permanente e elevada área específica, as tornam materiais excepcionais para aplicação em sistemas de liberação de fármacos (SLFs). Neste trabalho, uma MOF não-tóxica à base de íons zinco(II), denominada **bio-MOF-1**, foi sintetizada e caracterizada utilizando ácido 4,4'-bifenildicarboxílico e adenina como ligantes. O material poroso microcristalino obtido apresentou elevada capacidade de carregamento ($0,340 \text{ g g}^{-1}$) do metalofármaco anticancerígeno **Ru-90**, [*cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(solv)](PF₆)]. A liberação do complexo **Ru-90** da matriz **bio-MOF-1** é dependente do pH, e, portanto, este material se torna um candidato promissor em *drug delivery* de fármacos anticancerígenos. A aplicação de modelos cinéticos revela que o mecanismo de liberação do **Ru-90** dos poros da matriz posora se ajusta à equação de *Korsmeyer-Peppas* para o sistema em pH 5,0 e pH 7,4; os gráficos mostram elevada linearidade dos dados e coeficiente de correlação (R^2) maior que 0,96. O valor de n ficou abaixo de 0,45, sugerindo que o mecanismo de transporte segue um modelo quase-Fickiano. De fato, o estudo cinético sugere que a **bio-MOF-1** libera o fármaco principalmente por difusão. Os resultados de viabilidade celular *in vitro* revelam que a oclusão de **Ru-90** facilitou seu acesso e aumentou sua disponibilidade nas células utilizadas: A395 (tumoral) e L929 (não tumoral). Na segunda parte do trabalho, com o objetivo de tentar miniaturizar as partículas da **bio-MOF-1**, diferentes amostras (**Zn_HAc**, **Zn_pyd** e **Zn_pyd_{micro}**) foram obtidas utilizando técnicas de micro-ondas e moduladores de coordenação. A utilização do ácido acético como agente modulador reduziu ligeiramente o tamanho de partícula quando comparado com o método solvotérmico convencional. Foi também observado que, dependendo do tipo de modulador (ácido acético ou piridina) e da rota sintética utilizada (solvotérmica convencional ou assistida por micro-ondas), foi possível também obter compostos com diferentes morfologias (prismas, bastões concêntricos ou partículas quase-esféricas).

Palavras-chave: MOFs, sistema de liberação de fármacos (SLF), fármacos anticancerígenos, metalofármacos

ABSTRACT

One of the greatest bottlenecks in modern medicine has been the development and use of biocompatible carriers that assure efficient drug delivery in the body. Most of the existing carriers have shown some drawbacks like poor loading and rapid drug release with a "burst" effect. In this context, a subclass of coordination polymers, known as Metal-Organic Frameworks (MOFs), has drawn the attention of researchers across the world: the unique physical properties of MOFs make them exceptional materials for drug delivery systems (DDS). Here, we have synthesized and characterized a non-toxic Zn-based MOF, designated **bio-MOF-1**, by using 4,4'-biphenyldicarboxylic acid and adenine as linkers. The microcrystalline porous material presented great loading capacity (0.340 g g^{-1}) for the antitumoral metallodrug **Ru-90** [*cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(solv)](PF₆)]. The release of **Ru-90** from the **bio-MOF-1** matrix is depending on pH, and therefore, this material is a promising candidate for anticancer drug delivery. The fitting of kinetic equation models showed that the mechanism of **Ru-90** release from **bio-MOF-1** is adjusted by the Korsmeyer-Peppas model for the system at pH 5,0 and pH 7,4; the plots displayed high linearity and correlation coefficient values (R^2) greater than 0.96. The n values were under 0.45 (Korsmeyer-Peppas model), which suggested the quasi Fickian model for the transport mechanism. In fact, the kinetic study results showed that **bio-MOF-1** delivers the anticancer complex **Ru-90** mostly through a diffusive mechanism. The in vitro cytotoxicity results demonstrated that **Ru-90** occlusion facilitated its access and increased its availability in the cells A395 (tumoral) and L929 (non-tumoral). Moreover, microcrystalline particles of **bio-MOF-1**, here named **Zn_HAc**, **Zn_pyd** and **Zn_pyd_{micro}**, were obtained by microwaves-assisted techniques and the addition of coordination modulators. The use of acetic acid as a modulator decreased slightly the size of particles when compared to the conventional solvothermal route. In conclusion, depending on the type of modulator (acetic acid or pyridine) as well as the synthetic route (conventional solvothermal or microwave-assisted), we were capable to obtain different morphologies (rods, spheres, and clusters).

Keywords: MOFs, drug delivery systems (DDS), anticancer drugs, metallodrugs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Número de publicações envolvendo MOFs.....	14
Figura 2. Ácidos orgânicos utilizados como ligantes na construção de MOFs.....	16
Figura 3. Geometria de coordenação de metais de transição.	17
Figura 4. Diferentes tipos de SBUs que frequentemente são utilizadas na construção de MOFs.	17
Figura 5. Representação da MOF-5.....	18
Figura 6. Representação da bio-MOF-1.	19
Figura 7. Representações estruturais do efeito da remoção de uma molécula ou íon hóspede (G) dos poros de MOFs de diferentes gerações.....	20
Figura 8. Linha do tempo das principais abordagens desenvolvidas para a síntese das MOFs	21
Figura 9. Esquema gráfico da introdução de calor e distribuição de temperatura no meio reacional utilizando a síntese solvotérmica convencional e com o auxílio de micro-ondas. ...	22
Figura 10. Representação esquemática do processo de nucleação e crescimento de cristais de acordo com o modelo de LaMer.....	23
Figura 11. Equilíbrios químicos por trás do controle do crescimento de cristais de MOFs segundo modelo cinético.	25
Figura 12. Ilustração esquemática do comportamento das MOFs de acordo com a taxa de reação e reversibilidade.	25
Figura 13. Diminuição do tamanho dos cristais da MOF MIL-101(Cr) com o aumento do pKa do modulador utilizado.	26
Figura 14. Requisitos a serem levados em consideração na avaliação de sistemas de liberação controlada.	28
Figura 15. Padrões de raios-X de pó dos cristais da bio-MOF-1 sintetizada, bio-MOF-1 ativada e bio-MOF-1 simulada.	39
Figura 16. Imagens da microscopia eletrônica de varredura de amostras da (a) bio-MOF-1 sintetizada e (b) bio-MOF-1 ativada mostrando a formação de defeitos na superfície causados pelo processo de ativação.	40
Figura 17. Isotermas de fisissorção de N ₂ para a bio-MOF-1 ativada.....	41
Figura 18. Padrões de raios-X de pó dos cristais da bio-MOF-1 ativada antes e após imersão à 37°C durante 5 dias em pH 7,4 e pH 5,0.....	42
Figura 19. Padrões de raios-X de pó da série Zn_HAc e da bio-MOF-1 simulada.....	43
Figura 20. Padrões de raios-X de pó da série Zn_pyd e da bio-MOF-1 simulada.	43
Figura 21. Influência de r sobre o tamanho das partículas de MOFs à base de zinco(II).	44
Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das MOFs de Zn(II) utilizando ácido acético (a-b) e piridina (c-d) como moduladores na síntese solvotérmica.....	45

Figura 23. Padrões de raios-X de pó da série Zn_pyd _{micro} e da bio-MOF-1 simulada.	46
Figura 24. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das MOFs de Zn(II) obtidas pelo uso de micro-ondas utilizando piridina como modulador nas razões r = 50 (a-b) e r = 100 (c-d).....	47
Figura 25. Representação estrutural do metalofármaco Ru-90, [cis-[Ru(bpy) ₂ (NO ₂)(solv)](PF ₆)].....	47
Figura 26. Cromatograma do Ru-90 (65 µg mL ⁻¹) em água/DMSO 2% obtido pelo método cromatográfico utilizado.....	48
Figura 27. Cromatograma do Ru-90 (65 µg mL ⁻¹) em solução tampão PBS pH = 5.0 (verde) e pH = 7.4 (azul) obtido pelo método cromatográfico utilizado	49
Figura 28. Curva de calibração do Ru-90 em água/DMSO 2% obtida por CLAE-DAD.	50
Figura 29. Curva de calibração do Ru-90 em PBS pH 5,0 obtida por CLAE-DAD	54
Figura 30. Curva de calibração do Ru-90 em PBS pH 7,4 obtida por CLAE-DAD	57
Figura 31. (a) Curvas TG da bio-MOF-1 ativada (linha preta), Ru-90@bio-MOF-1 (linha vermelha) e bio-MOF-1 sintetizada (linha azul)	60
Figura 32. Padrões de raios-X de pó dos cristais da bio-MOF-1 antes e após incorporação do fármaco Ru-90.	60
Figura 33. Perfis de liberação do fármaco Ru-90 da matriz bio-MOF-1 em solução tampão PBS pH 5,0 (símbolo circular preto) e pH 7,4 (símbolo quadrado vermelho), à 37°C.....	62
Figura 34. Viabilidade celular dos compostos Ru-90, bio-MOF-1 e Ru-90@bio-MOF-1 em 24 horas de incubação.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados referentes a estudos utilizando MOFs como sistemas de liberação de fármacos.....	29
Tabela 2. Materiais utilizados no estudo.	32
Tabela 3. Valores das áreas dos picos de Ru-90 em água/DMSO 2% referentes à curva de calibração.....	50
Tabela 4. Análise de variância para os valores das áreas dos picos obtidos para a construção da curva de calibração do Ru-90 utilizando água/DMSO 2% como solvente.	51
Tabela 5. Determinação da repetibilidade de Ru-90 em água/DMSO 2% por CLAE-DAD. .	52
Tabela 6. Determinação da reprodutibilidade de Ru-90 em água/DMSO 2% por CLAE-DAD.	52
Tabela 7. Valores das áreas dos picos de Ru-90 em solução tampão PBS pH = 5.0 referentes à curva de calibração.	53
Tabela 8. Análise de variância para os valores das áreas dos picos obtidos para a construção da curva de calibração do Ru-90 em solução tampão PBS pH = 5.0	54
Tabela 9. Determinação da repetibilidade de Ru-90 em solução tampão PBS pH 5,0 por CLAE-DAD.....	55
Tabela 10. Determinação da reprodutibilidade de Ru-90 em solução tampão PBS pH 5,0 por CLAE-DAD.....	56
Tabela 11. Valores das áreas dos picos de Ru-90 em solução tampão PBS pH = 7.4 referentes à curva de calibração.	56
Tabela 12. Análise de variância para os valores das áreas dos picos obtidos para a construção da curva de calibração do Ru-90 em solução tampão PBS pH = 7.4.	57
Tabela 13. Determinação da repetibilidade de Ru-90 em solução tampão PBS pH 7,4 por CLAE-DAD.....	58
Tabela 14. Determinação da reprodutibilidade de Ru-90 em solução tampão PBS pH 7,4 por CLAE-DAD.....	59
Tabela 15. Modelos cinéticos considerados para a bio-MOF-1 e seus respectivos parâmetros calculados.	63
Tabela 16. Efeitos citotóxicos dos compostos Ru-90, bio-MOF-1, Ru-90@bio-MOF-1 e cisplatina em diferentes linhagens celulares após 24 horas de incubação.....	64

LISTA DE SIGLAS

- MOFs: *Metal-Organic Frameworks*
- SLF: Sistema de Liberação de Fármacos
- IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada
- SBUs: Unidades de construção secundária
- FTIR: Espectroscopia vibracional no infravermelho
- DRX: Difractometria de raios-X
- MEV-FEG: Microscopia Eletrônica de Varredura
- TGA: Análise termogravimétrica
- HF: Ácido fluorídrico
- NPs: nanopartículas
- C_{nuc} : concentração crítica de nucleação
- C_{sat} : concentração de saturação
- PBS: solução tampão fosfatada
- Bpdc: ácido 4-4'bifenildicarboxílico
- DMF: *N,N*-Dimetilformamida
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- FBS: Soro fetal bovino
- CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- SI: Índice de Seletividade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. <i>Design</i> de MOFs.....	16
2.2. Síntese de MOFs.....	20
2.3. Controle sobre o crescimento de cristais das MOFs.....	23
2.4. Aplicação de MOFs como Sistemas de Liberação de Fármacos (SLF).....	27
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivos específicos.....	31
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	32
4.1. Materiais.....	32
4.2. Sínteses.....	32
4.2.1. Síntese do complexo Ru-90.....	32
4.2.2. Síntese da bio-MOF-1.....	33
4.2.3. Síntese de MOFs à base de zinco(II) com auxílio de moduladores.....	33
4.2.4. Síntese de MOFs à base de zinco(II) com auxílio de moduladores usando síntese solvotérmica assistida por micro-ondas.....	33
4.3. Caracterizações.....	34
4.3.1. Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR).....	34
4.3.2. Difração de raios-X de pó (DRX).....	34
4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG).....	34
4.3.4. Análise termogravimétrica (TGA).....	34
4.3.5. Análise de porosidade via isotermas de fisissorção de N ₂	35
4.4. Estudo de estabilidade química.....	35
4.5. Curvas de calibração.....	35
4.5.1. Linearidade.....	35
4.5.2. Precisão – Repetibilidade.....	36
4.5.3. Precisão Intermediária - Reprodutibilidade.....	36
4.6. Encapsulamento do Ru-90 nos poros da matriz de Zn(II) (bio-MOF-1).....	36
4.7. Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do Ru-90.....	37
4.8. Ensaio de viabilidade celular.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Síntese da bio-MOF-1.....	39
5.2. Estabilidade química da bio-MOF-1.....	41

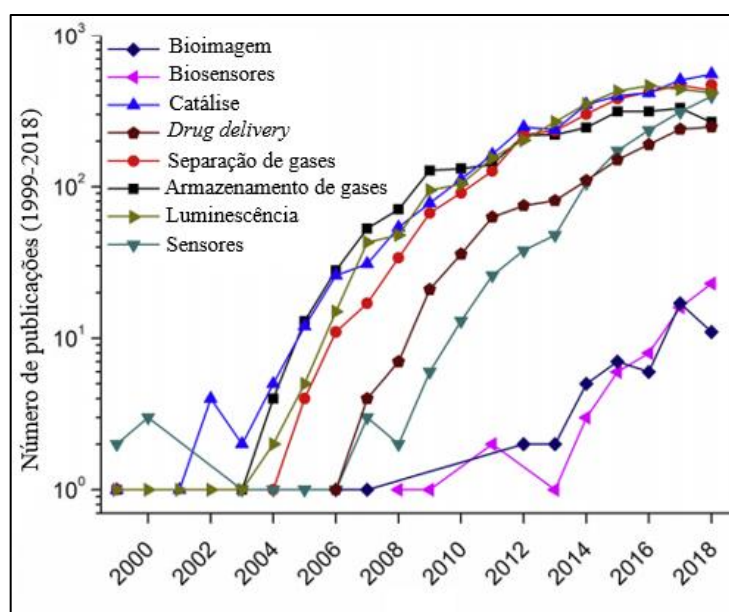
5.3. Tentativa de miniaturização das partículas da bio-MOF-1 para escala nanométrica	42
5.3.1. Uso de moduladores de coordenação	42
5.3.2. Síntese solvotérmica assistida por micro-ondas associada ao uso de piridina como modulador.....	45
5.4. Ensaio de encapsulação e liberação de fármaco.....	47
5.4.1. Validação do método de quantificação de Ru-90 por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD)	48
5.4.2. Encapsulação do fármaco Ru-90.....	59
5.4.3. Ensaio de liberação do fármaco Ru-90.....	61
5.5. Avaliação de viabilidade celular <i>in vitro</i>	63
6. CONCLUSÕES	65
7. PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

Metal-Organic Frameworks (MOFs), uma nova classe de polímeros de coordenação,^[1] tem atraído a atenção de muitos pesquisadores devido às suas propriedades únicas tais como estrutura porosa e cristalina,^[2] grande área superficial com funcionalidade de poros ajustáveis,^[3] cavidades hidrofílicas-hidrofóbicas,^[4] possibilidade de funcionalização da matriz porosa,^[5] e em diversos casos biodegradabilidade intrínseca.^[6]

Naturalmente, com o passar do tempo, estas propriedades foram sendo exploradas nos mais diversos tipos de aplicações e em diversas áreas, como armazenamento^[7] e separação de gases,^[8] purificação da água,^[9,10] catálise heterogênea,^[11] semicondutores,^[12] magnetismo,^[13] e sensores,^[14] entre outras. De forma mais recente, a utilização de MOFs para incorporação e liberação de fármacos (*drug delivery*) vêm ganhando cada vez mais destaque, como pode ser observado no gráfico da Figura 1.

Figura 1. Número de publicações envolvendo MOFs em bioimagem, biosensores, catálise, *drug delivery*, separação de gases, armazenamento de gases, luminescência e sensores.



Fonte: Adaptado de Gulcay, 2020.^[15]

O encapsulamento de fármacos é utilizado para melhorar a sua biodistribuição, meia-vida sistêmica e conseqüentemente seu efeito terapêutico. Nesse sentido, o uso de MOFs como sistemas de liberação de fármacos (SLFs) torna-se conveniente pelo fato de vários de seus representantes apresentarem características adequadas e preencherem requisitos básicos para serem carreadores de moléculas bioativas tais como baixa toxicidade, grande capacidade de encapsulamento, apresentação em escala nanométrica, possibilidade de modificação de sua superfície e liberação do agente ativo de forma controlada.

Ao longo das últimas duas décadas, alguns materiais de origem orgânica e inorgânica foram desenvolvidos como SLFs incluindo nanopartículas de óxido de zinco,^[16] dendrímeros,^[17] lipossomas,^[18] micelas,^[19] e sílica mesoporosa.^[20] Entretanto, sabe-se que esses tipos de carreadores apresentam certas desvantagens quando comparadas às MOFs destacando-se a toxicidade indesejável, baixíssima capacidade de incorporação e controle ineficiente sobre a liberação.^[21]

Dentro desse cenário, diversas MOFs já tiveram sua eficiência comprovada por meio de estudos de liberação de agentes terapêuticos. O trabalho pioneiro de Horcajada, P. e colaboradores,^[22] em 2006, avaliando o encapsulamento e a liberação do fármaco ibuprofeno em duas MOFs distintas (**MIL-100** e **MIL-101**) contribuiu imensamente para o avanço das pesquisas com outros tipos de MOFs e agentes terapêuticos.^[23-26]

Por conta da aplicação biológica, torna-se necessário que a estrutura das MOFs seja composta por unidades biocompatíveis. Assim sendo, as bio-MOFs, uma família de MOFs, vêm chamando a atenção como SLFs. Construídas através da coordenação de biomoléculas como aminoácidos, peptídeos, proteínas, sacarídeos e bases nitrogenadas com cátions metálicos biocompatíveis, as bio-MOFs apresentam um futuro promissor na área de *drug delivery*.^[27-29]

Em 2009, An e colaboradores sintetizaram e caracterizaram o primeiro representante das bio-MOFs, a **bio-MOF-1** ($[(Zn_8(\text{adenine})_4(\text{bpdc})_6\text{O})] \cdot 2\text{Me}_2\text{NH}_2 \cdot 8\text{DMF} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$). O material poroso formado por gaiolas (*cages*) de adeninato de zinco interligadas por ácido 4-4'-bifenildicarboxílico teve seu potencial como SLF avaliado. A incorporação de procainamida atingida foi de 0,22 g g⁻¹ de material e sua cinética de liberação foi avaliada em solução tampão PBS, atingindo 100% de liberação após 60h.^[30] É interessante notar que a matriz porosa da **bio-MOF-1** apresenta uma natureza aniônica intrínseca que favorece a adsorção de fármacos com moléculas catiônicas. Recentemente, Lucena e colaboradores avaliaram o potencial de liberação do fármaco diclofenaco de sódio incorporado na matriz porosa da **bio-MOF-1**. O fármaco foi carregado numa proporção de 1,72 g g⁻¹ de material e apresentou uma capacidade de liberação de 56% após 2 dias de imersão em solução tampão PBS, demonstrando um interessante perfil de liberação controlada.^[31]

Frente ao exposto, o *design*, a síntese e a caracterização de MOFs com grande capacidade de incorporação e liberação controlada, somadas a uma natureza biocompatível (bio-MOFs) tornam esse material um promissor sistema para aplicação em *drug delivery*.

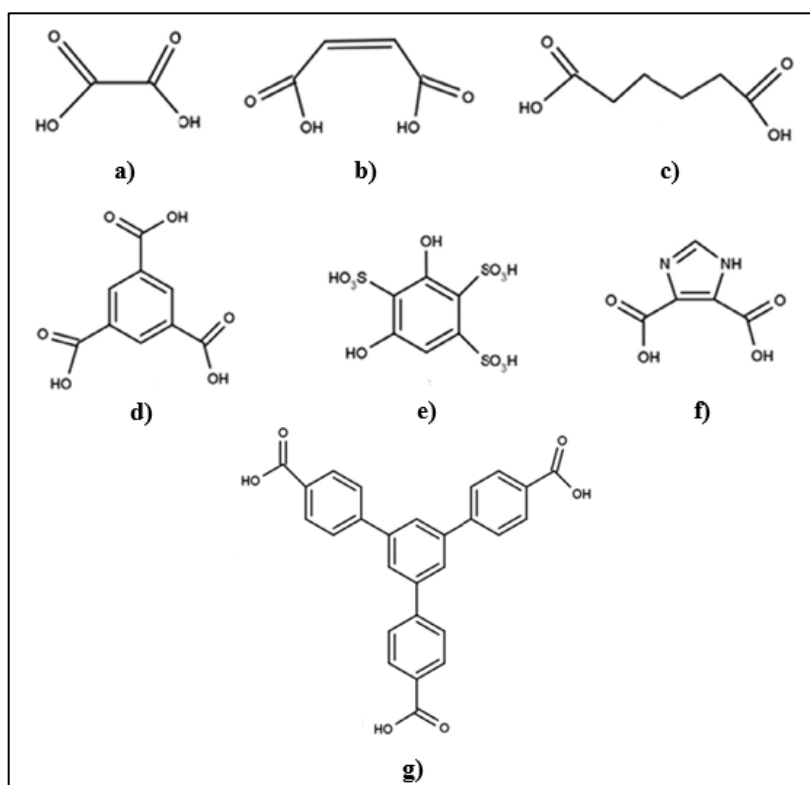
2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção será apresentada uma revisão dos principais tópicos referente ao estudo realizado, incluindo abordagens envolvendo o *design*, síntese e caracterização, propriedades e aplicações das MOFs.

2.1. Design de MOFs

Segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), “MOFs são redes de coordenação contendo espaçadores orgânicos multitópicos que apresentam cavidades potencialmente vazias”.^[32] Em se tratando de espaçadores, ligantes orgânicos com diversas funcionalidades vêm sendo utilizados no desenvolvimento de MOFs ao longo dos anos, desde carboxilatos bidentados até aromáticos polidentados, como mostra a Figura 2.

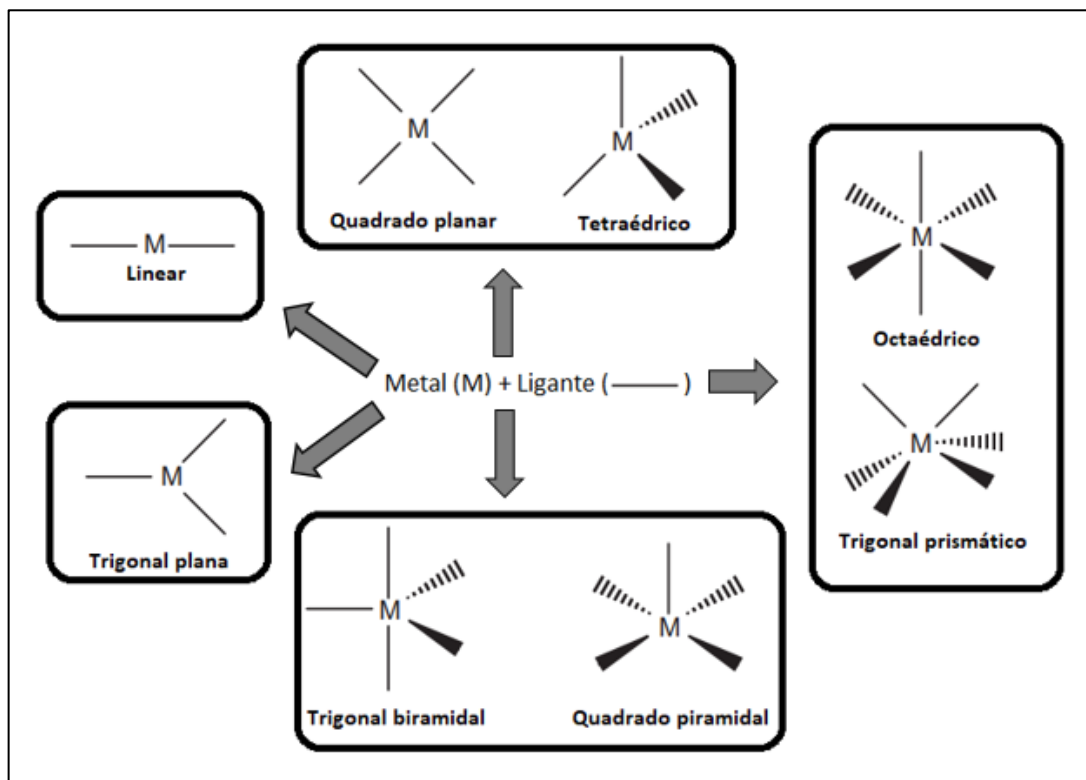
Figura 2. Ácidos orgânicos utilizados como ligantes na construção de MOFs. (a) ácido oxálico; (b) ácido fumárico; (c) ácido 1,4-butanodicarboxílico; (d) ácido trimésico; (e) ácido 4,6-diidroxi benzeno-1,2,5-sulfônico; (f) ácido 4,5-imidazoldicarboxílico; (g) ácido 1,3,5-benzenotribenzóico.



Fonte: Autor, 2021.

De forma semelhante, o centro metálico bem como sua geometria (ver Figura 3) são de fundamental importância para a construção da estrutura das MOFs.

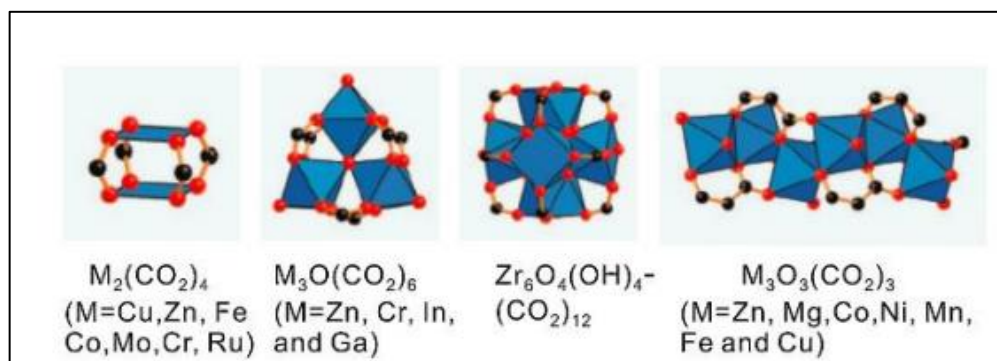
Figura 3. Geometria de coordenação de metais de transição.



Fonte: Adaptado de Erkey, 2011.^[33]

Assim sendo, a escolha do íon metálico e do ligante que serão utilizados na síntese do material irá determinar o tipo de rede obtida, podendo crescer em duas ou três dimensões. Do ponto de vista topológico, todas as MOFs apresentam nos vértices de suas redes unidades de construção secundária (SBUs – *secondary building blocks*) que contemplam íons metálicos e átomos de oxigênio.^[34,35] A Figura 4 mostra algumas SBUs utilizadas na construção de MOFs.

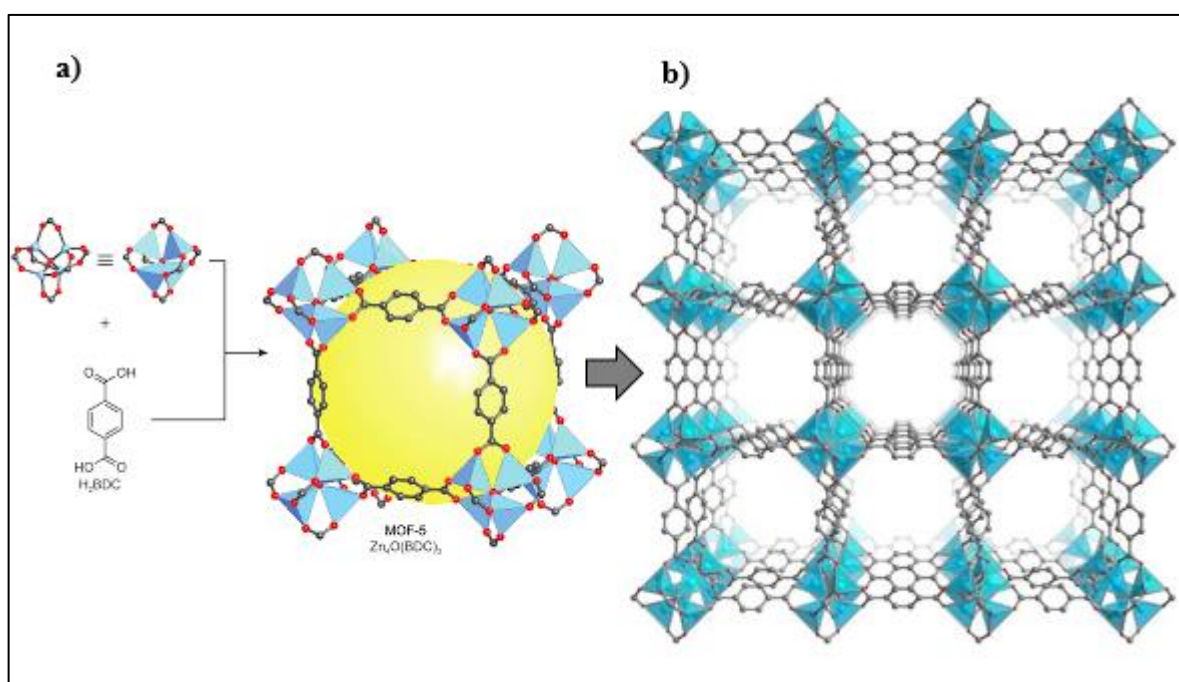
Figura 4. Diferentes tipos de SBUs que frequentemente são utilizadas na construção de MOFs. Em azul: *clusters* metálicos; em vermelho: átomos de oxigênio; em preto: átomos de carbono.



Fonte: Müller, 2016.^[35]

Na arquitetura da rede de coordenação das MOFs, os ligantes orgânicos apresentam papel fundamental ao serem responsáveis por realizar a conexão entre as SBUs.^[1] A Figura abaixo nos mostra a célula unitária (Figura 5a) e a estrutura tridimensional da rede **MOF-5** (Figura 5b) que originalmente foi descrita por Yaghi e colaboradores, em 1999.^[36] Fica claro como a estrutura é construída a partir da interação entre os centros metálicos de zinco(II) com o ligante orgânico 1,4-benzenodicarboxilato onde a esfera amarela representa o volume de poro da matriz.

Figura 5. Representação da **MOF-5**. (a) Célula unitária; (b) Estrutura tridimensional da rede cristalina. (azul: íons Zn^{2+} ; vermelho: átomos de oxigênio; preto: átomos de carbono).



Fonte: Adaptado de Yaghi, 1999.^[36]

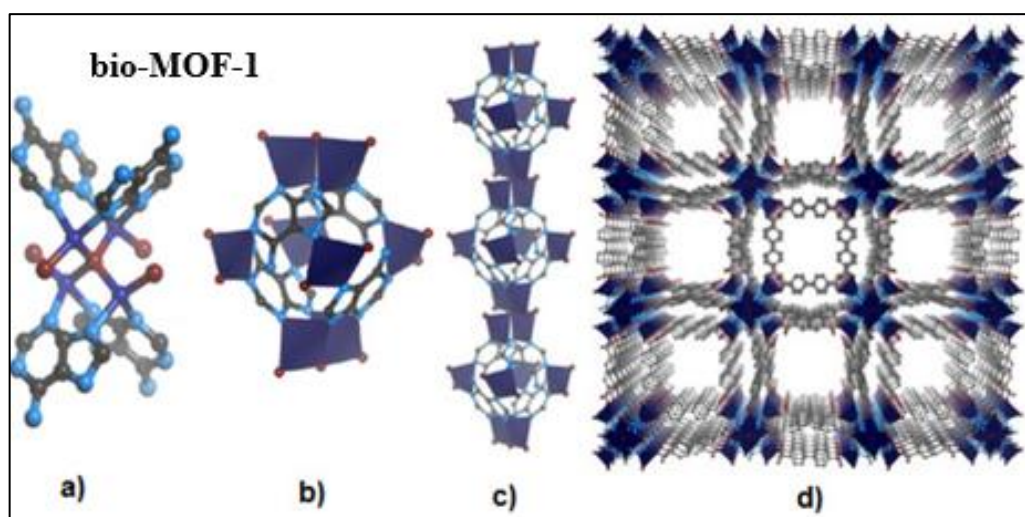
Em se tratando da estrutura da rede metalorgânica e da topologia, as MOFs podem ser classificadas como de primeira, segunda, terceira e quarta geração, dependendo da natureza do centro metálico e das características eletrônicas e estruturais do ligante orgânico utilizados na síntese.^[37]

As MOFs de primeira geração apresentam apenas um único íon metálico funcionando como vértice da rede. Os vértices são então interconectados por ligantes com mais de um sítio de coordenação disponível formando assim a rede de coordenação. Acontece que os centros metálicos utilizados nessa geração não eram robustos o suficiente para manter a rigidez estrutural da rede após a retirada das moléculas de solvente, favorecendo o colapso da mesma.

Portanto, do ponto de vista prático, as MOFs de primeira geração acabaram não sendo tão atrativas visto que sua utilização se restringia à uma única vez.^[1, 38]

Por outro lado, as MOFs de segunda geração, onde os vértices da rede são formados por SBUs, possuem estabilidade e porosidade permanente frente à remoção de moléculas hóspedes.^[37] Um exemplo típico de MOF de segunda geração é a **bio-MOF-1** possuindo elevada área superficial ($\sim 1700 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e natureza microporosa.^[39] A estrutura cristalina da **bio-MOF-1** está representada na Figura 6.

Figura 6. Representação da **bio-MOF-1**. a) *cluster* oxo-centrado de Zn_4O onde cada par de Zn^{2+} é ligado em ponte pelos nitrogênios N3 e N9 de duas adeninas; b) SBU formada por quatro adeninas em faces opostas do octaedro e oito Zn^{2+} tetraédricos; c) Coluna de SBU da **bio-MOF-1**; d) Estrutura tridimensional da rede. (azul escuro: íons Zn^{2+} ; preto: átomos de carbono; azul claro: átomos de nitrogênio; vermelho: átomos de oxigênio).



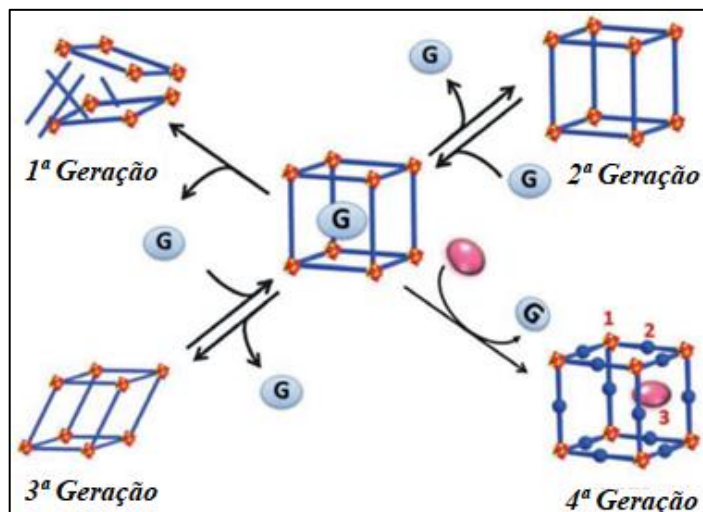
Fonte: An *et al*, 2009.^[39]

Por sua vez, as MOFs de terceira geração tem como característica principal uma flexibilidade estrutural a qual permite que a estrutura se deforme reversivelmente frente à adsorção/dessorção de moléculas ou estímulos externos como luz, temperatura ou campo elétrico. As MOFs de quarta geração são aquelas aptas a sofrer modificações pós-sintéticas e não alterar sua topologia ou mesmo sua integridade estrutural. Estas funcionalizações visam a introdução de grupos funcionais na estrutura da MOF já sintetizada a fim de trazer uma funcionalidade a mais para o material.^[1,37] A Figura 7 ilustra o comportamento das diferentes gerações de MOFs frente à introdução/remoção de moléculas hóspedes em sua estrutura.

Vale a pena destacar que a princípio, *drug delivery* com MOFs é aplicável da 2^a à 4^a geração, no entanto até que as MOFs de 3^a e 4^a geração pudessem ser totalmente compreendidas e amplamente exploradas, essa área ainda estava engatinhando. A

compreensão da flexibilidade e dinâmica do estado sólido das MOFs pode alterar a noção intuitiva de que os sólidos cristalinos são estruturalmente rígidos e estáticos como os sólidos inorgânicos comuns. Isso preparou o terreno para o uso de MOFs em *drug delivery*, pois a transformação estrutural é essencial para a incorporação e liberação de fármacos.

Figura 7. Representações estruturais do efeito da remoção de uma molécula ou íon hóspede (G) dos poros de MOFs de diferentes gerações. Legenda: aresta azul = ligantes; poliedro vermelho = SBU metálica; esfera azul = modificação pós-sintética; elipse rosa: espécie de interesse.



Fonte: Adaptado de Liu, 2013.^[37]

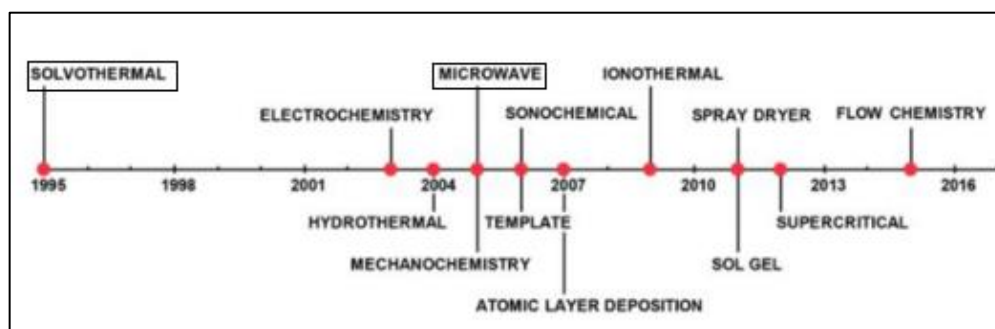
2.2. Síntese de MOFs

Um grande número de métodos e rotas sintéticas para a preparação de MOFs vem sendo apresentados e discutidos ao longo dos anos. Em grande parte dessas abordagens, a síntese ocorre em fase líquida com a mistura em solução contendo os íons metálicos e ligantes orgânicos. Porém, preparações de MOFs em estado sólido vêm ganhando cada vez mais espaço, sobretudo por serem relativamente rápidas e ambientalmente adequadas (livre de solventes).^[1] A síntese de MOFs em fase líquida requer a presença de ligantes orgânicos multitópicos e SBUs inorgânicas - componentes que determinam a estrutura da MOF - bem como solventes, utilizados como meio reacional uma vez que a maioria dos sais metálicos e ligantes orgânicos se apresentam no estado sólido.^[40]

Embora o método solvotérmico com aquecimento elétrico convencional ^[41,42] tenha sido adotado de forma rotineira na síntese de MOFs, métodos alternativos incluindo a síntese assistida por micro-ondas,^[43] síntese eletroquímica,^[44] síntese sonoquímica^[45,46] e síntese por *spray-drier*^[47] vêm ganhando cada vez mais espaço, uma vez que apresentam certas vantagens como menor tempo de síntese, preparação de partículas mais uniformes e possibilidade de

miniaturização em nanoescala, sendo esta última de fundamental importância para o desenvolvimento de SLFs, uma vez que sistemas nanoparticulados (< 200 nm) exercem um papel decisivo nos processos de internalização celular favorecendo o aumento da bioatividade do fármaco. A Figura 8 ilustra a linha do tempo referente aos principais métodos e abordagens sintéticas de MOFs, com destaque para a síntese solvotérmica e síntese assistida por micro-ondas, utilizadas nesse trabalho.

Figura 8. Linha do tempo das principais abordagens desenvolvidas para a síntese de MOFs. Em destaque: síntese solvotérmica e síntese assistida por micro-ondas.



Fonte: Olajire, 2018.^[40]

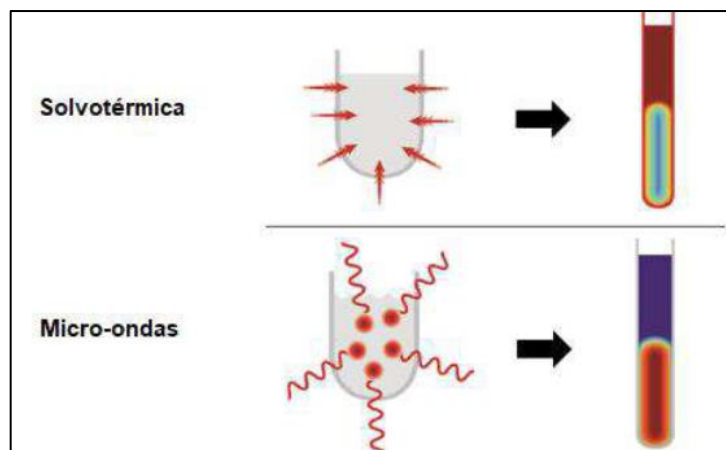
O método solvotérmico consiste em reações que ocorrem em recipientes fechados sob pressões elevadas e temperaturas acima do ponto de ebulição do solvente (353 - 453K). Seguindo a linha de raciocínio, sínteses não-solvotérmicas por sua vez ocorrem em pressão atmosférica, com temperatura inferior ou igual ao ponto de ebulição do solvente.^[48]

Como mencionado, a síntese solvotérmica é a técnica mais utilizada na preparação de MOFs. Isso se deve ao baixo custo e simplicidade do aparato técnico, facilidade na obtenção de cristais com elevado grau de cristalinidade e área superficial. Além disso, é uma técnica muito importante para realizar o crescimento de monocristais adequados para resolução estrutural por difratometria de raios-X (DRX). Entretanto, a técnica sofre com alguns inconvenientes como tempos prolongados de reação (alguns dias) e a formação de fases impuras.^[1,42]

Como alternativas à síntese solvotérmica, o uso de micro-ondas e ultrassom no preparo de MOFs aparece como soluções para superar as desvantagens inerentes ao método convencional. Essas técnicas geralmente permitem uma rápida cristalização das MOFs. Em particular, a utilização da síntese assistida por micro-ondas, em detrimento da síntese solvotérmica convencional, favorece um rápido e uniforme processo de nucleação através da formação de pontos superaquecidos com rápida transferência de calor, gerando assim partículas com distribuição de tamanho mais homogêneo,^[49,50] como mostra a Figura 9.

Enquanto na síntese solvotérmica o calor vem de fora para dentro do meio reacional através de transferência por convecção (deixando as paredes do frasco muito quentes), as micro-ondas atravessam a parede do vaso e aquecem diretamente a mistura a nível molecular.

Figura 9. Esquema gráfico da introdução de calor e distribuição de temperatura no meio reacional utilizando a síntese solvotérmica convencional e com o auxílio de micro-ondas.



Fonte: Adaptado de Kappe, 2019.^[51]

Como forma de demonstrar as vantagens da técnica em relação ao método solvotérmico no que diz respeito ao tempo de reação e homogeneidade do material, Ni e Masel realizaram a síntese dos materiais **IRMOF-1**, **IRMOF-2** e **IRMOF-3** em dietilformamida em apenas 90 segundos utilizando micro-ondas, contra 48-100 h utilizando o método solvotérmico convencional, onde em ambos os métodos a qualidade dos cristais se manteve inalterada.^[52] Da mesma forma, Margiolaki e colaboradores avaliaram a viabilidade do uso dessas rotas sintéticas distintas na obtenção da MOF de cromo(III) **MIL-101(Cr)**. Enquanto o método convencional na presença de ácido fluorídrico (HF) levou à formação de cristais polidispersos de poucos micrômetros em 16 horas, nanopartículas monodispersas de aproximadamente 20 nm foram obtidas em apenas 5 minutos com o auxílio de micro-ondas e sem a presença de HF.^[53]

No caso da síntese sonoquímica, a reação ocorre através da aplicação de ultrassom de alta energia no meio reacional. Quando o ultrassom interage com o líquido, pontos superaquecidos são formados através do fenômeno de cavitação favorecendo uma rápida nucleação e também a formação de cristais mais homogêneos. Uma limitação da técnica é o baixo rendimento.^[50] Em 2008, Jiang e colaboradores reportaram pela primeira vez de forma eficiente a síntese de nanoMOFs baseados no íon metálico zinco(II), utilizando a técnica de ultrassom.^[63] Em particular, nanocristais da MOF **Zn₃(BTC)₂·2H₂O** foram produzidos após 5

minutos em condições ambientes. O método solvotérmico convencional, para essa rota sintética, utiliza temperatura de 140 °C e leva em torno 24h para a obtenção da mesma fase.

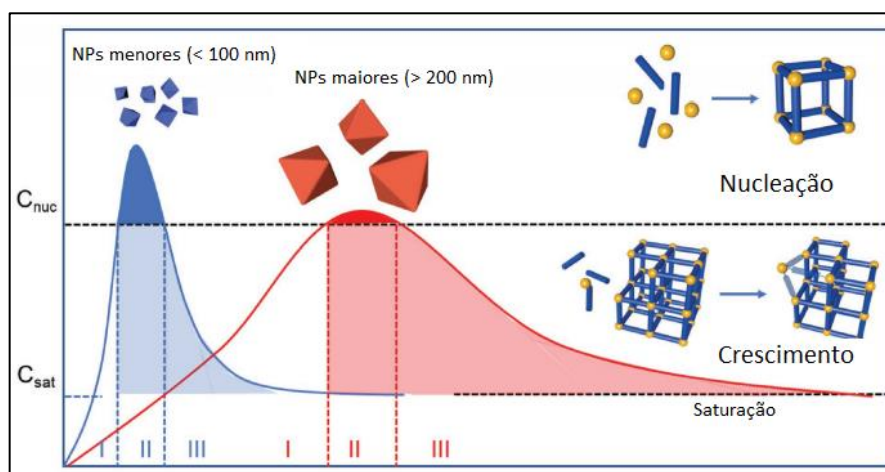
2.3. Controle sobre o crescimento de cristais das MOFs

Desde a sua descoberta, a imensa maioria dos estudos com MOFs estiveram focados na obtenção de fases *bulk* de misturas polidispersas contendo cristais com diferentes magnitudes de tamanho. Entretanto, de forma mais recente, um grande esforço tem sido dedicado ao estudo de nanopartículas monodispersas de MOFs, trazendo à tona uma variedade de propriedades não antes observadas em sistemas *bulk*, tais como cinética de adsorção/dessorção acelerada e melhora na biodisponibilidade.^[54]

Embora a síntese de MOFs em nanoescala venha sendo reportada com bastante frequência, o *design* e a preparação confiável de nanopartículas (NPs) uniformes ainda permanece como um grande desafio a ser superado. Por um lado, a termodinâmica da formação de MOFs pode variar muito dependendo da combinação metal-ligante e da topologia e dessa forma, os métodos de síntese geralmente são concebidos especificamente para uma determinada MOF. Do ponto de vista cinético, a formação das ligações de coordenação que levam ao crescimento das MOFs é muito lenta em comparação à taxa de difusão do precursor em solução, gerando longos períodos de nucleação e uma distribuição ampla do tamanho dos cristais da MOF.^[55]

Como consequência, torna-se inevitável a utilização de algumas ferramentas para um melhor entendimento sobre a mecânica do controle do tamanho dos cristais das MOFs, como por exemplo, o modelo de LaMer ilustrado na Figura 10.

Figura 10. Representação esquemática do processo de nucleação e crescimento de cristais de acordo com o modelo de LaMer.



Fonte: Adaptado de Wang, 2018.^[55]

De acordo com o modelo, a formação dos cristais se dá em 4 etapas principais: (1) um aumento rápido na concentração de monômeros precursores (Figura 10, estágio I); (2) uma nucleação homogênea proeminente à medida que a concentração de monômeros reativos excede a concentração crítica de nucleação – C_{nuc} ; (3) rápida redução na concentração de monômeros em solução, o que inibe possíveis eventos de nucleação futuros (Figura 10, estágio II) e (4) crescimento do cristal até atingir a concentração de saturação – C_{sat} (Figura 10, estágio III). O curto período que separa a nucleação do crescimento do cristal é crítico para a formação de NPs uniformes. Dessa forma, para a obtenção de partículas uniformes em nanoescala é essencial a geração de um grande número de núcleos e logo em seguida finalizar o crescimento do cristal através da eliminação dos precursores da solução.^[55]

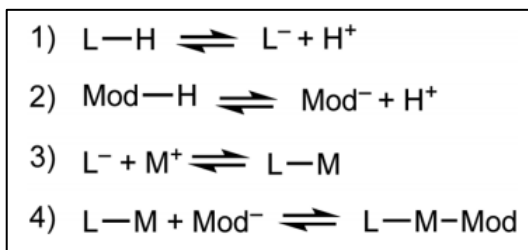
Nota-se, que o modelo de LaMer considera que a nucleação ocorre separadamente do crescimento do cristal, descrevendo ambos em termos de forças motrizes desencadeadas por altas concentrações de precursores. Hermes e colaboradores estudaram o processo de nucleação homogênea e crescimento de cristais da **MOF-5** em dietilformamida. Os dados sugerem que, de fato, a **MOF-5** segue o modelo de LaMer onde a nucleação e o crescimento da MOF ocorreram em tempos distintos.^[56] Entretanto, outros sistemas como **ZIF-8**^[57] e **HKUST-1**^[58] apresentam um comportamento diferente, exibindo uma lenta nucleação que acaba coincidindo com o crescimento do cristal. Além disso, a maioria das sínteses de nanoMOFs ocorre em meios diluídos, o que torna difícil a discussão de resultados à luz do modelo de LaMer.

Dessa forma, a termodinâmica continua sendo fundamental para o entendimento sobre a nucleação e o crescimento de cristais de MOFs; porém, o tamanho do cristal parece estar mais ligado a um controle cinético através de parâmetros químicos que favorecem a terminação do cristal gerando partículas menores e mais homogêneas. As condições críticas para garantir a formação de MOFs em nanoescala envolve a depleção da concentração local de íons metálicos, permitindo que os ligantes finalizem o crescimento da partícula. De acordo com o autor, tais condições envolvem ligantes em excesso (ligante orgânico ou modulador¹), reagentes em concentrações diluídas, forte ligação entre metal-ligante e baixa atividade de prótons.^[59] No modelo cinético proposto por Marshall e colaboradores (ver Figura 11), a formação de cristais de MOFs em nanoescala depende da competição entre quatro equilíbrios

¹ Moduladores são tipicamente ácidos monocarboxílicos e em alguns casos bases de Brønsted, utilizados em sínteses de nanoMOFs. Sua principal função é influenciar o tamanho das MOFs através da interferência na desprotonação do ligante orgânico. Moduladores também são utilizados para prevenir a agregação de partículas.^[60]

químicos: (1) desprotonação do ligante; (2) desprotonação do modulador; (3) coordenação do ligante e (4) terminação do cristal.^[59]

Figura 11. Equilíbrios químicos por trás do controle do crescimento de cristais de MOFs segundo modelo cinético.

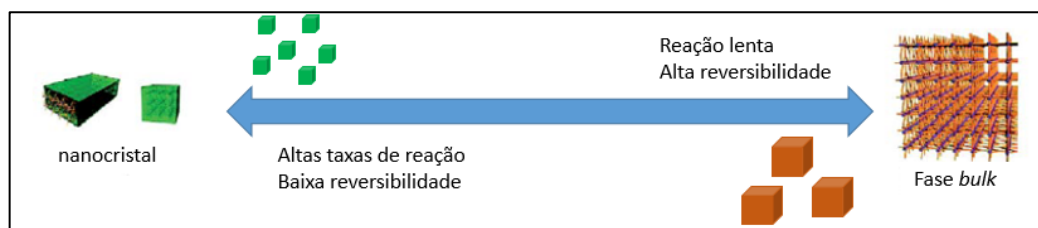


Fonte: Marshall, 2019.^[59]

Toda e qualquer estratégia deve ser baseada levando em conta esses quatro equilíbrios. Dessa forma, um equilíbrio que apresenta altas taxas de avanço e baixa reversibilidade tende a interromper rapidamente o crescimento para formar pequenos nanocristais ao invés de crescer de forma constante em direção à fase *bulk*, como mostra a Figura 12. Um exemplo clássico de baixa reversibilidade e taxa de reação elevada é a **UiO-66**,^[61] onde a reação entre o metal e o ligante apresenta intrinsecamente essa característica e por isso quando comparada com outras MOFs, a **UiO-66** tende a ter seu diâmetro reduzido.

De acordo com o equilíbrio 1 da Figura 11, o ligante orgânico deve ser desprotonado antes de formar ligações metal-ligante. Os moduladores por sua vez, que geralmente são ácidos fracos, também devem sofrer desprotonação (eq. 2). A coordenação entre os íons metálicos e os ligantes orgânicos torna possível o crescimento das partículas (eq. 3). O crescimento do cristal, portanto, é então dominado pela chegada de moléculas de reagentes solvatados. Por fim, durante a etapa de terminação (eq. 4) ligantes e moduladores competem pelos locais de coordenação dos íons metálicos. De acordo com o modelo, esse processo continuará até que a concentração local de ligante orgânico exceda muito a concentração de íons metálicos, o que de fato interromperá o crescimento do cristal.^[59]

Figura 12. Ilustração esquemática do comportamento das MOFs de acordo com a taxa de reação e reversibilidade.



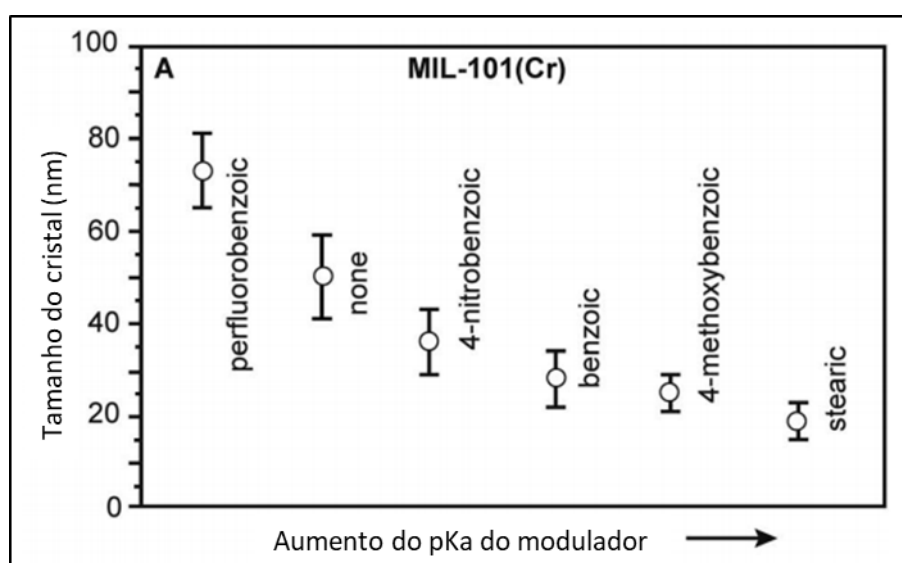
Fonte: Autor, 2021.

Como mencionado, existem alguns parâmetros-chave como concentração de reagentes e de modulador, a razão equivalente (r)² de modulador, os valores de pKa dos moduladores e a força de ligação metal-ligante, que tornam possível a depleção local da concentração de íons metálicos e devem ser levados em consideração no desenvolvimento de metodologias para controlar o tamanho das MOFs.

Em se tratando de moduladores, quando ácidos carboxílicos são utilizados, sua presença pode aumentar ou diminuir o tamanho das MOFs dependendo se irão impedir a desprotonação do ligante (eq. 1) ou atuar como agentes de terminação (eq. 4). Ao interferir na desprotonação, os moduladores acabam diminuindo a taxa de complexação metal-ligante (eq. 3) quando comparada à difusão do íon metálico no meio, resultando em MOFs com diâmetro maior. Por outro lado, podem gerar partículas menores ao agirem na superfície do cristal impedindo seu crescimento. Vale ressaltar que quanto menos ácido for o modulador, menor será a quantidade de prótons disponíveis no meio para a protonação do ligante, deslocando o equilíbrio 1 para a direita.^[59]

Em 2011, Jiang e colaboradores realizaram a síntese de nanopartículas da MOF **MIL-101(Cr)** adicionando 0,33 equivalentes de diferentes moduladores ácidos ao meio reacional.^[63] Pode ser observado a partir da Figura 13, que a adição de ácidos mais fracos (pKa maiores) como o ácido 4-nitrobenzóico, ácido benzoico, ácido 4-metoxibenzóico e ácido esteárico levou à produção de partículas com menores tamanhos.

Figura 13. Diminuição do tamanho dos cristais da MOF **MIL-101(Cr)** com o aumento do pKa do modulador utilizado.



Fonte: Jiang, 2011.^[63]

² Razão entre a quantidade em mols de modulador e a quantidade em mols de ligante orgânico.^[62]

De forma geral, a utilização de pequenas quantidades de ácidos fracos como moduladores leva à diminuição do tamanho dos cristais até certo ponto, quando a atividade de prótons em solução atinge um dado valor que começa a interferir na desprotonação do ligante orgânico, gerando partículas maiores.^[63]

A interação entre o metal e o ligante orgânico também deve ser levada em conta dentro da perspectiva do modelo cinético. Fortes interações metal-ligante favorecem a geração de partículas menores uma vez que elas aumentam as taxas de complexação (eq. 3) e terminação (eq. 4) durante o crescimento dos cristais, esgotando dessa forma, as concentrações locais dos íons metálicos em relação aos ligantes e moduladores.^[59] Por fim, vale ainda destacar que diversos métodos de síntese alternativos vêm sendo utilizados em complemento ao modelo cinético na preparação de partículas de MOFs menores e mais homogêneas, incluindo a utilização de micro-ondas e ultrassom.

2.4. Aplicação de MOFs como Sistemas de Liberação de Fármacos (SLF)

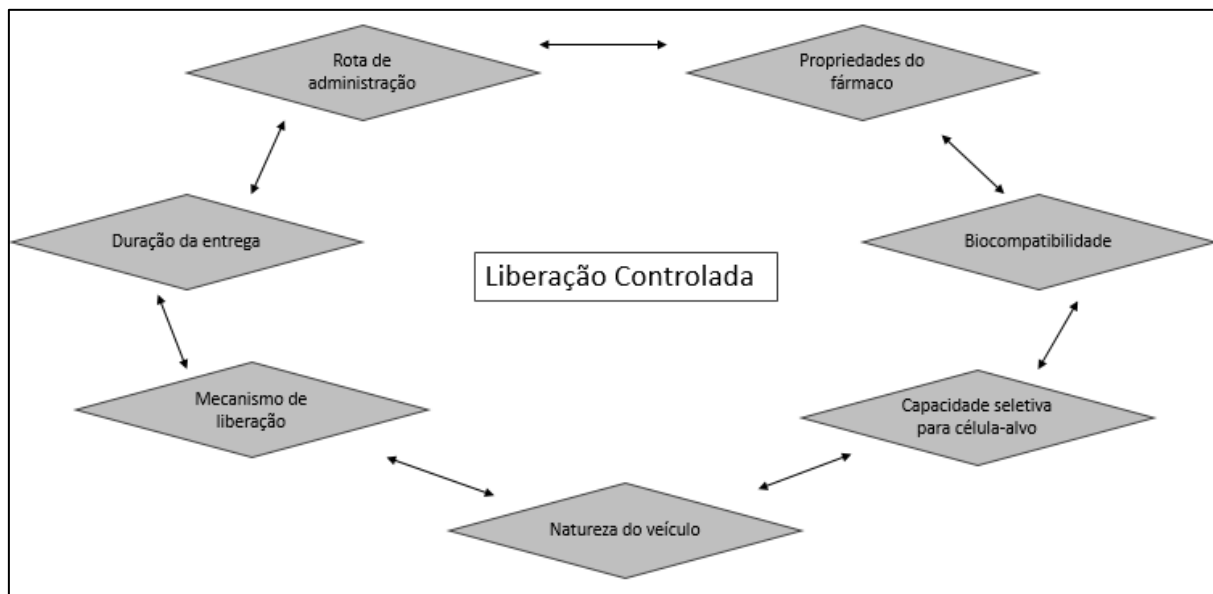
Sistemas de liberação de fármacos (em inglês, *drug delivery systems*) podem ser definidos como dispositivos capazes de introduzir moléculas bioativas para dentro do corpo humano. Quando um agente terapêutico é administrado, seja por via oral ou sistêmica, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo, sendo grande parte do montante desperdiçada devido ao processo de biodistribuição para outros tecidos, metabolização e excreção antes de atingir o local desejado, e, portanto, é natural que grande parte dos fármacos apresente um baixo tempo de meia-vida após administração.^[64]

Nesse contexto, dentro da era moderna da Medicina, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de novas plataformas terapêuticas as quais permitam manter concentrações plasmáticas ideais dos fármacos, diminuindo flutuações entre doses e conseqüentemente a necessidade de administração frequente, o que impacta de forma direta na adesão do paciente ao tratamento. Além disso, busca-se um controle sobre a liberação dos fármacos, tornando possível melhorar a eficiência terapêutica do medicamento e ao mesmo tempo reduzir seus efeitos tóxicos ao aumentar a quantidade e a persistência do medicamento sobre a vizinhança das células-alvo, enquanto reduz a exposição do medicamento às células não-alvo.^[64,65]

Um sistema de entrega controlada de medicamento requer consideração simultânea de vários fatores, como a propriedade do medicamento, a via de administração, a natureza do

veículo de entrega, o mecanismo de liberação do medicamento, a capacidade de direcionamento e sua biocompatibilidade,^[64] dentre outros, como ilustra a Figura 14.

Figura 14. Requisitos a serem levados em consideração na avaliação de sistemas de liberação controlada.



Fonte: Adaptado de Paolino, 2006.^[64]

Diversos tipos de sistemas (orgânicos e inorgânicos) têm sido desenvolvidos para aplicação no carregamento e liberação controlada de fármacos. Cabe aqui o destaque para o emprego de lipossomas no carregamento de cisplatina para tratamento de câncer de pulmão,^[66,67] nanopartículas de sílica porosa no carregamento do fármaco anticâncer camptotecina,^[68] micelas orgânicas no carregamento do hormônio diidrotestosterona^[69] e nanopartículas poliméricas no carregamento do anticâncer docetaxel.^[70]

Entretanto, estes sistemas apresentam uma ou mais desvantagens como instabilidade, baixa solubilidade, baixa capacidade de incorporação, biodistribuição inadequada, alta resposta imunológica e toxicidade, quando comparados às MOFs, as quais apresentam certas propriedades, já citadas anteriormente, que favorecem a superação dessas barreiras farmacológicas.^[71] Ao longo do século, com o trabalho pioneiro de Horcajada e colaboradores em 2006^[72] avaliando o carregamento de ibuprofeno em duas MOFs distintas **MIL-100** e **MIL-101**, o número de publicações envolvendo MOFs em *drug delivery* cresceu exponencialmente, ultrapassando 1200 publicações já em 2015.^[73]

A Tabela 1 resume dados importantes de grandes estudos envolvendo a aplicação das MOFs como SLFs em *drug delivery*. Vale a pena destacar o estudo realizado por Rojas e colaboradores, que avaliaram o potencial de carregamento e o perfil de liberação de dois

fármacos anticancerígenos em uma matriz porosa a base de Zn(II).^[75] Foram observados, em alguns casos, perfis interessantes de liberação controlada, bastante desejado na terapia contra o câncer.

Tabela 1. Dados referentes a estudos utilizando MOFs como sistemas de liberação de fármacos.

MOF	Fármaco/Atividade	Carregamento	Liberação	Meio	Ref
UiO-66	Calceína/Marcador fluorescente	0,16 g g ⁻¹	100% - 30 h	PBS	[74]
MIL-100	Ibuprofeno/Antiinflamatório	0,35 g g ⁻¹	100% - 72 h	PBS	[72]
MIL-101	Ibuprofeno/Antiinflamatório	1,4 g g ⁻¹	100% - 144 h	PBS	[72]
bio-MOF-1	Procainamida/Arritmia cardíaca	0,22 g g ⁻¹	100% - 72 h	PBS	[39]
ZnBDP_H	RAPTA-C*/anticâncer	0,55 g g ⁻¹	40% - 50 h	PBS	[75]
	Mitoxantrona/anticâncer	0,50 g g ⁻¹	-	-	
ZnBDP_NH ₂	RAPTA-C*/anticâncer	0,11 g g ⁻¹	60% - 50h	PBS	[75]
	Mitoxantrona/anticâncer	0,20 g g ⁻¹	-	-	

*RAPTA-C = [Ru(*p*-cymene)Cl₂(pta)] – (pta = 1,3,5-triaza-7-phospaadamantane)

O câncer é uma ameaça à saúde dos seres humanos causando milhões de mortes anualmente. Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, o câncer é a segunda principal causa de morte no país, onde matou mais de 250 mil pessoas em 2017, perdendo apenas para doenças cardiovasculares.^[76] A quimioterapia ainda é o método de tratamento dominante. No entanto, a administração direta tradicional de medicamentos terapêuticos a pacientes vem sendo questionada devido a limitações intrínsecas, incluindo efeitos colaterais indesejáveis, farmacocinética deficiente e biodistribuição insuficiente. Assim, esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novas plataformas de drogas para liberação controlada de medicamentos que consigam alcançar efeitos colaterais reduzidos e eficácia terapêutica aumentada.^[77,78]

Desde a descoberta da atividade anticancerígena da Cisplatina, fármacos a base de platina tem mostrado grande importância no tratamento de neoplasias e agora são vastamente utilizados na terapia para tratar diversos tipos de tumores sólidos incluindo de ovários, colorretal e pulmão. Embora esse tipo de fármaco apresente grande eficácia, também tem mostrado algumas desvantagens como resistência à droga, neurotoxicidade e nefrotoxicidade.^[79] Na tentativa de minimizar esses fatores, novos tipos de complexos metálicos, vêm sendo estudados. Nesse sentido uma nova série de complexos metálicos a base de rutênio com importante atividade antitumoral vem emergindo. Segundo Rojas, o sucesso

desses novos metalofármacos a base de rutênio repousa no fato de sua habilidade em interagir com diferentes alvos biológicos e interferir em diversos processos fisiológicos redox, promovendo uma combinação de mecanismos de ação.^[75]

Frente ao exposto, foi realizada a síntese da **bio-MOF-1**, uma MOF biocompatível a base de zinco(II), e seu potencial para *drug delivery* foi avaliado. A incorporação do complexo catiônico *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(solv)](PF₆), aqui denominado de **Ru-90**, no interior dos poros da **bio-MOF-1** também foi realizada. O metalofármaco **Ru-90** é um candidato ideal para a administração com liberação controlada uma vez que a matriz porosa da **bio-MOF-1** apresenta afinidade sobre moléculas catiônicas ao mesmo tempo em que oferece proteção contra uma rápida biodegradação, minimiza efeitos colaterais, aumenta a solubilidade da substância e garante concentrações satisfatórias nos locais de ação. A miniaturização do material em nanoescala também foi objeto de estudo, uma vez que a internalização celular eficaz e a liberação intracelular de biomoléculas com atividade terapêutica são características intrínsecas aos sistemas de liberação nanoparticulados, o que aumenta consideravelmente a citotoxicidade de fármacos anticancerígenos.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho é sintetizar e caracterizar uma BioMOF a base de zinco(II), adenina e ácido 4-4'bifenildicarboxílico (bpdc), bem como investigar seu potencial em *drug delivery* utilizando um metalofármaco baseado em íons rutênio(II).

3.1. Objetivos específicos

- Estudar o efeito do pH sobre a liberação do fármaco **Ru-90** da matriz porosa da **bio-MOF-1**.
- Avaliar o efeito da utilização da síntese assistida por micro-ondas sobre o tamanho dos cristais da **bio-MOF-1**.
- Avaliar o efeito da utilização de moduladores de coordenação (ácido acético e piridina) sobre o tamanho dos cristais da **bio-MOF-1**.
- Realizar estudos de citotoxicidade *in vitro* do fármaco **Ru-90** em sua forma livre e incorporado à matriz da **bio-MOF-1**.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais

Todos os reagentes e solventes usados nesse trabalho estão compilados na Tabela 2 e por apresentarem elevada pureza, foram utilizados sem nenhum tratamento ou purificação prévia.

Tabela 2. Materiais utilizados no estudo.

Material	Procedência
Acetato de zinco(II) diidratado	Vetec
Ácido Nítrico	Vetec
Adenina	Sigma-Aldrich
Ácido 4-4'-Bifenildicarboxílico (bpdc)	Sigma-Aldrich
N,N-Dimetilformamida (DMF)	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Synth
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	Synth
Hidróxido de sódio (NaOH)	Synth
Cloreto de rutênio(III) triidratado	Aldrich Chemicals
2,2'-bipiridina	Aldrich Chemicals
Linhagem celular A375	ATCC, Mannassas, VA, EUA
Linhagem celular L929	Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil
RPMI 1640	Invitrogen, EUA
DMEM	Invitrogen, EUA
Soro Fetal Bovino (FBS)	Invitrogen, EUA
Penicilina-estreptomicina	Invitrogen, EUA

Fonte: Autor, 2021.

4.2. Sínteses

4.2.1. Síntese do complexo Ru-90

O complexo *cis*-[RuCl₂(bpy)₂].2H₂O foi preparado segundo a metodologia apresentada por Dwyer e colaboradores.^[82] Os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)₂].H₂O e *cis*-

[Ru(bpy)₂(-NO₂)(NO)](PF₆) foram preparados conforme descrito por Meyer e colaboradores.^[83] Com base na síntese do complexo *cis*-[RuL(bpy)₂(NO)](PF₆)₂ (L = 4-pic, py, 4-acpy),^[84] o preparo do complexo **Ru-90** foi realizado. Resumidamente, o sal *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(NO)](PF₆) (0,128 mmol L⁻¹) dissolvido em 20 mL de acetona. Uma quantidade equimolar de NaN₃ (0,130 mmol L⁻¹) foi então dissolvida em 3 mL de metanol e adicionado gota a gota à solução. Após 30 minutos, 250 mL de Et₂O anidro foram adicionados para produzir um precipitado avermelhado que foi então coletado e lavado com Et₂O.

4.2.2. Síntese da bio-MOF-1

Os cristais foram preparados pelo método solvotérmico. Para esta finalidade, adenina (0,125 mmol), bpdc (0,25 mmol), acetato de zinco diidratado (0,375 mmol), ácido nítrico (1 mmol) e DMF/Metanol (1:1, 14 mL) foram adicionados a um copo teflon® de 20 mL e mantidos sob agitação por 30 minutos. O copo foi então selado em um reator e a mistura resultante aquecida a 130°C por 24 horas. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o pó branco microcristalino resultante foi lavado três vezes com uma mistura DMF/Metanol (1:1), filtrado e então seco sob vácuo durante 8 horas. Por fim, os poros do material foram ativados através da aplicação de vácuo (50 mbar) à 130°C por mais 24 horas.

4.2.3. Síntese de MOFs à base de zinco(II) com auxílio de moduladores

Nessa etapa, foi empregada a mesma metodologia de síntese utilizada no preparo da **bio-MOF-1**. Após colocar todos os reagentes no copo teflon®, foram adicionados diferentes concentrações de ácido acético e piridina como agentes moduladores. O fator *r* (onde *r* é definido aqui como a razão entre a concentração de modulador e ligante) para o ácido acético foi de 2, 5, 10, 15 e 100 e para a piridina foi de 2, 10, 30, 50 e 100. Por fim, os poros do material foram ativados através da aplicação de vácuo (50 mbar) à 130°C por mais 24 horas.

4.2.4. Síntese de MOFs à base de zinco(II) com auxílio de moduladores usando síntese solvotérmica assistida por micro-ondas

A síntese assistida por micro-ondas foi realizada utilizando um Micro-ondas Discover SP/CEM. Adenina (0,125 mmol), bpdc (0,25 mmol), acetato de zinco(II) diidratado (0,375 mmol), ácido nítrico (1 mmol), DMF (13,5 mL) e água destilada (1 mL) foram adicionados a um tubo de vidro adequado de 35 mL. A solução resultante foi aquecida durante 10 min até

dissolução total dos reagentes; ao final da dissolução adicionou-se diferentes concentrações de ácido acético e piridina como agentes moduladores. O fator r para a piridina foi 50 e 100. O tubo foi então selado e colocado no dispositivo, onde permaneceu a 130°C durante 30 min. Após o tempo de reação, o produto foi isolado por centrifugação e o precipitado, lavado três vezes com DMF, e então seco sob vácuo durante 8h. Por fim, os poros do material foram ativados através da aplicação de vácuo (50 mbar) à 130°C por mais 24 horas.

4.3. Caracterizações

4.3.1. 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 pastilha de KBr.

4.3.2. Difração de raios-X de pó (DRX)

Os difratogramas foram obtidos utilizando um difratômetro Rigaku Rint 2000, à temperatura ambiente, sob radiação de $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), com potência de 40 kV e corrente elétrica de 50 mA, instalado do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química – UNESP Araraquara. Os espectros das amostras foram obtidos com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4° e 70° e velocidade do goniômetro de 0,02°/min.

4.3.3. 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 e coberta com uma fina camada de carbono.

4.3.4. Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas TG-DSC foram obtidas utilizando um sistema de análise térmica da Mettler Toledo, modelo TG/DSC-1. A atmosfera será de gás inerte (N_2) como gás de purga a uma vazão de 50 mL min^{-1} , massa da amostra de aproximadamente 10 mg e cadinhos de $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$ de 70 μL , razão de aquecimento de 10°C min^{-1} e intervalo de temperatura de 30 – 1000 °C.

4.3.5. Análise de porosidade via isotermas de fisissorção de N₂

Foi determinada usando o equipamento ASAP 2010- MICROMETRICS. As amostras foram pré-tratadas a 100°C sob vácuo da ordem de 10⁻³ mmHg, durante 24 h, para eliminar vapores adsorvidos nas cavidades. Importante salientar que antes da realização dessas medidas, os materiais foram previamente ativados em estufa a vácuo, por 24h e temperatura de 130 °C, com a finalidade de retirar as moléculas de solvente presentes nos poros dos MOFs.

4.4. Estudo de estabilidade química

A estabilidade química da **bio-MOF-1** foi avaliada suspendendo aproximadamente 4 mg do material em 10 mL de solução aquosa em pH 5,0 e pH 7,4. A suspensão então foi mantida sob agitação constante em um Thermo Mixer Kasvi à 37°C, e após os tempos de 4 h e 12 h o material foi filtrado e realizada a difração de raios-x de pó.

4.5. Curvas de calibração

Com o intuito de garantir a quantificação do **Ru-90** ao longo dos ensaios de incorporação e liberação, a metodologia proposta foi testada, baseando-se na Resolução RE n° 166, Brasil, 2017.^[85] Os experimentos foram realizados seguindo a metodologia proposta por Saaia e colaboradores,^[81] em cromatógrafo SPD M20A (Shimadzu), equipado com detector DAD, detecção em 440 nm, com bomba LC-20A, instalado no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP Araraquara. A separação foi realizada em coluna C18 de fase reversa (Luna, Phenomenex) 250 x 4,60 mm (5 µm). Foi utilizada eluição isocrática com 20:80 de metanol e água deionizada contendo 0,1% de ácido fórmico, pH=3 com vazão de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 5 µL e temperatura ajustada à 33°C.

Para testar a metodologia avaliou-se as seguintes figuras de mérito: linearidade e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), conforme descrito na Resolução n°166, 2017.

4.5.1. Linearidade

A linearidade, tanto nos ensaios de incorporação como liberação, foi avaliada pela construção de três curvas analíticas, determinada pela análise de sete níveis de concentrações diferentes em três dias diferentes. Para ensaios de incorporação, pesou-se 10 mg de padrão de **Ru-90** diluindo em 100 mL de água Mili-Q com 2% de DMSO, para obter uma solução

estoque de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de **Ru-90**. A partir dessa solução estoque foram realizadas seis diluições, totalizando sete pontos: 10; 20; 30; 50; 65; 80 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções padrão foram preparadas em triplicata e para cada concentração descrita, foram realizadas três injeções previamente filtradas em membrana filtrante de $0,22 \mu\text{m}$. O mesmo procedimento foi utilizado nos ensaios de liberação, utilizando tampão fosfato (PBS) como solvente para a preparação das soluções padrão, em dois pHs distintos (5.0 e 7.4). A partir da média dos valores das áreas encontradas e das concentrações testadas para as três curvas a equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e calculada a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a validade dos parâmetros estatísticos.

4.5.2. Precisão – Repetibilidade

A precisão intracorrida ou repetibilidade foi avaliada usando três concentrações diferentes da curva analítica (20, 50 e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$), no mesmo dia sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5.3. Precisão Intermediária - Reprodutibilidade

A precisão intercorrida ou intermediária foi realizada nas mesmas condições, com analistas diferentes em dias diferentes e consecutivos. Os resultados foram analisados através do coeficiente de variação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6. Encapsulamento do Ru-90 nos poros da matriz de Zn(II) (bio-MOF-1)

Primeiramente, uma solução de **Ru-90** foi preparada com água (2% DMSO) numa concentração de $333,33 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os ensaios foram realizados utilizando uma técnica de impregnação. Para esse objetivo, 20 mg da **bio-MOF-1** ativada foram suspensos na solução de **Ru-90** (0,5:1 mg **Ru-90**/ mg **bio-MOF-1**) sob agitação em temperatura ambiente ao longo de 24 horas. Em seguida, a suspensão resultante, de coloração alaranjada, foi submetida à centrifugação (6000 rpm durante 15 minutos). O sobrenadante foi então coletado e submetido à análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) para determinação indireta da quantidade de **Ru-90** incorporada, como mostra a Equação 1.

$$Q(\%) = \frac{Ru_{(i)} - Ru_{(s)}}{Ru_{(i)}} \cdot 100 \quad [1]$$

onde, $Ru_{(i)}$ é a concentração inicial de **Ru-90** ($333,33 \mu\text{g mL}^{-1}$) e $Ru_{(s)}$ é a concentração de **Ru-90** no sobrenadante após o ensaio de encapsulamento. O *pellet* obtido após centrifugação e separação do sobrenadante foi lavado três vezes com uma solução de água (2% DMSO) para retirar o excesso de **Ru-90** presente na superfície da **bio-MOF-1**. Após secagem, o pó alaranjado agora designado de **Ru-90@bio-MOF-1** foi submetido à espectroscopia no infravermelho, difração de raios-x de pó e análise térmica.

4.7. Ensaio de liberação *in vitro* do Ru-90

Os perfis de liberação *in vitro* do fármaco **Ru-90** foram obtidos com o auxílio de um Thermo Mixer Kasvi. A liberação foi realizada em solução tampão PBS, em pH 5,0 (pH endossomal de células cancerígenas) e em pH 7,4 (pH fisiológico), ambas à $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação constante (300 rpm). Para isso, foram adicionados entre 6,5-7 mg de material incorporado **Ru-90@bio-MOF-1** em 12 mL de meio receptor. A quantidade de **Ru-90** liberada no meio foi determinada através de CLAE-DAD. Alíquotas foram retiradas depois de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h. Para cada alíquota retirada, uma quantidade idêntica de meio receptor foi imediatamente adicionada, afim de se manter constante o volume.

4.8. Ensaio de viabilidade celular

As linhagens tumoral de melanoma humano A375 e não tumoral L929 (fibroblastos) foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm^3 , com meio de cultura RPMI-1640 (Gibco® com 25,0 mM de HEPES, L-glutamina e sem bicarbonato de sódio), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. Foram mantidas em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 até serem utilizadas no experimento. Após 80% de confluência das células nas garrafas, estas foram tripsinizadas, contadas (câmara de Neubauer) e posteriormente semeadas 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços. Após o período de incubação de 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos respectivos complexos, sendo o complexo **Ru-90** dissolvido em DMSO e **bio-MOF-1** e **Ru-90@bio-MOF-1** em tampão PBS. As concentrações utilizadas foram de $100 \mu\text{M}$ até $0,78 \mu\text{M}$ e a porcentagem de DMSO por poço foi no máximo 1%. Após o período de 24 h de incubação, foi adicionado uma solução de MTT ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Durante 3 horas, ocorre a formação de cristais de formazan em células viáveis. Este processo envolve o processo de conversão via enzimas redutimétricas mitocondriais do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (MTT), em

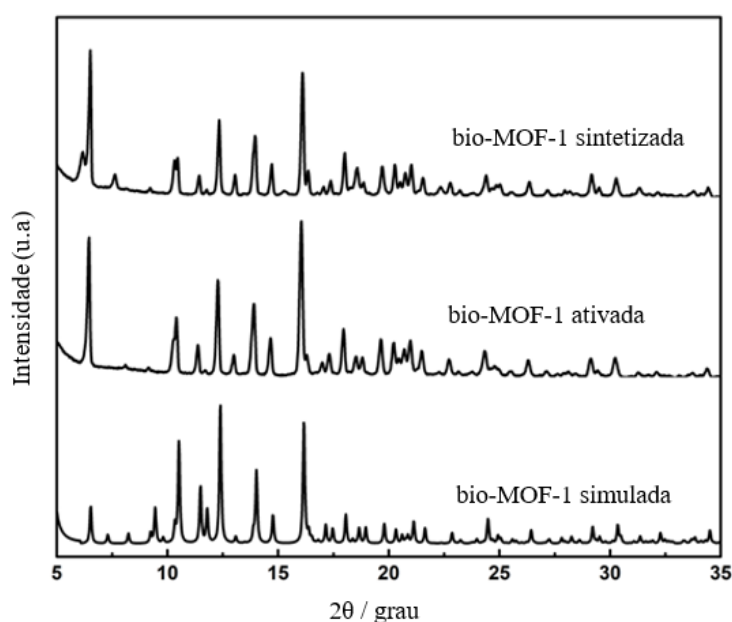
um sal de coloração coloração violeta ($\lambda_{\text{máx}} = 490 \text{ nm}$) o formazan, solúvel em solventes orgânico. Após o período de incubação, a solução de MTT foi retirada e os cristais formados foram solubilizados em 100 μL de DMSO. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada através da divisão da absorbância média das células tratadas com os compostos pela absorbância média do controle. A porcentagem de viabilidade celular *versus* a concentração de fármaco (escala logarítmica) foi calculada através da Equação de Hill no *software* GraphPad Prism (versão 8.0) para determinar a concentração de fármaco que inibe 50% da viabilidade celular referente ao controle (IC_{50}) já com os erros estimados relativo à média dos três experimentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese da bio-MOF-1

A reação entre o metal precursor $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com os ligantes adenina e bpdc sob condições solvotérmicas gerou um pó branco microcristalino. A Figura 15 apresenta os padrões de difração de raios-X de pó para as amostras da MOF como sintetizada e após o processo de ativação, como também o padrão simulado para a **bio-MOF-1**. Pode-se observar nestes padrões os picos de Bragg típicos da topologia da **bio-MOF-1**,^[39] indicando não apenas que houve a formação da fase desejada como também que o processo de ativação não modificou a cristalinidade do material.

Figura 15. Padrões de raios-X de pó dos cristais da **bio-MOF-1 sintetizada**, **bio-MOF-1 ativada** e **bio-MOF-1 simulada**.



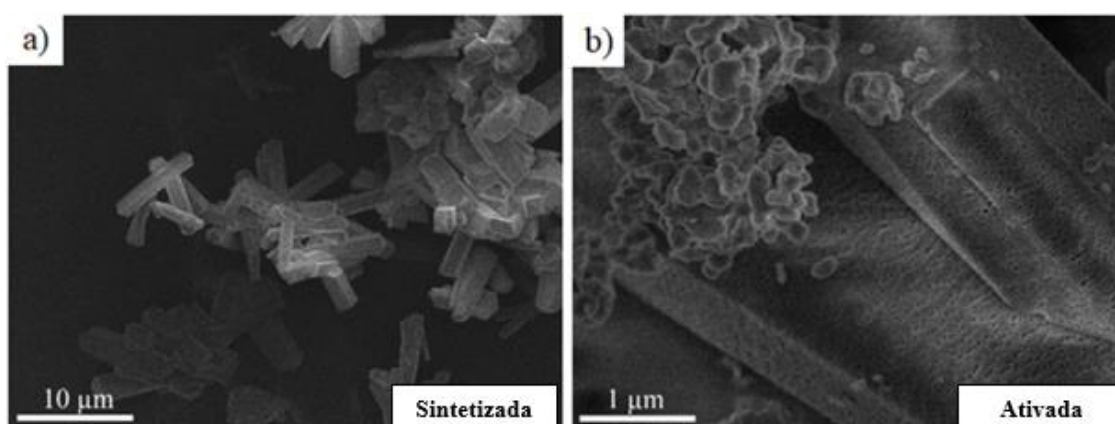
Fonte: Autor, 2021.

As imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) foram obtidas e estão ilustradas na Figura 16. Como pode ser visto na Figura 16a, o material é organizado na forma de bastões (*rod-like particles*) que variam entre 5 - 9 μm em média. Com base na Figura 16b, registrada após o processo de ativação (50 mbar, 130 $^{\circ}\text{C}$, 24h), é possível observar uma porosidade superficial bem como a presença de uma segunda fase, não detectada no DRX de pó, muito provavelmente devido à baixa quantidade.

Com o intuito de confirmar a porosidade da **bio-MOF-1**, a avaliação textural do composto ativado foi realizada através da análise de adsorção-dessorção de N_2 a 77K. A

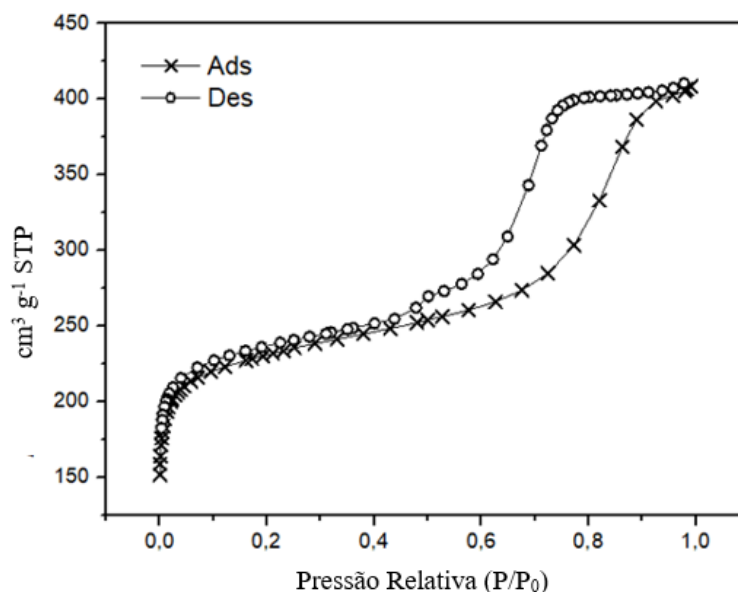
adsorção de gás pela MOF revelou uma área específica de aproximadamente $796 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ contendo microporos e mesoporos com volumes de $0,24 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (calculado via *t-plot*) e $0,57 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (calculado via BET), respectivamente. Como pode ser visto na Figura 17, a amostra da **bio-MOF-1 ativada** apresenta uma isoterma do tipo I com tipo IV - dado que em baixas pressões relativas, já ocorre bastante adsorção, típico de material microporoso - com um *loop* de histerese do tipo H2, que está associada com o preenchimento completo dos mesoporos através de um processo secundário de condensação capilar. Tal comportamento é típico de materiais que apresentam uma rede com poros interconectados.^[86,87] Os dados de fisissorção de N_2 estão de acordo com o trabalho anterior proposto por Lucena e colaboradores,^[31] onde também foi obtida uma estrutura porosa hierárquica para a **bio-MOF-1**. Nesse sentido, os resultados tornam-se promissores, uma vez que materiais com poros interconectados parecem ser mais eficientes em termos de difusão de moléculas,^[88,89] o que é uma característica muito desejável para sistemas de *drug delivery*.

Figura 16. Imagens da microscopia eletrônica de varredura de amostras da (a) **bio-MOF-1 sintetizada** e (b) **bio-MOF-1 ativada** mostrando a formação de defeitos na superfície causados pelo processo de ativação.



Fonte: Autor, 2021.

Figura 17. Isotermas de fisissorção de N₂ para a **bio-MOF-1 ativada**. (Símbolos em forma de X representam o processo de adsorção; símbolos em forma de O representam o processo de dessorção).



Fonte: Autor, 2021.

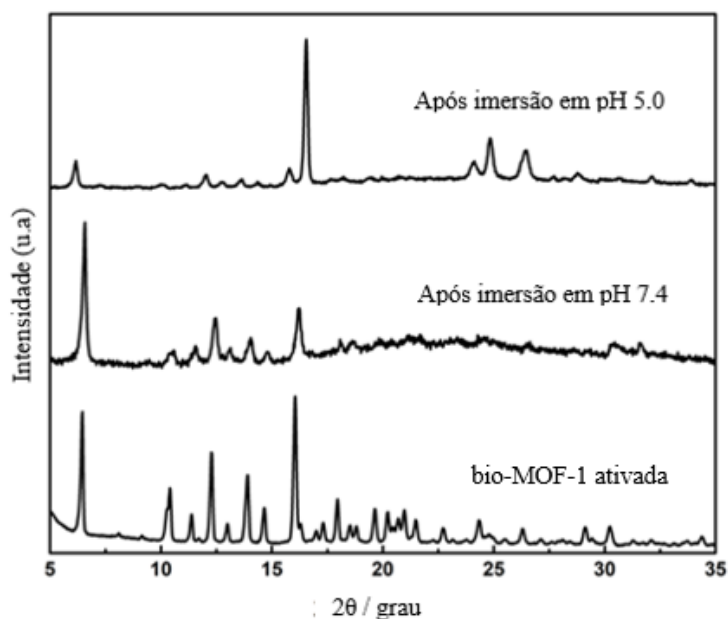
5.2. Estabilidade química da bio-MOF-1

Embora não haja um método padrão de avaliação da estabilidade química de MOFs em meio ácido, básico ou neutro, a técnica de difração de raios-X de pó frequentemente é utilizada para comparar os padrões de difração antes e após os ensaios de estabilidade. Além disso, não há um consenso sobre os tempos de imersão e temperatura que devam ser empregados,^[90-92] e, portanto, comparação entre estudos se torna problemática. Nesse estudo, a estabilidade da **bio-MOF-1** foi avaliada sob condições experimentais que simularam ambas condições fisiológicas (pH = 7,4) e patológicas (pH = 5,0) à 37 °C. E os resultados mostraram que a estrutura da **bio-MOF-1** foi mantida após cinco dias de imersão, através da análise dos respectivos padrões de difração mostrados na Figura 18.

Segundo o estudo realizado por An e colaboradores,^[31] mesmo após a imersão em solução tampão PBS (pH = 7,4) durante 14 dias, o padrão de difração da **bio-MOF-1** não foi alterado e sua cristalinidade foi mantida. Contudo, o padrão de difração aqui obtido para a **bio-MOF-1** após imersão em solução PBS (pH = 7,4) após 5 dias revelou uma tendência à diminuição de sua cristalinidade com alargamento significativo de seus picos e redução de suas intensidades, o que sugere uma degradação inicial de sua estrutura. Esse resultado pode estar relacionado com o processo de ativação da **bio-MOF-1** realizado nesse estudo, o qual pode ter enfraquecido a estrutura e afetado sua estabilidade. Por outro lado, mesmo que a cristalinidade da **bio-MOF-1** tenha sido mantida, é possível observar um padrão de difração

diferente após contato com solução tampão PBS (pH = 5,0) por 5 dias, sugerindo que a matriz $[(Zn_8(\text{adenine})_4(\text{bpdc})_6\text{O})] \cdot 2\text{Me}_2\text{NH}_2 \cdot 8\text{DMF} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ possa ter experimentado uma transição de fase.

Figura 18. Padrões de raios-X de pó dos cristais da **bio-MOF-1 ativada** antes e após imersão à 37°C durante 5 dias em pH 7,4 e pH 5,0.



Fonte: Autor, 2021.

5.3. Tentativa de miniaturização das partículas da bio-MOF-1 para escala nanométrica

Nessa etapa, foi avaliado o efeito da utilização da radiação micro-ondas e do uso de agentes moduladores sobre o tamanho e a morfologia de cristais da **bio-MOF-1**. Dependendo da técnica de síntese e do tipo de modulador utilizado, os compostos foram denominados por **Zn_HAc**, **Zn_pyd** e **Zn_pyd_{micro}**.

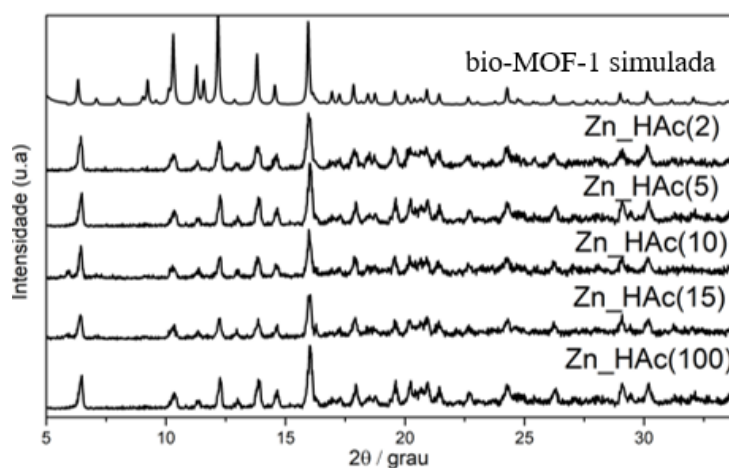
5.3.1. Uso de moduladores de coordenação

O uso de agentes moduladores para o controle do crescimento de cristais já é bem conhecido e amplamente utilizado em síntese de materiais. Especificamente na síntese de MOFs, promovem uma competição com os ligantes orgânicos pelos centros metálicos. Essa competição pode tanto favorecer o crescimento do cristal em uma determinada direção como impedir o seu crescimento.^[93, 94] Neste trabalho, ácido acético foi selecionado por apresentar o mesmo grupo funcional do ligante orgânico bpdc, e portanto, era esperado uma boa interação com os centros metálicos de Zn(II). Por sua vez, a piridina foi utilizada na tentativa de

estimular uma competição com o ligante adenina, uma base nitrogenada. Ambos apresentam grupos nitrogenados doadores de elétrons.

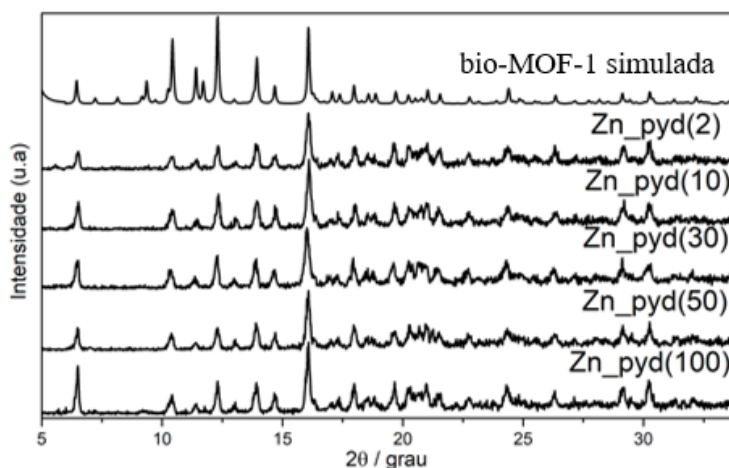
A síntese solvotérmica convencional utilizando diferentes concentrações dos moduladores ácido acético e piridina, com $r = 2, 5, 10, 15$ e 100 para o ácido acético e $r = 2, 10, 30, 50$ e 100 para a piridina, produziu uma família de compostos (amostras **Zn_HAc** e **Zn_pyd**, respectivamente) precipitados na forma de pós brancos. As Figuras 19 e 20 mostram os padrões de difração de raios-X de pó para as séries **Zn-HAc** e **Zn_pyd**, respectivamente, bem como o padrão simulado para a **bio-MOF-1**. Observando os padrões é possível notar que de fato houve a formação da fase desejada uma vez que os picos de Bragg, característicos da topologia da **bio-MOF-1**,^[39] foram mantidos tanto para a família **Zn_HAc** quanto para **Zn_pyd**.

Figura 19. Padrões de raios-X de pó da série **Zn_HAc** e da **bio-MOF-1** simulada.



Fonte: Autor, 2021.

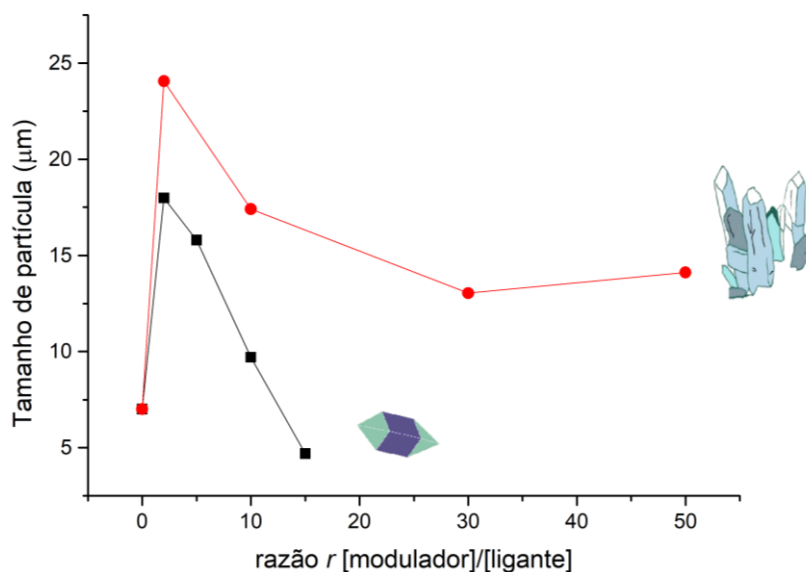
Figura 20. Padrões de raios-X de pó da série **Zn_pyd** e da **bio-MOF-1** simulada.



Fonte: Autor, 2021.

A Figura 21 ilustra o comportamento do tamanho das partículas das séries **Zn_HAc** e **Zn_pyd** à medida em que r sofre incrementos positivos. Pode-se observar que r parece influenciar igualmente o tamanho das partículas de ambas as séries, dada a tendência apresentada nos gráficos. Entretanto, a redução do tamanho observada para a série **Zn_HAc** (linha preta) foi mais pronunciada do que para a série **Zn_pyd** (linha vermelha).

Figura 21. Influência de r sobre o tamanho das partículas de MOFs à base de zinco(II). Linha preta: **Zn_HAc**; Linha vermelha: **Zn_pyd**.



Fonte: Autor, 2021.

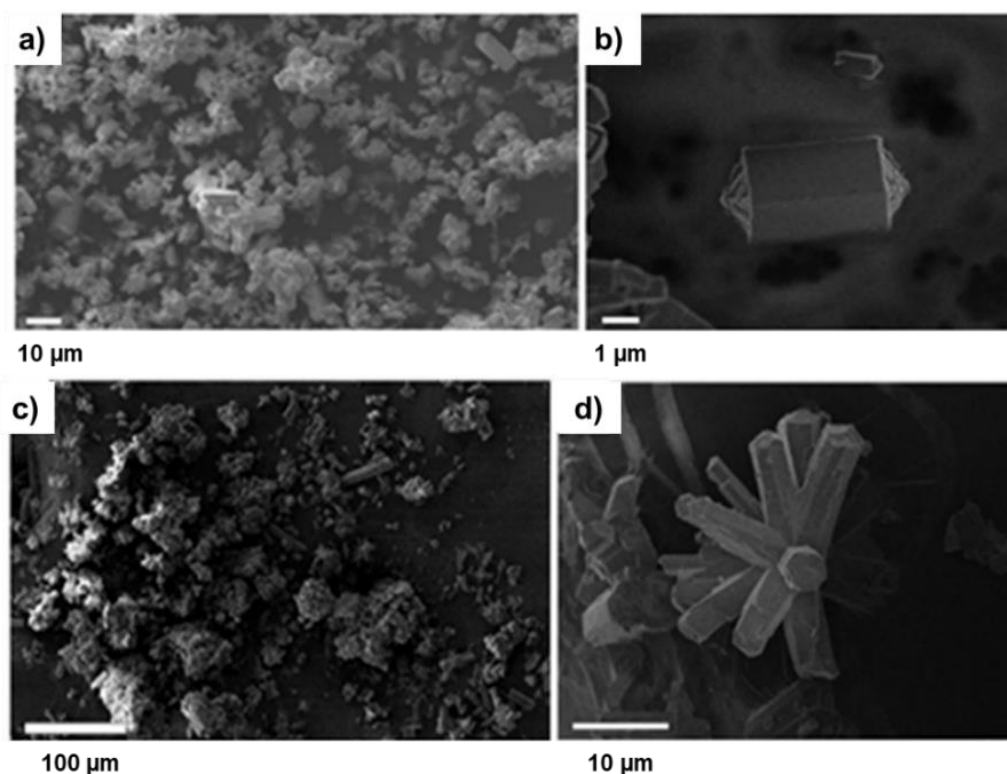
Com relação à influência da razão r no tamanho dos cristais, nota-se inicialmente, um aumento das partículas de MOFs em ambas as séries. No entanto, conforme incrementos adicionais de r vão sendo utilizados, foi observada, de forma geral, uma diminuição do tamanho dos cristais, principalmente para a série **Zn_HAc**.

Tal comportamento pode ser explicado pelo modelo cinético ilustrado na Figura 11. Como apresentado na Introdução desse trabalho, a presença de moduladores pode aumentar ou diminuir o tamanho do cristal dependendo se irão impedir a desprotonação do ligante (Fig. 11, eq. 1) ou atuar como agentes de terminação do cristal (Fig. 11, eq. 4). Interferindo na desprotonação, ácido acético e piridina tendem a diminuir a taxa de complexação do ligante (Fig. 11, eq. 3), resultando em partículas maiores (Fig. 21, $r = 2$). Por outro lado, podem restringir o crescimento do cristal se passando por agentes de terminação (Fig. 21, $r = 5-50$).^[59]

O uso dos moduladores de coordenação nesse trabalho também exerceu um papel sobre a forma das partículas. A influência dos moduladores na morfologia dos cristais pode

ser observada nas imagens MEV-FEG ilustradas na Figura 22. Enquanto a utilização de ácido acético produziu partículas na forma de prismas isolados (Fig. 22b), o uso da piridina levou à produção, majoritariamente, de partículas na forma de bastões concêntricos (Fig. 22d). A ação da piridina como modulador parece ter influenciado muito mais a forma dos cristais do que propriamente as dimensões, visto que o tamanho das partículas sob a ação da piridina variou entre aproximadamente 14 - 23 μm , valores muito acima daqueles encontrados em cristais obtidos sem o uso de moduladores ($\sim 5 - 9\mu\text{m}$). Em contrapartida, a presença do ácido acético como modulador não só reduziu o tamanho dos cristais ($< 5\mu\text{m}$) como não alterou a morfologia clássica da **bio-MOF-1**.

Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das MOFs de Zn(II) utilizando ácido acético (a-b) e piridina (c-d) como moduladores na síntese solvotérmica.



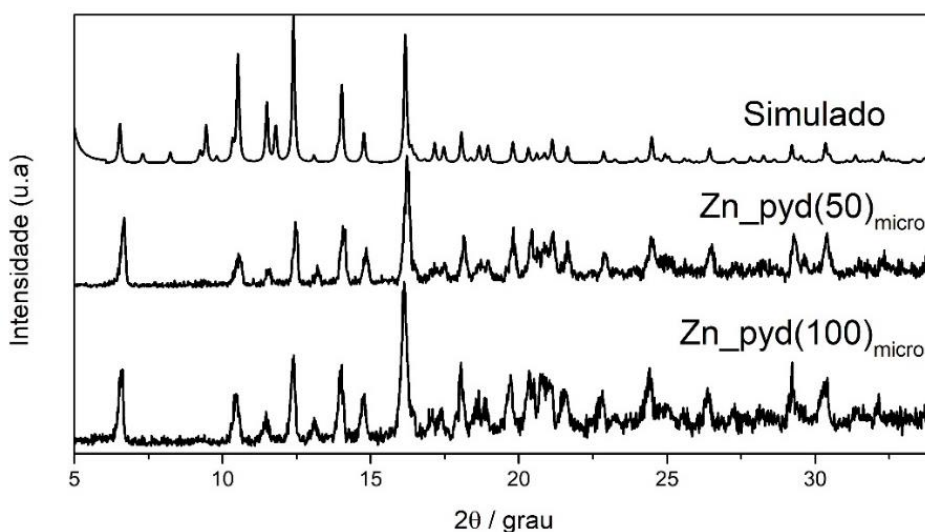
Fonte: Autor, 2021.

5.3.2. Síntese solvotérmica assistida por micro-ondas associada ao uso de piridina como modulador

Essa etapa do trabalho procurou investigar a influência da modificação da rota sintética no tamanho das partículas formadas. Dentro desse contexto, a síntese solvotérmica assistida por micro-ondas tem demonstrado ser um método atraente para a síntese rápida de MOFs.^[95-97] Durante a síntese, há a promoção de um processo acelerado de nucleação,

levando em geral à produção de materiais puros (uma única fase), com partículas de tamanho relativamente pequenos e com distribuição homogênea.^[62] A reação entre $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e os ligantes bpdc e adenina, utilizando a técnica de micro-ondas na presença do modulador piridina ($r = 50$ e $r = 100$), produziu sólidos brancos, aqui denominados de **Zn_pyd_{micro}**. Os padrões de difração de raios-X de pó (ver Figura 23) são consistentes com o padrão simulado da **bio-MOF-1**,^[39] confirmando assim, a topologia característica do material.

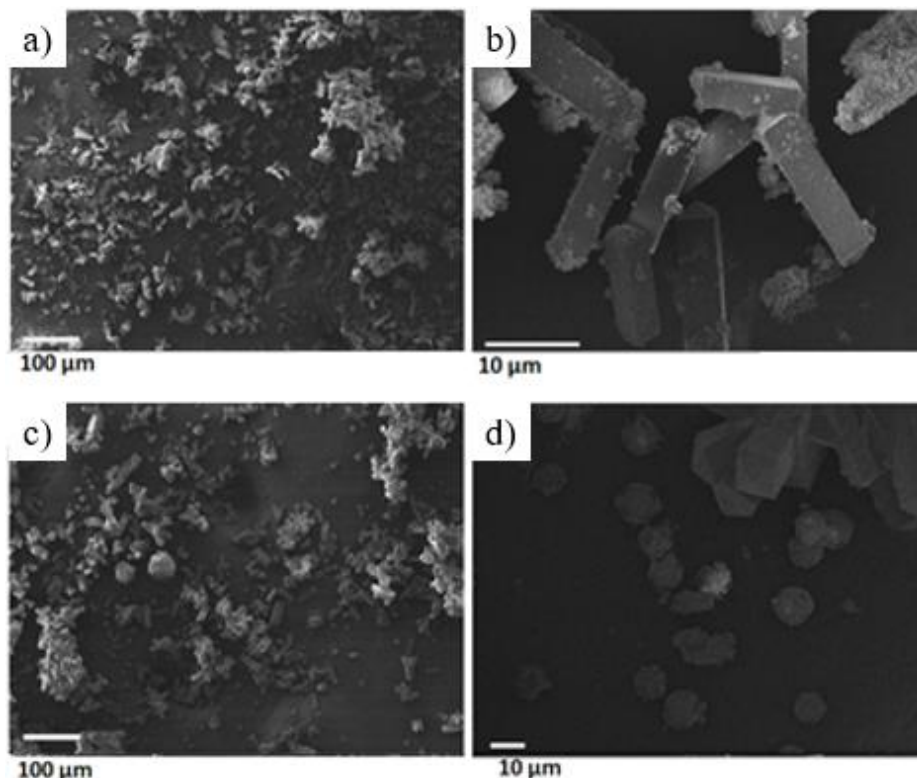
Figura 23. Padrões de raios-X de pó da série **Zn_pyd_{micro}** e da **bio-MOF-1** simulada.



Fonte: Autor, 2021.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (ver Figuras 24a-b) revelaram a manutenção da morfologia característica da **bio-MOF-1** (bastões prismáticos) e, que de fato, houve um aumento no tamanho dos cristais ($12,40 \pm 3,29 \mu\text{m}$), quando a razão $r = 50$ foi utilizada, quando em comparação ao material obtido sem modulador. Por outro lado, as imagens MEV-FEG ilustradas nas Figuras 24c-d mostram a formação de partículas esféricas irregulares com tamanho de aproximadamente $7,51 \pm 1,33 \mu\text{m}$, quando $r = 100$. Portanto, a piridina parece ter promovido um crescimento mais lento ao longo do eixo principal dos bastões (Fig. 24c), diminuindo seu alongamento e tornando os cristais arredondados. A forma de um cristal é organizada pela coexistência do crescimento de faces mais lentas e mais rápidas. À medida que o cristal cresce, ele se molda gradualmente à estrutura cercada pelas faces de crescimento mais lentas.^[98]

Figura 24. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das MOFs de Zn(II) obtidas pelo uso de micro-ondas utilizando piridina como modulador nas razões $r = 50$ (a-b) e $r = 100$ (c-d).

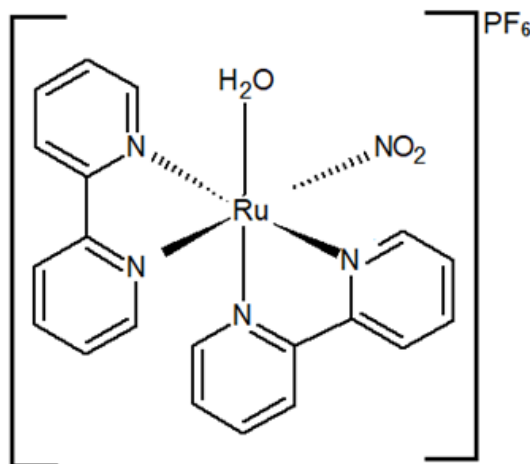


Fonte: Autor, 2021.

5.4. Ensaios de encapsulação e liberação de fármaco

Devido às características micro e mesoporosa da **bio-MOF-1 ativada**, esta foi submetida a ensaios de encapsulação utilizando o metalofármaco **Ru-90**, cuja estrutura molecular é representada na Figura 25.

Figura 25. Representação estrutural do metalofármaco **Ru-90**, [*cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(solv)](PF₆)].



Fonte: Sauaia, 2003.^[81]

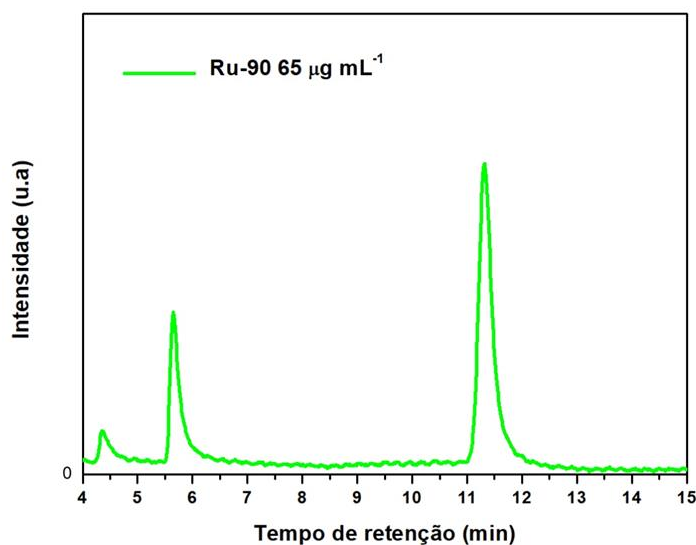
O metalofármaco **Ru-90** pertence a uma família de complexos metálicos à base de rutênio que apresenta notável atividade anticancerígena.^[99-102] O fármaco possui baixa estabilidade e solubilidade em água, além de apresentar certa toxicidade relacionada à liberação e entrega em sítios não específicos. Dessa forma, sua incorporação nos poros da matriz da **bio-MOF-1** pode não só minimizar os efeitos da toxicidade, como também aumentar sua biodisponibilidade nos tecidos-alvo, através de uma liberação controlada. O composto **Ru-90** foi cordialmente cedido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Roberto Santana da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, em colaboração.

5.4.1. Validação do método de quantificação de Ru-90 por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD)

Com o objetivo de validar a metodologia e garantir a quantificação de **Ru-90** durante os ensaios de *drug delivery* com a **bio-MOF-1**, avaliou-se os parâmetros linearidade e precisão, baseando-se na Resolução RE n° 166, 2017.

A Figura 26 mostra o cromatograma do **Ru-90** em solução de água e 2% de DMSO (v/v). É possível observar boa resolução e simetria de pico, com tempo de retenção de 11,31 minutos. O pico referente ao tempo de retenção 4,5 minutos pode estar relacionado a algum tipo de impureza presente na amostra, enquanto o pico referente ao tempo de retenção 5,65 minutos está associado à presença do isômero *trans*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(solv)](PF₆), como reportado por Sawaia *et al.*^[81]

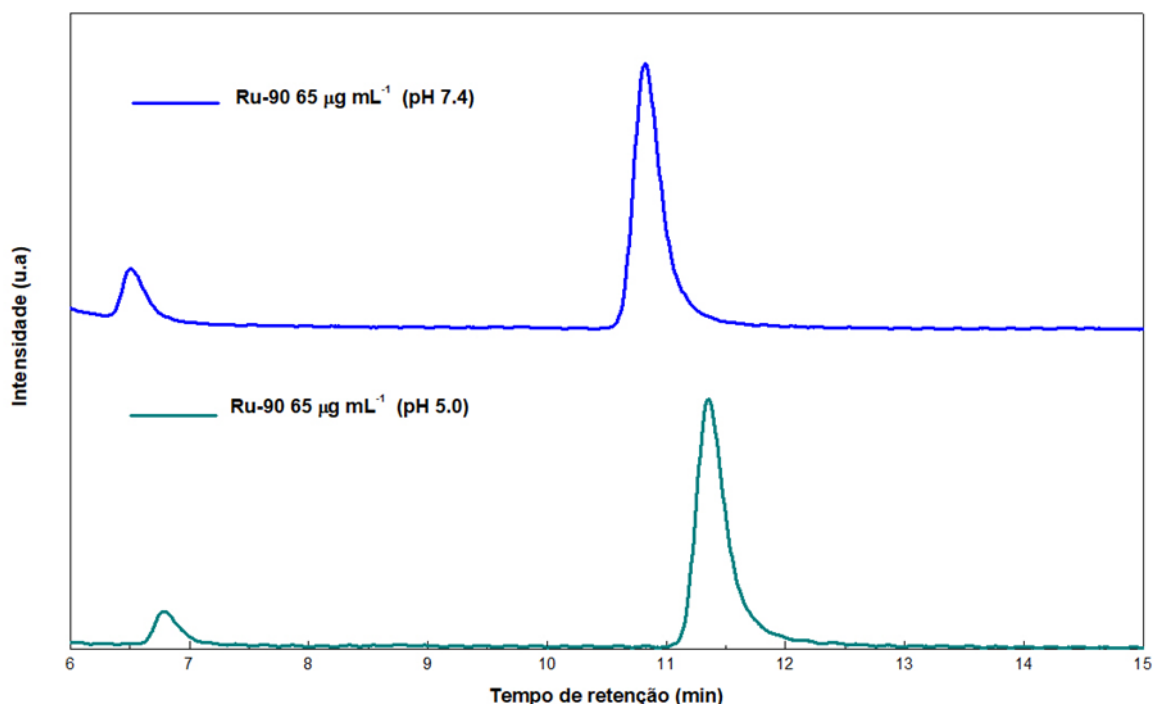
Figura 26. Cromatograma do **Ru-90** (65 µg mL⁻¹) em água/DMSO 2% obtido pelo método cromatográfico utilizado. Fase móvel: metanol e água (20:80) com 0,1% de ácido fórmico pH =3.0; Coluna C18-Luna (4,6 mm x 250 mm) 5 µm; Vazão 1,0 mL min⁻¹; λ = 440 nm; Injeção 50 µL; 33°C.



Fonte: Autor, 2021.

A Figura 27 mostra o cromatograma do **Ru-90** em solução tampão PBS pH 7,4 (linha azul) e pH 5,0 (linha verde). Aqui também observa-se boa resolução e simetria de pico, com tempos de retenção de 11,35 e 10,82 minutos, respectivamente para pH 5,0 e pH 7,4. Os picos que aparecem entre 6-7 minutos podem estar associados à presença do isômero *trans*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(solv)](PF₆).

Figura 27. Cromatograma do **Ru-90** (65 µg mL⁻¹) em solução tampão PBS pH = 5.0 (verde) e pH = 7.4 (azul) obtido pelo método cromatográfico utilizado. Fase móvel: metanol e água (20:80) com 0,1% de ácido fórmico pH =3.0; Coluna C18-Luna (4,6 mm x 250 mm) 5 µm; Vazão 1,0 mL min⁻¹; λ = 440 nm; Injeção 50 µL; 33°C.



Fonte: Autor, 2021.

5.4.1.1. Linearidade – água/DMSO 2%

Uma curva analítica para o fármaco **Ru-90** foi construída a partir de soluções padrão de concentrações 10; 20; 30; 50; 65; 80 e 100 µg mL⁻¹, utilizando água/DMSO 2% como solvente. Para cada concentração foram realizadas injeções em triplicata e os resultados médios das áreas dos picos cromatográficos foram utilizados para o estudo de regressão linear. A Tabela 3 mostra os valores das áreas dos picos para cada ponto da curva analítica representada na Figura 18. A ANOVA, calculada para os dados obtidos a partir da curva analítica, encontra-se representada na Tabela 4.

Tabela 3. Valores das áreas dos picos de **Ru-90** em água/DMSO 2% referentes à curva de calibração.

Ru-90 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área^a	Área média \pm DP^b	CV^c(%)
10	2.713	3.101 \pm 635	20,48
	3.834		
	2.756		
20	8.414	8.467 \pm 54	0,64
	8.466		
	8.522		
30	18.638	18.329 \pm 639	3,48
	17.595		
	18.755		
50	40.584	40.836 \pm 220	0,54
	40.992		
	40.931		
65	66.952	66.467 \pm 429	0,65
	66.316		
	66.134		
80	83.167	85.923 \pm 2.459	2,86
	86.708		
	87.894		
100	101.261	103.566 \pm 1.648	1,60
	104.453		
	103.566		

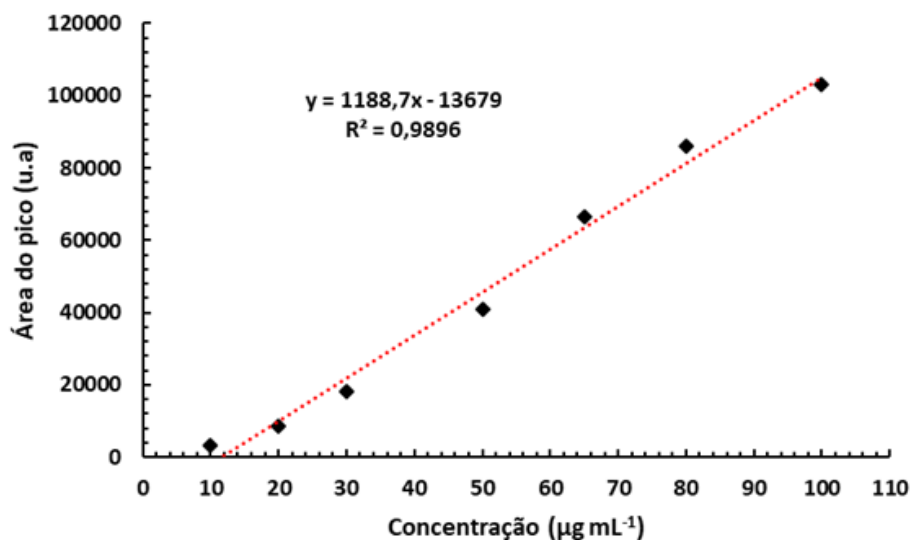
^aValor médio das três determinações

^bDP= Desvio Padrão

^cCV= Coeficiente de variação

Fonte: Autor, 2021.

Figura 28. Curva de calibração do **Ru-90** em água/DMSO 2% obtida por CLAE-DAD. Fase móvel: metanol e água (20:80) com 0,1% de ácido fórmico pH =3.0; Coluna C18-Luna (4,6 mm x 250 mm) 5 μm ; Vazão 1,0 mL min⁻¹; λ = 440 nm; Injeção 50 μL ; 33°C.



Fonte: Autor, 2021.

Tabela 4. Análise de variância para os valores das áreas dos picos obtidos para a construção da curva de calibração do **Ru-90** utilizando água/DMSO 2% como solvente.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Variância	Fcalculado	Ftabelado
Entre Concentrações	6	27.933.682.000	4.655.613.667	76,43*	2,85
Regressão Linear	1	27.080.883.221	27.080.883.221	44.457*	4,60
Desvio de Linearidade	5	852.798.778	170.559.756	2,80*	2,96
Dentro (resíduo)	14	852.798.778	60.914.198		
Total	20	27.953.302.339			

* Significativo para $p < 0,05$

Fonte: Autor, 2021.

Com base na análise estatística, pode-se dizer que não existe desvio significativo de linearidade, uma vez que $F_{cal} < F_{tab}$, aceitando assim a hipótese H_0 , e que existe regressão linear dos dados obtidos para o limite de confiança de 5%, onde $F_{calc} > F_{tab}$, rejeitando assim a hipótese H_0 .

5.4.1.2. Precisão – água/DMSO 2%

A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação percentual das amostras submetidas a ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade.

Para a repetibilidade, foram utilizadas concentrações baixa, média e alta da curva analítica (20, 50 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As injeções foram realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista, onde os ensaios foram realizados em triplicata.

O coeficiente de variação (CV%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas no mesmo dia, conforme pode ser visto na Tabela 5, foi de 1,80%, tendo o maior valor na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 3,58%, demonstrando assim que o método pode ser considerado preciso.

Tabela 5. Determinação da repetibilidade de **Ru-90** em água/DMSO 2% por CLAE-DAD.

Ru-90 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área^a	Área média	CV^b (%)	CV Geral (%)
20	8.184	8.203	0,23	
	7.204			
	9.222			
50	41.844	43.527	3,58	1,80
	43.822			
	44.914			
80	85.024	86.447	1,58	
	87.746			
	86.571			

^aValor médio das determinações^bCV = Coeficiente de variação**Fonte:** Autor, 2021.

Para avaliar a reprodutibilidade também foram utilizadas concentrações baixa, média e alta da curva analítica (20, 50 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$), expressando os resultados com base no coeficiente de variação. As injeções foram realizadas em dois dias diferentes e por analistas diferentes (A e B), utilizando o mesmo equipamento. Os ensaios foram realizados em triplicata. O CV percentual (%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes, conforme apresentado na Tabela 6, foi de 1,12%, tendo o maior valor na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ que foi de 3,58%, quando foi preparada pelo analista A no primeiro dia de ensaio, demonstrando assim, que o método é preciso.

Tabela 6. Determinação da reprodutibilidade de **Ru-90** em água/DMSO 2% por CLAE-DAD.

Dia	Analista	Ru-90 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área média^a	CV^b (%)	CV Geral (%)
1	A	20	8.203	0,23	
		50	43.527	3,58	
		80	86.447	1,58	
2	B	20	11.825	0,41	1,12
		50	39.195	0,47	
		80	84.979	0,44	

^aValor médio das determinações^bCV = Coeficiente de variação**Fonte:** Autor, 2021.

5.4.1.3. Linearidade – PBS pH 5,0

Uma curva analítica para o fármaco **Ru-90** foi construída a partir de soluções padrão de concentrações 10; 20; 30; 50; 65; 80 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em solução tampão PBS pH = 5.0. Para cada concentração foram realizadas injeções em triplicata e os resultados médios das áreas dos picos cromatográficos foram utilizados para o estudo de regressão linear. A Tabela 7 mostra os valores das áreas dos picos para cada ponto da curva analítica representada na Figura 29. A ANOVA, calculada para os dados obtidos a partir da curva analítica, encontra-se representada na Tabela 8.

Tabela 7. Valores das áreas dos picos de **Ru-90** em solução tampão PBS pH = 5.0 referentes à curva de calibração.

Ru-90 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área^a	Área média \pm DP^b	CV^c(%)
10	16.250 16.181 16.755	15.395 \pm 770	5,00
20	33.216 34.502 32.240	33.319 \pm 1.135	3,41
30	50.612 48.532 52.978	50.707 \pm 2.225	4,39
50	89.239 89.573 87.238	88.683 \pm 1.263	1,42
65	106.460 107.331 107.470	107.087 \pm 547	0,51
80	129.513 129.356 130.372	129.747 \pm 547	0,42
100	159.561 162.262 160.274	160.699 \pm 1400	0,87

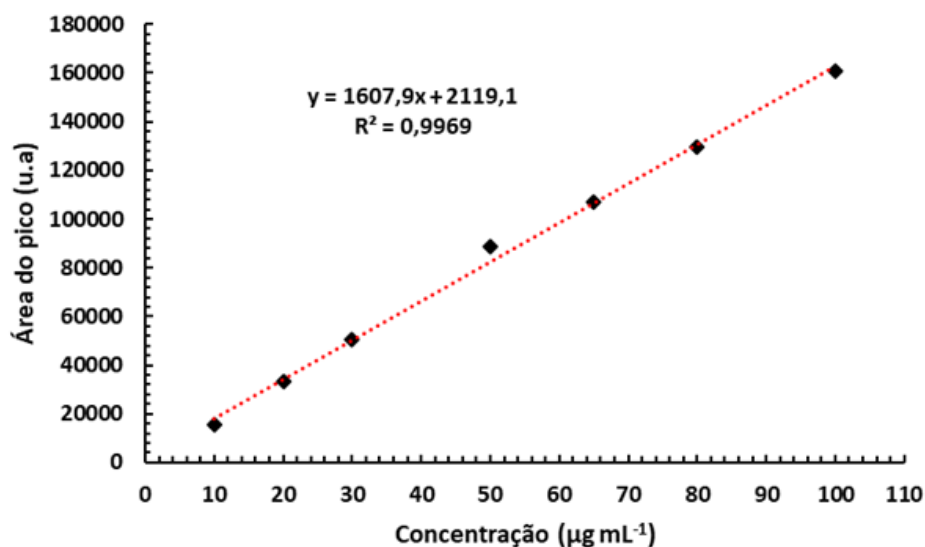
^aValor médio das três determinações

^bDP= Desvio Padrão

^cCV= Coeficiente de variação

Fonte: Autor, 2021.

Figura 29. Curva de calibração do **Ru-90** em PBS pH 5,0 obtida por CLAE-DAD. Fase móvel: metanol e água (20:80) com 0,1% de ácido fórmico pH =3,0; Coluna C18-Luna (4,6 mm x 250 mm) 5 µm; Vazão 1,0 mL min⁻¹; λ = 440 nm; Injeção 50 µL; 33°C.



Fonte: Autor, 2021.

Tabela 8. Análise de variância para os valores das áreas dos picos obtidos para a construção da curva de calibração do **Ru-90** em solução tampão PBS pH = 5.0 .

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Variância	Fcalculado	Ftabelado
Entre Concentrações	6	50.739.608.774	8.456.601.462	685,79*	2,85
Regressão Linear	1	50.566.972.878	50.566.972.878	4.100,76*	4,60
Desvio de Linearidade	5	172.635.897	3.452.7179	2,80*	2,96
Dentro (resíduo)	14	172.635.897	12.331.135		
Total	20	50.761.572.139			

* Significativo para $p < 0,05$

Fonte: Autor, 2021.

Com base na análise estatística pode-se dizer que não existe desvio significativo de linearidade, uma vez que $F_{cal} < F_{tab}$, aceitando assim a hipótese H_0 , e que existe regressão linear dos dados obtidos para o limite de confiança de 5%, onde $F_{calc} > F_{tab}$, rejeitando assim a hipótese H_0 .

5.4.1.4. Precisão – PBS pH 5,0

A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade.

Para a repetibilidade, foram utilizadas concentrações baixa, média e alta da curva analítica (20, 50 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As injeções foram realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista, onde os ensaios foram realizados em triplicata.

De acordo com a Tabela 9 o coeficiente de variação (CV%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas no mesmo dia foi de 0,72%, demonstrando repetibilidade do método.

Tabela 9. Determinação da repetibilidade de **Ru-90** em solução tampão PBS pH 5,0 por CLAE-DAD.

Ru-90 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área ^a	Área média	CV ^b (%)	CV Geral (%)
20	35.316	35.609	1,54	0,72
	35.271			
	36.240			
50	90.510	90.443	0,22	0,72
	90.219			
	90.601			
80	138.075	137.906	0,40	
	138.348			
	137.294			

^aValor médio das determinações

^bCV = Coeficiente de variação

Fonte: Autor, 2021.

Para avaliar a reprodutibilidade os resultados também foram expressos com base no coeficiente de variação percentual. As injeções foram realizadas em dois dias diferentes e por analistas diferentes (A e B), utilizando o mesmo equipamento. Os ensaios foram realizados em triplicata. O CV percentual (%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes, conforme apresentado na Tabela 10, foi de 1,03%, tendo o maior valor na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ que foi de 3,08%, quando foi preparada pelo analista B no segundo dia de ensaio, demonstrando assim, que o método é preciso.

Tabela 10. Determinação da reprodutibilidade de **Ru-90** em solução tampão PBS pH 5,0 por CLAE-DAD.

Dia	Analista	Ru-90 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área média ^a	CV ^b (%)	CV Geral (%)
1	A	20	35.609	1,54	1,03
		50	90.443	0,22	
		80	137.906	0,40	
2	B	20	41.580	3,08	
		50	95.633	0,67	
		80	150.107	0,25	

^aValor médio das determinações^bCV = Coeficiente de variação

Fonte: Autor, 2021.

5.4.1.5. Linearidade – PBS pH 7,4

Uma curva analítica para o fármaco **Ru-90** foi construída a partir de soluções padrão de concentrações 10; 20; 30; 50; 65; 80 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em solução tampão PBS pH = 7.4. Para cada concentração foram realizadas injeções em triplicata e os resultados médios das áreas dos picos cromatográficos foram utilizados para o estudo de regressão linear. A Tabela 11 mostra os valores das áreas dos picos para cada ponto da curva analítica representada na Figura 30. A ANOVA, encontra-se representada na Tabela 12.

Tabela 11. Valores das áreas dos picos de **Ru-90** em solução tampão PBS pH = 7.4 referentes à curva de calibração.

Ru-90 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área ^a	Área média \pm DP ^b	CV ^c (%)
10	33.546	34.227 \pm 629	1,84
	34.348		
	34.786		
20	71.026	71.689 \pm 1.135	0,94
	72.378		
	71.663		
30	104.431	102.843 \pm 1.689	1,64
	103.029		
	101.069		
50	176.570	178.288 \pm 2.181	1,22
	177.552		
	180.742		
65	228.040	231.258 \pm 2.789	1,21
	232.746		
	232.987		

Continua

80	281.696	282.455±1.658	0,59
	281.313		
	284.357		
100	359.315	353.787±5.692	1,61
	347.944		
	354.101		

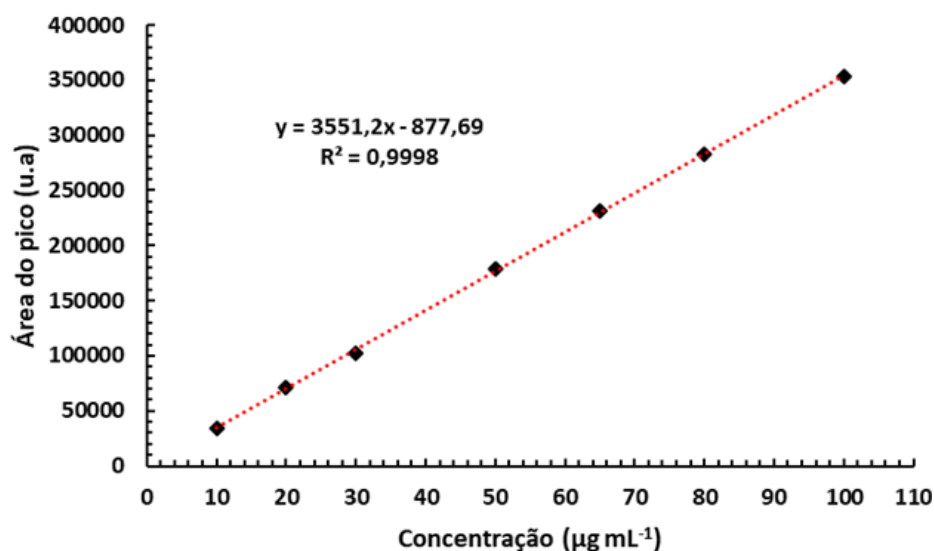
^aValor médio das três determinações

^bDP= Desvio Padrão

^cCV= Coeficiente de variação

Fonte: Autor, 2021.

Figura 30. Curva de calibração do **Ru-90** em PBS pH 7,4 obtida por CLAE-DAD. Fase móvel: metanol e água (20:80) com 0,1% de ácido fórmico pH =3.0; Coluna C18-Luna (4,6 mm x 250 mm) 5 µm; Vazão 1,0 mL min⁻¹; λ = 440 nm; Injeção 50 µL; 33°C.



Fonte: Autor, 2021.

Tabela 12. Análise de variância para os valores das áreas dos picos obtidos para a construção da curva de calibração do **Ru-90** em solução tampão PBS pH = 7.4.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Variância	Fcalculado	Ftabelado
Entre Concentrações	6	246.777.813.993	41.129.635.666	11.761,29*	2,85
Regressão Linear	1	246.728.855.493	246.728.855.493	70.553,71*	4,60
Desvio de Linearidade	5	48.958.501	9.791.700	2,80*	2,96
Dentro (resíduo)	14	48.958.501	3.497.036		
Total	20	246.880.593.580			

* Significativo para $p < 0,05$

Fonte: Autor, 2021.

Com base na análise estatística pode-se dizer que não existe desvio significativo de linearidade, uma vez que $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$, aceitando assim a hipótese H_0 , e que existe regressão linear dos dados obtidos para o limite de confiança de 5%, onde $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, rejeitando assim a hipótese H_0 .

5.4.1.6. Precisão – PBS pH 7,4

A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade, como realizado anteriormente para os ensaios de encapsulamento.

Para a repetibilidade, foram utilizadas concentrações baixa, média e alta da curva analítica (20, 50 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As injeções foram realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista, onde os ensaios foram realizados em triplicata.

De acordo com a Tabela 13 o coeficiente de variação (CV%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas no mesmo dia foi de 1,00%, demonstrando repetibilidade do método.

Tabela 13. Determinação da repetibilidade de **Ru-90** em solução tampão PBS pH 7,4 por CLAE-DAD.

Ru-90 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área ^a	Área média	CV ^b (%)	CV Geral (%)
20	71.690	71.294	0,49	1,00
	71176			
	71.017			
50	178.816	179.277	0,55	1,00
	178.614			
	180.402			
80	277.910	283.882	1,96	1,00
	288.921			
	284.814			

^aValor médio das determinações

^bCV = Coeficiente de variação

Fonte: Autor, 2021.

Para avaliar a precisão intermediária os resultados também foram expressos com base no coeficiente de variação percentual. As injeções foram realizadas em dois dias diferentes e por analistas diferentes (A e B), utilizando o mesmo equipamento. Os ensaios foram realizados em triplicata. O CV percentual (%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes, conforme apresentado na Tabela 14,

foi de 1,17%, tendo o maior valor na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ que foi de 2,91%, quando foi preparada pelo analista B no segundo dia de ensaio, demonstrando assim, que o método é preciso.

Tabela 14. Determinação da reprodutibilidade de **Ru-90** em solução tampão PBS pH 7,4 por CLAE-DAD.

Dia	Analista	Ru-90 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área média ^a	CV ^b (%)	CV Geral (%)
1	A	20	71.294	0,49	
		50	179.277	0,55	
		80	283.882	1,96	
2	B	20	80.856	0,68	1,17
		50	181.000	0,41	
		80	308.312	2,91	

^aValor médio das determinações

^bCV = Coeficiente de variação

Fonte: Autor, 2021.

5.4.2. Encapsulação do fármaco Ru-90

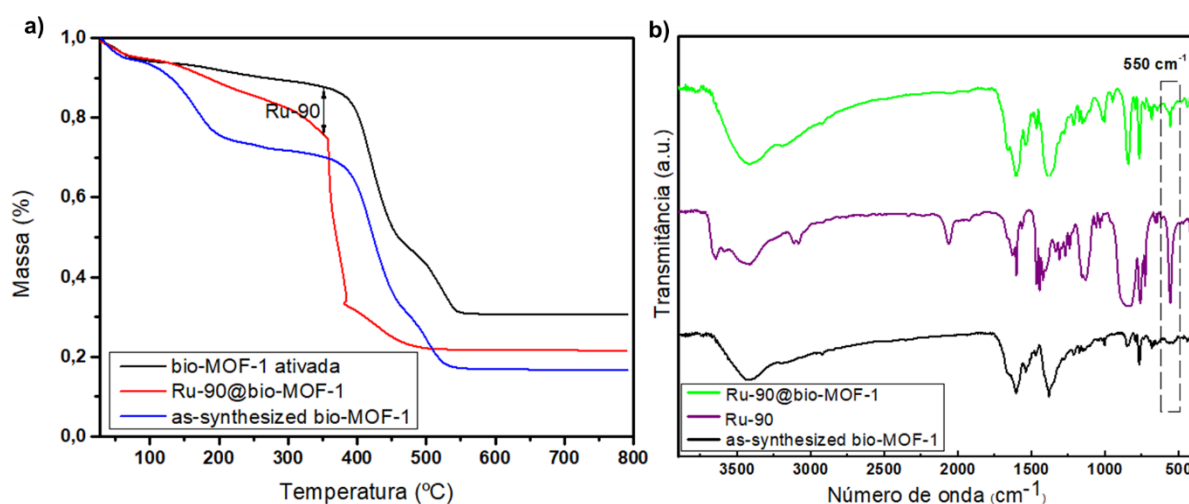
De forma a avaliar o potencial de aplicação da **bio-MOF-1**, sintetizada e devidamente caracterizada neste trabalho, ensaios de encapsulação do metalofármaco anticancerígeno não-convencional **Ru-90** foram realizados através do método de impregnação. Os resultados obtidos após os ensaios de encapsulação, através da análise termogravimétrica e espectroscopia vibracional na região do infravermelho, confirmam a presença do metalofármaco na estrutura da **bio-MOF-1**.

A Figura 31a ilustra, através de um gráfico, as curvas termogravimétricas da **bio-MOF-1 ativada** (linha preta), do material incorporado **Ru-90@bio-MOF-1** (linha vermelha) e da **bio-MOF-1 sintetizada** (linha azul). Pode-se observar que a **bio-MOF-1** apresenta boa estabilidade térmica ($T_{\text{onset}} \sim 380^{\circ}\text{C}$). Além disso, o *plateau* presente entre $90\text{-}374^{\circ}\text{C}$ sugere que de fato as moléculas do solvente foram completamente removidas pelo processo de ativação. A curva vermelha, referente ao material **Ru-90@bio-MOF-1**, mostra uma perda de massa entre $130\text{-}350^{\circ}\text{C}$ de aproximadamente 18%, associada à decomposição térmica do fármaco

Ru-90. A presença de moléculas de **Ru-90** na matriz porosa da **bio-MOF-1** também foi confirmada utilizando a técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (ver

Figura 31b). É possível observar o aparecimento de uma banda em 550 cm^{-1} no espectro do material incorporado (linha verde), a qual pode ser atribuída ao modo vibracional $\nu(\text{Ru-N})$ das moléculas do fármaco **Ru-90**.^[103]

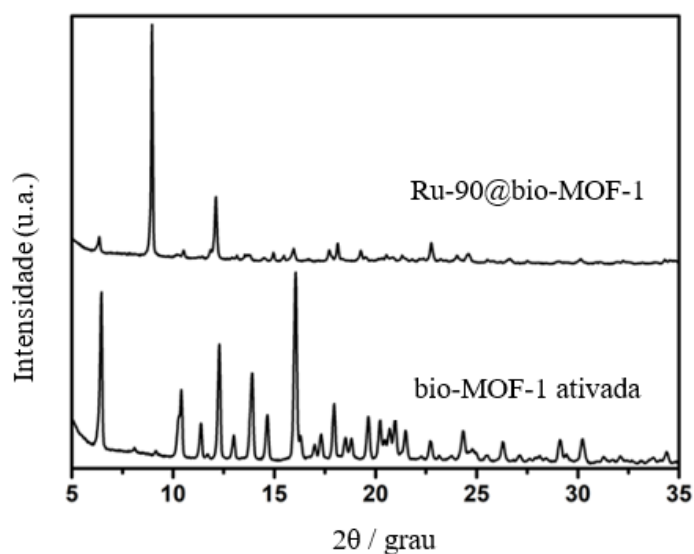
Figura 31. (a) Curvas TG da **bio-MOF-1 ativada** (linha preta), **Ru-90@bio-MOF-1** (linha vermelha) e **bio-MOF-1 sintetizada** (linha azul). (b) Espectros vibracionais no infravermelho da **bio-MOF-1 sintetizada** (linha preta), **Ru-90** (linha roxa) e **Ru-90@bio-MOF-1** (linha verde).



Fonte: Autor, 2021.

Após os ensaios de encapsulação do fármaco **Ru-90**, o padrão de difração de raios-X de pó da **bio-MOF-1** (ver Figura 32) foi obtido com o intuito de avaliar sua integridade estrutural.

Figura 32. Padrões de raios-X de pó dos cristais da **bio-MOF-1** antes e após incorporação do fármaco **Ru-90**.



Fonte: Autor, 2021.

É possível observar que após a incorporação, a MOF ainda apresenta estrutura cristalina, porém, o perfil de difração foi alterado em relação ao material inicialmente ativado. Este resultado confirma o comportamento flexível da matriz porosa da MOF, uma vez que se pode acomodar moléculas hóspedes através do alongamento e/ou encolhimento de sua estrutura porosa, o que acaba afetando seus padrões de difração de raios-X, volume e simetria.

Por fim, uma vez que os parâmetros linearidade e precisão encontram-se em de acordo com as normas de validação, foi possível determinar a quantidade de fármaco presente na matriz porosa da **bio-MOF-1** através da equação de reta presente no gráfico da Figura 28. Os ensaios alcançaram uma incorporação de aproximadamente 50% de **Ru-90** ou 0,340 g g⁻¹ (gramas de fármaco por grama de material), demonstrando o grande potencial da MOF no carregamento de moléculas catiônicas.

Complexos de rutênio vêm sendo amplamente estudados em sistemas de *drug delivery* utilizando diversas matrizes hospedeiras. Exemplos vão desde nanopartículas de sílica mesoporosa e polímeros até lipossomas e micelas. Apesar de eficientes na incorporação do metalofármaco, estas matrizes apresentam eficiência de encapsulamento bem abaixo daquela obtida neste trabalho. Fischer e colaboradores,^[104] atingiram 0,025 g g⁻¹ de encapsulação de um complexo de rutênio ao utilizar nanopartículas poliméricas como hospedeiro, enquanto Guo e colaboradores,^[105] obtiveram uma incorporação de apenas 0,018 g g⁻¹ utilizando lipossomas.

5.4.3. Ensaio de liberação do fármaco Ru-90

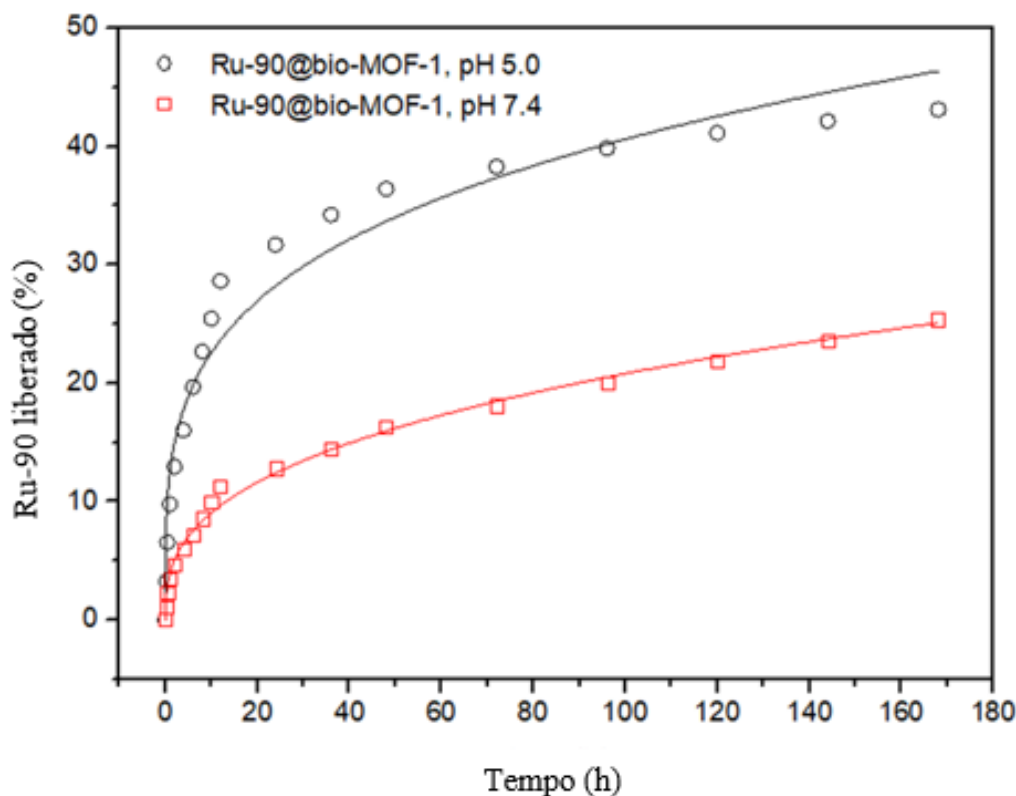
Os perfis de liberação *in vitro* do **Ru-90** são apresentados na Figura 33, onde é possível observar que a dessorção de moléculas do fármaco aconteceu até o final dos ensaios, sem a presença de um *plateau*.

De fato, estruturas como a da **bio-MOF-1 ativada**, contendo poros maiores interconectados por poros menores, são por natureza excelentes plataformas para liberação a longo prazo de fármacos.^[106-108] Em ambos os casos (pH 5,0 e pH 7,4), nota-se uma liberação controlada de **Ru-90** sem o desenvolvimento de efeito *burst*³, comum em materiais microcristalinos.^[109,110] Após 7 dias, 43,11% do **Ru-90** incorporado foi liberado em pH 5,0, enquanto que em pH 7,4 apenas 25,36%. Os resultados indicam que a liberação de **Ru-90** da matriz porosa da **bio-MOF-1** é sensível ao pH, e que, de fato, há uma forte interação entre a **bio-MOF-1** e as moléculas do fármaco. Do ponto de vista farmacocinético, um SLF sensível

³ Grande quantidade de fármaco liberada nos primeiros minutos de ensaio.

ao pH pode não só reduzir efeitos indesejáveis relacionados com o transporte do fármaco pela corrente sanguínea como também otimizar sua liberação no tecido canceroso alvo, que por sua vez apresenta moderada acidez quando comparado a um tecido saudável.^[111,112]

Figura 33. Perfis de liberação do fármaco **Ru-90** da matriz **bio-MOF-1** em solução tampão PBS pH 5,0 (símbolo circular preto) e pH 7,4 (símbolo quadrado vermelho), à 37°C. Os dados foram ajustados pela equação de Korsmeyer-Peppas como indicado pelas linhas preta e vermelha.



Fonte: Autor, 2021.

Nesse contexto, é de extrema importância a compreensão do mecanismo através do qual ocorre a liberação para a escolha do material mais adequado como também para obter informações sobre o comportamento da concentração do fármaco no plasma. Assim sendo, alguns modelos matemáticos foram ajustados aos dados obtidos com o intuito de interpretar o comportamento do fármaco durante o ensaio de liberação. A Tabela 15 traz um resumo de alguns modelos cinéticos e seus respectivos parâmetros de regressão utilizados no ajuste dos dados.

Estudos cinéticos envolvendo a **bio-MOF-1** são muito escassos, contudo, foi possível ajustar os dados a uma equação matemática que melhor descrevesse a liberação de **Ru-90** a partir dessa matriz porosa. Com base no coeficiente de correlação (R^2), o modelo cinético que melhor ajusta os dados de liberação é o de Korsmeyer-Peppas, tanto para pH 5,0 quanto pH 7,4, onde os valores de n encontrados foram 0,255 e 0,362, respectivamente (ver Tabela 15).

Neste caso, a cinética de transporte do fármaco é caracterizada pela difusividade.^[114] Vale ressaltar que, embora os valores de n estejam abaixo do limite imposto pelo modelo de Korsmeyer-Peppas ($n = 0,45$), ainda assim, indicam um processo de liberação controlado por difusão, do tipo quasi-Fickiano.^[117-119]

Tabela 15. Modelos cinéticos considerados para a **bio-MOF-1** e seus respectivos parâmetros calculados.

Modelo	Equação*	$k_{pH5.0}$	$k_{pH7.4}$	$n_{pH5.0}$	$n_{pH7.4}$	$R^2_{pH5.0}$	$R^2_{pH7.4}$
<i>Ordem Zero</i> ^[113]	$F = kt$	0,359	0,188	-	-	0,64	0,50
<i>Korsmeyer-Peppas</i> ^[114]	$F = kt^n$	12,5	3,93	0,255	0,362	0,96	0,99
<i>Hixson-Crowell</i> ^[115]	$F = 100[1-(1-kt)^3]$	0,00158	0,00083	-	-	0,69	0,86
<i>Primeira Ordem</i> ^[116]	$F = 100(1-e^{-kt})$	0,00546	0,00222	-	-	0,72	0,87

* F representa a porcentagem cumulativa de liberação do fármaco; t representa o tempo de liberação; k é uma constante de liberação específica do sistema e n é o expoente de liberação que corresponde ao tipo de mecanismo de transporte.

Fonte: Autor, 2021.

5.5. Avaliação de viabilidade celular *in vitro*

Com o intuito de avaliar a citotoxicidade do sistema **Ru-90@bio-MOF-1**, sua viabilidade celular foi estudada tanto em linhagem tumoral de melanoma humano (A-375) quanto em linhagem não tumoral L929 (fibroblastos). Os valores de IC_{50} mostram que o complexo **Ru-90** não é citotóxico até atingir a concentração de 100 μM ; entretanto, após sua inclusão nos poros da **bio-MOF-1**, houve um aumento da citotoxicidade em ambas as linhagens (ver Tabela 16). A presença do complexo no interior da MOF pode ter facilitado seu acesso e disponibilidade para as células (ver Figura 34). Entretanto, ao comparar os valores de IC_{50} com a cisplatina, um medicamento referência no tratamento do câncer, a eficácia foi menor. Quanto ao índice de seletividade (SI), o sistema **Ru-90@bio-MOF-1** mostrou ser um pouco mais seletivo para a linhagem tumoral em comparação à cisplatina, o que corrobora com a ação antitumoral do sistema composto pelo fármaco **Ru-90** e a **bio-MOF-1**.

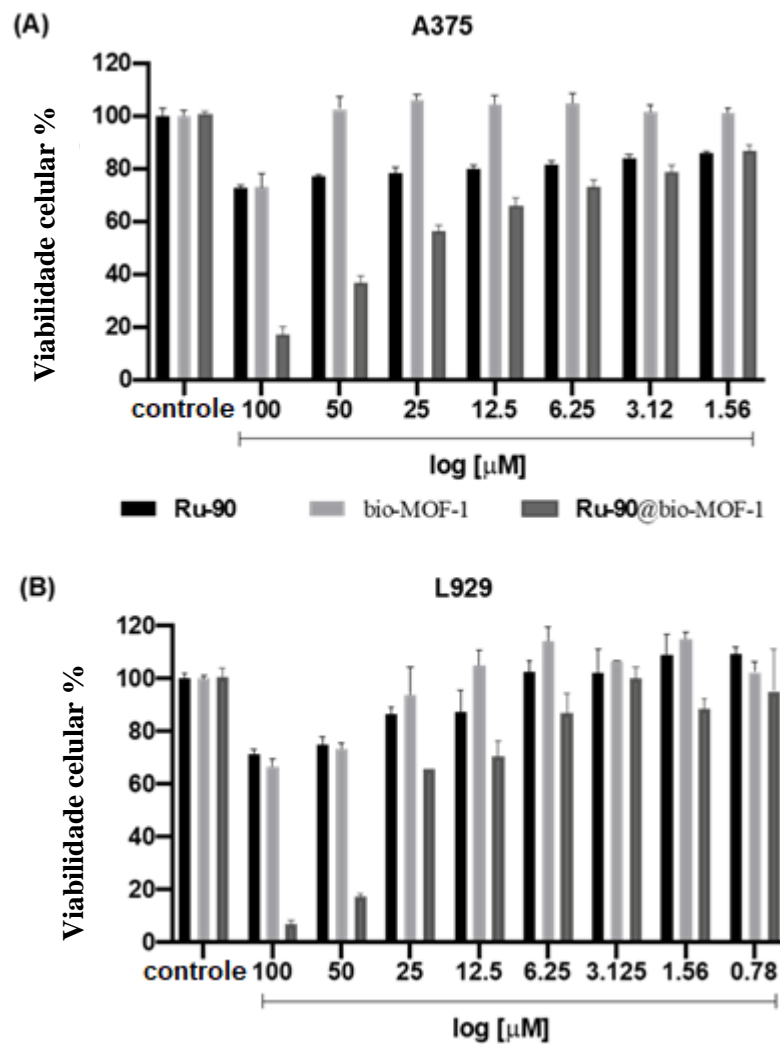
Tabela 16. Efeitos citotóxicos dos compostos **Ru-90**, **bio-MOF-1**, **Ru-90@bio-MOF-1** e cisplatina em diferentes linhagens celulares após 24 horas de incubação.

Compostos	IC ₅₀ [μM]		
	A375	L929	SI*
Ru-90	>100	>100	1
bio-MOF-1	>100	>100	1
Ru-90@bio-MOF-1	43.8 ± 3.8	31.5 ± 1.9	0.72
Cisplatina	27.3 ± 1.8	18.0 ± 0.3	0.65

Índice de Seletividade: IC₅₀L929/IC₅₀A375

Fonte: Autor, 2021.

Figura 34. Viabilidade celular dos compostos **Ru-90**, **bio-MOF-1** e **Ru-90@bio-MOF-1** em 24 horas de incubação: (a) Linhagem tumoral A375 e (b) Linhagem não tumoral L929.



Fonte: Autor, 2021.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a síntese solvotérmica levou à obtenção da **bio-MOF-1** com características de material mesoporoso (3 nm de diâmetro médio de poro) e área específica (BET) de $796 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Por conta, então, dessas propriedades, o material apresentou excelente resultado quando submetido à encapsulação do complexo anticancerígeno à base de rutênio **Ru-90**, *cis*-[Ru(bpy)₂(NO₂)(solv)](PF₆). A liberação do metalofármaco se mostrou responsiva ao pH do meio, com liberação de 25% e 43% em pH 7,4 e pH 5,0, respectivamente, após 170 horas. Particularmente, acredita-se que o SLF **Ru-90@bio-MOF-1** desenvolvido neste estudo possa ser um candidato promissor em *drug delivery* de medicamentos anticancerígenos baseados em compostos metálicos, uma vez que libera uma quantidade maior de fármaco quando em pH 5,0, valor esse que é típico de regiões tumorais. Vale ressaltar que em ambos os ensaios, o fármaco demonstrou um perfil de liberação sustentada, controlado por um mecanismo de difusão quando utilizada a matriz **bio-MOF-1**, apresentando assim, um grande potencial para a aplicação em sistemas de liberação controlada. Os estudos de viabilidade celular, por sua vez, demonstraram que a oclusão do complexo **Ru-90** nos poros da **bio-MOF-1** facilitou seu acesso e disponibilidade tanto na linhagem tumoral (A375) quanto não tumoral (L929). A síntese modulada e a técnica solvotérmica assistida por micro-ondas foram utilizadas com sucesso para produzir partículas micrométricas das séries **Zn_HAc**, **Zn_pyd**, **Zn_HAc_{micro}** e **Zn_pyd_{micro}**. Com base na estrutura desta MOF mista (contendo dois diferentes ligantes orgânicos), o uso de moduladores de coordenação apresentando distintos grupos funcionais e rotas sintéticas também influenciou na morfologia das partículas, direcionando-a para bastões, aglomerados ou esferas.

7. PERSPECTIVAS

O trabalho, como esperado, abriu várias frentes de investigação, dentre as quais destacam-se os estudos:

- Influência do modulador de coordenação piridina sobre a morfologia da **bio-MOF-1**.
- Influência da concentração do modulador ácido acético sobre o tamanho dos cristais da **bio-MOF-1** utilizando a síntese solvotérmica como metodologia.
- Influência do pH e temperatura sobre o tamanho dos cristais da **bio-MOF-1**.
- Influência da morfologia da **bio-MOF-1** sobre o encapsulamento e liberação do fármaco **Ru-90**.
- Influência do pH, temperatura e concentração do fármaco sobre a cinética de liberação do **Ru-90**.
- Realização de ensaios *in vivo* de *drug delivery* do fármaco **Ru-90** utilizando nanocristais da **bio-MOF-1**.
- Desenvolvimento de estruturas *core-shell* do tipo MOF@MOF para liberação de dois ou mais fármacos a partir de uma plataforma de liberação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Frem, R. C. G.; Arroyos, G.; Flor, J.; Alves, R. C.; Lucena, G. N.; Silva, C. M.; Coura, M. F. MOFs (*Metal-Organic Frameworks*): Uma fascinante classe de materiais inorgânicos porosos. *Quim. Nova*, 41, 1178-1191, 2018.
- [2] Dey, C. *et al.* Crystalline metal-organic frameworks (MOFs): synthesis, structure and function. *Acta Crystallographica Section B*, 70(1):3-10, 2014.
- [3] Liang, W. *et al.* Tuning pore size in a zirconium–tricarboxylate metal–organic framework. *CrystEngComm*, 29, 6530-6533, 2014.
- [4] Chen, X. *et al.* Catalyst surfaces with tunable hydrophilicity and hydrophobicity: metal–organic frameworks toward controllable catalytic selectivity. *Chem. Commun.*, 54, 3936-3939, 2018.
- [5] Lin, Y. *et al.* Amine-functionalized metal–organic frameworks: structure, synthesis and applications. *RSC Adv.* 6, 32598-32614, 2016.
- [6] Ruiz-Molina, D.; Novio, F.; Roscini, C. Bio- and Bioinspired Nanomaterials. MOFs in Pharmaceutical Technology: Stability and Toxicity. Weinheim: Wiley-VCH, 87-89, 2015.
- [7] Eddaoudi, M *et al.* Systematic Design of Pore Size and Functionality in Isorecticular MOFs and Their Application in Methane Storage. *Science*, 295, p. 469-472, 2002.
- [8] Sumida, K *et al.* Carbon dioxide capture in metal–organic frameworks. *Chem. Rev.*, v. 112, p. 724-781, 2012.
- [9] Li, S. *et al.* Water Purification: Adsorption over Metal-Organic Frameworks. *Chin. J. Chem.*, 34, 175-185, 2016.
- [10] Wang, R. *et al.* Highly efficient MOF-based self-propelled micromotors for water purification. *RSC Adv.*, 7, 42462-42467, 2017.
- [11] James, B. R *et al.* Structure activity relationships in metal–organic framework catalysts for the continuous flow synthesis of propylene carbonate from CO₂ and propylene oxide. *RSC Adv.*, 8, 2132-2137, 2018.
- [12] Kobayashi, Y; Jacobs, B; Allendorf, M. D; Long, J. R. Conductivity, Doping, and Redox Chemistry of a Microporous Dithiolene-Based Metal–Organic Framework. *Chem. Mater*, 22, 4120-4122, 2010.
- [13] Kurmoo, M. Magnetic metal–organic frameworks. *Chem. Soc. Ver.*, 38, 1353-1379, 2009.
- [14] Hu, Z; Deibert, B. J; Li, J. Luminescent metal–organic frameworks for chemical sensing and explosive detection. *Chem. Soc. Rev.*, 43, 5815-5840, 2014.

- [15] Gulcay, E.; Erucar, I. Two-Dimensional Nanostructures for Biomedical Technology. Metal-Organic Frameworks for Biomedical Applications. Elsevier B. V., p. 175, 2020.
- [16] Rasmussen, J. W.; Martinez, E.; Louka, P.; Wingett, D. G. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7, 1063-1077, 2010.
- [17] Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today Reviews*, 10, 35-43, 2005.
- [18] Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev.*, 65(1), 36-48, 2013.
- [19] Gaucher, G.; Dufresne, M-H.; Sant, V. P.; Kang, N.; Maysinger, D.; Leroux, J-C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 109, 169-188, 2005.
- [20] Wang, Y. et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11, 313-327, 2015.
- [21] Chen, W.; Wu, C. Synthesis, functionalization, and applications of metal-organic frameworks in biomedicine. *Dalton Trans.*, 47, 2114-2133, 2018.
- [22] Horcajada, P. et al. Metal-Organic Frameworks as Efficient Materials for Drug Delivery. *Angewandte Chemie*, v. 118, 2006.
- [23] Cunha, D. *et al.* Rationale of Drug Encapsulation and Release from Biocompatible Porous Metal-Organic Frameworks. *Chem. Mater.*, 25, 2767-2776, 2013.
- [24] Horcajada, P. *et al.* Flexible Porous Metal-Organic Frameworks for a Controlled Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 6774-6780, 2008.
- [25] Zhuang, J. *et al.* Optimized Metal- Organic Framework Nanospheres for Drug Delivery: Evaluation of Small-Molecule Encapsulation. *ACS Nano*, 8, 2812-2819, 2014.
- [26] Rojas, S. *et al.* Nanoscaled Zinc Pyrazolate Metal-Organic Frameworks as Drug Delivery Systems. *Inorg. Chem.*, 55, 2650-2663, 2016.
- [27] Usman, K. A. S.; Buenviaje, S. C.; Razal, J. M.; Conato, M. T.; Payawan, L. M. Synthesis and characterization of zinc adeninate metal-organic frameworks (bioMOF1) as potential anti-inflammatory drug delivery material. *AIP Conference Proceedings*, 1958, 020018, 2018.
- [28] Imaz, I.; Rubio-Martínez, M.; An, J.; Solé-Font, I.; Rosi, N. L.; Maspoch, D. Metal-biomolecule frameworks (MBioFs). *Chem. Commun.*, 47, 7287-7302, 2011.

- [29] Sattar, T.; Athar, M.; Haq, M. N. Hydrothermal Synthesis, Characterization, and In Vitro Drug Adsorption Studies of Some Nano-BioMOFs. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1-10, 2016.
- [30] An, J; Geib, S. J; Rosi, N. L. Cation-Triggered Drug Release from a Porous Zinc-Adeninate Metal-Organic Framework. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 8376-8377, 2009.
- [31] Lucena, N. G.; Alves, R. C.; Abuçafy, M. P.; Chiavacci, L. A.; da Silva, I. C.; Pavan, F. R.; Frem, R. C. G. Zn-based porous coordination solid as diclofenac sodium carrier. *Journal of Solid State Chemistry*, 260, 67-72, 2018.
- [32] Batten, S. R.; Champness, N. R.; Chen, X.-M.; Garcia-Martinez, J.; Kitagawa, S.; Öhrström, L.; O’Keeffe, M.; Suh, M. P.; Reedijk, J. Terminology of metal–organic frameworks and coordination polymers (IUPAC Recommendations 2013) *Pure Appl. Chem.*, 85, 1715, 2013.
- [33] Erkey, C. Supercritical Fluids and Organometallic Compounds: From Recovery of Trace Metals to Synthesis of Nanostructured Materials. Capítulo 1 - Introduction to Coordination Compounds. *Supercritical Fluid Science and Technology*, 1, 1-10, 2011.
- [34] Gangu, K. K. *et al.* A review on contemporary Metal-Organic Framework materials. *Inorganica Chimica Acta.*, 446, 61–74, 2016.
- [35] Müller, M. Self-Assembled Monolayers as Templates for Metal-Organic Framework Thin-Films-Preparation and Applications. *Materials Science*, 1-25, 2016.
- [36] Li, H.; Eddaoudi, M.; O’Keeffe, M.; Yaghi, OM. Design and synthesis of an exceptionally stable and highly porous metal-organic framework. *Nature* 402, 276-279, 1999.
- [37] Liu, J. *et al.* Applications of metal–organic frameworks in heterogeneous supramolecular catalysis. *Chem. Soc. Rev.*, 43, 6011—6061, 2013.
- [38] Perry, J. J. IV.; Perman, J. A.; Zaworotko, M. J. Design and synthesis of metalorganic frameworks using metal organic polyhedra as supermolecular building blocks. *Chem. Soc. Rev.*, v. 38, p. 1400-1417, 2009.
- [39] An, J; Geib, S. J; Rosi, N. L. Cation-Triggered Drug Release from a Porous Zinc-Adeninate Metal-Organic Framework. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 8376-8377, 2009.
- [40] Olajire, A. A. Synthesis chemistry of metal-organic frameworks for CO₂ capture and conversion for sustainable energy future. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92, 570–607, 2018.
- [41] Wha-Seung, A. *et al.* Solvothermal Synthesis of Fe-MOF-74 and Its Catalytic Properties in Phenol Hydroxylation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10, 135-141, 2010.

- [42] Sefcik, J. *et al.* Scalable continuous solvothermal synthesis of metal organic framework (MOF-5) crystals. *Chemical Engineering Journal*, 285, 718-725, 2016.
- [43] Fan, X. *et al.* Microwave-assisted synthesis of zirconium-based metal organic frameworks (MOFs): Optimization and gas adsorption. *Microporous and Mesoporous Materials*, 260, 45-53, 2018.
- [44] Gascon, J. *et al.* Electrochemical synthesis of some archetypical Zn²⁺, Cu²⁺ and Al³⁺ metal-organic frameworks. *Cryst Growth Des*, 12, 3489-3498, 2012.
- [45] Ahn, W. S. *et al.* Facile synthesis of MOF-177 by a sonochemical method using 1-methyl-2-pyrrolidinone as a solvent. *Dalton Trans*, 39, 2883-2887, 2010.
- [46] Ahn, W. S. *et al.* Sonochemical synthesis of MOF-5. *Chem Commun*, 6336-6338, 2008.
- [47] Maspoch, D.; Cano-Saraiba, M.; Imaz, I.; Carné-Sánchez, A. A spray-drying strategy for synthesis of nanoscale metal-organic frameworks and their assembly into hollow superstructures. *Nature Chemistry*, 5, 203-211, 2013.
- [48] Rabenau, A. The Role of Hydrothermal Synthesis in Preparative Chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 24, 1026, 1985.
- [49] Horcajada, P. *et al.* Nanostructured metal-organic frameworks and their bio-related Applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 307, 342-360, 2016.
- [50] Biswas, S.; Stock, N. Synthesis of Metal-Organic Frameworks (MOFs): Routes to Various MOF Topologies, Morphologies, and Composites. *Chem. Rev.*, 112, 933-969, 2012.
- [51] Kappe, C. O. Microwave-assisted synthesis. 2019. Disponível em: <https://wiki.antonpaar.com/en/microwave-assisted-synthesis/>. Acesso em: 02 mai. 2021.
- [52] Masel, R. I.; Ni, Z. Rapid Production of Metal-Organic Frameworks via Microwave-Assisted Solvothermal Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 38, 12394-12395, 2006.
- [53] Jiang, X. *et al.* Facile synthesis of nanocrystals of a microporous metal-organic framework by an ultrasonic method and selective sensing of organoamines. *Chem. Commun.*, 3642-3644, 2008.
- [54] Sindoro, M.; Yanai, N.; Jee, Y.; Granick, S. Colloidal-Sized Metal-Organic Frameworks: Synthesis and Applications. *Acc. Chem. Res.*, 47, 459-469, 2014.
- [55] Wang, S. *et al.* Metal-Organic Framework Nanoparticles. *Adv. Mater.*, 1800202, 1-14, 2018.
- [56] Hermes, S. *et al.* Trapping metal-organic framework nanocrystals: an in-situ time-resolved light scattering study on the crystal growth of MOF-5 in solution. *J Am Chem Soc.*, 129, 5324-5, 2007.

- [57] Cravillon, J. *et al.* Controlling Zeolitic Imidazolate Framework Nano- and Microcrystal Formation: Insight into Crystal Growth by Time-Resolved In Situ Static Light Scattering. *Chem. Mater.*, 23, 2130–2141, 2011.
- [58] Schafer, P.; Kaptejin, F.; Van der Veen, M. A.; Domke, K. F. Understanding the Inhibiting Effect of BTC on CuBTC Growth through Experiment and Modeling. *Cryst. Growth Des.*, 17, 5603–5607, 2017.
- [59] Marshall, C. R.; Staudhammer, S. A.; Brozek, C. K. Size control over metal–organic framework porous nanocrystals. *Chem. Sci.*, 10, 9396–9408, 2019.
- [60] Rosnes, M. H.; Nesse, F. S.; Opitz, M.; Dietzel, P. D. C. Morphology control in modulated synthesis of metal-organic framework CPO-27. *Microporous and Mesoporous Materials*. 275, 207-213, 2019.
- [61] Winarta, J. *et al.* A Decade of UiO-66 Research: A Historic Review of Dynamic Structure, Synthesis Mechanisms, and Characterization Techniques of an Archetypal Metal–Organic Framework. *Cryst. Growth Des.*, 20, 1347–1362, 2020.
- [62] Diring, S.; Furukawa, S.; Takashima, Y.; Tsuruoka, T.; Kitagawa, S. Controlled Multiscale Synthesis of Porous Coordination Polymer in Nano/Micro Regimes. *Chem. Mater.*, 22, 4531–4538, 2010.
- [63] Jiang, D.; Burrows, A. D.; Edler, K. J. Size-controlled synthesis of MIL-101(Cr) nanoparticles with enhanced selectivity for CO₂ over N₂. *CrystEngComm*, 13, 6916-6919, 2011.
- [64] Paolino, D.; Fresta, M. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation: drug delivery systems*. 2ed, 437-495, 2006.
- [65] João, C. A. R. Encapsulação e libertação controlada de fármacos. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Biomédica) - Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2013.
- [66] Fantini, M. *et al.* Lipoplatin Treatment in Lung and Breast Cancer. *Chemother Res Pract.*, 125192, 2011.
- [67] Stathopoulos, G. P.; Antoniou, D.; Dimitroulis, J.; Stathopoulos, J.; Marosis, K.; Michalopoulo, P. Comparison of liposomal cisplatin versus cisplatin in non-squamous cell non-small-cell lung cancer. *Drugs* 67, 2153–2171, 2007.
- [68] Knežević, N.; Lin, V. S. Y. A magnetic mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system for photosensitive cooperative treatment of cancer with a mesopore-capping agent and mesopore-loaded drug. *Nanoscale*, 5, 1544-1551, 2013.

- [69] Allen C.; Han, J.; Yu, Y.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. Polycaprolactone-b-poly(ethylene oxide) copolymer micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone, *J. Control. Release* 63, 275–286, 2000.
- [70] Zhang, X. *et al.* The effect of autophagy inhibitors on drug delivery using biodegradable polymer nanoparticles in cancer treatment. *Biomaterials*, 35, 1932-1943, 2014.
- [71] Marqués, M. G; Hidalgo, T; Serre, C; Horcajada, P. Nanostructured metal–organic frameworks and their bio-related applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 307, 342-360, 2016.
- [72] Horcajada, P. *et al.* Metal–Organic Frameworks as Efficient Materials for Drug Delivery. *Angewandte Chemie*, 118, 2006.
- [73] Lucena, G. N. Síntese, caracterização e avaliação do potencial em *drug delivery* de BioMOFs (*Biocompatible Metal-Organic Frameworks*) de Zn (II). 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, Araraquara, 2016.
- [74] Forgan, R. *et al.* Selective Surface PEGylation of UiO-66 Nanoparticles for Enhanced Stability, Cell Uptake, and pH-Responsive Drug Delivery. *Chem.*, 2, 561-578, 2017.
- [75] Rojas, S. *et al.* Nanoscaled Zinc Pyrazolate Metal–Organic Frameworks as Drug-Delivery Systems. *Inorg. Chem.*, 55, 5, 2650–2663, 2016.
- [76] SVS – Ministério da Saúde, Brasil. Painéis de Monitoramento: Principais causas de morte no Brasil. Disponível em: <http://svs.aids.gov.br/dantps/centrais-de-conteudos/paineis-de-monitoramento/mortalidade/gbd-brasil/principais-causas/>. Acesso em: 29 jun 2021.
- [77] Thakkar, S.; Sharma, D.; Kalia, K.; Tekade, R. K. Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: A review. *Acta Bio.*, 101, 43-68, 2020.
- [78] Li, Z. *et al.* Therapeutic drugs and drug delivery systems targeting stromal cells for cancer therapy: a review. *Journal of Drug Targeting*, 28, 714-726, 2020.
- [79] Ma, P. *et al.* Inorganic nanocarriers for platinumium drug delivery. *Materialstoday*, 18, 554-564, 2015.
- [80] Scolaro, C. *et al.* In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)–Arene PTA Complexes. *J. Med. Chem.*, 48, 4161-4171, 2005.
- [81] Saaia, M. G. *et al.* Use of HPLC in the identification of cis and trans-diaquabis(2,20 - bipyridine)ruthenium(II) complexes: crystal structure of cis-[Ru(H₂O)₂(bpy)₂](PF₆). *Inorg. Chem. Comm.*, 6, 864-868, 2003.
- [82] Dwyer F. P; Goodwin H. A; Gyrfas E. C. Mono-and bis-(2, 2'-bipyridine) and (1,

10-phenanthroline) chelates of ruthenium and osmium. I. Monochelates of bivalent, trivalent, and quadrivalent ruthenium, *Aust. J. Chem.* 16, 42–50, 1963.

[83] Meyer, T. J.; Godwin, J. B. Preparation of ruthenium nitrosyl complexes containing 2,2'-bipyridine and 1, 10-phenanthroline, *Inorg. Chem.* 10, 471–474, 1971.

[84] Sauaia, M. G.; da Silva, R. S.; The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands, *Transit. Met. Chem.* 28, 254–259, 2003.

[85] Brasil, ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Resolução nº 166, 2017.

[86] Chang, S-S.; Clair, B.; Ruelle, J.; Beauchêne, J.; Di Renzo, F.; Quignard, F.; Zhao, G-J.; Yamamoto, H.; Gril, J. Mesoporosity as a new parameter for understanding tension stress generation in trees. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3023–3030, 2009.

[87] Nguyen, P. T. M.; Do, D. D.; Nicholson, D. Pore connectivity and hysteresis in gas adsorption: A simple three-pore model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 437, 56-68, 2013.

[88] Lázaro, I. A.; Lázaro, S. A.; Forgan, R. S. Enhancing anticancer cytotoxicity through bimodal drug delivery from ultrasmall Zr MOF nanoparticles. *Chem. Commun.*, 54, 2792-2795, 2018.

[89] Cychosz, K. A.; Guillet-Nicolas, R.; García-Martínez, J.; Thommes, M. Recent advances in the textural characterization of hierarchically structured nanoporous materials. *Chem. Soc. Rev.*, 46, 389-414, 2017.

[90] Howarth, A. J.; Liu, Y.; Li, P.; Li, Z.; Wang, T. C.; Hupp, J. T.; Farha, O. K. Chemical, thermal and mechanical stabilities of metal-organic frameworks. *Nature reviews materials*, 2016, 1, 15018.

[91] Burtch, N. C.; Jasuja, H.; Walton, K. S. Water Stability and Adsorption in Metal-Organic Frameworks. *Chem. Rev.*, 2014, 114, 10575-10612.

[92] ul Qadir, N.; Said, S. A. M.; Bahaidarah, H. M. Structural stability of metal organic frameworks in aqueous media – Controlling factors and methods to improve hydrostability and hydrothermal cyclic stability. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2015, 201, 61-90.

[93] Masoomi, M. Y., Beheshti, S. e Morsali, A. Shape Control of Zn(II) Metal–Organic Frameworks by Modulation Synthesis and Their Morphology-Dependent Catalytic Performance. *Cryst. Growth Des.*, 15, 2533–2538, 2015.

- [94] Pham, M-H.; Vuong, G-T.; Fontaine, F-G.; Do, T-O. Rational Synthesis of Metal-Organic Framework Nanocubes and Nanosheets Using Modulators and Their Morphology-Dependent Gas-Sorption Properties. *Cryst. Growth Des.*, 12, 3091–3095, 2012.
- [95] Vakili, R.; Xu, S.; Al-Janabi, N.; Gorgojo, P.; Holmes, S. M.; Fan, X. Microwave-assisted synthesis of zirconium-based metal organic frameworks (MOFs): Optimization and gas adsorption. *Microporous and Mesoporous Materials*, 260, 45-53, 2018.
- [96] Blăniță, G.; Ardelean, Q.; Lupu, D.; Borodi, G.; Mihet, M.; Coros, M.; Vlassa, M.; Misan, I.; Coldea, I.; Popeneciu, G. Microwave assisted synthesis of mof-5 at atmospheric pressure. *Rev. Roum. Chim.*, 56, 583-588, 2011.
- [97] Amo-Ochoa, P.; Givaja, G.; Miguel, P. J. S.; Castillo, O.; Zamora, F. Microwave assisted hydrothermal synthesis of a novel CuI-sulfate-pyrazine MOF. *Inorganic Chemistry Communications*, 10, 921-924, 2007.
- [98] Umemura, A., Diring, S., Furukawa, S., Uehara, H., Tsuruoka, T. e Kitagawa, S. Morphology Design of Porous Coordination Polymer Crystals by Coordination Modulation. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 15506-15513, 2011.
- [99] Morais, T. S. et al. Synthesis of organometallic ruthenium(II) complexes with strong activity against several human cancer cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 114, 65-74, 2012.
- [100] Possato, B. et al. Anticancer activity and DNA interaction of ruthenium acetate clusters bearing azanaphthalene ancillary ligands. *Polyhedron*, 176, 114261, 2020.
- [101] Ramos, L. C. B.; Marchesi, M. S. P.; Callejon, D.; Baruffi, M. D.; Lunardi, C. N.; Slep, L. D.; Bendhack, L. M.; da Silva, R. S. Enhanced Antitumor Activity against Melanoma Cancer Cells by Nitric Oxide Release and Photosensitized Generation of Singlet Oxygen from Ruthenium Complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016, 3592-3597, 2016.
- [102] Mitrovic, A.; Kljun, J.; Sobic, I.; Gobec, S.; Turel, I.; Kos, J. Clioquinol–ruthenium complex impairs tumour cell invasion by inhibiting cathepsin B activity. *Dalton Trans.*, 45, 16913-16921, 2016.
- [103] Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Spectrometric identification of organic compounds*. 3.ed. New York: John Wiley, 1974.
- [104] Fischer, B.; Heffeter, P.; Kryeziu, K.; Gille, L.; Meier, S. M.; Berger, W.; Kowol, C. R.; Keppler, B. K. Poly(lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. *Dalton Trans.*, 43, 1096, 2014.

- [105] Guo, B.; Liao, C.; Fang, Y.; Li, S.; Li, X.; Lu, Z.; Chen, Y. Ruthenium complex delivery using liposomes to improve bioactivity against HeLa cells via the mitochondrial pathway. *Nanomedicine*, 13, 22, 2018.
- [106] Cunha, D.; Yahia, M. B.; Hall, S.; Miller, S. R.; Chevreau, H.; Elkaïm, E.; Maurin, G.; Horcajada, P.; Serre, C. Rationale of Drug Encapsulation and Release from Biocompatible Porous Metal–Organic Frameworks. *Chem. Mater.*, 2013, 25, 14, 2767-2776.
- [107] Oh, H.; Li, T.; An, J. Drug Release Properties of a Series of Adenine-Based Metal–Organic Frameworks. *Chem. Eur. J.*, 2015, 21, 17010-17015.
- [108] B.P. Commission, *The British Pharmacopoeia: Complete Edition*, The Stationery Office, London, 1998.
- [109] Thi, H. P. N.; Ninh, H. D.; Tran, C. V.; Le, B. T.; Bhosale, S. V.; La, D. D. Size-Control and Surface Modification of Flexible Metal-Organic Framework MIL-53(Fe) by Polyethyleneglycol for 5-Fluorouracil Anticancer Drug Delivery. *ChemistrySelect*, 4, 2333-2338, 2019.
- [110] Lucena, F. R. S.; de Araújo, L. C. C.; Rodrigues, M. do D.; da Silva, T. G.; Militão, G. C. C.; Fontes, D. A. F.; Rolim-Neto, P. J.; da Silva, F. F.; Nascimento, S. C. Induction of cancer cell death by apoptosis and slow release of 5-fluoracil from metal-organic frameworks Cu-BTC. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 67, 707-713, 2013.
- [111] Chowdhuri, A. R.; Laha, D.; Pal, S.; Karmakar, P.; Sahu, S. K. One-pot synthesis of folic acid encapsulated upconversion nanoscale metal organic frameworks for targeting, imaging and pH responsive drug release. *Dalton Trans.*, 2016, 45, 18120.
- [112] Tan, L-L.; Li, H.; Qiu, Y-C.; Chen, D-X.; Wang, X.; Pan, R-Y.; Wang, Y.; Zhang, S. X-A.; Wang, B.; Yang, Y-W. Stimuli-responsive metal–organic frameworks gated by pillar(5)arene supramolecular switches. *Chem. Sci.*, 2015, 6, 1640.
- [113] Costa, P.; Lobo, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001, 13, 123–133.
- [114] Peppas, N.A., Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.*, 1985, 60, 110-111.
- [115] Hixon, A.W. and Crowell, J.H., Dependence of reaction velocity upon surface and agitation: I-Theoretical consideration. *Ind. Eng. Chem.*, 1931, 23, 923-931.
- [116] Körber, M. PLGA Erosion: Solubility- or Diffusion-Controlled? *Pharm. Res.* 2010, 27, 2414–2420.

- [117] Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A Simple Equation for Description of Solute Release I. Fickian and non-Fickian Release from non-Swellable Devices in the Form of Slabs, Spheres, Cylinders or Discs. *Journal of Controlled Release*. 1987, 5, 23-36.
- [118] Permanadewi, I.; Kumoro, A. C.; Wardhani, D. H.; Aryanti, N. Modelling of controlled drug release in gastrointestinal tract simulation. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2019, 1295, 012063.
- [119] Basak, S. C.; Kumar, K. S.; Ramalingam, M. Design and release characteristics of sustained release tablet containing metformin HCl. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008, 44, 477-483.