



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

VALESCA ARIANE DOS SANTOS PIZONE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE REDES METALO-
ORGÂNICAS A BASE DE ÁCIDO TRIMÉSICO**

Araraquara, SP

2020

VALESCA ARIANE DOS SANTOS PIZONE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE REDES METALO-
ORGÂNICAS A BASE DE ÁCIDO TRIMÉSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leila Aparecida Chiovacci Favorin

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Regina Célia Galvão Frem

Araraquara, SP

2020

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE REDES METALO-ORGÂNICAS A BASE DE ÁCIDO TRIMÉSICO"

AUTORA: VALESCA ARIANE DOS SANTOS PIZONE

ORIENTADORA: LEILA APARECIDA CHIAVACCI FAVORIN

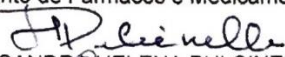
COORDINADORA: REGINA CÉLIA GALVÃO FREM

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



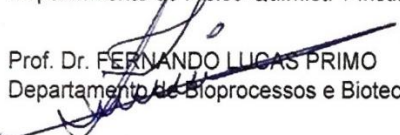
Profa. Dra. LEILA APARECIDA CHIAVACCI FAVORIN

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Profa. Dra. SANDRA HELENA PULCINELLI

Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020

P695d Pizone, Valesca Ariane dos Santos.
Desenvolvimento e caracterização de redes metalo-orgânicas a base de ácido trimésico / Valesca Ariane dos Santos Pizone. – Araraquara: [S.n.], 2020.
95 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Leila Aparecida Chiavacci Favorin.
Coorientadora: Regina Célia Galvão Frem.

1. MOF. 2. Estrutura cristalina. 3 Incorporação de fármaco. I. Favorin, Leila Aparecida Chiavacci, orient. II. Frem, Regina Célia Galvão, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, mãe Cristina, irmão Mairon e tio Júlio pelo incentivo diário e paciência. Agradeço de coração ao meu pai Carlos. Vocês foram essenciais para que eu continuasse a perseguir meus sonhos.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Leila Aparecida Chiavacci Favorin pelo conhecimento transmitido, amizade e confiança durante o período desse trabalho.

A minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Regina Célia Galvão Frem, por todo apoio em momentos de inseguranças e esclarecimentos frente ao assunto pesquisado.

Aos amigos do laboratório Marina, Bruna, Camila e Mariana, e todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta dissertação.

Ao Instituto de Química da UNESP/Araraquara, em especial a professora Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Zaghetete que forneceu os substratos de silício e o alvo de titânio e ouro utilizados neste trabalho.

Finalmente, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

As redes metalo-orgânicas (em inglês, Metal-Organic Frameworks ou MOFs) são materiais porosos que apresentam hábitos cristalinos distintos, possuem uma alta área de superfície e um grande volume de poros. Esses materiais podem ser utilizados na área farmacêutica como um sistema carreador e de liberação prolongada de fármacos. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo desenvolver materiais baseados em uma MOF de ácido trimésico (1,3,5-benzenotricarboxilato) com íons cobre (II) (conhecida como HKUST-1) de forma a modificar a sua morfologia octaédrica para analisar a citotoxicidade dos diferentes hábitos cristalinos frente a células saudáveis e cancerígenas como também a capacidade desses cristais de transportarem fármacos. Neste trabalho, além da forma padrão, foram sintetizadas partículas na forma de bastões e flores. Os resultados da caracterização por difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho, confirmaram a formação da MOF, a cristalinidade e a presença de picos característicos da fase desejada, e as imagens de microscopia eletrônica de varredura a diferenciação da forma das partículas. O efeito citotóxico gerado pelas MOFs na forma de bastões (VCuBTC) e octaédrica (VHKUST) foi avaliado nas linhagens celulares HDFa, HACAT e A-375. Os resultados confirmaram que há diferença na viabilidade celular sendo a forma de bastões a mais tóxica para as células. Finalmente, uma eficiência de encapsulação de 10% (m/m) foi obtida durante os testes de incorporação do fármaco modelo 5-fluorouracil para os materiais VCuBTC e VHKUST, comprovando a eficiência no carregamento de fármaco pelos materiais.

Palavras-chave: MOF, Estrutura cristalina, Incorporação de fármaco

Abstract

Metal-Organic Frameworks (MOFs) are porous materials that have distinct crystalline habits; they have a high surface area and a large pore volume. These materials can be used in the pharmaceutical field as a carrier and extended drug release system. Therefore, this work intended to develop materials based on a copper (II) ions trimesic acid (1,3,5-benzenetricarboxylate) MOF (known as HKUST-1) in order to modify its octameric morphology. The cytotoxicity of these diverse crystalline habits was analyzed against healthy and cancerous cells. The ability of these crystals to carry drugs was also analyzed. In this work, besides the standard form, particles in the rod-like form and flowers-like form were synthesized. The results of the characterization by X-ray diffraction and infrared spectroscopy confirmed the crystallinity and the presence of characteristic peaks of the desired phase and the scanning electron microscopy images showed the particle shape differentiation. The cytotoxic effect generated by MOFs in the form of rods (VCuBTC) and octahedral (VHKUST) was evaluated in the cell lines HDFa, HACAT and A-375. The results confirmed that there is a difference in cell viability with the rod-like form, which is the most toxic to cells. Finally, an encapsulation efficiency of 10% (w / w) was obtained during the incorporation tests of the model 5-fluorouracil drug to the materials VCuBTC and VHKUST, proving the efficiency of drug loading by the materials.

Keywords: MOF, crystalline structure, drug delivery

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema de formação das redes metalo-orgânicas	15
Figura 2: Número de publicações encontradas com o termo "metal-organic frameworks"	17
Figura 3: Número de publicações encontradas com o termo "metal-organic frameworks" e "drug delivery"	17
Figura 4: Representação esquemática das vias de citotoxicidade propostas com morfologia esférica e de fios.....	19
Figura 5: Exemplos de composto que podem ser utilizados como ligantes para a síntese de MOFs	23
Figura 6: Estrutura 3D e morfologia dos cristais das MOFs obtidas por MEV da, HKUST-1, MIL-101, UiO-66, MOF-5 e ZIF-8 (10,21,46–48).....	27
Figura 7: Estrutura da HKUST-1. A esfera azul indica o poro de 0,4 nm, a esfera amarela e a vermelha indicam os poros de 1,0 nm e 1,1 nm respectivamente	31
Figura 8 Ativação da HKUST-1 e remoção de moléculas de água coordenados aos átomos de cobre	32
Figura 9: Estrutura química do 5-Fu.....	35
Figura 10: Ilustração da síntese por metodologia layer-by-layer	44
Figura 11: Ilustração da retirada das MOFs do substrato e ativação em estufa a vácuo. A MOF ativada apresenta uma coloração levemente mais escura	45
Figura 12: Esquema das principais etapas do teste de citotoxicidade	47
Figura 13: Esquema das principais etapas do teste de citotoxicidade por Alamar blue®	48
Figura 14: Fotografia do material policristalino VHKUST antes (A) e após ativação térmica (B)	50
Figura 15: Microscopia Eletrônica de Varredura da VHKUST ativada	51
Figura 16: Difratoograma de raios-X da VHKUST após ativação (A) e a ficha CIF 2300380 referente à HKUST-1 (B)	52
Figura 17: Espectro infravermelho da MOF VHKUST após ativação	53
Figura 18: Imagem de Microscopia eletrônica de varredura das MOFs sintetizadas em substratos submetidos a diferentes técnicas de abrasão. A – água régia; B – lixa d'água; C - bucha tipo Scotch Britte®; D – algodão com água e detergente; E – algodão em metanol; F – metanol com agitação	55
Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura dos substratos com depósito de ouro contendo cristais de MOF posicionados no fundo do recipiente que contém o meio reacional (A) e na superfície do meio reacional (B)	58
Figura 20: Imagem MEV do material formado sobre substrato de silício sem recobrimento	59
Figura 21: Microscopia (MEV) das MOFs sintetizadas com auxílio de substrato de silício recoberto com titânio	60

Figura 22: Microscopia MEV da MOF sintetizada sobre substrato de silício recoberto com titânio+ouro no mesmo aumento apresentado para os substratos anteriores (A) e com um aumento de 1.500 vezes (B)	61
Figura 23: Comparação do crescimento dos cristais sobre substrato de titânio+ouro e dos cristais crescidos por substrato de silício somente com ouro	62
Figura 24: Relação entre a distribuição de tamanhos de partículas e vias de administração (82).....	63
Figura 25: Influência da concentração dos reagentes no tipo de partícula formada: Figura (A) síntese com a concentração descrita no subitem 1; Figura (B) síntese com a concentração descrita no subitem 2; Figura (C) síntese com a concentração descrita no subitem 3.....	65
Figura 26: Imagem MEV obtida do material retirado do substrato Titânio+Ouro após imersão em 3 mL de meio reacional.....	67
Figura 27: Imagens MEV do material retirado do substrato titânio+ouro após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas de imersão em meio reacional	68
Figura 28: Ilustração do mecanismo de formação do cristal em forma de flores (83).....	69
Figura 29: Foto do pó das MOFs VCuBTC antes do processo de ativação (A) e após o processo de ativação (B)	70
Figura 30: Representação esquemática da nucleação em superfície de substrato	71
Figura 31: Fotos do substrato silício recoberto por titânio+ouro após a síntese layer-by-layer (A) e após a síntese de contato direto (B)	71
Figura 32: Imagem MEV da MOF obtida por síntese de layer-by-layer.....	72
Figura 33: Difractogramas de raios-X da MOF VCuBTC após ativação dos poros (A) e o difratograma de raios-X da CIF 7214298.....	73
Figura 34: Espectro vibracional na região do infravermelho da amostra VCuBTC após ativação	74
Figura 35: Curva analítica do 5-Fu em água obtida por UV-Vis e sua equação da reta	75
Figura 36: Espectro infravermelho do fármaco 5-Fu e da MOF VKHUST+5-Fu (A) e do 5-Fu e da MOF VCuBTC+5-Fu (B).....	77
Figura 37: Imagem MEV da MOF VCuBTC antes da incorporação do 5-Fu (A) e após a incorporação do 5-Fu (B) e da MOF VHKUST antes da incorporação do 5-Fu (C) e após a incorporação do 5-Fu (D)	79
Figura 38: Placa de 96 poços com o tratamento de MTT (A) e após a retirada do tratamento de MTT (B)	80
Figura 39: Viabilidade celular via ensaio colorimétrico para avaliação de citotoxicidade MTT das MOFs VCuBTC e da MOF VHKUST frente a linhagem celular HDFa	81
Figura 40: Fotografia da placa de 96 poços após o tratamento com a resasurina (A) e (B) após a redução da resasurina	82

Figura 41: Gráfico da viabilidade celular (%) das células HaCat (A) e A-375 (B), após o tratamento de 24 horas com 5-Fu, VHKUST+5-Fu, VHKUST, VCuBTC+5-Fu e VCuBTC. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. **** Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).....	83
Figura 42: Gráfico da viabilidade celular (%) das células HaCat (A) após o tratamento de 24 horas com VHKUST e VCuBTC. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. **** Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).....	84
Figura 43: Gráfico da viabilidade celular (%) das células HaCat (A) após o tratamento de 24 horas com VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. ** Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).....	85
Figura 44: Gráfico da viabilidade celular (%) das células A-375 (B) após o tratamento de 24 horas com VHKUST e VCuBTC. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. **** Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).....	86
Figura 45: Gráfico da viabilidade celular (%) das células A-375 (B) após o tratamento de 24 horas com VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. *** Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).....	87

Lista de Tabelas

Tabela 1: Determinação da eficiência de encapsulação (EE%) obtida com a MOF VCuBTC e VHKUST após contato com solução contendo 5-Fu	76
Tabela 2: Resultados de viabilidade celular para a célula HDFa	81
Tabela 3: Resultados de viabilidade celular para a célula HaCat frente a VHKUST e VCuBTC	84
Tabela 4 Resultados de viabilidade celular para a célula HaCat frente a VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu	85
Tabela 5: Resultados de viabilidade celular para a célula A-375 frente a VHKUST e VCuBTC	86
Tabela 6: Resultados de viabilidade celular para a célula A-375 frente a VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu	87
Tabela 7: Comparativo da citotoxicidade apresentada pelo material em células não tumorais (HaCat) e células tumorais (A-375) na concentração usual para tratamento de câncer de pele.....	88

Lista de Abreviaturas

5-Fu: 5-Fluorouracil

BTC: Ácido Trimésico

CIF: Informações de Artigos Cristalográficos, (Crystallographic Information File)

CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events

CuSO₄: Sulfato de cobre II pentahidratado

DCM: Diclorometano

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF: Dimetilformamida

EE%: Eficiência de encapsulação

HDFa: Fibroblastos dérmicos humanos

HKUST: Hong Kong University of Science and Technology

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry)

IV: Infravermelho

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MIL: Materials of Institut Lavoisier

MOF: Redes metalo-orgânicas (do inglês metal-organic framework)

PBS: Tampão fosfato salino

PEG: Polietilenoglicol

PLGA: ácido poli lático-co-glicólico

SBB: blocos de construção supermoleculares (do inglês supermolecular building layer)

SBU: Secondary building units

SURMOF: Surface-mounted metal–organic framework

TS: Timidilato sintase

XRD: Difração de raios X (do inglês X Ray diffraction)

ZIF: Zeolitic imidazole framework

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. Revisão Bibliográfica	20
2.1. Redes metalo-orgânicas – (Metal-Organic Frameworks – MOFs)	20
2.2. Classificação das MOFs.....	21
2.3. Ativação dos poros na rede metalo-orgânica	25
2.4. Tamanho e forma das partículas.....	26
2.5. Uso de substratos	28
2.6. Redes metalo-orgânica HKUST-1	30
2.7. Sistema de liberação de fármacos	32
2.8. 5- Fluorouracil	34
3. OBJETIVO	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Materiais.....	37
4.2. Equipamentos:	38
4.3. Métodos experimentais	39
4.3.1. Sínteses.....	39
4.3.1.1. Síntese das redes metalo-orgânicas a base de ácido trimésico e acetato de cobre - HKUST-1.....	39
4.3.1.2. Sínteses em substrato.....	40
4.3.1.2.1. Limpeza e preparo do substrato de silício.....	40
4.3.1.2.2. Limpeza e do substrato de silício para posterior deposição de metais.....	40
4.3.1.2.3. Preparo do substrato de silício com camadas de ouro	40
4.3.1.2.4. Preparo do substrato de silício com camadas de titânio e ouro.....	41
4.3.1.2.4.1. Abrasão do substrato	41
4.3.1.3. Síntese das redes metalo-orgânicas a base de ácido trimésico e sulfato de cobre em substrato – VCuBTC.....	42
4.3.1.3.1. Síntese de crescimento direto em substrato	42
4.3.1.3.2. Síntese layer-by-layer	43
4.3.2. Métodos de caracterização.....	45
4.3.2.1. Difração de Raios X (DRX).....	45

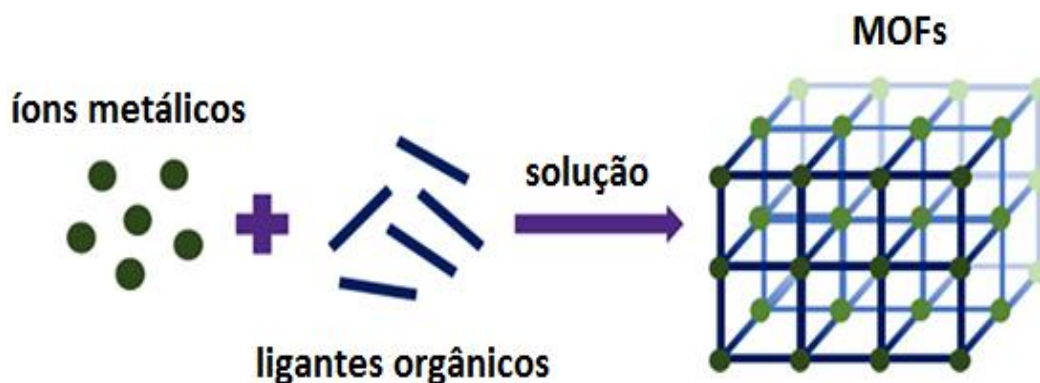
4.3.2.2.	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV).....	45
4.3.2.3.	Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)	45
4.3.3.	Avaliação da citotoxicidade	46
4.3.3.1.	Método colorimétrico por MTT.....	46
4.3.3.2.	Método colorimétrico por Alamar blue®	47
4.3.4.	Eficiência de incorporação de fármaco nas redes metalo-orgânicas... ..	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
5.1.	Síntese de VHKUST.....	50
5.2.	Síntese das redes metalo-orgânicas sobre substratos (SURMOFs, MOFs on surface)	54
5.2.1	Síntese em substrato de silício com deposição de ouro	54
5.3.	Influência do local de imersão	56
5.4.	Síntese em substrato de silício sem deposição	58
5.5.	Síntese em substrato de silício com deposição de uma camada de titânio.	59
5.6.	Síntese em substrato de silício com deposição de uma camada de titânio e ouro.....	60
5.7.	Influência da variação da concentração dos reagentes nas propriedades dos cristais obtidos pela síntese de contato direto em substrato de silício recoberto com titânio e ouro.	63
5.8.	Síntese de contato direto em substrato de silício com deposição de uma camada de titânio e ouro com variação do volume de solução.....	66
5.9.	Síntese de contato direto sobre substrato de silício com deposição de titânio e ouro com variação do tempo de contato	67
5.10.	Ativação dos poros do material VCuBTC	69
5.11.	Síntese layer-by-layer	70
5.12.	Ensaio de incorporação do fármaco 5-fluorouracil	75
5.13.	Avaliação da citotoxicidade	80
6.	CONCLUSÕES	90
7.	REFERÊNCIAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

Os materiais sólidos cristalinos porosos estão despertando cada vez mais a atenção da comunidade científica. Uma das classes de materiais porosos que se destaca são as redes metalo-orgânicas (MOFs, do inglês Metal-Organic Frameworks). Atualmente são conhecidas cerca de 10.000 estruturas diferentes para esses materiais (1), os quais possuem uma abrangente aplicação na área farmacêutica, industrial e ambiental (2–6).

As MOFs podem ser definidas como redes de coordenação constituídas por ligantes orgânicos e centros de coordenação baseados em íons metálicos, ou seja, são materiais híbridos (7). A Figura 1 apresenta um esquema ilustrando a formação das redes metalo-orgânicas. Nesta figura os átomos metálicos (representados por pequenos pontos circulares) formam os pontos de coordenação na estrutura (chamados de “nós”) e estão conectados aos ligantes orgânicos (também denominado de espaçadores de rede ou “hastes”).

Figura 1: Esquema de formação das redes metalo-orgânicas



Fonte: Autor

O responsável pelos primeiros relatos na literatura científica sobre as redes metalo-orgânicas foi Tomic (8) em 1965, que descreveu os materiais que hoje em dia seriam denominados MOFs, polímeros metalo-orgânicos ou estruturas supramoleculares.

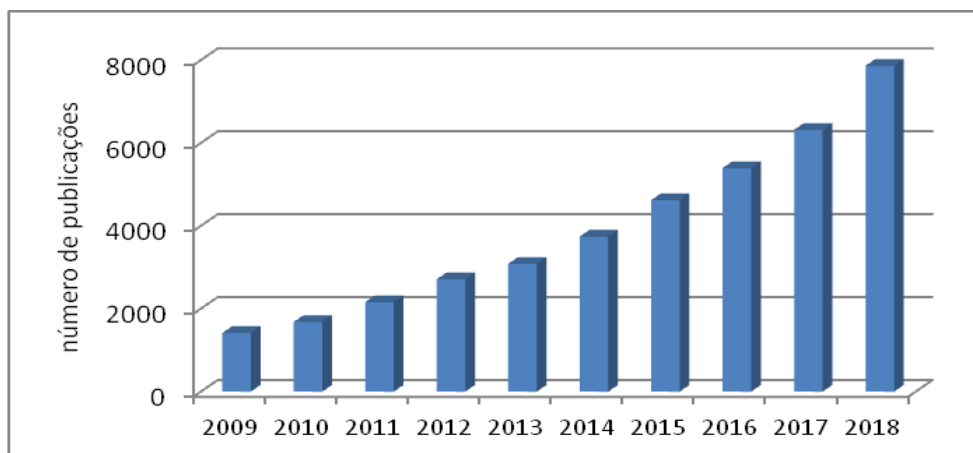
O tema, porém só ganhou atenção no final de 1995, quando a síntese começou a ser baseada no conceito de design reticular, que descrevia a organização de estruturas ordenadas pré-determinadas através de blocos de construção molecular rígidos que se repetem e se mantêm unidos através de fortes ligações covalentes metal-ligante (9,10).

O interesse frente a essa classe de material é consequência das propriedades de cristalinidade, porosidade e forte interação entre o metal e o ligante. Devido à ocorrência simultânea dessas características, muitos estudos destacam a síntese e a caracterização das MOFs sendo direcionada para áreas específicas como o armazenamento de gases (10), catálise (2), e sensor químico (11), entre outras (3,11,12). Em função das propriedades físico-químicas, as MOFs são igualmente promissoras para uso como sistemas de carregamento de fármacos (13,14) e diagnóstico por imagens (4).

O uso da síntese de design reticular, permitiu planejar a estrutura das MOFs, o que influenciou no aumento exponencial do número de publicações sobre o tema nas últimas décadas. O uso das propriedades físico-químicas, como a alta porosidade, atuou no aumento dos estudos das MOFs voltada à finalidade farmacêutica como o transporte de fármaco (4,5,10,15).

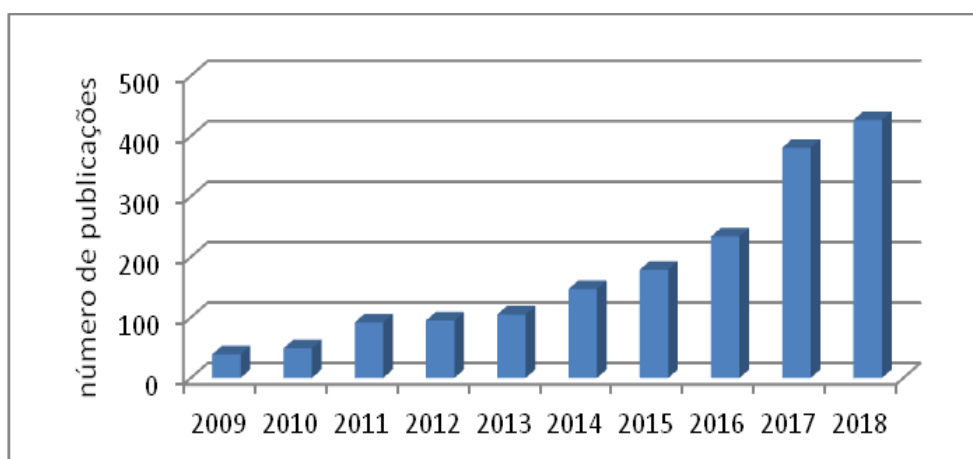
A Figura 2 apresenta a evolução temporal do número de publicações científicas sobre as MOFs e a Figura 3 o crescimento dos estudos na área de transporte de fármacos.

Figura 2: Número de publicações encontradas com o termo "metal-organic frameworks"



Fonte: Web of Science, acessado em 13 de janeiro de 2020 (disponível em: http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=7C6I6xUaeU1FCAKZq1g&preferencesSaved=)

Figura 3: Número de publicações encontradas com o termo "metal-organic frameworks" e "drug delivery"



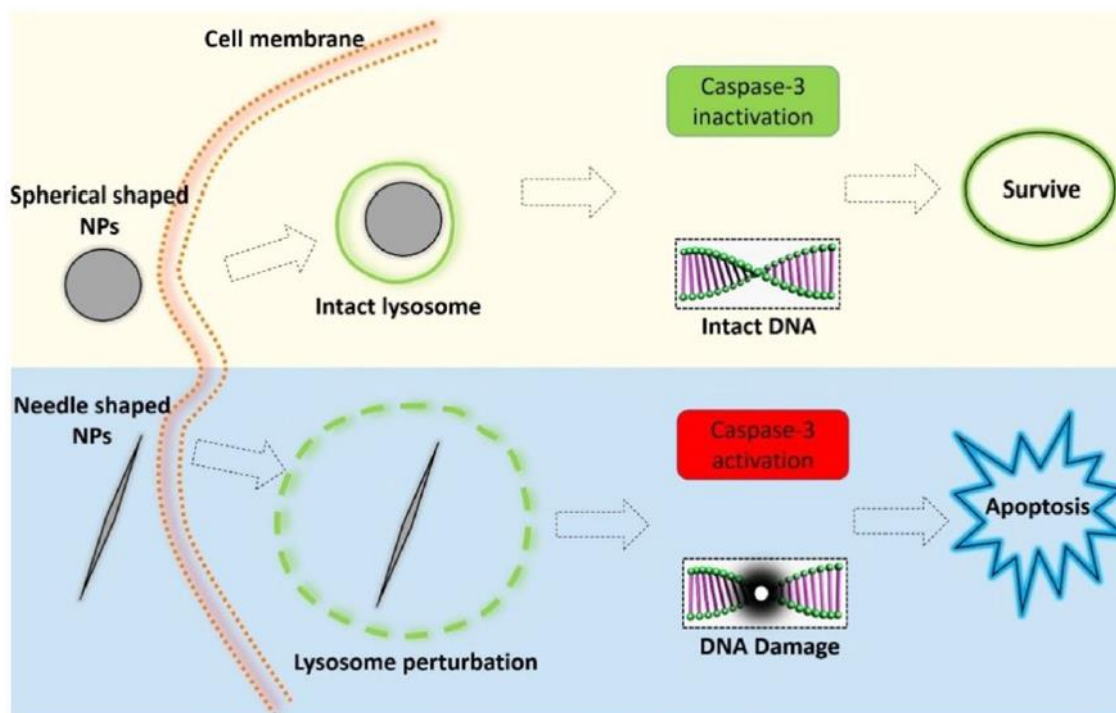
Fonte: Web of Science, acessado em 13 de janeiro de 2020 (disponível em http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=7C6I6xUaeU1FCAKZq1g&preferencesSaved=)

A grande maioria das MOFs descritas na literatura até o ano 2.000 era composta por moléculas orgânicas derivadas de matérias-primas petroquímicas não renováveis, por metais de transição e de alta toxicidade. Atualmente as MOFs estão sendo constituídas por compostos naturais e biocompatíveis com o sistema biológico (16,17).

Apesar da variedade de estruturas cristalinas e de composição química, ainda não existem muitos estudos a respeito da influência da morfologia dos cristais nas propriedades finais das MOFs, especialmente no caso da citotoxicidade e do perfil de incorporação de fármacos a partir desses materiais. Zhang e colaboradores (14) realizaram um estudo sobre materiais à base de ácido polietilenoglicol (PEG) e ácido poli lático-co-glicólico (PLGA), projetados para terem a morfologia semelhante a fios e morfologia esférica, o que permitiu analisar que a toxicidade dos materiais era dependente da sua morfologia. Os resultados do ensaio de citotoxicidade MTT conduzidos em células de carcinoma hepático (HepG2) demonstraram que a viabilidade celular permaneceu em torno de 84% para materiais de morfologia esféricas porém materiais com morfologia semelhante a fios causaram uma redução da viabilidade celular em 44%, ou seja, a viabilidade celular encontrada foi de 56%. A variação da viabilidade celular pode ser benéfica, por exemplo, para o aumento da morte de células cancerígenas.

A Figura 4 retirada do trabalho de Zhang e colaboradores (14), ilustra a influência da morfologia do material na citotoxicidade celular. Na representação esquemática, é possível observar que quando a célula internaliza partículas esféricas, o lisossoma da célula permanece intacto, a caspase-3 não é ativada, o DNA continua intacto e a célula sobrevive. Entretanto, quando a célula internaliza partículas na forma de fios, ocorre uma perturbação do lisossoma o qual tem capacidade de induzir a ruptura da membrana lisossomal, o que gera uma ativação da caspase-3, ação que causa danos ao DNA, induzindo a célula a apoptose, ou seja, a morte celular.

Figura 4: Representação esquemática das vias de citotoxicidade propostas com morfologia esférica e de fios



Fonte: Zhang (2017)

Com base nesse estudo, foram realizadas análise de citotoxicidade como também a avaliação da incorporação de fármacos em MOFs de diferentes morfologias.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Redes metalo-orgânicas – (Metal-Organic Frameworks – MOFs)

Os materiais porosos vêm sendo estudados há muito tempo para diversas aplicações; com o avanço das técnicas de caracterização e de métodos de síntese ocorreu o desenvolvimento das zeólitas e posteriormente dos materiais mesoporosos (18).

Os primeiros relatos na literatura sobre materiais porosos que apresentavam capacidade de modulação das propriedades estruturais como a porosidade surgiu em 1954, ano no qual o conceito de polímeros de coordenação foi introduzido como sendo estruturas cristalinas inorgânicas onde os íons metálicos se ligam a componentes orgânicos multidentados (19).

Durante cerca de quarentas anos foram realizadas diversas pesquisas voltadas para a área de polímeros de coordenação e em 1995 o termo “metal-organic framework” foi introduzido nos trabalhos do grupo de Yaghi e colaboradores (20), porém, sem dados específicos sobre a porosidade dos materiais. Em 1999 houve um grande avanço no estudo das MOFs com o relato do desenvolvimento da MOF HKUST-1 e a MOF-5, a primeira constituída por CuSO_4 e ácido trimésico e a segunda constituída por Zn_4O e ácido tereftálico como ligante orgânico. Essas MOFs apresentam porosidade permanente, estabilidade térmica e química e ausência de solvente dentro dos poros (21,22). A partir deste trabalho muitas MOFs foram sintetizadas com diversas propriedades estruturais e de porosidade (4,5,12,23).

Visando aperfeiçoar as propriedades do material uma grande variedade de MOFs já foi sintetizada com diferentes metais de transição, bem como diferentes ligantes orgânicos, o que permitiu a variação da área de superfície, do tamanho e da funcionalidade dos poros, além da topologia do material. Por fim, quando são empregadas técnicas de modificação pós-síntese a MOF pode ter a sua funcionalidade química ajustada para finalidades como a melhora da sua

estabilidade química e vetorização de moléculas biologicamente ativas (4,15,24,25).

Devido as variadas descrições sobre o conceito de compostos de coordenação e a seu campo de pesquisa ser multidisciplinar, foi necessário o desenvolvimento de um projeto pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), norteando as diretrizes de terminologia e nomenclatura das MOFs, definindo que elas são uma subclasse do grupo de substâncias conhecidas como polímeros de coordenação, as quais formam redes multidimensionais coordenadas e que possuem espaços potencialmente vazios (26).

Frente a nomenclatura, as MOFs vem sendo descritas, na maioria das vezes, com uma abreviatura seguida de um número sequencial de acordo com a ordem cronológica da descoberta. As abreviaturas indicam o tipo de material, como MOF (metal-organic framework), o tipo de estrutura, como ZIF (zeolitic imidazole framework) e SURMOF (surface-mounted metal–organic framework) ou até mesmo o laboratório em que o material foi desenvolvido, como por exemplo, MIL (Materials of Institut Lavoisier) e HKUST (Hong Kong University of Science and Technology) (5,15,20,21,27,28).

Finalmente demonstrando a viabilidade do uso das MOFs, por exemplo, para catálise e absorção de gases, a empresa BASF® comercializa uma seleção de cristais com diferentes tamanhos de poros, metais (como Al, Cu, Fe e Zn) e também ligantes orgânicos (como BTC e BDC). As MOFs são comercializadas sobre o nome de Basolite®, dentre elas a Basolite®-A100 (MIL-53), Basolite®-C300 (HKUST-1) e Basolite®-Z1200 (ZIF-8) (29).

2.2. Classificação das MOFs

As MOFs são divididas em 3 gerações. As MOFs de primeira geração são compostas por íons de metais de transição que tem a função similar a “nós” e se conectam a ligantes simples. Essas MOFs apresentam um sistema poroso dependente das moléculas dos solventes, ou seja, durante a síntese a estrutura porosa é formada e o solvente fica aprisionado no interior desses poros, ao

realizar o processo de ativação (descrito no item 2.3) para a remoção do solvente e consequentemente a obtenção de poros vazios, a estrutura porosa entra em colapso de forma irreversível. O colapso do material ocorre em razão da utilização de ligantes simples que formam interações fracas com o metal e que são sustentados pela presença do solvente no interior dos poros (9,26,30–32).

Os materiais da segunda geração ao invés de um único íon metálico no vértice da rede apresentam um complexo de íons metálicos que são sustentados, em mais de um ponto de coordenação, pelos ligantes orgânicos bidentados, formando o que é conhecido como unidades de construção secundária (do inglês *secondary building units* – SBU). Desta forma há uma forte interação metal-ligante dada por ligações covalentes que garantem a manutenção da porosidade das MOFs geradas mesmo após a remoção das moléculas visitantes (9,10,33).

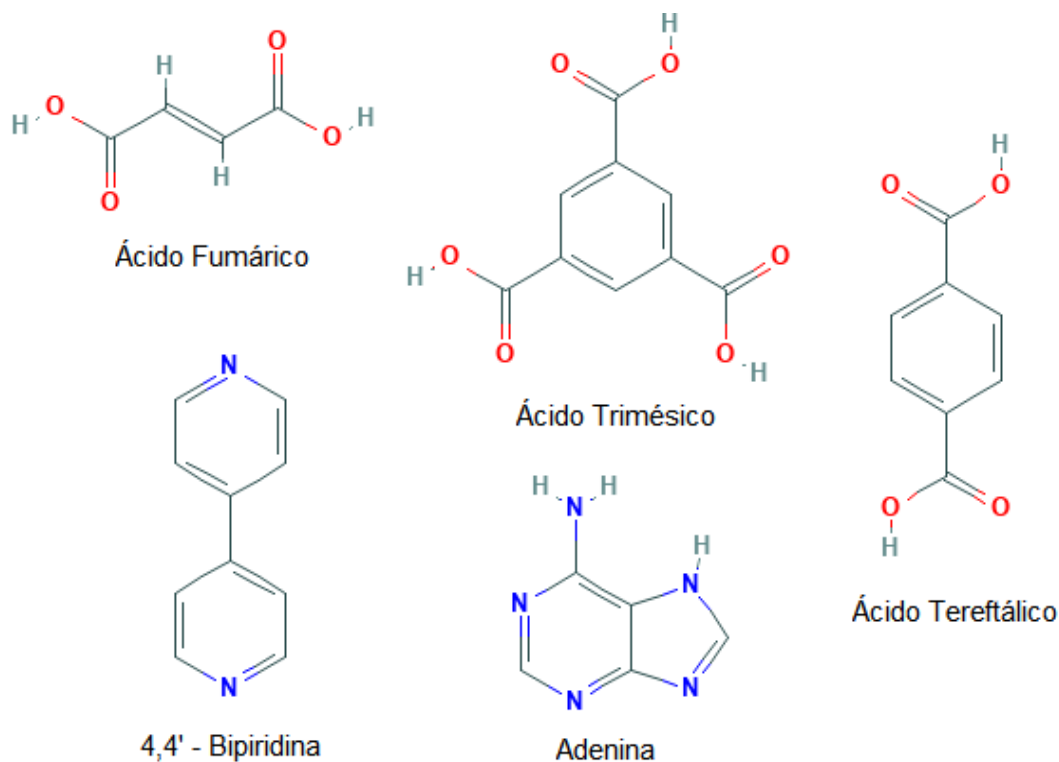
Por fim, os compostos de terceira geração possuem alta complexidade estrutural baseada no conceito conhecido como blocos de construção supramoleculares (do inglês *supermolecular building layer* – SBB), onde a rede tridimensional é obtida através do empilhamento de MOFs bidimensionais. Essa estrutura auxilia na construção de estruturas metalo-orgânicas estendidas que apresentam poros flexíveis, os quais podem sofrer alterações reversíveis em sua forma dependendo da presença de solvente ou em resposta a estímulos externos, como luz e temperatura (10,34).

A natureza e a concentração dos componentes (sais metálicos e ligantes orgânicos) determinam as características finais das MOFs, como a sua estabilidade (conforme descrito acima), a existência de propriedades magnéticas, ópticas, ou ainda possuir grandes canais para passagem de moléculas. Sendo assim, os componentes precursores de uma MOF devem ser cuidadosamente escolhidos, à medida que as suas propriedades são altamente relacionadas com a sua composição que por sua vez afetará a aplicação final do material (10,12,35).

Existem diversos compostos que podem ser utilizados como ligantes orgânicos, a Figura 5 apresenta alguns exemplos destes ligantes. A formação estrutural da MOF ocorre de acordo com a posição dos grupos de coordenação nas moléculas do ligante, que determinam o local em que o metal irá coordenar e

como a rede vai ser definida que pode, por exemplo, ser linear, em forma de T ou Y, tetraédrica, quadrado-planar, entre outras (30).

Figura 5: Exemplos de composto que podem ser utilizados como ligantes para a síntese de MOFs



Fonte: (disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

A formação das MOFs ocorre através da união e repetição das ligações metal-componente orgânico formando uma rede tridimensional, que pode ser sintetizada por diferentes técnicas que usualmente utilizam um solvente, podendo necessitar de temperatura, que varia desde a temperatura ambiente até aproximadamente 250 °C. As rotas alternativas de síntese podem influenciar as características dos materiais como o tamanho da partícula, a distribuição de tamanho de poros, a morfologia e consequentemente as propriedades finais do material (36).

Atualmente os métodos de síntese descritos na literatura são:

I. *Evaporação ou difusão de solventes*: Primeiro método utilizado para obtenção de materiais altamente cristalinos. O método consiste na adição de uma

solução contendo íons metálicos a uma solução contendo moléculas orgânicas multidentadas. Desta união ocorre o processo de auto arranjo onde o metal forma os “nós” da estrutura e liga-se à molécula orgânica que forma as “hastes”. A cristalização desses novos materiais ocorre através da difusão lenta de um meio para o outro meio. A desvantagem do método é a sua lentidão porém o mesmo é considerado simples e eficaz (36,37);

II. *Síntese solvotérmica convencional (aquecimento elétrico)*: A mistura reacional é colocada, por exemplo, em um reator de aço fechado geralmente revestido com Teflon®, que posteriormente é aquecido a temperaturas superiores ao ponto de ebulição do solvente, de forma a garantir condições adequadas de pressão (entre 10 a 100 atm) à síntese. O crescimento dos cristais pode ser promovido também pela variação dos valores das rampas de aquecimento e arrefecimento que influenciam também na modulação da estrutura porosa entre micro (abertura < 20 Å) e mesoporosa (abertura entre 20 e 500 Å). Este método pode ser realizado com ou sem agitação e o tempo da síntese pode variar de horas a vários dias (6,13);

III. *Síntese solvotérmica usando radiação de micro-ondas*: este método utiliza as micro-ondas para aquecer de forma rápida e uniforme o meio reacional. Ao variar os parâmetros da síntese é possível alterar o tamanho dos cristais formados, o que aumenta a seletividade da síntese na obtenção do material desejado. As vantagens descritas, para além da simplicidade de produção das MOFs, é a eficácia do aquecimento que ocorre devido à interação direta da radiação com o meio reacional e a baixa geração de resíduos, desta forma, gradativamente essa síntese vem sendo cada vez mais empregada (23,36);

IV. *Ultrassom*: É uma síntese pouco explorada que tem como principal objetivo a produção rápida de MOFs. O ultrassom é uma vibração cíclica com frequência próxima a 20 KHz capaz de gerar uma alta energia que interage com o meio reacional através de ciclos alternados de compressão (alta pressão) e rarefação (baixa pressão). Essa síntese é normalmente utilizada para a formação de nanocristais uma vez que promove uma nucleação homogênea (36,38).

Por fim, novas formas de sínteses têm sido apresentadas e discutidas como o controle na capacidade de formar cadeias (catenação) e síntese eletroquímica que evita uso de solventes orgânicos, entre outras (39–41).

2.3. Ativação dos poros na rede metalo-orgânica

Como um dos atributos mais importantes apresentados pelas MOFs é a porosidade permanente, característica fundamental para a aplicação do material na liberação de fármacos, é essencial a desobstrução dessas cavidades através do processo conhecido como ativação ou remoção de moléculas de solventes.

Desta maneira são descritas a seguir algumas estratégias como sendo as mais eficazes e gerais na ativação das MOFs.

I. *Ativação convencional*: faz uso de tratamento térmico e vácuo para remover o solvente. A literatura descreve alguns exemplos bem-sucedidos de MOFs que utilizam esse tipo de ativação, porém a maioria dos materiais apresentou perda de cristalinidade e liberação mínima de porosidade. Consequentemente, estratégias de ativação adicionais foram desenvolvidas tendo em vista a obtenção de grandes áreas de superfície para a maioria das MOFs (42);

II. *Ativação por troca de solvente*: é dada pela troca da sobra do solvente que foi necessário para a síntese (como por exemplo, metanol), que apresenta alto ponto de ebulição, por um solvente de ponto de ebulição mais baixo (por exemplo clorofórmio - CHCl_3), posteriormente é realizada a ativação com parâmetros mais moderados de temperatura e vácuo. O resultado desse processo são sólidos porosos com estabilidade estrutural e área superficial aumentada, quando comparado as MOFs ativadas convencionalmente (42,43);

III. *Ativação por CO_2 supercrítico*: É uma técnica baseada na troca de solventes, porém nesse caso é utilizado um solvente intermediário que seja miscível ao CO_2 líquido. Por exemplo, a troca do solvente ocorrerá ao aplicar uma alta pressão (73 atm) por horas em uma amostra na qual o solvente (como o etanol) está solúvel em CO_2 líquido. Em seguida, a amostra é levada à

temperatura supercrítica de CO₂ (isto é 31°C) o que resulta no preenchimento dos poros das MOFs pelo CO₂ supercrítico. Finalmente o equipamento ainda em temperatura supercrítica é lentamente ventilado e o CO₂ é eliminado na forma de um gás. Além de ser atóxica, com custos competitivos e possibilidade de escalonamento, os resultados dessa técnica são promissores uma vez que algumas MOFs exibiram uma área superficial até quatro vezes maior do que quando comparada a técnica tradicional de troca de solvente (44);

IV. *Ativação por liofilização*: é um método em que a MOF é adicionada a um solvente como o benzeno ou ciclo-hexano. A amostra é submetida a diversos ciclos de congelamento a temperatura de 0 °C e degelo a temperatura ambiente. Após o último ciclo de congelamento a amostra é colocada sob vácuo e a uma temperatura abaixo do ponto triplo do solvente. Finalmente quando a amostra está aquecida sobre uma pressão reduzida o solvente é sublimado e assim os poros são desobstruídos (42).

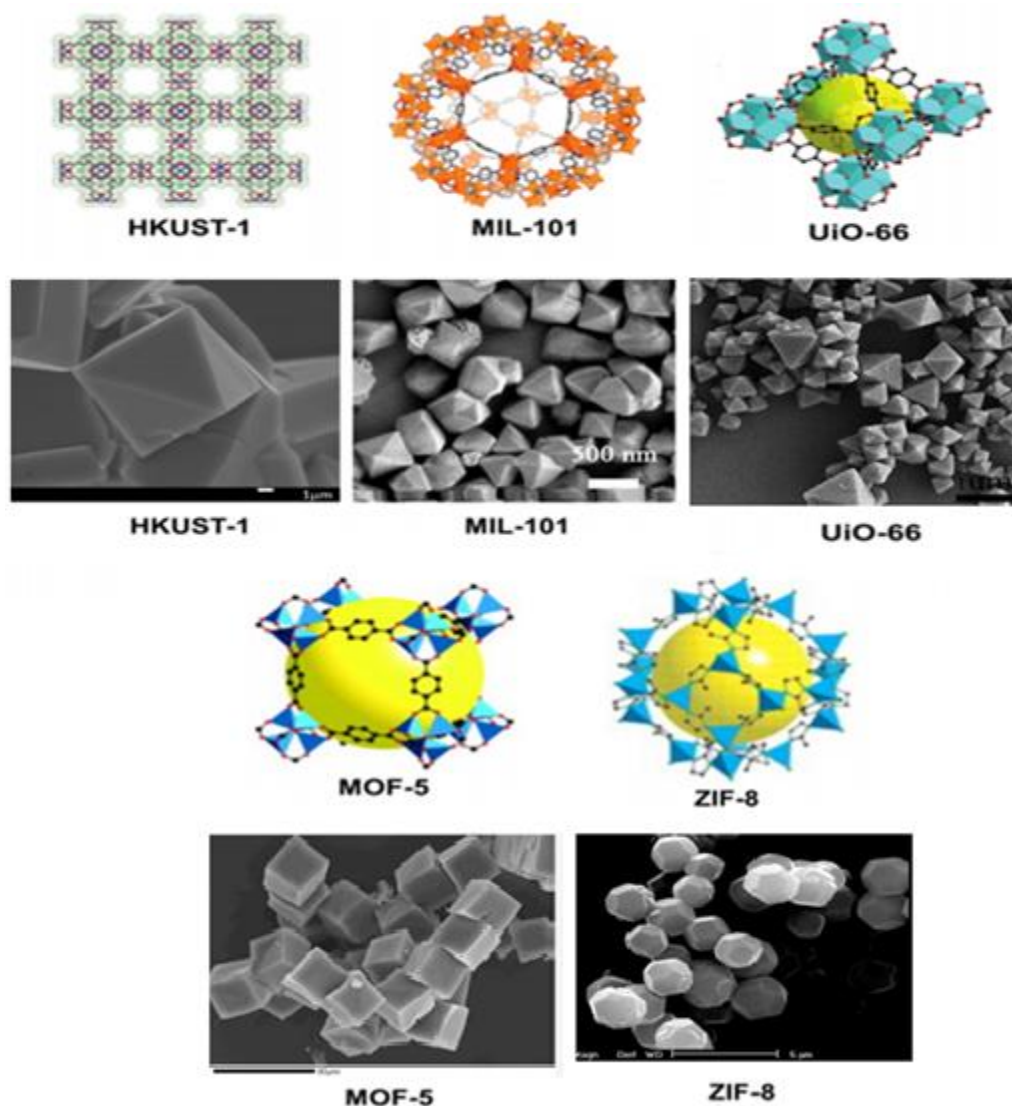
2.4. Tamanho e forma das partículas

O controle do tamanho e forma dos cristais é uma área importante na pesquisa das MOFs, uma vez que essas características podem otimizar as propriedades físicas do material e influenciar na sua aplicação.

As diferentes formas dos cristais de MOFs são estudadas visando facilitar a sua manipulação e incorporação em área de pesquisas como de armazenamento e separação de gás, sistemas catalíticos e biomédicos (2,45).

Numerosos métodos e técnicas combinadas com a abundância de componentes disponíveis e os parâmetros variáveis do processo levaram à produção de milhares de materiais MOFs. Como observado na Figura 6, a MOF-5, apresenta a geometria cúbica, a HKUST-1, MIL-101 e UiO-66 apresentam geometria octaédrica e a MOF ZIF-8 apresenta uma geometria hexagonal.

Figura 6: Estrutura 3D e morfologia dos cristais das MOFs obtidas por MEV da, HKUST-1, MIL-101, UiO-66, MOF-5 e ZIF-8 (10,21,46–48)



Fonte: Lee (2009), Keeffe (2010), Chui (1999), Yaghi (2008), Lu (2014)

Os cristais de MOFs desenvolvidos na escala nanométrica são estudados frente a diversas aplicações, por exemplo, na fabricação de filmes, membranas e quando são atóxicos e apresentam uma alta capacidade de carga, são direcionados para pesquisas para agentes de contraste em ressonância magnética e liberação de fármacos (36,49,50).

As MOFs em escalas micrométricas podem apresentar aplicações semelhantes, porém com algumas restrições, como por exemplo, a limitação para

o uso intravenoso na área de liberação de fármacos. O desenvolvimento de materiais em escalas maiores, entretanto, é essencial para os estudos sobre a estrutura do material, o qual analisa a relação entre a estrutura e suas propriedades (36,51,52).

A manipulação e controle do tamanho e morfologia dos cristais pode ser conseguida através de diferentes estratégias que envolvem desde parâmetros da síntese como o tempo de reação, valores de pressão, tipo de aquecimento como também o tipo de solvente, pH, metal de escolha e a concentração dos reagentes ou sua razão molar (15,52,53).

Em busca do controle do tamanho e da morfologia dos cristais de MOFs novas rotas de síntese estão sendo estudadas entre elas o aquecimento por microondas, síntese por ultrassom e síntese hidrotérmica. Além disso, recentemente vem sendo cada vez mais estudado a influência do crescimento dos cristais de MOFs sobre superfície ou em substratos. O uso de agentes estabilizantes, moduladores de coordenação também auxiliam nessa finalidade. (36,39,54–56).

Avaliando a amplitude de parâmetros é possível afirmar que não há um componente específico capaz de garantir o controle da forma e do tamanho dos cristais, ou seja, na etapa de desenvolvimento é necessário analisar e testar cada possibilidade para conferir a hipótese de uma delas, ou o seu conjunto, auxiliarem no controle desses parâmetros.

2.5. Uso de substratos

Uma variedade de substratos vem sendo utilizados para a formação de filmes a base de MOFs, como o silício, alumina, grafite e até mesmo superfícies orgânicas. Diferentes técnicas foram descritas para realizar a síntese fazendo uso desses dispositivos, dentre elas (36,54,55,57):

I. *Crescimento direto*: essa estratégia depende da imersão do suporte na solução reacional com o controle de temperatura, o que gera a formação dos sítios de nucleação que permitem o crescimento das MOFs no substrato. Como a

nucleação nesses casos é pobremente heterogênea são indicadas modificações químicas do substrato para que o filme produzido tenha uma maior qualidade (36,54);

II. *Camada layer-by-layer (LBL)*: técnica realizada a temperatura ambiente que envolve ciclos repetidos de imersão do substrato em solução contendo somente o sal metálico e posteriormente imersão na solução contendo o ligante orgânico. Entre os passos o substrato é enxaguado com solvente apropriado para remover o excesso de componentes (ligantes ou metal). Esta estratégia garante o crescimento de filmes mais homogêneos e com orientação controlada, porém é indicado a pré-funcionalização do substrato com diferentes grupos funcionais como COOH, OH e piridina (36,55,56);

III. *Crescimento secundário*: é uma estratégia que permite o controle da orientação no crescimento das MOFs quando comparada ao crescimento direto. É baseada no revestimento do substrato de finas camadas de metais, como titânio e ouro, por técnicas de deposição por rotação (“spin-coating”) ou imersão (“dip-coating”), este método depende somente de uma única etapa onde as sementes são primeiramente cristalizadas e ancoradas diretamente no substrato e na sequência, o substrato é imerso no meio reacional e o filme é então gradualmente formado de maneira similar ao do crescimento direto. Devido à pré-existência de núcleos na superfície do suporte a influência química da superfície é eliminada. Com isso os cristais das MOFs obtidas por este método apresentam uma ligação mais fraca com o substrato (36,55);

IV. *Solução química*: Essa é uma técnica considerada rápida e simples, onde a rota de deposição da solução química para a preparação das MOFs emprega dispersões estáveis de nanocristais que são revestidas por rotação ou imersão nos substratos. O controle do crescimento das MOFs é dado por múltiplas deposições (36);

V. *Evaporação*: É um dos métodos mais simples de crescimento das MOFs sobre superfície que consiste na fabricação de filmes finos pela evaporação da solução reacional previamente adicionada sobre o substrato. Ao adicionar a solução precursora a uma lâmina de vidro, por exemplo, a nucleação e o

crescimento são induzidos por exposição a vapores de metanol ou etanol, uma vez que a difusão dos vapores resulta em um processo suficientemente lento de cristalização (27,54).

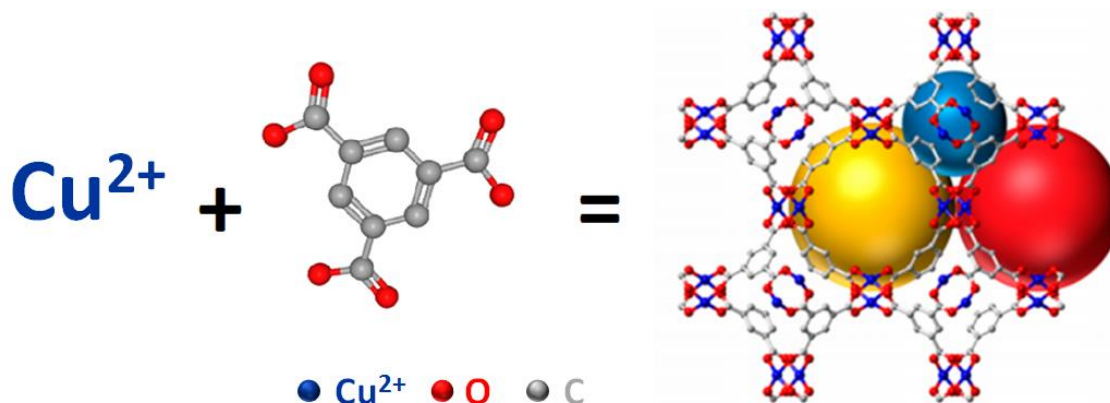
2.6. Redes metalo-orgânica HKUST-1

Em 1999 Chui e colaboradores (21), descreveram a síntese de um cristal de benzeno tricarboxilato de cobre ($\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$) que foi então nomeado como HKUST-1, por ser a primeira MOF desenvolvida pela Universidade de Hong Kong (Hong Kong University of Science and Technology).

A MOF HKUST-1 possui uma estrutura eletricamente neutra construída pela união de conjuntos polinucleares inorgânicos de cobre coordenado a quatro oxigênios, provenientes do ligante benzeno-1,3,5- tricarboxilato e moléculas de água nos sítios axiais (58).

O material apresenta propriedades físicas e químicas típicas de um polímero de coordenação de estrutura aberta altamente porosa, com cristais de morfologia octaédrica. As principais propriedades dessa MOF são a especificidade magnética (59), catálise (60) e adsorção (33). Ao realizar a ativação do material e remover a água de sua estrutura, ela se torna porosa e apresentando três tipos de poros de aproximadamente de 0,4 nm a 1,1 nm de diâmetro. Os poros pequenos são tetraédricos (0,4 nm), os médios (1,0 nm) e os grandes (1,1 nm) são cuboctaédricos (58). A Figura 7 ilustra a formação da MOF HKUST-1 e seus poros.

Figura 7: Estrutura da HKUST-1. A esfera azul indica o poro de 0,4 nm, a esfera amarela e a vermelha indicam os poros de 1,0 nm e 1,1 nm respectivamente

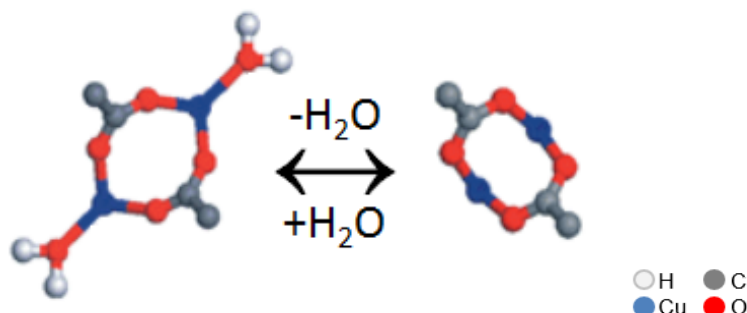


Fonte: Wu (2015)

O material tem um grau razoável de estabilidade térmica (até 240 °C) e uma capacidade de funcionalização química. O composto é hidrofílico e sua cor varia de azul escuro (forma desidratada) a azul claro (forma hidratada). É comumente sintetizado sob condições hidrotermais leves (109 – 120 °C), embora possa ser sintetizado por métodos alternativos como síntese de micro-ondas, ultrassom, temperatura ambiente e também eletroquimicamente (metodologia desenvolvida pela BASF®) (45,61).

A Figura 8 ilustra o processo de ativação que causa a remoção de moléculas de água coordenadas aos átomos de cobre, porém a estrutura cristalina do material é preservada, causando assim somente um encolhimento da gaiola $[\text{Cu}_2\text{C}_4\text{O}_8](\text{H}_2\text{O})_2 \rightarrow [\text{Cu}_2\text{C}_4\text{O}_8]$ o que é responsável pela coloração azul escura da MOF. A remoção da molécula de água torna os sítios de cobre ativos. (60,62)

Figura 8 Ativação da HKUST-1 e remoção de moléculas de água coordenados aos átomos de cobre



Fonte: Bordiga (2010)

2.7. Sistema de liberação de fármacos

Muitas propriedades farmacológicas de fármacos convencionais podem ser melhoradas através do uso de sistema de liberação de fármacos. A necessidade no uso de materiais capazes de transportar e liberar os fármacos ocorre principalmente devido à alta toxicidade de algumas moléculas frente ao organismo, por exemplo, os fármacos anticancerígenos (63).

O uso de sistemas de liberação de fármacos apresentam outras finalidades como a de ampliar a biodisponibilidade do fármaco, melhorar sua estabilidade, manter e controlar as taxas de liberação e direcioná-los para locais específicos do corpo, visando reduzir a frequência de administração do fármaco (63).

Os fármacos administrados através de um carreador exibem perfis cinéticos e biológicos diferentes daqueles obtidos quando o fármaco é administrado livremente, uma vez que o fármaco livre administrado, por exemplo, por via oral apresenta uma inabilidade para a liberação controlada. O modo de carrear um fármaco com mais eficiência é através da incorporação, encapsulação ou adsorção do mesmo em sistemas biocompatíveis conhecidos como transportadores de fármacos (5,64).

Uma ampla variedade de sistemas carreadores de fármacos tem sido objeto de estudos na área farmacêutica. Dentre os materiais desenvolvidos

podemos destacar os lipossomas, dispositivos revestidos implantáveis, nanopartículas, dendrímeros e recentemente as redes metalo-orgânicas (65–67).

As MOFs podem ser consideradas como materiais ideais para liberação de fármacos devido as propriedades inerentes ao material, entre elas a combinação de alta porosidade associada a grandes áreas superficiais e a capacidade de variar os tamanhos dos poros e de ajustar os grupos funcionais (5,68).

O primeiro grupo de MOF, considerado como potencial sistema de liberação de fármacos é o da família MIL (Materials of Institut Lavoisier) desenvolvido por Férey e colaboradores (5). Frente às características descritas anteriormente, as MOFs da família MIL apresenta área superficial dentre 3100-5900 m²/g. Estes materiais foram desenvolvidos a partir de metais trivalentes e ligantes orgânicos que apresentam ácidos carboxílicos (68).

O ibuprofeno foi escolhido como fármaco modelo por Horcajada e colaboradores (50) para a avaliação da incorporação e liberação a partir da MOF mesoporosa MIL-100. Eles relataram uma capacidade de carregamento de 0,35 gramas de ibuprofeno por grama de MIL-100 (50). Mais tarde, eles investigaram MIL-53 (Cr) e MIL-53 (Fe) para adsorção e entrega do mesmo fármaco e descreveram o valor de adsorção em torno de 0,2 g de ibuprofeno por grama de MOF (68).

A liberação do fármaco analgésico e anti-inflamatório não levou a perda da cristalinidade ou decomposição da estrutura. A cinética do ibuprofeno liberada através da MOF foi monitorada por HPLC, evidenciando a liberação constante do fármaco durante as primeiras 8 horas e a liberação completa ao final de 6 dias (50,69).

As MOFs da família ZIFs (Zeolitic imidazolate frameworks) também vêm sendo utilizadas como sistemas de liberação de fármaco. Esses materiais apresentam área superficial dentre 1300-1813 m²/g e foram utilizadas na avaliação da liberação de fármacos anticancerígenos como 5-fluorouracil, hidroxauréia e mercaptopurina. Os estudos revelaram uma capacidade de 0,65 a 0,68 g/g para a adsorção de 5-fluorouracil e hidroxauréia e uma capacidade de 0,55 g/g na adsorção de mercaptopurina (28).

Por fim, outra MOF que é relatada como promissora para o carreamento de fármaco é a HKUST-1. Ke e colaboradores (59) relataram o carreamento e liberação de nimesulide a partir de um nanocomposto de MOF, com características magnéticas e alta porosidade, fabricada pela incorporação de bastões de Fe_3O_4 em cristais de HKUST-1. Esta MOF foi capaz de adsorver até 0,2 g de nimesulide por grama de MOF, e demorou até 11 dias para completar a liberação do fármaco em solução salina fisiológica a 37 °C.

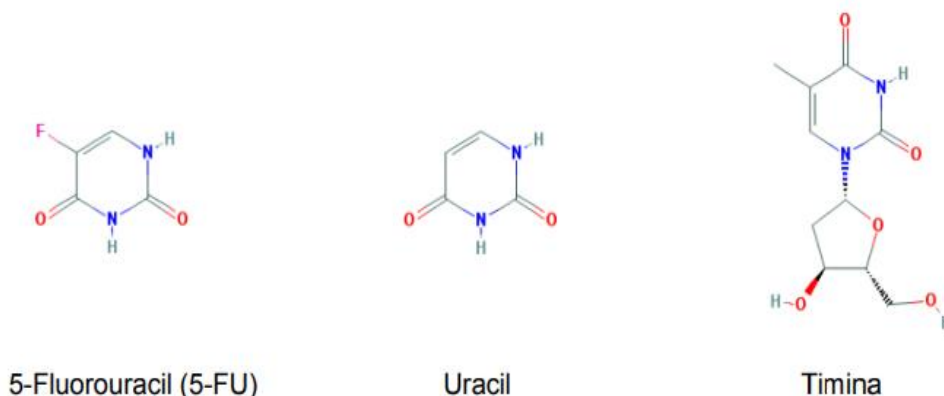
A partir dos relatos acima, é possível afirmar que o uso das MOFs para o carreamento de fármacos pode abrir novas perspectivas para melhoria da eficiência no tratamento de doenças severas como o câncer, uma vez que estes materiais podem ser desenvolvidos em meio biocompatíveis e podem adsorver fármacos com diferentes polaridades, tamanhos e grupos funcionais.

2.8. 5- Fluorouracil

Nas últimas décadas, o câncer se tornou um evidente problema de saúde pública mundial. O 5-fluorouracil (5-FU) é amplamente utilizado no tratamento de uma variedade de cânceres e quando combinado com outros agentes quimioterápicos (como a oxaliplatina e o irinotecano) melhora taxas de resposta e sobrevivência em câncer de mama, cabeça e pescoço, apresentando um grande destaque na melhora da sobrevida global e livre de doenças de pacientes com câncer colorretal estagio III e em cânceres de pele (70).

O 5-Fu é um fármaco antimetabolito análogo de uracil e timina, que apresenta um átomo de flúor ligado ao carbono 5 em substituição ao átomo de hidrogênio, conforme ilustrado na Figura 9. O 5-Fu exerce seus efeitos anticancerígenos através da inibição de processos biossintéticos essenciais da timidilato sintase (TS) e da incorporação de seus metabólitos em macromoléculas como o RNA e DNA inibindo a sua função normal (28,70).

Figura 9: Estrutura química do 5-Fu



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Os pacientes tratados com 5-Fu podem apresentar toxicidades graves induzidas pela quimioterapia como a neutropenia febril (presença de febre, com temperatura corporal $> 38,3^{\circ}\text{C}$ e contagem de neutrófilos $< 500/\text{mm}^3$ ou entre 500 e $1.000/\text{mm}^3$ e com tendência à queda), anorexia, náusea, vômito e diarreia. Tais efeitos adversos causam significativo ônus clínico e financeiro ao sistema de saúde por meio da hospitalização e aumento do risco de morbidade e mortalidade (71).

A toxicidade associada ao uso de 5-FU é mais frequente em mulheres e pacientes com idade avançada. Outros fatores clínicos também podem ser relacionados à toxicidade e precisam de maiores investigações, como a influência étnica, alcoolismo e a via de administração do fármaco. A mortalidade relacionada a complicações decorrentes do tratamento quimioterápico com 5-Fu tem taxas de 0,5-1,0% dos pacientes (70,72).

Do total de pacientes tratados com 5-Fu, de 10-40% apresentam toxicidades severas. As reações adversas ao tratamento com 5-Fu são consideradas severas quando classificadas em grau 3 e 4 de toxicidade, de acordo com o Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) (70,71). O uso de sistemas carreadores de fármaco, como as MOFs, é muito interessante, uma vez que o fármaco apresenta toxicidade severa.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é desenvolver um sistema formado por uma rede metalo-orgânica (MOF) com morfologias cristalinas diferentes para avaliar a citotoxicidade e o uso futuro em carreamento de moléculas terapêuticas. Visando atingir esses objetivos as seguintes ações foram adotadas:

- Desenvolver a rede metalo-orgânica a base de ácido trimésico com morfologia diferente da octaédrica;
- Caracterizar as propriedades estruturais dos sistemas desenvolvidos;
- Avaliar a capacidade de encapsulamento do fármaco modelo anticancerígeno, 5-Fluorouracil;
- Avaliar a citotoxicidade dos sistemas desenvolvidos, nas linhagens celulares HDFa, HaCat e A-375.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

- 5-fluorouracil – $C_4H_3N_2FO_2$ – Massa molecular: 130,08 g/mol – Sigma Aldrich®;
- Acetato de cobre II – $C_4H_6Cu_4 \cdot H_2O$ – Massa molecular 199,65 g/mol – Êxodo Científica®;
- Ácido trimésico (BTC) – $C_6H_3(CO_2H)_3$ – Massa molecular: 210,14 g/mol - Sigma Aldrich®;
- Álcool isopropílico – C_3H_8O – Massa molecular: 60,1 g/mol - Êxodo Científica®;
- Água purificada - Mili-Q Plus®;
- Azul de trypan - Sigma Aldrich®;
- Câmara de Neubauer - Kasvi®;
- Célula fibroblastos dérmicos humanos (HDFa);
- Célula de queratinócitos humanos (HaCat);
- Célula de melanoma humano (A375) – Banco de células do Rio de Janeiro;
- Cloridrato de resazurina - Sigma Aldrich®;
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) – Gibco®;
- Diclorometano – Massa molecular: 84,93 g/mol – Neon®;
- Dimetilformamida (DMF) – C_3H_7NO – Massa molecular: 73,09 g/mol – Êxodo Científica®;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – C_2H_6OS – Massa molecular: 78,13g/mol – Êxodo Científica®;

- Etanol – álcool etílico absoluto – Massa molecular: 46,07 g/mol – Êxodo Científica®;
- Garrafa de cultivo celular - Sigma Aldrich®;
- Methyl Thiazolyl Blue (MTT) – Sigma Aldrich®;
- Metanol – álcool metílico absoluto – Massa molecular: 32,04 g/mol – Êxodo Científica®;
- Microplaca para cultivo celular – TPP®;
- Metilmetanossulfonato – Massa molecular 110,13g/mol - Sigma Aldrich®;
- Papel filtro – LAC®;
- Soro fetal bovino (SFB) - Gibco®;
- Substrato de silício – Nova Eletronic Materials®;
- Sulfato de Cobre II Pentahidratado – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Massa molecular: 249,69 g/mol - Neon®;
- Tampão fosfato salino (PBS);
- Tripsina EDTA - Gibco®.

4.2. Equipamentos:

- Balança digital - Shimadzu®;
- Centrifuga SL-700 - Solab®;
- Difrátômetro de Raios - XD-5000 - Siemens®;
- Espectrofotômetro - Cary 60 UV-Vis – Agilent Technologies®;
- Estufa a vácuo – Microtube®;
- Sputter Coaster SCD-050 - Bal-Tec®;
- Infravermelho System 2000 - Perkin Elmer®;

- Leitor de microplacas Synergy H1 - Biotek®;
- Microscópio eletrônico de varredura SM-300- Topcon®
- Sistema de purificação de água Milipore - Mili-Q Plus®;
- Sputter DV-502A - Denton Vacuum®;
- Thermo Mixer – Kasvi®;
- Ultrassom Elmasonic S 40H - Elma®.

4.3. Métodos experimentais

4.3.1. Sínteses

4.3.1.1. Síntese das redes metalo-orgânicas a base de ácido trimésico e acetato de cobre - HKUST-1

A MOF HKUST-1 com forma cristalina octaédrica foi preparada utilizando a metodologia já descrita na literatura científica por Li e colaboradores (38). A síntese foi realizada com auxílio de ultrassom. Foram pesados 0,104 g de ácido trimésico, o qual foi dissolvido em uma mistura de 6 mL de dimetilformamida (DMF) e 2 mL de etanol absoluto para obter a solução ligante. A solução metálica foi preparada a partir de 4 mL de uma solução aquosa contendo 0,099 g de acetato de cobre dihidratado. As duas soluções foram adicionadas a um tubo de ensaio e foram mantidas em banho ultrassônico por 30 minutos. O produto formado de coloração azul claro foi isolado através de processo de centrifugação por 10 minutos em 4032 g. Finalmente os poros do material foram ativados pelo aquecimento em estufa a vácuo a uma temperatura de 150 °C por 24 horas e adquiriram a coloração azul escura, indicativa da desidratação do composto. O material sintetizado foi denominado neste trabalho de VHKUST.

4.3.1.2. Sínteses em substrato

Na tentativa de obtenção de redes metalo-orgânicas com formas cristalinas diferentes das reportadas na literatura, as sínteses das MOFs foram feitas com o auxílio de diferentes substratos de silício. Antes de realizar a síntese (descrita no item 4.3.1.3) os diferentes substratos de silício foram preparados de forma distinta através da deposição de camadas de ouro ou de camadas de titânio+ouro. Os substratos utilizados foram preparados em colaboração com o grupo de pesquisa da professora Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Zaghete do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química e do Prof. Dr. Marcelo Orlandi do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

4.3.1.2.1. Limpeza e preparo do substrato de silício

4.3.1.2.2. Limpeza e do substrato de silício para posterior deposição de metais

Primeiramente, o substrato de silício utilizado foi higienizado com auxílio de equipamento de ultrassom Elma[®]. Em seguida, o substrato de silício foi imerso em uma sequência de solventes (metanol absoluto, acetona e ao final em metanol absoluto com água purificada (50:50), a cada solvente ele foi mantido no banho ultrassônico por 30 minutos. Após a limpeza foi aguardada a secagem natural do material a temperatura ambiente.

4.3.1.2.3. Preparo do substrato de silício com camadas de ouro

O substrato de silício foi submetido ao processo de metalização por sputter, com deposição de um filme de ouro sobre a superfície do substrato.

Para a realização dessa deposição foram utilizados dois equipamentos diferentes. O primeiro da marca Bal-Tec[®] modelo SCD 050, disponível no Instituto de Química da UNESP de Araraquara. Os parâmetros utilizados foram de 25 °C

na câmara de metalização com uma corrente de 40 mA e tensão de 2 kV. O segundo equipamento utilizado foi da marca Denton Vacuum® DV-502A, o qual disponibiliza controle individual dos parâmetros. Os parâmetros utilizados foram a taxa de deposição de 0,8 Å/s, espessura de 50 nm de ouro a uma pressão de deposição de 2×10^{-3} mTorr sobre tensão de 450 V.

4.3.1.2.4. Preparo do substrato de silício com camadas de titânio e ouro

O substrato de silício foi submetido ao processo de metalização por sputer com o equipamento da marca Denton Vacuum® modelo DV-502A, sobre a superfície do substrato de silício foi depositado um filme de titânio e posteriormente um filme de ouro. Os parâmetros utilizados da taxa de deposição foi de 0,8 Å/s, espessura de 10 nm de titânio e 50 nm de ouro a uma pressão de deposição de 2×10^{-3} mTorr sobre tensão de 450 V.

4.3.1.2.4.1. Abrasão do substrato

Na tentativa de favorecer o crescimento do material na superfície do ouro, os substratos de silício recobertos com ouro utilizados na síntese descrita a seguir foram pré-tratados com diferentes técnicas de abrasão úmida:

- a. Técnica de imersão em água régia;
- b. Técnica de imersão em metanol absoluto com abrasão com lixa d'água pré-umedecida;
- c. Técnica de imersão em metanol absoluto com abrasão por bucha tipo scotch britte®;
- d. Técnica de polimento mecânico com algodão embebido em água purificada e detergente;
- e. Técnica de polimento mecânico com algodão embebido em metanol absoluto;

f. Técnica de polimento mecânico por imersão em metanol absoluto e agitação leve.

As técnicas de imersão em água régia; metanol absoluto com abrasão em lixa d'água pré-umedecida; e técnica de imersão em metanol absoluto com abrasão por bucha tipo scotch brite® tem por finalidade promover a corrosão da superfície de ouro. As técnicas de polimento mecânico com algodão embebido em água purificada e detergente; algodão embebido em metanol absoluto; e a técnica de polimento mecânico por imersão em metanol absoluto e agitação leve, tem por finalidade otimizar a uniformidade do substrato, melhorando a remoção de possíveis contaminantes da superfície na qual ocorrerá a reação (73).

4.3.1.3. Síntese das redes metalo-orgânicas a base de ácido trimésico e sulfato de cobre em substrato – VCuBTC.

As MOFs foram preparadas utilizando a metodologia proposta por Kojitani e colaboradores (54) com algumas modificações.

A síntese foi realizada inicialmente através do método de crescimento direto em substrato sendo posteriormente modificada para o uso da técnica de layer-by-layer.

As MOFs sintetizadas têm como ligante o ácido trimésico (BTC) e como metal o cobre, obtido do sulfato de cobre (CuSO_4) e foram denominadas de VCuBTC.

4.3.1.3.1. Síntese de crescimento direto em substrato

Para realizar a síntese foram preparadas duas soluções. A solução A foi preparada a partir da solubilização de 0,23 mM de ácido trimésico em 10 ml de água purificada. Para a solução B foram solubilizados 0,3 mM de sulfato de cobre em 10 mL de água purificada. A solução A foi adicionada a solução B formando a solução C.

A solução C (contendo o ligante e o metal) foi distribuída sobre o substrato que estava posicionado horizontalmente ao fundo do béquer, sendo mantida em um sistema fechado por 24 horas. Após esse período, o substrato foi retirado do béquer e seco em temperatura ambiente em estufa a vácuo. Posteriormente a MOF foi retirada do substrato através de raspagem manual e os cristais analisados por microscopia eletrônica de varredura.

Para essa síntese foram utilizados substratos de silício, sendo testado o substrato de silício sem qualquer recobrimento, substrato de silício com recobrimento de ouro, substrato de silício com recobrimento de titânio e por último substrato de silício com recobrimento de titânio recoberto com ouro.

4.3.1.3.2. Síntese layer-by-layer

A síntese de layer-by-layer foi estudada com o objetivo de melhorar o rendimento de crescimento das MOFs sobre o substrato de silício recoberto por titânio+ouro.

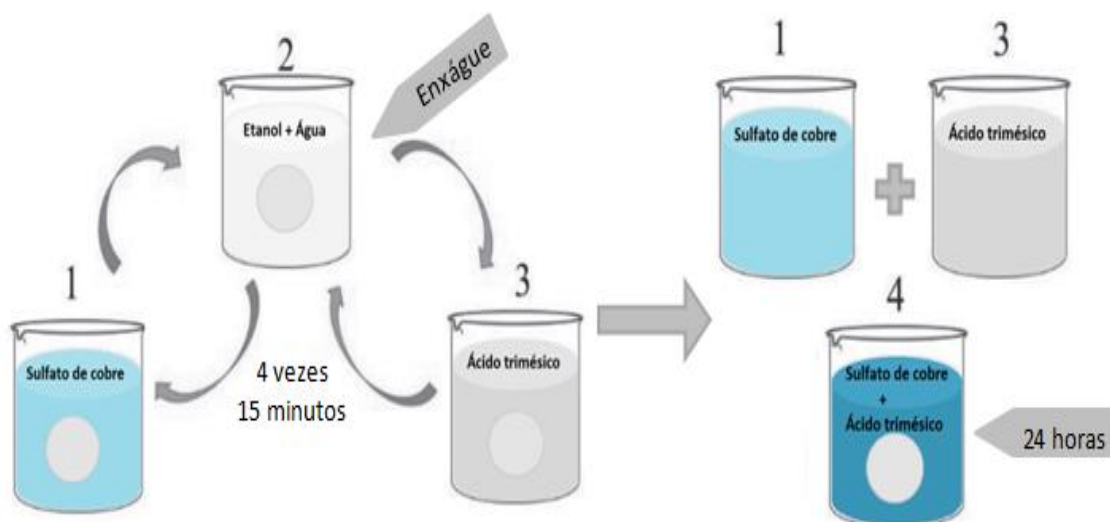
A técnica consiste em uma imersão cíclica do fragmento de silício recoberto por titânio+ouro em solução do metal e posteriormente na solução do ligante; entre os ciclos de imersão o substrato era lavado em solução de com água purificada e álcool absoluto (50:50) (56).

Para realizar a síntese foram preparadas duas soluções. A solução A foi preparada a partir da solubilização de 0,23 mM de ácido trimésico em 15 ml de água purificada e 15 ml de etanol absoluto. Para a solução B foram solubilizados 0,3 mM de sulfato de cobre em 30 mL de água purificada.

As soluções prontas foram distribuídas separadamente em béqueres, posteriormente o substrato revestido com titânio+ouro foi colocado ao fundo do béquer contendo a solução A onde permaneceu por 15 minutos. Após o tempo determinado, o substrato foi retirado da solução A, lavado em solução de água purificada e etanol absoluto (50:50) e adicionado no béquer contendo a solução B, na qual foi mantido por 15 minutos. Após esse período, o substrato foi retirado da solução B, lavado em solução de água purificada e etanol absoluto (50:50) e

colocado na solução A. Essa operação de imergir o substrato nas soluções foi realizada quatro vezes. Por fim, as soluções A e B foram misturadas, o substrato adicionado a essa solução na qual permaneceu imerso por 24 horas em sistema fechado. A Figura 10 ilustra a síntese pela metodologia layer-by-layer.

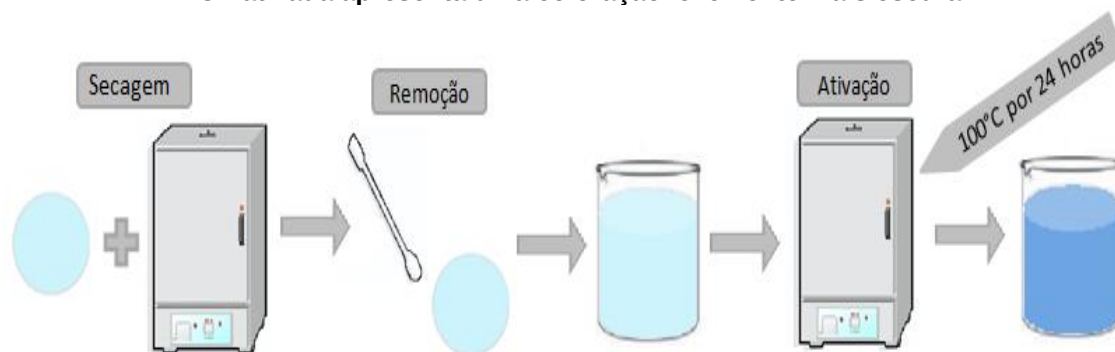
Figura 10: Ilustração da síntese por metodologia layer-by-layer



Fonte: Autor

Finalizando o período de síntese o substrato é retirado da solução, o excesso do meio reacional é retirado da superfície do substrato através de uma lavagem com solução de água purificada e etanol absoluto (50:50) e então o mesmo é colocado a temperatura ambiente em estufa a vácuo por 2 horas para secar. Na sequência, as MOFs são retiradas do substrato com o auxílio de uma espátula, e então ativadas na estufa a vácuo em temperatura de 100 °C por 24 horas. A Figura 11 ilustra a retirada das MOFs do substrato, a ativação em estufa a vácuo, e a alteração da coloração da MOF que antes da ativação apresentava uma cor azul clara e após a ativação adquiriram uma coloração mais escura.

Figura 11: Ilustração da retirada das MOFs do substrato e ativação em estufa a vácuo. A MOF ativada apresenta uma coloração levemente mais escura



Fonte: Autor

4.3.2. Métodos de caracterização

4.3.2.1. Difração de Raios X (DRX)

Para a realização da difratometria de raios X das amostras em pó foi utilizado o difratômetro de raios X, marca Siemens®, modelo D5000. Os parâmetros utilizados foram $2\theta = 5 - 50^\circ$; passo $0,005^\circ$; tempo = 1 segundo.

4.3.2.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Para realizar as análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho das amostras das MOFs na forma de pó foi utilizado o espectrofotômetro Perkin Elmer®, modelo System 2000, na região de $370 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ em modo transmissão.

4.3.2.3. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

As amostras das MOFs na forma de pó ou o substrato contendo as MOFs foram aderidos a uma fita de carbono condutora. O microscópio utilizado era da marca Topcon®, modelo SM-300 com detector de elétrons secundários e voltagem de aceleração de elétrons de 10 Kv.

4.3.3. Avaliação da citotoxicidade

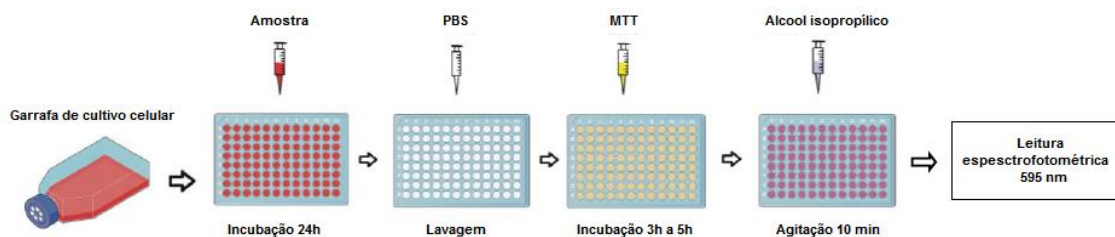
4.3.3.1. Método colorimétrico por MTT

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados a partir do método MTT para avaliar a viabilidade celular após contato com as redes metalo-orgânicas. As MOFs na forma de pó de VCuBTC e VHKUST, foram diluídas em meio de cultura DMEM. O ensaio foi conduzido em cultura de células de fibroblastos dérmicos humanos (HDFa). As células, após terem sido cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e ao apresentarem uma confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas para serem centrifugadas a 161 g por 3 minutos e finalmente semeadas em placas de 96 poços. A densidade celular para os ensaios de citotoxicidade por MTT foi de 2×10^5 células/mL.

Para a completa adesão das células as placas foram incubadas por 24 horas, posteriormente as células foram tratadas com 1 mL de controle positivo (dimetilsulfóxido a 10%), controle negativo (DMEM), e diferentes concentrações (160 µg/mL, 310 µg/mL, 630 µg/mL, 1250 µg/mL e 2500 µg/mL) das MOFs durante 24 horas.

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, as placas lavadas com tampão fosfato salino (PBS) (74), posteriormente foram adicionados 100 µL de MTT (1 mg/mL em PBS) em cada poço. A microplaca com as células foi incubada a 37 ± 2 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violeta de formazana (3 a 5 horas). Como a formazana é insolúvel, a mesma foi solubilizada com auxílio de 100 µL de álcool isopropílico absoluto que foram adicionados a cada poço. Ao fim, foi realizada em leitor de placas a leitura espectrofotométrica da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em três experimentos independentes e as concentrações, em cada experimento, testadas em triplicatas. A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento segundo proposto por Zhang e colaboradores (75). A Figura 12 esquematiza as principais etapas do teste de citotoxicidade.

Figura 12: Esquema das principais etapas do teste de citotoxicidade



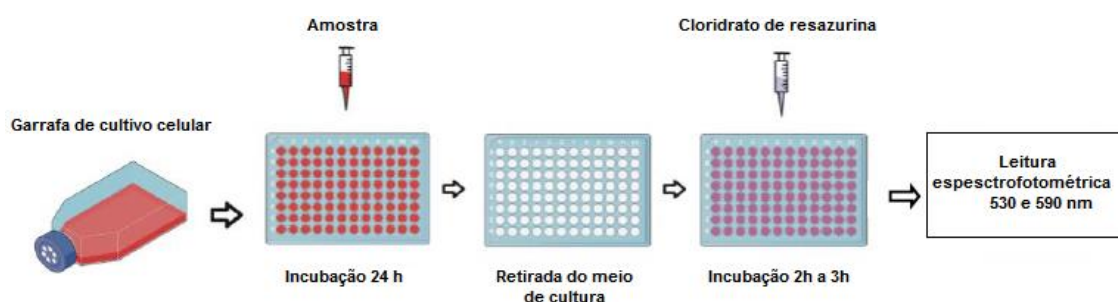
Fonte: Autor

4.3.3.2. Método colorimétrico por Alamar blue®

A viabilidade celular das linhagens HaCat (queratinócitos humanos) e A-375 (melanoma humano) foi determinada pelo método redox da resazurina de acordo com os procedimentos descritos por Pagé e colaboradores (76) e adaptados por De Grandis e colaboradores (77). As células foram incubadas sob condições padronizadas de cultivo celular (37 °C, 5% CO₂, 95% de umidade), em garrafas de cultivo de 75 cm², contendo meio de cultura apropriado para seu crescimento, suplementado com SFB. As células foram recolhidas das garrafas de cultivo utilizando 3 mL de tripsina-EDTA 0,25%, centrifugadas a 200 g por 5 minutos e contadas em câmara Neubauer, utilizando o método de exclusão pela solução azul de trypan a 0,004%, que cora as células inviáveis, em seguida, ajustou-se a concentração para $7,5 \times 10^4$ células/mL. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços obtendo uma concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células / poço, e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo, durante 24 horas para permitir a aderência celular. Para o tratamento, foram preparadas soluções de 5-Fu, VHKUST+5-Fu, VHKUST, CuBTC+5-Fu e CuBTC, em concentração inicial de 200 µM, de forma que pode-se realizar 5 diluições na microplaca, a fim de se obter concentrações de 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM e 12,5 µM. O controle positivo constituiu-se de metilmetanosulfonato (150 µM) e o controle negativo foi composto pelos poços com células que receberam apenas meio de cultura. Novamente as células foram incubadas por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido, e logo em seguida foram adicionados 50 µL de cloridrato de resazurina 0,01%. As placas foram novamente incubadas por

3 horas (HaCat) ou 2 horas (A-375). Em seguida, procedeu-se a leitura da fluorescência em leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek®) em filtros de excitação e de emissão nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos pela porcentagem de viabilidade celular (%) calculada em relação à fluorescência emitida pelo controle negativo, considerada como 100% de viabilidade. A Figura 13 esquematiza as principais etapas do teste de citotoxicidade por Alamar blue®.

Figura 13: Esquema das principais etapas do teste de citotoxicidade por Alamar blue®



Fonte: Autor

4.3.4. Eficiência de incorporação de fármaco nas redes metalo-orgânicas

Para avaliar a eficiência de incorporação foi utilizado o 5-Fluorouracil (5-Fu) como fármaco modelo. Primeiramente, 0,01 g do fármaco 5-Fu foi dissolvido em 30 mL de água purificada. Após a sua completa dissolução, 0,003 g das MOFs foram adicionadas à solução. Para o preparo desta suspensão foi utilizada a proporção de 3:1 (massa: massa) do fármaco e das MOFs, baseando-se na metodologia descrita na literatura por Horcajada e colaboradores (69).

O material foi colocado em um equipamento Thermo mixer sobre agitação constante com aquecimento de 27,4 °C por 12h, 24h e 72h. Após o período de agitação, o material foi centrifugado a 4032 g por 15 minutos, em seguida, foi medida a absorbância do sobrenadante por equipamento UV/Vis. Dessa maneira, a absorbância referente ao fármaco livre não incorporado às MOFs foi determinada no sobrenadante, após a centrifugação.

Para quantificar a eficiência de encapsulação, foi necessário primeiramente fazer uma curva analítica do fármaco estudado nas concentrações 0,0016 mg/mL, 0,0013 mg/mL, 0,0010 mg/mL, 0,0008 mg/mL, 0,0005 mg/mL e 0,0002 mg/mL com medidas de absorvância realizadas no intervalo de 200-600nm (absorção máxima do 5-Fluorouracil $\lambda = 265$ nm).

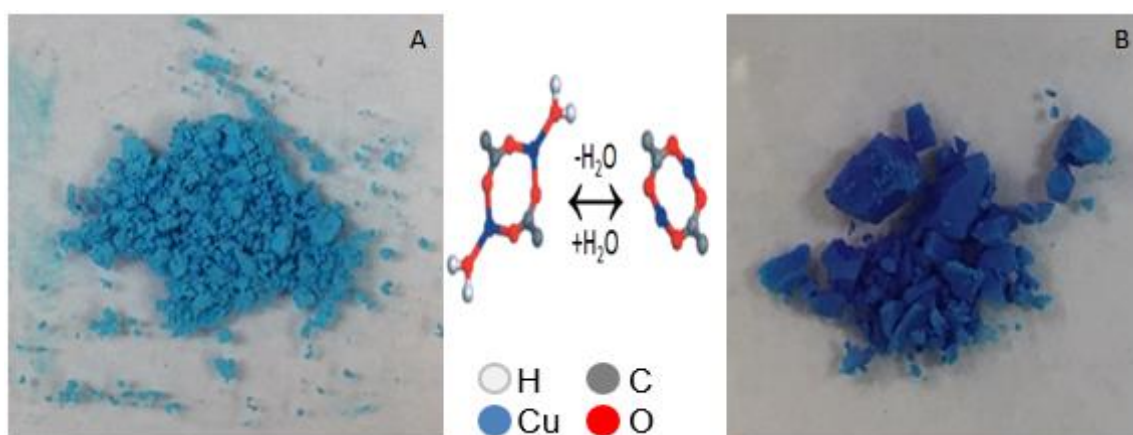
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Síntese de VHKUST

Visando os posteriores estudos comparativos da eficiência de incorporação e citotoxicidade, a MOF HKUST-1 foi sintetizada sem o auxílio de substrato conforme descrito na literatura (38), sendo denominada neste trabalho como VHKUST. Para realizar a ativação dos poros do material e assim obter poros livres, a MOF em forma de pó VHKUST foi colocada em estufa a vácuo com temperatura de 150 °C por 24 horas. Posteriormente o pó foi caracterizado para confirmar a formação de uma MOF com o mesmo aspecto, estrutura e morfologia de cristais descritos por Chui e colaboradores (21).

A Figura 14 apresenta uma fotografia do material policristalino sintetizado por esse método antes (A) e após (B) tratamento em estufa a vácuo. Observa-se a formação de um pó de coloração azul claro antes da ativação por calor térmico em estufa e outro de coloração azul escura após o tratamento térmico. A mudança na coloração observada está de acordo com o descrito na literatura (21,22) e está associada à remoção das moléculas de água covalentemente coordenadas, gerando sítios de coordenação insaturados sobre os íons cobre (II).

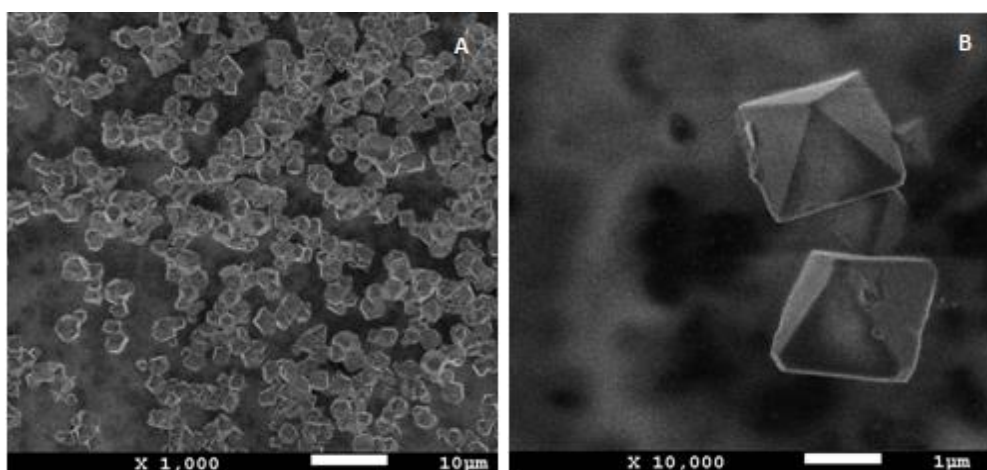
Figura 14: Fotografia do material policristalino VHKUST antes (A) e após ativação térmica (B)



Fonte: Autor

A microscopia obtida por MEV do pó sintetizado após ativação térmica dos poros é apresentada na Figura 15 sendo que a foto (A) apresenta uma micrografia de aumento de 1000 vezes e a foto (B) um aumento de 10.000 vezes para melhor observação da morfologia octaédrica dos cristais dessa MOF, a qual está conforme descrito na literatura (21). Além da morfologia foi possível observar que o crescimento dos cristais foi homogêneo e seu tamanho variou em 1 a 2 μm .

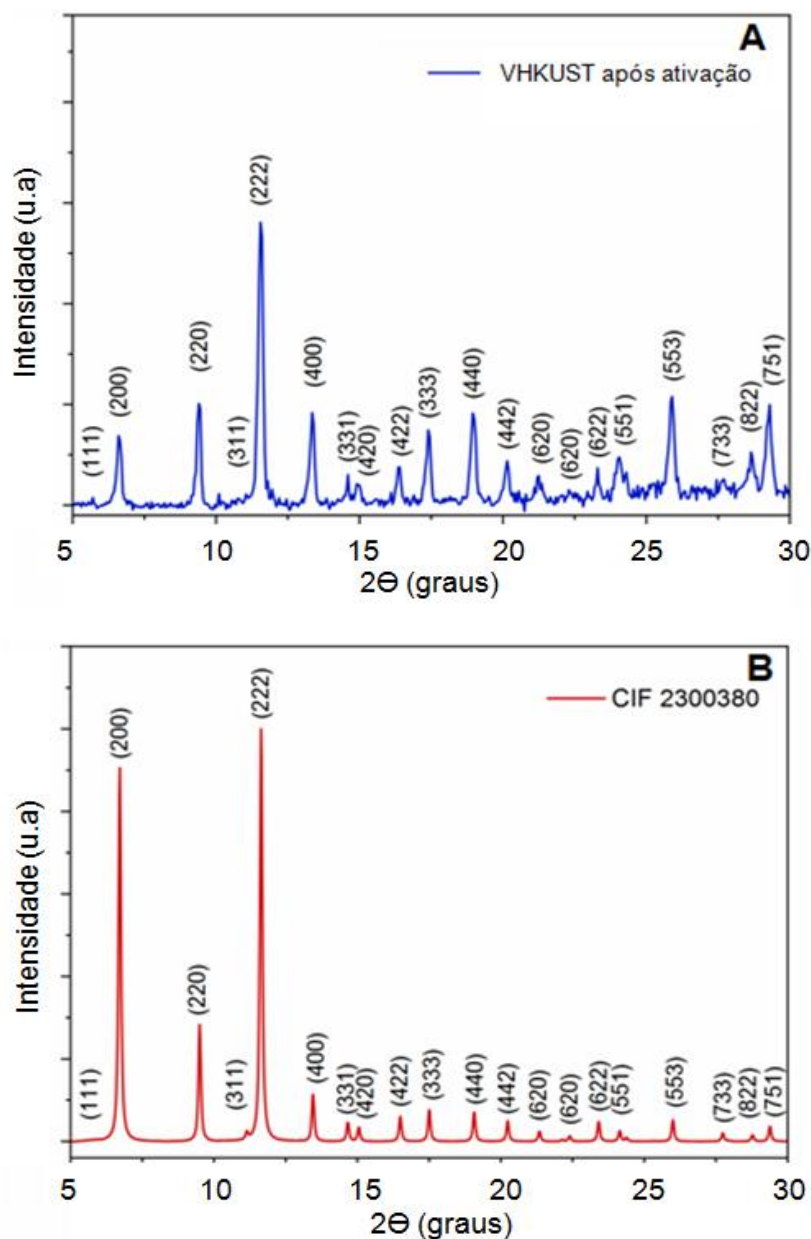
Figura 15: Microscopia Eletrônica de Varredura da VHKUST ativada



Fonte: Autor

A Figura 16 (A) apresenta o difratograma de raios-X da MOF VHKUST, em que a análise de difração de raios X em pó do material foi realizada para confirmar a pureza da fase cristalina no material, os números acima dos picos correspondem aos índices de Miller. Pode-se observar que o difratograma apresenta picos intensos e definidos, característicos de material cristalino. A posição em 2θ e a relação de intensidade dos picos são compatíveis com os valores correspondentes à rede metalo-orgânica, os dados foram comparados com o calculado com base na ficha CIF 2300380 referente a HKUST-1, ilustrada na Figura 16 (B) e com o descrito por Chui e colaboradores e (21,27,78).

Figura 16: Difratoograma de raios-X da VHKUST após ativação (A) e a ficha CIF 2300380 referente à HKUST-1 (B)



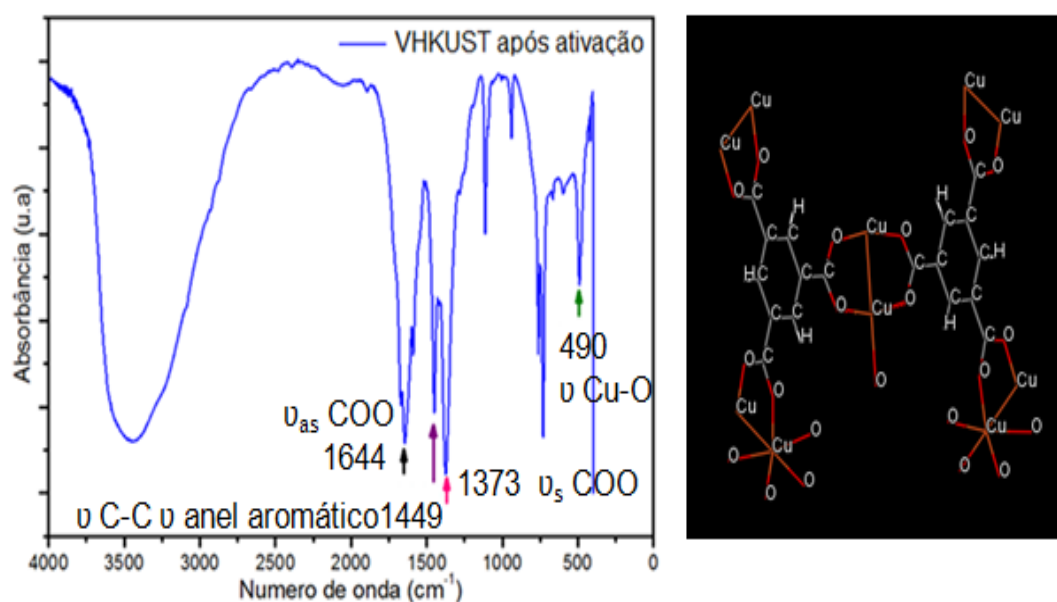
Fonte: Autor

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi empregada para verificar através das bandas de absorção na região do infravermelho, se ocorreu a ligação entre o ácido trimésico e o acetato de cobre utilizado.

A Figura 17 apresenta o espectro vibracional da MOF VHKUST ativada. Podemos observar bandas relativas à coordenação do ligante orgânico através

do grupo carboxilato, a saber, estiramento assimétrico COO em 1644 cm^{-1} (seta preta), e estiramento simétrico COO em 1373 cm^{-1} (seta rosa). Além disso, pode ser observada uma banda de média intensidade em 1449 cm^{-1} (seta roxa) atribuída aos movimentos vibracionais de estiramento C–C e movimentos vibracionais de estiramento do anel aromático. A banda relativa ao estiramento Cu–O pode ser observada em 490 cm^{-1} (seta verde) confirmando que o átomo de oxigênio está coordenado ao Cu. (79) Além disso, uma observação importante a partir desse estudo foi à ausência da banda associada à ligação C=O em 1700 cm^{-1} , referente ao ligante livre. Esses dados comprovaram que o ligante orgânico foi desprotonado para a coordenação aos íons de cobre para a formação da MOF HKUST-1 (80,81).

Figura 17: Espectro infravermelho da MOF VHKUST após ativação



Fonte: Autor

Com os resultados das técnicas de caracterização foi possível comprovar que o material sintetizado apresenta o mesmo aspecto de coloração, a mesma estrutura cristalina e a mesma morfologia da HKUST-1 descrita em literatura (21,27,38), conforme esperado.

5.2. Síntese das redes metalo-orgânicas sobre substratos (SURMOFs, MOFs on surface)

Na tentativa de obtenção da MOF cujas partículas apresentassem hábitos cristalinos diferentes do padrão octaédrico, algumas alterações nas condições de síntese foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Kojtari e colaboradores (54). A literatura descreve o uso de diferentes substratos para a formação de filmes a base de MOF (27,36,54,55). Com o objetivo de identificar qual dos substratos responderia melhor à finalidade do projeto de produzir MOFs, foram avaliados ao total 4 substratos de silício com diferentes recobrimentos.

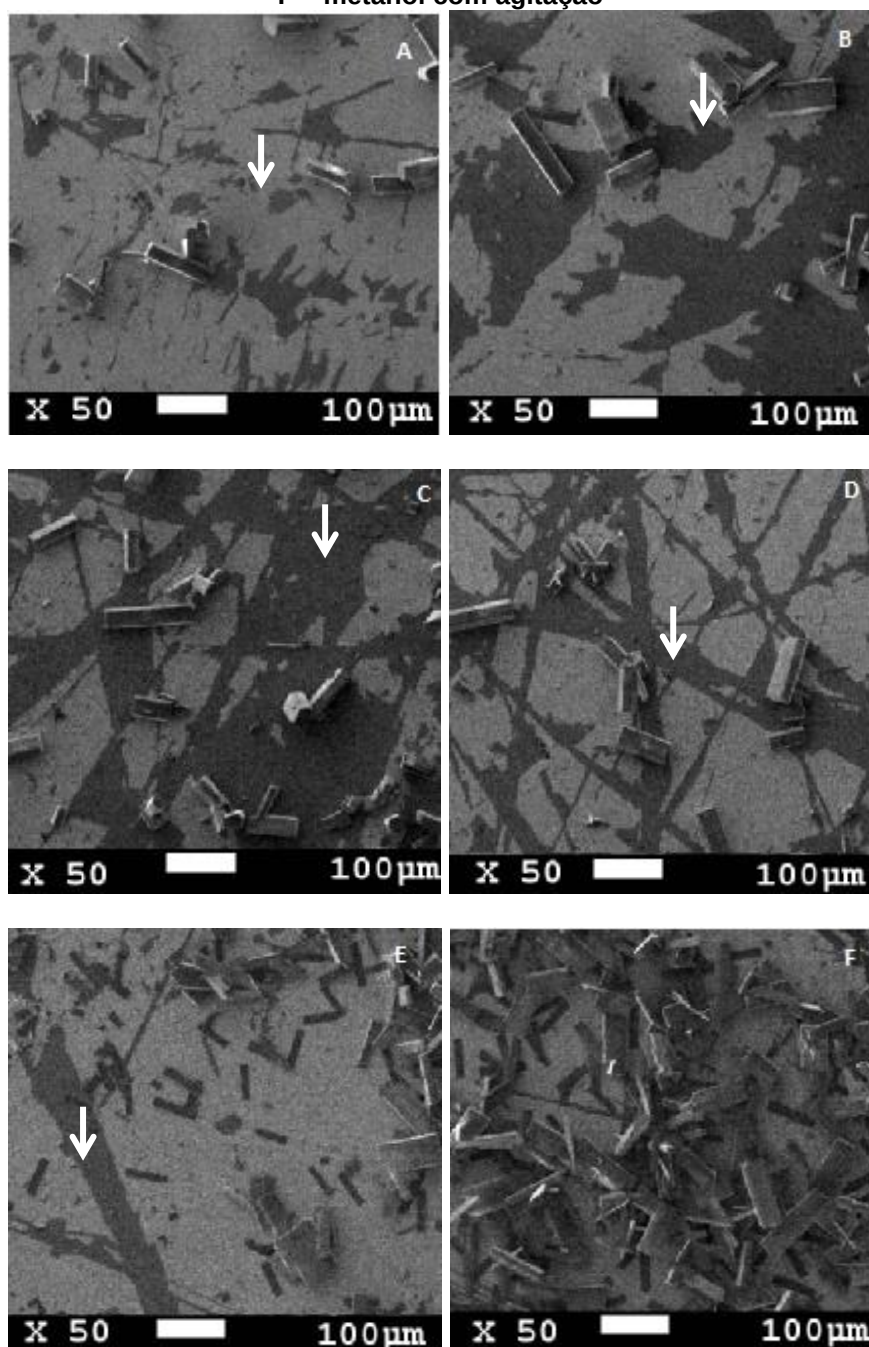
O primeiro onde o substrato de silício foi recoberto com ouro, o segundo com o substrato de silício sem recobrimento, o terceiro com o substrato de silício recoberto com titânio e o quarto com o substrato de silício recoberto por titânio e em seguida recoberto com ouro.

5.2.1 Síntese em substrato de silício com deposição de ouro

A metodologia de crescimento direto foi empregada nos substratos preparados conforme descrito no item 4.3.1.2.3. Nesses substratos foram testadas diferentes técnicas de abrasão e analisada a sua influência no crescimento do material sobre o substrato.

A Figura 18 apresenta as microscopias eletrônicas de varredura dos materiais sintetizados em substratos submetidos a diferentes técnicas de abrasão.

Figura 18: Imagem de Microscopia eletrônica de varredura das MOFs sintetizadas em substratos submetidos a diferentes técnicas de abrasão. A – água régia; B – lixa d'água; C - bucha tipo Scotch Britte®; D – algodão com água e detergente; E – algodão em metanol; F – metanol com agitação



Fonte: Autor

É possível observar através das microscopias a formação de ranhuras (indicada pelas setas brancas) de diferentes tamanhos na superfície dos substratos causada pela abrasão. O tamanho das ranhuras é dependente do método de abrasão utilizado. As microscopias revelaram ainda a formação de uma maior quantidade de cristais no substrato que foi submetido à técnica de abrasão que utilizou o polimento mecânico por imersão em metanol e agitação leve (Figura 19F). Podemos observar também uma morfologia alongada dos cristais, Kojtari e colaboradores (54) nomearam esse tipo de morfologia como fios (do inglês “wires”), McGuire e colaboradores (52) nomearam esse tipo de morfologia como bastões (do inglês “rod-like”), neste trabalho consideramos a morfologia como sendo de bastões. Os cristais formados não foram afetados pelas técnicas de abrasão. Sendo assim, concluiu-se que a técnica de polimento mecânico por imersão em metanol e agitação leve foi a melhor para o crescimento das MOFs no substrato recobertos apenas por ouro.

Finalmente, após o teste de abrasão os substratos preparados pelo equipamento da marca Bal-Tec modelo SCD 050 Sputter Coater não foram mais utilizados. Os substratos utilizados nos testes descritos a seguir, foram os preparados pelo equipamento Denton Vacuum DV-502A, o qual oferecia um maior controle de parâmetros para a deposição da camada de ouro no substrato de silício.

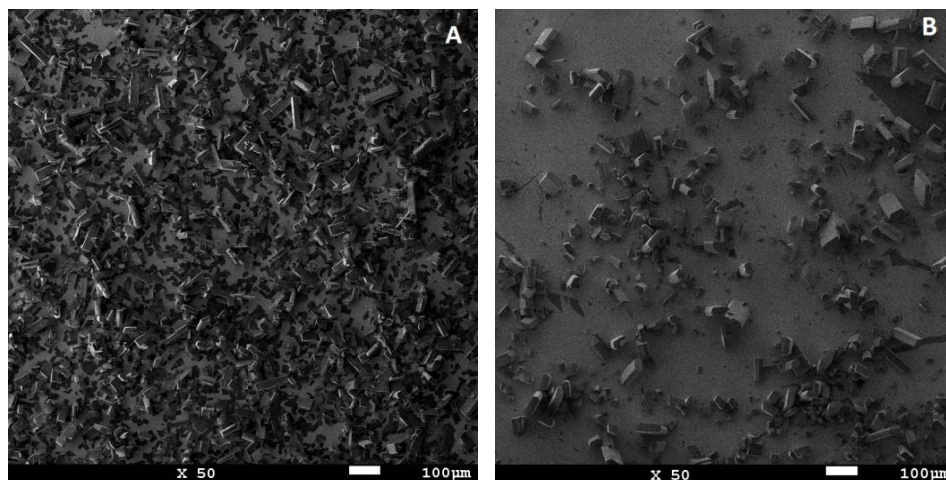
5.3. Influência do local de imersão

Além da influência das diferentes técnicas de abrasão, foi avaliado o efeito do posicionamento do substrato no meio reacional, uma vez que até o momento na literatura não foi encontrada comparações referentes à posição do substrato no meio reacional.

A primeira posição avaliada é a tradicional, cujo substrato é colocado no fundo do recipiente contendo o meio reacional com a face do depósito de ouro voltada para o meio reacional. Na segunda posição avaliada, o substrato foi colocado na superfície do meio reacional e com a face do substrato que contém o depósito de ouro voltado para a solução.

É possível observar após a síntese de contato direto com o substrato de silício recoberto com ouro, o crescimento de cristais nos substratos a olho nu. Entretanto, para melhor avaliar a influência do posicionamento no crescimento dos cristais, os substratos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 19 apresenta as imagens MEV dos substratos posicionado no fundo do recipiente contendo o meio reacional (A) e na superfície do meio reacional (B). Segundo a literatura, o material cresce de forma perpendicular à superfície do substrato. Entretanto, não foi possível observar este tipo de crescimento nos substratos testados neste trabalho, uma vez que o transporte do substrato para a realização das análises pode ocasionar o deslocamento dos cristais. As diferenças observadas pelas microscopias foram em relação à quantidade de cristal formada a partir do posicionamento diferente do substrato. Observou-se que quando o substrato foi colocado no fundo do recipiente ocorreu o crescimento de uma maior quantidade de cristais devido à ação da gravidade. Observamos também que o posicionamento do substrato não afetou a morfologia dos cristais. Após análise por microscopia eletrônica, os cristais foram retirados da superfície dos substratos por raspagem com auxílio de espátula, e sua massa foi medida. Através da técnica de pesagem, foi possível confirmar as observações realizadas a partir das microscopias, uma vez que o rendimento do material foi de 0,002 g para o substrato posicionado no fundo do recipiente e de $\approx 0,001$ g para substrato posicionado na superfície.

Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura dos substratos com depósito de ouro contendo cristais de MOF posicionados no fundo do recipiente que contém o meio reacional (A) e na superfície do meio reacional (B)



Fonte: Autor

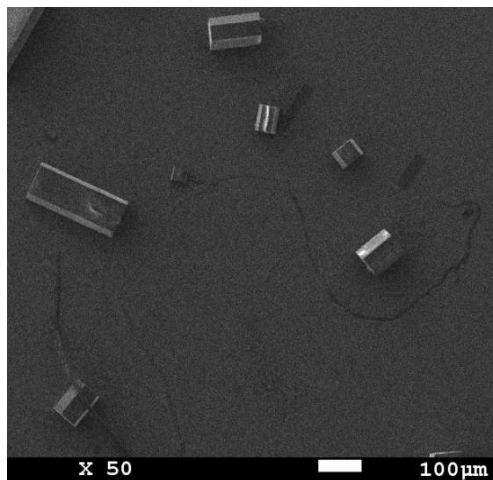
Dessa forma as sínteses subsequentes foram realizadas com o substrato posicionado no fundo do recipiente contendo o meio reacional.

5.4. Síntese em substrato de silício sem deposição

Os resultados envolvendo a síntese por contato direto com o substrato recoberto com ouro foram apresentados anteriormente e demonstraram a sua eficiência no que diz respeito à formação do material com hábito cristalino distinto (bastões) em relação ao padrão (octaédrico).

A Figura 20 apresenta a imagem MEV da MOF sintetizada pelo método de contato direto com auxílio de substrato de silício sem recobrimento. É importante destacar que, ao contrário do observado para os substratos recobertos com ouro, não foi possível verificar a olho nu se houve ou não crescimento dos cristais da MOF. O uso da microscopia eletrônica revelou, entretanto, que houve crescimento da MOF ainda que em uma quantidade de cristais significativamente menor. Após a raspagem do substrato com auxílio de uma espátula para retirada dos cristais, não foi possível determinar por pesagem a quantidade de cristais formada, mesmo utilizando uma balança analítica de alta precisão, confirmando o baixo rendimento da síntese neste substrato.

Figura 20: Imagem MEV do material formado sobre substrato de silício sem recobrimento



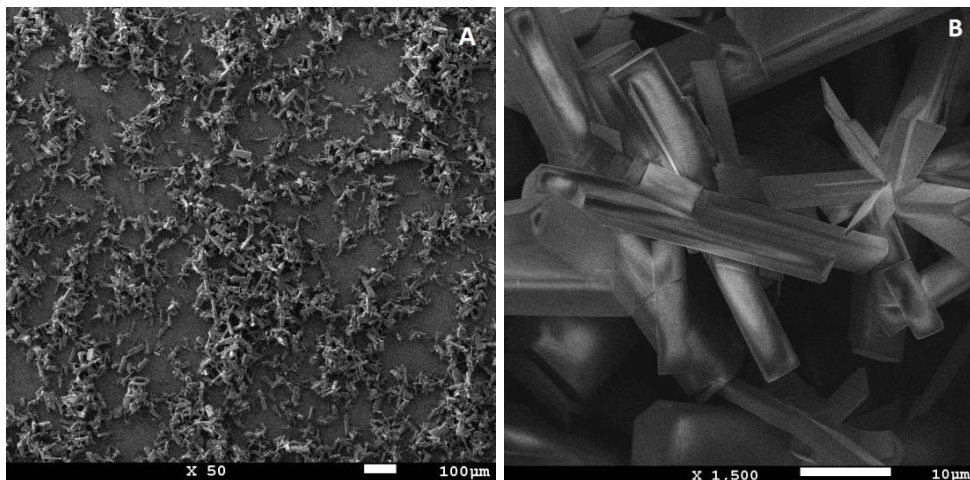
Fonte: Autor

5.5. Síntese em substrato de silício com deposição de uma camada de titânio

A síntese de contato direto com o substrato de silício recoberto por uma camada de 10 nm de titânio preparado pelo equipamento Denton Vacuum DV-502A, foi realizada. A Figura 21 apresenta a imagem MEV da MOF sintetizada sobre substrato de silício recoberto com titânio. Vale ressaltar que foi possível, assim como no caso dos substratos recobertos com ouro, observar à olho nu a formação de cristais da MOF.

Na Figura 21 (A) é possível observar a formação de uma grande quantidade de cristais com morfologia alongada como bastões, enquanto a Figura 21 (B) apresenta a imagem com um aumento de 1.500 vezes, a fim de destacar a morfologia encontrada. As partículas cristalinas observadas possuem um comprimento que varia de 48 - 61,2 μm e espessura que varia de 3,07 μm - 4,6 μm.

Figura 21: Microscopia (MEV) das MOFs sintetizadas com auxílio de substrato de silício recoberto com titânio

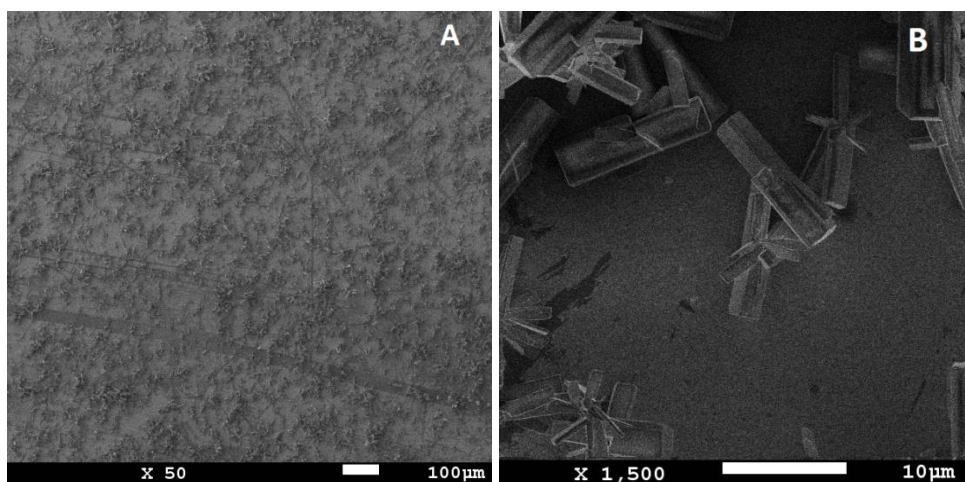


Fonte: Autor

5.6. Síntese em substrato de silício com deposição de uma camada de titânio e ouro

A Figura 22 apresenta a microscopia MEV da MOF sintetizada sobre o substrato de silício recoberto com uma espessura de 10 nm de titânio e 50 nm de ouro, no mesmo aumento apresentado para os substratos anteriores (A) e com um aumento de 1.500 vezes (B). Foi possível observar a olho nu o crescimento de cristais na superfície do substrato. A imagem apresentada na Figura 22 (A) revela a formação de grande quantidade de cristais com morfologia alongada na forma de bastões. Os cristais formados apresentaram comprimento variando de 18 - 29,6 μm e largura variando de 1,3 - 2,96 μm . Desta forma, podemos concluir que o tamanho dos cristais formados é menor do que aquele obtido quando o substrato foi recoberto apenas com titânio. Após a retirada dos cristais da superfície do substrato, foi obtida uma massa de $\approx 0,0002$ g.

Figura 22: Microscopia MEV da MOF sintetizada sobre substrato de silício recoberto com titânio+ouro no mesmo aumento apresentado para os substratos anteriores (A) e com um aumento de 1.500 vezes (B)

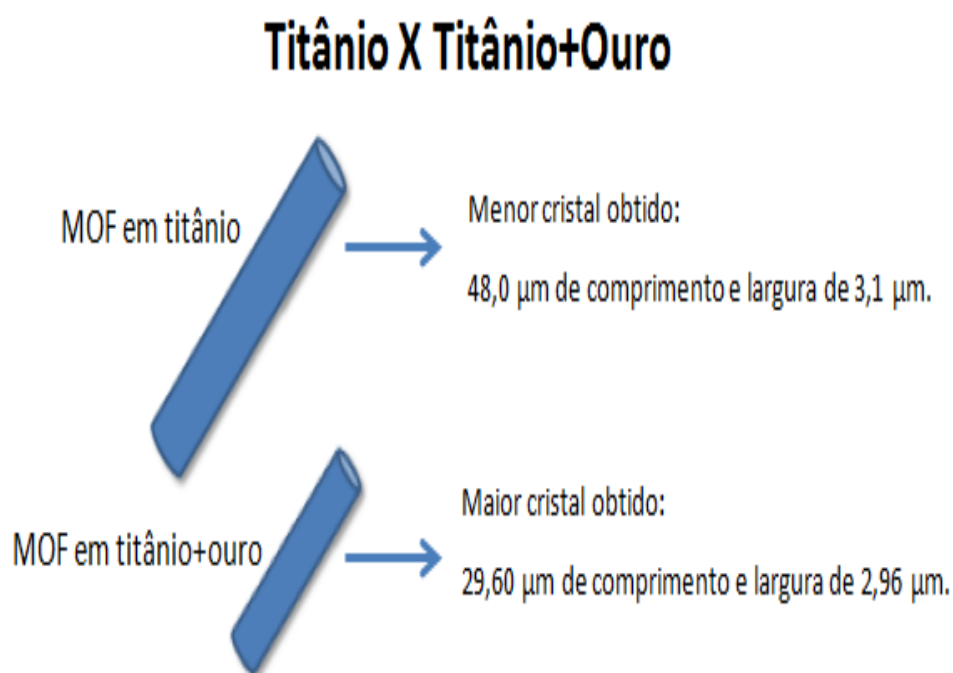


Fonte: Autor

O rendimento obtido a partir do crescimento dos cristais sobre substrato recobertos por titânio+ouro foi dez vezes superior ao encontrado anteriormente na MOF crescida sobre o substrato de silício recoberto só com ouro (0,0020 g).

O tamanho dos cristais formados, entretanto, é menor quando o recobrimento é feito com titânio+ouro em comparação ao recobrimento somente com titânio. A Figura 23 ilustra a diferença, sendo possível observar que a razão de 15,48 µm do menor cristal de MOF crescido em titânio é superior à razão de 10,00 µm do maior cristal de MOF crescido em titânio+ouro. Por esta razão optou-se por conduzir os estudos seguintes com o substrato de titânio+ouro. Vale ressaltar que o menor tamanho de partícula da matriz porosa é vantajoso para aplicação como sistema de liberação de fármacos por diferentes vias de administração.

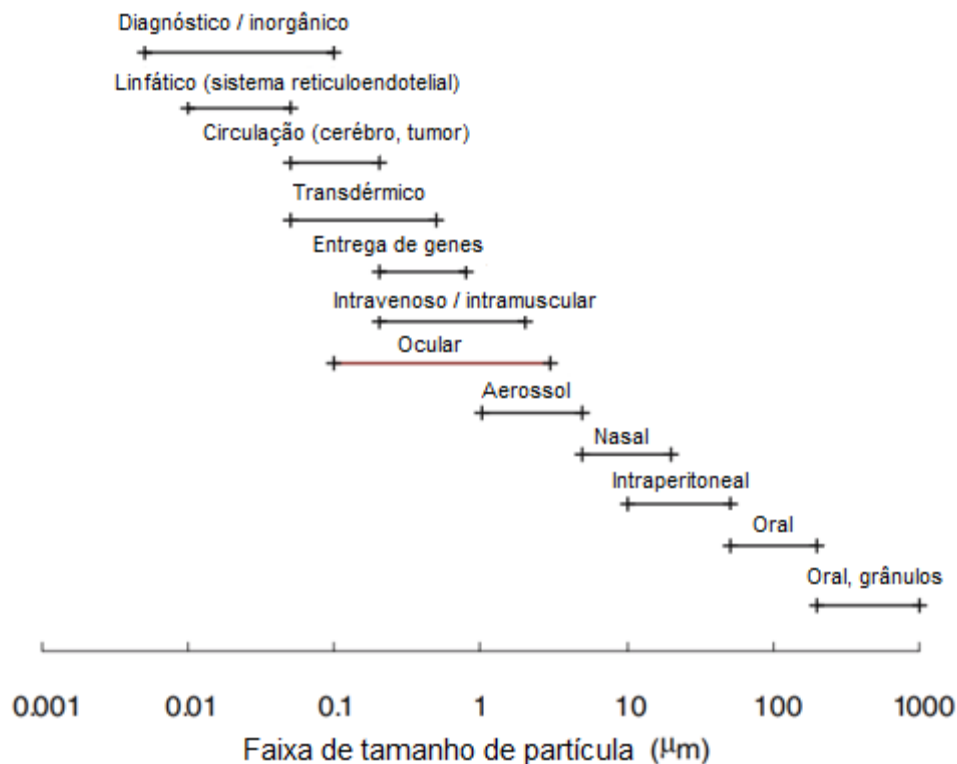
Figura 23: Comparação do crescimento dos cristais sobre substrato de titânio+ouro e dos cristais crescidos por substrato de silício somente com ouro



Fonte: Autor

A Figura 24 apresenta a relação entre a distribuição de tamanhos de partículas e a via de administração (82). Além de determinar a via de administração, o tamanho e a forma das partículas podem ter influência em uma grande variedade de propriedades físico-químicas e no processo de fabricação, incluindo: taxa de dissolução e biodisponibilidade dos princípios ativos, taxa de liberação prolongada do fármaco, taxa de absorção e tempo de depuração.

Figura 24: Relação entre a distribuição de tamanhos de partículas e vias de administração
(82)



Fonte: Adaptado de Shekunov (2007)

Considerando o tamanho da partícula sintetizada neste trabalho e a relação entre a distribuição de tamanhos de partículas e vias de administração, podemos concluir que as MOFs podem ser empregadas para via de administração oral, intraperitoneal, nasal, pulmonar e dérmica.

5.7. Influência da variação da concentração dos reagentes nas propriedades dos cristais obtidos pela síntese de contato direto em substrato de silício recoberto com titânio e ouro.

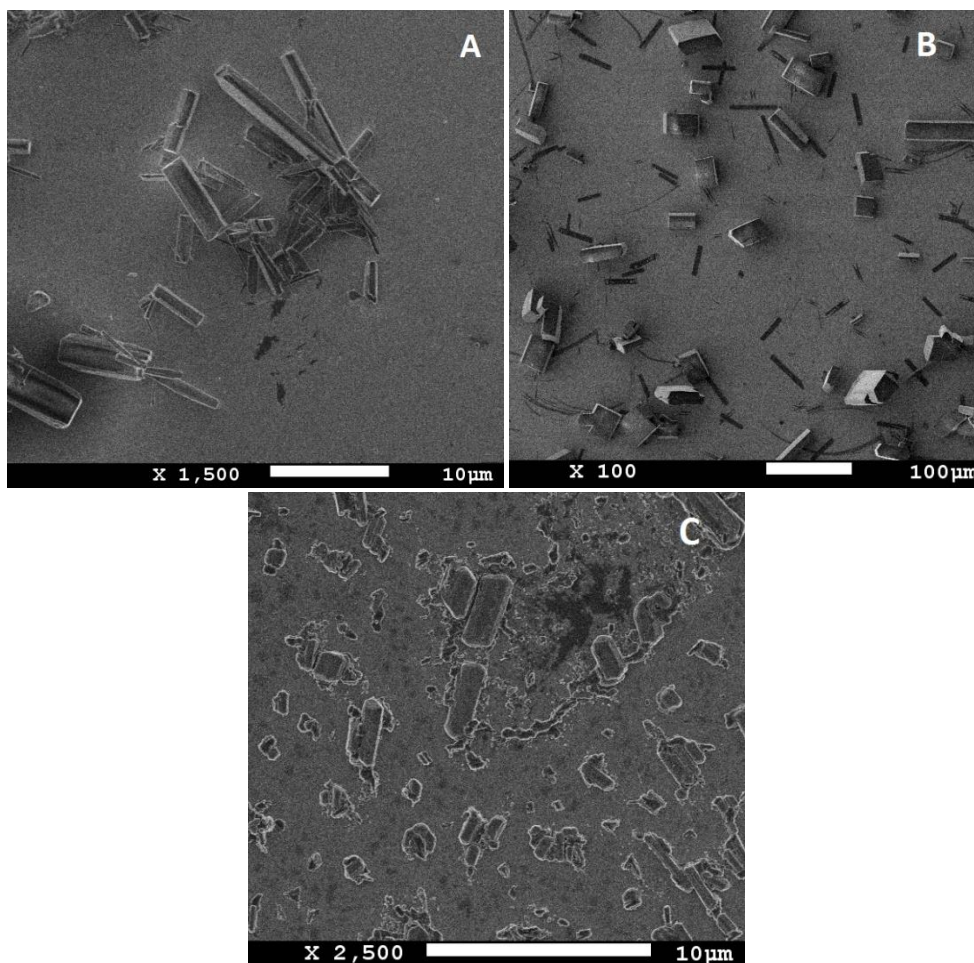
A síntese de contato direto foi realizada com diferentes concentrações dos reagentes, da solução do ligante (ácido trimésico) e do metal (sulfato de cobre) sobre o substrato de silício recoberto por titânio+ouro, com o objetivo de avaliar a possível influência da concentração dos reagentes na morfologia dos cristais bem

como no rendimento. Assim, foram testados os seguintes parâmetros referentes à razão molar metal:ligante:

1. 0,23 mmol de BTC e 0,30 mmol de sulfato de cobre;
2. 0,12 mmol de BTC e 0,15 mmol de sulfato de cobre;
3. 0,10 mmol de BTC e 0,10 mmol de sulfato de cobre;
4. 0,03 mmol de BTC e 0,30 mmol de sulfato de cobre.

A Figura 25 apresenta as imagens MEV dos materiais obtidos após a variação nas concentrações dos reagentes para a formação da MOF. A Figura 25 (A) apresenta a microscopia MEV do material obtido via síntese usando a condição de concentração número 1, a Figura 25 (B) apresenta a microscopia MEV após síntese com a concentração número 2 enquanto que a Figura 25 (C) apresenta a imagem MEV obtida após a síntese com a concentração número 3. Na imagem MEV da Figura 25 (A e B), e na microscopia da Figura 25 (C) foi possível observar que os materiais crescidos sobre o substrato usando a condição 3, não apresentaram as características padrão da MOF HKUST-1 ou de cristais alongados. Por fim, para síntese com os parâmetros de concentração número 4, não foi possível observar crescimento de cristais sobre o substrato e desta forma a microscopia MEV não foi apresentada.

Figura 25: Influência da concentração dos reagentes no tipo de partícula formada: Figura (A) síntese com a concentração descrita no subitem 1; Figura (B) síntese com a concentração descrita no subitem 2; Figura (C) síntese com a concentração descrita no subitem 3



Fonte: Autor

A partir das observações das microscopias MEV foi possível determinar que a concentração número 1 (0,23 mmol de BTC e 0,30 mmol de Cu), é a mais indicada para prosseguirmos os estudos na busca de uma MOF com morfologia de cristais mais alongados semelhantes a bastões.

5.8. Síntese de contato direto em substrato de silício com deposição de uma camada de titânio e ouro com variação do volume de solução.

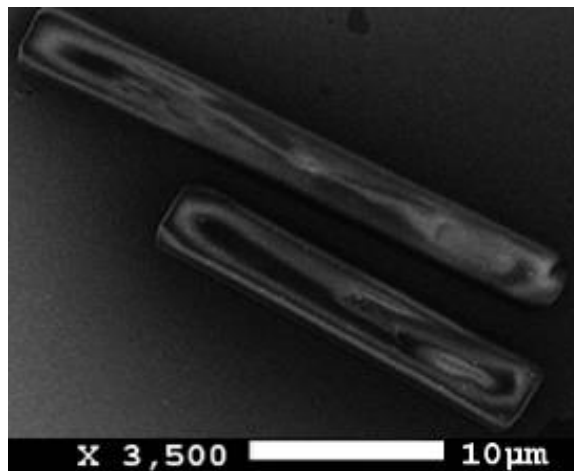
A partir da concentração ideal para a formação de cristais alongados, determinada no item anterior, diferentes volumes do meio reacional (0,23 mmol de BTC + 0,30 mmol de sulfato de cobre) foram colocados em contato com o substrato de titânio+ouro. Esses parâmetros foram estudados com o objetivo de avaliar a possível influência do volume do meio reacional na morfologia dos cristais bem como no rendimento. Dessa forma, foram testados os seguintes volumes da solução:

1. 3 mL de solução (0,23 mmol de BTC+ 0,30 mmol de CuSO_4);
2. 4 mL de solução (0,23 mmol de BTC+ 0,30 mmol de CuSO_4);
3. 18 mL de solução (0,23 mmol de BTC+ 0,30 mmol de CuSO_4).

Todas as condições estudadas apresentaram crescimento de cristais após o período de contato de 24 horas. A Figura 26 apresenta a imagem MEV obtida do material retirado do substrato titânio+ouro após imersão em 3 mL de meio reacional. Foi possível observar a morfologia alongada de bastões com diâmetro de $\approx 30 \mu\text{m}$ e espessura de $\approx 0,3 \mu\text{m}$.

Para a realização da síntese foi utilizada a mesma quantidade de substrato para todos os volumes testado. Após a síntese o substrato foi raspado manualmente para a retirada do material crescido sobre o mesmo. Ao realizar a pesagem de cada amostra foi obtida a média de 0,0029 g. Desta forma é possível afirmar que o volume de 3 mL é suficiente para que ocorra o crescimento da MOF sobre o substrato de titânio+ouro com diâmetro de 1 cm por 1 cm submerso em meio reacional, uma vez que o rendimento da síntese e a morfologia dos cristais não se alteram se um volume maior que 3 mL for utilizado.

Figura 26: Imagem MEV obtida do material retirado do substrato Titânio+Ouro após imersão em 3 mL de meio reacional



Fonte: Autor

5.9. Síntese de contato direto sobre substrato de silício com deposição de titânio e ouro com variação do tempo de contato

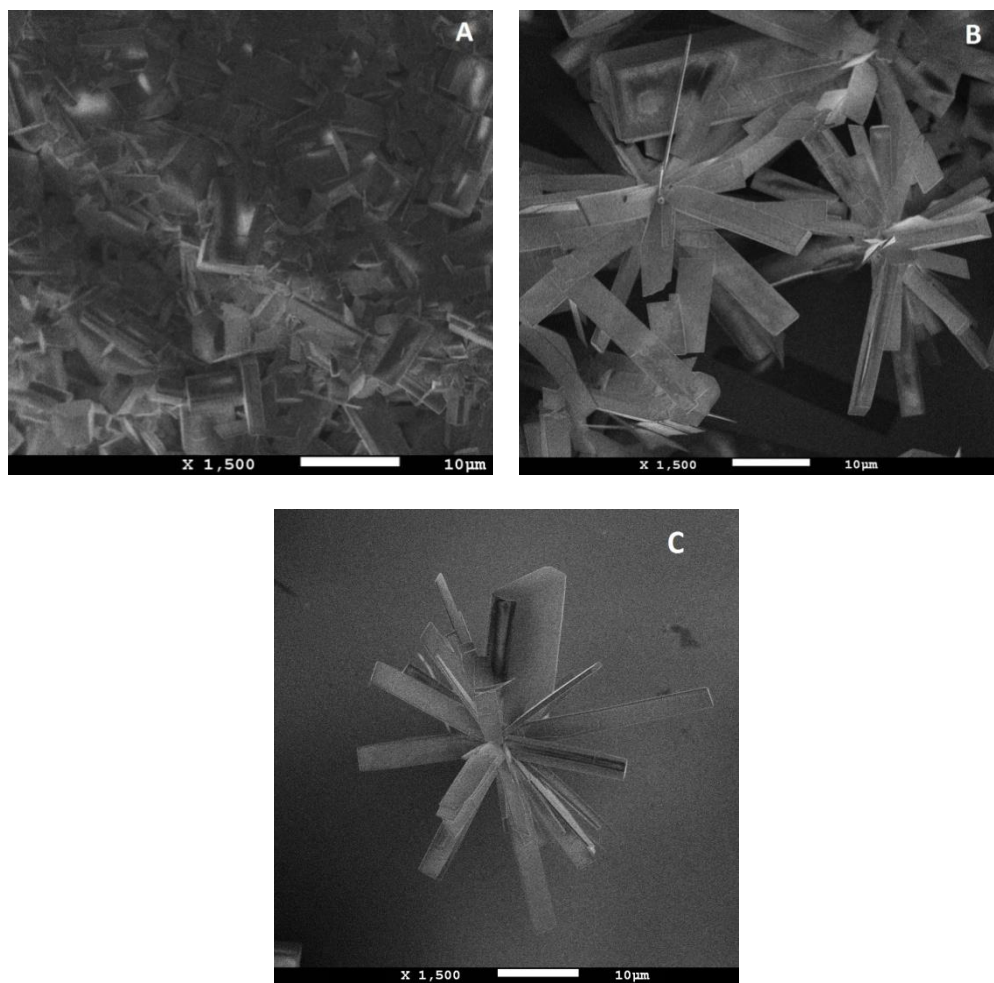
A literatura relata que o crescimento de cristais pode ocorrer em minutos, horas e semanas dependendo do tipo de síntese empregada (27,36,54,55). Buscando analisar a possível influência do tempo de reação na morfologia dos cristais bem como no rendimento, foram estudados os seguintes tempos de reação:

1. 24 horas de imersão no meio reacional;
2. 48 horas de imersão no meio reacional;
3. 72 horas de imersão no meio reacional.

A Figura 27 apresenta as imagens MEV do material retirado do substrato após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) de imersão no meio reacional. Através das imagens, foi possível observar que todos os modelos de tempos de contato avaliados apresentaram crescimento de cristais de MOF. Na Figura 27 (A) foi possível observar um aglomerado de partículas de MOFs com morfologia semelhante a bastões. Na Figura 27 (B) e (C) foi possível observar o crescimento de MOFs com morfologia diferente do padrão relatado na literatura e das descritas até o presente momento, isto porque, os cristais visualizados através da

microscopia são alongados, estão unidos em uma mesma base e o seu crescimento ocorre em diferentes direções, o que dá a esses cristais uma aparência descrita por Pung e colaboradores (83) como forma de flores, os quais apresentam um diâmetro de 37,5 μm e espessura de 3 μm .

Figura 27: Imagens MEV do material retirado do substrato titânio+ouro após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas de imersão em meio reacional



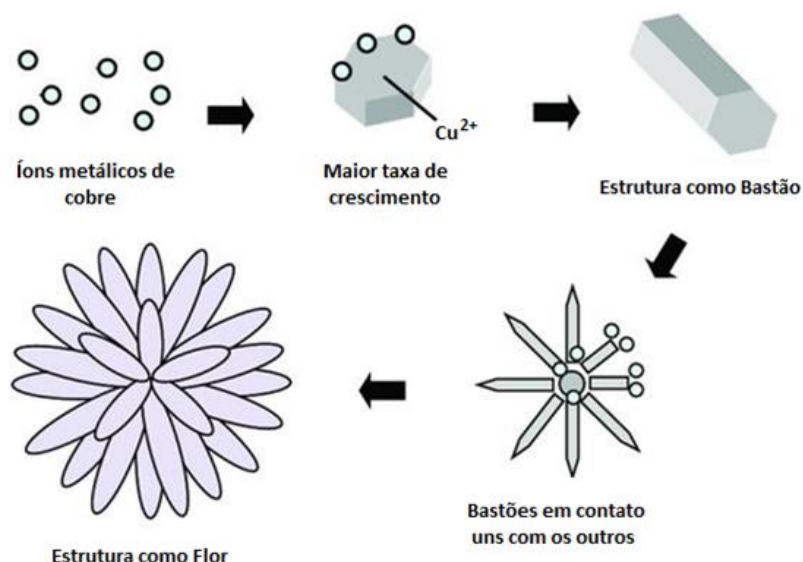
Fonte: Autor

Os estudos realizados demonstram que ocorre uma diferenciação da morfologia dos cristais quando o tempo de reação é superior a 24 horas.

A Figura 28 ilustra o mecanismo de formação do cristal em forma de flores proposto por Pung (83). O mecanismo é descrito como a ocorrência de nucleação primária, a qual origina a forma de bastões, o contato desses bastões um com o

outro durante o processo de síntese ocasiona na superfície de alguns bastões uma nucleação secundária, na qual as “pétalas” são formadas por bastões que se unem uns aos outros através de um bastão base, resultando na formação de partículas semelhantes a flores.

Figura 28: Ilustração do mecanismo de formação do cristal em forma de flores (83)

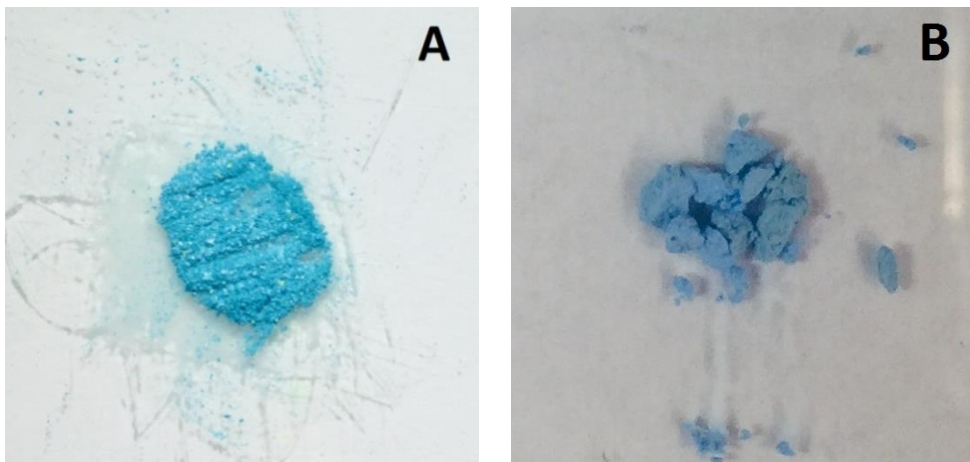


Fonte: Pung (2012)

5.10. Ativação dos poros do material VCuBTC

A Figura 29, apresenta as fotos do material VCuBTC antes do processo de ativação (A) e após o processo de ativação pelo processo de aquecimento térmico, realizado com o auxílio de estufa a vácuo com temperatura de 100 °C por 24 horas (B). Na Figura 29 (A) é possível observar que a coloração da MOF antes do processo de ativação é azul clara, enquanto que na Figura 29 (B) após o processo de ativação é a coloração da MOF é azul escura. A alteração da coloração segue o padrão já descrito em literatura, desta forma é possível sugerir que o processo de ativação utilizado foi eficiente.

Figura 29: Foto do pó das MOFs VCuBTC antes do processo de ativação (A) e após o processo de ativação (B)



Fonte: Autor

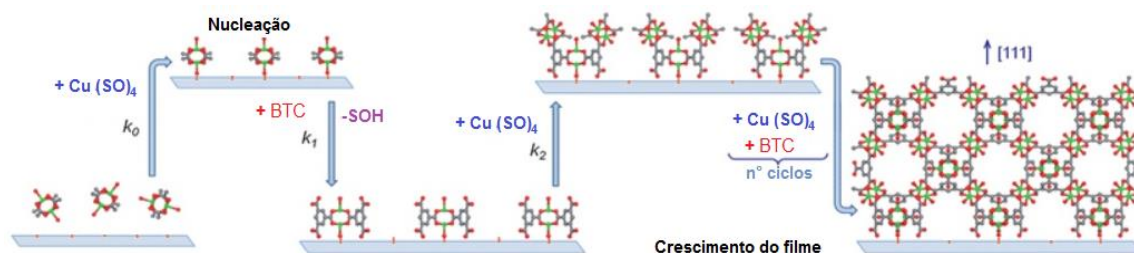
5.11. Síntese layer-by-layer

Após avaliar e definir os parâmetros para que a síntese da MOF a base de cobre e ácido trimésico sobre o substrato fosse a mais adequada para o crescimento de materiais em morfologia diferentes do padrão relatado na literatura, estudamos a alteração da rota sintética em busca de obtenção de um melhor rendimento e manutenção da morfologia de bastões. Desta forma, a metodologia de síntese foi alterada de “contato direto” para a técnica de “layer-by-layer” (LBL). Conforme descrito anteriormente, os estudos garantiram a definição dos seguintes parâmetros como sendo os mais adequados:

- Substrato de silício recoberto com titânio e ouro;
- Concentração de 0,23 mmol de ácido trimésico e 0,30 mmol de sulfato de cobre (II);
- Tempo de imersão de 24 horas;
- Ativação dos poros por calor térmico na estufa a vácuo com temperatura de 100 °C por 24 horas.

A Figura 30 ilustra o esquema de nucleação em superfície de substrato da síntese de LBL.

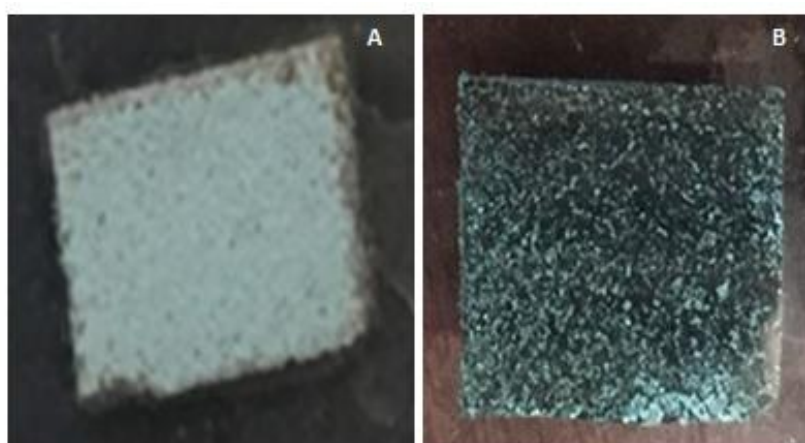
Figura 30: Representação esquemática da nucleação em superfície de substrato



Fonte: Adaptado Stavila (2012)(84)

A Figura 31 apresenta as fotos do substrato silício recoberto por titânio+ouro após a síntese layer-by-layer (A) e após a síntese de contato direto (B). Na foto apresentada na Figura 31 (A) é possível observar um amplo crescimento de cristais na coloração azul na superfície do substrato, na Figura 31 (B) também é observado o crescimento de cristais, entretanto, quando comparada com a foto anterior é possível visualizar a camada de titânio+ouro do substrato. Essa observação foi confirmada pelo cálculo do rendimento, através da comparação da massa do produto final obtido pela técnica de contato direto (0,029 g) em relação à massa do produto final obtida pela técnica layer-by-layer (0,090 g).

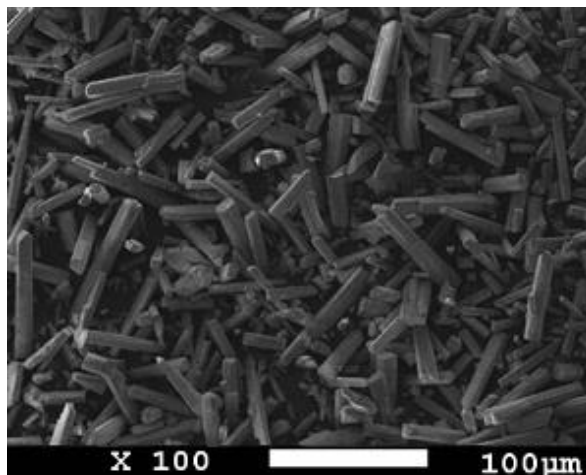
Figura 31: Fotos do substrato silício recoberto por titânio+ouro após a síntese layer-by-layer (A) e após a síntese de contato direto (B)



Fonte: Autor

A Figura 32 apresenta a imagem MEV do material obtido pela técnica layer-by-layer, onde é possível observar que apesar da alteração da técnica da síntese da MOF, as partículas ainda apresentam a morfologia de bastões.

Figura 32: Imagem MEV da MOF obtida por síntese de layer-by-layer



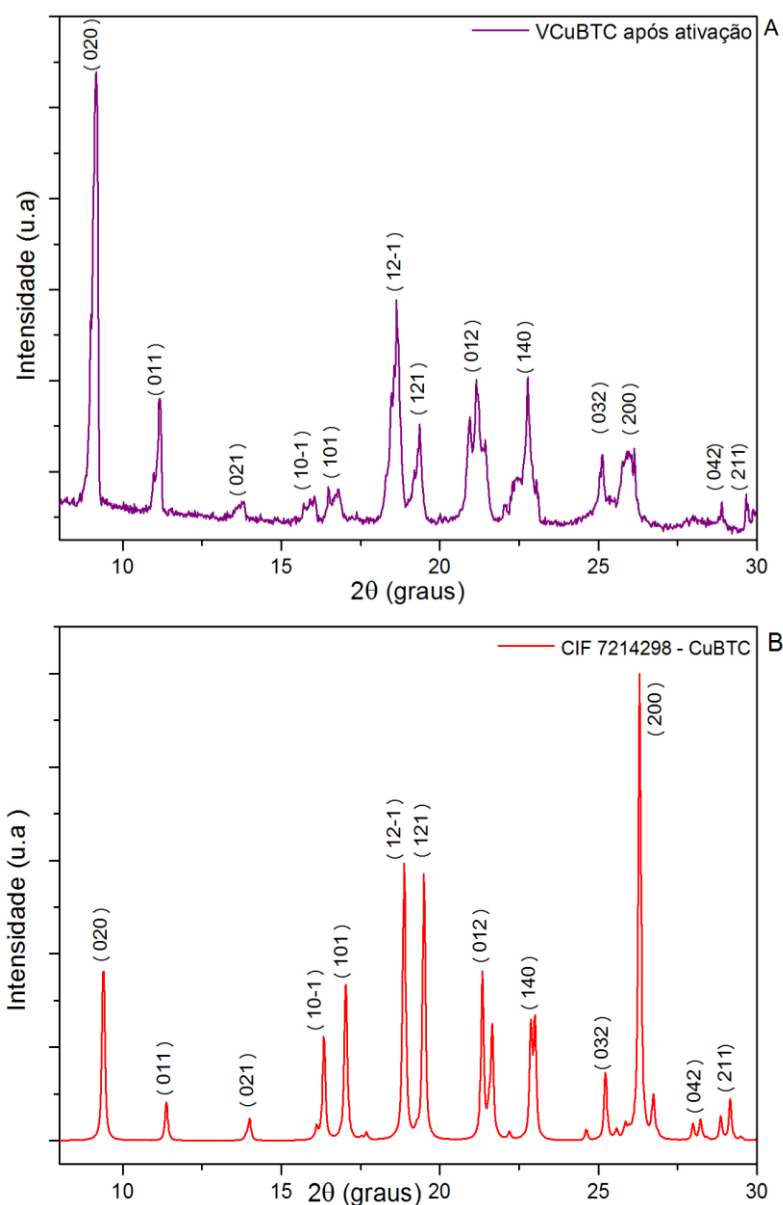
Fonte: Autor

Dessa forma podemos concluir que a técnica layer-by-layer foi a mais indicada para o crescimento da MOF, uma vez que apresenta alto rendimento (maior que 300%) quando comparado com a técnica de síntese de contato direto. O ganho no rendimento é importante, pois comprova a eficiência da técnica, afinal, a quantidade de material gasto para realizar a síntese layer-by-layer e o tempo de reação idêntico ao utilizado na técnica de contato direto.

Os cristais obtidos pela síntese layer-by-layer foram caracterizados por difração de raios X. A Figura 33 (A) apresenta o difratograma da amostra VCuBTC após ativação dos poros. A análise de difração de raios X em pó do material foi realizada para confirmar a pureza da fase cristalina no material, os números acima dos picos correspondem aos índices de Miller. Pode-se observar que o difratograma apresenta picos intensos e definidos, característicos de material cristalino. A posição em 2θ dos picos são compatíveis com os valores correspondentes à rede metalo-orgânica, os dados foram comparados com base na ficha CIF 7214298 referente a CuBTC ilustrada na Figura 33 (B) e com o descrito por Kojtari e colaboradores (35,54).

Na Figura 33 foi possível observar que ocorreu uma inversão em relação a intensidade dos picos, o qual na CIF 7214298 a maior intensidade era na direção (200) enquanto que na MOF VCuBTC, o pico mais intenso ocorreu na direção (020), isso pode ter ocorrido devido ao crescimento preferencial do cristal em relação a uma das direções cristalográficas, e alterações no tipo de síntese e ativação de poros utilizados.

Figura 33: Difratogramas de raios-X da MOF VCuBTC após ativação dos poros (A) e o difratograma de raios-X da CIF 7214298

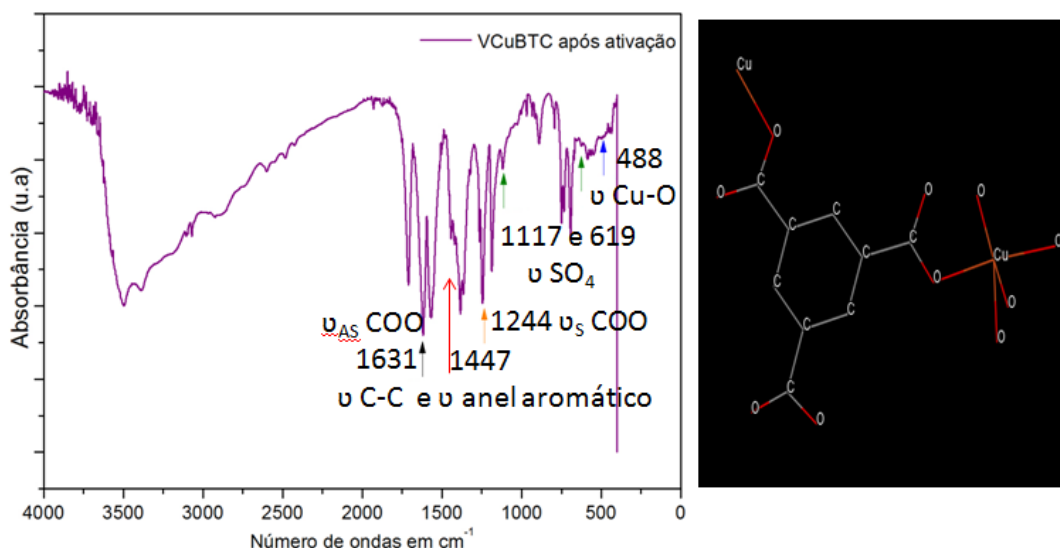


Fonte: Autor

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi empregada para verificar através das bandas de absorção na região do infravermelho, se ocorreu a ligação entre o ácido trimésico e o sulfato de cobre utilizado.

A Figura 34 apresenta os espectros vibracionais da MOF VCuBTC após ativação. No gráfico podemos observar bandas relativas ao estiramento assimétrico COO em 1631 cm^{-1} (seta preta), estiramento simétrico COO em 1244 cm^{-1} (seta laranja) e uma banda relativa aos movimentos vibracionais de estiramento C-C e ao estiramento do anel aromático em 1447 cm^{-1} (seta vermelha). A banda relativa ao estiramento SO_4 pode ser observada em 1117 cm^{-1} e em 613 cm^{-1} (seta verde) indicado que existe sulfato na amostra, a banda relativa ao estiramento Cu-O pode ser observada em 488 cm^{-1} (seta azul) confirmando que o átomo de oxigênio está coordenado ao Cu (79). Esses dados comprovaram que ocorreu a desprotonação do ligante H_3BTC na MOF e a formação das mesmas ligações descritas na literatura para a MOF HKUST-1 (80,81).

Figura 34: Espectro vibracional na região do infravermelho da amostra VCuBTC após ativação



Fonte: Autor

5.12. Ensaios de incorporação do fármaco 5-fluorouracil

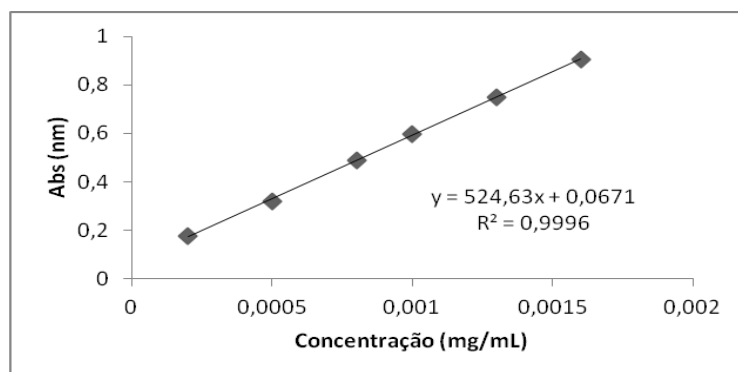
A fim de comprovar a aplicação da MOF VCuBTC após ativação na incorporação de fármacos, foi realizado o teste de incorporação do fármaco 5-fluorouracil, conforme descrito no item 4.3.4.

A quantidade de fármaco incorporada foi relacionada de forma inversamente proporcional com a quantidade obtida na solução sobrenadante, que foi calculada a partir da curva analítica do 5-Fu.

A curva analítica do 5-Fu, ilustrada na Figura 33, foi obtida a partir da solubilização do fármaco em meio aquoso nas concentrações: 0,0016 mg/mL, 0,0013 mg/mL, 0,0010 mg/mL, 0,0008 mg/mL, 0,0005 mg/mL e 0,0002 mg/mL.

A Figura 35 apresenta a curva analítica do 5-Fu em água obtida por UV-Vis e sua equação da reta. A equação obtida a partir da reta foi $y = 524,63x - 0,0671$ e o coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9996 indicando a linearidade da curva analítica.

Figura 35: Curva analítica do 5-Fu em água obtida por UV-Vis e sua equação da reta



Fonte: Autor

O teste de incorporação consistiu no preparo de uma solução aquosa de 5-Fu na qual foi adicionada a MOF (VCuBTC ou VHKUST). A suspensão MOF+5-Fu foi mantida em agitação por 24 horas. Após esse período a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante analisado por espectroscopia UV/Vis. A quantidade de fármaco que pode ser verificada por meio da utilização de espectrofotômetro de absorção molecular na região do ultravioleta-visível, pelo acompanhamento da absorção em 265 nm, sendo que o valor obtido é inversamente proporcional à

quantidade de fármaco incorporado ao MOF. Dessa forma, foi possível comparar a quantidade de fármaco antes e após o contato com o material e, assim, avaliar o quanto cada material incorporou de fármaco em seus poros. A tabela 1 evidencia a incorporação do 5-Fu na amostra VCuBTC e VHKUST.

Tabela 1: Determinação da eficiência de encapsulação (EE%) obtida com a MOF VCuBTC e VHKUST após contato com solução contendo 5-Fu

	VCuBTC	VHKUST
EE (%) *	11,96 ($\pm$ 0,149%)	10,21 ($\pm$ 0,189%)

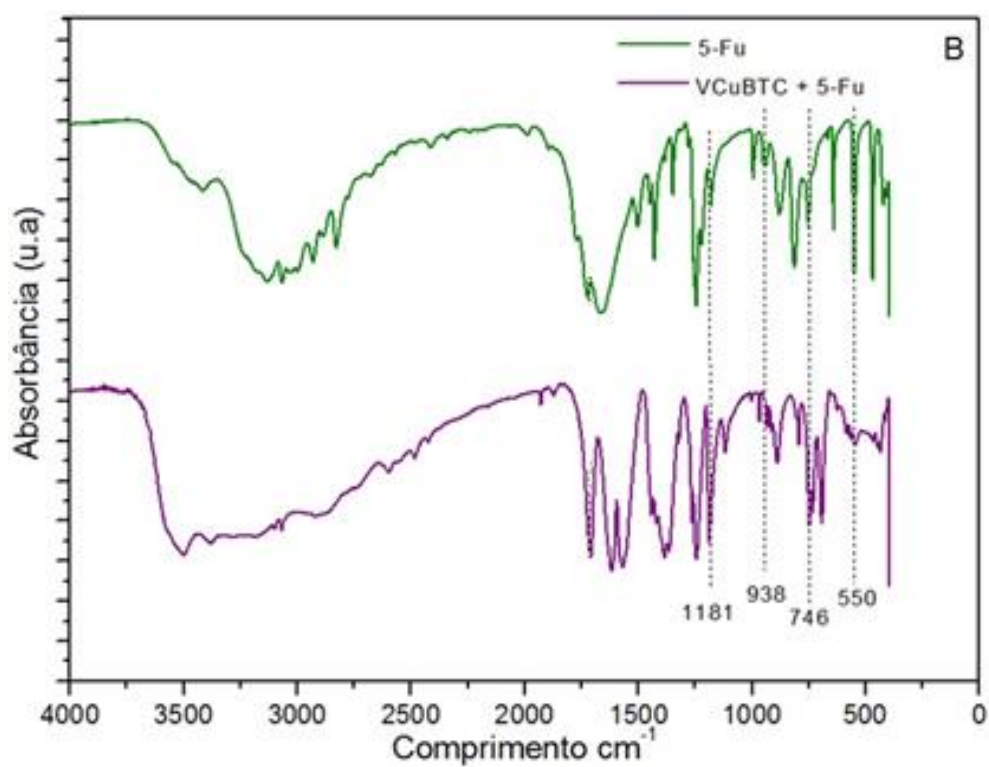
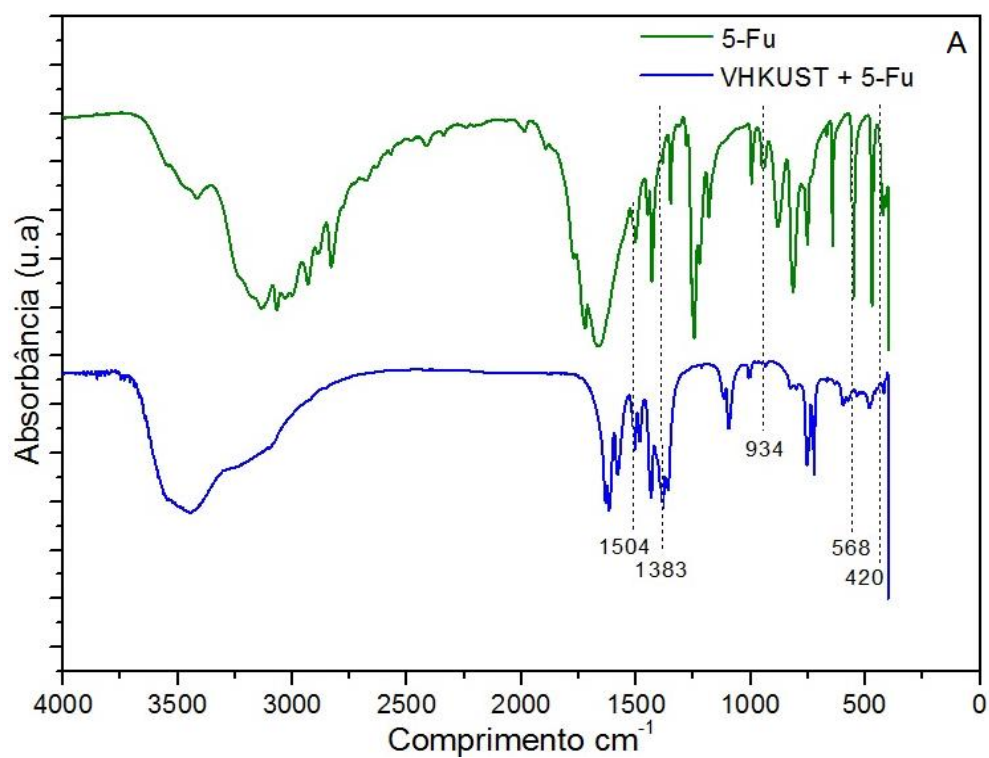
Fonte: Autor

*Para a obtenção dos valores de EE (%) descritos na Tabela 1 foi realizada a média de 3 incorporações independentes da MOF VCuBTC (valores obtidos 12,129 %, 11,893 % e 11,853 % = $35,875 / 3 = 11,958 \% \pm 0,149\%$) e da MOF VKUST (valores obtidos 10,231 %, 10,389 % e 10,011 % = $30,631 / 3 = 10,210 \% \pm 0,189\%$).

Através dos resultados de eficiência de encapsulação descrito na Tabela 1 foi possível concluir que o contato de 24 horas da MOF com a solução contendo 5-Fu resulta na incorporação do fármaco ao material. A faixa de incorporação é condizente com a relatada por Yingpeng e colaboradores (85).

A Figura 36 apresenta o espectro vibracional na região do infravermelho do fármaco 5-Fu e da MOF VHKUST + 5-Fu (A) e o espectro vibracional na região do infravermelho do fármaco 5-Fu e da MOF VCuBTC + 5Fu (B).

Figura 36: Espectro infravermelho do fármaco 5-Fu e da MOF VKHUST+5-Fu (A) e do 5-Fu e da MOF VCuBTC+5-Fu (B)



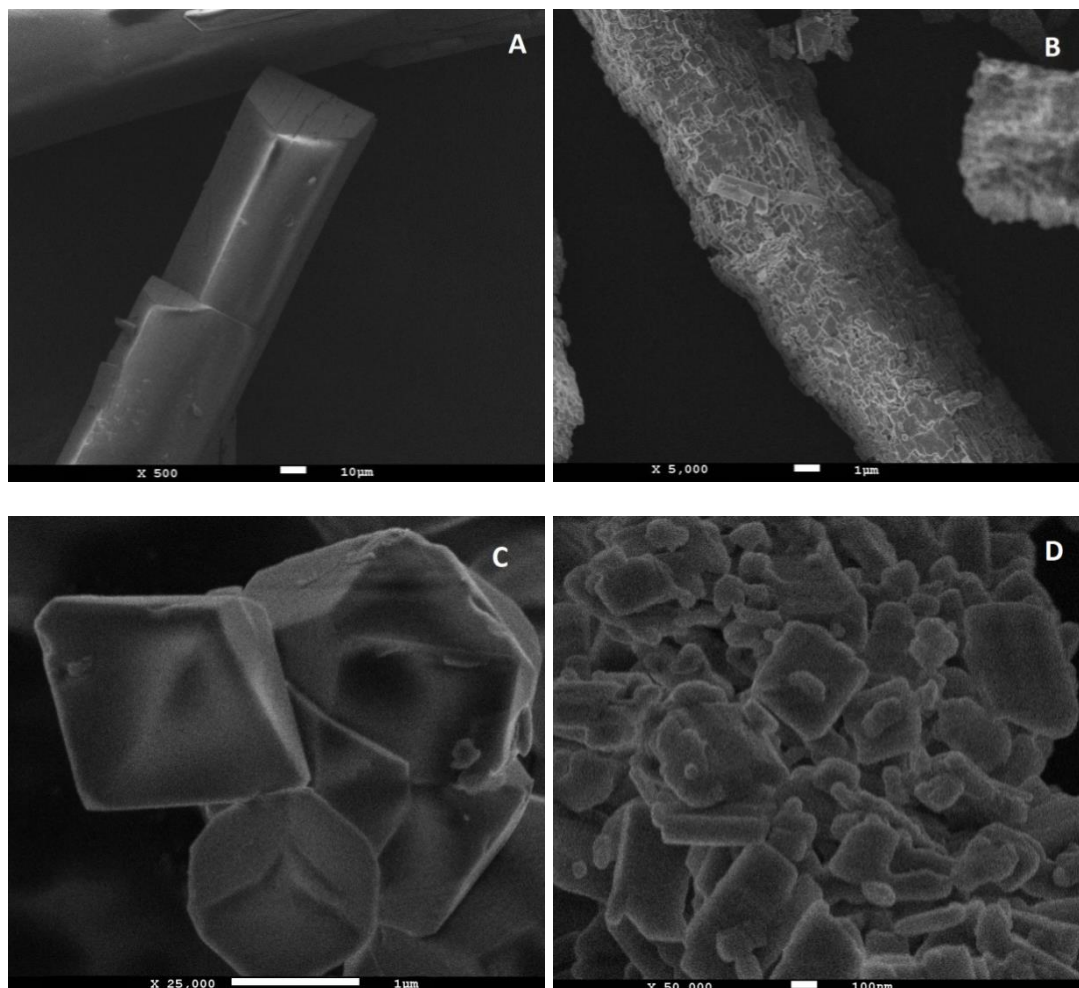
Fonte: Autor

A Figura 36 (A) apresenta o espectro de IV da MOF VHKUST + 5-Fu sendo possível observar a permanência das principais bandas nas mesmas regiões descritas anteriormente para VHKUST após ativação. Finalmente, comparando os espectros de 5-Fu com o espectro de VHKUST + 5-Fu foi possível observar bandas que estão presentes em ambos os espectros como 1504 cm^{-1} , 1383 cm^{-1} , 934 cm^{-1} , 568 cm^{-1} e 420 cm^{-1} , o que sugere a presença do fármaco na amostra VHKUST analisada. As curvas ainda mostram que não houve a formação de nenhuma nova banda, ou seja, nenhum novo grupo funcional, provavelmente porque não houve nenhuma reação química, somente interação física entre a MOF e o fármaco.

A Figura 36 (B) apresenta o espectro de IV da MOF VCuBTC + 5-Fu sendo possível observar a permanência das principais bandas nas mesmas regiões descritas anteriormente para VCuBTC após ativação. Finalmente, ao realizar a comparação do espectro de IV de 5-Fu com o da MOF VCuBTC + 5-Fu, foi possível observar bandas que estão presentes em ambos os espectros como 1713 cm^{-1} , 1181 cm^{-1} , 938 cm^{-1} , 746 cm^{-1} e 550 cm^{-1} o que sugere a presença do fármaco na amostra de VCuBTC analisada. As curvas ainda mostram que não houve a formação de nenhuma nova banda, ou seja, nenhum novo grupo funcional, provavelmente porque não houve nenhuma reação química, somente interação física entre a MOF e o fármaco.

A Figura 37 apresenta a imagem MEV do material VCuBTC e VHKUST antes e após o contato com a solução de 5-Fu.

Figura 37: Imagem MEV da MOF VCuBTC antes da incorporação do 5-Fu (A) e após a incorporação do 5-Fu (B) e da MOF VHKUST antes da incorporação do 5-Fu (C) e após a incorporação do 5-Fu (D)



Fonte: Autor

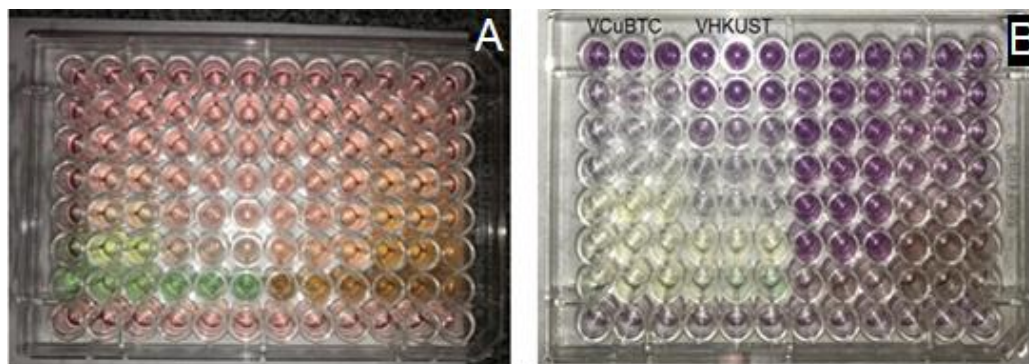
A Figura 37 (A) da MOF VCuBTC antes da incorporação do fármaco foi possível verificar que as partículas apresentavam uma superfície lisa, e que após a incorporação do 5-Fu (Figura 37 (B)) a superfície apresenta alterações, perdendo a sua característica lisa, mas mantendo a sua morfologia de bastão. A imagem 37 (C) apresenta o material VHKUST antes da incorporação do fármaco onde foi possível verificar que as partículas apresentavam uma superfície lisa e

octaédrica, entretanto, após a incorporação do 5-Fu (Figura 37 (D)) a superfície apresenta alterações, perdendo a sua morfologia octaédrica.

5.13. Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade é uma medida importante para avaliar o impacto do material na administração de medicamentos. O efeito citotóxico gerado pelas MOFs foi avaliado inicialmente na linhagem celular HDFa. A linhagem celular foi submetida ao tratamento com as redes metal-orgânicas VHKUST e VCuBTC. Este procedimento teve como objetivo avaliar a influência da morfologia octaédrica encontrada em VHKUST e da morfologia de bastões encontrada em VCuBTC na citotoxicidade. A Figura 38 apresenta a fotografia da placa de 96 poços com o tratamento de MTT (A) e após a retirada do tratamento de MTT (B)

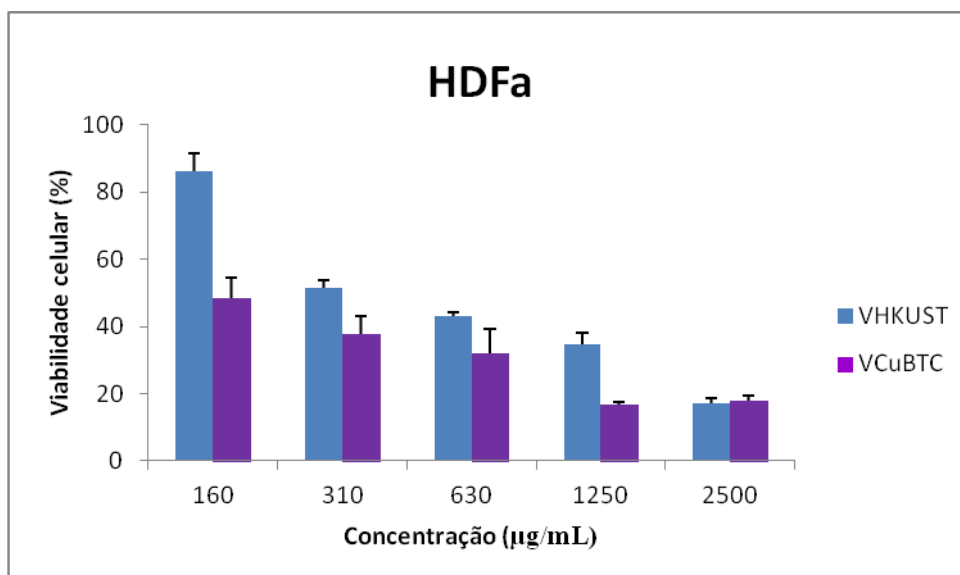
Figura 38: Placa de 96 poços com o tratamento de MTT (A) e após a retirada do tratamento de MTT (B)



Fonte: Autor

A Figura 39 apresenta os resultados de viabilidade celular via ensaio colorimétrico por MTT obtidos para a MOF VHKUST e para a MOF VCuBTC.

Figura 39: Viabilidade celular via ensaio colorimétrico para avaliação de citotoxicidade MTT das MOFs VCuBTC e da MOF VHKUST frente a linhagem celular HDFa



Fonte: Autor

Os resultados apresentados na Figura 39 mostraram que todas as MOFs avaliadas causaram uma redução na viabilidade celular. A Tabela 2 apresenta os resultados com o desvio padrão das principais diferenças encontradas.

Tabela 2: Resultados de viabilidade celular para a célula HDFa

160 µg/mL	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST	85% ± 6,00	15%
VCuBTC	50% ± 5,40	50%

2500 µg/mL	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST	17% ± 1,64	83%
VCuBTC	18% ± 1,49	82%

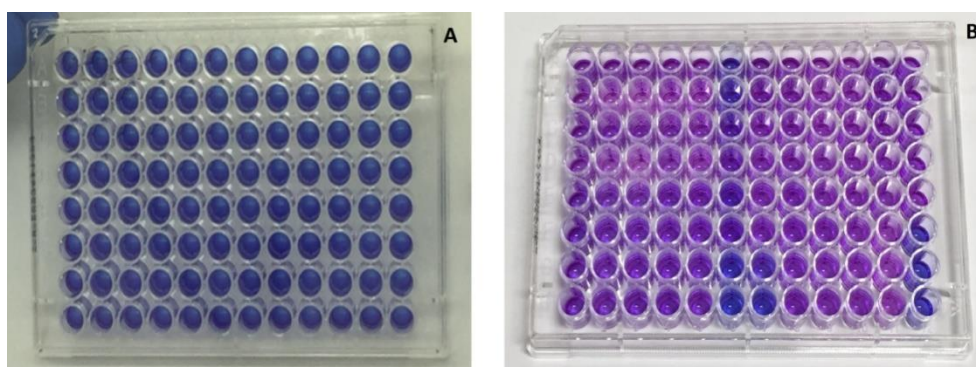
Fonte: Autor

A partir dos dados descritos na Tabela 2 podemos afirmar que na menor concentração estudada (160 $\mu\text{g/mL}$) a MOF VCuBTC apresentou uma maior citotoxicidade para a célula HDFa comparada ao MOF VHKUST.

As MOFs sintetizadas nesse estudo podem ser administradas em diferentes vias, dentre elas a via de administração cutânea. Dessa forma, foi realizado um segundo teste de viabilidade celular via ensaio colorimétrico de Alamar blue® com o objetivo de avaliar o efeito na viabilidade celular da linhagem não-tumoral HaCat e tumoral A-375 para a MOF VCuBTC após ativação, VCuBTC após incorporação de 5-FU, VHKUST após ativação, e VHKUST após incorporação de 5-FU. O ensaio de Alamar blue® foi utilizado para garantir a confiabilidade do resultado uma vez que o material utilizado apresenta uma coloração azul, coloração que poderia ter afetado os resultados obtidos pelo teste de MTT.

A Figura 40 (A) apresenta a fotografia da placa de 96 poços após o tratamento com as MOFs e a aplicação da resazurina, a Figura 40 (B) a fotografia da placa de 96 poços após a redução da resazurina sendo possível visualizar a diferenciação na coloração dos poços.

Figura 40: Fotografia da placa de 96 poços após o tratamento com a resazurina (A) e (B) após a redução da resazurina

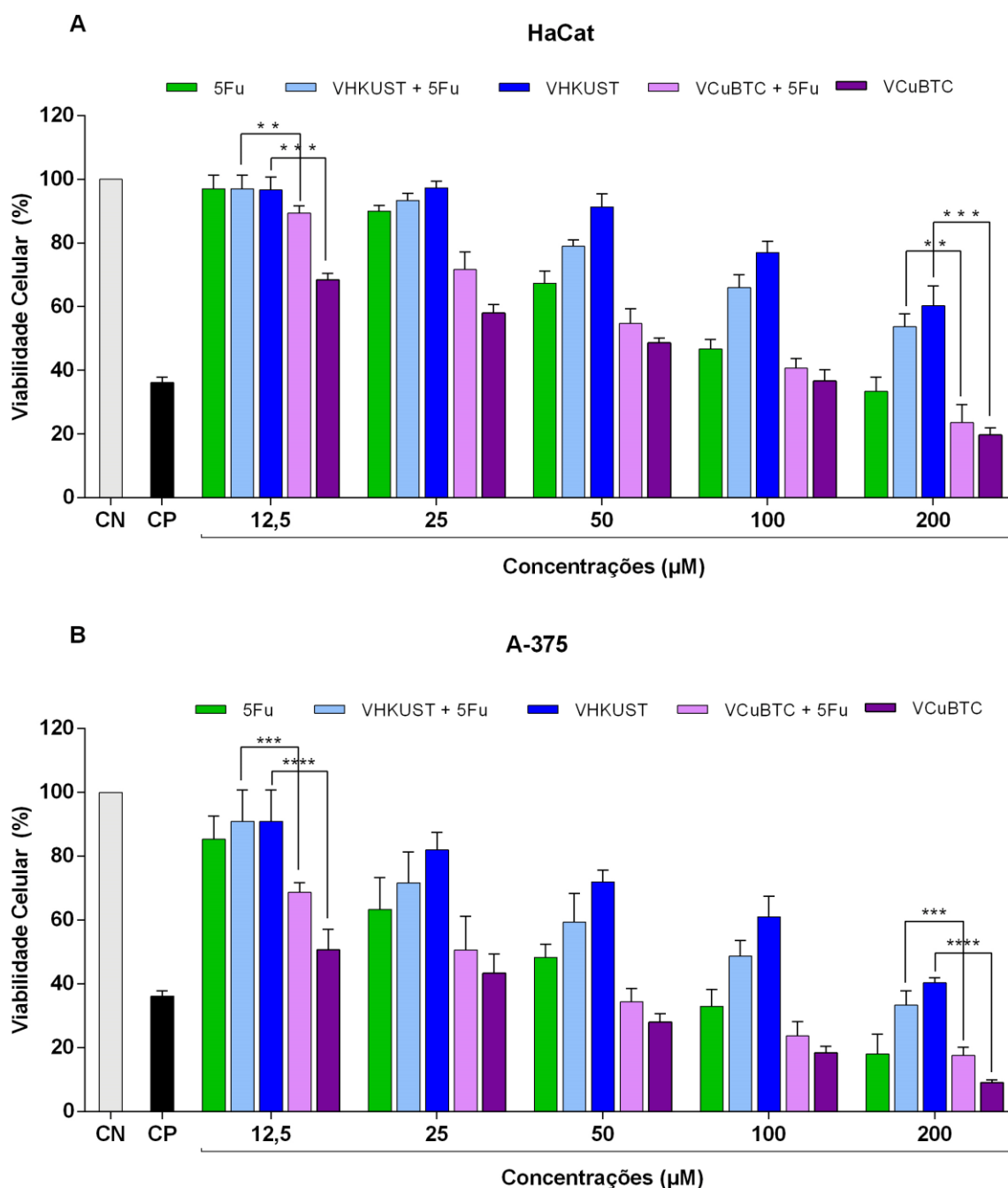


Fonte: Autor

A Figura 41 apresenta o gráfico dos resultados dos valores obtidos na leitura da fluorescência da viabilidade da célula HaCaT (A) e A-375 (B), os quais indicam a porcentagem de células viáveis após o tratamento por 24 horas com

diferentes concentrações (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M e 12,5 μ M) das MOFs e do fármaco 5-Fu.

Figura 41: Gráfico da viabilidade celular (%) das células HaCat (A) e A-375 (B), após o tratamento de 24 horas com 5-Fu, VHKUST+5-Fu, VHKUST, VCuBTC+5-Fu e VCuBTC. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. **** Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).

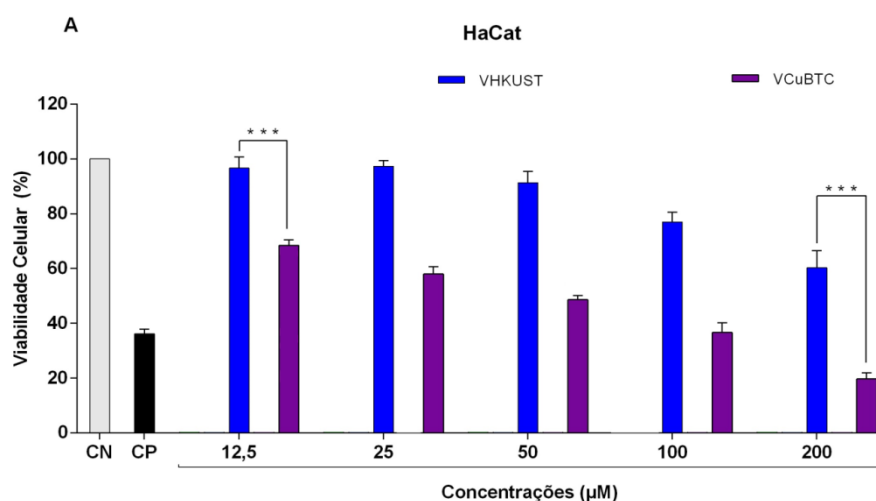


Fonte: Autor

Os resultados apresentados na Figura 41 (A) e (B) mostraram que todas as MOFs avaliadas causaram uma redução na viabilidade celular.

A Figura 42 apresenta os dados somente da MOF VHKUST e VCuBTC para a célula HaCat e a Tabela 3 apresenta os resultados com o desvio padrão das principais diferenças encontradas.

Figura 42: Gráfico da viabilidade celular (%) das células HaCat (A) após o tratamento de 24 horas com VHKUST e VCuBTC. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. ** Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).**



Fonte: Autor

Tabela 3: Resultados de viabilidade celular para a célula HaCat frente a VHKUST e VCuBTC

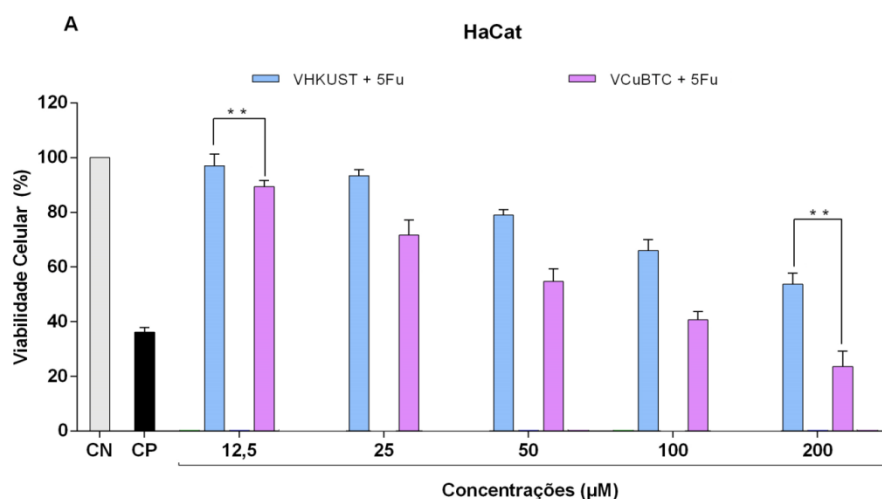
12,5 µM	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST	97% $\pm$ 4,0	3%
VCuBTC	68% $\pm$ 2,0	32%

200 µM	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST	60 $\pm$ 6,1	40%
VCuBTC	20% $\pm$ 2,3	80%

Fonte: Autor

A Figura 43 apresenta os dados somente da MOF VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu para a célula HaCat e a Tabela 4 apresenta os resultados com o desvio padrão das principais diferenças encontradas.

Figura 43: Gráfico da viabilidade celular (%) das células HaCat (A) após o tratamento de 24 horas com VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. ** Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

Tabela 4 Resultados de viabilidade celular para a célula HaCat frente a VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu

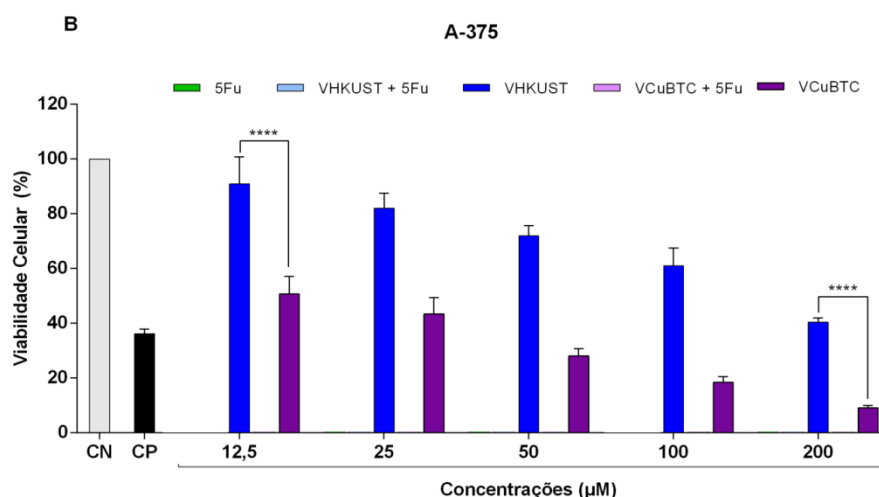
12,5 µM	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST+5-Fu	97% $\pm$ 4,4	3%
VCuBTC+5-Fu	89% $\pm$ 2,3	11%

200 µM	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST+5-Fu	54 $\pm$ 4,0	46%
VCuBTC+5-Fu	24% $\pm$ 5,5	76%

Fonte: Autor

A Figura 44 apresenta os dados somente da MOF VHKUST e VCuBTC para a célula A-375 e a Tabela 5 apresenta os resultados com o desvio padrão das principais diferenças encontradas.

Figura 44: Gráfico da viabilidade celular (%) das células A-375 (B) após o tratamento de 24 horas com VHKUST e VCuBTC. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. ** Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).**



Fonte: Autor

Tabela 5: Resultados de viabilidade celular para a célula A-375 frente a VHKUST e VCuBTC

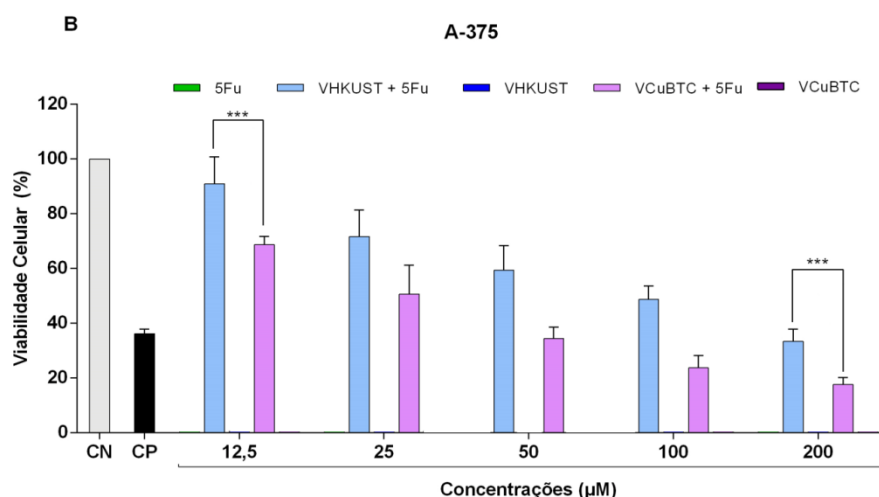
12,50 µM	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST	91 ± 9,8	9%
VCuBTC	51% ± 6,4	49%

200 µM	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST	40 ± 1,5	60%
VCuBTC	9% ± 1,0	91%

Fonte: Autor

A Figura 45 apresenta os dados somente da MOF VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu para a célula A-375 e a Tabela 6 apresenta os resultados com o desvio padrão das principais diferenças encontradas.

Figura 45: Gráfico da viabilidade celular (%) das células A-375 (B) após o tratamento de 24 horas com VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * Significativamente diferente (Teste t de Student, $p < 0,05$).**



Fonte: Autor

Tabela 6: Resultados de viabilidade celular para a célula A-375 frente a VHKUST+5Fu e VCuBTC+5Fu

12,50 µM	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST+5-Fu	91 $\pm$ 9,8	9%
VCuBTC+5-Fu	69% $\pm$ 3,0	31%

200 µM	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST+5-Fu	33 $\pm$ 4,5	67%
VCuBTC+5-Fu	18 $\pm$ 2,5	82%

Fonte: Autor

Finalmente, a Tabela 7 apresenta um comparativos entres os resultados encontrados para a célula HaCat e para a célula A-375 na concentração usual para o tratamento de câncer de pele (100 μ M), demonstrando que a viabilidade celular é menor para células tumorais quando comparado a células não tumorais, ou seja, a MOF causa uma maior morte celular para as células tumorais.

Tabela 7: Comparativo da citotoxicidade apresentada pelo material em células não tumorais (HaCat) e células tumorais (A-375) na concentração usual para tratamento de câncer de pele.

HaCat			A-375		
100 μ M	Viabilidade celular	Morte celular	100 μ M	Viabilidade celular	Morte celular
VHKUST	77% $\pm$ 3,6	23%	VHKUST	61% $\pm$ 6,5	39%
VCuBTC	37% $\pm$ 3,5	62%	VCuBTC	18% $\pm$ 2,0	82%
VHKUST+5-Fu	66% $\pm$ 3,5	24%	VHKUST+5-Fu	49% $\pm$ 5,8	51%
VCuBTC+5-Fu	41% $\pm$ 3,3	53%	VCuBTC+5-Fu	24% $\pm$ 3,5	76%
5-Fu	47% $\pm$ 2,0	53%	5-Fu	33% $\pm$ 3,0	67%

Fonte: Autor

Os efeitos da citotoxicidade encontrados nos nossos estudos corroboram com os descritos por Zhang e colaboradores (14) no qual os autores descrevem que as células alimentadas com partículas de PLGA-PEG em forma de alongadas foram capazes de induzir citotoxicidade significativa nas linhas celulares estudadas.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram, que o material VCuBTC em forma de fios é consideravelmente mais tóxico para as células HDFa, HaCaT e A-375, quando comparado com a MOF VHKUST. Uma segunda observação é que ambas as MOFs apresentaram uma mesma faixa de incorporação de fármaco 5-Fu, ou seja, durante o teste de citotoxicidade a mesma quantidade de fármaco estava incorporada à matriz cristalina.

Finalmente, podemos dizer que a citotoxicidade apresentada pelo material é mais dependente da forma cristalina do que dos seus componentes, uma vez

que as duas MOFs avaliadas apresentaram a mesma composição química, estruturas cristalinas semelhantes e incorporação de 5-Fu semelhantes.

6. CONCLUSÕES

A síntese das redes metalo-orgânicas realizadas nesse trabalho, a base de ácido trimésico e íons de cobre (II) com crescimento em substrato, apresentaram morfologia de bastões confirmando a eficiência do método de trabalho.

A microscopia eletrônica de varredura das MOFs permitiu a visualização de diferentes formas geométricas e as análises dos difratogramas de raios-X comprovaram a cristalinidade do material e a sua semelhança com a MOF padrão HKUST-1.

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho revelou que as MOFs submetidas ao processo de incorporação de fármacos apresentaram bandas características do fármaco modelo 5-Fu, sugerindo que o mesmo foi incorporado nos cristais.

A MOF VCuBTC submetidas a testes colorimétricos de citotoxicidade apresentaram uma citotoxicidade maior para as células HDFa, HaCat e A-375 em comparação com a MOF VHKUST, o que evidencia a relação da morfologia da MOF com a sua citotoxicidade.

Além disso, a MOF desenvolvida foi capaz de incorporar o fármaco modelo 5-Fu, sendo assim um material promissor para o carregamento de fármaco.

7. REFERÊNCIAS

1. Long JR, Yaghi OM. The pervasive chemistry of metal–organic frameworks. *Chem Soc Rev*. 2009;38(5):1213.
2. Drout RJ, Robison L, Farha OK. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal–organic frameworks. *Coord Chem Rev* [Internet]. 2019;381:151–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.11.009>
3. Choi KM, Jeong HM, Park JH, Zhang YB, Kang JK, Yaghi OM. Supercapacitors of nanocrystalline metal-organic frameworks. *ACS Nano*. 2014;8(7):7451–7.
4. Deng K, Hou Z, Li X, Li C, Zhang Y, Deng X, et al. Aptamer-mediated up-conversion core/MOF shell nanocomposites for targeted drug delivery and cell imaging. *Sci Rep*. 2015;5:1–7.
5. Horcajada P, Chalati T, Serre C, Gillet B, Sebrie C, Baati T, et al. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nat Mater* [Internet]. 2010;9(2):172–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2608>
6. Hosseini MS, Zeinali S, Sheikhi MH. Fabrication of capacitive sensor based on Cu-BTC (MOF-199) nanoporous film for detection of ethanol and methanol vapors. *Sensors Actuators, B Chem* [Internet]. 2016;230:9–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.008>
7. Faustini M, Nicole L, Ruiz-Hitzky E, Sanchez C. History of Organic–Inorganic Hybrid Materials: Prehistory, Art, Science, and Advanced Applications. *Adv Funct Mater*. 2018;28(27):1–30.
8. Tomic EA. Thermal Stability of Coordination Polymers. *J Appl Polym Sci*. 1965;9:3745–52.
9. Li H, Moler DB, O’Keeffe M, Yaghi OM, Chen B, Reineke TM, et al. Modular Chemistry: Secondary Building Units as a Basis for the Design of Highly Porous and Robust Metal–Organic Carboxylate Frameworks. *Acc Chem Res*. 2002;34(4):319–30.
10. Lu W, Wei Z, Gu ZY, Liu TF, Park J, Park J, et al. Tuning the structure and function of metal-organic frameworks via linker design. *Chem Soc Rev*. 2014;43(16):5561–93.
11. Zou Z, Wang S, Jia J, Xu F, Long Z, Hou X. Ultrasensitive determination of inorganic arsenic by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry using Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles for preconcentration. *Microchem J* [Internet]. 2016;124:578–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.10.005>
12. Nadar SS, Rathod VK. Magnetic-metal organic framework (magnetic-MOF): A novel platform for enzyme immobilization and nanozyme applications. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;120:2293–302. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.126>
13. Wang Y, Yang J, Liu YY, Ma JF. Controllable syntheses of porous metal-organic frameworks: Encapsulation of Ln(III) cations for tunable luminescence and small drug molecules for efficient delivery. *Chem - A Eur J*. 2013;19(43):14591–9.

14. Zhang B, Sai Lung P, Zhao S, Chu Z, Chrzanowski W, Li Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07588-9>
15. Chowdhury MA. Metal-organic-frameworks for biomedical applications in drug delivery, and as MRI contrast agents. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2017;105(4):1184–94.
16. Smaldone RA, Forgan RS, Furukawa H, Gassensmith JJ, Slawin AMZ, Yaghi OM, et al. Metalorganic frameworks from edible natural products. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010;49(46):8630–4.
17. Abuçafy MP, Caetano BL, Chiari-Andréo BG, Fonseca-Santos B, do Santos AM, Chorilli M, et al. Supramolecular cyclodextrin-based metal-organic frameworks as efficient carrier for anti-inflammatory drugs. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2018;127(February):112–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.009>
18. Breck DW, Eversole WG, Milton RM, Reed TB, Thomas TL. Physical and Inorganic Chemistry: Crystalline Zeolites. I. The Properties of a New Synthetic Zeolite, Type A. *J Am Chem Soc*. 1956;78(23):5963–72.
19. Wells AF. The geometrical basis of crystal chemistry. Part 2. *Acta Crystallogr* [Internet]. 1954;7(8):545–54. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0365110X54001831>
20. Yaghi OM, Li H. Hydrothermal Synthesis of a Metal-Organic Framework Containing Large Rectangular Channels. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1995;117(41):10401–2. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00146a033>
21. Chui SS, Lo SM, Charmant JPH, Orpen AG, Williams ID. REPORTS A Chemically Functionalizable Nanoporous Material. *Science* (80-). 1999;283(February):1148–51.
22. Li H, Yaghi OM, O’Keeffe M, Eddaoudi M. Design and synthesis of an exceptionally stable and highly porous metal-organic framework. *Nature*. 1999;402(November):276–9.
23. Taddei M, Dau P V., Cohen SM, Ranocchiari M, Van Bokhoven JA, Costantino F, et al. Efficient microwave assisted synthesis of metal-organic framework UiO-66: Optimization and scale up. *Dalt Trans*. 2015;44(31):14019–26.
24. Islamoglu T, Goswami S, Li Z, Howarth AJ, Farha OK, Hupp JT. Postsynthetic Tuning of Metal-Organic Frameworks for Targeted Applications. *Acc Chem Res*. 2017;50(4):805–13.
25. Simon-Yarza T, Giménez-Marqués M, Mrimi R, Mielcarek A, Gref R, Horcajada P, et al. A Smart Metal–Organic Framework Nanomaterial for Lung Targeting. *Angew Chemie - Int Ed*. 2017;56(49):15565–9.
26. Batten SR, Champness NR, Chen XM, Garcia-Martinez J, Kitagawa S, Öhrström L, et al. Coordination polymers, metal-organic frameworks and the need for terminology guidelines. *CrystEngComm*. 2012;14(9):3001–4.
27. Zhuang JL, Ceglarek D, Pethuraj S, Terfort A. Rapid room-temperature synthesis of metal-organic framework HKUST-1 crystals in bulk and as oriented and patterned thin films. *Adv Funct Mater*. 2011;21(8):1442–7.
28. Gomar M, Yeganegi S. Adsorption of 5-fluorouracil, hydroxyurea and

- mercaptapurine drugs on zeolitic imidazolate frameworks (ZIF-7, ZIF-8 and ZIF-9). *Microporous Mesoporous Mater* [Internet]. 2017;252:167–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.06.010>
29. Basolite® [Internet]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=basolite&interface=All&N=0&mode=match partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product>
 30. Kitagawa S, Kitaura R, Noro SI. Functional porous coordination polymers. *Angew Chemie - Int Ed*. 2004;43(18):2334–75.
 31. Gao WY, Chen Y, Niu Y, Williams K, Cash L, Perez PJ, et al. Crystal engineering of an nbo topology metal-organic framework for chemical fixation of CO₂ under ambient conditions. *Angew Chemie - Int Ed*. 2014;53(10):2615–9.
 32. Vagin SI, Ott AK, Rieger B. Paddle-wheel zinc carboxylate clusters as building units for metal-organic frameworks. *Chemie-Ingenieur-Technik*. 2007;79(6):767–80.
 33. Liu J, Thallapally PK, McGrail BP, Brown DR, Liu J. Progress in adsorption-based CO₂ capture by metal-organic frameworks. *Chem Soc Rev*. 2012;41(6):2308–22.
 34. Guillerm V, Kim D, Eubank JF, Luebke R, Liu X, Adil K, et al. A supermolecular building approach for the design and construction of metal-organic frameworks. *Chem Soc Rev*. 2014;43(16):6141–72.
 35. Kojtari A, Ji HF. Metal organic framework micro/nanopillars of Cu(BTC)·3H₂O and Zn(ADC)·DMSO. *Nanomaterials*. 2015;5(2):565–76.
 36. Stock N, Biswas S. Synthesis of Metal-Organic Frameworks (MOFs): Routes to Various MOF Topologies, Morphologies, and Composites. *Chem Rev* [Internet]. 2012;112(2):933–69. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr200304e>
 37. He M, Yao J, Liu Q, Wang K, Chen F, Wang H. Facile synthesis of zeolitic imidazolate framework-8 from a concentrated aqueous solution. *Microporous Mesoporous Mater* [Internet]. 2014;184:55–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.10.003>
 38. Li ZQ, Qiu LG, Xu T, Wu Y, Wang W, Wu ZY, et al. Ultrasonic synthesis of the microporous metal-organic framework Cu₃(BTC)₂ at ambient temperature and pressure: An efficient and environmentally friendly method. *Mater Lett* [Internet]. 2009;63(1):78–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2008.09.010>
 39. Carné-Sánchez A, Imaz I, Cano-Sarabia M, Maspoch D. A spray-drying strategy for synthesis of nanoscale metal–organic frameworks and their assembly into hollow superstructures. *Nat Chem* [Internet]. 2013 Mar 10;5(3):203–11. Available from: <http://www.nature.com/articles/nchem.1569>
 40. Van Assche TRC, Desmet G, Ameloot R, De Vos DE, Terryn H, Denayer JFM. Electrochemical synthesis of thin HKUST-1 layers on copper mesh. *Microporous Mesoporous Mater* [Internet]. 2012;158:209–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.03.029>
 41. Garcia Marquez A, Horcajada P, Grosso D, Ferey G, Serre C, Sanchez C, et al. Green scalable aerosol synthesis of porous metal-organic frameworks. *Chem Commun*. 2013;49(37):3848–50.
 42. Mondloch JE, Karagiari O, Farha OK, Hupp JT. Activation of metal-organic

- framework materials. *CrystEngComm*. 2013;15(45):9258–64.
43. Kim HK, Yun WS, Kim MB, Kim JY, Bae YS, Lee JD, et al. A Chemical Route to Activation of Open Metal Sites in the Copper-Based Metal-Organic Framework Materials HKUST-1 and Cu-MOF-2. *J Am Chem Soc*. 2015;137(31):10009–15.
 44. Liu B, Wong-Foy AG, Matzger AJ. Rapid and enhanced activation of microporous coordination polymers by flowing supercritical CO₂. *Chem Commun*. 2013;49(14):1419–21.
 45. Li B, Zhang Y, Ma D, Li L, Li G, Li G, et al. A strategy toward constructing a bifunctionalized MOF catalyst: Post-synthetic modification of MOFs on organic ligands and coordinatively unsaturated metal sites. *Chem Commun*. 2012;48(49):6151–3.
 46. Lee J, Farha OK, Roberts J, Scheidt KA, Nguyen ST, Hupp JT. Metal-organic framework materials as catalysts. *Chem Soc Rev*. 2009;38(5):1450–9.
 47. Keffe O. Texte intégral Systematic Design of Pore Size and Functionality in Isorecticular MOFs and Their Application in Methane Storage Ovid: Systematic Design of Pore Size and Functionality in Isorecticular ... 2010;295(iii):3–8.
 48. R. Banerjee, A. Phan, B. Wang, C. Knobler, H. Furukawa, M. O’Keeffe OMY, Banerjee R, Phan A, Wang B, Knobler C, Furukawa H, et al. High-Throughput Synthesis of Zeolitic. *Science* (80-). 2008;319(February):939–43.
 49. Rieter WJ, Taylor KML, An H, Lin W, Lin W. Nanoscale metal-organic frameworks as potential multimodal contrast enhancing agents. *J Am Chem Soc*. 2006;128(28):9024–5.
 50. Horcajada P, Serre C, Vallet-Regí M, Sebban M, Taulelle F, Férey G. Metal-organic frameworks as efficient materials for drug delivery. *Angew Chemie - Int Ed*. 2006;45(36):5974–8.
 51. Lian X, Huang Y, Zhu Y, Fang Y, Zhao R, Joseph E, et al. Enzyme-MOF Nanoreactor Activates Nontoxic Paracetamol for Cancer Therapy. *Angew Chemie - Int Ed*. 2018;57(20):5725–30.
 52. McGuire C V., Forgan RS. The surface chemistry of metal-organic frameworks. *Chem Commun [Internet]*. 2015;51(25):5199–217. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4CC04458D>
 53. Farha OK, Hupp JT. Rational design, synthesis, purification, and activation of Metal - Organic Framework Materials. 2010;
 54. Kojtari A, Carroll PJ, Ji HF. Metal organic framework (MOF) micro/nanopillars. *CrystEngComm*. 2014;16(14):2885–8.
 55. Shekhah O, Liu J, Fischer RA, Wöll C. MOF thin films: Existing and future applications. *Chem Soc Rev*. 2011;40(2):1081–106.
 56. Nan J, Dong X, Wang W, Jin W, Xu N. Step-by-step seeding procedure for preparing HKUST-1 membrane on porous α -alumina support. *Langmuir*. 2011;27(8):4309–12.
 57. Meek ST, Greathouse JA, Allendorf MD. Metal-organic frameworks: A rapidly growing class of versatile nanoporous materials. *Adv Mater*. 2011;23(2):249–67.
 58. Wu D, Guo X, Sun H, Navrotsky A. Thermodynamics of Methane Adsorption on Copper HKUST-1 at Low Pressure. *J Phys Chem Lett*. 2015;6(13):2439–

- 43.
59. Ke F, Yuan YP, Qiu LG, Shen YH, Xie AJ, Zhu JF, et al. Facile fabrication of magnetic metal-organic framework nanocomposites for potential targeted drug delivery. *J Mater Chem*. 2011;21(11):3843–8.
60. Hall JN, Bollini P. Structure, characterization, and catalytic properties of open-metal sites in metal organic frameworks. *React Chem Eng*. 2019;4(2):207–22.
61. Mueller U, Schubert M, Teich F, Puetter H, Schierle-Arndt K, Pastré J. Metal-organic frameworks - Prospective industrial applications. *J Mater Chem*. 2006;16(7):626–36.
62. Bordiga S, Bonino F, Lillerud KP, Lamberti C. X-ray absorption spectroscopies: Useful tools to understand metallorganic frameworks structure and reactivity. *Chem Soc Rev*. 2010;39(12):4885–927.
63. Allen TM, Cullis PR. Drug Delivery Systems : Entering the Mainstream Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Drug Discov*. 2014;303(March):1818–23.
64. Kostarelos K. Rational design and engineering of delivery systems for therapeutics: biomedical exercises in colloid and surface science. *Adv Colloid Interface Sci*. 2003;106(1–3):147–68.
65. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2007;3(1):20–31.
66. Allen JR L, Popovich N, Ansel H. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos - 9. Artmed Editora; 2013.
67. Férey, G, C.Mellot-Draznieks, C.Serre, F.Millange, J.Dutour, S.Suble IM. A Chromium Terephthalate – Based Solid with Unusually Large Pore Volumes and Surface Area. 2013;2040(2005).
68. Horcajada P, Serre C, Maurin G, Ramsahye N a, Balas F, Vallet-Regí M, et al. Flexible Porous Metal-Organic Frameworks for a Controlled Drug Delivery. *J Am Chem Soc [Internet]*. 2008;130(21):6774–80. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja710973k>
69. Horcajada P, Horcajada P, Serre C, Serre C, Maurin G, Maurin G, et al. Flexible Porous Metal-Organic Frameworks for a Controlled Drug Delivery. *J Am Chem Soc [Internet]*. 2008;130(21):6774–80. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja710973k>
70. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat Rev Cancer [Internet]*. 2003;3(5):330–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724731>
71. Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(3):447–64.
72. Lucena FRS, de Araújo LCC, Rodrigues M do D, da Silva TG, Pereira VRA, Militão GCG, et al. Induction of cancer cell death by apoptosis and slow release of 5-fluoracil from metal-organic frameworks Cu-BTC. *Biomed Pharmacother*. 2013;67(8):707–13.
73. Dietze W, Doering E, Schulz M, Glasow P, Langheinrich W, Ludsteck A, et al. Technology of Si, Ge, and SiC / Technologie Von Si, Ge und SiC. Springer Berlin Heidelberg; 1983.
74. Bruggisser R, Von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H.

- Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 2002;68(5):445–8.
75. Zhang Y, Wu L-J, Tashiro S-I, Onodera S, Ikejima T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2004;25(1):83–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704127>
 76. Page B, Page M, Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int J Oncol.* 1993;3(3):473–6.
 77. De Grandis RA, de Camargo MS, da Silva MM, Lopes ÉO, Padilha EC, Resende FA, et al. Human topoisomerase inhibition and DNA/BSA binding of Ru(II)–SCAR complexes as potential anticancer candidates for oral application. *BioMetals.* 2017;30(3):321–34.
 78. Lin KS, Adhikari AK, Ku CN, Chiang CL, Kuo H. Synthesis and characterization of porous HKUST-1 metal organic frameworks for hydrogen storage. *Int J Hydrogen Energy* [Internet]. 2012;37(18):13865–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.105>
 79. Lin S, Song Z, Che G, Ren A, Li P, Liu C, et al. Adsorption behavior of metal-organic frameworks for methylene blue from aqueous solution. *Microporous Mesoporous Mater* [Internet]. 2014;193:27–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2014.03.004>
 80. Song G, Wang Z, Wang L, Li G, Huang M, Yin F. Preparation of MOF(Fe) and its catalytic activity for oxygen reduction reaction in an alkaline electrolyte. *Chinese J Catal* [Internet]. 2014;35(2):185–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872206712607293>
 81. Mahalakshmi G, Balachandran V. FT-IR and FT-Raman spectra, normal coordinate analysis and ab initio computations of Trimesic acid. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2014;124:535–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.01.061>
 82. Shekunov BY, Chattopadhyay P, Tong HHY, Chow AHL. *Expert Review Particle Size Analysis in Pharmaceuticals: Principles, Methods and Applications.* 2007;24(2).
 83. Pung S-Y, Lee W-P, Aziz A. Kinetic Study of Organic Dye Degradation Using ZnO Particles with Different Morphologies as a Photocatalyst. *Int J Inorg Chem.* 2012;2012:1–9.
 84. Stavila V, Volponi J, Katzenmeyer AM, Dixon MC, Allendorf MD. Kinetics and mechanism of metal-organic framework thin film growth: Systematic investigation of HKUST-1 deposition on QCM electrodes. *Chem Sci.* 2012;3(5):1531–40.
 85. Li Y, Li X, Guan Q, Zhang C, Xu T, Dong Y, et al. Strategy for chemotherapeutic delivery using a nanosized porous metal-organic framework with a central composite design. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:1465–74.