

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO DE REDES METALO-ORGÂNICAS A BASE DE
CICLODEXTRINA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO

Marina Paiva Abuçafy

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

COORIENTADOR: Dr. Bruno Leonardo Caetano

ARARAQUARA - SP

2016

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

DESENVOLVIMENTO DE REDES METALO-ORGÂNICAS A BASE DE
CICLODEXTRINA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO

MARINA PAIVA ABUÇAFY

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, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

COORIENTADOR: Dr. Bruno Leonardo Caetano

ARARAQUARA - SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A165d Abuçafy, Marina Paiva
Desenvolvimento de redes metalo-orgânicas a base de ciclodextrina para liberação controlada de fármaco / Marina Paiva Abuçafy. – Araraquara, 2016.
91 f.

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.

Orientador: Leila Aparecida Chiavacci.
Coorientador: Bruno Leonardo Caetano.

1. Rede metalo-orgânica. 2. Ciclodextrina. 3. Liberação controlada de fármaco. I. Chiavacci,
Leila Aparecida, orient. II. Caetano, Bruno Leonardo, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

MARINA PAIVA ABUÇAFY

**Desenvolvimento e caracterização de Redes Metaló-Orgânicas a base de
Ciclodextrina para liberação controlada de fármaco**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista –
UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Araraquara, 30 de maio de 2016

BANCA EXAMINADORA



Profa Dra. LEILA AP CHIAVACCI FAVORIN



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI



Prof. Dr. LEO RICARDO BEDORE DOS SANTOS

Dedicatória

Aos meus pais, Roberto e Eliana, por todo apoio, amor, conforto e sempre me incentivarem a buscar meus sonhos, acreditando em mim. Ao meu irmão Daniel, por todo companheirismo e incentivo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar e me confortar nos momentos de dificuldade.

A minha família, especialmente meus pais, Roberto e Eliana, e meu irmão Daniel, pelo incentivo e força de todos os dias.

A minha orientadora Prof. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin pelo conhecimento transmitido, paciência, dedicação, amizade e confiança durante o período desse trabalho.

Ao meu co-orientador e amigo Bruno Leonardo Caetano, por todo apoio em momentos de inseguranças, pela amizade, pelo conhecimento transmitido e pela ajuda na correção desta dissertação.

Aos amigos do laboratório Ciências dos Materiais Aplicados a Farmácia (CMAF), por toda força, companheirismo e incentivo durante a rotina de trabalho e conversas fora dele, Bruna Lallo, Mariluci, Bruna Chiari, João, Mariana, Nathália, Neima e Ariane, e a Aline que sempre me acompanhou com muita dedicação. A minha amiga Eloisa, por toda amizade, paciência, compreensão e por estar ao meu lado durante o período de estágio no exterior, me ensinando tudo e deixando essa experiência ainda mais incrível.

A minha supervisora do estágio realizado na Universidade de Paris Sul na França, Ruxandra Gref, pela oportunidade, por todo carinho durante a recepção e período de permanência no laboratório e por todo conhecimento transmitido.

Ao laboratório de Farmacotécnica e Controle de Qualidade, em especial aos professores Marlus Chorilli e Virgínia Scarpa pela colaboração com materiais. Ao Instituto de Química da UNESP/Araraquara, em especial aos professores Celso V. Santilli e Sandra Helena Pulcinelli, pelo espaço cedido no laboratório para a realização desse trabalho e permissão da utilização de equipamentos para caracterização dos materiais e pelos funcionários Danúbia e Ricardo.

À Seção de Pós-graduação e toda Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

À FAPESP (processo 2014/10888-1), pela ajuda financeira com a bolsa de mestrado, BEPE (processo 2015/01199-0) e a reserva técnica.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta dissertação, meu agradecimento.

Lista de Abreviaturas

BET: Branauer- Emmett- Teller

CSD: Cambridge structure data base (banco de dados estrutural de Cambridge)

DRX: Difração de raios X

DSC: Calorimetria diferencial de varredura

DCM: Diclorometano

DCNA: Diclofenaco de sódio

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MOF: Metal- organic framework (redes metalo-orgânicas)

TGA- Análise termogravimétrica

Lista de Figuras

Figura 1: Formação das redes metalo-orgânicas.	16
Figura 2: Número de publicações encontradas com o termo “metal- organic frameworks” (ISI: Web of Science, acessado em 04 de abril de 2016).....	17
Figura 3: Número de publicações encontradas com os termos “metal organic frameworks” e “drug delivery” (ISI: Web of Science, acessado em 04 de abril de 2016)	18
Figura 4: Ligantes orgânicos que são usualmente utilizados na síntese das MOFs.	22
Figura 5: Estrutura da ciclodextrina formada por unidades de glicose (zoom).....	23
Figura 6: Classificação da IUPAC das isotermas de adsorção como tipo I, II, III, IV, V e VI.	28
Figura 7: Esquema de incorporação e liberação de fármaco das MOFs	31
Figura 8: Molécula do diclofenaco	32
Figura 9: Esquema de síntese das redes metalo-orgânicas	37
Figura 10: Esquema do teste de citotoxicidade	42
Figura 11: Micrografia estereoscópica das (a, b) γ - NaCD, (c) γ - KCD e (d) γ - FeCD.	49
Figura 12: Figura representativa do diâmetro de Feret na direção horizontal.....	50
Figura 13: Distribuição de tamanho de partículas das MOFs (A) γ -KCD, (B) γ -NaCD e (C) γ - FeCD.....	51
Figura 14: Curvas termogravimétricas (A) e suas derivadas (B) do α -KCD sintetizadas sob aquecimento e a temperatura ambiente	52
Figura 15: Curvas termogravimétricas (A) e suas derivadas (B) do γ -KCD antes e depois da ativação com DCM.....	53
Figura 16: Curvas termogravimétricas (A) e suas derivadas (B) do γ -NaCD antes e depois da ativação com DCM.....	54
Figura 17: Curvas termogravimétricas (A) e suas derivadas (B) do γ - FeCD antes e depois da ativação com DCM.....	55
Figura 18: Curva de TG (A), suas derivadas (B) e DSC (C) da rede metal orgânica γ -KCD, mistura física entre ciclodextrina e KOH e γ -Ciclodextrina.....	56
Figura 19: Curvas de DSC da ciclodextrina, da mistura física entre ciclodextrina e NaOH (MF NaCD) e da rede metal orgânica a base de ciclodextrina e sódio (NaCD).....	58

Figura 20: Curvas de DSC da ciclodextrina, da mistura física entre ciclodextrina e $\text{Fe}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MF FeCD) e da rede metalo-orgânica a base de ciclodextrina e ferro (FeCD).	59
Figura 21: Difração de Raios X das redes metalo-orgânicas e da γ -ciclodextrina	60
Figura 22: Curvas de SAXS da γ -CD e das MOFs (a) e as mesmas curvas representadas em uma região de q menor (b).....	61
Figura 23: Espectro de infravermelho das amostras γ -KCD, γ -NaCD, γ -FeCD e γ -CD pura	62
Figura 24: Espectro de infravermelho do diclofenaco de sódio	64
Figura 25: Espectro de infravermelho do γ - KCD e γ -KCD após encapsulamento do diclofenaco de sódio	64
Figura 26: Espectro de infravermelho do γ -NaCD e γ -NaCD após encapsulamento do diclofenaco de sódio	65
Figura 27: Espectro de infravermelho do γ -FeCD e γ -FeCD após encapsulamento do diclofenaco de sódio	65
Figura 28: Micrografia obtida por MEV das γ - KCD antes da ativação.	66
Figura 29: Micrografia obtida por MEV das γ - KCD após a ativação com diclorometano.	67
Figura 30: Micrografia obtida por MEV da estrutura cúbica das γ - KCD	67
Figura 31: Micrografia obtida por MEV das γ -NaCD ativadas.....	68
Figura 32: Micrografia obtida por MEV das γ -FeCD ativada.	68
Figura 33: Isoterma de BET da amostra γ -KCD não ativada	70
Figura 35: Isoterma de BET da amostra γ -KCD ativada.....	70
Figura 35: Modelo de isoterma de adsorção física composta.....	72
Figura 36: Avaliação da citotoxicidade promovida pela MOF γ -CD em células HepG2. (*) $P < 0.05$; ANOVA, Tukey.....	74
Figura 37: Avaliação da citotoxicidade promovida pela MOF γ -KCD em células HepG2. (*) $P < 0.05$; ANOVA, Tukey.....	74
Figura 38: Avaliação da citotoxicidade promovida pela MOF γ -NaCD em células HepG2. (*) $P < 0.05$; ANOVA, Tukey.....	75
Figura 39: Avaliação da citotoxicidade promovida pela MOF γ -FeCD em células HepG2. (*) $P < 0.05$; ANOVA, Tukey.....	75
Figura 40: Curva analítica do diclofenaco de sódio em etanol/água obtida por UV-Vis, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).	76

Figura 41: Curva analítica do diclofenaco de sódio em PBS obtida por UV-Vis, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).....	78
Figura 42: Perfis de liberação do diclofenaco de sódio liberada ao longo do tempo para as MOFs γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD.....	79

Lista de tabelas

Tabela 1: Rendimento obtido a partir das sínteses a base de β e γ -ciclodextrina como ligantes orgânicos e potássio, sódio e ferro, como metais.	44
Tabela 2: Medidas de pH das redes metal orgânicas em diferentes meios.....	45
Tabela 3: Valores de condutividade elétrica para os reagentes utilizados na síntese das MOFs e MOFs em meio aquoso e etanólico.	46
Tabela 4: Medida do tamanho de partícula (nm) e o índice de polidispersão (IPD) das redes metal- orgânicas em H ₂ O.....	48
Tabela 5: Tamanho dos poros (Å) de γ -KCD antes e depois da ativação	69
Tabela 6: Eficiência de encapsulação (EE%) obtidas com as formulações γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD contendo diclofenaco de sódio.....	77
Tabela 7: Parâmetros da equação de Peppas para os dados de liberação in vitro das MOFs em PBS	81

Resumo

O avanço no desenvolvimento de novos sistemas carreadores de fármacos tem contribuído na melhoria da qualidade de vida no que diz respeito a diminuir os efeitos colaterais dos fármacos e aumentar a sobrevida dos pacientes. Visando superar as limitações dos carreadores já explorados pela literatura, busca-se desenvolver novos materiais carreadores que apresentem maior capacidade de encapsulamento de fármaco. Entre esses novos materiais existem as redes metalo- orgânicas (MOFs), que são constituídas por ligantes orgânicos e centros metálicos que se unem formando redes cristalinas e altamente porosas. Assim, o foco desse trabalho foi sintetizar e caracterizar as MOFs a base de ciclodextrina, e diferentes metais como potássio (γ -KCD), sódio (γ -NaCD) e ferro (γ -FeCD), além de avaliar a capacidade de liberação de fármaco dessas materiais. As MOFs foram sintetizadas seguindo uma metodologia descrita na literatura, com algumas modificações: a ciclodextrina e o sal de metal foram solubilizados em água e em seguida colocados em difusão em metanol, após a formação dos cristais, os mesmos foram ativados com diclorometano. Os difratogramas de raios- X (DRX) mostraram a cristalinidade do material e a presença de picos característicos das MOFs a base de ciclodextrina, relatado na literatura. As análises térmicas (TG e DSC) confirmam a formação das redes através da ligação entre a ciclodextrina e o metal. As micrografias da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostram que as diferentes geometrias das estruturas formadas, como cúbicas para γ -KCD e γ -NaCD e forma de bastões para γ -FeCD, além de que após a ativação é possível evidenciar a presença de poros. O fármaco modelo, diclofenaco de sódio, foi incorporado nas MOFs, o que foi confirmado através da espectroscopia vibracional no infravermelho (IV), e os resultados mostram que o material apresenta alta eficiência de encapsulação, superior a 60%. Os perfis de liberação obtidos demonstraram um efeito de controle da liberação do fármaco em PBS, sugerindo que a liberação do fármaco ocorre devido à combinação de dois ou mais processos, como a difusão do fármaco e erosão da rede metalo-orgânica. Desta maneira, é possível afirmar que as MOFs desenvolvidas são biocompatíveis, apresentam grande capacidade de encapsular fármaco além de apresentarem comportamento de liberação controlada.

Palavras-chave: Rede metalo-orgânica, Ciclodextrina, Liberação controlada de fármaco.

Abstract

The progress on the development of new biomaterial and carriers systems for drugs has been contributing to improve the quality of life in relation to decrease the collateral effects of drugs and increase the survival of patients. Aiming to overcome the limitations of carriers already explored in the literature, researches wants develop new carriers materials that have enhanced properties, such as higher drug encapsulation capacity. An example of these materials are metal-organic frameworks (MOFs) that are composed by organic ligands and metal centers that combine to form crystalline and highly porous framework. Thus, the aim of this work was synthesized and characterized the MOFs based on cyclodextrin with different metals as potassium (γ -KCD), sodium (γ -NaCD) and iron (γ -FeCD), and analyses the capacity of this materials to application as drug carriers. The MOFs were synthesized via the methodology with modifications: cyclodextrin and metal salt were solubilized in water and then placed in methanol diffusion. After formation of the crystals, they were activated with dichloromethane. The diffraction patterns of X-rays XRD showed the crystallinity and the presence of characteristic peaks of MOFs based on cyclodextrin, reported in literature. The thermal analysis (TG and DSC) confirm the formation of networks by linking the cyclodextrin and the metal, the micrographs of scanning electron microscopy (SEM) show that the formed structures are organized and after activation is possible to demonstrate the presence of pores. The model drug, diclofenac sodium, was incorporated in MOFs, confirmed by infrared vibrational spectroscopy (IR), and the results show that the material has high encapsulation efficiency, higher than 60%. The release profiles obtained showed a controlling effect of drug release in PBS, indicating that drug release is due to a combination of two or more processes, such as diffusion of the drug and erosion of metal-organic framework. Is possible affirm that the developed MOFs are biocompatible, have great ability to encapsulate the drug in addition to having controlled release behavior.

Keywords: Metal-organic network, Cyclodextrin, Drug controlled release.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Redes metalo-orgânicas	20
2.1.1. Estruturas	21
2.1.2. Síntese e ativação.....	24
2.1.3. Técnicas de caracterização	27
2.1.4. Propriedades e aplicações.....	29
2.1.4.1. MOF como sistemas carreadores de fármacos	27
2.2. Diclofenaco de sódio como modelo de fármaco anti-inflamatório.....	29
3. OBJETIVO.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Materiais	35
4.2. Métodos	36
4.2.1. Síntese das redes metalo-orgânicas a base de ciclodextrina.....	36
4.2.2. Medida de pH	38
4.2.3. Condutividade elétrica.....	38
4.2.4. Análise de distribuição de tamanho.....	38
4.2.5. Análise Termogravimétrica e Calorimetria	39
4.2.6. Difração de Raios X (DRX)	39
4.2.7. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	39
4.2.8. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	40
4.2.9. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)	40
4.2.10. Adsorção/ Dessorção de Nitrogênio	40
4.2.11. Avaliação da citotoxicidade.....	37
4.2.12. Eficiência de encapsulação do fármaco nas redes metalo-orgânicas	39
4.2.13. Determinação “in vitro” do perfil de liberação do diclofenaco de sódio	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1. Síntese das redes metalo-orgânicas a base de ciclodextrina.....	44
5.2. Caracterização das redes metalo-orgânicas	45
5.2.1. Medidas de pH.....	45

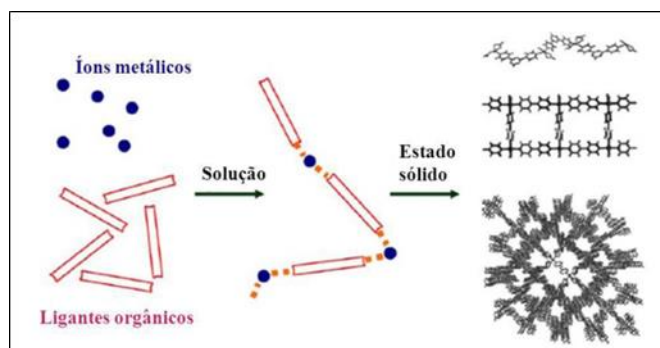
5.2.2.	Condutividade elétrica.....	46
5.2.3.	Análise de distribuição de tamanho.....	48
5.2.4.	Análise Termogravimétrica e Calorimetria.....	52
5.2.5.	Difração de Raios X.....	57
5.2.6.	Espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS).....	57
5.2.7.	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV):.....	61
5.2.8.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	66
5.2.9.	Adsorção de Nitrogênio.....	69
5.2.10.	Avaliação da citotoxicidade.....	70
5.3.	Eficiência de encapsulação.....	76
5.4.	Determinação “in vitro” do perfil de liberação do diclofenaco de sódio.....	76
6.	CONCLUSÃO.....	81
7.	REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

Os materiais porosos têm atraído muito o interesse científico e industrial para diversas aplicações, como armazenamento de gases (BECKNER e DAILLY, 2015; FITZGERALD *et al.*, 2015), catálise seletiva (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2015), transporte de fármacos (TORAD *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2015) e diagnóstico por imagem (DENG *et al.*, 2015).

Uma classe de materiais porosos que vem ganhando destaque são as redes metalo-orgânicas que incluem milhares de estruturas diferentes. Tais materiais são conhecidos como MOFs (do inglês, metal-organic frameworks), que são materiais híbridos, compostos por centros de coordenação, que são os íons metálicos e os agentes ligantes, também chamados de espaçadores, que são os compostos orgânicos. A Figura 1 mostra, através de um esquema, como ocorre a formação das redes metalo-orgânicas.

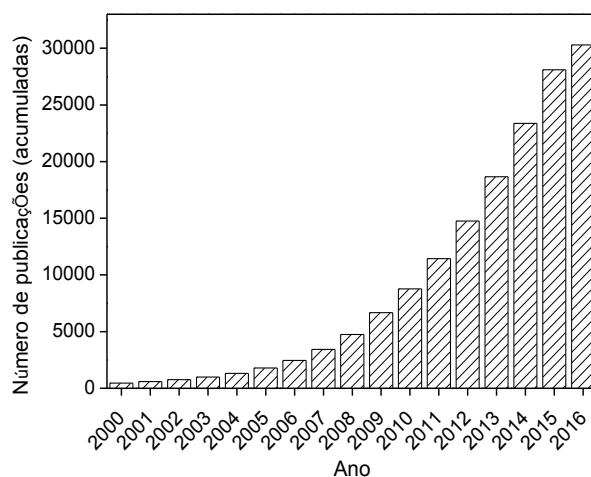
Figura 1: Formação das redes metalo-orgânicas (ROBIN e FROMM, 2006).



Apesar de serem conhecidas desde 1965, as MOFs ganharam maior interesse no final de 1999, quando passaram a ser sintetizadas com base no conceito de design reticular, que pode ser descrito como um processo de montagem de blocos de construção molecular rígida criteriosamente projetada em estruturas ordenadas (redes) (YAGHI *et al.*, 2003). A capacidade de combinar a alta porosidade aliada a grandes áreas superficiais juntamente com a possibilidade de variar os tamanhos dos poros, além das variedades estruturais, torna as

MOFs alternativas promissoras quando comparados aos materiais porosos tradicionais (KESKIN E KIZILEL, 2011), e como consequência, o número de publicações relacionadas com o termo “metal- organic framework” aumentou de forma significativa, como mostra a Figura 2.

Figura 2: Número de publicações encontradas com o termo “metal- organic frameworks” (ISI: Web of Science, acessado em 04 de abril de 2016)



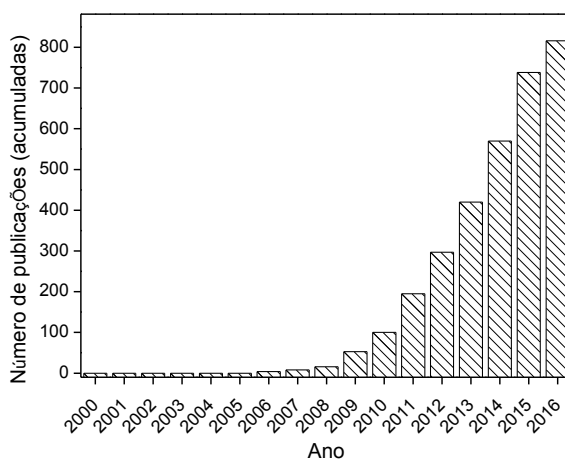
Existem muitos estudos que tem como prioridade a síntese e a caracterização das MOFs (CZAJA *et al.*, 2009; COHEN, 2010; HUXFORD *et al.*, 2010), e que são conduzidos a áreas específicas de armazenamento de gases e catálises (Keskin e Sholl, 2007; Keskin *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). No entanto, algumas propriedades físico-químicas desse material, como a capacidade de modulação dos seus componentes e capacidade de incorporar maior massa de fármaco o torna extremamente promissor na aplicação de transporte de fármacos (KERBELLEC *et al.*, 2008; TAYLOR-PASHOW *et al.*, 2010).

Os transportadores de fármacos devem apresentar alguns requisitos para garantir uma terapia eficiente, e os principais são: capacidade de armazenar eficientemente altas quantidades de fármacos; controle da liberação; controle da degradação da matriz transportadora e proteção da superfície do material carregado. Além desses requisitos, uma nova fase de estudos requer a possibilidade de uso destes materiais como teranósticos, ou seja,

associação de terapias e diagnósticos, e desta maneira, o carreador deve servir tanto como transportador de fármaco quanto como agente de diagnóstico para avaliar a distribuição dos fármacos e a eficiência de tratamento (HORCAJADA *et al.*, 2010).

O número de estudos das MOFs com a finalidade de transporte de fármaco e de uso como diagnóstico de imagem (RIETER *et al.*, 2006; RIETER *et al.*, 2008; TAYLOR *et al.*, 2008; HORCAJADA *et al.*, 2010) está em crescente aumento desde 2006, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3: Número de publicações encontradas com os termos “metal organic frameworks” e “drug delivery” (ISI: Web of Science, acessado em 04 de abril de 2016)



As MOFs apresentam enorme capacidade de transporte de fármaco devido à sua alta porosidade, o que destaca este material dos que já são bem conhecidos na literatura, como lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões e micelas (HORCAJADA *et al.*, 2010).

Com a finalidade de estudar um novo material que seja promissor como carreador de fármaco, este trabalho foi desenvolvido a partir de relatos na literatura sobre a formação de redes metalo-orgânicas a base de ciclodextrina com metais alcalinos e alcalinos terrosos. A partir da metodologia anteriormente desenvolvida, foi possível sintetizar e caracterizar diferentes MOFs, avaliar a citotoxicidade destes materiais e aplica-los na encapsulação e liberação de um fármaco modelo.

Durante o período deste trabalho foi realizado um estágio de pesquisa de dois meses no exterior (BEPE). O estágio foi feito no laboratório ISMO (Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay) da Universidade de Paris Sul, Orsay, França, sob a supervisão de Ruxandra Gref, pesquisadora do CNRS e coordenadora do projeto europeu intitulado “CycloN Hit” que tem como objetivo desenvolver novos carreadores de fármacos a base de ciclodextrina. Durante o período de estágio as atividades desenvolvidas se basearam na caracterização de duas MOFs a base de ferro. A primeira delas é formada com o ligante orgânico ciclodextrina e segunda com ácido trimésico, relatado na literatura como MIL (Materials of Institut Lavoisier), sintetizada pelo grupo de pesquisa francês.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Redes metalo-orgânicas

Os materiais porosos vêm sendo estudados há muito tempo para diversas aplicações, e com o avanço das técnicas de caracterização e de métodos de síntese, a partir da primeira metade do século XIX, houve o desenvolvimento da síntese de zeólitas e, posteriormente, materiais mesoporosos. No entanto, as zeólitas apresentam pequenas dimensões de poros, o que limita adsorção de outros constituintes e os materiais mesoporosos, descobertos posteriormente para solucionar essa limitação, continuavam apresentando poros limitados e impossibilidade de variação das propriedades estruturais (CORMA *et al.*, 2010). Em 1954, surgiram os polímeros de coordenação, que são estruturas cristalinas inorgânicas em que os íons metálicos se ligam com componentes orgânicos, capazes de combinar a capacidade de modulação das propriedades estruturais com a porosidade (WELLS, 1954).

Durante muitos anos, diversos trabalhos foram realizados na área de polímeros de coordenação, até que em 1995 o termo “metal-organic framework” (MOF) surgiu na literatura de periódicos nos trabalhos do grupo de Yaghi (YAGHI E LI, 1995), sendo que em nenhum trabalho ainda havia dados específicos sobre a porosidade e a aplicação em liberação de fármacos. Em 1999 foi publicado o primeiro caso de sucesso de síntese da MOF com altíssima porosidade e estabilidade, feito com grupamentos Zn_4O e ácido tereftálico como ligante orgânico, nomeado como MOF-5. A partir deste trabalho muitas MOFs foram sintetizadas com diversas propriedades estruturais e áreas porosas (LI *et al.*, 1999).

O fato da classe do material das redes metalo-orgânicas ter sido descoberta há pouco tempo e ser um campo de pesquisa multidisciplinar que envolve química sólida, inorgânica e de coordenação, faz com que ainda não exista uma nomenclatura padrão. Existe uma interposição de conceitos e terminologias, por exemplo, os termos “polímeros de coordenação” e “redes metalo-orgânicas” são muitas vezes considerados sinônimos (FARRUSSENG *et al.*, 2009), ou ainda o segundo pode estar inserido ao primeiro.

A definição que melhor explica esse material o determina como um polímero de coordenação por apresentar a conexão do metal e um ligante orgânico através de uma ligação

coordenada. Para um polímero de coordenação ser considerado uma MOF a ligação deve ser forte suficiente para fornecer robustez ao material e apresentar geometria bem definida. Além disso, estes materiais devem se apresentar altamente cristalinos (ROWSELL E YAGHI, 2004). Alguns autores julgam que o pré-requisito de um material para ser classificado como MOF é a sua porosidade medida através da isoterma de adsorção, outros julgam que isto não é necessário, e o que basta é o material ter uma estrutura 2 ou 3D com ligantes orgânicos.

A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), através de um projeto denominado “Coordination polymers and metal-organic frameworks: terminology and nomenclature guidelines” (BATTEN *et al.*, 2012), define MOF como sendo um polímero de coordenação com uma rede aberta contendo espaços potenciais. Desta maneira, é possível notar que a definição desenvolvida pela IUPAC é ampla, mas enfatiza que o espaço interno precisa estar disponível e livre das moléculas de solvente.

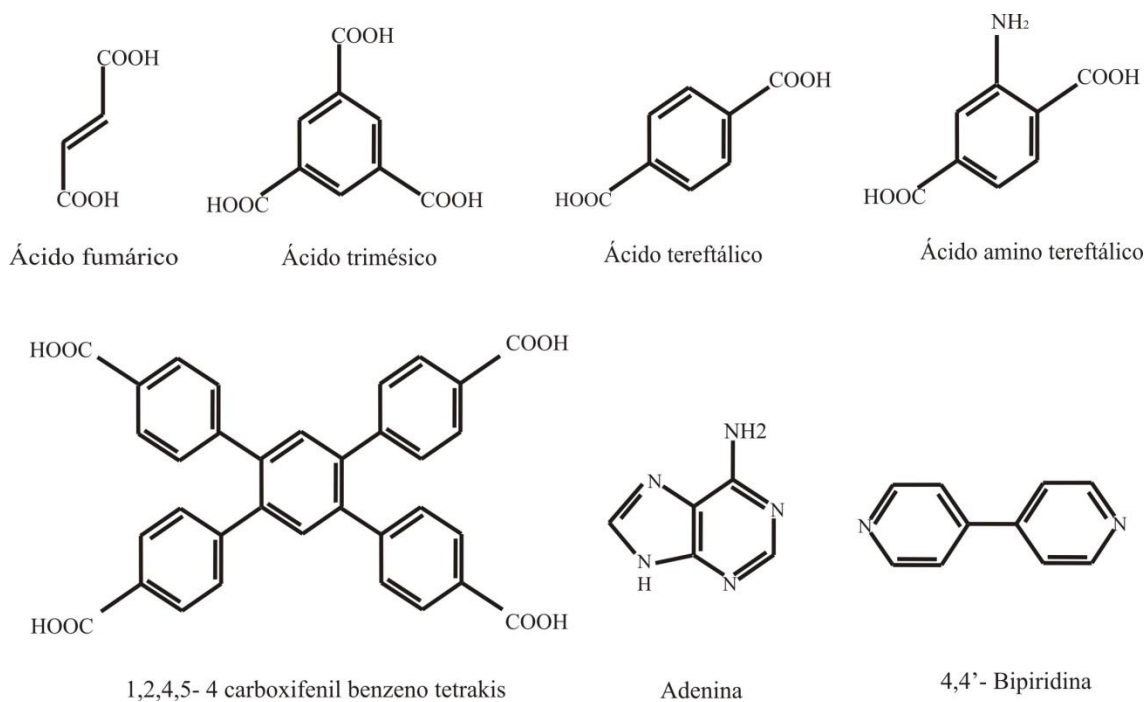
A nomenclatura das MOFs vem sendo descrita, na maioria das vezes, com uma abreviatura seguida de um número sequencial de acordo com a descoberta. As abreviaturas indicam o tipo de material, como MOF (metal-organic framework) e COF (covalente organic framework), o tipo de estrutura, como ZIF (zeolitic imidazole framework) e IRMOF (MOF isoreticular) ou até mesmo o laboratório em que o material foi desenvolvido, como por exemplo, CPO (coordination polymer of Oslo) e MIL (Materials of Institut Lavoisier). Outra maneira de nomear este tipo de material é usar a estequiometria da célula unitária, podendo conter também a molécula visitante, por exemplo: $[Zn_4(O)(bdc)_3] \cdot 3H_2O$, sendo que o oxigênio e a molécula 1,4-benzeno dicarboxilato (bdc) são os ligantes orgânicos e a H_2O é uma molécula hóspede (CORMA *et al.*, 2010).

2.1.1. Estruturas

Os componentes precursores de uma MOF devem ser cuidadosamente escolhidos, à medida que as suas propriedades são altamente relacionadas com a aplicação final do produto. A natureza e a concentração dos componentes determinam suas características finais como a existência de propriedades magnéticas, ópticas, ou ainda possuir grandes canais para passagem de moléculas.

Existem diversos compostos que podem ser utilizados como ligantes orgânicos, e a Figura 4 mostra 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.

Figura 4: Ligantes orgânicos que são usualmente utilizados na síntese das MOFs.



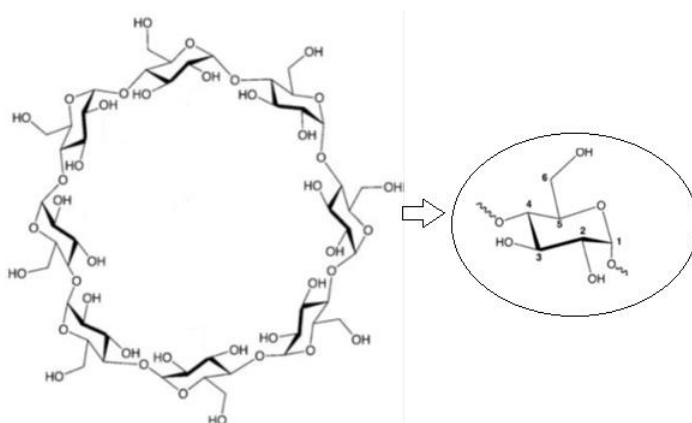
A formação das MOFs ocorre através da união e repetição das ligações meta-componente orgânico, formando uma rede tridimensional que proporciona a cristalinidade e porosidade do material (EDDAOUDI *et al.*, 2001).

As MOFs descritas até 2010 apresentavam moléculas orgânicas oriundas de materiais não renováveis, derivados de petróleo e compostas por metais pesados e de alta toxicidade. Já as novas MOFs estão sendo constituídas por compostos naturais, mas que apresentam em sua grande maioria, como ponto negativo, a assimetria das unidades que não são passíveis de cristalização. Desta maneira, a utilização da ciclodextrina como ligante orgânico favorece a formação de um material cristalino e biocompatível (SMALDONE *et al.*, 2010). Essa síntese é alcançada devido a presença de grupos -OCCO - ou - OCCN - no

ligante orgânico, que forma uma estrutura tridimensional, resultando em uma maior área de superfície aparente e volume de poros. Existem, entretanto, poucos relatos na literatura abordando a síntese de MOFs a base de ciclodextrina e sua aplicação se restringe a área de retenção de gases poluentes e catalisadores (SMALDONE *et al.*, 2010; FORGAN *et al.*, 2011; GASSENSMITH *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2011).

As ciclodextrinas apresentam repetição do grupo –OCCO– como mostrada na Figura 5, que orienta os doadores de oxigênio rígidos a interagir com cátions metálicos.

Figura 5: Estrutura da ciclodextrina formada por unidades de glicose (zoom).



As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, carboidratos complexos, formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações $\alpha(1,4)$ glicosídicas. São produzidas industrialmente por ação de enzimas ciclodextrina glicosiltransferases (CGTases) sobre o amido (SANTOS). As principais ciclodextrinas são: α , β e γ ciclodextrinas, que possuem 6, 7 e 8 monômeros de glicose, respectivamente (DAVIS E BREWSTER, 2004).

A estrutura da ciclodextrina tem um formato de tronco cônico em que a cavidade interna é lipofílica, por apresentar ligações glicosídicas (C-H) e a superfície externa hidrofílica por apresentar hidroxilas (-OH) (SMALDONE *et al.*, 2010). A maioria das ciclodextrinas é metabolizada no colón pelas bactérias da flora intestinal. Estudos de toxicidade mostraram que as ciclodextrinas e alguns dos seus derivados são moléculas seguras, quando administradas oralmente (SALTÃO E VEIGA, 2001).

Levando em consideração todas as propriedades e os benefícios das ciclodextrinas, justifica-se a investigação da formação de uma rede metalo-orgânica utilizando da ciclodextrina como material orgânico. Mais de um século de pesquisas inovadoras baseadas na ciclodextrina contribuíram para um vasto conhecimento científico, no entanto, é surpreendente que a química de coordenação com cátions de metais não tenha sido muito investigada a partir de um ponto de vista racional com relação a sua extensão estrutural no estado cristalino. Segundo Yaghi, a ligação da ciclodextrina com os cátions dos grupos IA e IIA pode formar estrutura cristalina altamente porosa (FORGAN *et al.*, 2011), e a generalização desta observação pode incluir outros metais, como alguns metais de transição como o Fe, Zn e Cd, que podem proporcionar ao material característica teranóstica.

2.1.2. Síntese e ativação

A síntese das MOFs ocorre em temperaturas relativamente amenas, geralmente abaixo de 300°C, para manter a estabilidade, e as condições de síntese podem ser ambientes ou solvotérmicas (solvente quente e pressurizado).

O processo de síntese das redes metalo-orgânicas apresenta uma dificuldade muito importante, que é saber como ocorre o processo chamado auto- montagem, do inglês “self assembly”, do centro metálico com o ligante orgânico. A auto- montagem ocorre através da formação de ligações coordenadas entre o metal e o ligante, podendo ser ligações mais fracas do tipo Van der Waals ou ligações de hidrogênio entre os componentes não metálicos (VAGIN *et al.*, 2007).

É possível sintetizar compostos isoreticulares, que são uma serie de compostos com a mesma topologia, mas variando a natureza e o tamanho do ligante (FURUKAWA *et al.*, 2010). A combinação entre metal e ligante também pode resultar em diferentes estruturas, o que é chamado de polimorfismo (CORMA *et al.*, 2010).

Existem diversos métodos de síntese na preparação das MOFs e entre os métodos relatados na literatura estão:

- I. Evaporação ou difusão de solventes: Este método permite obter materiais extremamente cristalinos, e foi o primeiro a ser utilizado nesta área. As soluções concentradas das unidades de construção (metais e ligantes orgânicos) são colocadas em contato, resultando em uma difusão lenta de um meio para o outro meio na cristalização dos novos materiais. Apesar de ser um método muito simples e eficaz, é um método lento (PAZ E ROCHA);
- II. Síntese solvotérmica: A mistura reacional é colocada em um reator (geralmente de aço revestido internamente com Teflon), que é aquecido a temperaturas superiores ao ponto de ebulição do solvente; desta maneira, a síntese é levada a condições de pressão adequadas podendo ser com ou sem agitação. Variações nas rampas de aquecimento ou arrefecimento também pode promover o crescimento dos cristais. O tempo de preparação das MOFs por este método pode variar de algumas horas a vários dias (PAZ E ROCHA);
- III. Síntese assistida por micro-ondas: Este método está sendo cada vez mais usado para a síntese de MOFs. Ao invés da utilização do aquecimento por convecção como na síntese convencional solvotérmica em reator fechado, este método utiliza micro-ondas para aquecer mais rapidamente e de forma uniforme o meio reacional. É caracterizado pela simplicidade, eficácia no aquecimento e pouca produção de resíduos secundários. Além disso, a variação de parâmetros inerentes a este método permite alterar o tamanho e o hábito dos cristais formados, aumentando a seletividade da síntese para obter o material planejado (Klinowski *et al.*, 2011);
- IV. Síntese assistida por ultrassons: Na síntese de MOFs a ultrassonicação promove a nucleação homogênea com tempo de cristalização muito curto, então, é essencialmente utilizada para síntese de nanocristais como descrito para MOF-5 (MEEK, GREATHOUSE, *et al.*, 2011).
- V. Síntese “one-pot”: Esta técnica consiste na agitação (magnética ou mecânica) das soluções das unidade de construção (metal e ligante orgânico) a temperatura ambiente e pressão atmosférica. Este método vem ganhando espaço nos últimos anos pela rapidez e pelo baixo consumo energético, que permite obter nanocristais (IMAZ *et al.*, 2009).

A etapa final da síntese das MOFs para exibir porosidade permanente é a ativação, ou remoção das moléculas hospedes. Os solventes utilizados durante a síntese geralmente permanecem nos poros dos materiais e através da ativação esses são removidos sem comprometer sua integridade estrutural e sua porosidade (LIU *et al.*, 2007).

Desta maneira, é possível delinear quatro estratégias que tem sido eficaz para ativar as MOFs.

- i. Ativação convencional: a remoção do solvente e/ou outras moléculas hóspedes ocorre por calor simples e tratamento a vácuo. Apesar de existir alguns exemplos bem sucedidos que utilizam esse tipo de ativação, a maioria das MOFs apresenta perda da cristalinidade e falta de porosidade (ABRAHAMS *et al.*, 1994; LI *et al.*, 1998). Desta maneira, estratégias de ativação adicionais foram desenvolvidas para obter grandes áreas de porosidade na maioria das MOFs.
- ii. Ativação por troca de solvente: ocorre a troca da sobra do solvente que foi necessário para a síntese, que apresenta alto ponto de ebulição, por um solvente de ponto de ebulição mais baixo seguido da secagem a uma temperatura mais branda e a vácuo. Este é um processo que vem sendo utilizado porque a estrutura pode ser mantida e após a ativação é obtido um sólido poroso com área superficial muito maior.
- iii. Ativação por CO₂: o uso do CO₂ é uma alternativa que está provando ser muito eficiente, não tóxica, com custo compatível e escalonável. O processo ocorre como na troca de solventes, mas nesse caso é utilizado um solvente intermediário que seja solúvel em CO₂ líquido (súper crítico), como o etanol, que entra em contato com a amostra e posteriormente é adicionado o CO₂ líquido a alta pressão (>73atm) ao longo de horas, e em seguida a amostra é colocada acima da temperatura supercrítica de CO₂ (por exemplo, 32°C). Esta técnica vem mostrando o melhor resultado para liberação dos poros de algumas MOFs, aumentando a área superficial ou obtendo valores de porosidade que não existiam com a ativação convencional (WENZEL *et al.*, 2009; MEEK, PERRY IV, *et al.*, 2011; MONDLOCH *et al.*, 2013).
- iv. Ativação por liofilização: esta é uma técnica recentemente desenvolvida para ativação. Para realizar essa técnica é necessário que o MOF seja permutado com solventes como o benzeno ou ciclo-hexano, que é menos tóxico (HE *et al.*, 2013). A amostra em seguida é congelada a 0°C e trazida de volta a temperatura ambiente várias vezes, e após o ciclo de congelamento final, a amostra é colocada sob vácuo a uma temperatura e pressão abaixo do ponto triplo do solvente. Finalmente quando a amostra é aquecida sob pressão reduzida o solvente é sublimado e, portanto os poros desobstruídos (GAO *et al.*, 2014).

O grande esforço para melhorar a síntese e a ativação de MOFs para obter um material livre de moléculas de solventes, altamente poroso e com uma estrutura altamente cristalina é de suma importância para o carreamento de fármacos.

2.1.3. Técnicas de caracterização

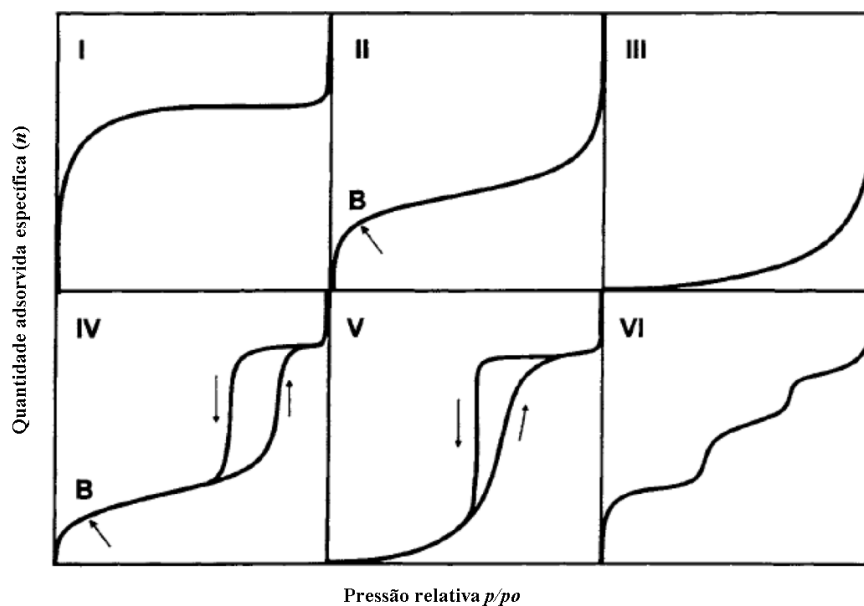
A caracterização estrutural de um material está intimamente relacionada com as propriedades do mesmo. As espécies presentes nas redes metalo- orgânicas exigem um número relativamente grande técnicas complementares para sua caracterização. Uma caracterização desejável envolve a determinação da estrutura cristalina, tamanho, forma, e especificamente no caso das MOFs, a porosidade presente na sua estrutura.

A espectroscopia vibracional no infravermelho (IV) permite avaliar as frequências vibracionais específicas das ligações presentes no material analisado, e desta maneira é possível identificar a formação das ligações entre o íon metálico e o ligante orgânico. As bandas mais investigadas são os anéis imidazólicos, grupo carboxilato e hidroxila (GRECCO *et al.*, 2013; PADOVINI, 2013). Cada rede metalo-orgânica desenvolvida apresenta sua individualidade, desta maneira, de acordo com a estrutura formada e o ligante utilizado, outras bandas específicas podem ser investigadas.

A estabilidade térmica é uma característica importante para as MOFs, e para esse monitoramento é indicado a análise térmica gravimétrica (TGA) e diferencial (DSC). O estudo térmico pode mostrar as diferenças da perda de massa da MOF durante a dessorção da molécula hóspede (ativação), que deve ocorrer na maior temperatura possível (Rowsell e Yaghi, 2004). A maioria das MOFs desenvolvidas apresenta grande estabilidade térmica mesmo após o processo de ativação (LIN *et al.*, 2012).

A estrutura cristalina da MOF deve ser analisada através da difração de raios-X, podendo ser através do pó (PXRD) ou através do monocristal (DO *et al.*, 2011). As informações sobre a estrutura e a possível presença de defeitos também pode ser obtida empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LIU *et al.*, 2013).

A porosidade das redes metalo-orgânicas pode ser analisada através das isotermas de adsorção/ dessorção de nitrogênio. Os dados podem ser analisados através da curva isotérmica, classificada pela IUPAC, que determina se os poros são microporos, mesoporos ou macroporos, como mostra a Figura 6.

Figura 6: Classificação da IUPAC das isotermas de adsorção como tipo I, II, III, IV, V e VI.

A isoterma de adsorção de tipo I ocorre em substratos microporosos, as de tipo II e III ocorrem em substratos macroporosos que apresentam afinidades fortes e fracas com o adsorbato, respectivamente. As isotermas tipo IV e V ocorrem em substratos mesoporosos com afinidade forte e fraca com o adsorbato, respectivamente. A isoterma tipo VI ocorre em substrato não poroso de superfície quase uniforme formando multicamadas. As isotermas podem apresentar adsorção diferente da dessorção o que é demonstrado na histerese.

Através do modelo matemático de BET (Sing, 2001), é possível determinar o tamanho dos poros dos materiais através das áreas superficiais e volume dos poros. Os poros que apresentam o tamanho entre 0 e 2nm são classificados como microporos, os que estão entre 2 e 50nm são mesoporos, os que apresentam tamanho entre 50 e 7500nm são macroporos e os poros maiores que 7500nm são megaporos.

Diversas outras técnicas de caracterização podem ser utilizadas, de acordo com as características das MOFs e a aplicação desejada, como absorção de raios-X (XANES), difração de raios-x a baixo ângulo (SAXS), espectroscopia foto eletrônica de raios-X (XPS), reflectância difusa (DRS), análise elementar, absorção no UV-Vis, etc.

2.1.4. Propriedades e aplicações

Desde o início dos estudos das MOFs foi reconhecido que não somente os seus componentes podem ser alterados, mas também os conteúdos das suas cavidades. A flexibilidade da síntese e a estrutura porosa tornam as redes promissoras para diversas aplicações. Ligações específicas molécula visitante - matriz (como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals) podem ser formadas após a remoção do solvente, o que faz com que a MOF tenha muita afinidade para adsorver específicos grupos funcionais (CLEGG *et al.*, 1986).

Essas observações têm inspirado pesquisas de que com a estrutura adequada, MOFs podem ser produzidos para agir como peneiras moleculares altamente seletivas, catalisadores (ZHANG E CHEN, 2008; ZHOU *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2009), sensores (GULIANTS *et al.*, 1996; ABRAHAMS *et al.*, 1998; SABANER *et al.*, 2015), para o armazenamento de gás (MA *et al.*, 2007; OSCHATZ *et al.*, 2010) e como transportadores de fármacos (HORCAJADA *et al.*, 2006).

A aplicação das MOFs como transportadores de fármacos (drug delivery) tem sido estudada nos últimos anos por alguns grupos que partiram do princípio de que a alta área superficial das MOFs possibilita armazenamento de grande quantidade de moléculas orgânicas um pouco maiores (HORCAJADA *et al.*, 2006).

2.1.5. MOF como sistemas carreadores de fármacos

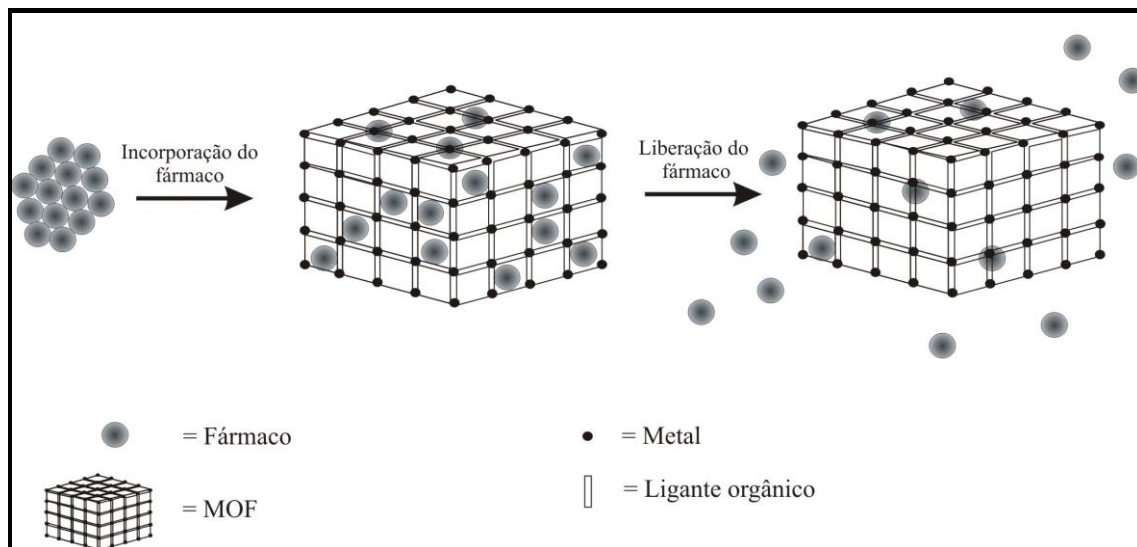
Os sistemas carreadores de fármacos são usados com a finalidade de ampliar a biodisponibilidade do fármaco, melhorar sua estabilidade, manter e controlar as taxas de liberação e direcioná-los para locais específicos do corpo, visando sempre reduzir a frequência de administração do fármaco e favorecer o conforto do paciente (BURGESS, 2006; SAHOO *et al.*, 2007).

A interação que ocorre entre os fármacos e compostos supramoleculares representa um aspecto importante na pesquisa médica e na tecnologia farmacêutica, devido às

implicações biológicas desses novos compostos que podem interferir no perfil de biodisponibilidade ou modificar a estabilidade de grande número de substâncias de uso terapêutico (KOSTARELOS, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2004). Os fármacos administrados através de um carreador exibem perfis cinéticos e biológicos diferentes daqueles obtidos quando o fármaco é administrado de forma convencional. O modo de carrear um fármaco com mais eficiência é por incorporação, encapsulação ou adsorção (KOSTARELOS, 2003) do mesmo em sistemas biologicamente compatíveis.

Algumas estratégias têm sido muito exploradas no sentido de melhorar o fornecimento de fármacos ao sistema biológico, dentre elas, destaca-se: lipossomas (ALLEN JR *et al.*, 2013), dispositivos revestidos implantáveis (PONTES ANDRADE LIMA E ALVES JUNIOR, 2010), nanopartículas (BURGESS, 2006), dendrímeros (SAHOO *et al.*, 2007), ciclodextrina (PEDERSEN *et al.*, 1998) e recentemente as redes metalo-orgânicas (Horcajada *et al.*, 2010).

As MOFs podem ser consideradas como materiais ideais para liberação de fármacos por terem a possibilidade de ajustar os grupos funcionais e o tamanho dos poros. A capacidade controlar a liberação de fármacos contribui para a eficácia do tratamento e a redução dos efeitos colaterais. A Figura 7 mostra como ocorre a incorporação e a liberação de fármaco das redes metalo-orgânicas, através dos seus poros.

Figura 7: Esquema de incorporação e liberação de fármaco das MOFs (desenvolvida pela autora)

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 (FÉREY *et al.*, 2005). Estes materiais foram desenvolvidos a partir de metais trivalentes e ligantes orgânicos que apresentam ácidos carboxílico, e apresentam alta porosidade (25- 34 Å) e grandes áreas de superficiais (3100-5900 m²/g) que faz com que se tornem muito promissores para liberação de fármacos. Horcajada e colaboradores avaliaram a liberação de ibuprofeno a partir da MOF mesoporosa MIL 100 (YAO *et al.*, 2013). A liberação do fármaco 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 8h e a liberação completa ao final de 6 dias.

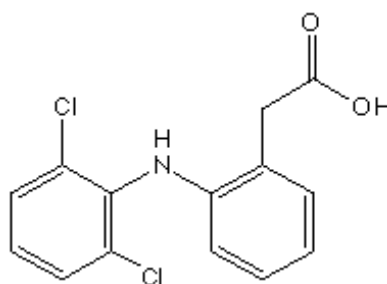
Embora os sistemas discutidos até o momento apresentem potencial para aplicação das MOFs como veículos de liberação de fármacos, a utilização *in vivo* está limitada devido a maioria desses materiais não serem apropriados para a administração intravenosa, por possuírem tamanhos maiores ao permitido. Desta maneira, o tamanho das MOFs deve ser reduzido para nanoescala para que possa circular no sangue. Horcajada e colaboradores (HORCAJADA *et al.*, 2008) sintetizaram materiais não tóxicos a base de ferro (II), como

MIL-53, MIL-88A, MIL-88B, MIL-89, MIL-100 e MIL-101-NH₂, que variam os seus ligantes orgânicos, como nanocarreadores para liberação eficiente de antitumorais e retrovirais (bussufano, trifosfato de azidotimidina, doxorubicina ou ciclovir) para o tratamento de câncer e da AIDS (LIU *et al.*, 2011). Os autores investigaram a toxicidade, biocompatibilidade, eficiência de carga do fármaco e perfil de liberação para estas MOFs. A citotoxicidade foi feita *in vitro* em macrófagos de ratos utilizando ensaio MTT, *in vivo* através da administração intravenosa das MOFs. A não toxicidade foi confirmada através da ausência de respostas imune ou de reações inflamatórias. Estes materiais podem ser obtidos em soluções aquosas e etanolicas e podem encapsular fármacos com diferentes polaridades, tamanhos e grupos funcionais. Esses nanocarreadores podem abrir novas perspectivas para melhoria no tratamento anticancerígeno e fármacos antirretrovirais.

2.2. Diclofenaco de sódio como modelo de fármaco anti-inflamatório

O diclofenaco de sódio é um anti-inflamatório não esteroideal (AINE) que é prescrito para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, como artrite reumatoide e osteoartrite (GIAGOUDAKIS E MARKANTONIS, 1998). A fórmula molecular do diclofenaco é C₁₄H₁₀Cl₂NCl₂O₂ e está representada na Figura 8.

Figura 8: Molécula do diclofenaco



O diclofenaco de sódio apresenta massa molecular de 318,13g/mol, é um pó cristalino branco, levemente higroscópico, praticamente solúvel em água e etanol. É um ácido fraco e

possui pKa de 4.0, sendo mais solúvel em pH entre 7-8 e praticamente insolúvel em meio ácido (USP, 2007).

O mecanismo de ação do diclofenaco, assim como os outros AINEs, ocorre através da inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX) presente nos processo inflamatórios (BASTING, 2012). Após a sua administração oral, o mesmo sofre metabolização pré- sistêmica o que diminui sua biodisponibilidade em até 50%, necessitando de múltiplas doses. Como efeito adverso, o uso do diclofenaco apresenta irritação, sangramento, ulcerações e eventuais perfurações na parede gástrica (MULLER *et al.*, 2004).

Desta maneira, estudos fundamentados no desenvolvimento de novos carreadores de fármacos têm como objetivo minimizar a toxicidade e aumentar a eficácia clínica do diclofenaco de sódio.

3. OBJETIVO

Sintetizar e caracterizar redes metalo-orgânicas a base de ciclodextrina com diferentes metais, como o potássio e sódio e ferro. Realizar também o ensaio de citotoxicidade, encapsulação e liberação de fármaco de todos os materiais obtidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

- Água purificada Mili-Q,
- Ciclodextrina (90%, peso molecular de $1297\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ - Sigma Aldrich),
- Cu $(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (acetato de cobre II, peso molecular de 182 g/mol, Dinâmica Química Contemporânea Ltda),
- Diclofenaco de sódio (DCFNa- peso molecular de 334,25g/mol, da Audaz),
- Diclorometano (- 99%, peso molecular 84,93g/mol - LAC),
- Fe_2Cl_3 (cloreto férrico- 97%, peso molecular de 270,3 g/mol Dinâmica Química Contemporânea Ltda.),
- KOH (hidróxido de potássio 90%, peso molecular de 56,1g/mol, Sigma Aldrich),
- Metanol (álcool metílico- 99,8%, peso molecular de 32,04, da LAC),
- Mn $(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (acetato de manganês II tetra hidratado- 99.5%, peso molecular 245,087 g/mol- Dinâmica Química Contemporânea Ltda),
- NaOH (hidróxido de sódio 97%, peso molecular de 40 g/mol Sigma- Aldrich).

Equipamentos:

- Analisador Termogravimétrico SDT 600, da TA Instruments;
- Balança digital Ohaus;
- Bomba a vácuo. Tecnal – TE- 0,58;
- Centrifuga Fanem Excelsa Baby II, modelo 206- R;
- Difratorômetro de Raios- XD-5000, da Siemens;

- Equipamento de DSC modelo Q100, da TA Instruments;
- Equipamento de Infravermelho Perkin Elmer, System 2000;
- Phmetro; PG2000, da Gehaka
- Porosímetro de ASAP2010 da Micromeritics;
- Sistema de purificação de água Milipore, Mili-QPlus;
- Condutivímetro DEL. LAB®, modelo DL – 150.

4.1.1. Métodos

4.1.2. Síntese das redes metalo-orgânicas a base de ciclodextrina

As MOFs foram preparadas utilizando a metodologia proposta por Smaldone e colaboradores com algumas modificações (Smaldone *et al.*, 2010).

A síntese foi realizada através do método de difusão a vapor, com a variação da temperatura, tempo de reação, taxa de resfriamento, concentração e proporção dos reagentes além das variáveis durante a ativação do material.

Foram realizadas diversas sínteses, porque em muitos casos foram necessárias repetições para obtenção de material suficiente visando à caracterização. Primeiramente foi feita a síntese de sistemas a base de β -ciclodextrina com os metais sódio e potássio, denominados β -NaCD e β -KCD, e em seguida a síntese de sistemas a base de γ -ciclodextrina com os metais de sódio, potássio, manganês, cobalto e ferro, denominados γ -NaCD, γ -KCD, γ -MnCD, γ -CuCD e γ -FeCD. As proporções utilizadas durante as sínteses foram baseadas na literatura. Para cada 1 mmol de ciclodextrina, foram utilizados 8 mmol do sal de metal, visto que cada ciclodextrina é capaz de se ligar com oito íons metálicos através de ligações coordenadas pelos ligantes –OCCO– presente na sua estrutura.

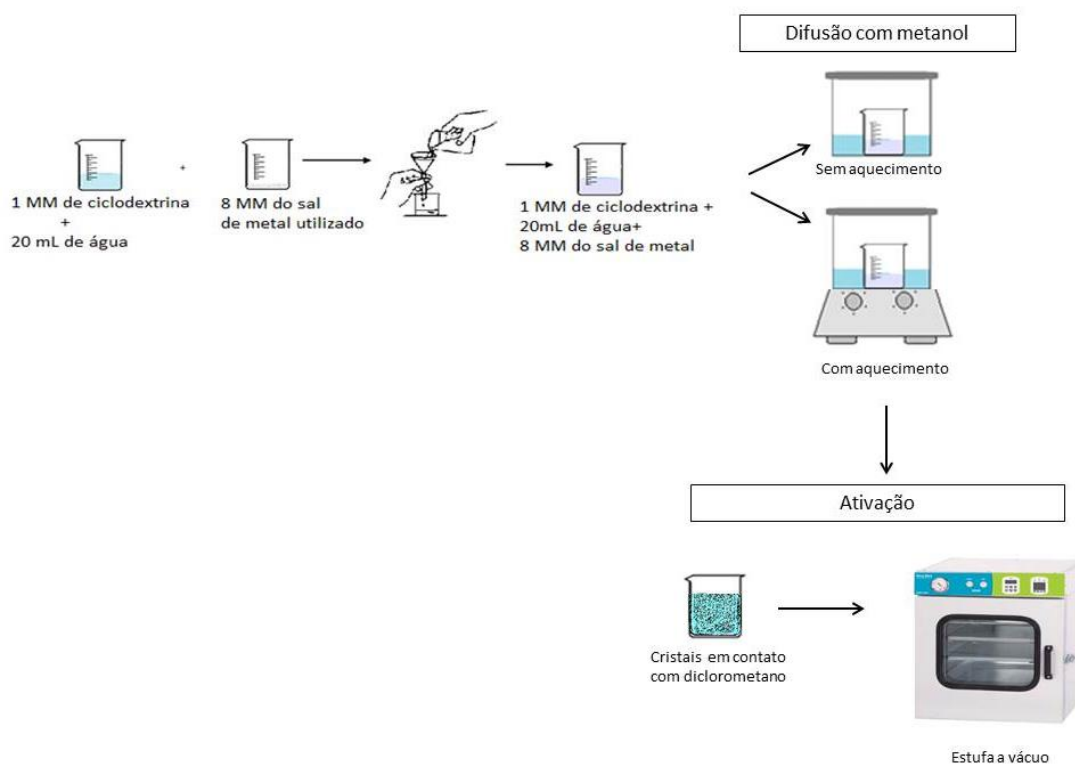
O procedimento de síntese foi o mesmo para todos os métodos e obedeceu a seguinte ordem: o metal utilizado foi adicionado a uma solução aquosa de ciclodextrina. Em seguida foi realizada a filtração da solução formada e esse material foi colocado em difusão com metanol durante um período de 3 a 7 dias. Foi feito esse processo a temperatura ambiente e sob aquecimento de 50°C para detectar qual rota de síntese resultaria em um melhor resultado.

Após a síntese, os cristais formados foram filtrados e lavados duas vezes com metanol e então foi realizada a ativação dos mesmos. A ativação do sistema consiste em um processo capaz de desobstruir os poros, eliminando resquícios de reagentes utilizados durante a síntese ou de água. O material foi submerso em diclorometano (aproximadamente 20mL) durante três dias, trocando o reagente três vezes.

Depois da ativação dos cristais, os mesmos foram secos a vácuo em uma estufa de aquecimento. A estufa apresenta pressão máxima de vácuo a 760mmHg, temperatura máxima de 200°C, abertura de 300mm e profundidade de 470mm. As amostras foram mantidas a pressão de 760mmHg durante 24 horas, sendo que durante as 12 primeiras horas a temperatura ambiente e durante as doze horas seguinte a uma temperatura de 45°C.

A Figura 9 demonstra o processo de síntese das diferentes MOFs preparadas.

Figura 9: Esquema de síntese das redes metalo-orgânicas (elaborado pela autora)



4.1.3. Medida de pH

As medidas de pH das amostras foram realizadas no pHmetro de bancada digital ION PHB-500 que realiza análise na faixa de pH 0 a 14 com 3 pontos de calibração.

O equipamento foi calibrado utilizando soluções padrões de pH 9, 7 e 4, e todas as análises foram feitas a 25°C.

Os materiais caracterizados foram o γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD. Os materiais foram dispersos em diferentes meios com a finalidade de avaliar seu comportamento em todos eles. Os meios utilizados foram: soro, tampão fosfato salino, meio de cultura celular DMEM e etanol.

4.1.4. Condutividade elétrica

As medidas de condutividade dos materiais foram realizadas através de uma célula de condutividade e um circuito elétrico (equipamento Condutivímetro Digimed). A temperatura estabilizada foi de 25°C e a unidade de medida $\mu\text{S}/\text{cm}$. A solução padrão, utilizada para calibrar o equipamento, apresenta a condutividade de 1412 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

4.1.5. Análise de distribuição de tamanho

O tamanho de partícula foi medido através do espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês, Dynamic Light Scattering) em um equipamento zetasizer. O equipamento analisa partículas submicro, tamanho molecular entre os tamanhos de 0.3nm e 10 μm podendo variar a temperatura entre 0°C e 90°C. As análises foram feitas a 25°C, com tempo de 60 segundos em água, sempre em triplicata.

A curva de distribuição de tamanho das partículas de MOFs foi realizada através da visualização em um estereoscópio, através da contagem de cerca de 100 partículas, com a digitalização de imagens em computador através do programa analisador de imagem Leica

Qwin. Amostras de MOFs foram cuidadosamente dispostas sobre lâminas, sem sobreposição de lamínula. As imagens das partículas foram obtidas com aumento de 25x.

4.1.6. Análise Termogravimétrica e Calorimetria

O equipamento utilizado para obtenção dos termogramas foi o SDT 600 Simultaneous DTA/TG da TA Instruments. As amostras foram acondicionadas em cadinhos de alumina de 90 μ L e aquecidas com uma taxa de 5°C/min sob fluxo de ar de 50mL/min. As medidas foram monitoradas entre 25 e 800°C.

O equipamento utilizado na obtenção das curvas calorimétricas foi o TA Instruments, modelo DSC Q10. As curvas de calorimetria exploratória diferenciada (DSC) foram obtidas na faixa de temperatura entre -90°C e 350°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100mL/min), razão de aquecimento de 5°C/min, utilizando cápsula de alumínio contendo aproximadamente 2mg da amostra. Os equipamentos foram previamente calibrados ou verificados antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrão índio metálico.

4.1.7. 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 radiação CuK α , $2\theta = 5 - 50^\circ$; passo 0,005°; tempo= 1 segundo.

4.1.8. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS- Campinas, Brasil), na linha SAXS1. A linha de SAXS é equipada com um monocromador ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$), um detector vertical localizado cerca de 896mm da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento $I(q)$, em função do vetor de espalhamento, q . O espalhamento do kapton e do ar foram subtraídos da intensidade total espalhada. Cada espectro foi coletado por 30 segundos.

4.1.9. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

O equipamento utilizado nas análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi o espectrofotômetro Perkin Elmer, System 2000, na região de $370\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ em modo transmissão.

4.1.10. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram preparadas de duas maneiras: primeiramente os materiais na forma de pó foram aderidos a uma fita de carbono condutora e em um segundo preparo, as amostras foram colocadas em suspensão de álcool isopropílico e aderidas à mica. As amostras foram metalizadas com filme de ouro de 20 nm de espessura durante 80 segundos. O microscópio utilizado foi modelo TopconSM- 300 com detector de elétrons secundários com voltagem de aceleração de elétrons de 10Kv.

4.1.11. Análise das isotermas de adsorção/ dessorção de Nitrogênio

Os parâmetros da porosidade das redes metalo-orgânicas foram obtidos através de isotermas de adsorção de nitrogênio a 77K conduzidos em um porosímetro ASAP (Accelerated Surface Área and Porosimetry System), modelo 2010 cuja marca é Micromeritic, conectado a um computador. As amostras foram submetidas à 100°C em vácuo $\sim 1\ \mu\text{mHg}$ para limpeza da superfície. As medidas foram realizadas usando o método volumétrico estático e o intervalo de pressão relativa entre 0,02 e 0,998.

4.1.12. Avaliação da citotoxicidade

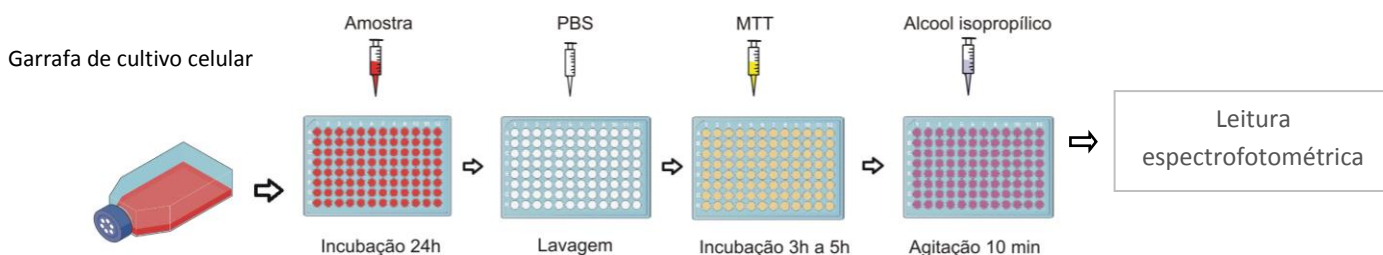
As amostras (γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD) na forma de pó foram diluídas em meio de cultura DMEM nas concentrações 2000 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

A avaliação da toxicidade celular pelas redes metal-orgânicas foi avaliada com a linhagem celular: HepG2. As células foram cultivadas em garrafas de cultivo, contendo meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) pH 7,2- 7,4, suplementado com antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram mantidas em atmosfera de 5% CO₂ a temperatura de 37°C na incubadora de CO₂.

A partir do momento em que a monocamada celular se apresentou com confluência de 80-90% nas garrafas de cultivo, após a 3ª passagem, elas foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos e, então, semeadas em placas de 96 poços. Para neutralização da tripsina foi utilizado o meio de cultura com o soro fetal bovino.

A densidade celular para os ensaios de citotoxicidade (MTT) foi de 2×10^5 células/mL. As placas foram incubadas por 24 horas para adesão completa das células às placas de 96 poços. Posteriormente as células foram tratadas com 100 µL de controle positivo (dimetilsulfóxido a 10%), controle negativo (meio de cultura sem soro fetal bovino) e diferentes concentrações da solução mãe contendo as MOFs, durante 24 horas. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas delicadamente com tampão fosfato salino (PBS) e 100 µL de MTT (1 mg/mL em PBS) foram adicionados em cada poço. As células na microplaca foram incubadas a $37 \pm 2^\circ$ C, ao abrigo da luz. A atividade da desidrogenase mitocondrial reduz o MTT amarelo para um sal de formazana roxo insolúvel, que foi solubilizado em 100µL de álcool isopropílico absoluto e sua absorbância lida a 595 nm em um leitor de placas.

No método MTT, as células que permaneceram vivas após o contato com as MOFs conseguem reduzir o sal MTT amarelo através da enzima presente na mitocôndria (desidrogenase mitocondrial) para um sal de formazana purpura insolúvel e essa redução é proporcional à produção de células viáveis. A Figura 10 esquematiza as principais etapas do teste de citotoxicidade.

Figura 10: Esquema do teste de citotoxicidade .

Foram realizados 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 (Zhang *et al.*, 2004) e, em seguida, foi determinada também a porcentagem de células vivas. A viabilidade celular do ensaio de citotoxicidade foi calculada como descrito na *Equação 1*:

$$\% \text{ células viáveis} = (\text{Abs teste} - \text{Abs branco}) / (\text{Abs CN} - \text{Abs branco}) \times 100 \quad \text{Equação. 1}$$

A análise estatística do resultado obtido comparadas com o controle negativo, foi avaliada pelo teste One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), quando adequado (YUKSEL *et al.*, 2000).

4.1.13. Eficiência de encapsulação do fármaco nas redes metalo-orgânicas

Para a incorporação, o fármaco modelo (diclofenaco de sódio) foi dissolvido em uma mistura água Milli-Q/ etanol (na proporção de 30: 70 respectivamente), e após a sua completa dissolução, as MOFs foram adicionadas à solução. Para o preparo desta solução foi utilizada a proporção de 3:1 (massa: massa) do fármaco e das MOFs, baseando-se na literatura através da metodologia utilizada por Horcajada (HORCAJADA *et al.*, 2008).

O material foi deixado sob agitação magnética constante, sem aquecimento, durante 3 dias. Após o período de agitação, o material foi centrifugado a 4000 rpm, por 15 minutos e, em seguida, foi medida a absorbância por UV/Vis do sobrenadante. Dessa maneira, a absorbância referente ao fármaco livre 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 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com medidas de absorbância realizadas no intervalo de 200-400nm (absorção máxima do diclofenaco de sódio $\lambda = 275 \text{ nm}$).

4.1.14. Determinação “in vitro” do perfil de liberação do diclofenaco de sódio

A liberação do fármaco modelo, diclofenaco de sódio, foi realizada pelo método de dialise, conforme descrito por Santos Magalhaes e colaboradores (Santos-Magalhaes *et al.*, 2000). O procedimento consiste na utilização de sacos de diálise, constituídos por membrana sintética de diálise de celulose (Dialysis tubing cellulose membrane, 25x16 mm - Sigma-Aldrich), previamente hidratadas no meio de liberação por 15 minutos. Cada saco de dialise foi amarrado em suas extremidades e antes de vedados foi adicionado 10mg de MOF contendo fármaco em cada um.

Nos béqueres foram adicionados 30 mL do meio receptor (PBS pH 7,4), onde foram inseridos os sacos de diálise contendo a amostra para dar início ao experimento. O processo foi feito em triplicata para cada amostra.

Os ensaios de liberação foram realizados a temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sob agitação magnética constante. Durante o ensaio, a quantificação do fármaco liberado foi realizada pelo método UV/Vis diretamente no meio receptor utilizando uma sonda de imersão, sem necessidade de coleta e reposição do meio. A leitura referente ao meio receptor correspondeu ao percentual da quantidade de fármaco liberada capaz de ultrapassar a membrana de diálise.

Os tempos de leitura foram de: 0; 0,5 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24 e 48 horas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Síntese das redes metalo-orgânicas a base de ciclodextrina

Foram realizados testes preliminares para obtenção das redes metalo-orgânicas a base de γ -ciclodextrina e potássio (γ -KCD) com diferentes tempos de síntese: 3, 5 e 7 dias com o objetivo de verificar o melhor rendimento da síntese. O rendimento destes materiais foi calculado através da comparação, em porcentagem, do material em massa utilizado como reagente e do produto final obtido. Foi realizada também a síntese de MOF a base de γ -ciclodextrina e sódio, γ -ciclodextrina e ferro, e β -ciclodextrina e potássio. A tabela 1 apresenta os rendimentos obtidos.

Tabela 1: Rendimento obtido a partir das sínteses a base de β e γ -ciclodextrina como ligantes orgânicos e potássio, sódio e ferro, como metais.

Composto	Tempo de síntese (dias)	Rendimento calculado (%)
β -KCD	7	62
γ -KCD	3	62,2
γ -KCD	5	70
γ -KCD	7	72,4
γ -NaCD	7	72
γ -FeCD	7	61,3

A partir dos rendimentos observou-se que todos foram superiores a 60%, confirmando a eficiência do método utilizado. Entretanto, é possível perceber que houve maior rendimento da síntese do γ -KCD com período de 7 dias. Estes dados, em associação com os de difração de raios-X que serão posteriormente apresentados, foram decisivos para a escolha e padronização do período de síntese das MOFs.

A partir da escolha do período de síntese, foram testados outros metais biocompatíveis na preparação das redes metalo-orgânicas, como o sódio (Na), o ferro (Fe), o cobre (Cu) e o manganês (Mn) sempre usando como ligante orgânico a γ -ciclodextrina. No preparo das MOFs com Mn e Cu não observou-se a formação de cristais. Os materiais que formaram cristais e que deram continuidade no trabalho foram as MOFs a base de ciclodextrina e sódio, potássio e ferro (γ -NaCD, γ -KCD e γ -FeCD).

5.2. Caracterização das redes metalo-orgânicas

5.2.1. Medidas de pH

Foram avaliados os pHs dos γ -MOFs em diferentes meios em que as redes MOFs entraram em contato para testes ou ficaram armazenadas em suspensão: água, soro, tampão fosfato-salino (PBS), meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e o etanol. A tabela 2 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 2: Medidas de pH das redes metal orgânicas em diferentes meios

	Solventes				
	Água	Etanol	Soro	PBS	DMEM
γ -KCD	8,67	7,32	8,5	7,85	7,81
γ -NaCD	8,80	8,7	8,67	7,75	8,6
γ -FeCD	3,13	2,12	3,4	7,4	8,1

É possível observar que γ -KCD e γ -NaCD apresentam um valor de pH levemente básico em todos os solventes, o que pode ser justificável pela presença de resquícios das bases usadas durante a síntese. O γ -FeCD apresentou um comportamento ácido em água, etanol e soro, e levemente básico em PBS e DMEM. Provavelmente a acidez do γ -FeCD se deve a presença de íons cloros livres ou que se desligaram da rede ao entrar em contato com o

solvente, rico em H^+ , e assim propiciou a formação de HCl que conseqüentemente diminui o pH do meio. No entanto, γ -FeCD nos meios PBS e DMEM não apresentam comportamento ácido, que pode ser resultado da ligação do cloro livre com algum componente presentes nos meios PBS e DEMEM, o que não levam a formação de HCl e portanto não diminui o pH do meio.

A constatação de que os materiais desenvolvidos apresentam pH levemente básico na presença de PBS e DMEM foi de extrema importância para saber que o material estaria apto para realizar o teste de citotoxicidade. Os valores de pH que as amostras apresentam estão dentro da faixa de pH de sobrevivência celular, desta maneira, não ocorre interferência no resultado da viabilidade celular, evitando assim um falso negativo.

5.2.2. Condutividade elétrica

Com o objetivo de estudar o comportamento das MOFs em meio aquosos, para a aplicação biológica, e saber se a ligação metalo- orgânica iria se manter ou se dissociar em água e etanol, foram realizadas as medidas de condutividade elétrica das MOFs e dos seus componentes individualmente. A concentração utilizada para todas as amostras foi de $1 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. A tabela 3 apresenta os valores dos resultados obtidos.

Tabela 3: Valores de condutividade elétrica para os reagentes utilizados na síntese das MOFs e MOFs em meio aquoso e etanólico.

Solvente	Amostras						
	γ -CD	KOH	γ -KCD	NaOH	γ -NaCD	Fe_2Cl_3	γ -FeCD
H ₂ O	18,04	175,99	27,63	770,4	13,16	252,3	41,9
Etanol	-----	-----	8,89	-----	3,4	-----	13,fv36

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3 foi possível observar que as soluções dos reagentes utilizados, com exceção da ciclodextrina que é um componente

orgânico, quando colocados em água apresentam maior condutividade que as respectivas MOFs. Estes resultados sugerem que quando os reagentes: NaOH, KOH e Fe_2Cl_3 são colocados em água, eles se dissociam formando Na^+/OH^- , K^+/OH^- e $\text{Fe}^{3+}/\text{Cl}^{2-}$. Em contrapartida, as MOFs não se dissociam da mesma maneira, ou seja, não existe grande quantidade de metal livre no meio, resultando em valores menores de condutividades.

Tendo em vista que a massa total de reagentes utilizada na síntese das MOFs foi 1,6g e que, como dito anteriormente, a síntese apresenta o rendimento de aproximadamente 70%, o produto final obtido é de 1,12g. Seguindo a proporção utilizada no preparo do material, é possível concluir que em 0,01g de γ -NaCD usado na análise de condutividade teria 0,0028g de NaOH. Desta forma, 0,0028g de NaOH presente na rede metalo-orgânica apresenta a condutividade de 19,73 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e a mesma massa livre de NaOH em solução aquosa apresenta 245 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Sendo assim, é possível deduzir que o sódio presente na rede metalo-orgânica se encontra ligado a ciclodextrina e não está na forma ionizada.

Posteriormente foi analisada a mistura física da ciclodextrina com NaOH com a mesma quantidade usada na síntese das redes metalo-orgânicas, ou seja, 1,3g de ciclodextrina e 0,312g de NaOH. Após a mistura, uma amostra de 0,01g foi diluída em 100mL de água. Esta mistura física apresentou uma condutividade de 163,96 $\mu\text{S}/\text{cm}$. A mesma quantidade testada na forma de rede metalo-orgânica apresentou a condutividade de 19,73 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Desta forma é possível verificar que a solução que apresenta a simples mistura física dos componentes apresenta uma condutividade muito maior quando comparada com a solução da rede metalo-orgânica, porque os primeiros estão livres na solução enquanto a MOF apresenta a fase orgânica e o metal ligados mesmo em solução.

Com os resultados do teste de condutividade elétrica podemos afirmar que as MOFs desenvolvidas terão sua estrutura mantida ao entrarem em contato com o meio biológico, sem se dissociar, sendo possível transportar fármacos sem se dissociar em meio aquoso.

5.2.3. Análise de distribuição de tamanho

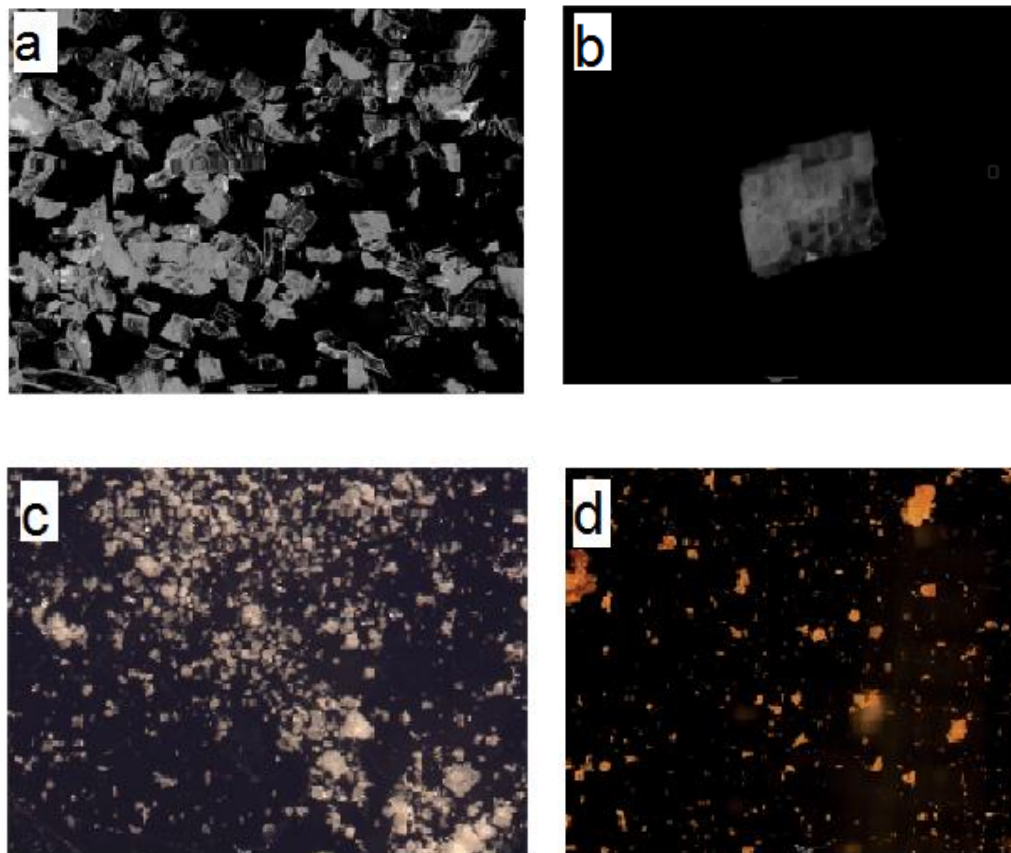
As amostras desenvolvidas foram analisadas através do espalhamento de luz dinâmico (DLS). Todas as medidas foram realizadas utilizando a concentração de 0,1mg/mL. Os valores do tamanho das partículas foram obtidos e estão listados na tabela 4.

Tabela 4: Medida do tamanho de partícula (nm) e o PDI (Índice de Polidispersividade) das redes metal-orgânicas em H₂O.

	Tamanho da partícula (nm)	PDI
KCD	370	0,7
NaCD	1052	1
FeCD	608	0,7

Através dos resultados que se encontram na tabela 4, é possível concluir que as partículas apresentam um tamanho de partícula maior que o limite do equipamento e um alto PDI (Berne e Pecora, 1976), e desta maneira, a análise por DLS é considerada inadequada para este tipo de material. A não eficácia deste método pode ser justificada pela estrutura do material desenvolvido, em que as redes formadas e a presença de poros são muito grandes e, por isso, o espalhamento de luz pode ser errôneo por não capturar a partícula como um todo, podendo estar analisando somente uma parte dela juntamente com seu poro. Com o objetivo de obter a medida do tamanho de partícula através de um método eficaz e adequado para este tipo de amostra, posteriormente foi feita a uma curva de distribuição de tamanho de partículas através de um estereoscópio.

A Figura 11 mostra as micrografias das amostras γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD a partir do estereoscópio com aumento de 25x.

Figura 11: Micrografia estereoscópica das (a, b) γ - NaCD, (c) γ - KCD e (d) γ - FeCD.

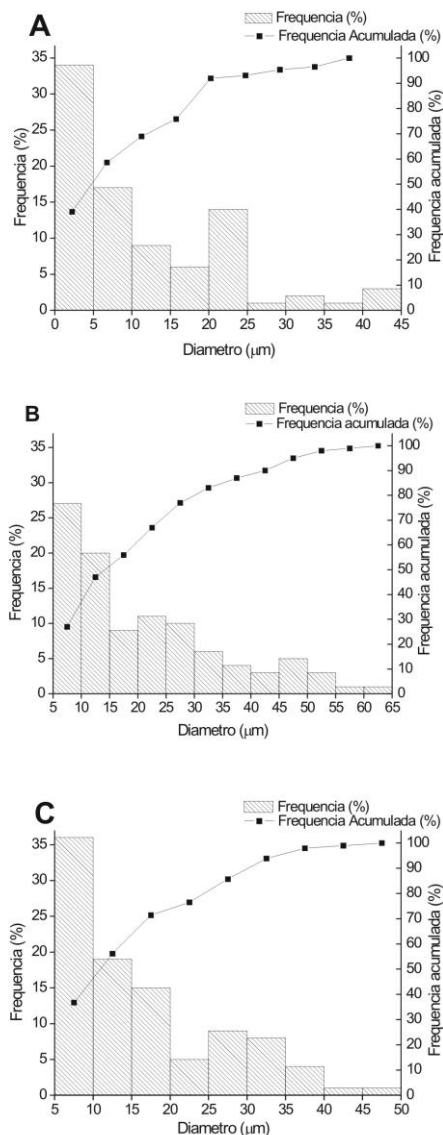
As imagens mostram diferentes tamanhos e poucos detalhes das partículas, por se tratar de uma micrografia de baixa resolução, desta maneira, detalhes da estrutura da amostra poderão ser observados através da microscopia eletrônica de varredura, presente no item 5.2.9.

As MOF formadas não são sistemas monodispersos de partículas com forma regular e desta maneira não há nenhum parâmetro isolado que seja capaz de definir o pó, em relação à medida e a classificação do tamanho de partículas. Sendo assim, a determinação do tamanho de partículas foi realizada através do diâmetro de Feret 0° , que corresponde à distância horizontal entre duas linhas paralelas verticais imaginárias e tangentes a uma mesma partícula (STANIFORTH, 2005), como mostra a representação da Figura 12.

Figura 12: Figura representativa do diâmetro de Feret (D) na direção horizontal



Os perfis de distribuição de tamanho das MOFs foram obtidos a partir de populações de cerca de 100 partículas e são apresentados na Figura 13, onde os dados são exibidos em função da frequência percentual e frequência acumulada dos tamanhos obtidos.

Figura 13: Distribuição de tamanho de partículas das MOFs (A) γ -KCD, (B) γ -NaCD e (C) γ -FeCD.

Observando-se os perfis de distribuição apresentados na Figura 13, é possível perceber que as amostras γ -KCD apresentam uma faixa de distribuição de tamanho em que 90% das partículas são menores que 20 μm . Já as amostras γ -NaCD apresentam uma faixa de distribuição de tamanho menos estreita, 90% das partículas são menores que 40 μm . As amostras γ -FeCD apresentam uma faixa de distribuição de tamanho em que 90% são menores que 30 μm .

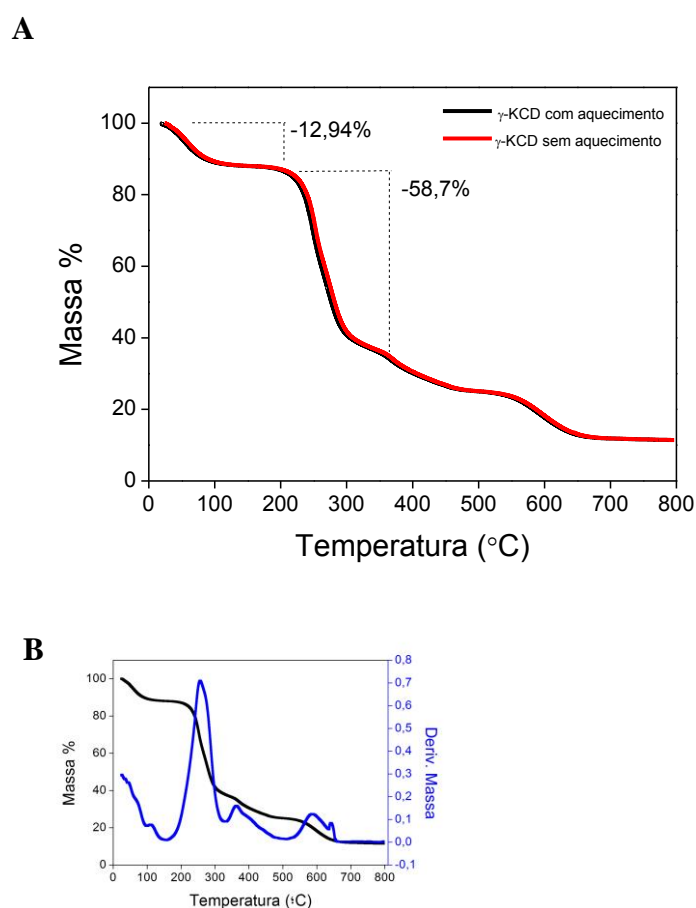
Os tamanhos de partículas obtidos permitem concluir as MOFs desenvolvidas estão aptas para aplicação via oral. Também é possível concluir que o material desenvolvido é

maior do que o permitido para a aplicação sistêmica, visto que são partículas que excedem o tamanho limite que podem ser transportadas através dos vasos sanguíneos. Desta maneira, para futura aplicação como carreador de fármaco via endovenosa seria necessário diminuir o tamanho do material para transformá-lo em nanoMOF.

5.2.4. Análise Termogravimétrica e Calorimetria

A Figura 14 apresenta as TGs das amostras γ -KCD sintetizadas a temperatura ambiente ou sob aquecimento.

Figura 14: Curvas termogravimétricas (A) e suas derivadas (B) do γ -KCD sintetizadas sob aquecimento e a temperatura ambiente

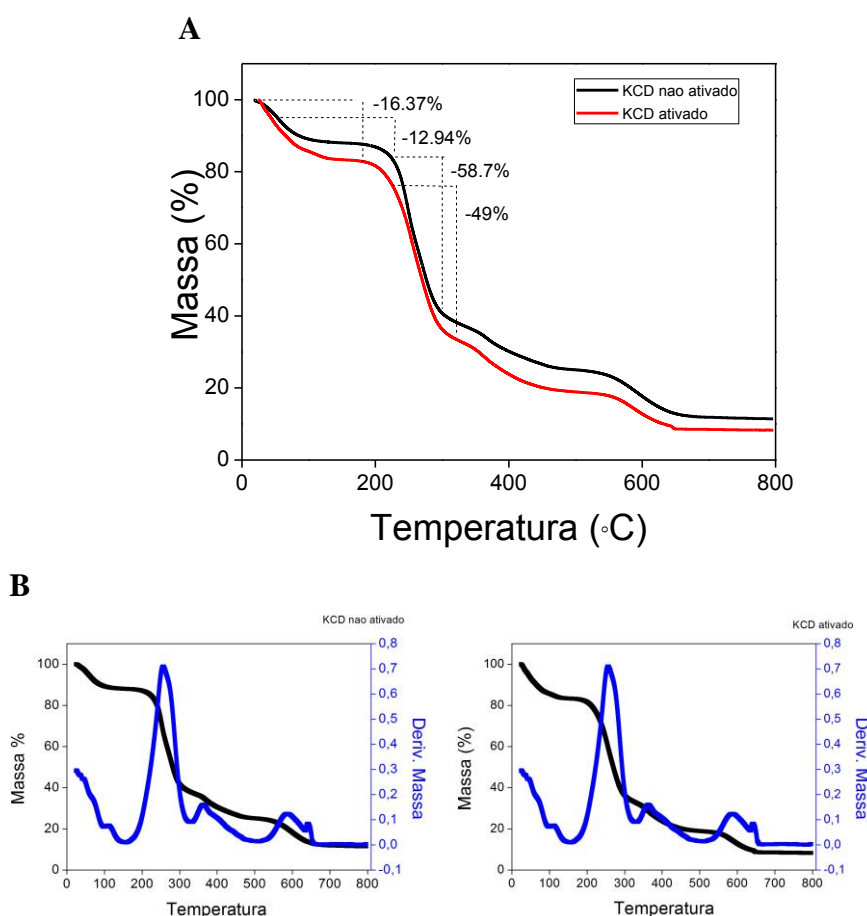


Observa-se inicialmente uma perda de massa de 12,94 % no intervalo de temperatura de 25 a 100°C correspondente à perda de água de hidratação. Essa perda é seguida de uma

segunda perda de massa de 58.7% no intervalo de 198°C a 300°C caracterizando a decomposição da amostra. Desta maneira, é possível concluir que a realização ou não do aquecimento durante a síntese do material não interfere no produto final.

Posteriormente foram comparados os materiais desenvolvidos antes e depois de serem ativados, para avaliar a perda de massa que ocorreu após a eliminação dos solventes nos poros. As Figuras 15, 16 e 17 apresentam as TGs do γ -KCD, γ -NaCD e do γ -FeCD.

Figura 15: Curvas termogravimétricas (A) e suas derivadas (B) do γ -KCD antes e depois da ativação com DCM

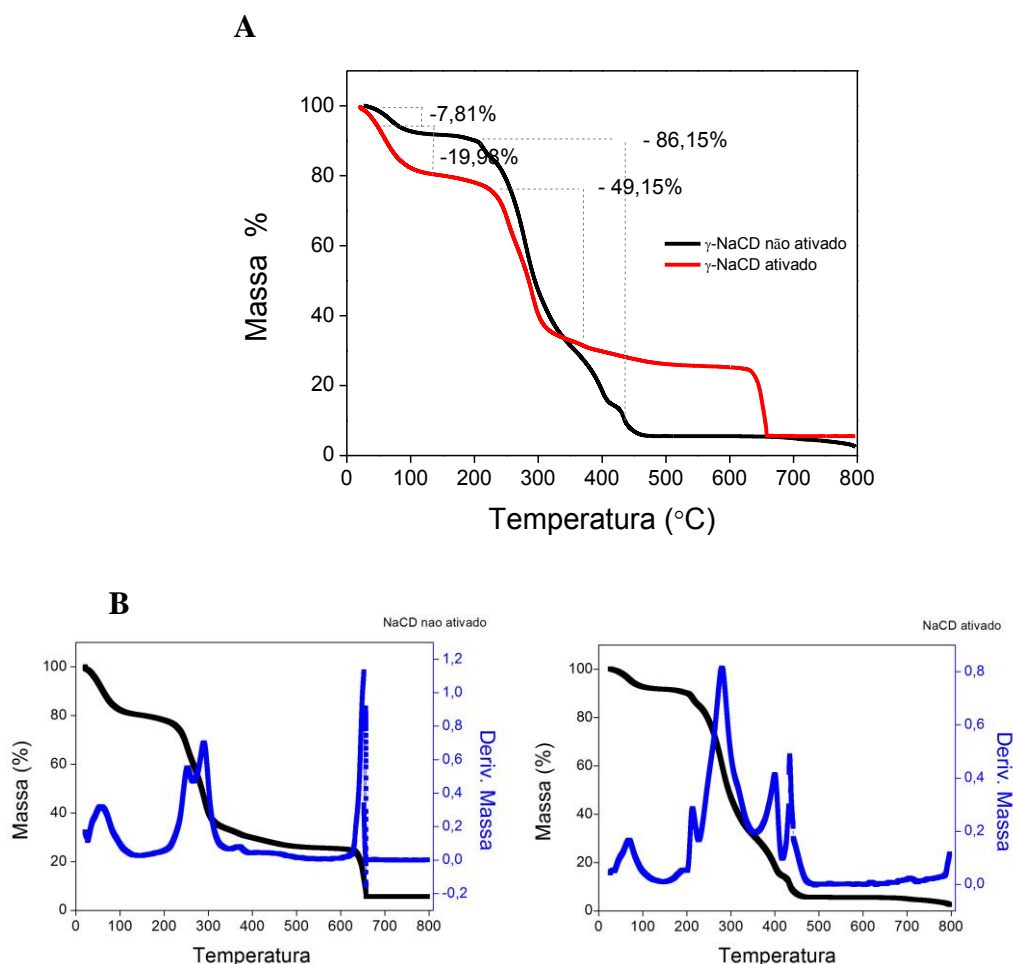


As curvas termogravimétricas do γ -KCD não ativado e ativado mostraram-se muito semelhantes, variando principalmente a quantidade de perda de massa orgânica e a faixa de temperatura em que esse evento ocorre. A curva termogravimétrica do γ -KCD mostrou duas perdas de massa: a primeira (12.94%), em torno de 104°C e a segunda (58.7%) em torno de 245°C. Já o γ -KCD após a ativação mostrou a primeira perda de massa (16.37%) em torno de

116°C e a segunda (49%) em aproximadamente 220 °C. As primeiras correspondem à perda de água de hidratação e as segundas à decomposição da amostra. É possível observar que γ -KCD sem ativação teve uma maior perda de massa orgânica que o material ativado, isso se deve a presença de solvente orgânico no interior dos poros destes materiais que foram liberados após a ativação.

A Figura 16 apresenta as TGS das γ -NaCD antes e após a ativação.

Figura 16: Curvas termogravimétricas (A) e suas derivadas (B) do γ -NaCD antes e depois da ativação com DCM.

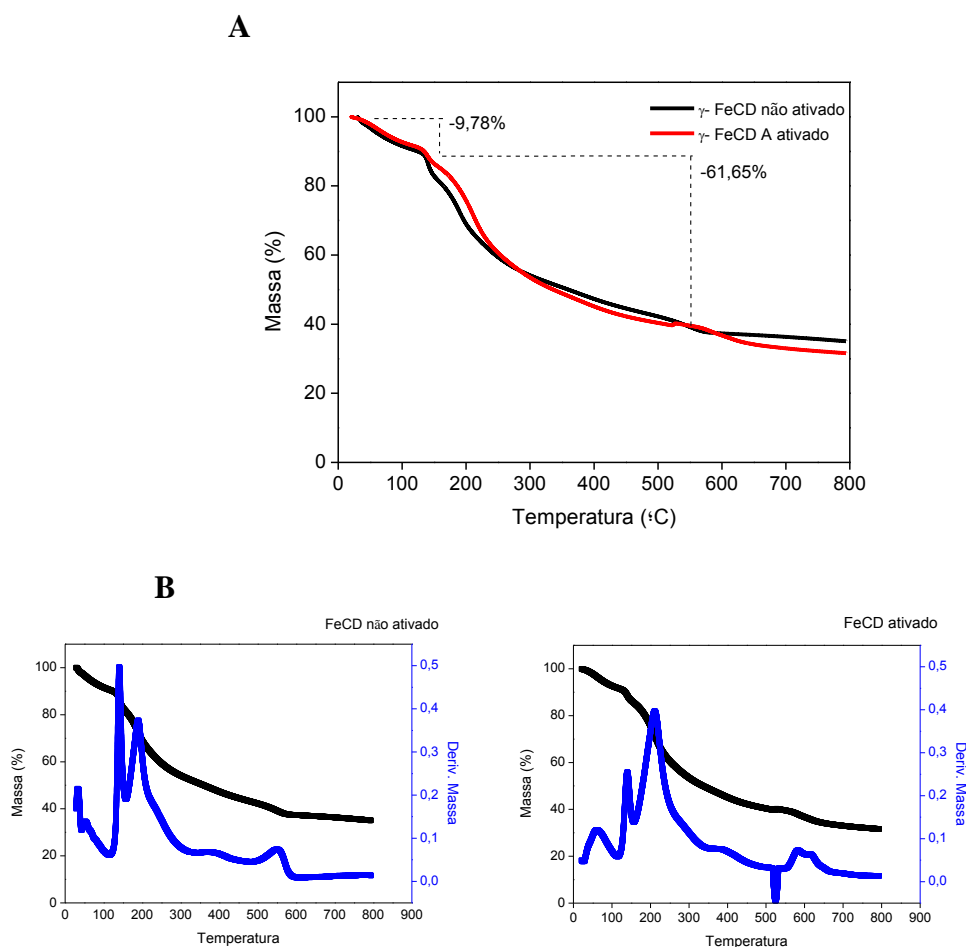


A análise termogravimétrica da rede metalo-orgânica do γ -NaCD não ativada mostrou duas perdas de massa: a primeira (7.81%), em torno de 61°C e a segunda (86.15%) em torno de 260°C. Já o γ -NaCD após a ativação mostrou a primeira perda de massa (19.98%) em torno de 113°C e a segunda (49.15%) em aproximadamente 196°C. As primeiras correspondem à

perda de água de hidratação e as segundas a decomposição da amostra. Ficou evidente nesta análise que a rede metalo-orgânica não ativada teve maior perda de massa orgânica que o material ativado, e isso pode ser explicado pela presença de solventes orgânicos no interior dos poros, que são resquícios da síntese do material, e que foram liberados após a ativação.

A Figura 17 apresenta as TGS das γ -FeCD antes e após a ativação.

Figura 17: Curvas termogravimétricas (A) e suas derivadas (B) do γ -FeCD antes e depois da ativação com DCM.

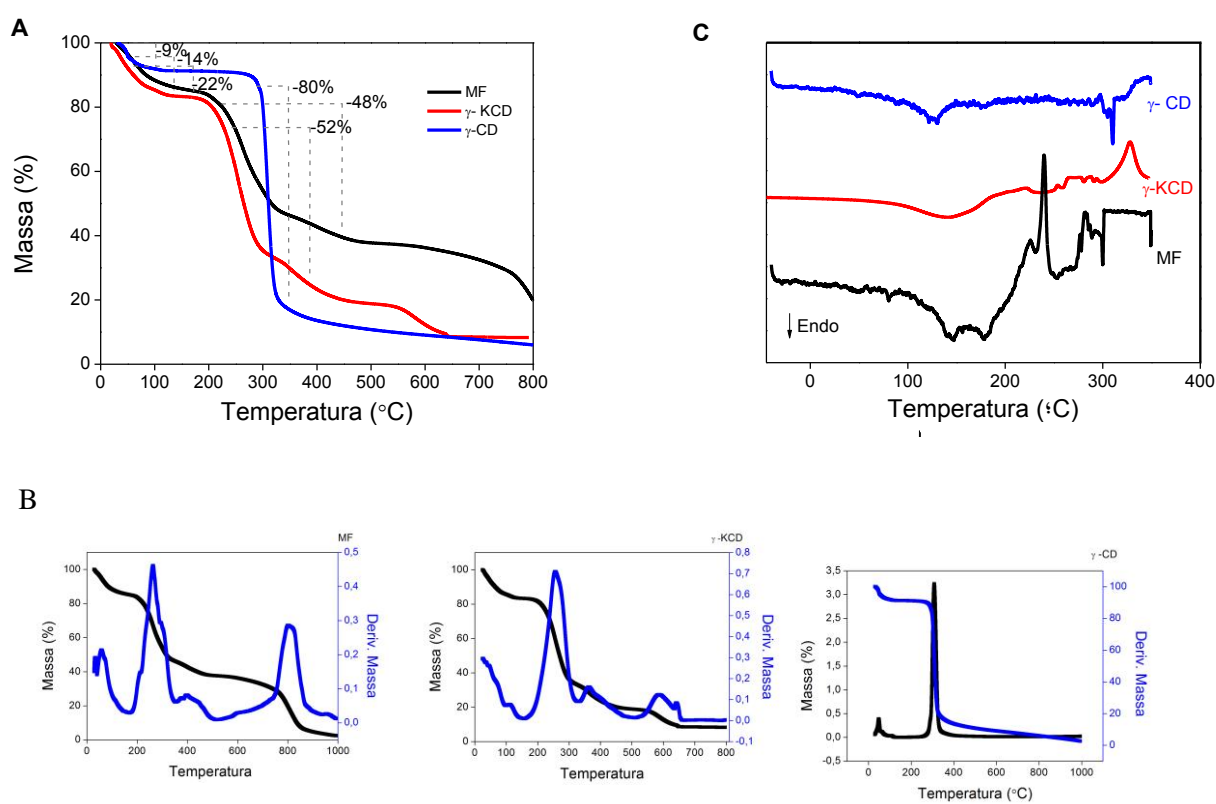


A análise termogravimétrica da rede metalo-orgânica γ -FeCD ativada e γ -FeCD não ativada apresentaram o mesmo comportamento. A primeira perda de massa (9.78%), em torno de 133°C e a segunda (61.65%) em torno de 543°C. A primeira corresponde à perda de água de hidratação e a segunda a decomposição da amostra. Ficou evidente nesta análise que a rede metalo-orgânica ativada e a não ativada não tiveram diferenças de porcentagem de perda de

massa orgânica, o que pode indicar a baixa presença de resquícios de solventes no interior dos poros deste material antes mesmo da sua ativação.

Posteriormente foram comparadas as MOFs desenvolvidas com a mistura física de seus componentes e com a ciclodextrina pura. A Figura 18 apresenta as TG e os DSC da γ -KCD, da mistura física dos seus componentes (ciclodextrina e KOH) e da ciclodextrina pura.

Figura 18: Curva de TG (A), suas derivadas (B) e DSC (C) da rede metal orgânica γ -KCD, mistura física entre ciclodextrina e KOH e γ -Ciclodextrina



A análise da curva TG da γ -CD representada na Figura 18A mostra que na faixa de temperatura de 32- 104°C ocorreu um evento de perda de massa de 9% atribuído à liberação de moléculas de água a partir da cavidade da ciclodextrina, o que pode ser confirmado com os resultados de DSC. Em seguida, foi possível verificar um patamar de estabilidade térmica, entre 94-265 °C. Na faixa de temperatura 276°C- 358°C ocorreu uma perda de massa de 80%, relacionada a rápida fusão/ decomposição da γ -CD. Em seguida ocorre a perda de massa referente ao final de sua decomposição.

Na curva de DSC, mostrada na Figura 18C, da γ -CD exibiu um evento endotérmico na faixa de temperatura 112-137°C, que pode estar relacionado à desidratação da molécula. Na faixa de temperatura 294- 316°C ocorreu um evento endotérmico característico da fusão da molécula, seguido de sua termodecomposição e eliminação do material carbonáceo.

A curva de TG da MF mostrou que a primeira perda de massa (14%) ocorreu entre 29-106°C, referente à liberação das moléculas de água a partir da cavidade da γ -CD. A segunda perda de massa (48%) ocorreu entre 192-453°C referente às perdas de massa de decomposição inicial tanto do KOH quanto da γ -CD, apresentando um percentual inferior quando comparado com a γ -KCD, o que pode indicar uma baixa interação entre as moléculas de ciclodextrina e o metal potássio. As demais perdas correspondem à decomposição final dos materiais.

Pela curva de DSC da MF pode-se observar um evento endotérmico na faixa de temperatura 132-149°C, devido à desidratação da estrutura molecular da γ -CD, de forma mais acentuada em relação aos eventos térmicos das redes metalo-orgânicas. Isso provavelmente ocorre por apresentar pouca interação entre o metal e a ciclodextrina.

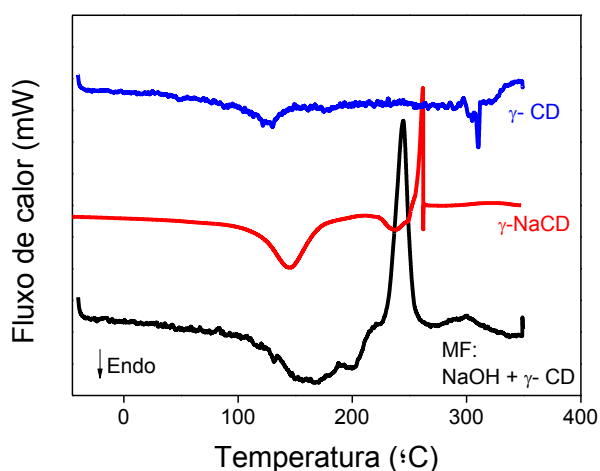
A curva TG da γ -KCD mostra um aumento da perda de massa entre 38-119°C quando comparado à mistura física, indicando saída de moléculas de água de solvatação da cavidade da rede formada. É possível também observar que a γ -KCD apresenta percentuais maiores de perda de massa (52%) na faixa de temperatura de 221- 413°C, indicando maior estabilidade desses sistemas quando comparados à mistura física. A partir de 413°C ocorre perda de massa referente à decomposição térmica dos componentes e liberação de material carbonáceo.

A curva de DSC da γ -KCD mostrou-se diferente da MF e da matéria prima ciclodextrina. O primeiro evento endotérmico, que ocorre na faixa de temperatura 112- 179°C se refere à desidratação da ciclodextrina. Na faixa de temperatura 220- 263°C ocorreu um evento endotérmico característico da fusão da γ -KCD, seguido de sua termodecomposição e eliminação do material carbonáceo seguida então pela fusão do material e degradação do mesmo. Como principais mudanças indicativas da formação de redes metalo-orgânicas determinados por DSC pode-se citar mudança na intensidade do evento endotérmico

referentes a desidratação da ciclodextrina e alteração na temperatura de fusão da rede composta pela ciclodextrina e pelo metal potássio.

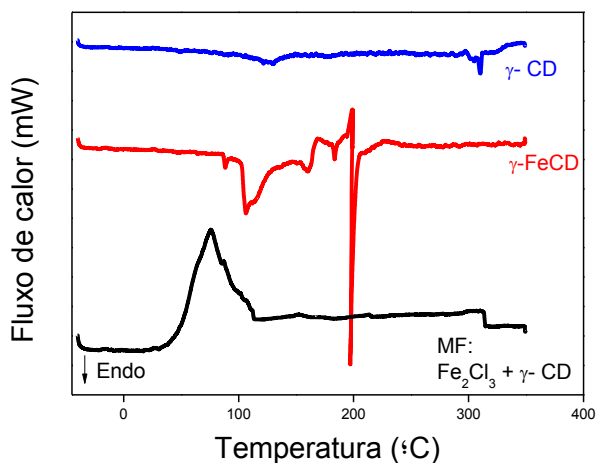
As curvas de DSC das amostras γ -NaCD e γ -FeCD comparada com as misturas físicas dos respectivos reagentes estão apresentadas nas Figuras 19 e 20.

Figura 19: Curvas de DSC da ciclodextrina, da mistura física entre ciclodextrina e NaOH (MF NaCD) e da rede metal orgânica a base de ciclodextrina e sódio (NaCD)



As curvas de DSC das misturas físicas permitem observar na Figura 19 um evento endotérmico na faixa de temperatura 130-180°C (MF NaCD) devido à desidratação da estrutura molecular da γ -CD, de forma mais acentuada em relação aos eventos térmicos das redes metal-orgânicas. Isso provavelmente ocorre por apresentar pouca interação entre o metal e a ciclodextrina. A curva de DSC da γ -NaCD mostrou-se diferente da MF e da matéria prima ciclodextrina. O primeiro evento endotérmico, que ocorre na faixa de temperatura 118-187 °C, se refere à desidratação da ciclodextrina. Na faixa de temperatura 215- 235°C ocorreu um evento endotérmico característico da fusão da γ -NaCD, seguido de sua termodecomposição e eliminação do material carbonáceo seguida então pela fusão do material e degradação do mesmo. É possível afirmar que a mudança na intensidade do evento endotérmico referente a desidratação da ciclodextrina e a alteração na temperatura de fusão da rede composta pela ciclodextrina e o sódio são as principais mudanças indicativas da formação das redes metal-orgânicas.

Figura 20: Curvas de DSC da ciclodextrina, da mistura física entre ciclodextrina e $\text{Fe}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MF FeCD) e da rede metalo-orgânica a base de ciclodextrina e ferro (FeCD)

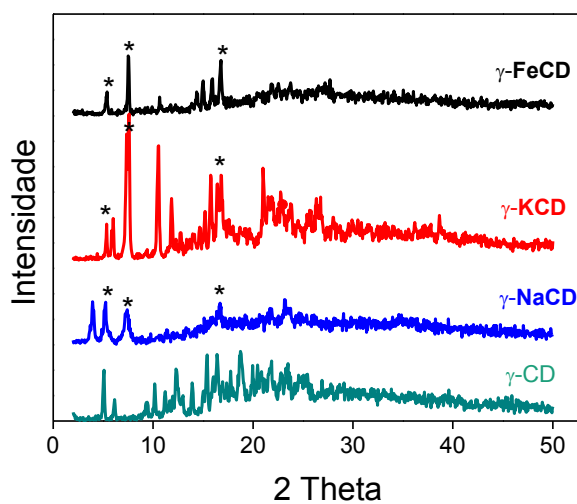


A curva de DSC da MF FeCD permite observar na Figura 20 um evento exotérmico, na faixa de temperatura 42-112°C, referente a cristalização do material, seguida da decomposição do mesmo. Esse comportamento diferente das outras amostras supostamente ocorre pelo fato de que a matéria prima utilizada ($\text{Fe}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) é extremamente higroscópica, o que influencia no comportamento da curva. A curva de DSC da γ -FeCD mostrou-se diferente da MF e da matéria prima ciclodextrina. O primeiro evento endotérmico, que ocorre na faixa de temperatura 93- 101°C, se refere a desidratação da ciclodextrina. Na faixa de temperatura 105- 132°C ocorreu um evento endotérmico característico da fusão da γ -FeCD, seguido de sua termodecomposição e eliminação do material carbonáceo seguida então pela fusão do material e degradação do mesmo. Como principais mudanças indicativas da formação de redes metalo-orgânicas determinados por DSC pode-se citar mudança na intensidade do evento endotérmico referentes a desidratação da ciclodextrina e alteração na temperatura de fusão da rede composta pela ciclodextrina e pelo ferro.

5.2.5. Difração de Raios X

A Figura 21 apresenta os difratogramas de raios X das diferentes MOF a base de γ -CD comparando-as com a ciclodextrina pura.

Figura 21: Difração de Raios X das redes metalo-orgânicas e da γ -ciclodextrina



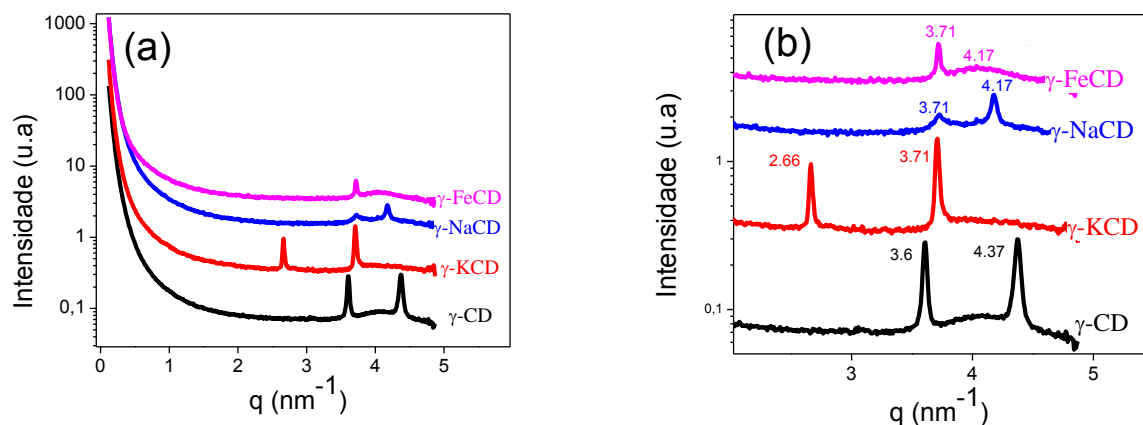
Através dos difratogramas de raios X das MOFs é possível observar que todas as amostras apresentam picos intensos e bem definidos, característicos de material cristalino. As MOFs formadas apresentam os principais picos identificados em $2\theta = 5.3^\circ$, 7.4° e 16.6° . Todos esses picos identificados correspondem a rede metalo-orgânica a base de ciclodextrina, CD-MOF, descritos anteriormente na literatura (SMALDONE *et al.*, 2010).

5.2.6. Espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) detecta o espalhamento dos raios X em ângulos θ entre 0.1° e 10° , que está relacionado a distâncias interplanares com dimensões nanométricas, sendo eficaz para detecção da presença de poros nas redes do material (DONG E BOYD, 2011).

A Figura 22A apresenta as curvas de SAXS da γ -CD e das MOFs. Para uma melhor visualização a Figura 22B apresenta as mesmas curvas, mas numa região de q maior.

Figura 22: Curvas de SAXS da γ -CD e das MOFs (a) e as mesmas curvas representadas em uma região de q maior (b).



As MOFs apresentam dois picos bem definidos, o que pode estar relacionado ao espalhamento dos raios X pelos poros ordenados presentes no material. A curva de SAXS para a ciclodextrina também apresenta picos bem definidos que podem resultar do espalhamento dos raios X pelas cavidades presentes no interior das estruturas. A relação entre as posições dos picos em q não coincide com a fase cristalina da ciclodextrina relatada pela literatura, o que nos leva a supor que tanto para a ciclodextrina quanto para as MOFs a presença destes picos se relaciona com o espalhamento pelos poros. Esse fato é ainda reforçado pelo deslocamento dos picos da γ -KCD ativada para menores valores de q sugerindo que a desobstrução dos poros causa um aumento da área livre dos mesmos (ZHAO *et al.*, 2011).

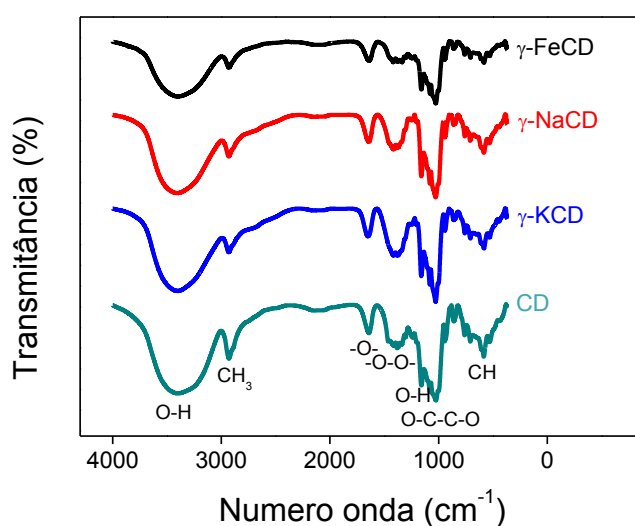
5.2.7. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV):

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi empregada para verificar através das bandas de absorção na região do infravermelho, se ligação entre a ciclodextrina e o metal utilizado ocorreu. Posteriormente, o espectro da MOF formada foi

comparado com o espectro do fármaco modelo utilizado para a encapsulação, o diclofenaco de sódio.

Os espectros obtidos para as MOFs formadas e a ciclodextrina pura estão apresentados na Figura 23.

Figura 23: Espectro vibracional na região do infravermelho das amostras γ -KCD, γ -NaCD, γ -FeCD e γ -CD pura.



Observando os espectros obtidos, podemos identificar as principais bandas de absorção na região do infravermelho, referentes as ligações presentes na γ -CD, na sendo elas: a banda larga centrada 3400 cm^{-1} referente ao O-H de associação polimérica; a banda de 2932 cm^{-1} referente a C-H; a banda 1652 cm^{-1} referente a ligação oxo cíclica; a banda 1386 cm^{-1} referente a C-O; a banda de 1023 cm^{-1} referente a ligação - OCCO-; e a banda 591 cm^{-1} referente a CH_2 com deformação angular de cadeia.

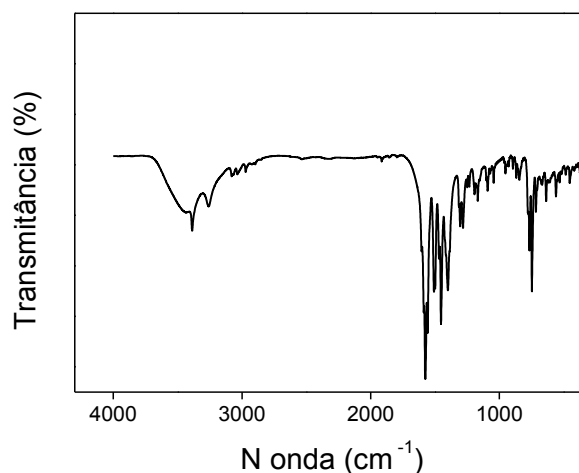
Os espectros das MOFs mostram que as amostras apresentam uma banda em torno de 3400 cm^{-1} e que pode ser associada a vibrações de grupos OH. A presença de bandas de vibrações relacionadas a estiramento carbono-hidrogênio (C-H) em aproximadamente 2930 cm^{-1} também é observada nos espectros de todas as amostras. Bandas relacionadas ao

estiramento carbono- oxigênio C-O-C, típicas de grupos éteres, são observadas em torno de 1652 cm^{-1} .

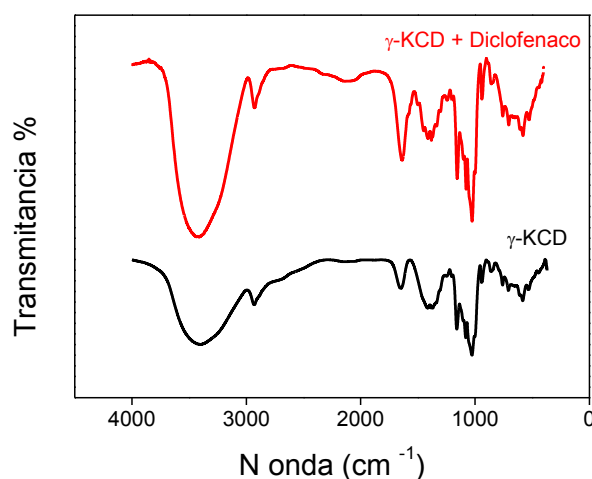
As MOFs γ - KCD, γ -NaCD e γ -FeCD apresentam as bandas nas mesmas regiões que a γ -CD, que correspondem aos mesmos grupos funcionais observados, mas em alguns casos apresentando alargamento ou estreitamento de bandas específicas. O espectro mostra o estreitamento das bandas de estiramento das MOFs referente a ligação – OCCO –, quando comparada com a banda da γ -CD. O estreitamento da banda sugere uma relação da quebra da ligação de hidrogênio para a formação da ligação entre a ciclodextrina e o metal com a formação da rede metalo-orgânica. Também é possível observar um alargamento das MOFs em relação a γ -CD na banda 591 cm^{-1} referente a CH_2 com deformação angular de cadeia, o que supostamente está relacionado com a modificação conformacional da molécula após a formação da ligação metal-ciclodextrina.

Após a encapsulação do fármaco modelo, diclofenaco de sódio, foi feita uma nova análise de infravermelho para confirmar a presença do fármaco na rede metalo- orgânica.

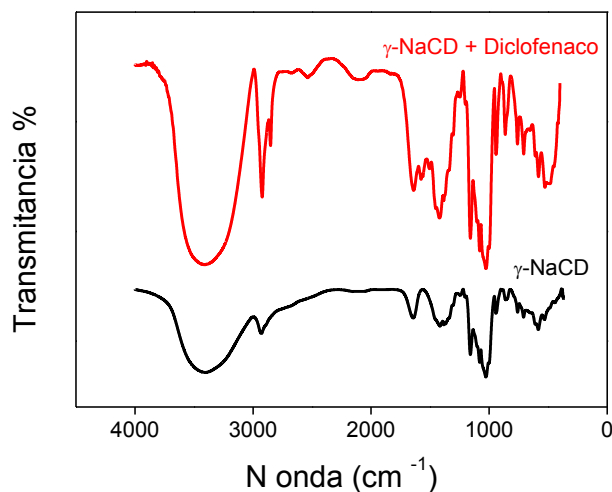
O espectro do fármaco modelo, diclofenaco de sódio, se encontra na Figura 24.

Figura 24: Espectro de infravermelho do diclofenaco de sódio

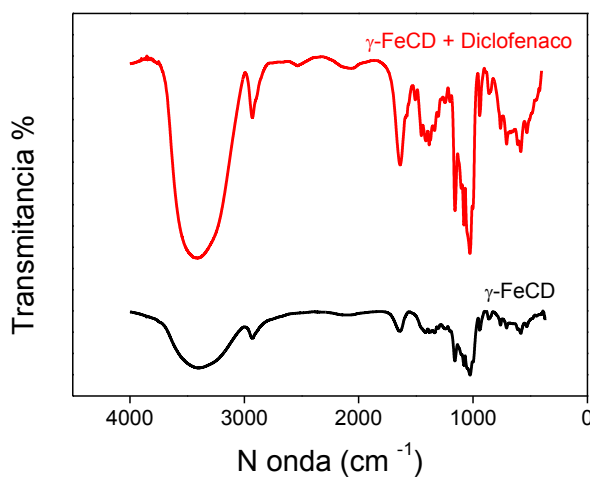
Os espectros das MOFs a base de ciclodextrina e diferentes metais (γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD) após a encapsulação estão demonstrados nas Figuras 25, 26 e 27.

Figura 25: Espectro de infravermelho do γ -KCD e γ -KCD após encapsulamento do diclofenaco de sódio

É possível observar, com a Figura 25, que a rede metalo-orgânica após o encapsulamento do fármaco apresenta a maioria das bandas nas mesmas regiões que a γ -KCD inicial, o que correspondem aos mesmos grupos funcionais observados. Nota-se que existem novas bandas, também presentes no espectro de infravermelho do fármaco, como $2547,4 \text{ cm}^{-1}$, 2109 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} e 1462 cm^{-1} , que sugerem a presença do fármaco na amostra analisada.

Figura 26: Espectro de infravermelho do γ -NaCD e γ -NaCD após encapsulamento do diclofenaco de sódio

A Figura 26 mostra que a rede metalo-orgânica após o encapsulamento do fármaco apresenta a maioria das bandas nas mesmas regiões que a rede metal orgânica γ -NaCD inicial. No entanto, identifica-se algumas bandas presentes no espectro de infravermelho do fármaco, como 2842,69 cm⁻¹, 2547,4 cm⁻¹, 2109 cm⁻¹, 1578,3 cm⁻¹ e 1500 cm⁻¹.

Figura 27: Espectro de infravermelho do γ -FeCD e γ -FeCD após encapsulamento do diclofenaco de sódio

Observa-se na Figura 27 que a rede metalo-orgânica após o encapsulamento do fármaco apresenta a maioria das bandas nas mesmas regiões que a rede metal orgânica inicial que correspondem aos mesmos grupos funcionais observados. Além disso, é possível identificar bandas presentes no espectro de infravermelho do fármaco, como $2547,4\text{ cm}^{-1}$, 2109 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} e 1462 cm^{-1} .

Desta maneira, através das Figuras 25, 26 e 27, foi possível confirmar a presença do fármaco diclofenaco de sódio nas redes metalo-orgânicas após a etapa encapsulação.

5.2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

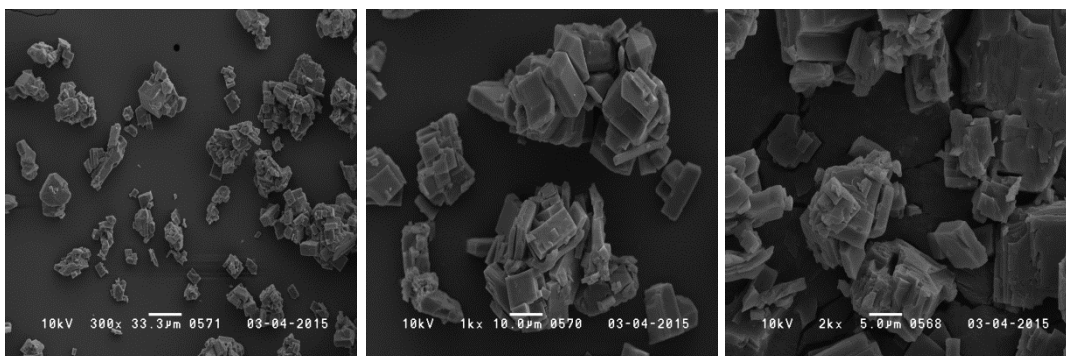
Nas Figuras de 28 a 32 são mostradas as micrografias obtidas por MEV das amostras γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD.

Figura 28: Micrografia obtida por MEV das γ -KCD antes da ativação.



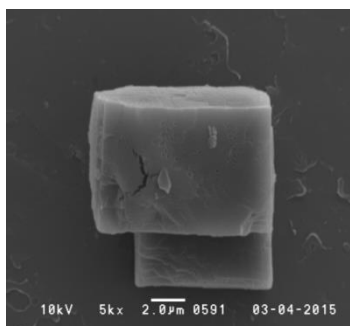
As imagens mostram que γ -KCD obtida antes da ativação se encontra recoberta por uma capa de solventes, e conseqüentemente se encontram agregadas. No entanto, o mesmo material, apresentado anteriormente foi analisado após o processo de ativação com diclorometano, como está mostrado na Figura 29.

Figura 29: Micrografia obtida por MEV das γ -KCD após a ativação com diclorometano.



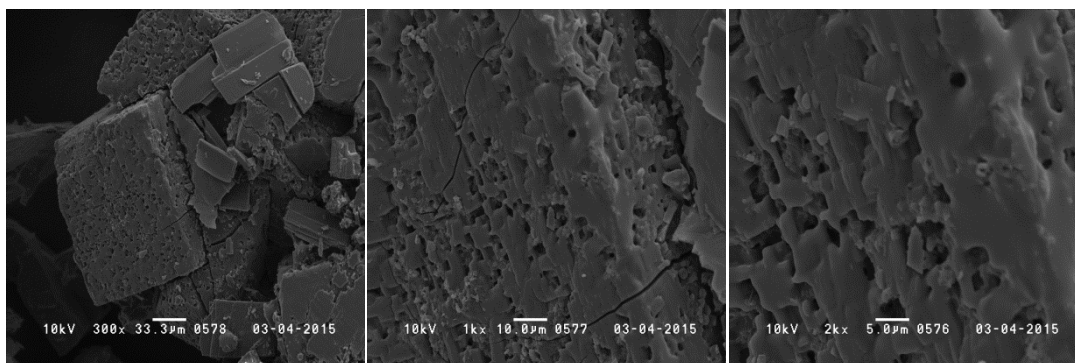
A Figura 29 mostra o material após a ativação e comprova que o processo de liberação dos poros foi feito com sucesso, removendo o solvente superficial sem desestruturar o cristal. A forma geométrica do material é melhor visualizada na Figura 30, por apresentar uma unidade isolada do cristal.

Figura 30: Micrografia obtida por MEV da estrutura cúbica das γ -KCD

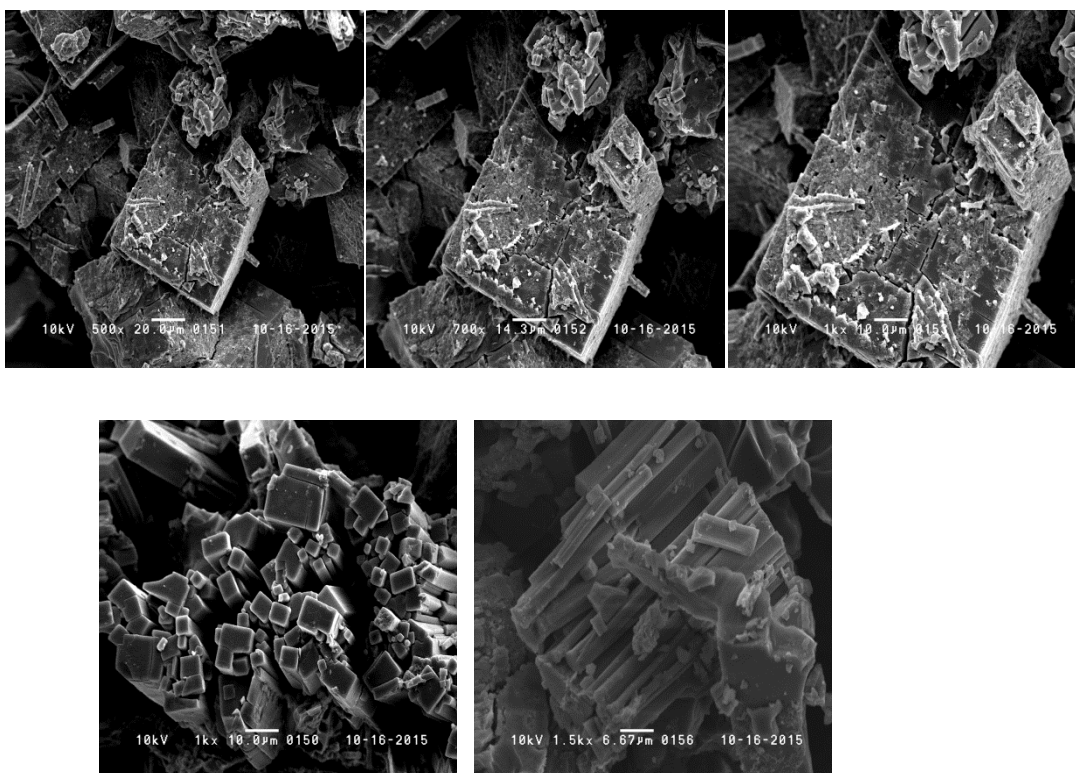


Através da Figura 30 é possível evidenciar a formação de cristais em forma cúbica.

A micrografia da γ -NaCD ativada permite observar claramente os poros na estrutura formada, como mostra a Figura 31.

Figura 31: Micrografia obtida por MEV das γ -NaCD ativadas

Através da Figura 31 afirma-se que os cristais sintetizados a base de ciclodextrina e sódio, após a ativação, apresentam forma cúbica com alta porosidade na superfície. A micrografia da γ -FeCD ativada está apresentada na Figura 32.

Figura 32: Micrografia obtida por MEV das γ -FeCD ativada.

É possível observar, através da microscopia eletrônica de varredura, que os cristais formados a base de ciclodextrina e ferro apresentam-se na forma de bastões e também fica evidente a porosidade na superfície do material.

A forma geométrica que cada rede metalo- orgânica apresenta, com presença de poros, visíveis nas micrografias, confirmam que os materiais são promissores para a incorporação e liberação de fármaco, sendo capazes de armazená-lo e liberá-lo de forma regular.

5.2.9. Análise das isotermas de adsorção/ dessorção de Nitrogênio

A área superficial específica (S_{BET}), o volume do poro (V_p) e o diâmetro médio do poro (D) de cada material foram determinados pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller). O volume total de poros foi calculado de acordo com a quantidade de N_2 que foi adsorvida a uma pressão relativa de aproximadamente 0.98mmHg. Por fim, o diâmetro médio do poro foi calculado como sendo quatro vezes o volume total do poro dividido pela S_{BET} .

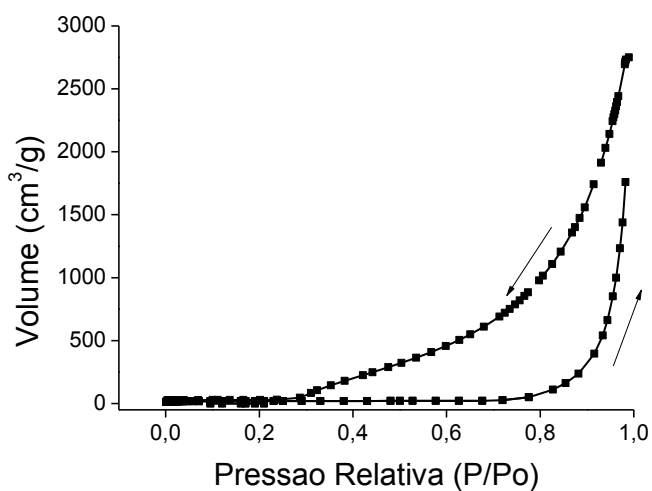
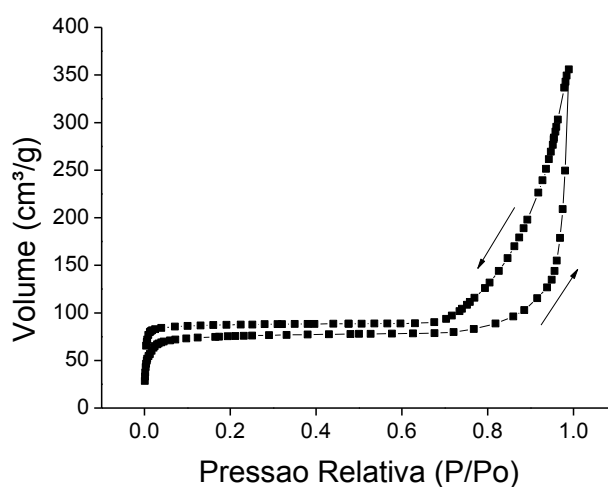
A tabela 5 mostra os tamanhos dos poros da amostra γ -KCD antes e depois do processo de ativação, com o objetivo de analisar a mudança que essa etapa da síntese realmente proporciona na desobstrução dos poros.

Tabela 5: Tamanho dos poros (Å) de γ -KCD antes e depois da ativação

	Tamanho do poro (Å)
γ-KCD não ativada	24,34
KCD ativada	156,91

O tamanho do poro após a ativação aumentou mais de 6 vezes, o que confirma que o processo de ativação é muito importante para desobstruir os poros e liberá-los dos solventes restantes da síntese. Com os poros livres, o material, classificado como mesoporoso, se torna muito mais promissor para encapsulação e liberação do fármaco.

Nas Figuras 33 e 34 estão representados os resultados obtidos por adsorção/dessorção de nitrogênio, da amostra γ -KCD, através das isotermas.

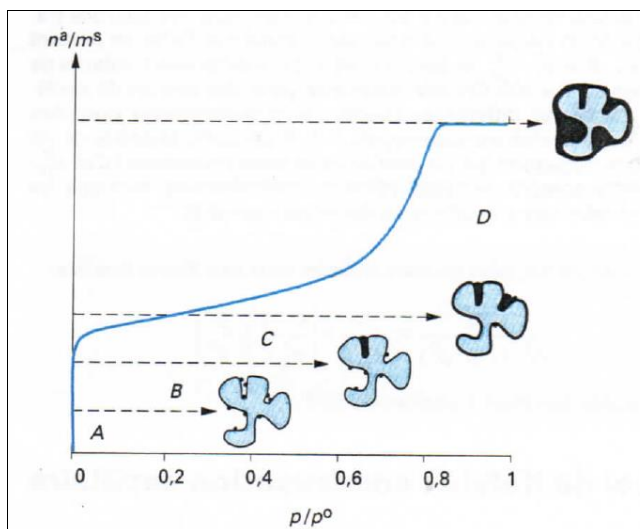
Figura 33: Isoterma de adsorção/ dessorção de N₂ da amostra γ -KCD não ativada**Figura 34:** Isoterma de de adsorção/ dessorção de N₂ da amostra γ -KCD ativada

Na Figura 33 a isoterma é do tipo III, segundo a classificação da IUPAC (Sing *et al.*, 2013). A isoterma tipo III ocorre mais raramente e se difere pela pressão muito baixa. A mudança de curvatura da isoterma de adsorção ocorre devido a interação sólido/líquido (adsorvante/ adsorvato) serem muito baixas, ou seja, as moléculas do adsorvato apresentam maior interação entre si do que com o sólido. Essa dificuldade de interação entre o adsorvante

e o adsorvato pode ser explicada pelo fato de que os poros da rede metal orgânica estarem obstruídos por solventes ou água que restaram do processo de síntese do material.

Na Figura 34 a isoterma é do tipo IV segundo a classificação da IUPAC (Santilli e Pulcinelli, 1993). Diferentemente da isoterma do γ -KCD sem ativação, mostrada na Figura 28, a isoterma do γ -KCD ativado mostra uma interação entre o adsorvante e adsorvato. A isoterma tipo IV tem a mesma aparência da isoterma tipo II que é caracterizada pelo aumento muito progressivo da quantidade de gás adsorvido em função da pressão relativa baixa; para pressões relativamente mais elevada é caracterizado por um nível de saturação, cujo comprimento é muito variável (por vezes reduzida a um ponto de inflexão). Esta isoterma é obtida com sólidos mesoporosos em que ocorre uma condensação capilar. A dessorção do azoto condensado por capilaridade em mesoporos não é reversível e há geralmente uma histerese de dessorção em relação a adsorção.

A isoterma tipo IV pode ser interpretada através da sua subdivisão em domínios, como mostra a Figura 35. Primeiramente a rede metalo-orgânica é colocada em contato com o gás, sendo que anteriormente o material foi degasado. A adsorção que ocorre em um primeiro contato é rápida porque a pressão relativa é muito baixa (domínio A). No domínio B a pressão relativa baixa atinge microporos em um auto equilíbrio relativo. No domínio C a adsorção monomolecular ocorre, pode-se considerar que estatisticamente a superfície deste sólido é coberta por uma camada de moléculas adsorvidas. No domínio D a superfície do sólido é coberta por uma camada que engrossa progressivamente e a adsorção é multimolecular. Depois de determinada pressão, pode-se observar no domínio D um aumento mais rápido da adsorção devido a um fenômeno de condensação capilar, e este fenômeno já ocorre nos mesoporos. Quando a pressão do gás chega a pressão de vapor saturada ($p/p_0=1$) o gás se liquefaz e a quantidade de substancia gasosa que parte do meio reacional tende ao infinito.

Figura 35: Modelo de isoterma de adsorção física composta

A histerese é ocasionada pelo fenômeno de condensação capilar, que frequentemente ocorre quando os gases se condensam em sólidos mesoporosos. Inicialmente, o gás é adsorvido nos poros a uma baixa densidade, visto que as forças de atração são maiores e porque há uma proximidade entre as moléculas dentro dos poros. Após uma quantidade de gás adsorvido, ele condensa espontaneamente para um estado líquido dentro dos poros. Em alguns casos, o líquido adsorvido pode ser mais denso que o líquido não adsorvido, o que permite que grande quantidade de gás seja armazenada dentro do sólido poroso. No processo inverso, a evaporação pode ser dificultada pela formação do líquido e pelo formato dos poros. Esses fatores podem explicar a diferença das curvas de adsorção e dessorção. A condensação capilar pode ocorrer principalmente em mesoporos, porque quando as dimensões dos poros são muito pequenas ou muito grandes os fatores descritos se tornam desprezíveis (IUPAC 1997).

A histerese também pode ser classificada de acordo com o formato de seus gráficos de isoterma de adsorção, já que diferentes estruturas de rede de um adsorvente podem resultar em diferentes histereses. A histerese das amostras γ -KCD sem ativação e ativada, representadas pelas Figuras 34 e 35, tem um formato típico de uma mistura do tipo H1 e H3 da classificação da IUPAC. Essa mistura de formatos pode ser devido a presença de poros de diferentes geometrias.

Posteriormente foi feita a porosimetria da amostra γ -NaCD ativada, para comparar sua porosidade com a rede metalo-orgânica já caracterizada, descrita anteriormente. O

tamanho do poro da rede metal orgânica γ -NaCD é de 35,7 Å, e sendo assim, a γ -NaCD também é classificada como mesoporosa.

5.2.10. Avaliação da citotoxicidade

O efeito citotóxico gerado pelas MOFs foi avaliado na linhagem celular HepG2. As células HepG2 são células de hepatoma humano, metabolicamente ativas, empregadas em diferentes estudos por possuírem a capacidade de simular a função hepática de um organismo *in vitro*. Esta linhagem foi escolhida para este estudo, pois o fígado é um alvo frequente de carreadores que atingem a corrente sanguínea, e desta forma, são um modelo importante para avaliar a segurança das MOFs. Além disso, por serem células metabolizadoras, permitem a avaliação da citotoxicidade dos metabólitos das amostras.

Além de a linhagem ter sido submetida ao tratamento com as redes metal-orgânicas, também foi tratada com o ligante orgânico puro, a γ -ciclodextrina. Este procedimento teve como objetivo comparar o resultado da citotoxicidade do ligante orgânico, já conhecido na literatura por sua biocompatibilidade, com a rede metalo-orgânica formada.

As Figuras 36 a 39 apresentam gráficos de viabilidade celular do ensaio MTT.

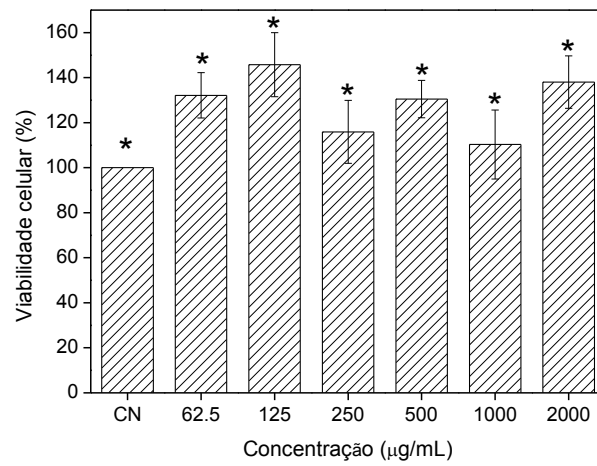
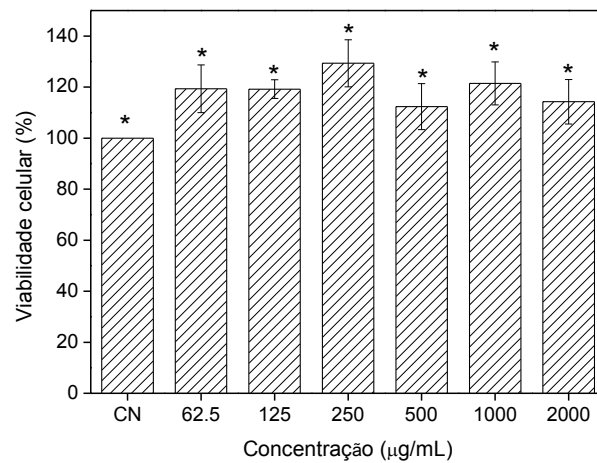
Figura 36: Avaliação da citotoxicidade promovida pela MOF γ -CD em células HepG2. (*) $P < 0.05$; ANOVA, Tukey.**Figura 37:** Avaliação da citotoxicidade promovida pela MOF γ -KCD em células HepG2. (*) $P < 0.05$; ANOVA, Tukey.

Figura 38: Avaliação da citotoxicidade promovida pela MOF γ -NaCD em células HepG2. (*) P<0.05; ANOVA, Tukey.

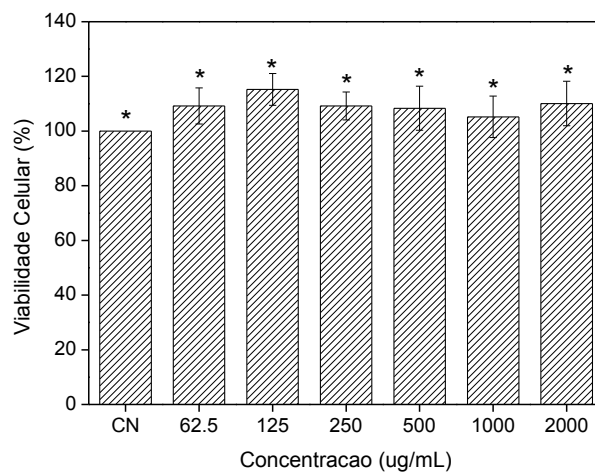
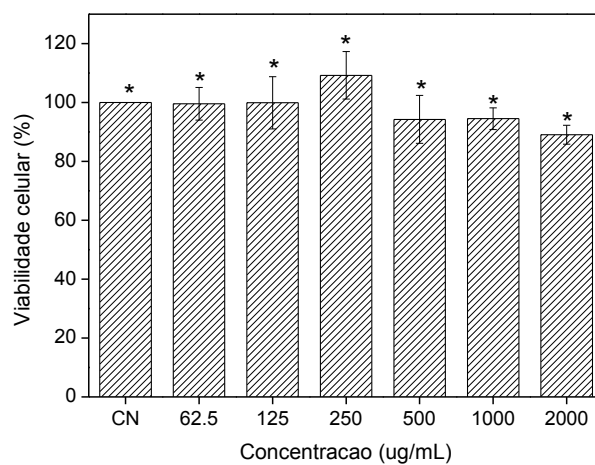


Figura 39: Avaliação da citotoxicidade promovida pela MOF γ -FeCD em células HepG2. (*) P<0.05; ANOVA, Tukey.



Nota-se que não houve redução da viabilidade celular para todas as MOFs. Testou-se separadamente a ciclodextrina e observou-se que ela sozinha também apresenta baixa citotoxicidade.

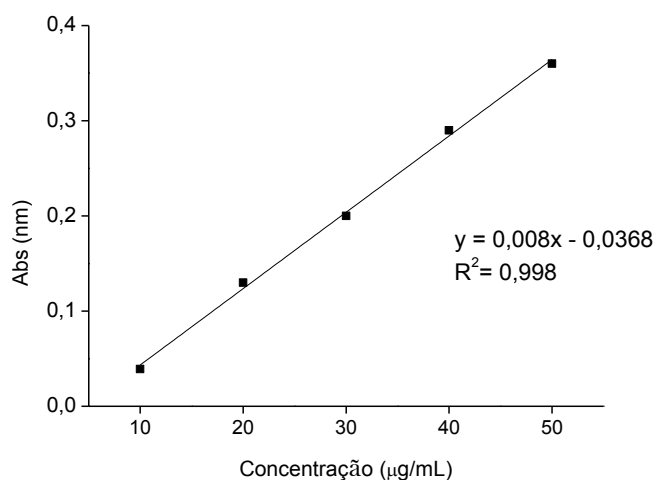
Os resultados e análises estatísticas mostraram que todas as MOFs avaliadas não apresentaram citotoxicidade significativa independente da concentração de MOF, sendo assim, as culturas celulares não sofreram modificações significativas comparadas ao controle negativo (ANOVA $p < 0.005$).

Portanto, é possível afirmar com o teste de citotoxicidade realizado, que as MOFs sintetizadas não apresentam citotoxicidade para o tipo de linhagem celular testada nas concentrações.

5.3. Eficiência de encapsulação

A quantidade de fármaco encapsulada foi relacionada de forma inversamente proporcional com a quantidade obtida na solução, que foi calculada a partir da curva analítica do diclofenaco de sódio. A curva analítica, mostrada na Figura 40, foi feita com o diclofenaco de sódio em meio (70% etanol: 30% água) nas concentrações: 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 40: Curva analítica do diclofenaco de sódio em etanol/água obtida por UV-Vis, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).



A equação obtida a partir da reta foi $y = 0,008x - 0,0368$ e o coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,998, indicando linearidade da curva analítica.

A mistura da MOF, fármaco diclofenaco de sódio e o solvente que permaneceram em agitação foi centrifugada, e analisada os seus sobrenadantes através de espectros de absorção UV/Vis, como previamente descrito.

A tabela 6 mostra a eficiência de encapsulação do diclofenaco de sódio após o contato durante 3 dias com as redes metalo-orgânicas γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD.

Tabela 6: Eficiência de encapsulação (EE%) obtidas com as formulações γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD contendo diclofenaco de sódio.

	MOFs		
	γ -KCD	γ -NaCD	γ -FeCD
EE ^a (%)	42	52	55,15

^amédia de três determinações

Através dos resultados de eficiência de encapsulação obtidos é possível concluir que quando a rede metalo-orgânica fica em contato em apenas 3 dias com o fármaco ocorre grande encapsulação do mesmo.

A eficiência de encapsulação foi relativamente alta, maior que 40% (massa:massa). A alta capacidade de encapsulação é importante porque a quantidade de materiais carreadores necessários para administrar e liberar a dose de fármaco pode ser reduzido proporcionalmente, e assim, a pesquisa apresenta clara vantagem para o conforto dos pacientes além de vantagens competitivas no ponto de vista industrial.

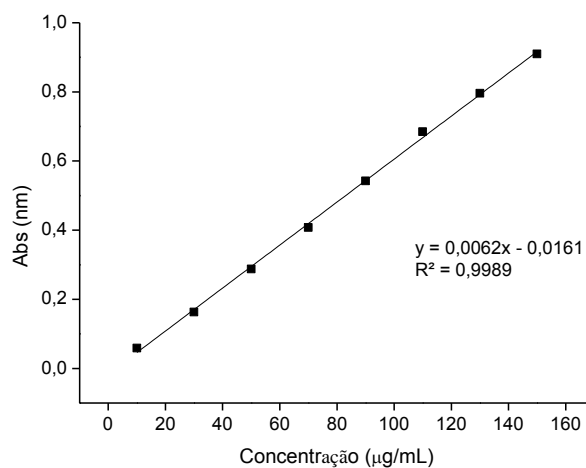
Na literatura são descritos trabalhos sobre a encapsulação de fármacos com carga superficial positiva e negativa que poderiam interagir com as nanopartículas que também possuem carga, através de interação eletrostática. Neste trabalho a rede metalo-orgânica formada não apresenta sítios carregados e, além disso, o fármaco não apresenta carga superficial. Desta maneira, o principal mecanismo envolvido foi a encapsulação física.

5.4. Determinação “in vitro” do perfil de liberação do diclofenaco de sódio

A quantidade de fármaco liberada foi relacionada proporcionalmente com a quantidade de fármaco presente no meio receptor, que foi calculada a partir da curva analítica do diclofenaco de sódio em PBS, obtida por UV/Vis, demonstrada na Figura 42. O coeficiente de correlação linear (R) maior que 0.99 demonstrou a linearidade do método na faixa de trabalho.

Com a finalidade de obter uma curva analítica entre às concentrações de 10µg/mL e 150µg/mL de diclofenaco de sódio, foi utilizado o meio PBS para a liberação. O procedimento foi realizado em triplicata, obtendo-se uma curva média, apresentada na Figura 41.

Figura 41: Curva analítica do diclofenaco de sódio em PBS obtida por UV-Vis, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).

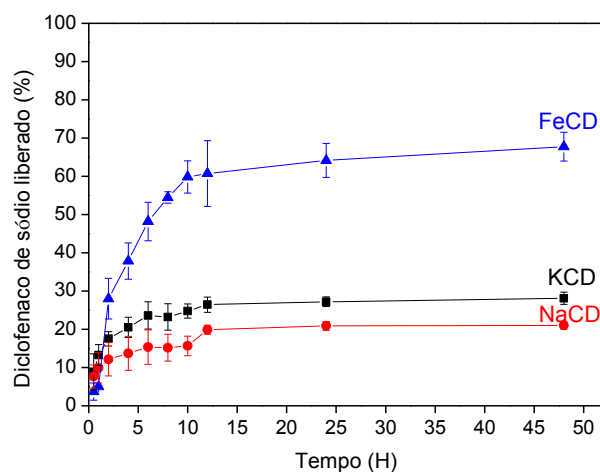


O estudo da liberação *in vitro* foi realizado com a intenção de quantificar o fármaco liberado da formulação em função do tempo. A elucidação do perfil de liberação do fármaco é importante para fornecer informações da estrutura do sistema, mecanismo envolvido no processo de liberação, interação fármaco- carreador e como uma ferramenta do controle da qualidade.

Uma das vantagens da utilização do método de diálise é a garantia das condições *sink* durante a liberação. Baseando-se na solubilidade de 6 mg.g^{-1} do DF Na^+ em PBS pH 7,4 encontrada pelos pesquisadores (Zahedi e Lee, 2007), a quantidade de fármaco utilizada não ultrapassou 20% deste valor, para garantir a “sink conditions” do experimento. O fármaco dissolvido após a liberação difunde facilmente pela membrana de diálise até que seja atinja o equilíbrio entre os dois compartimentos (Levy e Benita, 1990).

Os perfis de liberação das diferentes composições de MOFs com fármaco são apresentados na Figura 42.

Figura 42: Perfis de liberação do diclofenaco de sódio liberada ao longo do tempo para as MOFs γ -KCD, γ -NaCD e γ -FeCD.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 42, observa-se que não ocorreu a liberação completa do fármaco livre durante o período do teste (48h), ressaltando-se que o retardamento da liberação do fármaco pode ser explicada pela estrutura porosa do material.

O ensaio de liberação mostrou que mais de 50% do fármaco foi liberado da γ -FeCD durante 8 horas de ensaio, sendo que em γ -KCD e γ -NaCD apenas cerca de 20% de fármaco foi liberado neste mesmo período. Sendo assim, podemos afirmar que as MOFs constituídas pelos metais sódio e potássio liberam o fármaco em proporção similar e em menor quantidade

quando comparada com a MOF constituída pelo metal ferro, e este comportamento pode ser associado à estrutura das MOFs (Cury *et al.*, 2009).

A interpretação quantitativa dos valores obtidos através de um ensaio de liberação é facilitada pelo uso de equações que traduzem matematicamente a curva de dissolução em função de alguns parâmetros relacionados a forma farmacêutica, e desta maneira, podem contribuir para o esclarecimento do mecanismo que ocorre a liberação do fármaco.

Diversos fatores podem influenciar a cinética de liberação, entre eles o tipo de fármaco, tamanho da partícula, grau de cristalinidade, forma da matriz, quantidade incorporada. A escolha do melhor modelo matemático de liberação pode ser baseada no valor do coeficiente de correlação "r²".

Foram aplicados diferentes modelos matemáticos aos dados de liberação (Figura 42): Higuchi, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdal, Korsmeyer-Peppas e Weibull(Costa e Lobo, 2001) com auxílio do software Sigma Plot 10.

Baseando-se no valor de r², o modelo que mais se adequou a liberação do diclofenaco de sódio foi o de Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer e Peppas, 1992). Neste modelo, a relação entre velocidade de liberação e o tempo é descrita na *Equação 2*.

$$M_t/M_{oo}=Kt^n + b$$

Equação 2

Onde: K é uma constante cinética, que incorpora características estruturais do mecanismo, n é o expoente de liberação que caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco, e a função de t é M_t/M_{oo} (liberação fracional do fármaco).

A tabela 7 relaciona os parâmetros da equação de Peppas obtidos para o ensaio de liberação do fármaco em PBS.

Tabela 7: Parâmetros da equação de Peppas para os dados de liberação *in vitro* das MOFs em PBS

MOF	R ²	K	n
KCD	0,93	39,76	0,74
NaCD	0,95	29,37	0,67
FeCD	0,93	28,76	2,05

Este modelo é utilizado com muita frequência para descrever a liberação do fármaco a partir de diversos tipos de sistemas de liberação modificada, que são resultados de combinações de dois ou mais processos aparentemente independentes, em que um é devido ao transporte do fármaco, e outro consequência do fenômeno de erosão do material. Portanto, nesta equação, além da difusão do fármaco, a erosão das redes é determinante na liberação do fármaco.

A cinética da liberação do diclofenaco de sódio das redes metalo-orgânicas foi avaliada pela equação Korsmeyer-Peppas que considera outros mecanismos de liberação não fikianos, como anômalo, caso II e super caso II. O valor do coeficiente n que pode ser calculado através da equação está relacionado ao tipo de liberação apresentado pela matriz, sendo difusão fikiana quando $n=0,43$, transporte anômalo quando $0,43 < n < 0,85$, transporte caso II quando $n=0,85$ e transporte super caso II quando $n > 0,85$ (AGNES E ORTEGA, 2003). Através da interpretação dos valores n resultantes para caracterizar o mecanismo de liberação, encontrados na tabela 7, verifica-se o diclofenaco de sódio é liberado a partir de γ -KCD e γ -NaCD por um mecanismo anômalo, dependente da difusão e da erosão, e partir de γ -FeCD ocorre uma alta velocidade de permeação do meio pela matriz, favorecendo o processo de erosão do sistema.

A capacidade de difusão é uma constante de proporcionalidade, que pode ser estabelecida em função da concentração ou de variáveis físicas que estão relacionados à estrutura do material, como a existência de volume livre entre as cadeias poliméricas, que permite a difusão do fármaco (FAN E SINGH, 1989).

Desta maneira, podemos concluir que a liberação de fármacos a partir das MOFs depende da dessorção do fármaco dos poros formados, difusão do fármaco através das redes, da erosão do material ou ainda da combinação dos processos de difusão e erosão.

6. CONCLUSÃO

A síntese das redes metalo-orgânicas realizadas neste trabalho, a base de ciclodextrina e variados metais, como o sódio, potássio e ferro, apresentaram rendimentos superiores a 60%, o que confirma a eficiência do método realizado. As MOFs possuem características mesoporosas e cristalinas.

As análises térmicas comprovaram a formação das redes metalo-orgânica. Através da análise termogravimétrica e a da calorimetria diferencial de varredura foi possível observar que houve a necessidade de uma temperatura diferente para decompor a rede formada, quando comparada com a sua forma livre e que os pontos de fusão das MOFs são diferentes dos seus componentes na forma de mistura física.

As medidas de condutividade revelaram que as redes metalo-orgânicas formadas não se dissociam em água, o que possibilita o uso destes materiais em meio biológico para a aplicação como carreador de fármaco.

Os difratogramas de raios X mostram a cristalinidade dos materiais sintetizados, e através das curvas de SAXS foi possível detectar a presença de poros nas suas estruturas.

A microscopia eletrônica de varredura comprova a porosidade do material, além de mostrar que estes se encontram em diferentes formas geométricas. É evidente a importância da ativação, visto que a liberação dos poros foi feito com sucesso, removendo o solvente superficial e sem desestruturar o cristal.

As redes metalo- orgânicas sintetizadas apresentam alta viabilidade celular, quando testadas com células HePG2, o que indica alta biocompatibilidade.

As MOFs sintetizadas apresentam características que favorecem a encapsulação do fármaco modelo nos seus poros e a espectroscopia de infravermelho revelou que as MOFs após a encapsulação apresentaram bandas referentes à deformação angular do diclofenaco de sódio, o que pode ser usado como indicativo da encapsulação do fármaco na estrutura das redes metalo-orgânicas. O fato de os materiais conseguirem incorporar cerca de 45% de

fármaco (massa : massa), pode o tornar ainda mais promissor para a sua aplicação como carreador.

Com base no perfil de liberação *in vitro* do diclofenaco de sódio pode-se concluir que as redes metalo-orgânicas exibiram uma liberação controlada, sendo que cerca de 60% do fármaco foi liberado em 12 horas na γ -FeCD e aproximadamente 20% do fármaco foi liberado nas γ -NaCD e γ -KCD. O maior controle da taxa de liberação do fármaco deve ocorrer pela formação das redes metalo-orgânicas que é flexível de acordo com o metal que as constitui, podendo ser mais compacta e resultar em numa menor liberação do fármaco, como no caso dos metais alcalinos. De acordo com os modelos matemáticos, essa liberação ocorre através de mecanismo complexo, no qual vários processos estão envolvidos, como a difusão e a erosão, que podem ocorrer simultaneamente.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAMS, B. F., HOSKINS, B. F., MICHAIL, D. M., & ROBSON, R. Assembly of porphyrin building blocks into network structures with large channels. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 727-729, 1994.

ABRAHAMS, B. F.; JACKSON, P. A.; ROBSON, R. A Robust (10, 3)-a Network Containing Chiral Micropores in the AgI Coordination Polymer of a Bridging Ligand that Provides Three Bidentate Metal-Binding Sites. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 19, p. 2656-2659, 1998.

AGNES, E. J.; ORTEGA, G. G. Modelos matemáticos e físico-química da difusão. **Caderno de Farmacia**, v. 19, n. 1, p. 9, 2003.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**- 9ed. Artmed Editora, 2013.

BASTING, R. T. Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. 2012.

BATTEN, S. R. et al. Coordination polymers, metal-organic frameworks and the need for terminology guidelines. **CrystEngComm**, v. 14, n. 9, p. 3001-3004, 2012.

BECKNER, M.; DAILLY, A. Adsorbed methane storage for vehicular applications. **Applied Energy**, v. 149, p. 69-74, 2015.

BERNE, B. J.; PECORA, R. Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics. Courier Corporation, 1976.

BURGESS, D. J. Colloids and colloid drug delivery systems. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, 3rd. ed. London: Informa Healthcare, p. 636-647, 2006.

CLEGG, W.; LITTLE, I. R.; STRAUGHAN, B. P. Zinc carboxylate complexes: structural characterisation of some binuclear and linear trinuclear complexes. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 6, p. 1283-1288, 1986.

COHEN, S. M. Modifying MOFs: new chemistry, new materials. **Chemical Science**, v. 1, n. 1, p. 32-36, 2010.

CORMA, A.; GARCÍA, H.; LLABRÉS I XAMENA, F. X. Engineering Metal Organic Frameworks for Heterogeneous Catalysis. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 8, p. 4606-4655, 2010/08/11 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr9003924> >, Acesso em: 11/02/2016

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

CURY, B. S. F., CASTRO, A. D., KLEIN, S. I., & EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: Physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. **International journal of pharmaceuticals**, v. 371, n. 1, p. 8-15, 2009.

CZAJA, A. U.; TRUKHAN, N.; MÜLLER, U. Industrial applications of metal-organic frameworks. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 5, p. 1284-1293, 2009.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1023-1035, 2004.

DE OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V., CORREA, M. A., CERA, L. F. R., & FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

DENG, K. et al. Aptamer-Mediated Up-conversion Core/MOF Shell Nanocomposites for Targeted Drug Delivery and Cell Imaging. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

DO, X.-D.; HOANG, V.-T.; KALIAGUINE, S. MIL-53 (Al) mesostructured metal-organic frameworks. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 141, n. 1, p. 135-139, 2011.

DONG, Y.-D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International journal of pharmaceuticals**, v. 417, n. 1, p. 101-111, 2011.

EDDAOUDI, M., MOLER, D. B., LI, H., CHEN, B., REINEKE, T. M., O'KEEFFE, M., & YAGHI, O. M. Modular chemistry: secondary building units as a basis for the design of highly porous and robust metal-organic carboxylate frameworks. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 4, p. 319-330, 2001.

FAN, L. T.; SINGH, S. K. **Controlled release: a quantitative treatment** Springer. Berlin, New York, 1989.

FARRUSSENG, D.; AGUADO, S.; PINEL, C. Metal–organic frameworks: opportunities for catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 41, p. 7502-7513, 2009.

FITZGERALD, S. A., NELSON, J. N., GILMOUR, E., & ROWSELL, J. L. Infrared overtone spectroscopy of adsorbed hydrogen in MOF-5. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 307, p. 20-26, 2015.

FORGAN, R. S. et al. Nanoporous carbohydrate metal–organic frameworks. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 1, p. 406-417, 2011.

FURUKAWA, H. et al. Ultrahigh porosity in metal-organic frameworks. **Science**, v. 329, n. 5990, p. 424-428, 2010.

FÉREY, G., MELLOTT-DRAZNIIEKS, C., SERRE, C., MILLANGE, F., DUTOUR, J., SURBLÉ, S., & MARGIOLAKI, I. A chromium terephthalate-based solid with unusually large pore volumes and surface area. **Science**, v. 309, n. 5743, p. 2040-2042, 2005.

GAO, W. Y. et al. Crystal engineering of an nbo topology metal–organic framework for chemical fixation of CO₂ under ambient conditions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 10, p. 2615-2619, 2014.

GARCÍA-GARCÍA, P.; MÜLLER, M.; CORMA, A. MOF catalysis in relation to their homogeneous counterparts and conventional solid catalysts. **Chemical Science**, v. 5, n. 8, p. 2979-3007, 2014.

GASSENSMITH, J. J. et al. Strong and reversible binding of carbon dioxide in a green metal–organic framework. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 39, p. 15312-15315, 2011.

GIAGOUDAKIS, G.; MARKANTONIS, S. L. An alternative high-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 17, n. 4, p. 897-901, 1998.

GRECCO, S. D. T. F.; DO CARMO RANGEL, M.; URQUIETA-GONZÁLEZ, E. A. Zeólitas hierarquicamente estruturadas. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 131-142, 2013.

GULIANTS, V. V., BENZIGER, J. B., SUNDARESAN, S., WACHS, I. E., JEHNG, J. M., & ROBERTS, J. E. The effect of the phase composition of model VPO catalysts for partial oxidation of n-butane. **Catalysis Today**, v. 28, n. 4, p. 275-295, 1996.

HAN, S. et al. Imprinting Chemical and Responsive Micropatterns into Metal–Organic Frameworks. **Angewandte Chemie**, v. 123, n. 1, p. 290-293, 2011.

HE, Y.-P.; TAN, Y.-X.; ZHANG, J. Tuning a layer to a pillared-layer metal–organic framework for adsorption and separation of light hydrocarbons. **Chemical Communications**, v. 49, n. 96, p. 11323-11325, 2013.

HORCAJADA, P. et al. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. **Nature materials**, v. 9, n. 2, p. 172-178, 2010.

HORCAJADA, P. et al. Flexible porous metal-organic frameworks for a controlled drug delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 21, p. 6774-6780, 2008.

HORCAJADA, P. et al. Metal–organic frameworks as efficient materials for drug delivery. **Angewandte chemie**, v. 118, n. 36, p. 6120-6124, 2006.

HUXFORD, R. C.; DELLA ROCCA, J.; LIN, W. Metal–organic frameworks as potential drug carriers. **Current opinion in chemical biology**, v. 14, n. 2, p. 262-268, 2010.

IMAZ, I. et al. Metal–organic spheres as functional systems for guest encapsulation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 13, p. 2325-2329, 2009.

IMAZ, I., HERNANDO, J., RUIZ-MOLINA, D., & MASPOCH, D. Comparative studies on the catalytic activity and structure of a Cu-MOF and its precursor for alcoholysis of cyclohexene oxide. **Catalysis Science & Technology**, v. 5, n. 2, p. 897-902, 2015.

KERBELLEC, N. et al. Luminescent coordination nanoparticles. **New Journal of Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 584-587, 2008.

KESKIN, S.; KIZILEL, S. Biomedical Applications of Metal Organic Frameworks. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 4, p. 1799-1812, 2011/02/16 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ie101312k> > Acesso em: 07/12/2015.

KESKIN, S., LIU, J., RANKIN, R. B., JOHNSON, J. K., & SHOLL, D. S. Progress, opportunities, and challenges for applying atomically detailed modeling to molecular adsorption and transport in metal–organic framework materials. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 5, p. 2355-2371, 2008.

KESKIN, S.; SHOLL, D. S. Screening metal-organic framework materials for membrane-based methane/carbon dioxide separations. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 38, p. 14055-14059, 2007.

KLINOWSKI, J., PAZ, F. A. A., SILVA, P., & ROCHA, J. Microwave-assisted synthesis of metal-organic frameworks. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 2, p. 321-330, 2011.

KORSMEYER, R.; PEPPAS, N. Macromolecular and modeling aspects of swelling controlled system in controlled release delivery systems. **Treatise on controlled drug delivery: fundamentals, optimization, applications**. New York: Marcel Dekker, p. 196, 1992.

KOSTARELOS, K. Rational design and engineering of delivery systems for therapeutics: biomedical exercises in colloid and surface science. **Advances in colloid and interface science**, v. 106, n. 1, p. 147-168, 2003.

LEVY, M. Y.; BENITA, S. Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. **International journal of pharmaceutics**, v. 66, n. 1-3, p. 29-37, 1990.

LI, H., EDDAOUDI, M., GROU, T. L., & YAGHI, O. M. Establishing microporosity in open metal-organic frameworks: Gas sorption isotherms for Zn (BDC)(BDC= 1, 4-benzenedicarboxylate). **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 33, p. 8571-8572, 1998.

LI, H., EDDAOUDI, M., O'KEEFFE, M., & YAGHI, O. M. Design and synthesis of an exceptionally stable and highly porous metal-organic framework. **Nature**, v. 402, n. 6759, p. 276-279, 11/18/print 1999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/46248> > Acesso em: 29/01/2016.

LI, J.-R.; KUPPLER, R. J.; ZHOU, H.-C. Selective gas adsorption and separation in metal-organic frameworks. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 5, p. 1477-1504, 2009.

LIN, Z. et al. Ultrasensitive sorption behavior of isostructural lanthanide-organic frameworks induced by lanthanide contraction. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 39, p. 21076-21084, 2012.

LIU, D.; HUXFORD, R. C.; LIN, W. Phosphorescent nanoscale coordination polymers as contrast agents for optical imaging. **Angewandte Chemie**, v. 123, n. 16, p. 3780-3784, 2011.

LIU, J. et al. Experimental and theoretical studies of gas adsorption in Cu₃(BTC)₂: an effective activation procedure. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 26, p. 9305-9313, 2007.

LIU, Z. et al. A review of fine structures of nanoporous materials as evidenced by microscopic methods. **Microscopy**, v. 62, n. 1, p. 109-146, 2013.

MA, P. A., XIAO, H., LI, C., DAI, Y., CHENG, Z., HOU, Z., & LIN, J. Inorganic nanocarriers for platinum drug delivery. **Materials Today**, 2015.

MA, S., SUN, D., WANG, X. S., & ZHOU, H. C. A Mesh-Adjustable Molecular Sieve for General Use in Gas Separation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 14, p. 2458-2462, 2007.

MA, S., SUN, D., YUAN, D., WANG, X. S., & ZHOU, H. C. Preparation and gas adsorption studies of three mesh-adjustable molecular sieves with a common structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 18, p. 6445-6451, 2009.

MEEK, S. T.; GREATHOUSE, J. A.; ALLENDORF, M. D. Metal-Organic Frameworks: A Rapidly Growing Class of Versatile Nanoporous Materials. **Advanced Materials**, v. 23, n. 2, p. 249-267, 2011.

MEEK, S. T. et al. Complete Series of Monohalogenated Isoreticular Metal–Organic Frameworks: Synthesis and the Importance of Activation Method. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 10, p. 4309-4312, 2011.

MONDLOCH, J. E. et al. Activation of metal–organic framework materials. **CrystEngComm**, v. 15, n. 45, p. 9258-9264, 2013.

MULLER, C. R. et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química nova**. São Paulo. Vol. 27, n. 4 (2004), p. 555-560, 2004.

OSCHATZ, M. et al. A cubic ordered, mesoporous carbide-derived carbon for gas and energy storage applications. **Carbon**, v. 48, n. 14, p. 3987-3992, 2010.

PADOVINI, D. S. S. Síntese e caracterização de nanopartículas de ZrO₂ por rota hidrotérmica. 2013.

PAZ, F. A. A.; ROCHA, J. METAL-ORGANIC FRAMEWORKS: o Que São E Para Que Servem.

PEDERSEN, M. et al. A genuine clotrimazole γ -cyclodextrin inclusion complex-isolation, antimycotic activity, toxicity and an unusual dissolution rate. **International journal of pharmaceuticals**, v. 176, n. 1, p. 121-131, 1998.

PONTES ANDRADE LIMA, D.; ALVES JUNIOR, S. O. Novos materiais metal-orgânicos como veículo de liberação controlada de fármacos. 2010.

RIETER, W. J. et al. Nanoscale Coordination Polymers for Platinum-Based Anticancer Drug Delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 35, p. 11584-11585, 2008/09/03 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja803383k> > Acesso em: 15/05/2016.

RIETER, W. J., POTT, K. M., TAYLOR, K. M., & LIN, W. Nanoscale Metal–Organic Frameworks as Potential Multimodal Contrast Enhancing Agents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 28, p. 9024-9025, 2006/07/01 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja0627444> > Acesso em: 28/05/2016..

ROBIN, A. Y.; FROMM, K. M. Coordination polymer networks with O-and N-donors: what they are, why and how they are made. **Coordination chemistry reviews**, v. 250, n. 15, p. 2127-2157, 2006.

ROUSELL, J. L. C.; YAGHI, O. M. Metal–organic frameworks: a new class of porous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 73, n. 1–2, p. 3-14, 8/6/ 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387181104001295> > Acesso em: 15/03/2016..

SABANER, M. A., ISIK, F., SAHINBAS, T., & BAYRI, A. Theoretical Magnetic Behavior of NbO-type Cu₂ MOF. **Journal of Superconductivity and Novel Magnetism**, v. 28, n. 3, p. 791-796, 2015.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, 2001.

SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. Análise da textura de materiais cerâmicos a partir das isotermas de adsorção de gases. **Cerâmica**, v. 39, n. 259, p. 11, 1993.

SANTOS-MAGALHAES, N. S., PONTES, A., PEREIRA, V. M. W., & CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International journal of pharmaceutics**, v. 208, n. 1, p. 71-80, 2000.

SING, K. The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 187, p. 3-9, 2001. I

SING, K. S. W. et al. Assessment of Microporosity. **Adsorption by Powders and Porous Solids: Principles, Methodology and Applications**, p. 303, 2013.

SMALDONE, R. A. et al. Metal-organic frameworks from edible natural products. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 46, p. 8630-8634, 2010.

STANIFORTH, J. N. Análise do tamanho de partícula. AUTON, ME, **Delineamento de forma farmacêutica**, 2005.

TAYLOR, K. M. L.; RIETER, W. J.; LIN, W. Manganese-Based Nanoscale Metal-Organic Frameworks for Magnetic Resonance Imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 44, p. 14358-14359, 2008/11/05 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja803777x> > Acesso em: 30/04/2016.

TAYLOR-PASHOW, K. M., DELLA ROCCA, J., HUXFORD, R. C., & LIN, W. Hybrid nanomaterials for biomedical applications. **Chemical Communications**, v. 46, n. 32, p. 5832-5849, 2010.

TORAD, N. L. et al. MOF-derived nanoporous carbon as intracellular drug delivery carriers. **Chemistry Letters**, v. 43, n. 5, p. 717-719, 2014.

VAGIN, S.; OTT, A. K.; RIEGER, B. Paddle-Wheel Zinc Carboxylate Clusters as Building Units for Metal-Organic Frameworks. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 79, n. 6, p. 767-780, 2007.

WELLS, A. F. The geometrical basis of crystal chemistry. Part 2. **Acta Crystallographica**, v. 7, n. 8-9, p. 545-554, 1954.

WENZEL, S. E. et al. Highly porous MOF containing a novel organosilicon linker—a promising material for hydrogen storage. **Inorganic Chemistry**, v. 48, p. 6556-6559, 2009.

YAGHI, O. M.; LI, H. Hydrothermal Synthesis of a Metal-Organic Framework Containing Large Rectangular Channels. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 41, p.

10401-10402, 1995/10/01 1995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja00146a033> >
Acesso em: 08/007/2015.

YAGHI, O. M., O'KEEFFE, M., OCKWIG, N. W., CHAE, H. K., EDDAOUDI, M., & KIM, J. Reticular synthesis and the design of new materials. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 705-714, 2003.

YAO, J., HE, M., WANG, K., CHEN, R., ZHONG, Z., & WANG, H. High-yield synthesis of zeolitic imidazolate frameworks from stoichiometric metal and ligand precursor aqueous solutions at room temperature. **CrystEngComm**, v. 15, n. 18, p. 3601-3606, 2013.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and-independent methods. **International journal of pharmaceutics**, v. 209, n. 1, p. 57-67, 2000.

ZAHEDI, P.; LEE, P. I. Solid molecular dispersions of poorly water-soluble drugs in poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 320-328, 2007.

ZHANG, J.-P.; CHEN, X.-M. Exceptional framework flexibility and sorption behavior of a multifunctional porous cuprous triazolate framework. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 18, p. 6010-6017, 2008.

ZHANG, Y., WU, L. J., TASHIRO, S. I., ONODERA, S., & IKEJIMA, T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 1, p. 83-89, 2004.

ZHAO, Y., ZHANG, J., HAN, B., SONG, J., LI, J., & WANG, Q. Metal–Organic Framework Nanospheres with Well-Ordered Mesopores Synthesized in an Ionic Liquid/CO₂/Surfactant System. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 636-639, 2011.

ZHOU, W.; WU, H.; YILDIRIM, T. Enhanced H₂ Adsorption in Isostructural Metal–Organic Frameworks with Open Metal Sites: Strong Dependence of the Binding Strength on Metal Ions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 46, p. 15268-15269, 2008.