

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE
MATERIAIS**

**Metal-Organic Frameworks (MOFs): alternativa inteligente
para carreamento de fármacos anti-inflamatório e
antineoplásico**

Doutoranda: Iane Bezerra Vasconcelos Alves

2013

Iane Bezerra Vasconcelos Alves

**Metal-Organic Frameworks (MOFs): alternativa inteligente
para carregamento de fármacos anti-inflamatório e
antineoplásico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Doutora em Ciências de Materiais

Orientação: Prof^o. Severino Alves Júnior

Co-orientação: Prof^a Teresinha Gonçalves da Silva

Recife

Catálogo na fonte
Bibliotecário Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Alves, Iane Bezerra Vasconcelos.

Metal-organic frameworks (MOFs): alternativa inteligente para carreamento de fármacos anti-inflamatório e antineoplásico / Iane Bezerra Vasconcelos Alves. – Recife: O Autor, 2013.

xix, 83 f.: fig. tab.

Orientador: Severino Alves Júnior.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais, 2013.

Inclui bibliografia e apêndice.

1. Câncer. 2. Polímeros de coordenação.
3. Fármacos. I. Alves Júnior, Severino (orientador).
bcdaq@ufpe.br bcdaq@ufpe.br bcdaq@ufpe.br.

616.994

(22. ed.)

FQ 2013-08

2013

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO***IANE BEZERRA VASCONCELOS ALVES***

“METAL-ORGANIC FRAMEWORKS(MOFs): ALTERNATIVA INTELIGENTE PARA CARREAMENTO DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINEOPLÁSICO”

A Banca Examinadora composta pelos Professores: TERESINHA GONÇALVES DA SILVA, do Departamento de Antibióticos da UFPE; BRÁULIO SILVA BARROS, Escola de Ciências e Tecnologia da UFRN; JORGE LUIZ NEVES, do Departamento de Química Fundamental da UFPE; PEDRO JOSÉ ROLIM NETO, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE; e pela Doutora JOANNA ELZBIETA KULESZA, do Departamento de Química Fundamental da UFPE; considera a Tese da candidata:

() APROVADA

() REPROVADA

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, em 01 de março de 2013.

PROFA. TERESINHA GONÇALVES DA SILVA
PRESIDENTE E 1ª EXAMINADORA

PROF. BRÁULIO SILVA BARROS
2º EXAMINADOR

PROF. JORGE LUIZ NEVES
3º EXAMINADOR

PROF. PEDRO JOSÉ ROLIM NETO
4º EXAMINADOR

DRª. JOANNA ELZBIETA KULESZA
5ª EXAMINADORA

DEDICATÓRIA

***Aos meus pais Ivon (in memorian) e Mercês,** que dignamente me mostraram à importância da família e o caminho da honestidade e persistência.*

***Ao meu grande companheiro Severino Alves Júnior,** pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. Sem você nenhuma conquista seria tão vibrante!*

***E nessa empreitada claro, a nossa linda e bela negona (Ingrid),** que já vibra com certeza, pelos erros e acertos desta mãe inquieta. Mais um ser a motivar-me!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema e constante em nossas vidas. Ele conhece nossos corações, nossos medos e nossas necessidades. Sempre grata senhor, por tudo!

Ao querido orientador Professor Severino Alves Júnior, por estar ao meu lado, de forma surpreendente, nos momentos mais importantes, que me marcaram, transformaram, comoveram. Agradeço pela amizade, apoio e dedicação imensuráveis e por me ensinar, muitas vezes como crescer;

A minha co-orientadora, professora Teresinha Gonçalves da Silva, do Departamento da Universidade Federal de Pernambuco, pelo incentivo, amizade e por transmitir a sua sabedoria e conhecimento, com imensa humildade. Minha imensa gratidão;

A todos os professores que durante o desenvolvimento desta pós-graduação, contribuíram para minha formação;

Aos professores e químicos Thereza Soares (UFPE), Marcelo Oliveira (UnB), Ricardo Freire (UFS) e Nivan Bezerra (UFS), pela credibilidade da minha presença na grande e eficiente equipe de trabalhos, propiciando o meu desenvolvimento em produções científicas e, consequente, realização deste trabalho;

As professoras Railda Shelsea (UEPB) Gardênia Militão (UFPE), Regina Bressan (UFPE) e Janaína Versiani (UFPE), por todo o suporte para minha formação;

A professora colaboradora, Adriana Ribeiro da Universidade Federal de Alagoas, pelas bem vindas sugestões;

Ao professor Eduardo Falcão do Departamento de Química Fundamental, pelos bons momentos de aprendizado e amizade. Ah! Os bises de limão.....o quanto me tranquilizaram, muito mais que os chás oferecidos, os quais nunca tomei, rsrsrs.....);

A todos os amigos e companheiros do Departamento de Antibióticos e de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, que se fizeram presentes e contribuíram com os momentos alegres e tensos, durante o desenvolvimento desta pós-graduação;

Aos colegas da Pós-Graduação, Jadson, Josivandro e Marconi, no curso com as disciplinas. Momentos de trocas fantásticos!

Em especial, aos meus queridos amigos do Departamento de Química Fundamental: Dani Pontes, Nadja, Alice, Fernanda, Allana, Sidcléia, Kelly, Isa, pela contínua satisfação em tê-los como amigos, e de desfrutar dos momentos sábios que vivenciamos;

Ao técnico João Carlos, do Departamento de Física – UFPE, pela caracterização dos materiais, através do difratograma de Raio X;

Aos funcionários da Central Analítica, pela receptividade, e por serem bastante prestativos no momento da caracterização dos materiais;

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro;

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, especialmente a Carlos França, pela atenção necessária;

Aos animais de laboratório, com um pedido de desculpas, mas são verdadeiros solidários;

Ao meu esposo, Severino Alves Júnior, pelo seu imenso amor, dedicação e companheirismo, por me apoiar e incentivar sempre. Vai bidico!

A toda minha família, em especial ao meu núcleo a ser formado: Beteque, bidico e negona.

"De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos
começando;
A certeza de que precisamos
continuar e;
A certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar.
Fazer da queda um passo de dança;
Do medo uma ponte do sonho, uma
escada;
Da procura um encontro.
Só assim terá valido a pena existir."

Fernando Pessoa

RESUMO

As redes Metalorgânicas (MOFs) têm sido empregadas na veiculação de fármacos, permitindo a criação de um novo caminho para a difusão dessas substâncias bioativas, além de fornecer maior proteção, melhor transporte e entrega de diversos fármacos no organismo. As MOFs são compostos de coordenação que se destacam na área de nanotecnologia, por serem materiais altamente porosos, apresentarem elevada área superficial, versatilidade para funcionalização, dentre outras peculiaridades. Neste cenário, é fundamental a sua utilização para o advento de um novo sistema de liberação de fármacos, o que conduz ao desenvolvimento de abordagens originais no âmbito da inovação terapêutica. Partindo desta ótica, o objetivo deste trabalho foi utilizar estas redes de coordenação na liberação controlada de fármacos, tendo como foco as áreas de inflamação e câncer. Para o estudo da incorporação dos fármacos ibuprofeno (IBU) e doxorrubicina (DOXO), tanto na Zeolite Imidazolate Framework-8 (ZIF-8) quanto na $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \text{ n}$, foi utilizado o método de difusão. A determinação quantitativa dos fármacos incorporados, bem como a concentração dos mesmos, foram determinadas por espectrofotometria no UV-Vis. A incorporação dos fármacos e o comportamento dos materiais propostos foram confirmados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X, análise termogravimétrica, espectroscopia de luminescência e espectroscopia fotoelétrica de raios-X. Na ZIF-8 foram incorporados 41% e 99% do ibuprofeno e da doxorrubicina, respectivamente. Já na $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \text{ n}$, foram incorporados 44% e 92% dos mesmos fármacos. Quanto ao perfil de liberação dos fármacos foi demonstrado que a doxorrubicina apresentou uma taxa de liberação lenta, quando comparado com outros sistemas. Avaliação citotóxica através do método MTT, demonstrou bons resultados antineoplásicos do sistema DOXO-ZIF-8, apresentando valores de IC_{50} que variaram de 0,79 a 14,96 $\mu\text{g/mL}$, frente a 3 linhagens de células tumorais, sendo mais ativo para linhagem de pulmão. Sugerimos assim, o desenvolvimento de um sistema de liberação a base de MOFs.

Palavras chave: MOFs, sistemas de liberação de fármacos, câncer, inflamação.

ABSTRACT

The networks Metalorgânicas (MOFs) have been used in the placement of drugs, allowing the creation of a new pathway for the diffusion of these bioactive substances, in addition to providing greater protection, better transport and delivery of various drugs in the body. The MOFs are composed of coordination that excel in the area of nanotechnology, materials to be highly porous, high surface area present, versatility for functionalization, among other peculiarities. In this scenario, it is fundamental to their use for the advent of a new drug delivery system, which leads to the development of novel approaches in the context of therapeutic innovation. From this perspective, the objective of this study was to use these networks for coordination in controlled drug delivery, focusing on the areas of inflammation and cancer. To study the incorporation of drugs ibuprofen (IBU) and doxorubicin (paradox), both in Imidazolate Zeolite Framework-8 (ZIF-8) as in [Zn (BDC) (H₂O) 2] n, was used diffusion method. Quantitative determination of the incorporated drugs and the concentration thereof were determined by UV-Vis spectrophotometry. The incorporation of drugs and behavior of the proposed materials were confirmed by vibrational spectroscopy in the infrared, scanning electron microscopy, X-ray diffraction, thermal analysis, spectroscopy and luminescence spectroscopy photoelectric X-ray. In ZIF-8 were incorporated into 41% and 99% of ibuprofen and doxorubicin, respectively. In the [Zn (BDC) (H₂O) 2] n, were incorporated into 44% and 92% of the same drugs. As to drug release profile was shown that doxorubicin showed a slower release rate as compared with other systems. Cytotoxicity by MTT method showed good results antineoplastic system paradox-ZIF-8, with IC₅₀ values ranging from 0.79 to 14.96 µg / mL, compared to three tumor cell lines, being more active strain lung. We suggest therefore the development of a delivery system the base of MOFs.

Keywords: MOFs, drug delivery systems, cancer, inflammation.

Lista de Figuras

- FIGURA 1:** Componentes das vias inflamatórias. Fator de necrose tumoral (TNF), Interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6), Tol-like receptor (TLR), quimiocina ligante 2 (CCL2), Interleucina 8 (CXCL8). 5
- FIGURA 2:** Formulação em comprimidos do fármaco ibuprofeno (A) e suas fórmulas estrutural (B) e espacial (C). 6
- FIGURA 3:** As etapas da carcinogênese. 7
- FIGURA 4:** Formulação do cloridrato da doxorrubicina peguilado lipossomal (superior esquerda), fórmula estrutural da doxorrubicina (superior direita) e Formulação do cloridrato de doxorrubicina (inferior direita). 8
- FIGURA 5:** Características que um material candidato a carreador de fármacos deve apresentar. 10
- FIGURA 6:** Alguns sistemas carreadores de fármacos. 13
- FIGURA 7:** Concentração de um fármaco modelo no sangue (a) dosagem tradicional, concentrações oscilantes do fármaco (*curva sólida seguida da pontilhada*) (b) dosagem com liberação controlada, doses múltiplas do fármaco em intervalos regulares (*linha sólida seguida da pontilhada*). MCT = Mínima Concentração Tóxica; MCE = Mínima Concentração Terapêutica. 14
- FIGURA 8:** Estrutura cristalográfica da ZIF-8, ilustrando os dois sítios de coordenação do íon Zn^{+2} (NC = número de coordenação) (A). Estrutura ilustrando a cavidade da ZIF-8 (B). 20

- FIGURA 9:** Estrutura da MOF $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$, em 1(A), 2 (B) e 3 dimensões (C). Estrutura supramolecular da mesma molécula, destacando os empacotamentos π - π (poliedros cinzas) e as ligações de hidrogênio (região ampliada) (D). 21
- FIGURA 10:** Ilustração das incorporações dos fármacos IBU e DOXO, nas MOFs ZIF-8 e $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$ (A); sistema em agitação, protegido da luminosidade (B). 26
- FIGURA 11:** Aparato utilizado para o ensaio de liberação dos fármacos, a partir das respectivas MOFs, em solução. 28
- FIGURA 12:** Curvas analíticas referentes aos fármacos IBU [a (ZIF-8 e $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$) e DOXO [b (ZIF-8) e c ($[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$)]. 32
- FIGURA 13:** Representações das incorporações DOXO-ZIF-8 (A), IBU-ZIF-8 (B), DOXO- ZnBDC (C) e IBU-ZnBDC (D). Nas placas maiores são observados os resultados macroscópicos, com base na mudança de cor, das incorporações. 35
- FIGURA 14:** Representação gráfica da quantidade de fármaco liberado da ZIF-8, em 30 dias. A linha vermelha apresentada no gráfico, correspondente à quantidade total de fármaco incorporado a ZIF-8 (A). Representação esquemática da DOXO sendo liberada, de forma sustentável, pelo sistema DOXO-ZIF-8, em células HL-60 (B). 38
- FIGURA 15:** Espectros de infravermelho referentes à incorporação do fármaco DOXO: a) ZIF-8, b) DOXO c) Sistema DOXO-ZIF-8. A= Fórmula estrutural da ZIF-8, B= Fórmula estrutural do cloridrato de doxorrubicina. 40
- FIGURA 16:** Espectros de infravermelho: a) $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$, b) DOXO e c) sistema DOXO-ZnBDC. A= Fórmula estrutural da $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$, B= Fórmula estrutural do cloridrato de doxorrubicina. 42

FIGURA 17: Curva TG de $[\text{Zn}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2)_2]$ (ZIF-8).	43
FIGURA 18: Curva TG/ DTG da DOXO.	44
FIGURA 19: Curva TG/ DTG da DOXO-ZIF-8.	45
FIGURA 20: Fotomicrografias eletrônicas de varredura referentes às amostras DOXO (A), ZIF-8 (B) e DOXO-ZIF-8 (C).	45
FIGURA 21: Difratoograma referente à ZIF-8 (em preto) e à incorporação do fármaco DOXO na ZIF-8 (em azul). Os círculos vermelhos indicam os picos pertencentes à DOXO (A). Refinamento de Rietveld do sistema DOXO-ZIF-8, com o calculado (linha vermelha), observado (bolinhas), diferença entre o observado e o calculado (linha azul) e os picos de Bragg (traços verticais em verde). As setas vermelhas destacam os picos referentes à lactose. Fatores de confiabilidade para o refinamento: R_p : 1.4; R_{wp} : 2.07; χ^2 : 5.28; RF 2: 18.52 (B).	47
FIGURA 22: Espectro de excitação (linha cheia) e emissão da DOXO em solução (linha tracejada) (A). Espectros de excitação (B) e emissão (C), em estado sólido, a temperatura ambiente.	48
FIGURA 23: Espectros de excitação e emissão da ZIF-8 (A). Espectro de Excitação (B) e Emissão (C) da ZIF-8 em estado sólido, a temperatura ambiente.	50
FIGURA 24: Espectro de Excitação da DOXO-ZIF-8 (A) e espectros de emissão em estado sólido (B) e (B), a temperatura ambiente.	52
FIGURA 25: Viabilidade de macrófagos, expostos aos sistemas IBU, IBU-ZIF-8 e ZIF-8.	59
FIGURA 26: A microscopia confocal de células HL-60 incubadas na	62

ausência (A) ou presença de ZIF8 (B); IC_{50} (C) e $2 \times IC_{50}$ (D) de DOXO, IC_{50} (E) e $2 \times IC_{50}$ (F) de DOXO-ZIF-8, durante 24 horas; IC_{50} (G) e $2 \times IC_{50}$ (H) de DOXO e IC_{50} (I) e $2 \times IC_{50}$ (J) de 8-DOXO-ZIF, durante 48 horas. A coluna da esquerda representa a fluorescência do canal de vermelho e o da direita representa a fusão do canal de vermelho e a imagem de contraste de interferência diferencial.

FIGURA 27: Seção histológica do tecido cardíaco de camundongos submetidos à solução salina (A e B) em comparação com o grupo DOXO-ZIF-8 (C e D) (H & E×400). 64

FIGURA 28: Seção histológica do fígado de camundongos submetidos à solução salina (A) em comparação com o grupo DOXO-ZIF-8 (B) (H & E×400). 65

FIGURA 29: Corte histológico do rim de camundongos submetidos à solução salina (A e B) em comparação com o grupo DOXO-ZIF-8 (C e D) (H & E×400). 66

FIGURA 30: Seção histológica do baço de camundongos submetidos à solução salina (A) em comparação com o grupo DOXO-ZIF-8 (B) (H&E×400). 66

Lista de Tabelas

TABELA 01:	Concentrações das soluções dos fármacos, utilizadas para obtenção das respectivas curvas de calibração voltadas aos sistemas em que foram incorporados.	27
TABELA 02:	Quantidade dos fármacos incorporados nas MOFs.	35
TABELA 03:	Atividade citotóxica da DOXO, ZIF-8 e do sistema DOXO-ZIF-8 frente às linhagens celulares NCI-H292, HL-60 e HT-29.	60

Lista de Siglas e Abreviaturas

λ_{emis}	Comprimento de onda de emissão
μL	Microlitros
λ_{max}	Comprimento de onda máximo
Å	Angstrom
Ag	Prata
AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
BDC	1,4-benzenodicarboxilato ou tereftalato
Bio-MOF	Bio-Metal Organic Framework
Ca	Cálcio
CCL2	Quimiocina ligante 2
CEEA	Comitê de Ética na Experimentação Animal
CG1521	7-phenyl-2, 4, 6-hepta-trienoyl hydroxamic acid
cm^{-1}	Centímetros a menos 1
CXCL8	Interleucina 8
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s médium
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOXO	Doxorrubicina
DOXO-ZIF-8	Incorporação da doxorrubicina na ZIF-8
DRX	Difração de raios-X
DTGA	Derivada da curva termogravimétrica
EPR	Permeabilidade e retenção aumentadas
ER-negativo	Receptor de estrógeno negativo
ER-positivo	Receptor de estrógeno positivo
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
G0	Fase G0
G1	Fase G1
G2	Fase G2
Gd,	Gadolínio

HDAC	Atividade enzimática de inibição de histona desacetilase
HeLa	Carcinoma epidermóide do colo de útero
HL-60	Células de leucemia promielocítica humana
HPMA	Metacrilamida
HT-29	Carcinoma de cólon - humano
IBU	Ibuprofeno
IC	Intervalo de confiança
IC₅₀	Inibição do crescimento de 50% das células
IFN-γ	Interferon-γ
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IV	Infravermelho
kgf/cm²	Kilograma força por centímetros quadrado
M	Mitose
M	Molar
mA	Miliampere
MCE	Mínima Concentração Tóxica
MCF-7	Carcinoma de mama - humano
MCT	Mínima Concentração Terapêutica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
MIL	Materials of Institut Lavoisier
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mn	Manganês
MOFs	Metal Organic Frameworks
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo
MV	Milivolt
nanoMOF	Nano- Metal Organic Framework
NC	Número de coordenação

NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NCI-H292	Câncer de pulmão– humano
NF-kB	Fator nuclear k beta
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
°C	Graus celsius
P.A	Para análise
PAMAM	Poliamidoamina
PBS	Tampão fosfato salino
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
PXD101	Ácido hidroxâmico sulfonamida
r.p.m	Rotação por minuto
Rp e Rwp	Parâmetros que indicam a qualidade dos ajustes pelo método de Rietveld
RPMI	Mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular.
S	Síntese de DNA
TGA	Análise termogravimétrica
TLR	Tol-like receptor
TNF-α	Fator de necrose tumoral - α
TSA	Tricostatina A
UICC	International Union Against Cancer
UV-Vis	Ultravioleta visível
XPS	Espectroscopia fotoelétrica de raios-X
ZIF-8	Zeolite Imidazolate Framework-8
Zn	Zinco
ZnBDC	$[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \text{ n}$
ZnO	Óxido de zinco
α	Alfa
β	Beta

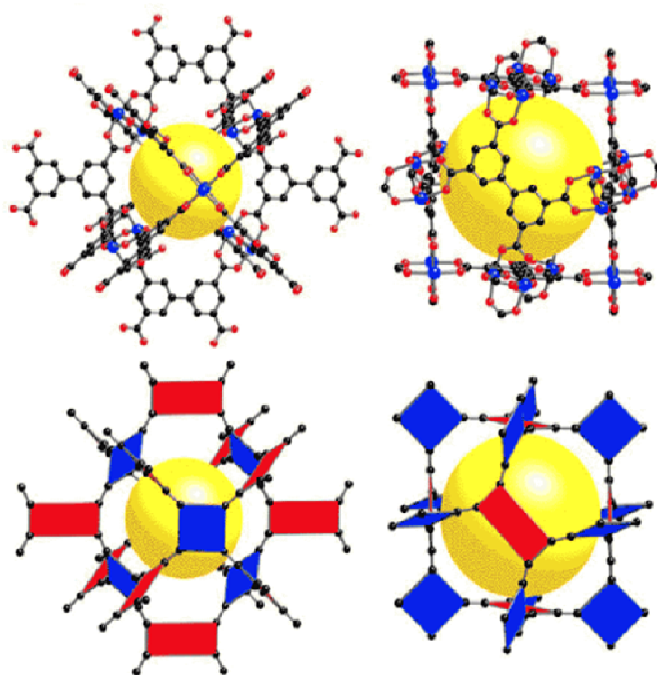
γ	Gama
λ	Lâmbda

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. CAPÍTULO 1(REVISÃO DA LITERATURA)	3
1.1. Interconectividade: Inflamação e câncer	4
1.2. Incorporação de fármacos	9
1.3. Nanopartículas associadas à liberação de fármacos	11
2. OBJETIVOS	23
3. CAPÍTULO 2 (PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS)	24
3.1. Material e métodos	25
3.2. Métodos experimentais	25
3.2.1. Incorporação dos fármacos	25
3.2.2. Perfil de incorporação dos fármacos	26
3.2.3. Avaliação da liberação dos fármacos	27
3.3. Técnicas de caracterização	29
3.3.1. Espectroscopia de infravermelho	29
3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
3.3.3. Análise termogravimétrica (TG)	30
3.3.4. Difratometria de raios-X (DRX)	31
3.3.5. Espectroscopia de fluorescência	31
3.3.6. Espectroscopia UV-Vis	32
3.4. Resultados	34
3.4.1. Espectroscopia UV-Vis, perfil de incorporação e liberação dos fármacos	34
3.4.2. Espectroscopia de infravermelho	40
3.4.2.1. Sistema DOXO-ZIF-8	40
3.4.2.2. Sistema DOXO-ZnBDC	42
3.4.3. Análise termogravimétrica (TG)	43
3.4.3.1. Sistema DOXO-ZIF-8	43
3.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
3.4.5. Difratometria de raios-X (DRX)	46
3.4.6. Espectroscopia de fluorescência	48
3.4.6.1. Doxorubicina	48
3.4.6.2. ZIF-8	49
3.4.6.3. DOXO-ZIF-8	51
3.4.7. Conclusão	53
4. CAPÍTULO 3 (AVALIAÇÃO DOS MATERIAIS)	54
4.1. Métodos	55
4.1.1. Viabilidade de macrófagos	55
4.1.2. Estudo de citotoxicidade	55
4.1.3. Microscopia confocal	56
4.1.4. Toxicidade aguda	57
4.1.5. Análises estatísticas	58
4.1.6. Aspecto ético	58
4.2. Resultados	59
4.2.1. Viabilidade de macrófagos	59
4.2.2. Estudo de citotoxicidade	60
4.2.3. Microscopia confocal	61

4.2.4. Toxicidade aguda	62
4.2.5. Conclusão	67
5. CAPÍTULO 4 (CONCLUSÃO GERAL)	69
6. CAPÍTULO 5 (PERSPECTIVAS)	71
7. CAPÍTULO 6 (REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS)	73
8. CAPÍTULO 7 (APÊNDICE)	80
8.1. Trabalhos enviados a congressos	80
8.2. Trabalhos publicados	80
8.3. Cursos de formação	82
8.4. Participação em Congressos	83

MOFs



INTRODUÇÃO

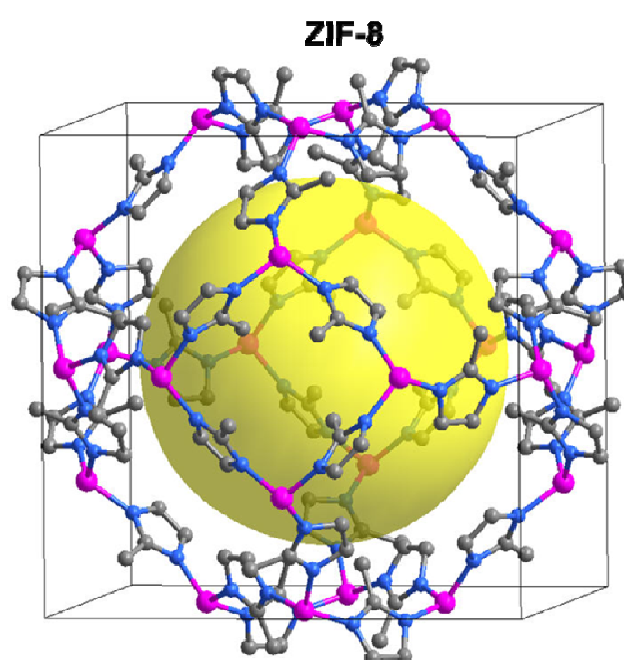
É inegável que a pesquisa e o desenvolvimento na busca de novos fármacos estão em ascensão, entretanto para um grande número de ativos, quase que rotineiramente, são necessárias revisões e discussões sobre a devida qualidade, pois ainda é observada a ineficiência por parte destes, além do que os seus usuários se queixam de seus efeitos indesejados no organismo – náuseas, vômitos, diarreia, toxicidade, dentre outros, inerentes à sua utilização em concentrações elevadas. Com essas limitações, diferentes estratégias estão sendo desenvolvidas, estimulando a comunidade científica a buscar, incessantemente, abordagens mais atuais e eficazes aos insumos terapêuticos, visando tanto inovações quanto o melhoramento de fármacos vigentes.

Novas tecnologias para testes de biomarcadores, de formulação especial, de drogas promotoras e efetoras, proteonômica, metabolômicas e tantos outros saberes são os principais enfoques[1]. No entanto, a nanotecnologia é um dos campos das ciências aplicadas que vem se destacando, pois utiliza materiais, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, seja a nível de átomos, moléculas e estruturas supramoleculares, controlando-os de acordo com o interesse desejado [2]. Este campo vem proporcionando impactos significativos na área de carregamento de fármacos, aperfeiçoando e reafirmando as ciências farmacêuticas, pois proporciona a modificação da cinética, distribuição e liberação dos ativos. Na área de câncer estes estudos têm sido bastante confirmados, a nanotecnologia das terapias combinadas explora diferentes materiais – dendrímeros, micelas poliméricas, nanopartículas cerâmicas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de ouro, entre outros - para que estes protejam o fármaco da destruição pelo sistema imune, fazendo com que o mesmo permaneça por um período de tempo maior na corrente sanguínea, e com isso favoreça a sua disponibilidade no alvo celular, reduzindo a toxicidade e os efeitos adversos associados à ação convencional [3].

Dentre os diversos nanomateriais, os polímeros de coordenação, chamados Metal Organic Frameworks (MOFs), vem apresentando resultados satisfatórios para carregamento de fármacos, visto que há possibilidades de modificar e funcionalizar sua superfície para garantir estabilidade e biocompatibilidade, e ainda serem adaptados ao seu hospede, especificamente [4].

Assim, podemos observar a gama de possibilidades para identificar novos sistemas que assegurem melhor eficácia e redução de toxicidade apresentadas pelos fármacos vigentes, conduzindo ao desenvolvimento de novas abordagens no âmbito da inovação terapêutica.

No presente trabalho foi dado enfoque a incorporação de dois fármacos, um anti-inflamatório e um antineoplásico, em polímeros de coordenação. Esta escolha foi estabelecida em virtude de determinados processos inflamatórios promoverem agravantes condições patológicas, e do tratamento do câncer exigir uma seletividade para as células tumorais, poupando células saudáveis. Além do que, já foi comprovado que podem ser processos relacionados, o que possivelmente, possibilitará elucidações e melhoramentos relacionados a ambas as patologias [5].



CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

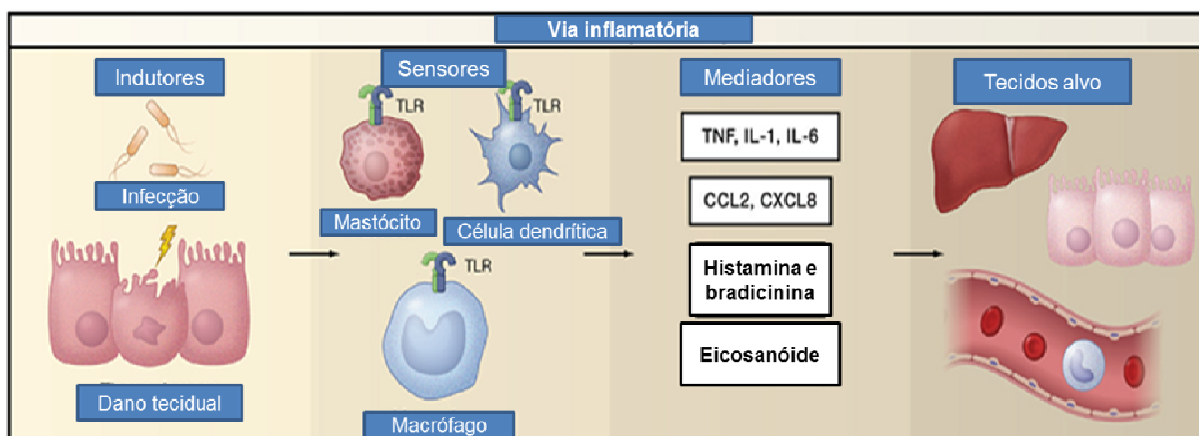
1.1) Interconectividade: Inflamação e câncer

Os processos inflamatórios vêm despertando em muitos grupos de pesquisas um grande interesse, em virtude das condições patológicas que podem subsidiar, como asma crônica, artrite reumatóide, esclerose múltipla, osteoartrite, lúpus eritematoso e psoríase. A inflamação é a maneira como o corpo lida com infecções e danos nos tecidos, tendo como objetivos localizar a região agredida, eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados, preparando a área lesada para reparação [6]. Entretanto, têm sido confirmados diversos casos em que esta resposta do organismo escapa aos mecanismos de controle, desencadeando as desordens inflamatórias mencionadas acima. O evento passa a ganhar características sistêmicas, podendo se auto-perpetuar e provocar a disfunção de diversos órgãos e sistemas, podendo culminar no câncer [7].

Todo este processo é composto por quatro componentes importantes: indutor da inflamação (agente flogístico), sensores biológicos que detectam a inflamação, mediadores da inflamação e órgãos ou tecidos alvos. A atuação destes componentes envolvem vários eventos celulares e vasculares dinâmicos, bem coordenados que dependem da chegada de leucócitos inflamatórios para o local da lesão.

Há uma complexa variedade de células (neutrófilos, macrófagos e células mononucleares), e diversas moléculas inflamatórias, tais como prostaglandinas (PGs), o óxido nítrico (NO), citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12), interferon γ (IFN- γ), e quimiocinas. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o foco inflamado [8]. A figura 01 apresenta de uma forma esquemática esta abordagem.

Figura 01: Componentes das vias inflamatórias.



Fonte: R. Medzhitov, Cell 2010, 140, 771-776. Fator de necrose tumoral (TNF), Interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6), Tol-like receptor (TLR), quimiocina ligante 2 (CCL2), Interleucina 8 (CXCL8).

A estratégia de tratamento para doenças inflamatórias envolve, principalmente, interrupção da síntese ou ação de histamina, serotonina, anafilotoxinas, leucotrienos, prostaglandinas, fator de agregação plaquetária dentre outros, que são as substâncias com procedências e funções próprias na mediação da inflamação. Elas conduzem resposta à lesão e modificações estruturais, baseando-se na existência de receptores específicos, com conformação espacial particular capaz de desencadear os processos que conduzem à resposta imunológica [9].

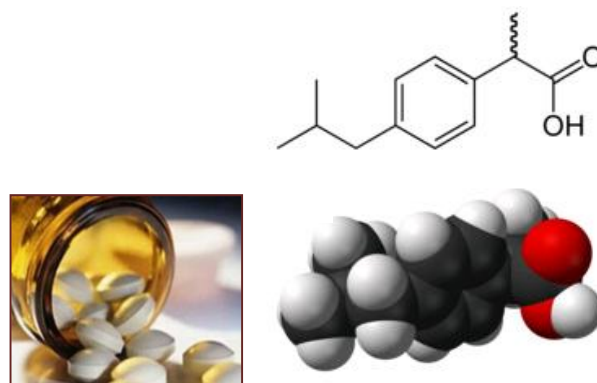
Dentre os fármacos utilizados em distúrbios inflamatórios, os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) se destacam, apesar de apresentarem complicações significativas (úlceras e hemorragias) em todo o trato gastroduodenal, desde o esôfago até o reto[10]. A redução ou eliminação destes danos vem sendo avaliados por meio da redução da dose destes ativos[11]. Os AINEs apresentam três tipos principais de efeitos: anti-inflamatório, analgésico e antipirético. De uma maneira geral, todos estes efeitos resultam da inibição da enzima ciclooxigenase, e conseqüentemente das substâncias as quais intermedeia síntese - prostaglandinas e tromboxanos - mediadores lipídicos sintetizados por muitas células, em detrimento de algum estímulo químico ou mecânico[12].

O ibuprofeno é um dos fármacos pertencentes ao grupo dos AINEs, amplamente utilizado, inserido no sub-grupo dos derivados do ácido propiônico, sua fórmula estrutural está exibida na figura 02. É geralmente bem tolerado, mas poderá apresentar alguns efeitos adversos como dor de cabeça, dor de estômago, vômitos,

diarréia, úlceras no estômago e duodeno [13]. Assim, é necessário um planejamento para tentar minimizar estes efeitos indesejáveis e potencializar a sua ação anti-inflamatória.

Avanços são, frequentemente, observados na compreensão subjacente a fisiopatologia das condições inflamatórias e no advento de muitos medicamentos, mas pouco tem sido feito para identificação de terapias significativamente adequadas.

Figura 02: Formulação em comprimidos do fármaco ibuprofeno (A) e suas fórmulas estrutural (B) e espacial (C).



Fonte: Autoria própria

Assim como as patologias inflamatórias, ou de forma até mais agravante, o câncer é uma doença, notoriamente, difícil de tratar [14]. A incidência de câncer no mundo vem aumentando de forma significativa nos últimos anos, e segundo a UICC (International Union Against Cancer) estima-se que em 2020, haverá 15 milhões de novos casos, dos quais 53% serão constatados nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, o que configura, um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial[15].

Para o entendimento da fisiopatologia do câncer é necessário o conhecimento da cinética celular, um evento em que é composto pelas etapas G1(a célula se prepara para a síntese do DNA); S (a célula sintetiza e duplica o DNA) G2 (possui número de cromossomos duplicados) M (prepara-se para a duplicação do núcleo, dividindo-se em duas células idênticas) e G0 (célula encontra-se em repouso, apresentando menor atividade metabólica). A duração de cada fase citada é variável, mas os processos ocorridos no interior das células são iguais para todas elas. A ocorrência de fenômenos de mutação, aneuploidia e amplificações genéticas neste processo, condiciona uma maior ou menor instabilidade genômica, que pode

ser crucial nos processos iniciais da carcinogênese (formação do câncer), como consequência de aneuploidia e amplificações genéticas, daí o câncer ou neoplasia, este último termo é uma forma mais branda de se considerar este distúrbio patológico. O câncer pode ser originado espontaneamente, ou por agentes carcinogênicos, sejam de origem física, química ou biológica. A figura 03 enfatiza as etapas da carcinogênese.

Figura 03: As etapas da carcinogênese



Fonte: INCA (2002, p. 58)

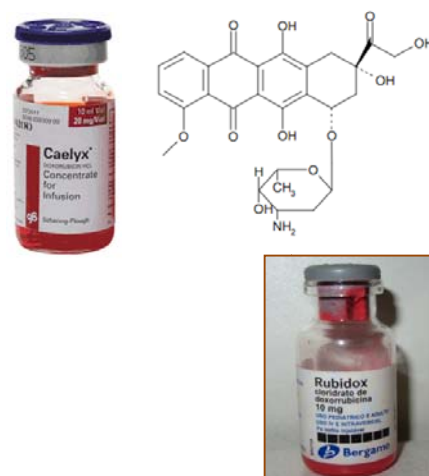
Uma dos medicamentos mais empregados na oncologia médica é o cloridrato de doxorrubicina, designado para matar as células tumorais, no entanto, geralmente também apresenta toxicidades [16]. O cloridrato de doxorrubicina (DOXO) (figura 04) é uma droga antineoplásica que faz parte da classe das antraciclinas, foi naturalmente produzida a partir de bactérias da espécie *Streptomyces peucetius* [17]. De modo geral, o mecanismo de ação das drogas desta classe inclui interações com o ácido desoxirribonucleico (DNA), por meio da intercalação entre os pares de bases dos ácidos nucleicos [18]. A sua administração pode ser realizada de modo intravesical ou intravenosa. Segundo estudos, quando se opta por esta última forma, há uma rápida queda dos níveis plasmáticos, acompanhada por uma lenta excreção urinária e biliar [19]. O que motiva para o desenvolvimento de uma forma terapêutica alternativa da DOXO.

Apesar do seu potencial, a DOXO apresenta uma ação inespecífica, acompanhada de efeitos colaterais, tais como cardiotoxicidade e mielossupressão [20]. No entanto, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos, chamando a atenção para os danos hepáticos causados por este fármaco, que podem está relacionados, assim como a cardiotoxicidade, com a dose administrada limitante a dose cumulativa

máxima [21]. Vários estudos atribuem que estes efeitos adversos estão relacionados a geração de radicais livres, logo após o fármaco ser metabolizado [22]. Vale salientar que a DOXO tem atividade antineoplásica significativa frente a diversos tipos de tumores humanos [23].

Formas alternativas da doxorubicina têm sido aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA), com o intuito de eliminar seus efeitos adversos, como é o caso do Dexrazoxane, comercialmente conhecido Zinecard®. Este foi desenvolvido para redução da incidência e severidade da cardiotoxicidade associada à administração da DOXO. Seu mecanismo de ação atua reduzindo os íons metálicos complexados com antraciclinas, e consequentemente diminui a formação de radicais peróxidos [24]. Entretanto, no ano de 2009, o FDA advertiu o seu uso em pacientes pediátricos, pois dois importantes estudos constataram o aparecimento de malignidades secundárias e leucemia mieloide aguda nos referidos pacientes, decorrente do uso da Dexrazoxane [25]. Outra opção é a doxorubicina lipossomal peguilada (Doxil), a qual foi desenvolvida pela empresa Johnson & Johnson, tendo como nome comercial Caelyx. Este promove administração da doxorubicina em um órgão ou tecido específico, de forma quantitativa e seletiva por meio do efeito EPR (sigla em inglês que significa permeabilidade e retenção aumentadas). [26]. Da mesma forma que estes exemplos, diferentes abordagens estão sendo exploradas, mas todas com o intuito de reduzir os efeitos adversos da doxorubicina e preservar a sua ação antitumoral [27].

Figura 04: Formulação do cloridrato da doxorubicina peguilado lipossomal (superior esquerda), fórmula estrutural da doxorubicina (superior direita) e Formulação do cloridrato de doxorubicina (inferior direita).



Fonte: Autoria própria

Conforme apresentado, a inflamação e o câncer se tratam de processos diferentes, cada qual com suas características e elementos inerentes, no entanto desde o século XIX começaram as tentativas para elucidação da relação de causa e efeito entre a exposição a fatores cancerígenos e a inflamação crônica [28]. Todavia, foi a partir deste século, por meio de estudos moleculares e celulares, que pesquisadores israelenses afirmaram que a relação entre uma inflamação crônica e o aparecimento do câncer, estão direcionados à "NF-kappa B" ou NF-kB (fator nuclear k beta), proteína característica da inflamação e frequentemente encontrada nos tumores [29]. Com esta descoberta surge a esperança em desenvolver melhores tratamentos para combater o câncer.

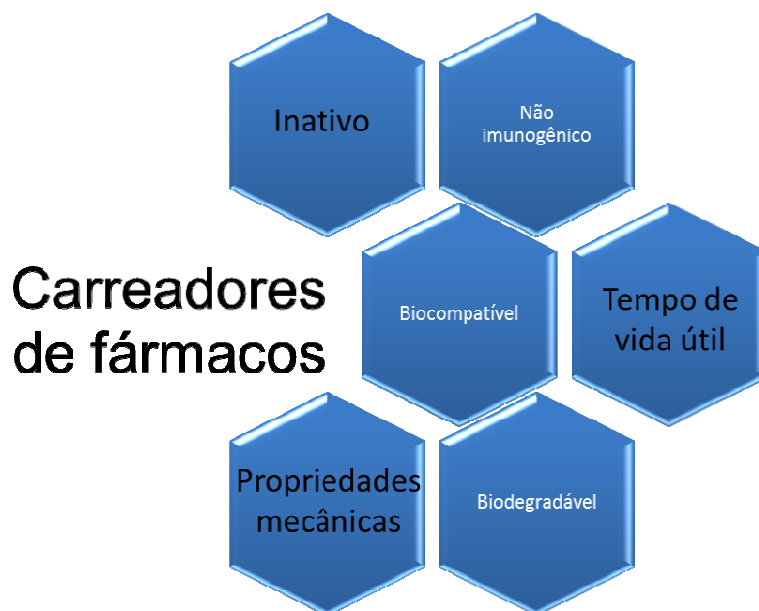
1.2) Incorporação de fármacos

A incorporação de fármacos em partículas poliméricas biodegradáveis é um dos muitos processos que aumentam significativa e controladamente a liberação de fármacos, bem como os protegem de degradação precoce. A incorporação de múltiplos fármacos em micro e nanocápsulas têm atraído grande interesse para aplicações biomédicas, uma vez que pode induzir efeitos terapêuticos sinérgicos [27c, 30]. Um método utilizado é o aprisionamento de difusão fickniana, em que o princípio ativo, inicialmente, é dissolvido num solvente adequado, e, posteriormente, o material hospedeiro é adicionado ao sistema, de modo que o processo de difusão ocorra. Após o tempo estabelecido por este processo, o sistema é centrifugado, o sobrenadante utilizado para a análise desejado, e, finalmente, o material é submetido a secagem. Recentemente, Horcajada et al. utilizando este método de incorporação, demonstraram a eficácia de incorporação do fármaco ibuprofeno MOFs MIL-100, MIL-110, MIL-53 (Cr) e MIL-53 (Fe) [31].

O sucesso na incorporação de fármacos está atrelado a uma análise prévia e atenciosa do material hospedeiro. Este deve ser selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar o sistema material/fármaco [32]. Em adição, é interessante que o encapsulante apresente baixa viscosidade em concentrações elevadas e seja de fácil manipulação durante o processo; possua baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; seja reativo com o material a ser encapsulado; tenha habilidade de selar e segurar o material ativo

dentro da estrutura da cápsula; libere completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcione máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; seja solúvel em solventes comumente usados; possua as propriedades desejadas de liberação do material ativo; não apresente sabor desagradável no caso de consumo oral; e seja econômico [33]. A Figura 05 mostra as características desejadas para que um material carreador de fármaco.

Figura 05: Características que um material candidato a carreador de fármacos deve apresentar.



Fonte: Autoria própria

1.3) Nanopartículas associadas a liberação de fármacos

O campo da química supramolecular, a qual é conhecida como a química além da molécula, é considerado importante ao se pensar em desenvolver sistemas de liberação de fármacos. A química supramolecular trata-se da química de ligação intermolecular, referente à estrutura e função de entidades formadas pela associação de duas ou mais espécies químicas [34]. Assim, se torna muito interessante propor o melhoramento de fármacos a partir da síntese de compostos simples que sejam "hospedeiros", capazes de se comportarem como receptores

biológicos [35]. A maioria dos hospedeiros sintéticos apresenta certa flexibilidade que permite um “ajuste” [36].

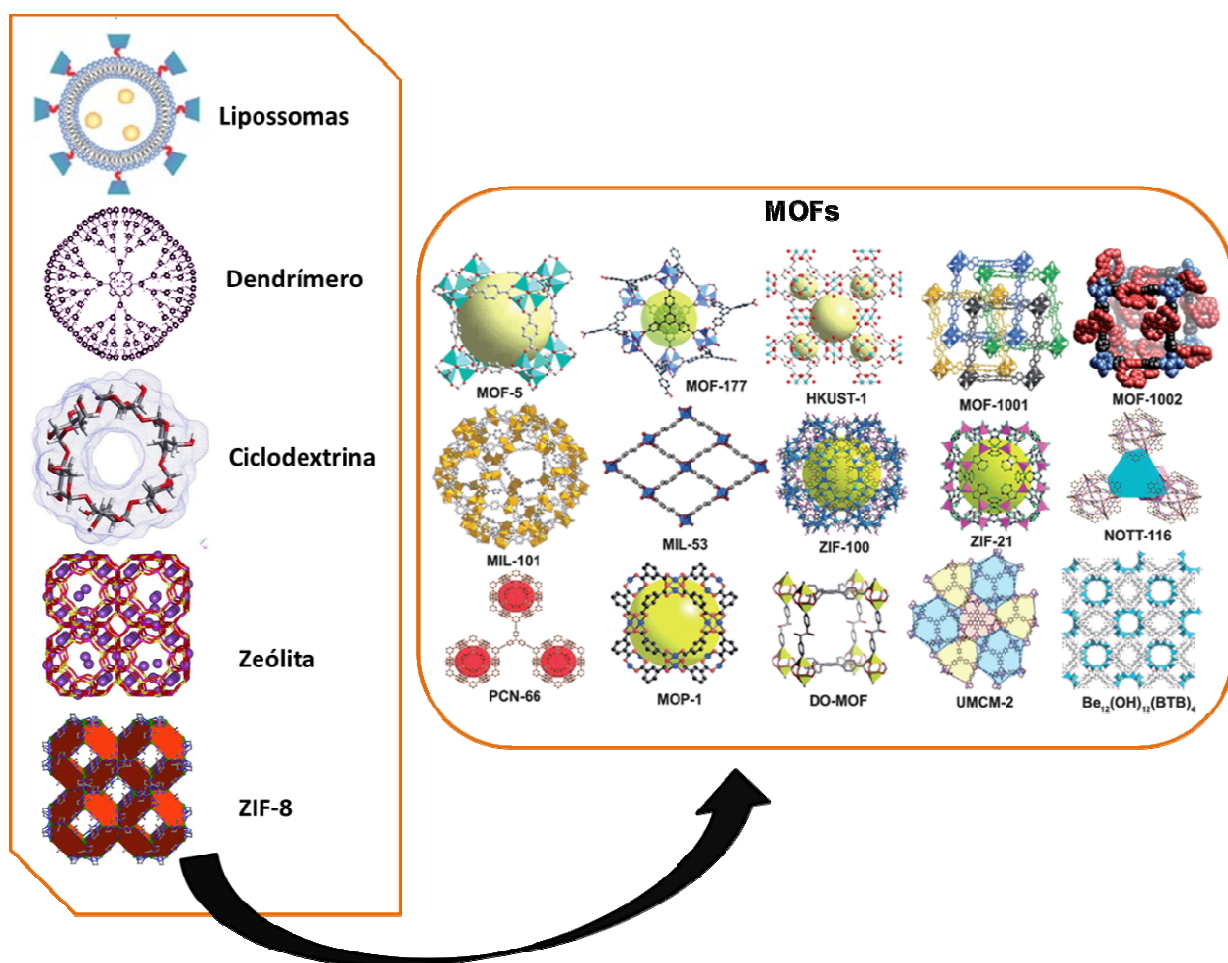
O reconhecimento estrutural segue o princípio da complementariedade, em que o “hospedeiro” deve possuir sítios de interações que possibilitem, cooperativamente, o contato e a atração dos sítios de interação do “convidado”, sem gerar fortes repulsões não-ligantes [37]. Além dos requisitos mencionados, um material ao ser idealizado como um sistema carreador de fármacos depende da sua biodegradabilidade, sua biocompatibilidade, mecanismos de absorção e de liberação do fármaco, independente dos fatores locais do tecido e do fármaco [37], métodos de caracterização físico-química, além de uma visão sobre o arranjo molecular de drogas em dispersão sólida [38]. A previsão da capacidade de estoque do ativo a ser armazenado, a cinética e a meia-vida do ativo, a determinação do fluxo de liberação, a velocidade de difusão (concentração local) e o período de tempo de liberação (tempo de tratamento) devem também ser considerados. Essas características cinéticas que podem ser controladas ou moduladas dependem do tamanho e do peso molecular do agente ativo, do mecanismo de liberação e dos seus fatores de influência, por exemplo, a porosidade do material. A modulação é obtida pela variação de fatores internos (mudança de pH) ou externos (efeitos físicos e químicos) [39].

O seguimento desta abordagem é interessante, visto que das diversas tecnologias que vem sendo avaliadas como estratégias de tratamento para o câncer e inflamação, raras são as que chegam ao mercado. Este quadro é justificado pela quantidade pequena de fármaco que conseguem incorporar ou adsorver em determinada nanopartícula, e também por estes sistemas exibirem uma liberação rápida do fármaco. Por um motivo ou outro, a consequência é que a atividade biológica prevista não é alcançada e os efeitos de toxicidade ou efeitos secundários adversos se instalam [40]. Para evitar estes problemas, polímeros biodegradáveis são utilizados para o recobrimento das nanopartículas, com intuito de exibirem opsonização natural no organismo, bem como são submetidos à funcionalização para serem direcionados especificamente para o alvo de ação [27b, 41].

Uma ampla variedade de sistemas carreadores de fármacos tem sido objeto de investigação na área da indústria farmacêutica (figura 06), designados para controlar a exposição do fármaco, ao longo do tempo; auxiliar a passagem do fármaco pelas barreiras fisiológicas; proteger o fármaco da sua rápida eliminação;

destinar o fármaco para o local de ação, evitando que o mesmo atinja outras partes do corpo; e aumentar a adesão do paciente, por reduzir a frequência de administração [42]. Entre estes incluem sistemas poliméricos baseados em lipossomas, niossomas, dendrímeros, ciclodextrinas, zeólitas mesoporosas, redes metalorgânicas (Metal Organic Frameworks - MOFs) e outros materiais mesoporosos. Alguns destes exemplos estão ilustrados na figura 06 [43]. Estes sistemas podem atuar através de três mecanismos primários: difusão, erosão e sistemas ativados por solventes. Vale salientar que estes eventos podem ocorrer associadamente. Na difusão, o fármaco encapsulado por uma membrana polimérica ou suspenso numa matriz polimérica, se dissolve e se difunde para fora do polímero. Na erosão, como no método de difusão, o fármaco é contido na membrana ou matriz polimérica, o polímero é degradado naturalmente, liberando então o fármaco. Nos sistemas ativados por solvente são utilizadas membranas semipermeáveis, contendo um pequeno orifício e uma alta concentração de um fármaco, causando a entrada da água (fluidos biológicos) pela membrana, dessa maneira forçando a saída do fármaco pelo orifício por causa do aumento de pressão interna [44].

Figura 06: Alguns sistemas carreadores de fármacos.



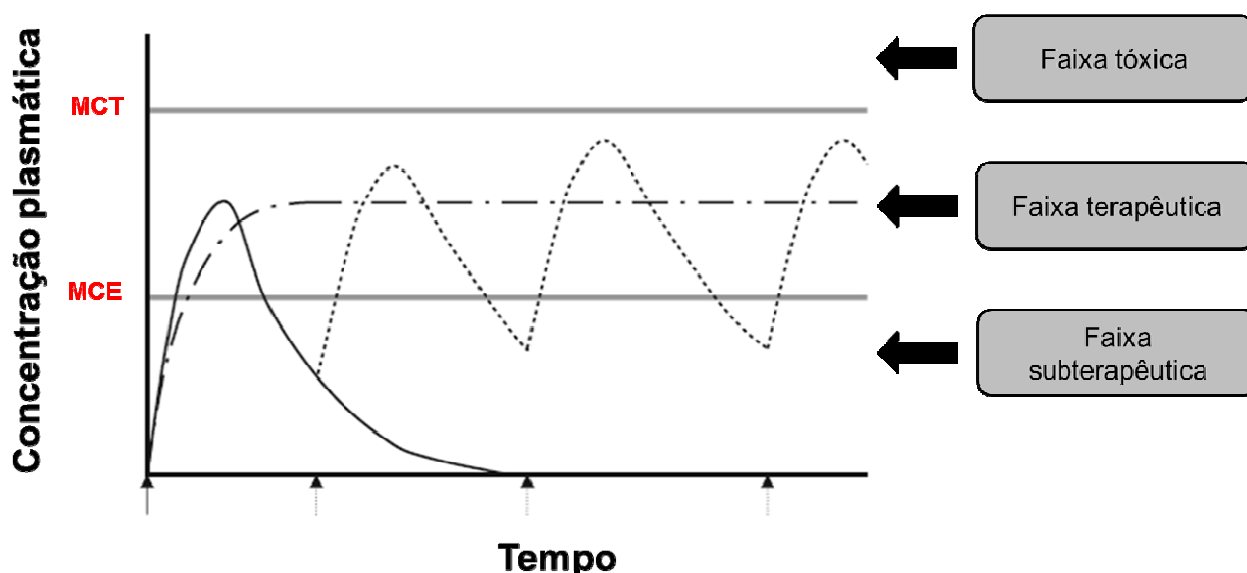
Fonte: Autoria própria

Dentre os poucos nanodispositivos terapêuticos em uso clínico, tem-se o Doxil[®] (doxorubicina), a atividade antitumoral do Ácido Úsnico - 6 Alora[®], Decapeptyl TM, ProstopTM, dentre outros [45]. As pesquisas mais recentes na área farmacêutica têm desenvolvido novas formas de transporte de fármacos, na tentativa de corrigir limitações apresentadas pelas vigentes (alta toxicidade e diversos efeitos colaterais), e com isso buscar atingir máximos efeitos terapêuticos.

O sucesso desses sistemas de liberação de fármacos é alcançado não somente pela farmacodinâmica adequada da molécula, mas, também, pela manutenção da dose efetiva do fármaco nos locais de ação. A maioria dos fármacos, com destaque para aqueles estruturalmente específicos, tem uma faixa de concentração que define os níveis de segurança e eficácia, mostrados na figura 07. Concentrações abaixo ou acima dessa faixa podem causar ineficiência do tratamento, além de graves efeitos tóxicos ou sintomas anteriormente não evidenciados [46].

As terapias de nanopartículas como Abraxane e Doxil, e a iniciativa das referidas pesquisas, ilustram a força desta abordagem.

Figura 07: Concentração de um fármaco modelo no sangue (a) dosagem tradicional, concentrações oscilantes do fármaco (*curva sólida seguida da pontilhada*) (b) dosagem com liberação controlada, doses múltiplas do fármaco em intervalos regulares (*linha sólida seguida da pontilhada*).



Fonte: J. S. R. A. S. M. J. Rathbone, in *Advances in Delivery Science and Technology*, Vol. XIII, 2012, p. 592. **MCT** = Mínima Concentração Tóxica; **MCE** = Mínima Concentração Terapêutica.

LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram definidos por Alec Bangham *et al*, como associações coloidais de lipídios anfipáticos, que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas, tipo concha esférica [47]. Essas estruturas caracterizam-se por apresentar um volume aquoso central, circundado por uma ou várias lamelas concêntricas, formando partículas unilamelares ou multilamelares, com diâmetros variáveis, a depender do método de preparação^[48]. Graças a essas características, substâncias farmacologicamente ativas podem ser incorporadas, seja no compartimento aquoso interno (substâncias hidrossolúveis), seja nas membranas dos lipossomas (substâncias lipofílicas ou anfifílicas) [49].

Os lipossomas têm sido estudados para este fim, por serem biodegradáveis, não-tóxicos e não imunogênicos, além de atuarem como modelos celulares de membrana e adjuvantes imunológicos em vacinas, por apresentarem características

relevantes para aplicações farmacêuticas, pois são biocompatíveis, alvos específicos *in vivo*, controlados, possuem faixas de tamanho diferentes e são mais facilmente caracterizados [50]. Entretanto, ao ser iniciada sua utilização como carreadores de fármacos, apresentavam resultados insatisfatórios, tendo em vista sua instabilidade físico-química e biológica, bem como pela sua baixa eficiência na encapsulação de fármacos [51].

Visando a melhora deste quadro, Urbinati *et al* (2010) compararam a capacidade de lipossomas peguulado em transportar três classes de inibidores de histonas desacetilases (CG1521, PDX101 e TSA), uma nova classe de agentes antitumorais que induzem hiperacetilação de histonas e inibem a proliferação de células tumorais, por interrupção do ciclo celular, diferenciação celular e apoptose. Os sistemas foram caracterizados, biológico e físico-quimicamente, e em seguida avaliada a sua toxicidade para várias linhagens de células cancerígenas de mama humano, tanto as dotadas do receptor de estrógeno-positivos (ER-positivos), quanto as dotadas do receptor de estrógeno-negativos (ER-negativos), resultando na efetividade dos lipossomas peguulados para inibirem as histonas desacetilases. Os sistemas demonstraram ser eficientes em estudo *in vivo*, graças ao bom desempenho como um sistema de entrega adequado, e capaz de proteger a droga de seu metabolismo rápido, após administração intravenosa [52].

DENDRÍMEROS

Os dendrímeros, do grego dedron que significa árvore, são polímeros bem distintos dos tradicionais, são auto-organizados, com estrutura tridimensional regular e ramificada, de tamanhos variados (1 a 100 nm). Encontram-se constituídos por um espaço central, no qual se podem encapsular várias espécies químicas; outra estrutura, na qual são encontradas camadas internas de unidade repetitivas, o que possibilita o fornecimento de espaços flexíveis residentes nos espaços vazios; e por grupos funcionais periféricos, dando condições para estabelecer diversas funcionalidades químicas [53].

Para avaliação antitumoral, Etrych *et al* (2011) conjugaram o fármaco doxorubicina com o dendrímero N-(2-Hidroxipropil) metacrilamida (HPMA), constatando considerável estabilidade deste material em solução tampão, pH 7,4, e liberação da doxorubicina tanto em condições moderadamente ácidas ou na

presença de enzima lisossomal catepsina B. Estes resultados foram satisfatórios, tendo em vista as similares condições no local do tumor [54]. Em outro estudo, Zhu *et al* (2010) avaliaram a ação citotóxica do fármaco doxorrubicina conjugado ao dendrímero Poliamidoamina (PAMAM), através de um estudo *in vitro*, frente ao melanoma B16, constatando ser mais eficiente na inibição dessas células do que a doxorrubicina livre, ou seja, sozinha, uma vez que foi constatada uma grande concentração de doxorrubicina livre nas células tumorais [55].

CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos tridimensionais, em forma de copo de cerca de 1 nm de altura, com alto número de hidroxilas, o que lhes confere uma boa solubilidade em água. São formadas por unidades de glicose unidas através de ligações α -1,4, originados da degradação do amido pelas enzimas glicosiltransferases. Por apresentar cavidade interna com diâmetro variando entre 5, 7 e 9 Å para α -, β - e γ -ciclodextrina e hidrofóbica, servem bem para solubilizar drogas lipossolúveis [56].

As ciclodextrinas são conhecidas por melhorarem a solubilidade e estabilidade de fármacos, sendo por isso muito importantes em aplicações biológicas. Uma característica a contribuir, ainda mais, para essa aplicabilidade é a capacidade em formar complexos relativamente não específicos, com uma grande variedade de substratos, sendo a principal condição a adaptação do substrato à cavidade, ainda que parcialmente [57].

Nesse âmbito, ciclodextrinas são desenvolvidas com intuito de aumentar a solubilidade de fármacos e cedê-los continuamente em níveis elevados e controlados [43a, 58]. A capacidade de retenção de um fármaco em células tumorais tem sido alcançada com sucesso. Tal feito foi possível por meio da incorporação do complexo ciclodextrina e doxorrubicina em lipossomas peguizados. Foi observado que as cavidades do complexo apresentaram alta afinidade pelos fármacos, o que resultou numa alta taxa de incorporação, bem como num melhor controle na liberação da doxorrubicina. Estudos *in vitro* constataram a potencialização do material preparado, visto que a sua atividade antitumoral foi mais pronunciada que o sistema de lipossomas com doxorrubicina apenas [59]. Recentemente, nanoesferas de ciclodextrinas com quitosana foram preparadas por formação *in situ*. A este

sistema incorporou-se o fármaco doxorrubicina, que ao ser avaliado, por meio de estudo *in vitro*, observou-se que o referido fármaco foi liberado de forma efetivamente sustentada, apresentando citotoxicidade significativa frente às células HeLa (Carcinoma epidermóide do colo de útero) [60].

Em adição, ciclodextrinas são descritas como novos adjuvantes quimicamente estáveis que aumentam a biodisponibilidade ocular de fármacos [61].

REDES METALORGÂNICAS – MOFs

Uma das abordagens promissoras para o desenvolvimento de drogas que possuam propriedades farmacocinéticas ideais é a utilização de nanomateriais. Estes têm sido testados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para fins de diagnóstico e terapia. Resultados têm sido reportados nos estudos de Huxford *et al* (2010), quando desenvolveram a incorporação e a liberação de agentes bioativos ligados a nanoMOF-101(Fe) [43f]. Dentro deste contexto, alguns grupos de pesquisa, nos últimos 5 anos, têm se dedicado intensamente ao desenvolvimento de biomateriais, partindo das redes de coordenação ou MOFs. Estes compostos tem recebido bastante atenção, devido às suas características: cristalinidade bem definida, elevada área superficial, estabilidade cinética e termodinâmica, alta porosidade, baixa densidade e mais recentemente funcionalidade química ajustável, vislumbrando ótimas propriedades terapêuticas [43f, 62].

O primeiro grupo de MOFs a ser investigado como sistema em transporte de drogas foi o Materials of Institut Lavoisier (MIL), tendo como pesquisadores pioneiros Férey e colaboradores [63]. Um dos trabalhos iniciais tratou de incorporar o fármaco o ibuprofeno, visto que a MOF MIL-101 apresentava grandes cavidades. Na intenção de estudar a interação do mesmo fármaco com diferentes MOFs, Horcajada e colaboradores em 2006, estudaram as MOFs de cromo, a MIL-100 e a MIL-101 [64]. Nesse trabalho foi observado que houve diferença na adsorção do referido fármaco, devido à diferença nos tamanhos dos poros, resultado da presença de ligantes diferentes nas redes. Nos trabalhos seguintes, foram utilizadas mais duas MOFs, MIL-53(Cr) e MIL-53(Fe) para adsorção e liberação controlada *in vitro*, de ibuprofeno. Os resultados obtidos indicaram que a quantidade de droga inserida na rede foi a mesma, indicando que o metal utilizado em cada rede híbrida não

influenciou a adsorção do fármaco, já que as duas MOFs são formadas pelo mesmo ligante, variando apenas o metal [65].

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com abordagens semelhantes, demonstrando que estes materiais exibem uma liberação de fármacos de forma sustentada, não são tóxicos, e são citotóxicos contra algumas linhagens de células tumorais [66]. Existe um método alternativo para liberação de quantidades consideráveis de fármacos, o mesmo consiste em desenvolver uma Bio-MOF com base no fármaco em questão, no ligante orgânico e de sua liberação através da degradação da MOF em si. Em adição utilizam-se metais bioativos, como Ag, Zn, Ca, Mn, Gd, Fe, na intenção de se introduzir propriedades terapêuticas adicionais [66d]. Entretanto, outros estudos têm revelado as vantagens em funcionalizar ligantes orgânicos [62, 67]. Diante de tantas vantagens, Taylor-Pashow *et al* (2009) demonstraram a incorporação de um fluoróforo orgânico (ácido 2-aminotereftálico) e um fármaco antineoplásico (cisplatina), através de modificações covalentes a nanoMOFs de carboxilato de ferro da estrutura MIL-101 revestidas com sílica. O potencial deste material como um sistema de nano-entrega em imagens ópticas e terapia antineoplásica foram avaliadas por estudo *in vitro*. Observou-se um aumento no tamanho dos poros da estrutura MIL-101 e uma efetiva atividade citotóxica frente às células HT-29 (carcinoma de cólon – humano) [68].

O nosso grupo de pesquisa – Grupo Terras Raras - vem sintetizando e caracterizando novas redes de coordenação. Em 2010, Lima e colaboradores sintetizaram uma MOF inédita, $\text{Cu}_3[\text{C}_6\text{H}_4(\text{COO})_6]_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, com o propósito de utilizá-la como um sistema de carregamento de drogas, onde o fármaco em questão foi o 5-fluoroacil [31c]. Santos e colaboradores, no mesmo ano, incorporaram o fármaco anti-inflamatório e analgésico – ibuprofeno - na *Zeolitic Imidazolate Frameworks* (ZIF-8), obtendo resultados satisfatórios quanto a toxicidade do sistema, o que revela um requisito favorável para ser utilizado como um biomaterial [69]. A interação de fármacos com compostos supramoleculares tais como, MOFs, representa um aspecto importante na pesquisa biomédica e em tecnologia farmacêutica, visto que suas implicações biológicas interferem no perfil de biodisponibilidade ou modificam a estabilidade de grande número de compostos de uso terapêutico.

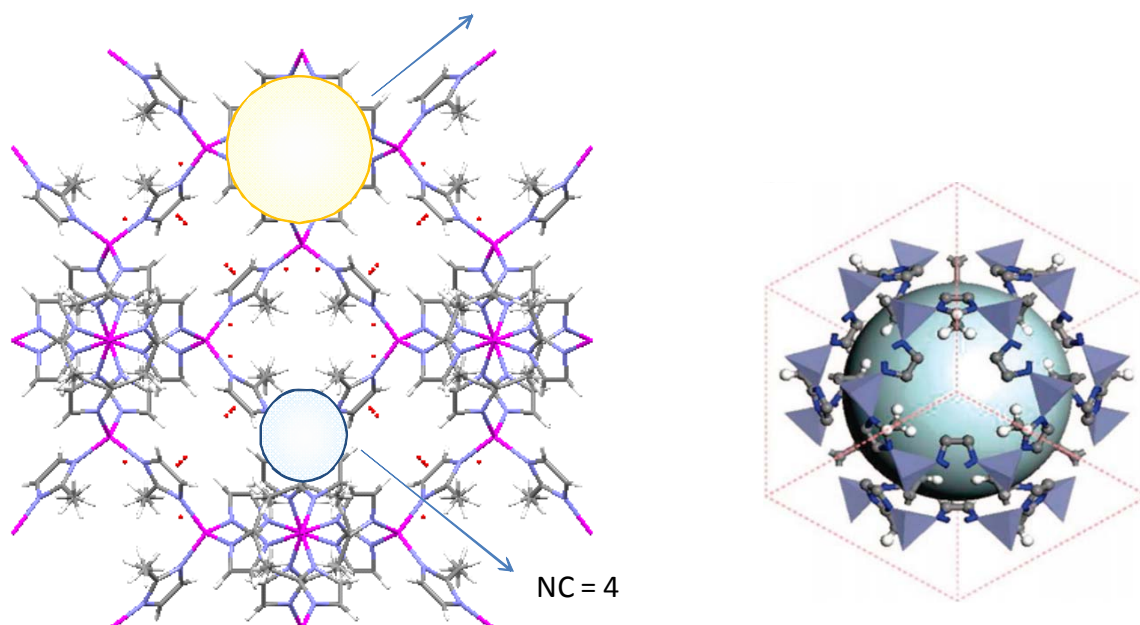
Dentro desse contexto, as MOFs são consideradas promissoras, uma vez que as mesmas apresentam baixa toxicidade no organismo e são biocompatíveis [70]. Mas o sucesso da aplicação de MOFs para carrear fármacos dependerá,

fundamentalmente, da eficiência em modificar e funcionalizar as suas superfícies, tornando-as mais estáveis e garantindo funcionalidade específica.

A ZIF-8 é um material pertencente a uma subclasse de MOFs, que tem emergido como um novo tipo de material poroso, possuidor de propriedades assumidas tanto pelas MOFs quanto pelas zeólitas: microporosidade, elevada área superficial, estabilidade cinética [71]. (ver figura 08). No entanto, a característica predominante da ZIF-8 é o que diz respeito à sua estabilidade hidrotérmica e térmica, até cerca de 400°C. Possui ainda, alguns diferenciais em relação às zeólitas, pois apresenta poros acessíveis com aberturas de 3,4 Å e uma cavidade central de 11,6 Å, além de vantagens estruturais e energéticas que contribuem para o desenvolvimento de um carreador de fármacos [72].

Recentemente, ZIF-8 tem se mostrado um excelente material de suporte terapêutico, bem como encapsulador de uma quantidade substancial da droga fluorouracil, mostrando ser estável em condições orgânicas importantes, com valores de pH diferentes. Assim, tanto em ambientes neutro (fisiológica), ou ácido (células cancerosas) atua como um veículo eficiente de fármacos [73]. Existem outros estudos alcançando efeitos semelhantes, a cafeína foi encapsulada na ZIF-8 por métodos *in situ* e *ex situ* de encapsulação, o que demonstra as vantagens quanto à quantidade encapsulada, bem como o seu tempo de sustentação [72a]. Apesar das pesquisas citadas, existe uma necessidade de utilizar a ZIF-8 de uma forma mais eficaz e inovadora, impondo mais credibilidade como um veículo eficiente de fármacos ou substâncias bioativas.

Figura 08: Estrutura cristalográfica da ZIF-8, ilustrando o sítio de coordenação do íon Zn^{+2} (NC = número de coordenação) (A). Estrutura ilustrando a cavidade da ZIF-8 (B).



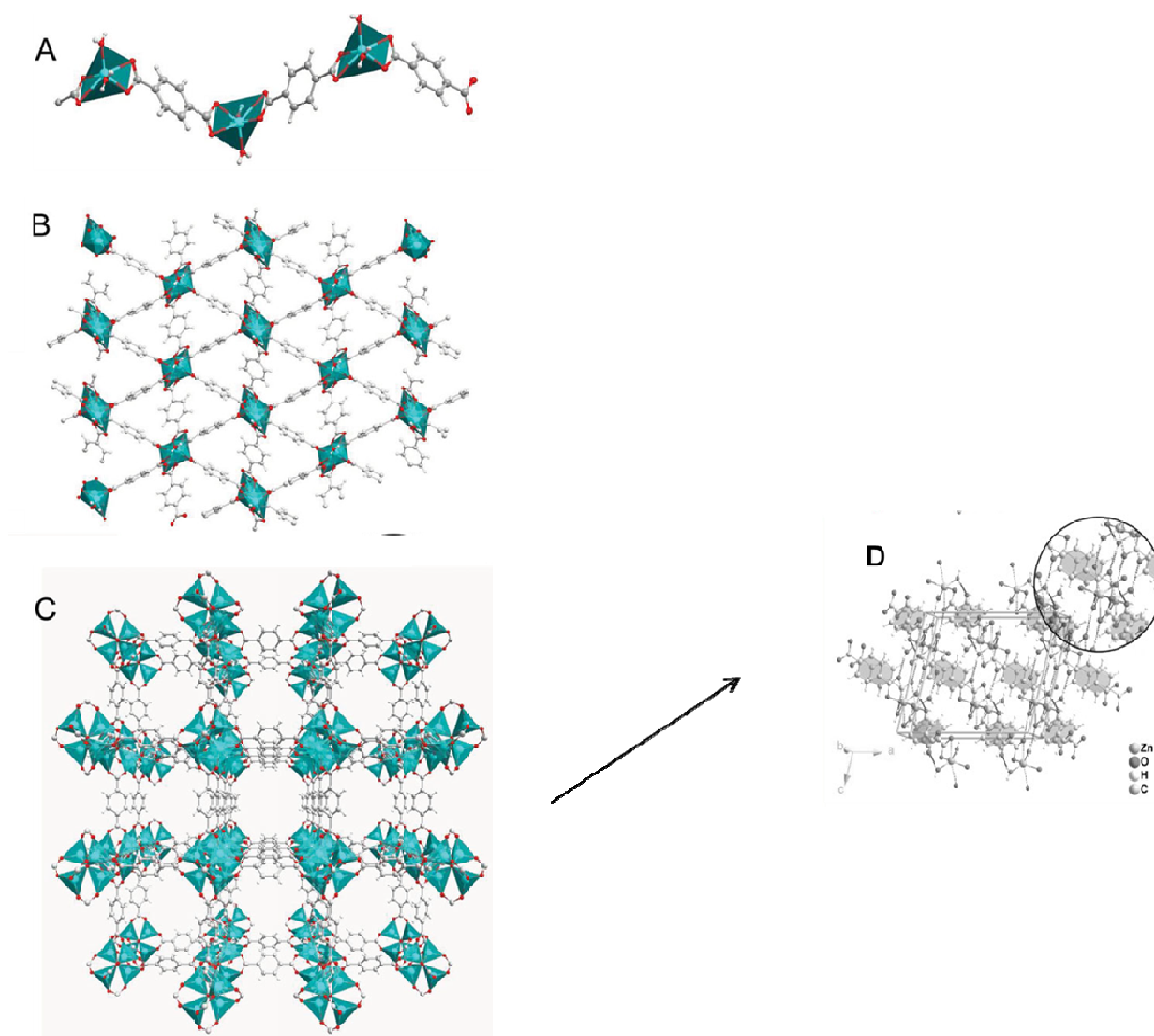
Fonte: W. Zhou, Wu H., Udovic T. J., Rush J. J., and Yildirim T. , *J. Phys. Chem. A* **2008**, 112, 12602-12606.

Por outro lado, a MOF $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$ é um material lamelar com uma organização em camadas bem definidas, podendo ser desenvolvida sob a forma 1, 2 ou 3D, conforme esquematiza a figura 09. Em nosso laboratório foi sintetizada a forma 1D, sendo um dos intuitos utilizá-lo para adsorção de fármacos [74]. O trabalho pioneiro nesta área estudou a incorporação do fármaco antitumoral 6-mercaptapurina, em diferentes proporções. Os sistemas foram testados em ensaios antitumorais *in vitro* e *in vivo*, e apresentaram atividade de inibição do crescimento tumoral, bem como foi realizada a avaliação histológica dos órgãos dos animais, não sendo observadas alterações histológicas graves [75]. Mais recentemente, realizamos um estudo utilizando a técnica de docking molecular para prever a interação de um conjunto de fármacos relevantes com a MOF $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$. Neste estudo, esta técnica corroborou para melhores conclusões dos resultados experimentais [76].

Destacando as características peculiares da $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$, é interessante ressaltar que o espaço existente entre os baricentros de duas lamelas adjacentes, ou do início de uma lamela até o início da lamela seguinte é conhecido como espaçamento basal. A distância entre duas lamelas adjacentes é denominada

cavidade ou espaço interlamelar. É neste espaço, que pode ocorrer a intercalação de uma espécie química de interesse [77]. Além dos atributos favoráveis desta MOF para atuação como carreador de fármaco, existe o fato de que não é observado na literatura estudo como o aqui proposto, a seguir.

Figura 09: Estrutura da MOF $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$ em 1(A), 2 (B) e 3 dimensões (C). Estrutura supramolecular da mesma molécula, destacando os empacotamentos π - π (poliedros cinzas) e as ligações de hidrogênio (região ampliada) (D).



Fontes: K. A. J. S. A. P.-s. C. O. Wanderley, *Química Nova* **2010**, XY, 1-5; M. O. Rodrigues, M. V. de Paula, K. A. Wanderley, I. B. Vasconcelos, S. Alves, T. A. Soares, *International Journal of Quantum Chemistry* **2012**, 112, 3346-3355.

2. OBJETIVOS

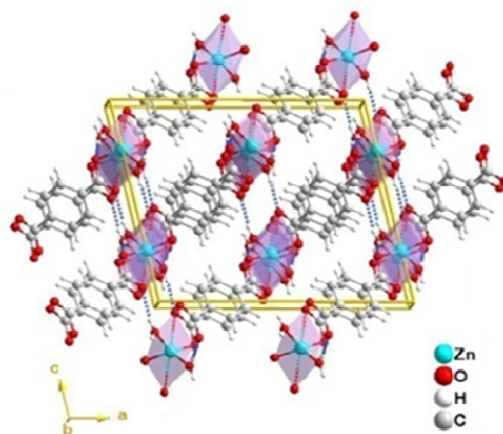
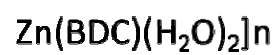
Com base em limitações apresentadas por diversas nanopartículas em carrear fármacos, o presente trabalho almeja:

2.1) Objetivo geral

Avaliar o potencial de redes metalorgânicas (MOFs) como carreadores de fármacos.

2.2) Objetivos específicos

- Realizar estudos experimentais das incorporações dos fármacos IBU e DOXO, de forma independente, nas MOFs ZIF-8 e $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$;
- Caracterizar as incorporações dos fármacos, através de diferentes métodos de análise – espectroscopia vibracional na região do infravermelho, espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, espectroscopia de fotoluminescência, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X, análise termogravimétrica e microscopia confocal;
- Avaliar a viabilidade de macrófagos, frente aos materiais ZIF-8, IBU-ZIF-8 e IBU;
- Avaliar, *in vitro*, a dissolução dos fármacos incorporados as MOFs;
- Avaliar a atividade citotóxica dos sistemas DOXO-ZIF-8 e DOXO-ZnBDC, através do método do MTT;
- Avaliar a toxicidade aguda tanto das MOFs ZIF-8 e $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$, quanto dos materiais preparados, em camundongos albino Swiss, bem como o perfil histológico de órgãos vitais destes animais;



CAPÍTULO 3: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

3.1) MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são abordadas todas as metodologias experimentais utilizadas, mas antes são elencados os reagentes utilizados:

- Solventes: etanol P.A (Dinâmica), Água ultrapura (Millipore Corporation);
- MOFs: Z1200 (Sigma) e $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$ [Sintetizada por [74]];
- Substâncias hóspedes: Sal de ibuprofeno (PM: 228 g/mol, Sigma) e Cloridrato de doxorrubicina (PM: 580 g/mol, Bérigamo). É importante salientar que na formulação deste produto, são encontrados apenas 17% do fármaco (doxorrubicina), o restante corresponde a excipientes, sobretudo lactose.

3.2) MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.2.1) INCORPORAÇÃO DOS FÁRMACOS

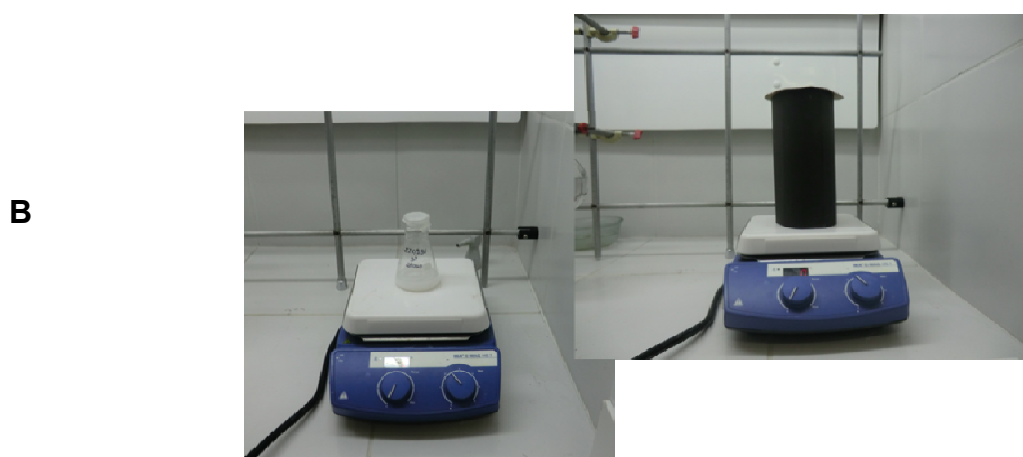
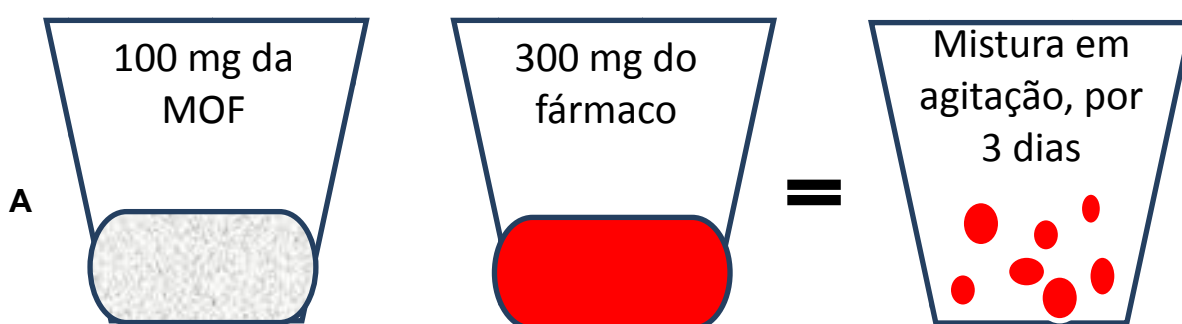
Para as incorporações dos fármacos foram obedecidas as etapas descritas na figura 10. Inicialmente, em um balão de fundo redondo foram dissolvidos 300 mg do fármaco IBU (etanol) ou do cloridrato de doxorrubicina (água ultrapura). Uma vez dissolvido as substâncias hóspedes, foram adicionados 100 mg de MOF, previamente pulverizada, e o sistema foi submetido a agitação. Após o período em agitação, o sobrenadante foi coletado para determinação da concentração do fármaco (UV-Vis) e o precipitado obtido foi submetido a lavagens sucessivas com o designado solvente, objetivando retirar o excesso de fármaco que não foi adsorvido pela MOF. Essa etapa foi imprescindível para se estabelecer a melhor condição para ocorrência da adsorção, levando-se em consideração o período de agitação do sistema.

A proporção dos reagentes utilizados foi de 3(fármaco):1(MOF) em massa. O procedimento empregado foi realizado de acordo com o de Horcajada e colaboradores [31a], que utilizaram 300 mg de fármaco, 100 mg de MOF e 10 mL do solvente designado. Este método de incorporação foi realizado em triplicata, em diferentes períodos de agitação (1 dia, 3 dias e 7 dias), para determinar o melhor tempo de incorporação. Foram realizadas incorporações tanto do IBU quanto da

DOXO na ZIF-8 e na $\text{Zn(BDC)(H}_2\text{O)}_2$ n. Estes sistemas foram submetidos à agitação, sendo protegidos da luz, conforme apresentado na figura 10, pois se tratam de fármacos fotossensíveis.

Contudo, após as referidas etapas, o material foi submetido à secagem, a temperatura ambiente, e conduzido para as etapas posteriores de caracterização, e finalmente destinados aos ensaios biológicos.

Figura 10: Ilustração das incorporações dos fármacos IBU e DOXO, nas MOFs ZIF-8 e $[\text{Zn(BDC)(H}_2\text{O)}_2]$ n (A); sistema em agitação, protegido da luminosidade (B).



Sistema em agitação

Fonte: Autoria própria

3.2.2) PERFIL DE INCORPORAÇÃO DOS FÁRMACOS

Nesta etapa, foi dada a devida atenção para serem obtidas as quantidades dos fármacos incorporadas nas MOFs. Para isso, inicialmente, foram preparadas soluções estoques tanto do IBU quanto do cloridrato de doxorrubicina, em seus

respectivos solventes, e, a partir destas soluções, foram preparadas outras soluções em diferentes concentrações, dispostas na tabela 01. A intenção na realização deste procedimento seria a obtenção das curvas de calibração, referentes aos três sistemas em estudo. Assim, gráficos de concentração *versus* resposta (absorbância) puderam ser determinados, disponibilizando uma equação da reta.

Para realização destas análises, foram considerados os comprimentos de onda apresentados na tabela 01. Entretanto, foram considerados dois comprimentos de onda diferentes: 485 nm para o sistema ZIF-8 e 232 nm para o sistema $[Zn(BDC)(H_2O)_2] n$, para elaboração da curva da DOXO. A utilização deste último comprimento de onda, deveu-se ao fato da $[Zn(BDC)(H_2O)_2] n$ absorver na mesma região anteriormente considerada deste fármaco (485 nm).

Tabela 01: Concentrações das soluções dos fármacos, utilizadas para obtenção das respectivas curvas de calibração, voltadas aos sistemas em que foram incorporados.

	FÁRMACOS		
	<i>Ibuprofeno</i>	<i>Doxorrubicina</i>	<i>Doxorrubicina</i>
	(ZIF-8 e $[Zn(BDC)(H_2O)_2] n$)	(ZIF-8)	($[Zn(BDC)(H_2O)_2] n$)
	$\lambda = 220 \text{ nm}$	$\lambda = 485 \text{ nm}$	$\lambda = 232 \text{ nm}$
Concentrações estabelecidas C(10⁻⁴M)	0,2	0,5	0,1
	0,5	1,0	0,5
	0,6	2,1	1,0
	0,7	3,1	1,5
	0,8	4,1	2,0
	0,9	5,6	2,5
	1,4	7,0	2,7
	1,5	8,3	-

3.2.3) AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS

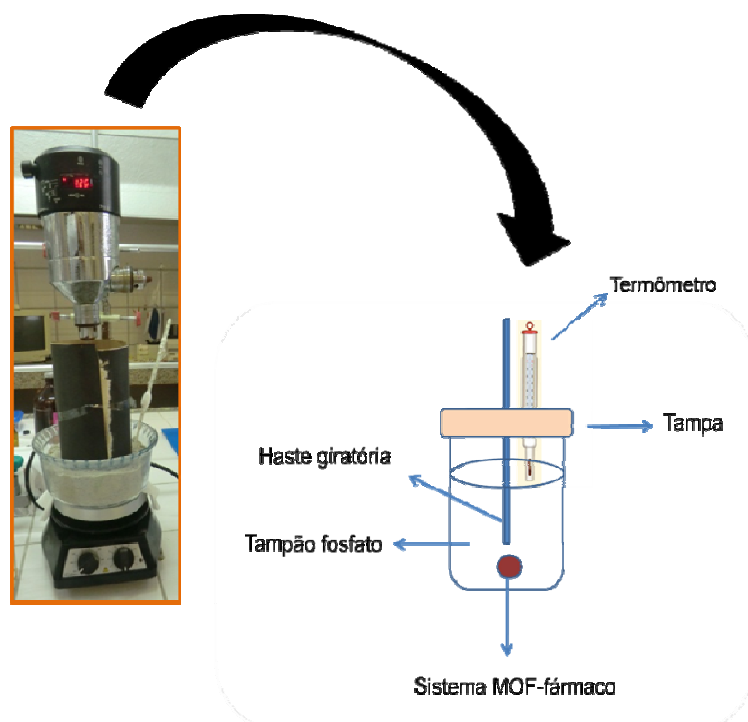
Através do aparato desenvolvido em nosso laboratório (Figura 11), os materiais em estudo, designados IBU-ZIF-8, DOXO-ZIF-8, DOXO-ZnBDC e IBU-ZnBDC, foram submetidos em meio de dissolução contendo 437 mL de PBS 0,01 M (pH 7,4), a $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, velocidade de agitação de 96 r.p.m., até completa liberação ou no máximo 48 horas do início dos ensaios. É importante salientar que estas

condições estão condizentes com a via de administração (intravenosa) proposta para administração dos materiais.

Para preparação das pastilhas MOF-fármaco a serem imersas na solução de PBS, 27 mg dos sistemas foram comprimidos em prensa hidráulica utilizando-se uma força de compressão de 3 toneladas (equivalente à $5445,16 \text{ kgf/cm}^2$), durante 2 minutos.

O volume coletado para cada alíquota foi de 2 mL do meio de dissolução, o mesmo era, a medida que analisado, repostado para manutenção da concentração do meio. As amostras foram coletadas, filtradas e analisadas em um espectrofotômetro, durante 48 horas. Posteriormente, ainda houve monitoramento até se completar 30 dias. A quantidade de fármaco liberada foi determinada a partir de uma curva padrão realizada com o referido fármaco, em diferentes concentrações, levando em consideração o total de fármaco encapsulado na ZIF-8 e a quantidade liberada em cada tempo de análise. Assim, foram consideradas as absorbâncias em 220 nm (IBU-ZIF-8 e IBU-ZnBDC), em 232 nm (DOXO- ZnBDC) e em 485 nm (DOXO-ZIF-8).

Figura 11: Aparato utilizado para o ensaio de liberação dos fármacos, a partir das respectivas MOFs, em solução.



Fonte: Autoria própria

A cinética de liberação do fármaco em uma formulação é um parâmetro determinante na quantificação do fármaco dissolvido, na velocidade de liberação e nos possíveis problemas que possam ocorrer durante sua dissolução.

3.3) TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

A depender do enfoque adotado, existem várias definições para caracterização de materiais na literatura. Sob a óptica da Engenharia e Ciências de Materiais podemos conceituar: “Descrição dos aspectos de composição e estrutura dos materiais, dentro de um contexto de relevância para um processo, produto ou propriedade em particular” [78].

Atenção às diversas solicitações dos sistemas vivos deve ser considerada, pois os biomateriais estão em contato direto com estes, seja através de funções estruturais de sustentação, seja através de respostas bioquímicas e físico-químicas complexas, tais como resposta imunológica, trombogenicidade, adsorção de macromoléculas, resposta inflamatória, histocompatibilidade, osteocondução, dentre outras. A caracterização adequada das interações do sistema biomaterial-tecido, requer as avaliações das quatro entidades distintas: superfície, recobrimento, interface e volume (“bulk”).

Em síntese, as técnicas de caracterização deverão ser determinadas de modo a alcançar a avaliação completa do sistema biomaterial-organismo vivo. Desta forma, foram empregadas espectroscopia vibracional na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal, análise termogravimétrica, espectroscopia de fotoluminescência, e difratometria de raios-x.

3.3.1) ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho vibracional na região do infravermelho foi empregada para caracterizar os grupos funcionais típicos das MOFs e da incorporação dos fármacos, nas matrizes já citadas.

As análises na região do infravermelho ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras foram preparadas através da técnica de

pastilhas de KBr, e em seguida utilizou-se um espectrômetro Bruker modelo IFS-66, que mostrou bandas de absorção características da vibração molecular das amostras em estudo. Os resultados foram analisados pelo programa Spectroscopic Software OPUS da Bruker.

3.3.2) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O microscópio eletrônico de varredura é a ferramenta ideal para identificar o hábito dos materiais em estudo, visto que por meio de imagens tridimensionais com alta resolução e possibilidade de ampliação de até 300.000 vezes, proporciona análises apuradas de suas morfologias [79].

Para início das análises, as amostras foram previamente fixadas a um pedaço de fita duplaface de carbono, apoiadas sobre uma placa de metal em vácuo, e em seguida revestidas com uma película de ouro de 15 nm de espessura através do uso de um metalizador, modelo Sputter Coater SCD 050 Baltec. Esta etapa foi necessária para tornar a amostra um material condutor, possibilitando a emissão de elétrons, os quais são os responsáveis pela formação da imagem que é construída em sequência no tempo, à medida que o material é varrido. O microscópio utilizado foi o Scanning Eletron Microscopy JSM – 5900 Jeol, acoplado ao EDS Vantage, Thermo/Noran Instruments.

3.3.3) ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A termogravimetria é uma técnica de análise térmica em que a variação da massa da amostra, perda ou ganho, é determinada como uma função da temperatura e/ou tempo enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer detalhadamente as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias [80]. Permite estabelecer a faixa de temperatura em que as mesmas adquirem composição química definida ou as temperaturas em que começam a se decompor, bem como para acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, decomposição, etc.

Assim, as curvas termogravimétricas dos materiais preparados foram obtidas usando o equipamento Shimadzu, modelo 50 WS, do Laboratório de Materiais

Vítreos e Nanodispositivos Fotônicos, do Departamento de Química Fundamental da UFPE, bem como o Q50 Thermogravimetric da TA Instruments, do Laboratório de Polímeros, do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará. Para a realização das análises foram utilizados 10 mg de cada amostra, as quais mantiveram-se sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min), em uma faixa de temperatura de 25 a 900 °C, usando cadinho de platina, sob a taxa de aquecimento de 10°C/min.

3.3.4) DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

Assim como a técnica anterior, a difração de raios X assume muitas funções nas análises farmacêuticas, é uma poderosa ferramenta que permite alta precisão nos resultados quantitativos e qualitativos de misturas sólidas cristalinas [81]. Para a realização da difratometria de Raios X de pó foi utilizado o difratômetro da Siemens, modelo D5000, do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco. A emissão utilizada foi a de cobre, sob as condições de 40 KV e 40 mA. O intervalo de análise foi estabelecido através do método passo a passo, sendo de 2θ entre 5 e 50°, com $D2\theta$ de 0,01°, fenda Soller de 2,5° de divergência, fenda de espalhamento de 0,5° e fenda de recepção de 0,6 mm. Para o refinamento pelo método de Rietveld foi usado o programa GSAS [82]. A orientação preferencial foi corrigida pelo modelo dos esféricos harmônicos descrito por Jarvinen [83]. E, para o ajuste do perfil dos picos de difração foi usada a função de Thompson-Cox-Hastings modificada por Young e Desai [84].

3.3.5) ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

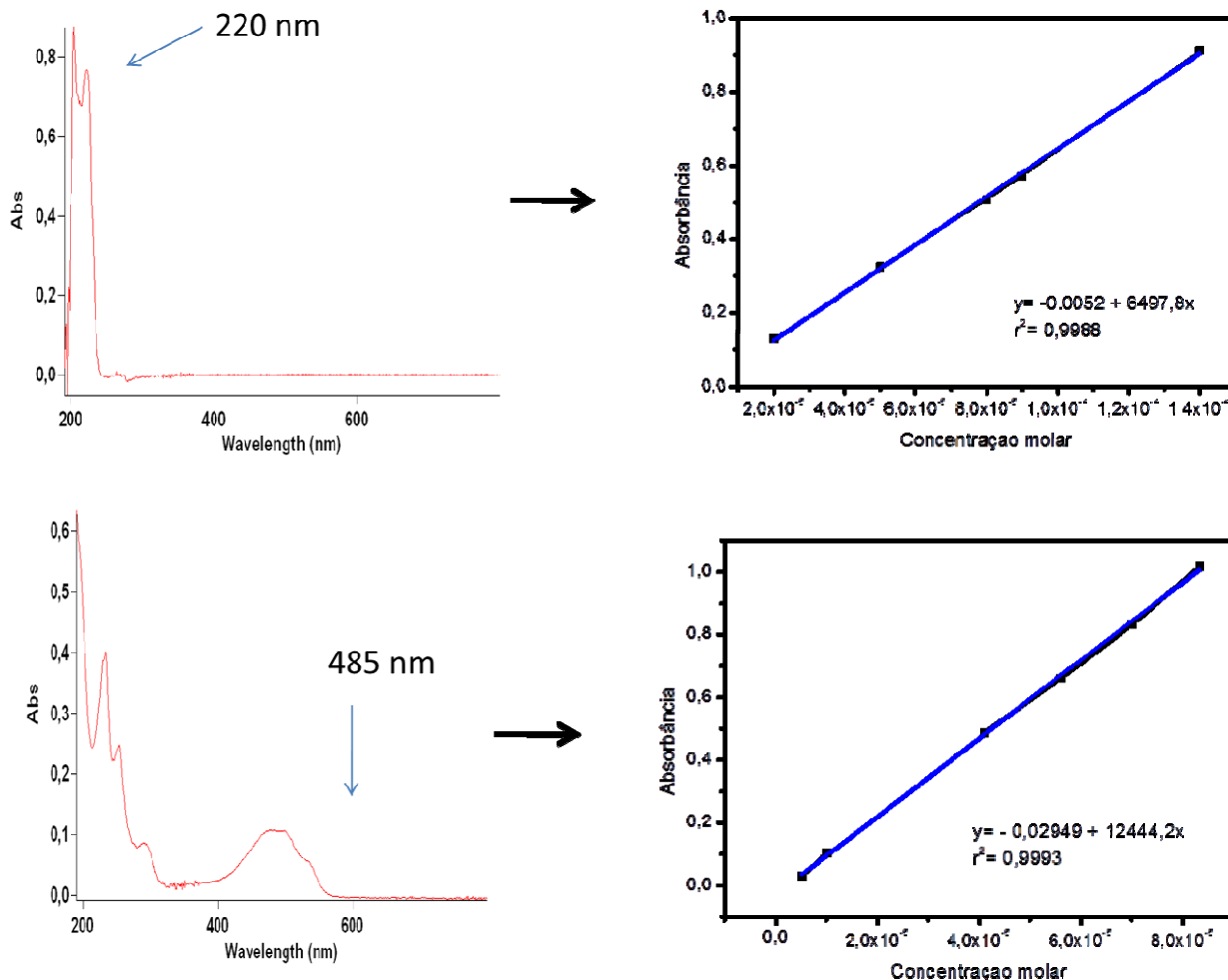
Para analisar a fluorescência dos materiais foi utilizado a espectrofluorimetria e sua técnica complementar, a espectroscopia de absorção. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia I, do Departamento de Química Fundamental-UFPE, com o equipamento HORIBA Jobin Yvon, FluoroLog - Modular Spectrofluorometer. As medidas foram realizadas com as amostras em estado sólido, usando intervalos de 200-600 nm para excitação e de 400-700 nm para

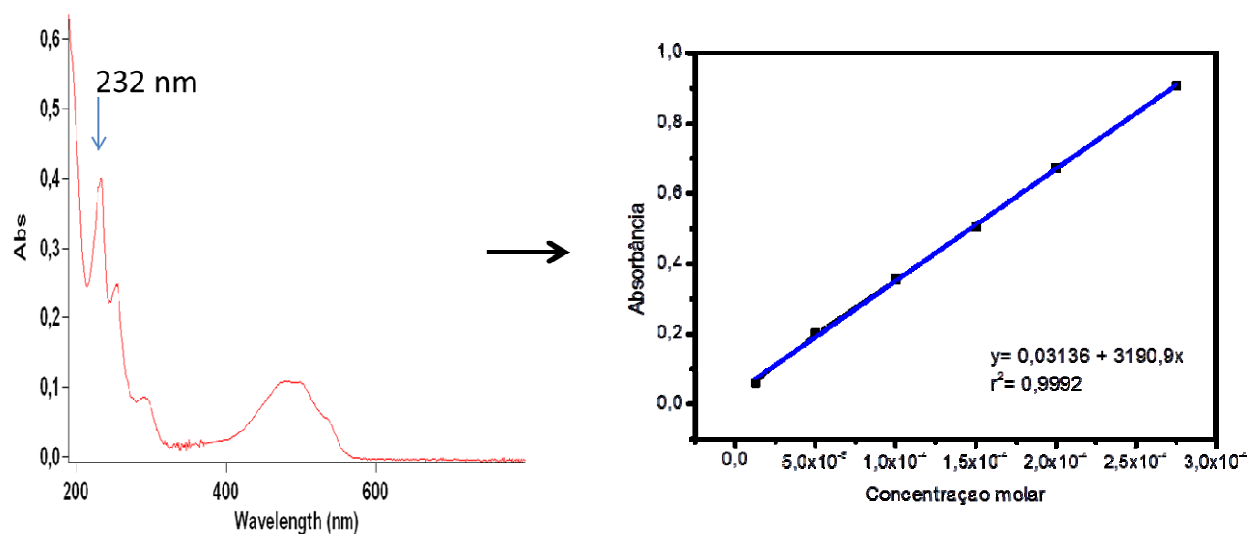
emissão. Em relação as fendas, foram utilizadas as de 2 nm e 1 nm, para excitação e emissão, respectivamente.

3.3.6) ESPECTROSCOPIA UV-Vis

Na intenção de determinar a concentração dos fármacos incorporados aos sistemas, os espectros de absorção das amostras em concentrações da ordem de 10^{-4} mol/L, foram obtidos com a utilização do Espectrômetro de feixe simples Cary 50/ Varian, o qual opera com a lâmpada de xenônio, instalado nas dependências do Laboratório de Eletrossíntese Orgânica, do Departamento de Química Fundamental - UFPE. As curvas de calibração obtidas por esta técnica estão apresentadas na figura 12.

Figura 12: Curvas analíticas referentes aos fármacos IBU (A - ZIF-8 e $\text{Zn(BDC)(H}_2\text{O)}_2$) e DOXO (B - ZIF-8 e C - $[\text{Zn(BDC)(H}_2\text{O)}_2]_n$).





Através dos espectros de absorção na região do UV-Vis foi possível determinar a concentração dos fármacos em estudo, uma vez que as MOFs não absorvem na mesma região que os mesmos, haja vista que estes materiais são insolúveis em água e em solventes orgânicos. Dessa forma, a partir da construção das curvas de calibração dos fármacos, disponíveis na figura 12, foram obtidas as respectivas equações das retas, que possibilitaram o cálculo para determinação da concentração dos fármacos IBU e DOXO incorporados tanto na ZIF-8, quanto na $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$ (tabela 02).

3.4) RESULTADOS

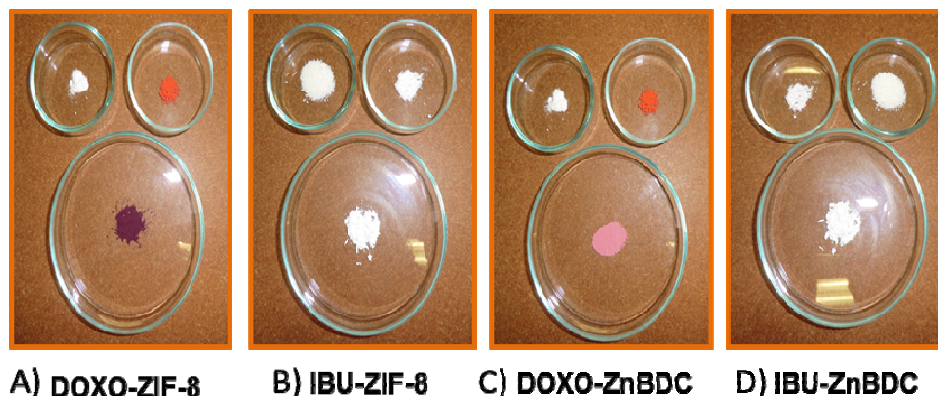
3.4.1) ESPECTROSCOPIA UV-Vis, PERFIL DE INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS

Com relação à incorporação dos fármacos, com base em observações macroscópicas, foram visualizadas colorações diferentes entre as incorporações realizadas na ZIF-8 e na $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$, em se tratando da DOXO. Assim, como observado nas figuras 13A e 13C, o sistema DOXO-ZIF-8 apresentou uma coloração roxa, enquanto que o sistema DOXO-ZnBDC apresentou uma coloração rosa, respectivamente. O que evidencia a formação de complexos.

Este comportamento pode ser atribuído a uma interação hóspede-hospedeiro, conforme dados obtidos através de docking molecular, realizado sob a colaboração da professora Thereza Soares do Departamento de Química, da Universidade Federal de Pernambuco. Os resultados desta investigação referente ao sistema DOXO-ZIF-8, se encontram no apêndice 7.2.2 deste trabalho [85]. Em conjunto com a caracterização experimental apresentada mais adiante, os cálculos sugerem que a DOXO interage, preferencialmente, com a superfície da MOF, ao invés do seu interior, cujo diâmetro de entrada é, pelo menos, metade do tamanho do menor eixo do fármaco [85].

De forma distinta, as incorporações com o fármaco IBU (figuras 13B e 13D) não apresentaram mudança de cor, ao fim do processo. Entretanto, num outro trabalho, estudos semelhantes de docking molecular foram realizados, corroborando para elucidação dos tipos de interação entre o fármaco ibuprofeno e a MOF $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]_n$ [76]. A técnica de docking vem contribuir fortemente nesta área, pois antes da realização dos estudos experimentais, pudemos selecionar os fármacos que possuem afinidades com tais MOFs. Os resultados podem ser visualizados no apêndice 7.2.1 deste trabalho [76].

Figura 13: Representações das incorporações DOXO-ZIF-8 (A), IBU-ZIF-8 (B), DOXO-ZnBDC (C) e IBU-ZnBDC (D). Nas placas maiores são observados os resultados macroscópicos, com base na mudança de cor, das incorporações, em quanto que nas placas menores estão dispostos os reagentes independentes (MOF e fármaco, respectivamente).



Fonte: Autoria própria

Através dos espectros de absorção na região do UV-Vis foi determinado o comprimento de onda de absorção do IBU e da DOXO, sendo verificadas bandas de absorção em 220 nm e 485 nm, respectivamente (figura 12). Assim, foi possível determinar a concentração dos fármacos em estudo, uma vez que as MOFs não absorvem na mesma região que os mesmos, haja vista que estes materiais são insolúveis em água e em solventes orgânicos. Dessa forma, a partir da construção das curvas de calibração dos fármacos, disponíveis na figura 12, foram obtidas as respectivas equações das retas, que possibilitaram o cálculo para determinação da concentração dos fármacos IBU e DOXO incorporados tanto na ZIF-8, quanto na $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$ (tabela 02).

Tabela 02: Quantidade do fármaco ibuprofeno e do medicamento cloridrato de doxorrubicina, incorporados nas MOFs.

Fármacos	g fármaco/g MOF	
	UV-Vis	UV-Vis
	(g fármaco/g ZIF-8)	(g fármaco/g $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$)
ibuprofeno	1,260	1,335
Cloridrato de doxorrubicina	2,970	2,750

Com base ainda na tabela 02, é importante salientar que na quantidade de DOXO incorporada incluem-se os excipientes, pois se trata, como já mencionada anteriormente, de um produto comercial. Assim, na formulação do rubidox (cloridrato de doxorubicina) contém 0,05 g de doxorubicina.

Após obter como absorbância o valor de 0,280 e a equação da reta, a quantidade incorporada a MOF pôde ser determinada, por diferença em relação à quantidade utilizada para preparação do material. Assim, com a referida absorbância, o peso molecular do medicamento (580 g/mol) e volume de 0,020 L, foi encontrado o valor de 0,04971 g do DOXO incorporada por grama de MOF ZIF-8, levando em consideração apenas o valor do princípio ativo (0,05 g).

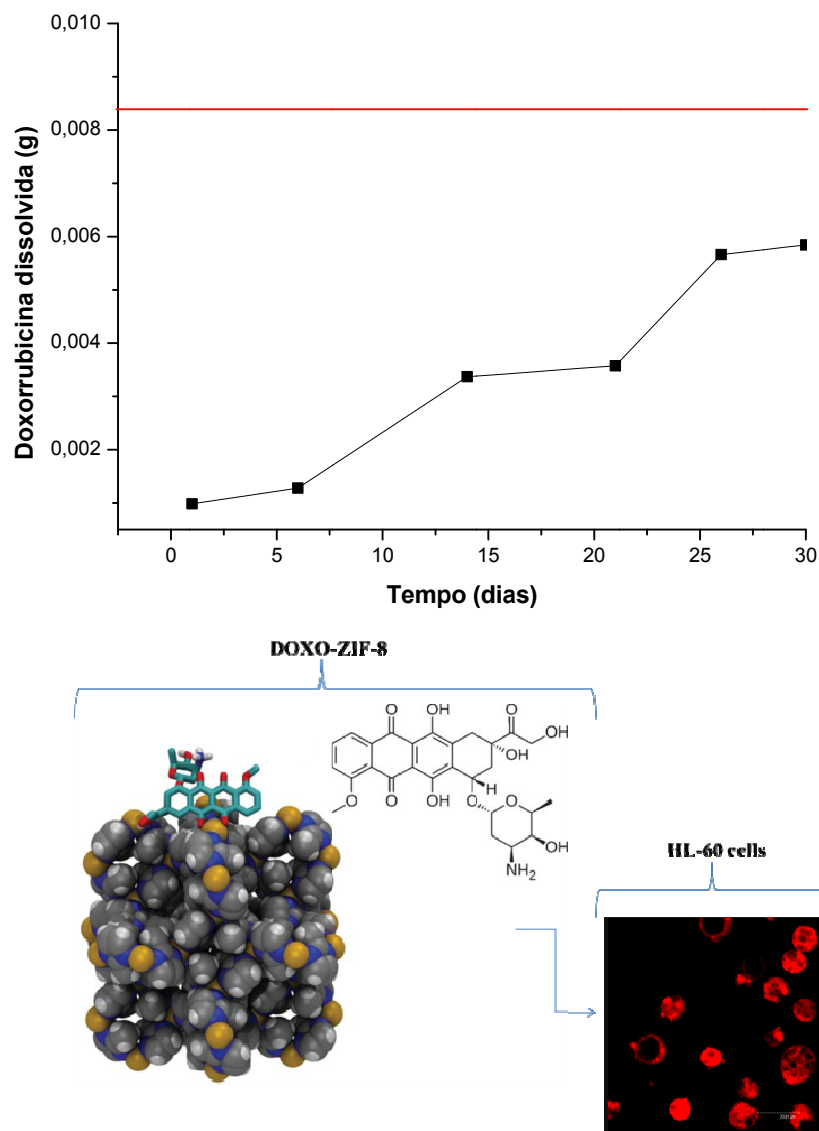
A partir dos resultados, observamos que a DOXO foi incorporado, de forma significativa, tanto na ZIF-8 quanto na $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$. Na literatura encontramos uma quantidade muito superior do fármaco 5-fluorouracil no sistema ZIF-8, (0,660 g de 5-fluorouracil por grama de ZIF-8). Isto pode ser justificado quando se leva em consideração o tamanho dos fármacos em questão. O tamanho do 5-fluorouracilo ($5,42 \times 4,50 \times 0,00 \text{ \AA}$) é muito menor em relação ao da DOXO ($14,64 \times 10,02 \times 6,90 \text{ \AA}$). Com base nesta informação, é provável que o primeiro esteja incorporado no interior dos poros da MOF, enquanto que o segundo esteja apenas na superfície da MOF[73]. Segundo os estudos de simulação de docking molecular, a incorporação da DOXO resulta da interação com íon metálico Zn^{2+} das MOFs. Em meio aos resultados acredita-se que esta interação ocorra a partir da substituição de grupos imidazolatos por moléculas de água, as quais atuariam como elos entre a DOXO e o cátion Zn^{2+} tetraédrico [85]. Em adição, é sabido que o tamanho e o volume adequados dos poros tornam os materiais porosos promissores para a incorporação e posterior liberação de uma variedade de moléculas bioativas [86].

Um exemplo de sucesso na incorporação de fármaco é relatado pelo grupo de Férey [87], o qual obteve 73 e 70% de ibuprofeno adsorvido em suas MOFs, MIL-53(Cr) e MIL-53(Fe), respectivamente. A diferença de adsorção em relação aos nossos resultados pode ser atribuída ao fato destas MOFs apresentarem um tamanho de poros superiores. No presente trabalho, optamos por sistemas que contenham íons Zn^{2+} por serem fundamentais no bom funcionamento dos organismos vivos, pois atuam como cofatores estruturais e catalíticos de muitas enzimas, resultando na modulação das vias de sinalização celular [88].

Conforme os resultados da tabela 01, constatamos uma melhor incorporação do DOXO, em ambas as MOFs estudadas. No entanto, aos estudos seguintes foi dada a exclusiva atenção ao sistema DOXO-ZIF-8, pelo fato da ZIF-8 demonstrar melhor perfil para alcançar o propósito deste trabalho. As informações referentes a este perfil serão abordadas mais adiante.

Para o estudo de liberação do fármaco DOXO (ver figura 14), a espectroscopia UV-Vis foi utilizada para mensurar a quantidade liberada do mesmo em PBS, pH 7,4. Vale salientar que, nestas condições, a ZIF-8 tem garantido sua estabilidade, bem como a DOXO [73]. A espectroscopia UV-Vis revelou-se adequada, visto que apresentou um limite de quantificação de fármaco bem utilizado em sistemas matriciais. Barboza e colaboradores desenvolveram e validaram uma metodologia analítica de dissolução. Os seus resultados demonstraram que a metodologia analítica por espectroscopia UV-Vis é considerada específica, linear, precisa, exata e robusta, sendo adequada para avaliação de fármacos em matrizes hidrofílicas, bem como aplicável aos testes de dissolução [89].

Figura 14: Representação gráfica da quantidade de fármaco liberado da ZIF-8, em 30 dias. A linha vermelha apresentada no gráfico, correspondente à quantidade total de fármaco incorporado a ZIF-8 (A). Representação esquemática da DOXO sendo liberada, de forma sustentável, pelo sistema DOXO-ZIF-8, em células HL-60 (B).



Fonte: Autoria própria

Apesar dos sistemas de liberação controlada de fármacos serem programados para ter uma liberação constante, eles não garantem uma concentração plasmática constante, entretanto conseguem fornecer uma liberação sustentada, ou bimodal. Este tipo de liberação é caracterizado por lenta liberação na fase inicial, seguido por aumento na liberação na fase posterior [90]. Há outro tipo de liberação, o qual foi o primeiro modelo proposto, chamado liberação de ordem zero,

em que a liberação do fármaco ocorre de forma lenta e constante, a fim de minimizar oscilações da concentração do fármaco no sangue [42].

Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes ao exposto acima, onde na figura 14 pode ser observada a quantidade de doxorubicina liberada em função do tempo. Nas primeiras 48 horas, foram liberados 13% do total incorporado a ZIF-8. Este efeito de liberação inicial lento pode referir-se a possibilidade das moléculas deste fármaco de estarem adsorvidas na superfície interna dos poros da ZIF-8, ou tratar-se de interações fortes entre os íons Zn^{2+} da ZIF-8 e a doxorubicina, que podem ser estabelecidas de formas variadas, pois como já foi mencionado, na ZIF-8 há existência de dois sítios distintos para o íon Zn^{2+} , um com coordenação tetraédrica e outro com coordenação octaédrica (figura 08). Estes resultados mostram que a ZIF-8 possui um padrão de ordem zero, semelhante ao perfil de liberação anteriormente relatado para o sistema de ibuprofeno-MIL-100, o qual depende da natureza do metal presente na MOF utilizada para a incorporação [31a]. Ainda analisando a figura 14, é observado que a liberação da DOXO, por 30 dias, obedece ao mesmo comportamento, onde 66% do fármaco foram liberados. Diferente dos resultados apresentados por Imaz et al, os quais revelam que esferas metal-orgânicas (DOX/Zn(bix)) realiza a liberação de 80% da DOXO, em 8 horas [91]. Nosso resultado é considerado excelente, quando comparado também, a liberação da DOXO da MIL-100, a qual libera 100% deste fármaco em 14 dias [92]. Ainda centrados em nossos resultados, é importante destacar que a DOXO ao ser liberada não mais apresenta a coloração roxa do sistema, volta a apresentar a coloração alaranjada de origem, ou seja, aquela observada antes deste ser incorporado na ZIF-8. Para elucidar este comportamento estudos teóricos de reatividade da DOXO estão sendo realizados em conjunto, com o professor Nivan, da Universidade Federal de Sergipe, com intuito de analisar evidências sobre a existência de mais de um tautômero no meio reacional de incorporação da DOXO na ZIF-8; possível presença de mais de um tautômero que influenciem a reatividade da DOXO; efeito da solvatação no equilíbrio tautométrico e o estudo de estabilidade relativa de DOXO desprotonada.

Contudo, a liberação da DOXO mediada pelo mecanismo de desorção, além de reduzir os efeitos adversos da DOXO, sobretudo a cardiotoxicidade, pode proporcionar melhoras quanto a sua meia-vida curta, baixa biodisponibilidade em meios biológicos e baixa permeabilidade celular [93]. Além de promover a proteção

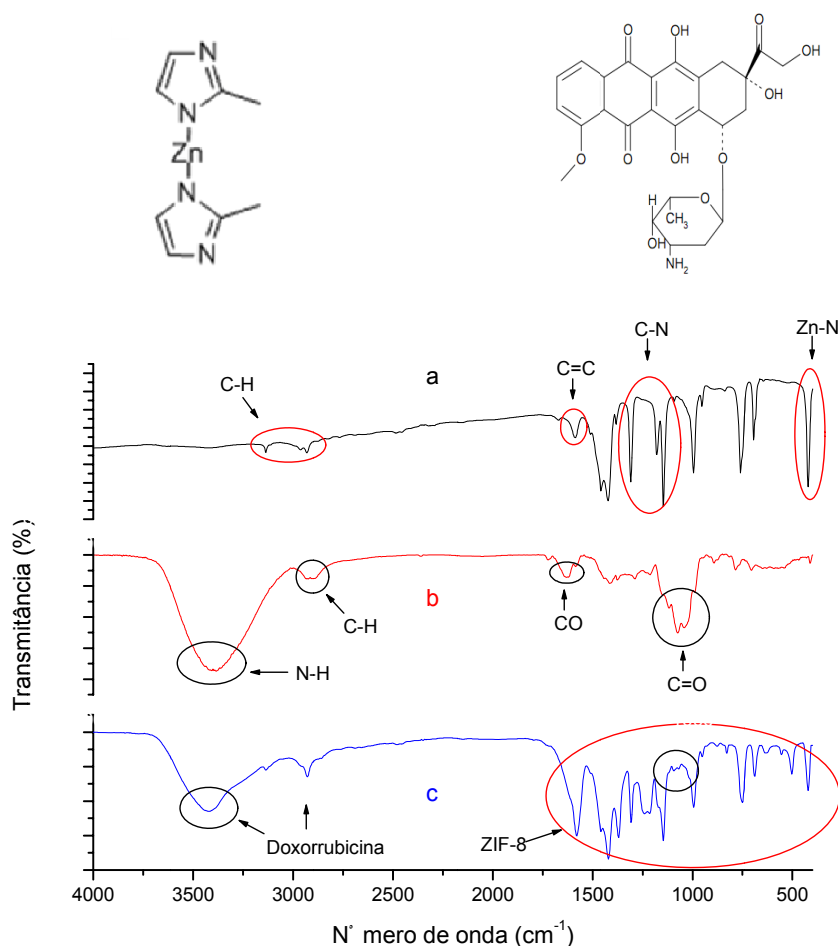
deste fármaco frente aos demais componentes da sua formulação, e tornar o esquema posológico simplificado com menor administração de ativo, privando o paciente dos seus efeitos adversos.

3.4.2) ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

3.4.2.1) Sistema DOXO-ZIF-8

Na figura 15 são visualizados os espectros de infravermelho relacionados à incorporação DOXO-ZIF-8.

Figura 15: Espectros de infravermelho referentes à incorporação do fármaco DOXO: a) ZIF-8, b) DOXO c) Sistema DOXO-ZIF-8. A= Fórmula estrutural da ZIF-8, B= Fórmula estrutural do cloridrato de doxorubicina.



Na figura 15a, constatamos em 3135, 2962 e 2930 cm^{-1} estiramento de C-H de compostos aromáticos, deformação axial assimétrica e estiramento de C-H de alifático referente ao anel imidazol, respectivamente. Em 1670 cm^{-1} é observada a

banda do estiramento de C=C. Enquanto que as bandas de absorção C-N são observadas na região de 1100 a 1400 cm^{-1} . Finalizando, ainda é observado em 422 cm^{-1} o modo de estiramento Zn-N [94]. Estas atribuições estão de acordo com Park et al, 2006 [72b].

Em análise ao sistema DOXO-ZIF-8 (figura 15c), os picos da DOXO e da ZIF-8 na incorporação não são favorecidos, devido a sobreposição dos mesmos. Entretanto, podemos sugerir a presença do fármaco em questão, em virtude de em 3441 cm^{-1} haver a ocorrência de uma deformação axial da ligação N-H, em 2936 cm^{-1} a deformação axial de C-H, em 1635 cm^{-1} a deformação axial da ligação CO e em 1000 a 1260 cm^{-1} a absorção associada ao estiramento do grupamento álcool [94]. Na região entre 675 e 900, há uma deformação fora do plano do grupo O-H, que também foi relatada por Chouhan et al [95]. Através destes resultados, a possível incorporação da DOXO na ZIF-8 é corroborada pela mudança de coloração nos cristais da ZIF-8, que inicialmente eram incolores e passaram a apresentar a coloração roxa. Em adição, resultados de modelagem molecular sugerem que a DOXO pode interagir, fortemente, com a superfície (fenômeno de adsorção) da ZIF-8 [85]. Ainda, podem ser descartados possíveis casos de ligações químicas, pelo fato da não existência de novas bandas de absorção. Entretanto, esta afirmativa deve ser corroborada por um estudo de deconvolução, na região 500-1500 cm^{-1} .

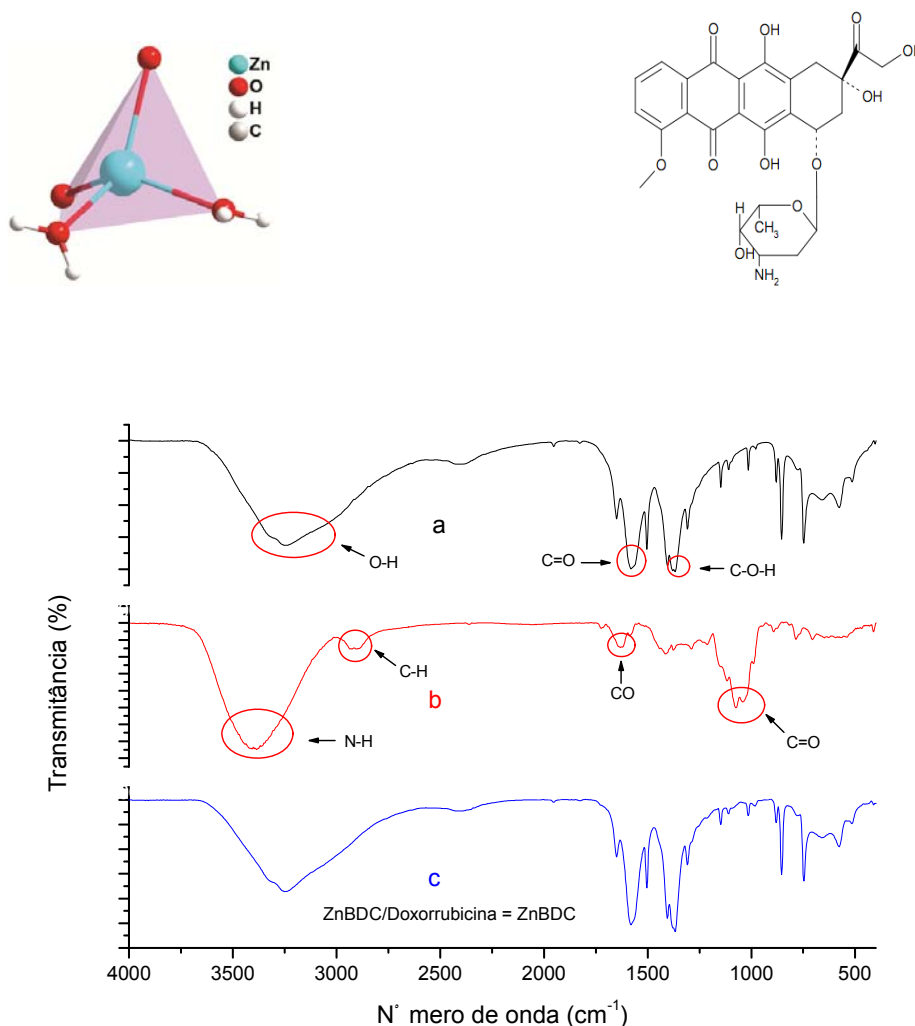
3.4.2.2) Sistema DOXO-ZnBDC

No sistema $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$ (figura 16a), em 3245 cm^{-1} é apresentada uma larga deformação axial de O-H, identifica-se também, facilmente, o sinal característico da carbonila, uma deformação axial de C=O em 1579 cm^{-1} . E, em 1367 cm^{-1} a deformação angular no plano C-O-H [94].

Neste sistema, a incorporação da DOXO pode ser interpretada de forma semelhante ao sistema DOXO-ZIF-8, visto que não foram observados picos referentes à DOXO no $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$, devido a possíveis sobreposições. Da mesma forma que o sistema anterior, é válido um estudo de deconvolução, para melhores esclarecimentos.

Contudo, foi observada a mudança de coloração dos cristais, que anteriormente eram incolores, passaram a apresentar coloração rosa.

Figura 16: Espectros de infravermelho: a) $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$, b) DOXO e c) sistema DOXO-ZnBDC. A= Estrutural da $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n$ (poliedro de coordenação), B= Fórmula estrutural do cloridrato de doxorubicina.



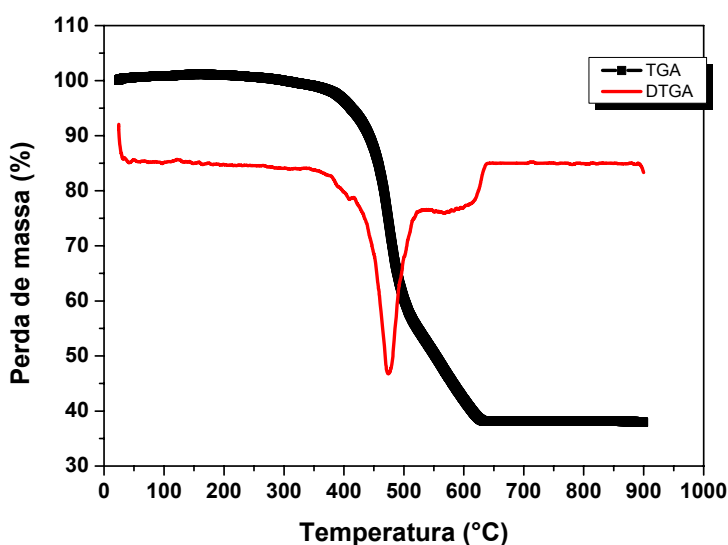
A partir da seção seguinte, o trabalho será destinado ao estudo, apenas, do sistema DOXO-ZIF-8. Este planejamento atendeu ao critério mediado pelos estudos biológicos, os quais serão conferidos no capítulo 3. Nele serão apresentados os resultados que tornam o sistema escolhido um forte candidato a um agente terapêutico.

3.4.3) ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

3.4.3.1) Sistema DOXO-ZIF-8

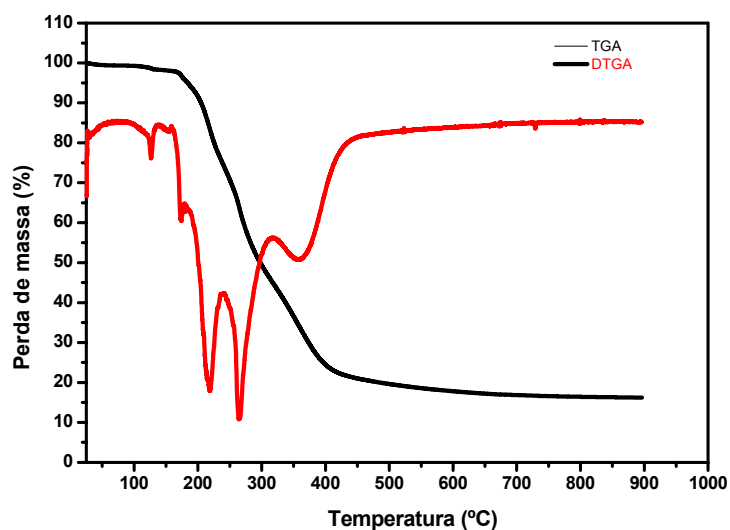
De acordo com a figura 17, a qual corresponde ao material ZIF-8, é possível observar na região entre 370-620°C, a ocorrência de dois eventos, que indicam a decomposição do imidazolato, parte orgânica deste material (perda de 62%). E, na região de 620 a 900°C é observado apenas, a presença de óxido de zinco, correspondendo a uma porcentagem de 37%. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Ordóñez et al (2010) [96].

Figura 17: Curva TG da $[\text{Zn}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2)_2]$ (ZIF-8).



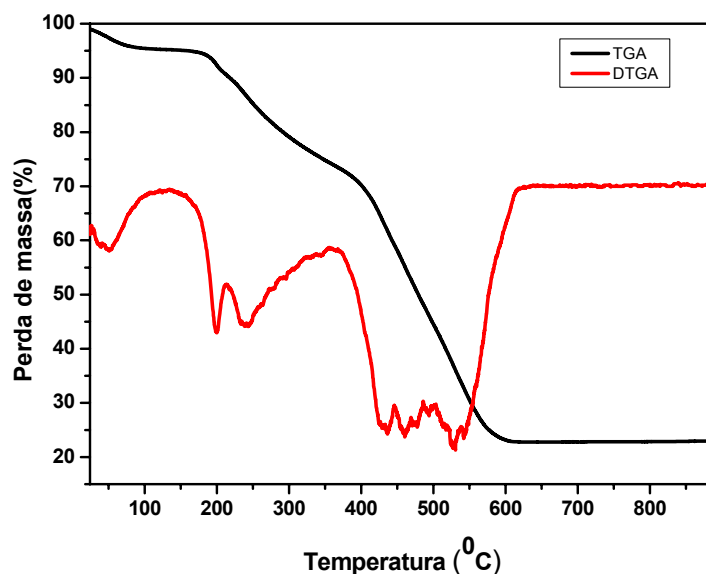
De acordo com a literatura, moléculas de água de hidratação são liberadas em torno de 100°C. Dessa forma, baseando-se nos dados termogravimétricos da figura 18, sugere-se a liberação de moléculas de águas de hidratação, referente ao primeiro evento que ocorre na região entre 80-150°C (1,77%). Em seguida, são observados quatro eventos simultâneos que ocorrem na região entre 160-460°C, os quais podem ser associados à decomposição da molécula $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}\text{HCl}$ (79,11%). Ainda podemos perceber uma de suas características importantes, a sua estabilidade térmica até 400°C, o que é concordante a resultados encontrados na literatura [97].

Figura 18: Curva TG/ DTG da DOXO.



Os dados termogravimétricos referentes ao sistema DOXO-ZIF-8 mostram quatro eventos de perda de massa (%), em faixas de temperatura que variam de 80-100, 190-390 e 390-620°C (figura 19). O primeiro evento é relacionado a perda de moléculas de água de hidratação, as quais interagem com os poros da ZIF-8. O segundo evento é característico das moléculas pertencentes à DOXO, visto que o perfil de decomposição da ZIF-8 não demonstrou perda de massa nesta região térmica. O terceiro evento corresponde a decomposição simultânea da DOXO e da ZIF-8, seguida da carbonização do material. Como resultado desta última perda, tem-se óxido de zinco residual (ZnO) (37 e 21%, respectivamente).

Figura 19: Curva TG/ DTG do DOXO-ZIF-8.



3.4.4) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A partir das fotomicrografias, observa-se a ZIF-8 com tamanhos variados de partículas de modo aglomerado, as quais possuem um diâmetro médio de cerca de 200 nm (figura 20B), tamanho coerente aos revelados por Ma.J.C. Ordonez et al [96]. De forma distinta, na figura 20A observamos cristais de DOXO, porém bem maiores que os da ZIF-8. E, como resultado da incorporação (DOXO-ZIF-8), foram obtidos nanopartículas cristalinas com tamanho aproximado de 300 nm, o qual é estimado também por análise de DRX (fotomicrografia 20C).

Figura 20: Fotomicrografias eletrônicas de varredura referentes às amostras DOXO (A), ZIF-8 (B) e DOXO-ZIF-8 (C).

