



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

**REDES DE COORDENAÇÃO: NOVOS SISTEMAS CARREADORES DE
FÁRMACOS**

DENISE PAULA DA CUNHA

**ORIENTADORES: SEVERINO ALVES JÚNIOR
TEREZINHA GONÇALVES DA SILVA**

**RECIFE
2009**

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

**REDES DE COORDENAÇÃO: NOVOS SISTEMAS CARREADORES DE
FÁRMACOS**

DENISE PAULA DA CUNHA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos básicos para a obtenção do título de mestre em Ciência de Materiais.

Orientadores: Prof. Dr. Severino Alves Júnior

Profa. Dra. Terezinha Gonçalves da Silva

RECIFE

2009

Cunha, Denise Paula da

Redes de coordenação: novos sistemas carreadores de fármacos / Denise Paula da Cunha. - Recife : O Autor, 2009.

xi, 73 folhas : il., fig., tab.

Dissertação(mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica. 2. Sistemas carreadores de fármacos. 3. Redes de coordenação. 4. Câncer. 5. Quimioterapia. I. Título.

546

CDD (22.ed.)

FQ2009-24

*Dedico este trabalho à minha avó, Abigail Cruz da Cunha,
que, ao longo de sua vida soube ser forte, diante das adversidades,
sem nunca perder o amor e a ternura pelas pessoas,
até o fim de sua vida.*



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO

DENISE PAULA DA CUNHA

“REDES DE COORDENAÇÃO: NOVOS SISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS”

A Banca Examinadora, composta pelos Professores Severino Alves Júnior (Presidente), Terezinha Gonçalves da Silva, Beate Saegesser Santos, todos da Universidade Federal de Pernambuco, e Railda Shelsea Taveira Rocha do Nascimento, da Universidade Estadual da Paraíba, considera a candidata:

APROVADA REPROVADA

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciéncia de Materiais do Centro de Ciéncias Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, aos 20 dias do mês de maio de 2009.

Severino Alves Júnior
PROF. SEVERINO ALVES JÚNIOR

PRESIDENTE E 1º EXAMINADOR

Terezinha Gonçalves da Silva
PROFª TEREZINHA GONÇALVES DA SILVA
ORIENTADORA

Railda Shlesia Taveira Rocha do Nascimento
PROFª RAILDA SHELSEA TAVEIRA ROCHA DO NASCIMENTO
2º EXAMINADOR

Beate Saegesser Santos
PROFª BEATE SAEGESSER SANTOS
3º EXAMINADOR

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER E TRATAMENTOS.....	1
1.1.2 Câncer.....	1
1.1.3 Tratamentos.....	3
1.2 SISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS.....	5
1.3 MATERIAIS POROSOS.....	10
1.3.1 Metal Organic Frameworks – MOF's	13
1.4 APLICAÇÃO DE MOFs COMO SISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS.....	16
2.OBJETIVOS	20
2.1 GERAL.....	20
2.2 ESPECÍFICOS.....	20
3.METODOLOGIA	21
3.1 MATERIAL UTILIZADO: SOLVENTES E REAGENTES.....	21
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	22
3.2.1 Síntese da MOF Zn(BDC) _n	22
3.2.2 Incorporação do fármaco na rede.....	23
3.2.3 Incorporação do Zn(NO ₃) ₂ •6H ₂ O na MOF-A	23

3.3 TÉCNICAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS...	23
3.3.1 Análise elementar.....	23
3.3.2 Espectroscopia de infravermelho.....	24
3.3.3 Análises termogravimétricas (TGA).....	24
3.3.4 Difratometria de raios-x.....	24
3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	25
3.4 PERFIL DE LIBERAÇÃO DO SISTEMA MOF-6MP	26
3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	26
3.5.1 Avaliação antitumoral <i>in vitro</i>	26
3.5.2 Toxicidade aguda da MOF e avaliação histológica.....	27
3.5.3 Avaliação antitumoral <i>in vivo</i> do sistema	28
3.5.4 Análises histológicas dos órgãos.....	30
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	31
4.1.1 Análise elementar	31
4.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV).....	32
4.1.3 Análises termogravimétricas	36
4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersa (EDS).....	41
4.1.5 Difração de raios-X.....	45
4.1.6 Perfil de liberação do sistema MOF-6MP.....	48
4.1.7 Avaliação antitumoral <i>in vitro</i> do sistema MOF-6MP.....	49
4.1.8 Toxicidade aguda da MOF.....	51
4.1.9 Avaliação histológica dos ensaios de toxicidade aguda.....	51
4.1.10 Avaliação antitumoral <i>in vivo</i> do sistema MOF-6MP.....	56
4.1.11Avaliação histológica antitumoral carcinoma de Ehrlich.....	58

5.CONCLUSÕES.....	65
6.PERSPECTIVAS.....	67
7.REFERÊNCIAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formação do câncer.....	1
Figura 2. Disseminação de células tumorais (metástase).....	2
Figura 3. Alguns sistemas utilizados em carreadores de fármacos.....	7
Figura 4. Gráfico representando as diferentes doses e concentração de fármaco no plasma.....	8
Figura 5. Esquema hipotético de ciclodextrinas.....	8
Figura 6. Classes de materiais porosos	11
Figura 7. Três exemplos de redes de zeólitas: a) MFI, contendo um sistema de canais bidimensionais; b) LTA, contendo cavidades; c) LTL, contendo um sistema de canais unidimensionais.....	12
Figure 8. Zeólitas. a) Projeção ao longo do eixo-c mostrando 7 canais; b) Projeção ao longo do eixo-c mostrando células unitárias em forma de poliedro; c) Secção mostrando as diferentes posições catiônicas; d) Visão de anéis formando canais ao longo do eixo c; e) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de cristais de zeólita.....	12
Figura 9. Exemplos de algumas MOFs ⁴⁹	14
Figura 10. Figura representativa de um reator utilizado para realizar sínteses solvotermais e produtos oriundos dessas reações ⁵³	15
Figura 11. Unidades construtoras secundárias (SBUs) comumente ocorrem em carboxilatos metálicos, incluindo (a) quadrado com dois terminais ligantes; (b) octaedro de acetato de zinco,e (c) o prisma trigonal com três terminais ligantes. Exemplos de SBUs orgânicas incluem as bases conjugadas de (d) tetraedro quadrado, (e) tetraedro adamantane, e (f) trigonal. Metais são representados por esferas azuis, carbono por esferas pretas, oxigênio por esferas vermelhas e nitrogênio por esferas verdes.....	16
Figura 12. Esquema simplificado de incorporação e liberação da droga na matriz da MOF.....	18
Figura 13. 6-Mercaptopurina.....	19
Figura 14. (a) Reator utilizado na síntese, (b) vista externa do forno e (c) vista interna do forno.....	22
Figura 15. Possíveis modos de coordenação do ligante orgânico BDC. Monodentado (a), bidentado em ponte (b) e bidentado quelato (c).....	32

Figura 16. Espectros de infravermelho de H ₂ BDC (A), Zn(NO ₃) ₂ (B) e de MOF sem lavar (B em preto) e lavada e seca (C em azul).....	33
Figura 17. Espectros de infravermelhos correspondentes à MOF lavada e seca (lilás), 6MP (preto) e dos sistemas MOF-6MP na proporção de 1:1 massa (azul), 1:2 mol (verde) e 1:1 mol (vermelho).....	35
Figura 18. Termograma para MOF lavada e seca e termograma de uma MOF contendo BDC como ligante (acima e à direita do gráfico).....	37
Figura 19. Termograma da 6MP e do sistema MOF-6MP na proporção molar de 1:1..	38
Figura 20. Micrografias da MOF sintetizada em concentração normal lavada (a) e lavada e seca à 150°C. Em (b) podemos ver algumas estruturas com uma morfologia em flor.....	42
Figura 21. Micrografias realizadas da MOF sintetizadas em concentração menor e que não foram lavadas (a e b). ..	43
Figura 22. Micrografia do sistema MOF-MP na proporção de 1:1 massa (a) e 6MP com aumento de 800 x à direita e acima na figura (b).....	44
Figura 23. Análise de espectroscopia de energia dispersiva para a amostra do sistema MOF-6MP na proporção 1:1 massa. À esquerda (a) vemos a imagem e as áreas analisadas e à direita o gráfico representando a presença dos elementos na amostra (b).....	45
Figura 24. Difratogramas da MOF preparada em concentrações normais sem lavar (a) e a mesma amostra após secar em 150°C por 24 horas (b).....	46
Figura 25: Difratogramas de raios-x das amostras da MOF preparadas em concentração cinco vezes menor sem lavar (a) e a mesma após ser lavada com água (b). ..	47
Figura 26. Difratograma de raios-x relativo ao sistema MOF-6MP na proporção 1:1 massa.....	48
Figura 27. Gráfico representando a curva de calibração da 6MP (a) e Perfil de liberação do sistema MOF-6MP 1:1 massa (b).....	49
Figura 28 – Fotomicrografia característica de tecido renal coletado de animais que receberam MOF, mostrando comprometimento da integridade do parênquima renal	

com evidente congestão vascular nos capilares entre os túbulos contorcidos e nos capilares glomerulares (**setas**). H.E.: 400X.....52

Figura 29 – Fotomicrografias características de tecido hepático coletado de animais que receberam MOF, mostrando comprometimento da integridade dos hepatócitos com evidente vacuolização citoplasmática (**setas finas**): **A**) 100X e **B**) 400X. Desordenação dos feixes celulares e processo de congestão vascular em veias centrolobulares (**v**). H.E.....53

Figura 30 – Fotomicrografia característica de tecido pulmonar coletado de animais que receberam MOF, mostrando comprometimento da integridade dos alvéolos com evidente espessamento de suas paredes devido à exudação linfocitária e congestão da rede vascular local (**setas curtas**): H.E., 100X.....54

Figura 31. Fotomicrografia característica do baço coletado de animais que receberam MOF, mostrando nódulos linfáticos ativados (**setas curvas**): H.E., 100X.....55

Figura 32. Fotomicrografia da parede ventricular do coração de animais submetidos à toxidez aguda com MOF. Notar congestionamento vascular (**cabeça de seta**) entre as fibras cardíacas estriadas. H.E.: 100X.....55

Figura 33. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G1 (controle): observamos veia centrolobular (**v**), hepatócitos (**cabeça de seta**) e capilares sinusóides (seta fina) preservados. H.E.: 200X.....59

Figura 34. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G2 (MOF): observamos veia centrolobular (**v**), intensa atividade mitótica nos hepatócitos(**setas curvas**) e vacuolização citoplasmática (**setas retas**) preservados. H.E.: 200X.....60

Figura 35. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G3 (MOF): observamos veia centrolobular (**v**), hepatócitos e capilares sinusóides preservados. H.E.: 200X.....60

Figura 36. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G4 (MOF): observamos veia centrolobular (**v**), com infiltrado linfocitário perivasculares (**L**) Hepatócitos e capilares sinusóides preservados. H.E.: 200X.....61

Figura 37. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G5: observamos veia centrolobular (**v**), alguns hepatócitos com núcleos volumosos (**seta curta**). Capilares sinusóides preservados. H.E.: 100X.....61

Figura 38. Fotomicrografias de órgãos (baço, coração e rins, respectivamente) de animais (grupos G1, G2 e G3). **Grupo G1:** baço sem alterações (presença de nódulos linfáticos*); coração com fibras cardíacas estriadas (setas) sem alterações e no rim observamos glomérulos renais (estrelas) com espaços subcapsulares preservados (seta curva). **Grupo G2:** observamos no rim evidente redução dos espaços subcapsulares quando comparados ao controle, demais órgãos sem alterações. **Grupo G3:** não observamos alterações nos órgãos avaliados. H.E.: 100X.....63

Figura 39. Fotomicrografias de órgãos (baço, coração e rins, respectivamente) representando os grupos G4 e G5. Grupo G4 e G5: baço sem alterações (presença de nódulos linfáticos); Coração com fibras cardíacas estriadas, sem alterações e no rim observamos glomérulos renais com espaços subcapsulares preservados. H.E.: 100X.....64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa do número de casos em 2008 por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária. Fonte: INCA.....	5
Tabela 2. Reagentes, solventes e material utilizado na realização dos experimentos.	21
Tabela 3. Grupos e respectivos tratamentos no ensaio antitumoral com sarcoma 180.	29
Tabela 4. Grupos e respectivos tratamentos no ensaio antitumoral com carcinoma de carcinoma de Ehrlich.....	30
Tabela 5. Números previstos e experimentais da análise elementar.....	32
Tabela 6. Dados mostrados sobre os eventos de perda de massa e suas respectivas faixas térmicas onde se encontram.....	40
Tabela 7. Produtos utilizados e seus respectivos valores de inibição do crescimento celular.....	50
Tabela 8. Relação dos grupos do experimento e volume tumoral do ensaio com sarcoma 180.....	56
Tabela 9. Avaliação do ensaio antitumoral do sarcoma 180.....	57
Tabela 10. Avaliação da atividade antitumoral de carcinoma de Ehrlich.....	57

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

MOF.....	Metal Organic Framework
CD.....	Ciclodextrina
SBU's.....	Secundary Building Units (unidades construtoras secundárias)
MIL.....	Material Institut Lavoisier
6MP.....	6-mercaptopurina
BDC.....	1,4-Benzendodicarboxilato
MOF-A.....	produto da primeira síntese realizada
MOF-B.....	MOF sintetizada com uma concentração de reagentes cinco vezes menor que na MOF-A
MOF-6MP.....	sistema onde a 6MP se encontra incorporada na rede da MOF-A
IV.....	Infravermelho
DRX.....	Difração de Raios-X
TGA.....	Análise Termogravimétrica
MEV.....	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS.....	Espectroscopia de Energia Dispersiva
HEp-2.....	Human Epidermoide Câncer Cells
PBS.....	Tampão Fosfato
H.E.....	Hematoxilina e Eosina
T.A.....	Toxicidade Aguda
MOF-Zn.....	MOF-A lavada e seca com foi incorporado zinco em sua rede
V.O.....	Via Oral
OECD.....	Organização para cooperação Econômica e Desenvolvimento
SNC.....	Sistema Nervoso Central

RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais atinge a população mundial. Seu tratamento geralmente é invasivo, oneroso e extremamente tóxico ao paciente. A liberação de agentes terapêuticos no tumor é um grande problema no tratamento da doença por causa da estrutura da massa tumoral. Uma das propostas atuais é melhorar as propriedades dos fármacos já existentes, como carreadores de fármacos, com o objetivo de melhorar a eficácia do tratamento e diminuir a alta toxicidade aos tecidos sadios causada por esse tipo de tratamento. Vários materiais têm sido pesquisados para este fim. A proposta deste trabalho é a utilização de metal-organic frameworks (MOFs), uma nova classe de material poroso, como um carreador de fármaco, permitindo a incorporação de um agente terapêutico em suas cavidades com uma taxa de liberação suficientemente lenta para que o mesmo permaneça em concentrações ótimas na corrente sanguínea. Neste trabalho foi sintetizada e caracterizada uma MOF, $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]$, por espectroscopia na região do infravermelho, análise elementar, análise termogravimétrica, difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva. Primeiramente foram realizados ensaios de toxicidade aguda a fim de observar alguma toxicidade da MOF em cobaias e foi visto que a mesma apresenta tal toxicidade. A esta MOF foi incorporado um fármaco antitumoral (6-mercaptopurina) em diferentes proporções e foram avaliados como sistemas carreadores de fármacos através de ensaios de perfil de liberação, mostrando que a MOF se mostra eficiente para este fim. Os sistemas em diferentes proporções foram testados em ensaios antitumorais *in vitro* e *in vivo* onde apresentaram atividade de inibição do crescimento tumoral. A avaliação histológica dos órgãos dos animais que passaram por esses experimentos mostraram que a MOF quando incorporada ao fármaco não apresenta alterações histológicas graves.

Palavras-chave: Sistemas carreadores de fármacos; Redes de coordenação; Câncer; Quimioterapia

ABSTRACT

Cancer is one of the most widespread diseases in the world. Generally, it requires an invasive treatment, being extremely toxic to the patient. The liberation of therapeutical agents in the tumor is a great problem in the treatment because of the structure of the tumor mass. One of the current approaches is to improve the properties of the existing drugs, such as drug delivery systems, with the goal of improving treatment accuracy and also decreasing healthy tissue toxicity. Many materials are being researched regarding this objective. This work proposes is the use of metal-organic frameworks (MOFs), a new class of porous material, as a drug carrier, allowing the incorporation of a therapeutical agent in its cavities with a release rate that is low enough so that it remains in optimal concentration on the blood current. In this work, a MOF, $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]$, has been characterized and synthesized, using spectroscopy in the region of the infrared, elemental analysis, thermogravimetric analysis, X-ray diffraction, scanning electronical microscopy and dispersive energy spectroscopy. In the first stage, acute toxicity rehearsals were released with the goal of observing MOF toxicity in mice. Such toxicity was proved existent after the tests. This MOF has been added with an antitumor drug (6-mercaptopurine) in different proportions and they have been evaluated as drug carrying systems through liberation profiles, proving that the MOF is effective for this purpose. The systems in different proportions were tested in antitumor rehearsals both *in vivo* and *in vitro*, where it was possible to see tumor grow inhibition. Histological evaluation of the animal subjects organs showed that the MOF, when incorporated to the drug does not show severe histological changes.

Keywords: *Drug Delivery System; Coordenation Framework; Cancer; Chemotherapy*

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER E TRATAMENTOS

1.1.2 Câncer

Câncer é uma coleção de distúrbios que compartilham a característica comum de crescimento celular descontrolado, o que leva a uma massa de células chamada neoplasia (do grego, “nova formação”) ou tumor. Sabemos que a persistência do tumor resulta de alterações que vão desde a progênese das células tumorais. Estas alterações genéticas permitem uma proliferação excessiva e não regulada que se torna autônoma (independente de estímulos fisiológicos), embora os tumores permaneçam dependentes do hospedeiro para sua nutrição e aporte sanguíneo^{1a}. (Figura 1).

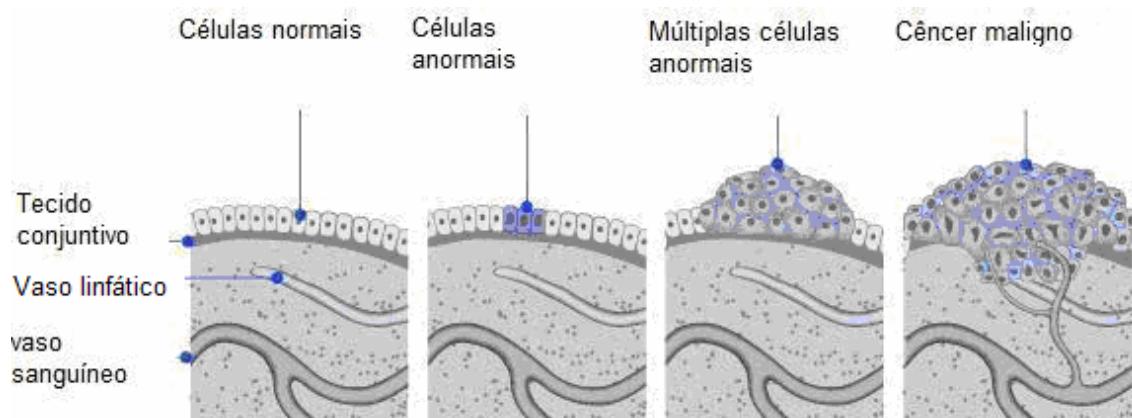


Figura 1. Formação do câncer^{1b}.

As neoplasias são divididas em benignas e malignas, onde a primeira é recoberta por uma capa fibrosa e não possui a característica de invadir tecidos circunvizinhos, enquanto a segunda invade os mesmos e em geral metastisam para locais mais distantes no corpo. Esta capacidade de invadir e metastisar (Figura 2) distinguem as neoplasias malignas das benignas². Os tumores malignos formados a partir de células mesenquimatosas, tecido conjuntivo primário, também são denominados *sarcomas*; os formados por células epiteliais, células cuja principal função é de revestimento de órgãos e cavidades, são chamados de *carcinomas*³. As células dos tumores malignos possuem superfície alterada de modo tal que, fica reduzida sua adesividade com as células vizinhas. Isto permite seu deslocamento da colônia neoplásica e confere-lhes a capacidade de movimentação, infiltração entre os constituintes

dos tecidos normais circunstantes, a destruição, a penetração nos vasos sanguíneos e capilares linfáticos e assim alcançam locais distantes da colônia principal, formando colônias secundárias (metástases). Os tumores malignos apresentam alta incidência de recidiva local, já que sua forma irregular e seu crescimento infiltrativo tornam difícil sua retirada completa⁴.

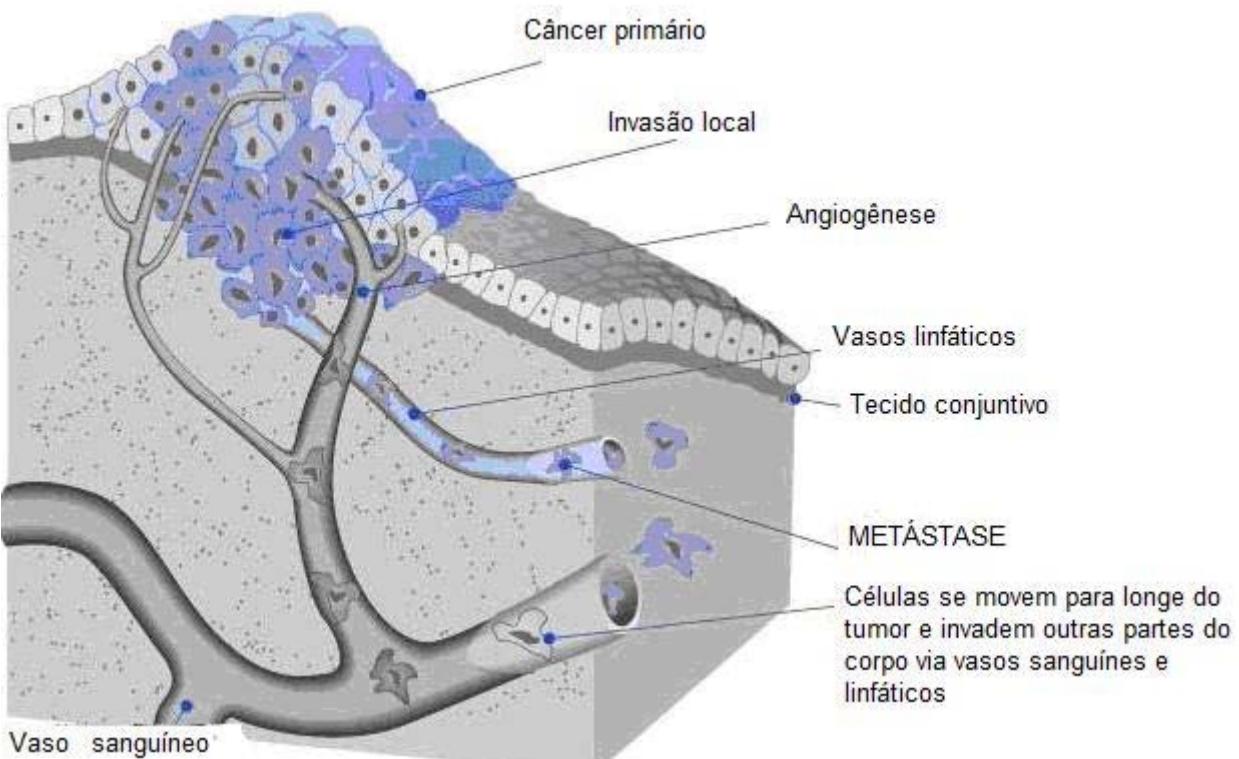


Figura 2. Disseminação de células tumorais (metástase)^{1b}.

Os tecidos neoplásicos podem ser divididos em três subcompartimentos: vascular, intersticial e celular. A vascularização dos tumores mostra regiões de necrose e hemorrágicas, assim como regiões que são densamente vascularizadas a fim de promover um suprimento adequado de nutrientes e oxigênio para um rápido crescimento do tumor (angiogênese). O espaço intersticial é predominantemente composto por colágeno e redes de fibras elásticas. Disperso nessa estrutura, estão fluidos e constituintes macromoleculares (ácido hialurônico e proteoglicanos, por exemplo) que formam um gel hidrofílico. O interstício é também caracterizado por uma pressão intersticial vinda da convecção do fluido externo, também como pela

ausência de uma rede linfática bem definida. Daí, o transporte de substâncias anticâncer será governado pela fisiologia e propriedades físico-químicas do interstício e da molécula em questão. O subcompartimento celular é formado por células que participam da massa tumoral⁵.

Apesar de seu mecanismo de formação não estar ainda completamente elucidado, acredita-se que fatores externos como fumo, agentes químicos, radiação ionizantes, infecções e fatores internos como mutações inerentes ao metabolismo, hormônios e condições imunes, são relevantes no surgimento de carcinomas. Estes fatores podem agir juntos ou sequencialmente para iniciar e promover a carcinogênese. Este processo pode levar até dez anos da iniciação da mutação celular até a formação do tumor⁶. Mesmo com a dificuldade em prever com total certeza quem está em risco de desenvolver o câncer, há claras evidências que o aparecimento do câncer pode ser reduzido pela diminuição de uso de agentes como cigarro e álcool, redução da exposição ao sol, assim como controle da obesidade, entre outros, além de adotar uma alimentação saudável, realizar atividades físicas e fazer exames preventivos⁷.

1.1.3 Tratamentos

A remoção cirúrgica de um tumor e dos tecidos circunvizinhos afetados é considerado o procedimento primário para tumores grandes o suficiente para manipular. Entretanto, dificilmente apenas a cirurgia é suficiente e, geralmente é inevitável a permanência de células residuais afetadas. A excisão do tumor pode ter como efeito secundário indesejável a mudança da taxa de crescimento das células cancerosas restantes provocando um processo metastático mais rápido. Em muitos casos, os pacientes morrem do câncer metastático depois que o tumor preliminar foi removido com sucesso⁶.

Além da cirurgia, outros recursos terapêuticos podem ser utilizados tais como: a radioterapia, a quimioterapia, a terapia hormonal, a imunoterapia, entre outros, ou mesmo uma combinação dessas terapias a fim de se obter melhores resultados. O diagnóstico precoce, a remoção cirúrgica completa e a utilização desses tratamentos são fatores críticos na determinação do prognóstico do paciente⁷.

Os tratamentos convencionais e novos agentes são divididos em três categorias: moléculas, partículas e células. Por exemplo, em quimioterapia, o agente pode ser injetado como uma molécula ou ser injetado em uma nanopartícula ou lipossoma (pequenas vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios que se organizam espontaneamente em meio aquoso). Em terapia gênica, o agente pode ser uma molécula, uma partícula viral ou não-viral ou uma célula geneticamente modificada. Em imunoterapia, ele pode ser uma molécula como um anticorpo ou uma célula como um linfócito ativado⁸.

Na literatura, a quimioterapia muitas vezes é definida como o uso de qualquer tratamento com drogas para qualquer doença. Na oncologia a quimioterapia é entendida num sentido mais restrito como a utilização de agentes químicos direcionados para matar ou controlar células tumorais. Ela carrega um alto risco devido à toxicidade das drogas e o paciente tem que tolerar vários efeitos colaterais sacrificando sua qualidade de vida. A efetividade da quimioterapia depende de uma série de fatores, incluindo as drogas usadas, a condição do paciente, a dose, as formas de administração, etc⁹.

Para que a droga/agente chegue até o tumor ela pode utilizar três vias, através do compartimento vascular (dentro do tumor), transporte através da parede microvascular e, transporte através do compartimento intersticial (espaço entre as células). Durante este percurso do agente terapêutico até o tumor, ele pode ser ligado a proteínas ou outros tecidos, ligar especificamente aos alvos ou ser metabolizada^{10, 11}.

Apesar de tantos anos desde sua descoberta, o câncer lidera a causa de mortalidade em todo o mundo. No Brasil o índice tem crescido em números alarmantes a cada ano. No ano de 2008 houve uma estimativa de 500 mil como mostra a Tabela 1. As dificuldades encontradas na quimioterapia convencional em diminuir esses números indica que novas descobertas nesse campo são necessárias¹².

Tabela 1. Estimativa do número de casos em 2008 por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária. Fonte: INCA¹³

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Côlon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Apesar da diversidade de drogas utilizadas no tratamento da doença, a administração sistemática de algumas dosagens destes medicamentos provoca diversos efeitos colaterais. Tais efeitos são às vezes tão intensos que o paciente deve descontinuar o tratamento antes das drogas terem a chance de erradicar o câncer. Conseguir, portanto, uma concentração terapêutica de fármacos e minimizar os efeitos tóxicos sistêmicos é um problema crítico no tratamento do câncer. Os avanços na terapia do câncer estão progredindo, tanto na formulação de novos agentes quimioterápicos como em novas formas de “entregar” antigas moléculas, como vêm sendo pesquisados em alguns sistemas conhecidos como *drug delivery systems* ou sistemas carreadores de fármacos^{14,15}.

1.2 SISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS

A medicina sempre se preocupou em desenvolver meios ou sistemas com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos seres humanos. Novos métodos de ingestão ou administração de drogas são um exemplo. Situações como essas aparecem em todos os escritos da história, de cada continente e cultura. A quimioterapia do câncer que muitos consideram moderna, tem

existido de alguma forma há 500 anos. A vacinação foi usada na China e na Índia para tentar prevenir varíola e outras infecções, centenas de anos antes do nascimento de Jenner ou Pasteur¹².

Atualmente, a busca por tratamentos de antigas e novas doenças continua e novas tecnologias têm sido desenvolvidas para melhorar o transporte e as propriedades de fármacos não só para o tratamento do câncer, mas de outras patologias, como por exemplo, pro-drogas¹⁶, lipossomas¹⁷, biocompósitos¹⁸, biopolímeros¹⁹, nanopartículas²⁰, ciclodextrinas²¹ e recentemente redes de coordenação ou Metal Organic Frameworks (MOFs) (Figura 3)²². Além da proposta de melhorar a biodisponibilidade de moléculas utilizadas nos tratamentos de diversas doenças, esses sistemas tem como principal objetivo o de diminuir efeitos tóxicos de fármacos já utilizados e com isso melhorar a qualidade de vida das pessoas que necessitam desses tratamentos. Vale salientar, que essas novas tecnologias são o esforço de anos de pesquisas em diversas áreas tais como Biologia, química, engenharia de materiais e física, sendo o fruto de trabalhos interdisciplinares originando os sistemas supracitados conhecidos como carreadores de fármacos²³.

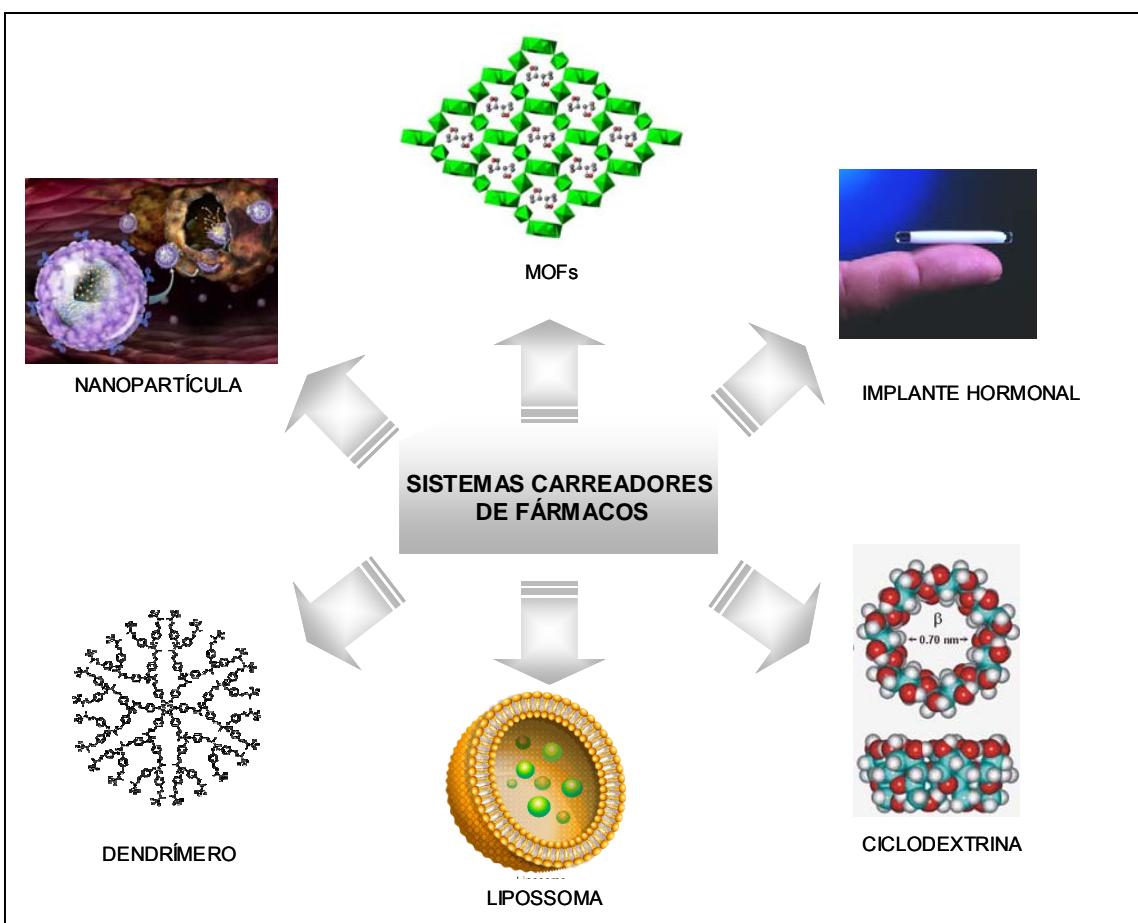


Figura 3. Alguns sistemas utilizados em carreadores de fármacos.

Sistemas carreadores de fármacos são uma das mais promissoras aplicações para a saúde humana e representa um campo crescente para ciência de materiais na área biomédica. Basicamente um sistema de liberação de fármaco pode ser descrito como uma formulação que controla a taxa e o período de liberação da droga. Diferentemente das terapias convencionais, que mostram uma curva “dente-de-serra” (Figura 4) da concentração da droga no plasma, sistemas carreadores de fármacos são projetados para manter níveis terapêuticos durante o período de tratamento^{23, 24}.

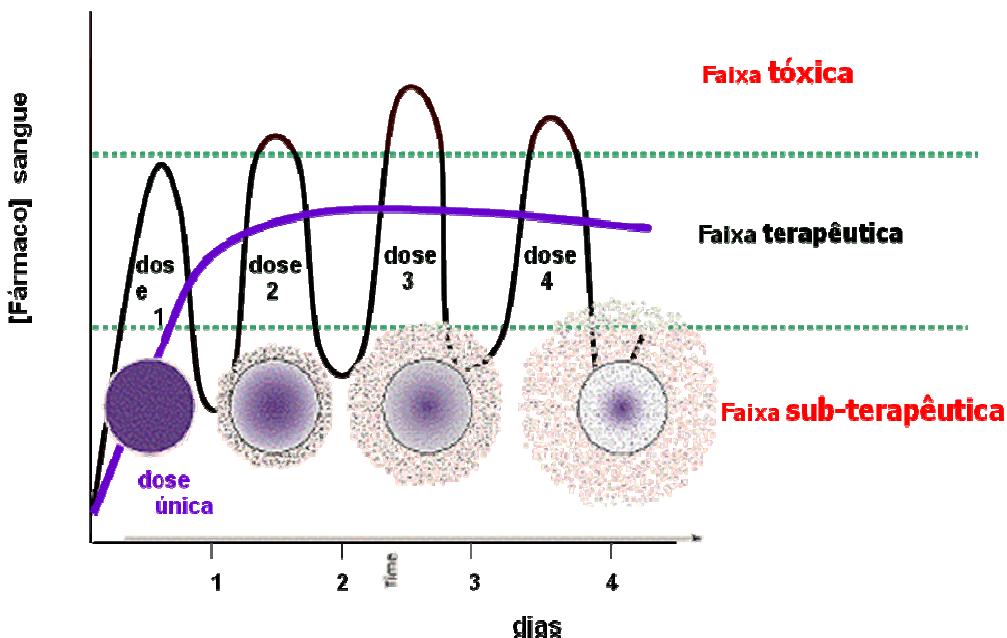


Figura 4. Gráfico representando as diferentes doses e concentração de fármaco no plasma²⁵.

Como exemplo de um sistema já utilizado no campo farmacêutico, podemos citar as ciclodextrinas (CD) (Figura 5), que são carboidratos complexos compostos por unidades de glicose unidas por ligações tipo α -1,4. Dependendo da quantidade de unidades de glicose, dá-se origem a α , β ou γ -CD (6, 7 e 8 unidades respectivamente)²⁶. Elas são muito utilizadas para aumentar a solubilidade em água e a taxa de dissolução de moléculas, para melhorar sua estabilidade e para aumentar sua biodisponibilidade²⁷. Isso ocorre devido a formação de um complexo de inclusão com essas drogas lipofílicas ou partes lipofílicas da mesma, assim, mudando suas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de uma maneira desejada^{28, 29}.

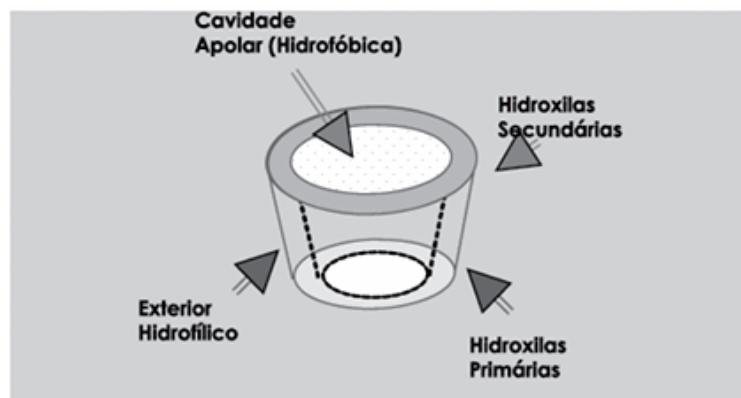


Figura 5. Esquema hipotético de ciclodextrinas³⁰.

Outro exemplo de abordagem é a liberação localizada de uma droga em um tecido pela liberação controlada de um implante polimérico contendo uma droga ou hormônio. No período seguinte à implantação, as moléculas da droga são lentamente liberadas do polímero para o espaço extracelular do tecido. A disponibilidade da droga no tecido e a taxa de liberação no espaço extracelular vão depender da característica do dispositivo, como porosidade, rugosidade, etc. Mesmo depois que a droga é liberada no espaço extracelular a taxa de migração da droga através do tecido, captação dentro do sistema circulatório e eliminação do corpo depende da característica da droga (lipofilicidade ou hidrofilicidade) e fisiologia do local de liberação³¹.

Os materiais utilizados para carreamento de fármacos podem ser reconhecidos como um corpo estranho pelo organismo. Quando o sistema imune detecta a presença de um fator estranho, um processo inflamatório é iniciado. A inflamação consiste de uma complexa série de reações com objetivos de evitar ou diminuir o dano tecidual em curso, isolar e destruir o material estranho e, ativar os processos de reparo. A finalidade de uma reação inflamatória é a mesma quando induzida por um trauma mecânico, infecção microbiana, antígenos externos ou agentes químicos. Para que um sistema seja utilizado como carreador de fármaco, ele precisa ser biocompatível para evitar um dano inflamatório intenso ao organismo³².

A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material de efetuar uma performance com uma resposta apropriada do hospedeiro numa aplicação específica. No caso de sistemas carreadores de fármacos do tipo hóspede-hospedeiro, sistemas onde a droga se encontra totalmente ou parcialmente dentro do material, vários fatores podem influenciar a biocompatibilidade. Dentre os principais que depende o hóspede (droga) são: a espécie, o fator genético e o microambiente; enquanto os principais que dependem o hospedeiro (material) se destacam: forma, tamanho, superfície química, rugosidade, morfologia, porosidade, duração do contato e degradação. Esses parâmetros podem ser responsáveis por variações de intensidade e duração da reação do tecido^{33, 34}.

Uma proposta que tem fascinado a comunidade científica na última década é a utilização de *Metal Organic Frameworks* (MOFs), materiais

mesoporosos e nanoporosos, como carreadores de fármacos. Esse novo campo visa a incorporação de um fármaco em suas cavidades com uma taxa de liberação suficientemente lenta para que o mesmo permaneça em concentrações ótimas na corrente sanguínea diminuindo seus efeitos colaterais melhorando a qualidade de vida do paciente³⁵.

1.3 MATERIAIS POROSOS

O grande interesse científico nos materiais porosos deve-se a sua ampla aplicabilidade nos setores da saúde e tecnologia tais como: separações químicas, troca iônica, sensores, carreadores de fármaco entre outros. Kitagawa, em 2004, dividiu esses materiais em três classes, sendo eles denominados materiais porosos inorgânicos, materiais à base de carbono e polímeros de coordenação (Figura 6)³⁶⁻³⁹.

Materiais porosos são classificados segundo a IUPAC baseados em seus tamanhos de poros, d : microporosos para $d < 20 \text{ \AA}$, mesoporosos para $20 \text{ \AA} \leq d \leq 500 \text{ \AA}$, e macroporosos para $d > 500 \text{ \AA}$. Recentemente há referências a materiais nanoporosos para estruturas que tem poros entre 10-100 \AA de diâmetro⁴⁰.

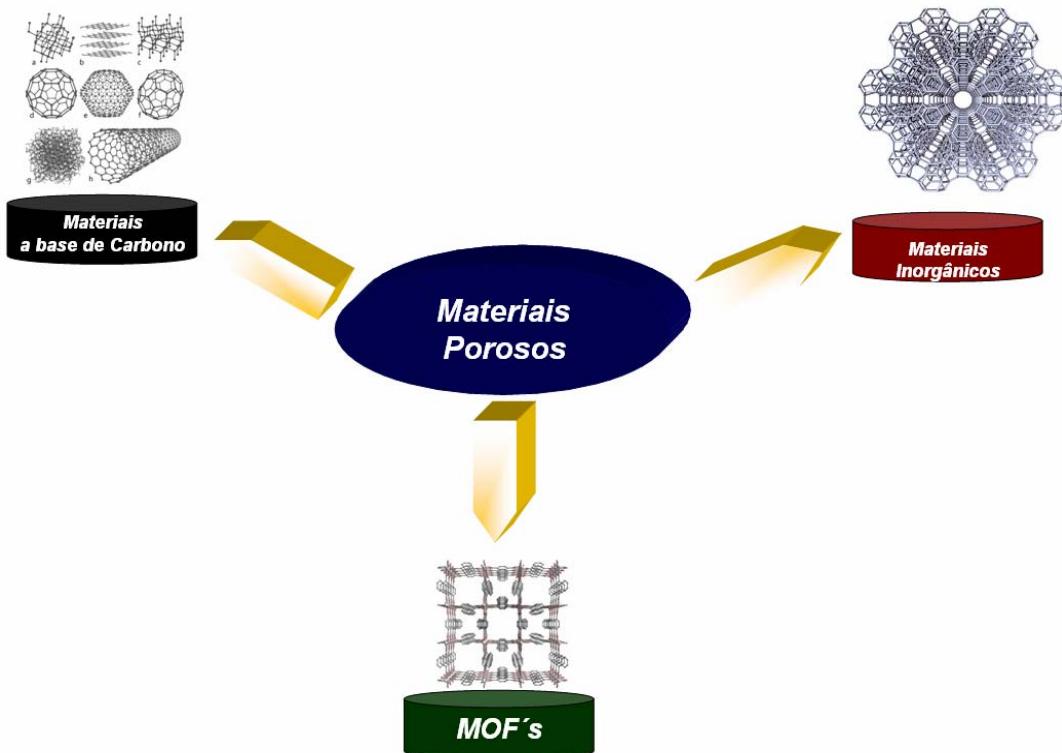


Figura 6. Classes de materiais porosos

Até metade dos anos 90, havia basicamente dois tipos de materiais porosos, chamados, inorgânicos e materiais baseados em carbono^{41, 42}. No caso dos sólidos inorgânicos podemos citar as zeólitas, as quais pertencem à classe dos aluminosilicatos microporosos, estruturalmente bem definidos, sendo usados essencialmente como catalisadores ácidos na isomerização, alquilação e quebra de hidrocarbonetos na indústria de petróleo, na fabricação de detergentes e mais recentemente foram propostos como carreadores de fármacos⁴³. Nesse trabalho realizou-se a incorporação do antiinflamatório Ibuprofeno na zeólita MCM-41 e pode-se estudar a influência do tamanho de poro da matriz na taxa de liberação do fármaco⁴⁴.

As Zeólitas consistem em estruturas 3D cristalinas (Figura 7). Suas redes, construídas a partir de tetraedros com os átomos Si ou Al nos centros e os de oxigênio em cada vértices, TO_4 ($T=Al, Si$) define túneis interconectados ou cavidades⁴⁵.

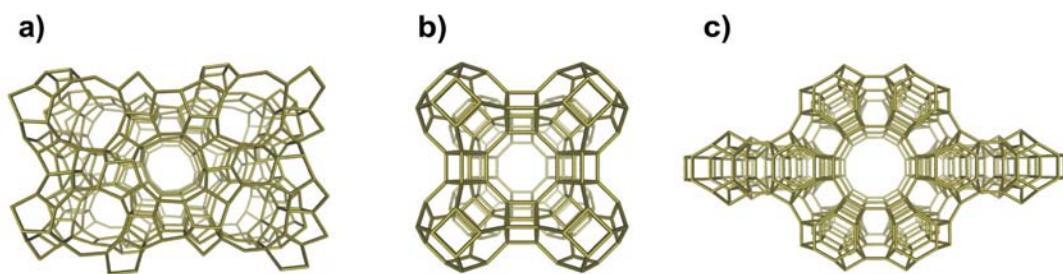


Figura 7. Três exemplos de redes de zeólitas: a) MFI, contendo um sistema de canais bidimensionais; b) LTA, contendo cavidades; c) LTL, contendo um sistema de canais unidimensionais.

Esses aluminossilicatos são geralmente sintetizados por via hidrotermal sob meio alcalino, a temperaturas entre cerca de 80° e 200° C e são termicamente estáveis. Entretanto, o grande inconveniente das zeólitas é que a pequena dimensão dos canais (inferior a 0,8 nm) e cavidades (geralmente <1,5 nm) impõe limitações de tamanho e forma das moléculas hóspedes (Figura 8)⁴⁶.

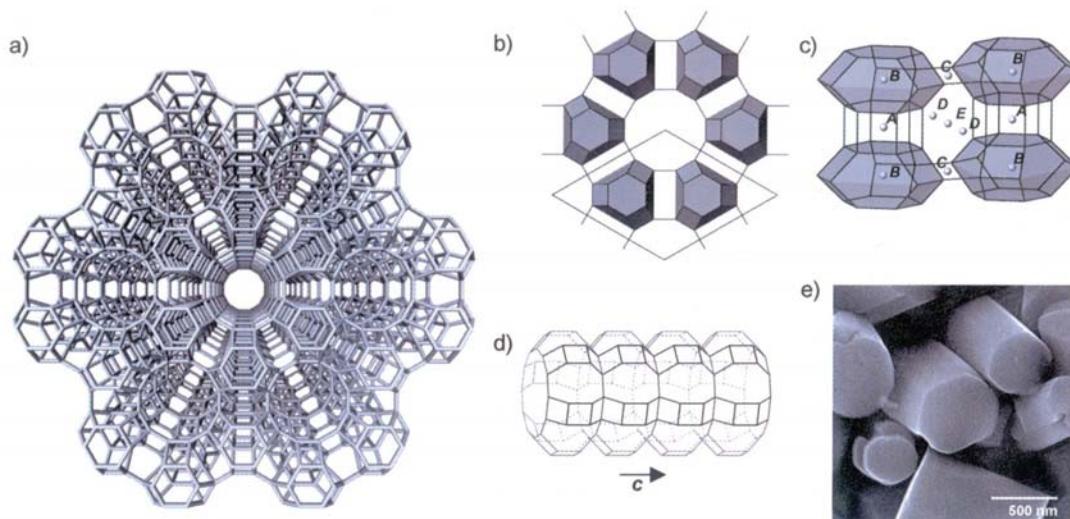


Figure 8. Zeólitas. a) Projeção ao longo do eixo-c mostrando 7 canais; b) Projeção ao longo do eixo-c mostrando células unitárias em forma de poliedro; c) Secção mostrando as diferentes posições catiônicas; d) Visão de anéis formando canais ao longo do eixo c; e) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de cristais de zeólita.

Alguns esforços foram dedicados ao desenvolvimento de zeólitas com poros grandes ($> 1,5$ nm), mas os aumentos foram modestos. Além disso, estes novos materiais não são muito eficazes na incorporação de moléculas grandes impossibilitando, desta maneira, o *design* e a síntese de novas zeólitas que possam ser utilizadas como carreadores de uma grande variedade de fármacos. Em contrapartida, as redes de coordenação podem ser idealizadas e sintetizadas com diferentes tamanhos de poros objetivando incorporar diferentes fármacos obtendo-se assim um carreador multifuncional^{47, 48}.

1.3.1 Metal Organic Frameworks – MOF's

A área de compostos híbridos orgânico-inorgânico, em especial engenharia de cristais, tem conseguido grandes avanços nos últimos cinco anos, onde podemos destacar a síntese e a caracterização de redes infinitas, uni, bi e tridimensional (1D, 2D e 3D). Essas redes de coordenação são construídas basicamente por íons metálicos como conectores, os quais atuam como suporte principal, esqueleto, e por moléculas orgânicas como ligantes. As redes de coordenação são comumente conhecidas como polímeros de coordenação, materiais híbridos orgânicos-inorgânicos ou MOFs (*metal organic frameworks*)⁴⁹.

Dentre as classificações de sólidos cristalinos, o termo MOF é um dos mais gerais e é constantemente usado de diferentes maneiras pela comunidade científica. Muitas vezes, este termo, pode ser citado como um polímero de coordenação formado por uma célula unitária na qual os centros metálicos estão coordenados nas três dimensões ou polímeros de coordenação com células unitárias uni, bi ou tridimensionais (1D, 2D ou 3D respectivamente) que apresentam porosidade, onde as 1D ou 2D podem formar redes tridimensionais através de ligações de hidrogênio⁵⁰.

O interesse, dos grandes grupos de pesquisa, pela síntese de MOFs se dá devido à possibilidade de obtenção de inúmeras MOFs com baixa densidade, diferentes topologias, diferentes tamanhos de poro (Figura 9) e consequentemente, uma ampla aplicabilidade que vai desde a adsorção de gases a carreadores de fármacos⁵¹. Esses materiais são sintetizados por um

processo de auto-organização que depende diretamente da concentração dos reagentes bem como da temperatura, métodos hidrotermais (Figura 10), reações assistidas por microondas e, mais recentemente, por ultrassom. Portanto a síntese das MOFs são relativamente baratas e com alto rendimento. Entretanto, as mesmas apresentam baixo grau de previsibilidade devido às diversas possibilidades de coordenação dos ligantes orgânicos⁵².

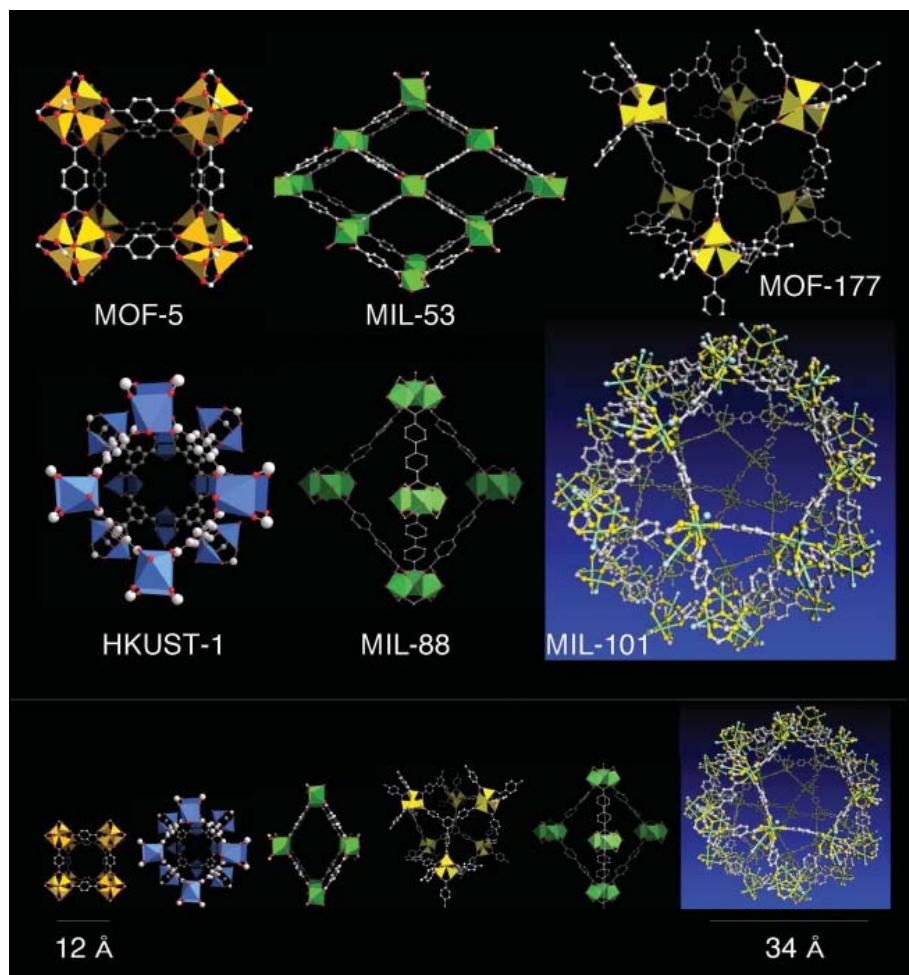


Figura 9. Exemplos de algumas MOFs⁴⁹.

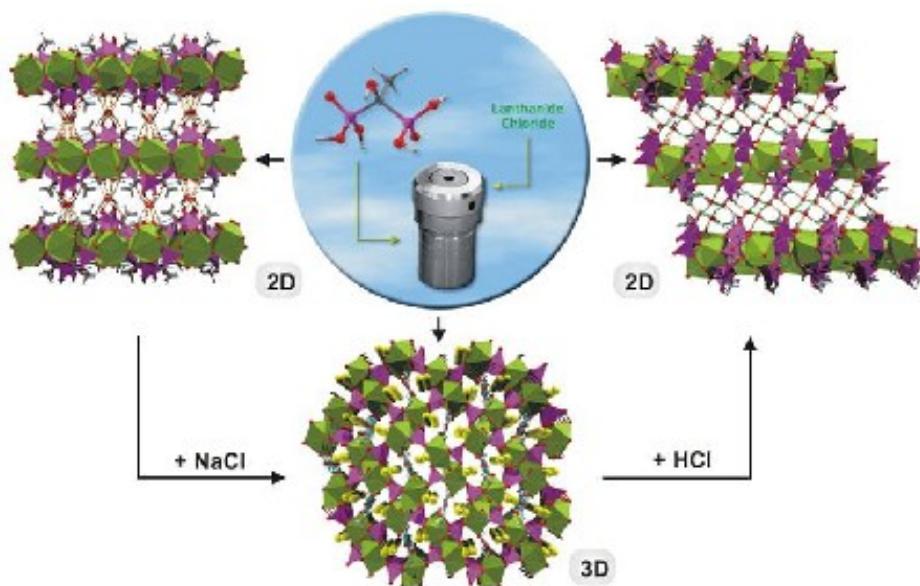


Figura 10. Figura representativa de um reator utilizado para realizar sínteses solvotermais e produtos oriundos dessas reações⁵³.

A fim de auxiliar o processo de predição estrutural das MOFs, foi introduzido o conceito de unidades de construção secundárias (SBU, do inglês, secondary building units)⁵⁴. As SBUs são figuras geométricas simples, as quais representam os “clusters” inorgânicos ou esferas de coordenação que são ligados juntos pelos componentes orgânicos para formar os produtos da rede⁵⁵. Tais unidades não são diretamente introduzidas na rede, mas são formadas *in situ* sob condições sintéticas específicas (figura 11)^{56, 57}.

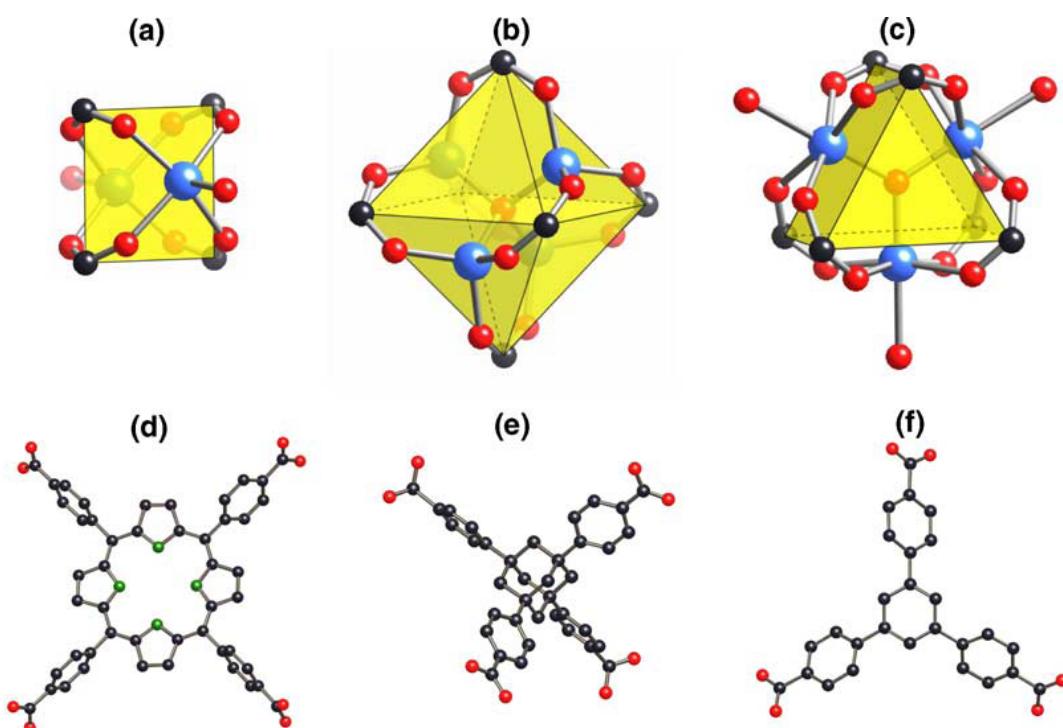


Figura 11. Unidades construtoras secundárias (SBUs) comumente ocorrem em carboxilatos metálicos, incluindo (a) quadrado com dois terminais ligantes; (b) octaedro de acetato de zinco, e (c) o prisma trigonal com três terminais ligantes. Exemplos de SBUs orgânicas incluem as bases conjugadas de (d) tetraedro quadrado, (e) tetraedro adamantane, e (f) trigonal. Metais são representados por esferas azuis, carbono por esferas pretas, oxigênio por esferas vermelhas e nitrogênio por esferas verdes³⁶.

1.4 APLICAÇÃO DE MOFs COMO SISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS

Alguns produtos bioativos apresentam características indesejáveis diminuindo a eficácia de tratamentos bem como produzindo efeitos colaterais. Isto requer a utilização de sistemas carreadores que aumentam a atividade de tais moléculas e amenizam tais efeitos. Esses sistemas normalmente permitem um melhor controle de níveis plasmáticos da droga, assim como, aumentam a estabilidade pela proteção da sua biodegradação⁵⁸.

Devido a essas dificuldades da indústria farmacêutica tem crescido o interesse de desenvolver novos materiais para este fim. Pesquisas no

desenvolvimento de materiais porosos para aplicações nesta área vem despertando grande interesse por parte de químicos, físicos e biólogos. Em 2004, o material mesoporoso MCM-41 foi proposto como um sistema carreador de fármaco. Em geral, materiais mesoporosos são grandes candidatos à carreadores de fármacos pelas seguintes características: ter uma rede porosa que é muito homogênea em tamanho e permite o controle da quantidade de droga inserida na rede; ter um alto volume de poro para acomodar a quantidade de fármaco em questão; grande área superficial que implica um alto potencial para adsorção de droga⁵⁹. A dosagem e a taxa de liberação do fármaco pode ser controlada pela seleção de diversos fatores, como estrutura e composição da matriz, tamanho do poro e interações químicas hóspede-hospedeiro⁶⁰.

Em 2006, Férey e colaboradores propuseram a utilização de MOFs como sistemas carreadores de fármacos. O primeiro exemplo se deu pela adsorção de um fármaco antiinflamatório, Ibuprofeno, em MOFs rígidas MIL-100 e MIL-101 (MIL=Material Institut Lavoisier) com poros da ordem de 3 nm. As MOFs apresentaram um alto poder de armazenamento da droga, onde para MIL-100 e MIL-101 respectivamente 0,35 g e 1,4 g de droga foram armazenadas por grama de material e levaram de 3 a 6 dias para serem liberadas da matriz em experimentos *in vitro*⁶¹(Figura12).

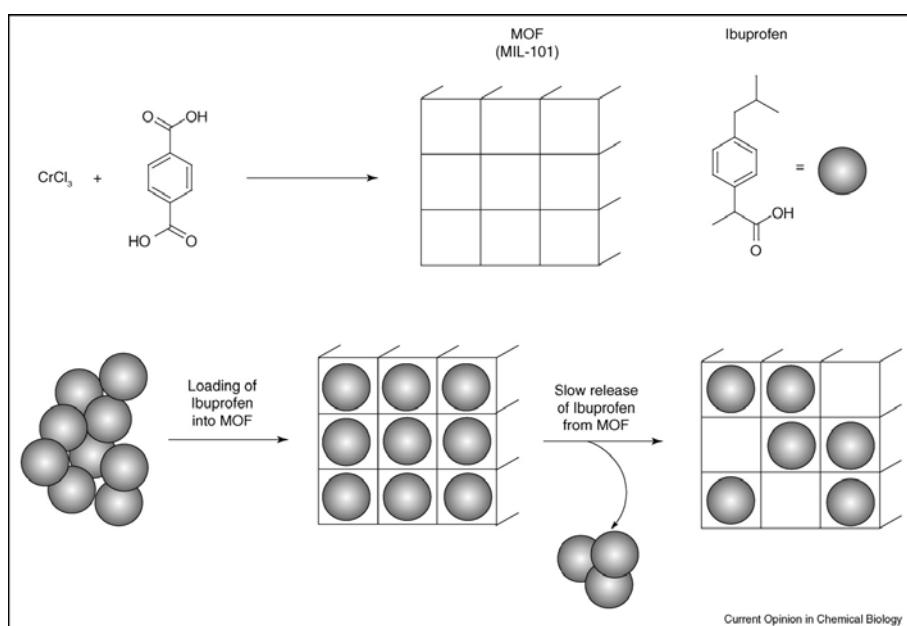


Figura 12. Esquema simplificado de incorporação e liberação da droga na matriz da MOF³⁵.

Dentro de uma visão interdisciplinar e pioneira, este trabalho tem como o objetivo, não só a síntese, a incorporação do fármaco na matriz da MOF e a avaliação do perfil de liberação, mas também, a avaliação da biocompatibilidade do material, realizando testes de citotoxicidade e toxicidade aguda. Estes consistem em avaliar danos causados em células e no organismo animal, respectivamente. Outra preocupação foi utilizar uma MOF onde o metal fosse algum que, em quantidades consideradas relativamente altas, não prejudicasse o organismo caso a rede metalorgânica fosse desfeita em contato com o organismo. O metal em questão é o zinco (Zn), que além dessa característica, é um elemento essencial que controla muitos processos celulares, incluindo síntese de DNA, desenvolvimento cerebral e também atua diretamente no sistema imune, melhorando as condições de defesa do organismo contra várias patologias^{62, 63}.

Além do estudo necessário para se instituir a biocompatibilidade da MOF, também foi avaliada a taxa de liberação do fármaco da rede a fim de avaliar a possível eficiência como um sistema de liberação de fármaco. Em seguida, foram feitos testes antitumorais em camundongos com o intuito de observar uma possível ação do sistema MOF-Fármaco em tumores

experimentais ascíticos (sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich). A escolha da droga foi baseada em seu tamanho, já que moléculas maiores que o tamanho de poro da MOF não seriam incorporadas, pela sua alta toxicidade e pela sua baixa biodisponibilidade. A 6-Mercaptopurina (6-MP), mostrada na Figura 13, é uma droga antiproliferativa largamente utilizada no tratamento e profilaxia de leucemia linfoblástica aguda e leucemia mielóide aguda, doença de Crohn's, policitemia vera, colite ulcerativa e doença inflamatória intestinal. Ela tem um curto tempo de meia vida de 60-90 minutos, exibindo alto metabolismo de primeira passagem depois da administração oral com variação de biodisponibilidade de 5-80% exibindo efeitos colaterais como anorexia, diarréia, irritação do trato gastrointestinal e hepatotoxicidade, o mais importante sendo a última associada com a mielossupressão^{64, 65}.

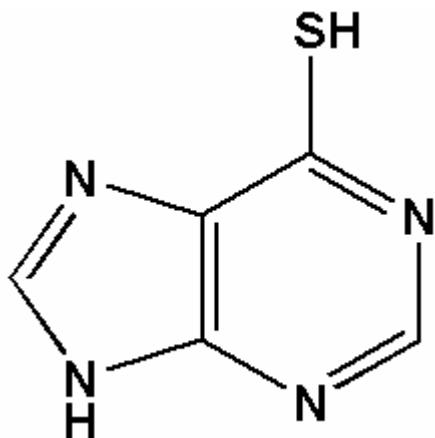


Figura 13. 6-Mercaptopurina

2.OBJETIVOS

2.1 GERAL:

Avaliar a biocompatibilidade e eficiência de uma MOF como um sistema de liberação de fármaco.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Sintetizar e caracterização da MOF-5;
- Incorporar o fármaco antitumoral 6-mercaptopurina na MOF e caracterizar o sistema MOF-Fármaco;
- Avaliação da biocompatibilidade da MOF através de ensaios de toxicidade aguda em camundongos e avaliação histológica de órgãos vitais dos mesmos;
- Avaliar o perfil de liberação do sistema com o objetivo de observar a taxa da saída da droga do sistema;
- Realizar ensaios antitumorais *in vitro* e *in vivo* para avaliar um possível efeito sistêmico da MOF-6MP;
- Avaliar a histologia de órgãos vitais dos animais utilizados nos ensaios experimentais através da microscopia óptica.

3.METODOLOGIA

3.1 MATERIAL UTILIZADO: SOLVENTES E REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados na síntese das redes de coordenação, incorporação do fármaco, medidas experimentais, experimentação animal e análise histológica estão apresentados na tabela 2. Para todo o estudo realizado, não foi feita nenhuma purificação prévia de solventes e reagentes.

Tabela 2. Reagentes, solventes e material utilizado na realização dos experimentos.

Reagentes/ solventes / Material utilizado	Procedência
Etanol P.A.	Vetec
Zn(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	Vetec
6-Mercaptopurina	Aldrich
Éter etílico P. A.	Aldrich
ácido 1,4- benzodicarboxílico	Aldrich
Parafina histológica	Biotec
Lamina 26 x 76 mm, c/ extermidade fosca	GLASSTEHNICA
N,N- dimetilformamida	Vetec
Formaldeído	Sigma

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Síntese da MOF Zn(BDC)_n

A síntese da MOF de Zn(BDC)_n foi realizada como descrita na literatura⁶⁶. Em um reator de teflon de 10 mL foi adicionado 10 mmol de ácido 1,4-benzenodicarboxílico (COOH₆H₄COOH, 1,66 g), 22 mmol de nitrato de zinco (Zn(NO₃)₂•6H₂O, 6,54g) e 5 mL de N,N-dimetilformamida. Em seguida, foi feita uma agitação até completa dissolução dos reagentes. Cada recipiente de teflon fechado contendo a mistura reacional foi inserido em um envoltório metálico com tampa rosqueada, de modo que o recipiente de teflon ficasse, na prática, selado. O sistema onde as reações foram realizadas está esquematizado na Figura 14. A mistura foi aquecida em 100°C durante 18 horas em um forno programável (Figura 14 b e c), com uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹, e uma taxa de resfriamento igual à capacidade do forno de dissipar o calor de seu interior. O resfriamento à temperatura de 30°C aconteceu em aproximadamente 6 horas. O produto desta síntese será chamado de MOF-A.

Uma mesma rota sintética foi realizada com uma concentração de reagentes cinco vezes menor que a descrita acima. O produto desta síntese será chamado de MOF-B. Após a síntese, a MOF foi lavada com água destilada e em seguida colocada em uma estufa por 24 horas a 150° C para remoção de água e possíveis solventes residuais. Amostras sem lavar e sem secar em estufa também foram feitas.

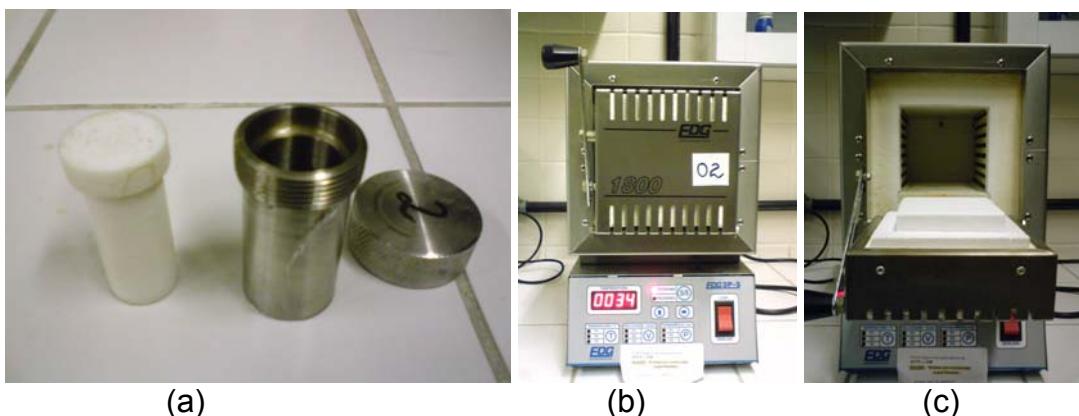


Figura 14. (a) Reator utilizado na síntese, (b) vista externa do forno e (c) vista interna do forno.

3.2.2 Incorporação do fármaco na MOF-A

Foi dissolvido em um balão de fundo redondo 1 mmol do fármaco, 6MP, utilizando 15 mL de uma solução etanólica. Em seguida foi adicionada a esta solução 1 mmol de $Zn(BDC)_n$, sendo submetido a agitação durante 24 horas a temperatura ambiente. O sistema foi centrifugado em um aparelho Sigma modelo 6-15 por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado recolhido. Procedeu-se, então, a lavagem desse precipitado com etanol, objetivando retirar o excesso de fármaco que não foi adsorvido pela MOF. O material foi então secado a temperatura ambiente e conduzido para as etapas posteriores de caracterização. O mesmo procedimento foi realizado nas proporções: (MOF:6MP) 1:2 em mol. Utilizou-se ainda proporções em massa 1:1, 1:2 e 1:4, partindo de 100 mg de MOF.

3.2.3 Incorporação do $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ na MOF-A

Foi adicionado 14 mmol de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 20 mL de água destilada e em seguida adicionado 1,2 mmol de MOF-A. O sistema foi submetido à agitação magnética por 24 horas e depois filtrado e seco à temperatura ambiente.

3.3 TÉCNICAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A caracterização da rede de coordenação e do sistema MOF-6MP foi feita através de espectroscopia na região do infravermelho, análise elementar, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X, análise termogravimétrica e espectroscopia de energia dispersiva.

3.3.1 Análise elementar

A análise elementar é uma técnica destrutiva, baseada na combustão da amostra visando a formação de compostos gasosos como CO_2 , N_2 , NO_x , SO_2 , SO_3 e H_2O . Uma vez que todo o carbono, nitrogênio, enxofre e hidrogênio

são transformados em tais produtos de combustão, os gases são analizados e quantificados. O resultado da análise é a precentagem destes elementos na amostra de modo que a percentagem de oxigênio presente no composto é obtida por diferença. As análises CHNS dos compostos sintetizados foram feitas em um analisador CE INSTRUMENTS, modelo EA1110.

3.3.2 Espectroscopia de infravermelho

As análises na região do infravermelho foram realizadas utilizando-se um espectrômetro Bruker modelo IFS-66 com transformada de Fourier da Central Analítica do Departamento de Química da UFPE. Os resultados foram analisados pelo programa Spectroscopic Software OPUS da Bruker.

As amostras foram preparadas através da técnica de pastilhas de KBr e em seguidas analisadas.

3.3.3 Análises termogravimétricas (TGA)

Os termogramas foram obtidos utilizando o equipamento de TGA da Shimadzu, modelo 50 WS, do Laboratório de Materiais Vítreos e Nanodispositivos Fotônicos do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Todas as amostras foram executadas sob atmosfera inerte de nitrogênio com um fluxo de 50 mL^{-1} . A faixa de temperatura utilizada foi da temperatura ambiente até 800 ou 1200°C , com uma taxa de aquecimento de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Foram utilizados neste caso porta-amostra de platina.

3.3.4 Difratometria de raios-X (DRX)

Análises por difração de raios-X de pó foram utilizadas para a identificação das fases cristalográficas presentes nas amostras. O equipamento utilizado para a realização das análises foi o difratômetro de raios-X da Rigaku modelo 2400 DMAX, usando uma raia K_{α} de radiação do cobre ($0,15 \text{ nm}$), operando com tubo alvo de cobre a (40 kV) com (40 mA) do Departamento de física da UFPE. Os difratogramas foram obtidos na faixa de 2θ de 5 a 50 graus

e passo de 0,02° e tempo de aquisição de 2 segundos à temperatura de 25°C. Todas as análises foram realizadas nas mesmas condições descritas acima.

3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada a fim de caracterizar a morfologia das partículas sintetizadas assim como estimar o tamanho das mesmas. A espectroscopia de energia dispersiva foi utilizada para determinação da composição da amostra em regiões de aproximadamente 3 μm de diâmetro, através da identificação de raios-X emitidos pela amostra quando estes interagem com o feixe eletrônico do equipamento.

As imagens de MEV e análises EDS foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura da Jeol, modelo JSM-5000 *Noram Instrument*, do Laboratório de Microscopia do Departamento de Física da UFPE.

Para a aquisição das imagens, os seguintes parâmetros foram utilizados: distância de trabalho de 11-12 mm, abertura do feixe de elétrons (*spot size*) 36-42 nm, e tensão de 20 kV. As amostras foram preparadas sobre fita de carbono contida em suportes (*stub*) de cobre e depois metalizadas.

As metalizações (*sputtering*) foram realizadas sob vácuo, em atmosfera inerte de argônio, a 40 mA de corrente, 10^{-5} torr de pressão por um vácuo de 50 segundos. Nestas condições foi realizada a deposição de uma camada fina de ouro de aproximadamente 12,5 nm sobre a superfície das amostras. O equipamento usado para tal procedimento foi o da Bal-Tec modelo SCD 050 *Sputter Coater*, no Laboratório de Microscopia do Departamento de Física da UFPE.

3.4 PERFIL DE LIBERAÇÃO DO SISTEMA MOF-6MP

Com o objetivo de avaliar o perfil de liberação do sistema MOF-6MP na proporção 1:1 em massa, foi feita uma pastilha com 13 mm de diâmetro e aproximadamente 1mm de espessura à uma pressão de 3 toneladas numa prensa hidráulica. Em seguida a pastilha foi colocada em um recipiente contendo 1L de solução de PBS (tampão fosfato, pH 7,2). A solução foi agitada por uma haste com uma hélice em sua terminação a 200 rpm. Visando a avaliação da liberação da 6MP do sistema, alíquotas dessa solução foram coletadas e depois monitoradas por espectroscopia na região do UV/VIS no comprimento de onda máximo de absorção do fármaco (329 nm). As alíquotas foram analisadas no equipamento Ocean Optics HR 4000 com fonte DH-2000.

3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.5.1 Avaliação antitumoral *in vitro*

As células da linhagem HEp-2 (Human Epidermoide Cancer Cells), as quais são derivadas de tumor primário da laringe humana, foram mantidas em *Minimum Essential Medium Eagle Modified Dulbecco's*, DMEM (Sigma), suplementadas com 10% de soro bovino fetal e 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL contendo estreptomicina 250 mg/mL e 1% de L-glutamina 200 mM).

Para a determinação da viabilidade celular, foi utilizado o corante vital Azul Tripan 0,4 % (p/v), em tampão fosfato de sódio (PBS), o qual penetra facilmente nas células danificadas corando-as em azul, enquanto as células íntegras permanecem incolores, permitindo assim, determinar-se a porcentagem de células vivas e células mortas. Realizou-se contagem de células em microscópio invertido LEITZ, com a utilização de um hemocitômetro, preenchido com uma alíquota de suspensão de células homogeneizada.

Para determinação da citotoxicidade das amostras, uma suspensão celular de 10^5 células/mL foi preparada em meio adaptado para cada linhagem celular. A suspensão foi então distribuída em placas de cultura com 96 poços e em seguidas as placas foram incubadas a 37 °C em estufa, com atmosfera

úmida enriquecida com 5% de CO₂ durante 24 h. Após este período, amostras em diferentes concentrações foram adicionadas e as placas incubadas a 37 °C. Após 72 h de contato entre as células e as amostras, adicionou-se em cada poço 25 µL de Brometo-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) a uma concentração de 5 mg/mL em PBS (p/v) e as placas deixadas por 2 horas em estufa (37 °C). Ao final desse período, o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT, foram aspirados seguidos de adição de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan⁶⁷. O método do MTT baseia-se na capacidade que células vivas possuem em reduzir o sal tetrazólio, de cor amarela, a formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita graças à ação da enzima mitocondrial succinil desidrogenase, ativa apenas em células vivas. A leitura óptica foi realizada em leitor automático de placas a 595 nm. Comparou-se a densidade óptica (DO) média dos poços testes com a DO média dos poços controles. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos do Departamento de Antibióticos

3.5.2 Toxicidade aguda da MOF e avaliação histológica

A avaliação da toxicidade aguda da MOF foi realizada segundo o protocolo da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD 423). Três camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas com idade entre 8-12 semanas e pesando entre 25-30g, receberam uma única dose da MOF de 2000 mg/kg via oral, utilizando-se solução salina 0,9% como veículo. Os animais foram observados individualmente após a administração durante a primeira hora e periodicamente durante as primeiras 24 horas. Foi dada uma atenção especial nas primeiras 4 horas e uma avaliação diária foi feita durante os subsequentes 14 dias. As cobaias foram submetidas a ciclos de 12 horas claro/escuro e mantidos à temperatura de 22±2° C e a umidade se encontrava entre 50-60%. Para alimentação, foi fornecida ração industrial Labina e água *ad libitum*. No 14° dia, os animais foram sacrificados e feita a necropsia com análise macroscópica geral e pulmão, fígado, rim, baço e coração foram retirados e armazenados em solução fixadora de formalina tamponada (10%) para posterior análise histológica dos mesmos. O

experimento acima descrito foi realizado em duplicata. Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos do Departamento de Antibióticos, seguindo as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE.

A avaliação dos aspectos histológicos foi realizada com o auxílio da microscopia óptica comum, no Laboratório de Histotécnica do Departamento de Histologia e Embriologia – C.C.B./UFPE. Fragmentos dos órgãos fixados foram desidratados em bateria de álcoois (70 a 100 %), diafanizados em xanol e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5 µm foram corados pela técnica histológica de rotina com Hematoxilina & Eosina (H.E.) e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan®). Após a montagem, as preparações foram avaliadas e fotografadas através de sistema de vídeo-microscopia (Microscópio MOTIC BA200, com câmera digital MOTICAM 1000 1.3M Pixel–USB 2.0).

3.5.3 Avaliação antitumoral *in vivo* do sistema

Todos os estudos descritos estão de acordo com os padrões estabelecidos pelo guia para saúde e uso de animais de laboratório. Foram realizados dois experimentos antitumorais seguindo o mesmo protocolo. O primeiro utilizando sarcoma 180 e o segundo utilizando carcinoma de Ehrlich. Células tumorais foram obtidas de animais doadores com 8-10 dias de implante. Após sacrifício dos animais por deslocamento cervical, as células tumorais na forma ascítica foram coletadas da cavidade peritoneal dos animais doadores, e sua viabilidade celular foi avaliada através da coloração em azul tripan. Apenas as amostras com viabilidade acima de 90% foram utilizadas no transplante. Em seguida foi preparada uma suspensão de 25×10^6 células/mL e 0,5 mL foram implantados intraperitonealmente em camundongos albinos Swiss saudáveis com idade entre 6-8 semanas. No ensaio que foi utilizado o sarcoma 180, foram utilizados 5 grupos com 7 animais cada, onde 24 horas após receberem o implante tumoral foi iniciado o tratamento com as substâncias mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Grupos e respectivos tratamentos no ensaio antitumoral com sarcoma 180.

GRUPO (G)	SUBSTÂNCIA
G1	Solução salina 0,9 %
G2	MOF
G3	MOF+ Zn
G4	6-Mercaptopurina (6-MP)
G5	Sistema MOF-6MP (1:1 massa)

Para os ensaios com o carcinoma de Ehrlich o tratamento foi realizado durante 7 dias consecutivos onde a dose de todas as substâncias foram escolhidas em função da dose da 6-MP (Tabela 4), que é utilizada em humanos na concentração de 5 mg/kg de massa corpórea. Todos foram administrados nessa dosagem, exceto os sistemas MOF-6MP em proporção 1:1, 1:2 e 1:4 massa, onde a dose foi ajustada para que a concentração de 6-MP contida no sistema chegasse a 5 mg/kg resultando em uma dose total do sistema (10 mg/kg por exemplo no caso de sistema 1:1 massa). No 9º dia desde o início do experimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido ascítico foi coletado e seus órgãos vitais foram avaliados macroscopicamente e, fígado, rim, baço e coração foram retirados para posterior análise histológica. Os parâmetros observados para identificar uma possível ação inibitória do tumor foram o volume do tumor ascítico, a viabilidade celular e o número de células totais. A análise estatística da significância dos dados foi determinada por teste “t” de Student e ANOVA. O nível de significância foi de $p < 0,05$. Para o estudo histológico foram retirados os órgãos acima citados e fixados em formalina tamponada 10%. Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos do Departamento de Antibióticos, seguindo as

recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE.

Tabela 4. Grupos e respectivos tratamentos no ensaio antitumoral com carcinoma de Ehrlich.

GRUPO (G)	SUBSTÂNCIA
G1	Solução salina 0,9 %
G2	MOF
G3	6-Mercaptopurina (6-MP)
G4	MOF-6MP (1:2 massa)
G5	MOF-6MP (1:4 massa)

3.5.4 Análises histológicas dos órgãos

A avaliação dos aspectos histopatológicos dos órgãos (fígado, rim, baço e coração) dos animais controle e tratados (G1, G2, G3, G4 e G5) foi realizada com o auxílio da microscopia óptica comum, no Departamento de Histologia e Embriologia – C.C.B./UFPE. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina tamponada (10%) e posteriormente foram desidratados em bateria de álcoois (70 a 100 %), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5 μ foram corados pela técnica histológica de rotina com Hematoxilina & Eosina (H.E.) e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan®).

Após a montagem, as preparações foram avaliadas e fotografadas através de sistema de vídeo-microscopia (Microscópio MOTIC BA200, com câmera digital MOTICAM 1000 1.3 M Pixel–USB 2.0). Exames histológicos foram realizados apenas nos órgãos dos animais que fizeram parte do ensaio antitumoral com o carcinoma de Erlich.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico iremos tratar da caracterização da MOF, assim como da incorporação da 6MP na rede via espectroscopia vibracional na região do infravermelho, análise termogravimétrica, análise elementar (CHNS), difratometria de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva.

Em seguida trataremos da viabilidade e eficiência da MOF como um sistema carreador através dos experimentos de perfil de liberação, toxicidade aguda, ensaio antitumoral e análises histológicas de órgãos de animais submetidos aos dois últimos procedimentos citados.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A MOF sintetizada foi obtida na forma de um pó cristalino branco e a incorporação do fármaco resultou em um pó amarelo, mostrando aparência macroscópica regular. Ambas as amostras não demonstraram ser higroscópicas.

4.1.1 Análise elementar

A análise elementar foi realizada com o objetivo de quantificar os elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre presentes na amostras. Com esses dados podemos estimar qual a unidade básica estrutural da amostra. Os dados obtidos neste experimento está apresentado na Tabela 5. Na primeira linha observa-se os dados previstos para a fórmula mínima $Zn(BDC)(H_2O)_2$ e na segunda linha os obtidos pela análise experimental. Os resultados se apresentam bastante coerentes com os valores previstos, ratificando a fórmula mínima proposta.

Tabela 5. Números previstos e experimentais da análise elementar.

	Carbono	Hidrogênio
Previsto	36,1%	3,0%
Experimental	34,0%	2,8%

4.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada como método complementar de caracterização, facilitando assim a identificação dos grupos funcionais pertencentes ao ligante, BDC, e do mesmo presente na rede de coordenação bem como o modo pelo qual este ligante se coordena ao íon metálico como mostra a Figura 15. Este método também visou à identificação da incorporação do fármaco na MOF.

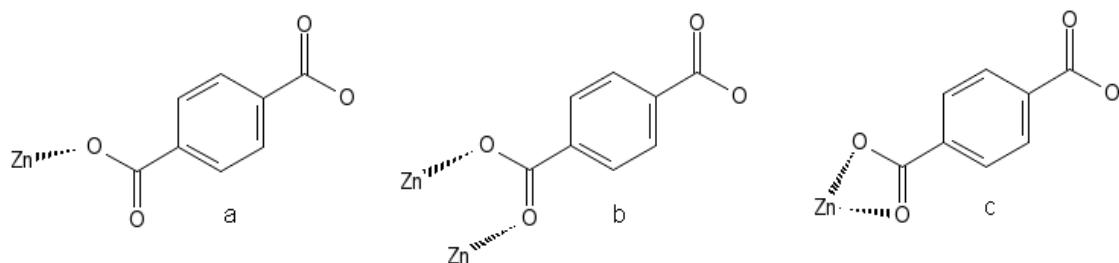


Figura 15. Possíveis modos de coordenação do ligante orgânico BDC. Monodentado (a), bidentado em ponte (b) e bidentado quelato (c).

Na Figura 16, são apresentados os espectros de infravermelho referentes ao ligante livre, ao nitrato de zinco e ao $\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2$ (sem lavar e lavado e seco). Para o ligante livre, H_2BDC , podemos identificar os principais picos que caracterizam as vibrações dos grupos que pertencem a essa molécula^{70, 71}. Na região de 3000 cm^{-1} observamos estiramento O-H referente ao ligante, H_2BDC , e a ligações de hidrogênio, 1682 cm^{-1} estiramento C=O e 1283 cm^{-1} C-O. Podemos sugerir o modo de coordenação do metal através de uma correlação da diferença entre os picos correspondentes a carboxila ($\nu_{\text{C=O}} - \nu_{\text{C-O}}$) presentes no ligante livre e na MOF.

O ligante livre apresenta $\nu_{C=O} - \nu_{C-O} = 390$ e a MOF sem lavar e da MOF lavada e seca apresenta $\Delta\nu$ ($\nu_{C=O} - \nu_{C-O}$) igual a 200 e 190 respectivamente. Portanto, quando comparamos o $\Delta\nu$ do ligante com o da MOF sem lavar e da MOF lavada e seca podemos sugerir que o ligante se coordena de forma bidentada⁶⁸. Na Figura 16 B é ilustrado o espectro de infravermelho do $Zn(NO_3)_2$ onde podemos observar um bandas em $1386 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ (essa banda é referente ao estiramento (ν_{NO_2}).

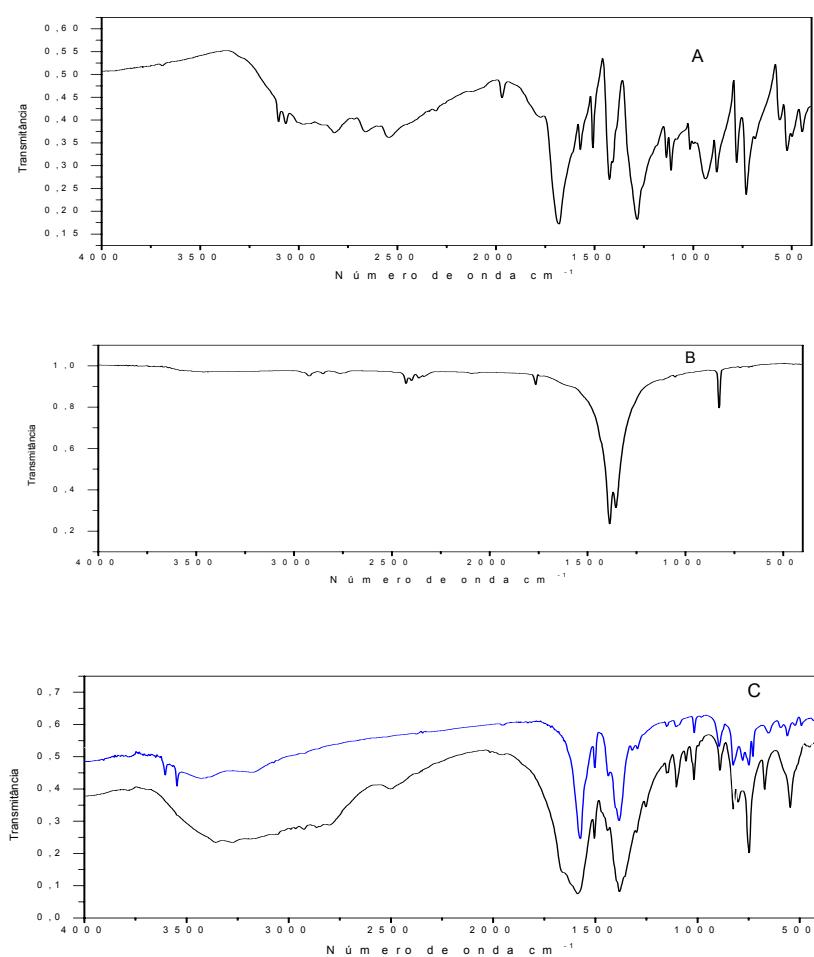


Figura 16. Espectros de infravermelho de H_2BDC (A), $Zn(NO_3)_2$ (B) e de MOF sem lavar (B em preto) e lavada e seca (C em azul).

Podemos observar pelos espectros de infravermelho das MOFs (Figura 16 C), lavada com água destilada e lavada e seca em estufa a 150°C, que não há nenhuma alteração nas bandas características dos grupos funcionais do ligante. Entretanto, observamos apenas uma diminuição da banda referente

estiramento O-H (3000 cm^{-1}), a qual também é atribuída à água de hidratação e possíveis ligações de hidrogênio.

Na Figura 17, são apresentados espectros de infravermelho pertencentes à 6MP (preto), sistema MOF-6MP nas respectivas proporções de 1:1 massa (azul), 1:2 mol (verde) e 1:1 mol (vermelho). Nos espectros na região do infravermelho relativos ao sistema MOF-6MP, não podemos precisar quais bandas são referentes apenas à 6MP ou apenas à MOF, pois as duas amostras apresentam bandas em regiões semelhantes podendo haver uma sobreposição das mesmas nos espectros⁶⁹.

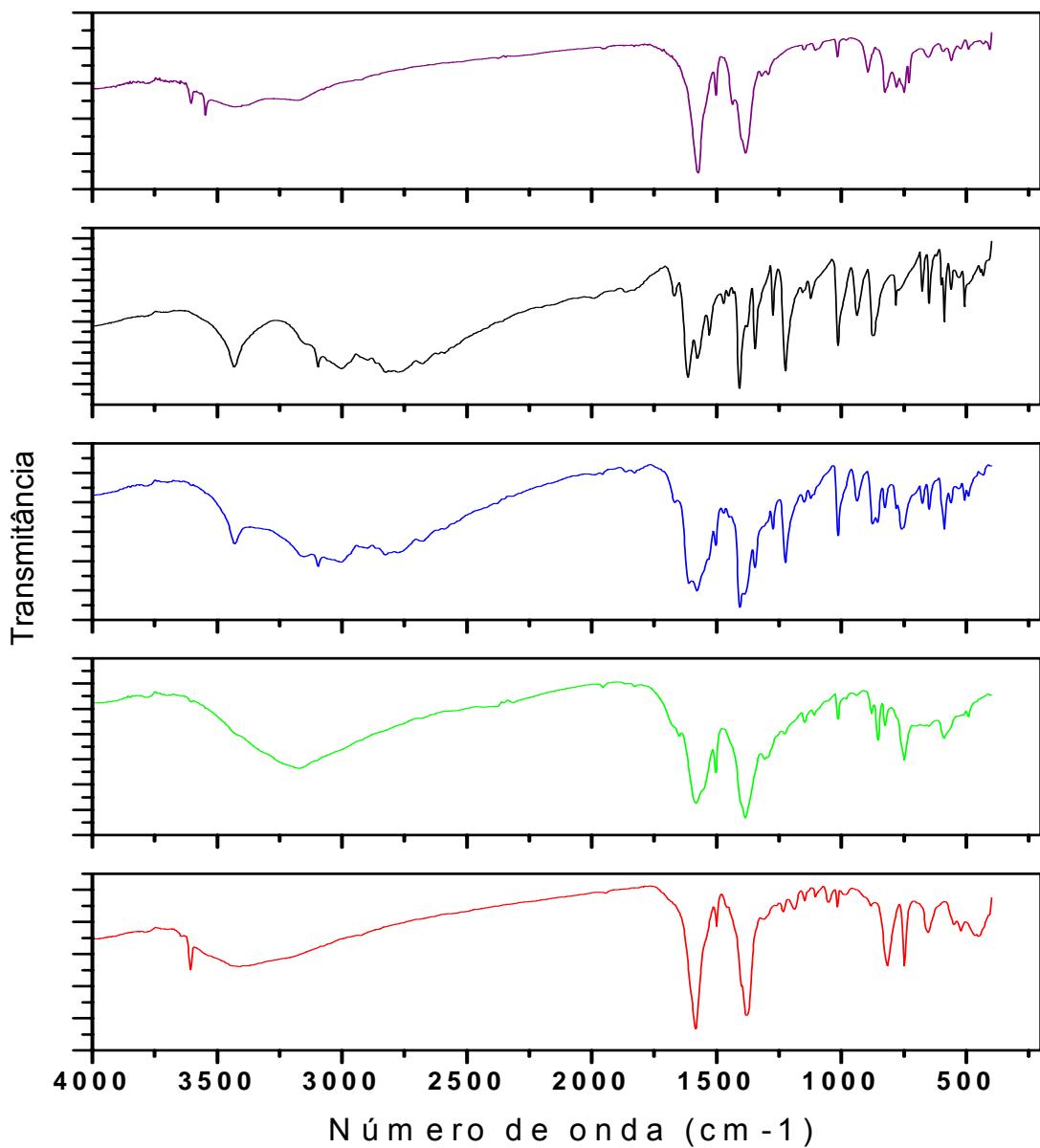


Figura 17. Espectros de infravermelhos correspondentes à MOF lavada e seca (lilás), 6MP (preto) e dos sistemas MOF-6MP na proporção de 1:1 massa (azul), 1:2 mol (verde) e 1:1 mol (vermelho).

Os espectros de infravermelho dos sistemas MOF-6MP nas proporções de 1:2 e 1:4 em massa não foram apresentados por se apresentarem exatamente iguais ao espectro de infravermelho do sistema 1:1 massa. No gráfico mostrado acima referente ao sistema MOF-6MP na razão molar de 1:1 e 1:2, podemos observar bandas referentes à MOF principalmente entre 4000 e

1379,19 cm⁻¹. Nos gráficos dos sistemas MOF-6MP, principalmente onde existe uma maior concentração da droga, vemos uma banda em 1000 cm⁻¹ de baixa intensidade, referente a deformação axial de tiocarbonila, um grupo funcional presente na 6MP onde na mesma é bastante intensa e aguda^{70,71}.

4.1.3 Análises termogravimétricas

Análises termogravimétricas foram realizadas a fim de obter as percentagens de massa perdida pela amostra e assim correlacionar com as faixas de temperatura e com a composição do composto estudado.

Na Figura 18, podemos observar a curva termogravimétrica referente à MOF sintetizada nesse trabalho, aquela é semelhante a um sistema sintetizado, com o mesmo ligante BDC, na literatura⁶⁹. No tópico anterior, referente à análise elementar, foi proposta uma fórmula mínima para a MOF $[Zn(BDC)(H_2O)_2]$, esta fórmula foi corroborada pela análise termogravimétrica comparando as perdas de massa relativa com a composição do composto estudado.

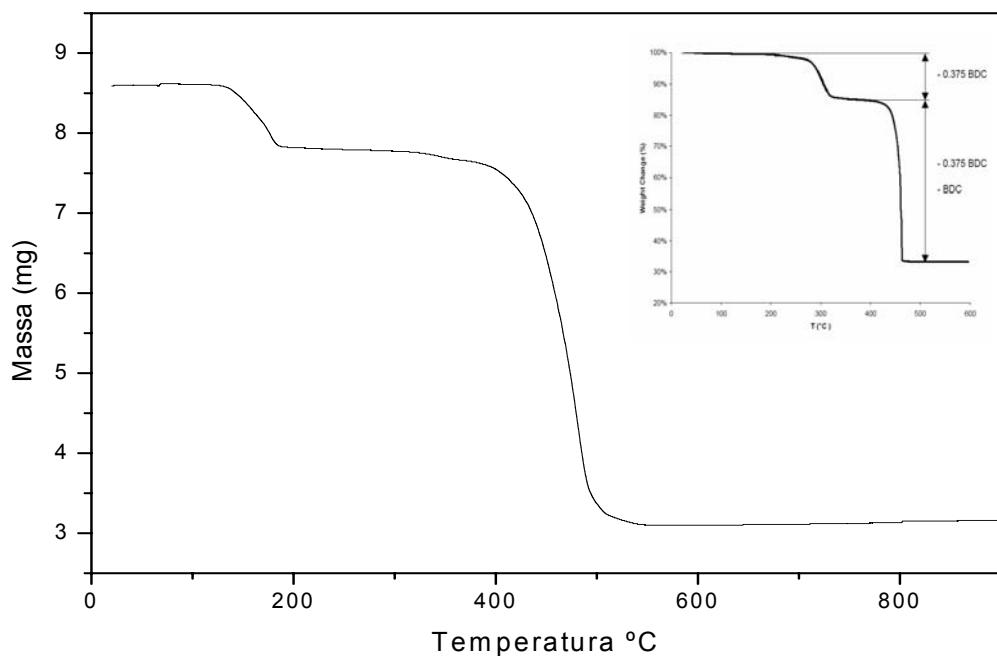
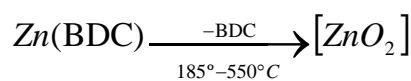
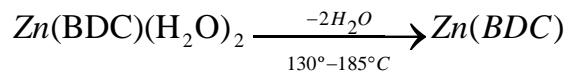


Figura 18. Termograma para MOF lavada e seca e termograma de uma MOF contendo BDC como ligante (acima e à direita do gráfico)⁶⁹.

No termograma da MOF, mostrado na Figura 18, também podemos observar uma perda de água entre aproximadamente 135° e 185° C. Entre 185° e 550° podemos observar o que aparenta ser a destruição da rede onde há perda de 52 % de massa do material. Com base nessas informações, podemos formular um mecanismo de decomposição térmica para o composto em questão. O mecanismo descrito abaixo concorda com a fórmula mínima proposta a partir da análise CHNS com erros percentuais variando em torno de 6%.



Na Figura 19 podemos observar os termogramas referentes à 6MP e aos demais sistemas MOF-MP razão molar de 1:1 e 1:2 e na proporção de 1:1 em massa. Quando observamos e comparamos o gráfico do sistema MOF-6MP 1:1 mol com os da MOF e da 6MP isoladamente, podemos ver uma perda de água entre 110° e 190° C. Nas temperaturas entre 260° e 300° C há uma perda de aproximadamente 10% de massa da amostra provavelmente relativa à 6MP. Entre 235° e 510° C observamos uma perda de massa de 25%, provavelmente relativa ligante BDC presente MOF. Nas temperaturas entre 510° e 800° C, podemos ver uma perda de massa de quase 17% relativa à 6MP.

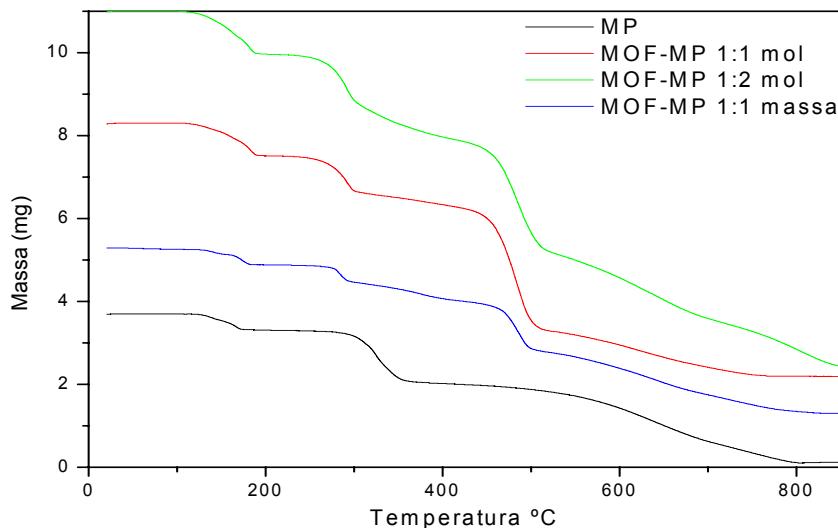


Figura 19. Termograma da 6MP (preto) e do sistema MOF-6MP na proporção molar de 1:1 (vermelho) e 1:2 (verde); 1:1 em massa (azul).

No gráfico acima, onde vemos o termograma do sistema 1:1 em mol, podemos observar novamente uma perda inicial de água entre 140° e 190° C (10%). Podemos notar outro evento de perda de massa entre 250° e 300° C (10%) que provavelmente está atribuído à droga. Também vemos perda de massa entre as temperaturas de 460° a 510° referente possivelmente ao BDC da MOF, estando um pouco deslocado em relação ao gráfico da MOF, correspondendo a uma perda de 20% de massa. No último evento vemos uma perda de 510° a 850° relativa à degradação da 6MP. Na figura 18 também

podemos perceber uma perda de água entre as temperaturas de 130º e 180º C (7%); Um evento entre 250º e 290º C indicando ser característico da droga com uma perda de massa de aproximadamente 5%; outro evento entre 380º e 500º C provavelmente com relação à perda de massa da MOF (30%). O último aveneto acredita-se estar relacionando com a perda de massa da droga entre 500º e 800º C. Todos esses fatores dão indícios da presença tanto do fármaco 6MP quanto da MOF das amostras avaliadas.

A Tabela 6 apresenta os valores de perda de massa, intervalo de temperatura em que esses eventos se encontram e a que eles provavelmente se referem.

Tabela 6. Dados mostrados sobre os eventos de perda de massa e suas respectivas faixas térmicas onde se encontram.

Sistema amostra	ou	T inicial (°C)	T final (°C)	Perda de massa (%)	Observações
MOF lavada e seca		135°	185°	10	perda de água
		420°	500°	53	Degradação da rede
6 MP		120°	175°	11	perda de água
		450°	800°	50	Degradação do material
Sistema MOF-6MP 1:1 mol		110°	190°	10	Perda de água
		260°	300°	10	Relativo a 6MP
		235°	510°	25	Relativo a MOF
		510°	800°	17	Relativo a 6MP
Sistema MOF-6MP 1:2 mol		140°	190°	10	Perda de água
		250°	300°	10	Relativo a 6MP
		460°	510°	20	Relativo a MOF
		510°	800°	35	Relativo a 6MP
Sistema MOF-6MP 1:1 mol		130°	180°	7	Perda de água
		250°	290°	5	Relativo a MOF
		380°	500°	30	Relativo a MOF
		500°	800°	35	Relativo a 6MP

4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura das amostras das MOF's A e B, e das mesmas após passarem por um processo de lavagem e secagem, foram obtidas com o intuito de avaliar uma possível mudança da morfologia em cada um dos processos acima citados. O MEV do sistema MOF-MP na proporção de 1:1 massa também foi realizado a fim de compará-lo morfologicamente com as micrografias da MOF e da droga isolada.

Na Figura 20, são apresentadas as micrografias referentes à MOF-A lavada, da mesma amostra após ser seca à 150°C e uma imagem aproximada de umas das morfologias que podemos observar durante o experimento.

Quando analisamos a MOF-A que foi lavada com água destilada após a síntese (Figura 20 a), observamos uma morfologia granular e irregular, composta por partículas que variam aproximadamente de 10 a 100 µm. Quando a amostra é seca (após a lavagem) não se observa modificação na morfologia. Entretanto, na amostra lavada e seca encontraram-se estruturas peculiares, com aspecto de agulhas concêntricas, formando uma estrutura de forma estrelar (Figura 20 b).

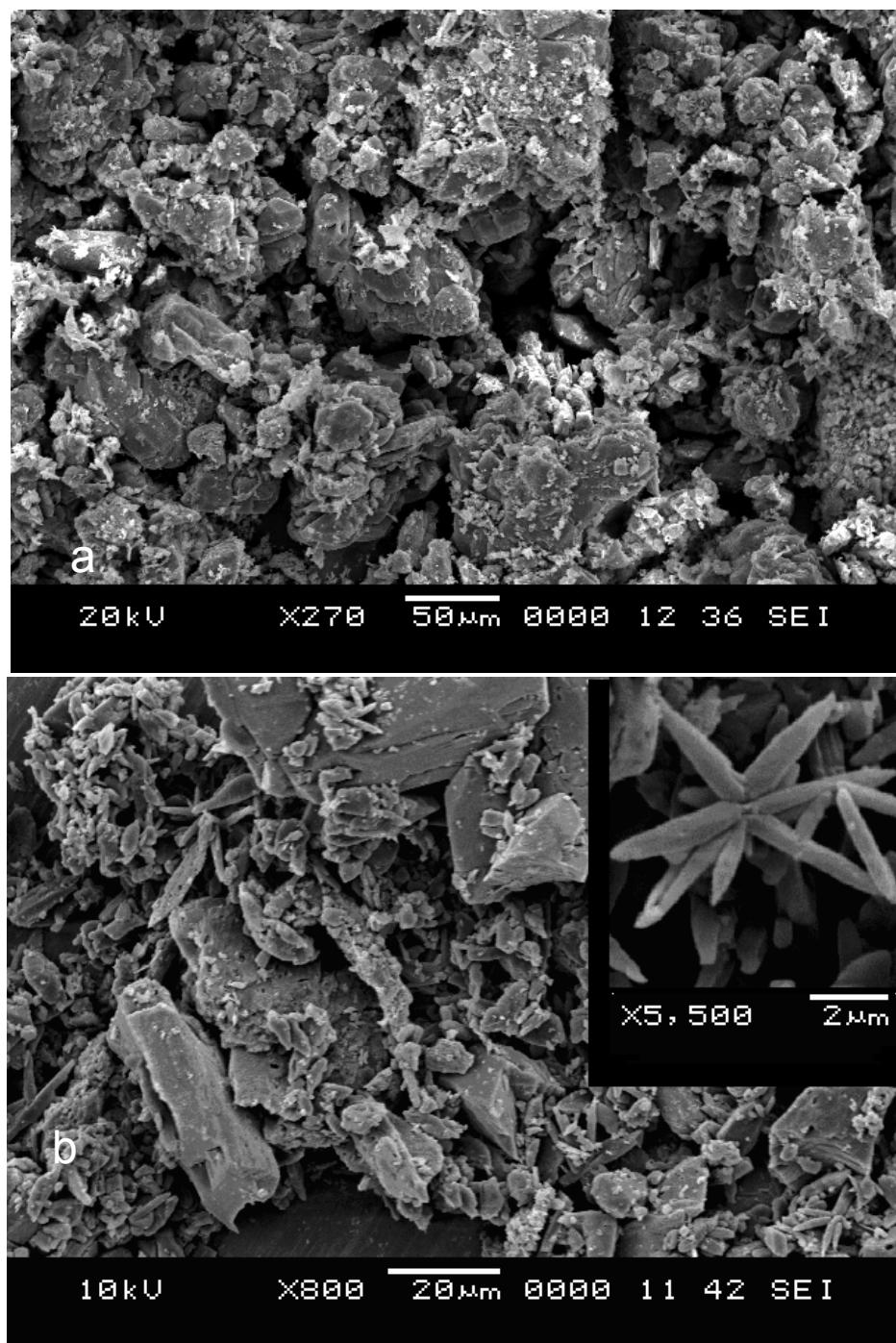


Figura 20. Micrografias da MOF-A lavada (a) e lavada e seca à 150°C (b). Em b podemos ver algumas estruturas com uma morfologia em flor.

A micrografia da amostra obtida em concentração cinco vezes menor (MOF-B) que a feita anteriormente mostra duas fases predominantes: uma fase composta por partículas menores com aspecto cúbico (Figura 21 b), bastante semelhante à MOF-5, e outra fase composta por partículas maiores com faces

bem definidas (Figura 21 a e b). Devido à predominância das estruturas de morfologia indefinida é provável que na análise de difração de raios-X de pó corresponda ao cristal maior.

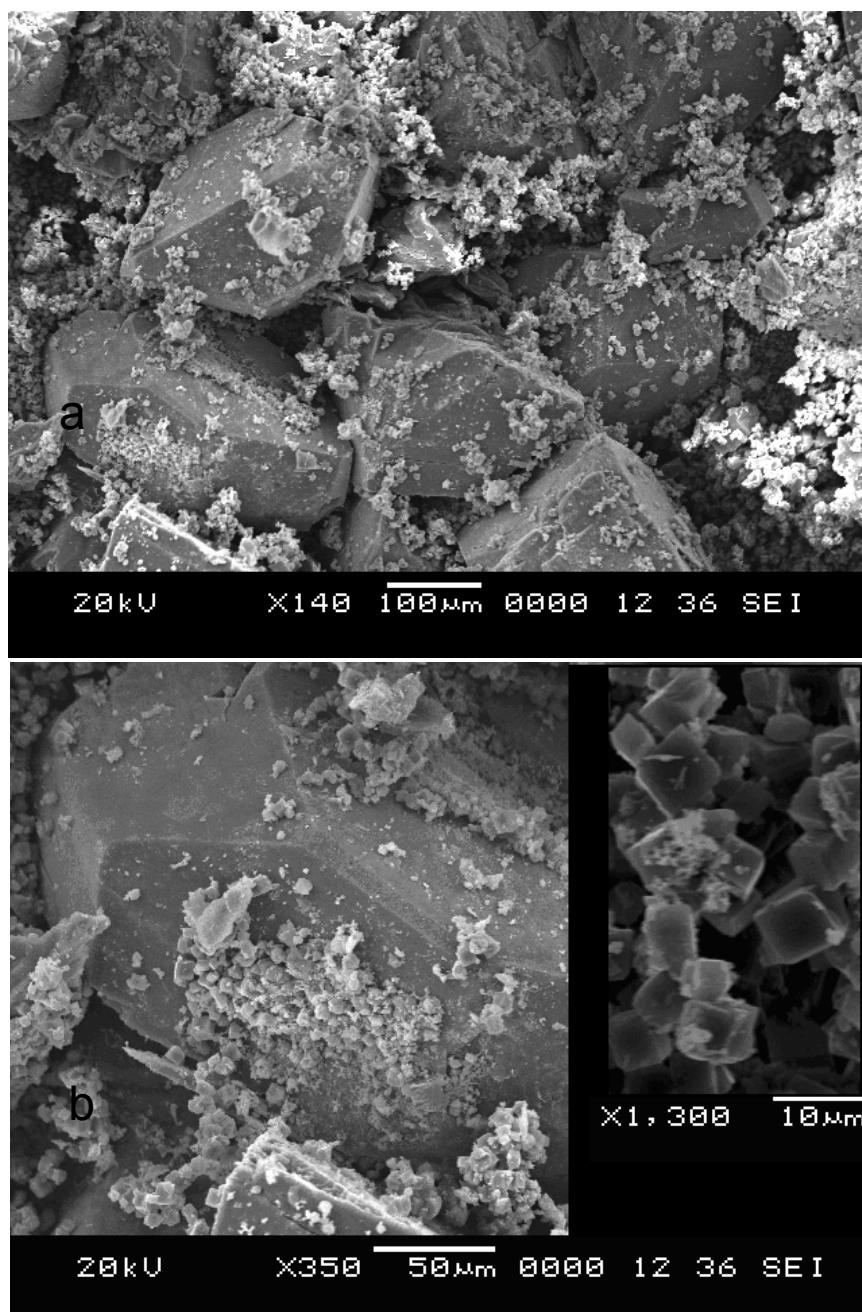
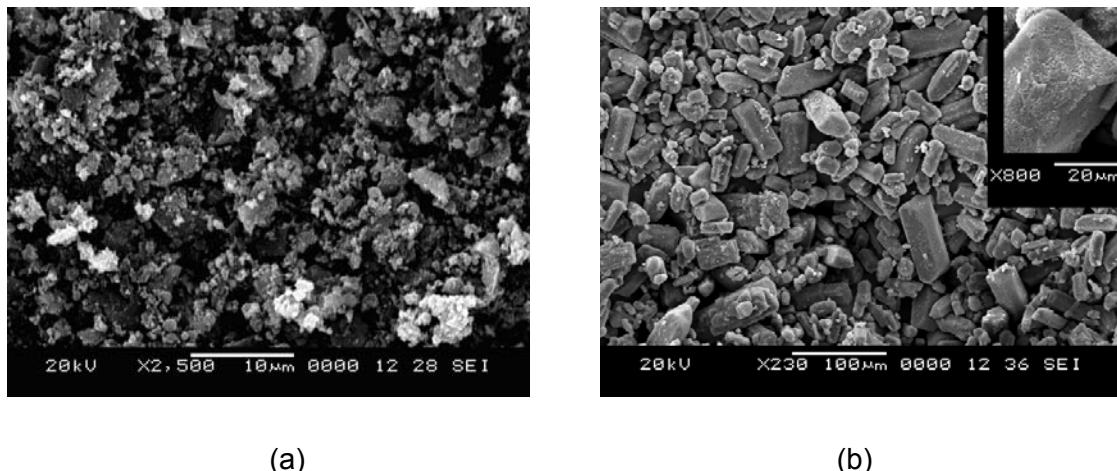


Figura 21. Micrografias realizadas das amostras de MOF-B que não foram lavadas (a e b).

Com o intuito de avaliar uma possível alteração da morfologia dos compostos, foram obtidas micrografias do sistema MOF-MP na proporção 1:1 em massa. Nas análises microscópicas das amostras do sistema MOF-6MP na proporção 1:1 em massa apresentadas na Figura 22 (a e b), podemos notar uma alteração no aspecto da mesma quando comparamos com as micrografias da MOF (preparadas nas diferentes condições acima descritas) e da 6MP, principalmente na média tamanho das partículas. As amostras não apresentam morfologia definida.



(a)

(b)

Figura 22. Micrografia do sistema MOF-MP na proporção de 1:1 massa (a) e 6MP com aumento de 800 x à direita e acima na figura (b).

Na Figura 23, vemos a análise de EDS de uma amostra do sistema MOF-6MP mostrando a presença do zinco e do nitrogênio que são elementos que fazem parte da MOF e do fármaco respectivamente, sugerindo a presença de ambos na amostragem analisada. Apenas um gráfico está presente, pois todas as áreas foram bastante semelhantes.

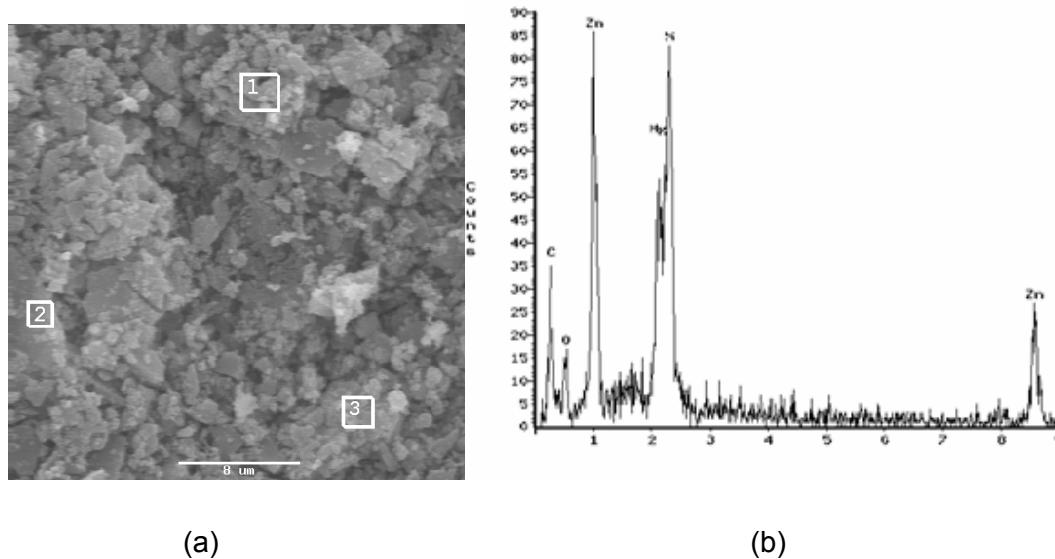


Figura 23. Análise de espectroscopia de energia dispersiva para a amostra do sistema MOF-6MP na proporção 1:1 massa. À esquerda (a) vemos a imagem e as áreas analisadas e à direita o gráfico representando a presença dos elementos na amostra (b).

4.1.5 Difração de raios-X (DRX)

Análises de raios-X de pó foram realizadas a fim de avaliar a cristalinidade do material suas alterações estruturais quando a MOF é preparada de diferentes maneiras.

Difratogramas de raios-X de pó referentes à MOF-A, onde a primeira amostra não passou pelo processo de lavagem com água e o segundo também sem lavar, mas que passou por um processo de secagem à 150°C (Figura 24). Podemos observar quando comparamos estes dois gráficos que as amostras se mostram cristalinas devido às larguras dos picos serem estreitos. Também podemos reparar que a perda de água (demonstrada pela análise termogravimétrica) altera a simetria da estrutura, podendo ser visto pelo aumento do número de picos no segundo gráfico e pelos desdobramentos que os picos começam a formar mostrando perda de simetria da estrutura após passar pelo processo de secagem. Isso se deve provavelmente a perda de ligações de hidrogênio que podem estar formando a rede, com isso, havendo a perda da simetria do cristal.

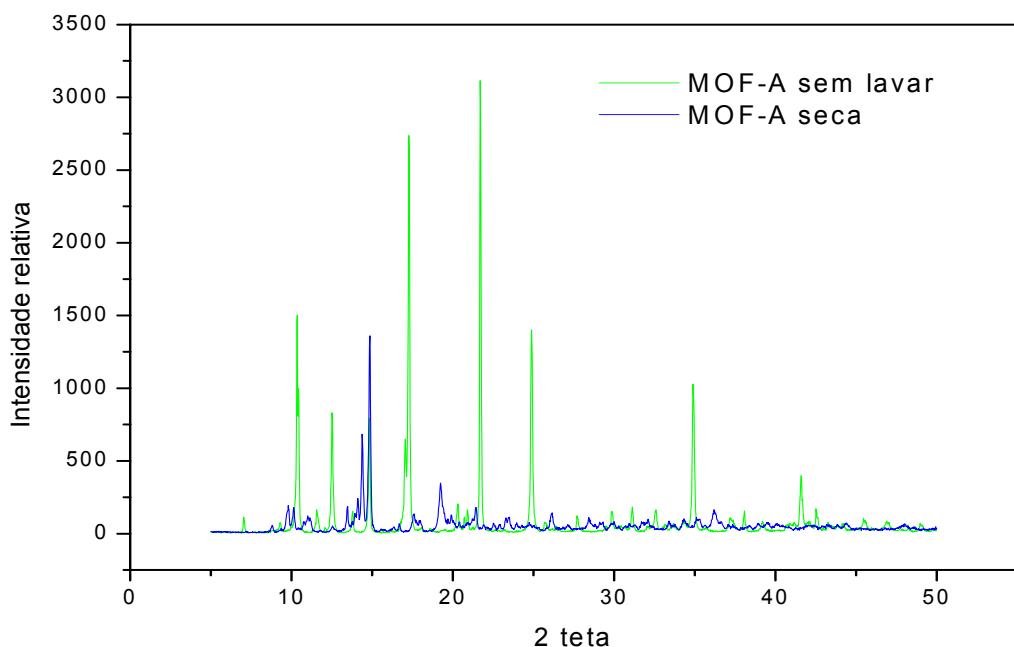


Figura 24. Difratogramas da MOF-A preparada em concentrações normais sem lavar (verde) e a mesma amostra após secar em 150°C por 24 horas (azul).

Tanto nos difratogramas onde a MOF foi lavada ou nas que foram secas, a água se mostrou um fator importante na determinação da estrutura da amostra.

Na Figura 25, observamos difratogramas de raios-X de pó referentes à MOF-B (sintetizada em concentração cinco vezes menor que a MOF-A) sem lavar e lavada com água destilada. Podemos perceber que ambas as amostras apresentam padrão de difração característico de material cristalino (picos estreitos e bem definidos). Observa-se uma possível mudança na estrutura quando a MOF é lavada, sugerindo que a água exerce um importante papel na estrutura da MOF-B como na MOF-A. A identificação da função da água na estrutura poderá ser confirmada por meio da elucidação da estrutura cristalina (difração de raios-X de monocrystal).

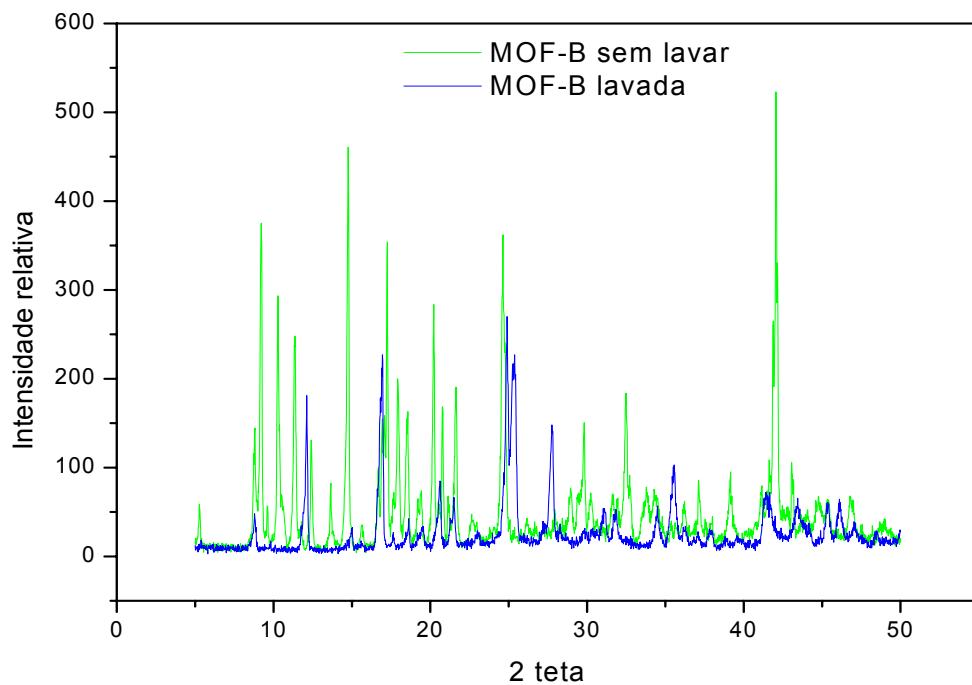


Figura 25: Difratogramas de raios-X das amostras da MOF-B sem lavar (verde) e a mesma após ser lavada com água (azul).

Na Figura 26, observamos um difratograma referente ao sistema MOF-MP na proporção 1:1 em massa. Neste caso, como não se observa a soma dos difratogramas da MOF nem da 6MP (banco de dados), sugere-se assim, uma alteração da estrutura por interações químicas e apresentando ainda uma cristalinidade da amostra.

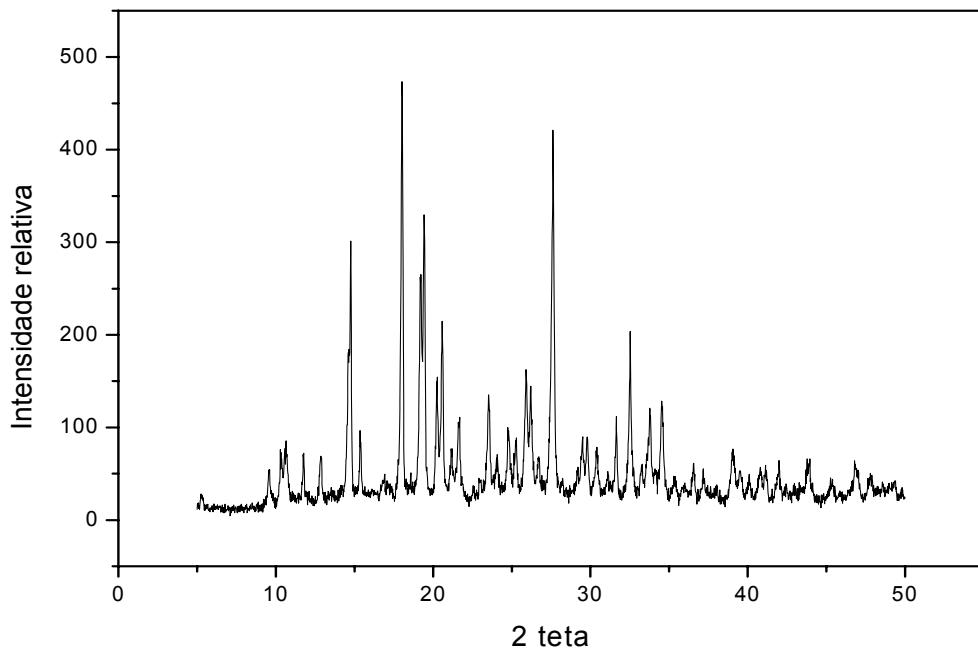


Figura 26. Difratograma de raios-X relativo ao sistema MOF-6MP na proporção 1:1 em massa.

4.1.6 Perfil de liberação do sistema MOF-6MP

Para a realização deste experimento, inicialmente foi feita uma curva de calibração (Figura 27) através de espectroscopia de absorção eletrônica na região UV/Vis, relacionando uma concentração conhecida da droga em questão com a intensidade do sinal. Esse experimento teve o objetivo de futuramente comparar concentrações desconhecidas do fármaco numa solução com a intensidade do sinal com a curva padrão, conseguindo assim, estimar a quantidade de 6MP presente numa amostra.

O perfil de liberação foi realizado com o intuito de averiguar se há saída do fármaco do sistema e a velocidade do evento em meio fisiológico. O experimento demonstrou uma liberação lenta da droga, onde os primeiros 25% ocorreram nos primeiros 5 dias. No 18º dia, aproximadamente, praticamente não observamos mais liberação da 6MP, sugerindo uma saturação do meio, ou que uma parte da droga pode ter se ligado à rede de uma forma não reversível.

Neste caso, também não temos como afirmar se esta MOF pode ser enquadrada em sistemas carreadores monolíticos (que se degradam para liberar uma droga) ou reservatórios (que liberam a molécula hospedeira sem alterar sua estrutura) pois seria necessária uma difratometria de raios-X para avaliar se houve perda da cristalinidade do material hóspede. Também seria necessário relacionar esses dados citados acima com qual ordem é a cinética de liberação.

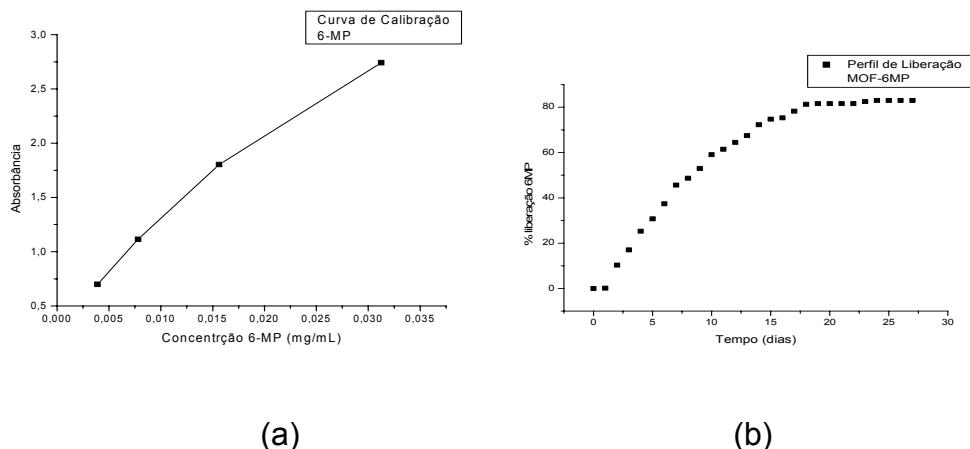


Figura 27. Gráfico representando a curva de calibração da 6MP (a) e Perfil de liberação do sistema MOF-6MP 1:1 massa (b).

4.1.7 Avaliação anitumoral *in vitro* do sistema MOF-6MP

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* teve como objetivo a averiguação da atividade citotóxica dos sistemas MOF-6MP em diferentes proporções (1:1 e 1:2 em mol e 1:1 em massa) utilizando para este ensaio uma linhagem celular derivadas de tumor primário da laringe humana. Também testamos a MOF+Zn e a MOF-A lavada e seca sozinha a fim de observar uma possível ação antitumoral das mesmas ou se existe algum sinergismo na ação dos sistemas. A tabela 7 mostra os produtos utilizados neste experimento e os valores da inibição do crescimento celular quando se utiliza os mesmo na concentração de 10 µg/ml.

Percebeu-se em testes antitumorais *in vivo* preliminares que a MOF-A sem lavar apresentou ação antitumoral e que na mesma existia uma quantidade significativa de Zn^{+2} na rede e que tal elemento. Objetivando avaliar qual deles (MOF-A ou zinco) estava atuando para a inibição tumoral, o zinco foi incorporado na MOF-A previamente lavada e seca.

Baseado nos resultados apresentados na Tabela 7 percebe-se que o sistema mais eficiente é o MOF-6MP na proporção 1:1 em massa, porém não vemos uma diferença significativa entre eles. Também podemos observar que a MOF e a MOF-Zn não apresentaram inibição do crescimento celular, mostrando que as mesmas não possuem propriedades capazes de inibir tal crescimento neste tipo de linhagem celular. É provável que a MOF-A e/ou o zinco não atuem diretamente na célula tumoral, e sim, em alguns dos sistemas envolvidos direta ou indiretamente nos processos cancerígenos.

Tabela 7. Produtos utilizados e seus respectivos valores de inibição do crescimento celular.

PRODUTOS	% DE INIBIÇÃO CO CRESCIMENTO CELULAR (10 μ g/ml)
MOF-6MP (1:1)	36,6
MOF-6MP (1:2 em mol)	38,7
MOF-6MP (1:1 em massa)	41,1
6MP	34,5
MOF-A	Nenhuma ação
MOF-Zn	Nenhuma ação

4.1.8 Toxicidade aguda da MOF

De acordo com os critérios da OECD 423, a toxicidade da MOF na dose de 2000mg/kg é baixa e com a DLA₅₀ (dose letal aproximada de 50% dos animais) referente à 2500 mg. Também não foram observados alterações comportamentais extremos como convulsões e tremores. Na dose administrada, observou-se nos primeiros 30 minutos reações excitatórias e estimulantes tais como: movimentos estereotipados, piloereção e taquicardia. Após esse período, os náufragos apresentaram reações depressoras tais como abaixamento do trem posterior e sonolência. Todas essas mudanças comportamentais foram totalmente reversíveis após as primeiras horas após a administração da dose.

A fase excitatória sugere que a MOF pode ser um fator estimulante do sistema nervoso central (SNC), e após esta fase, os sinais depressores podem ter sido causados por uma fadiga neuronal (que ocorre normalmente após uma fase excitatória, ou até mesmo uma metabolização ou excreção do fator estimulante. A análise macroscópica não mostrou alterações nos órgãos dos animais.

4.1.9 Avaliação histológica dos ensaios de toxicidade aguda

A avaliação histológica de órgãos de animais que receberam MOF ainda não se apresenta na literatura, por isso, a discussão dos resultados não teve âmbito comparativo com resultados anteriores. Vamos relacionar as alterações com possíveis disfunções fisiológicas encontradas na literatura atualmente. Podemos observar pela avaliação da Figura 28, que é referente ao corte histológico de rim dos animais submetidos aos ensaios de toxicidade aguda, várias áreas congestionadas, causada, provavelmente, por um aumento da pressão sanguínea do animal. Por ser um órgão excretório e altamente vascularizado, o rim sofre um rápido comprometimento de suas funções quando a pressão arterial está alterada. Esse fato pode gerar uma perda ou diminuição da função renal.

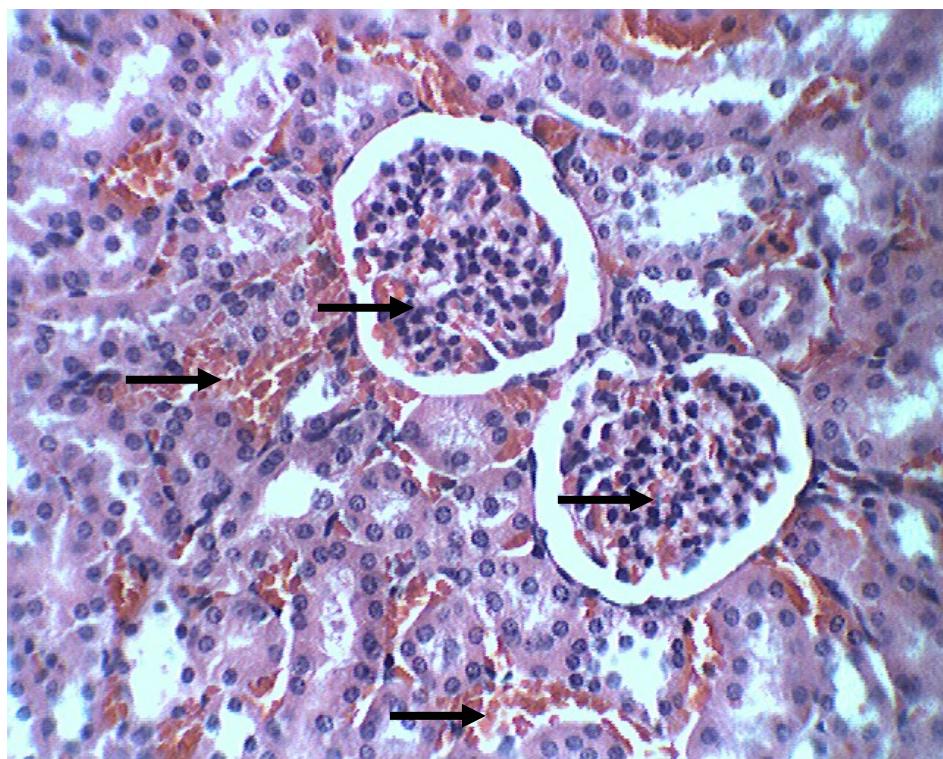


Figura 28. Fotomicrografia característica de tecido renal coletado de animais que receberam MOF, mostrando comprometimento da integridade do parênquima renal com evidente congestão vascular nos capilares entre os túbulos contorcidos e nos capilares glomerulares (**setas**). H.E.: 400X.

Na Figura 29, podemos observar também uma congestão vascular hepática (v) como visto no tecido renal, provavelmente causada pelo aumento da pressão sanguínea. Este órgão também é um órgão que recebe um grande fluxo sanguíneo e bastante suscetível a alterações da pressão arterial.

A vacuolização (setas finas na Figura (29 A e B) citoplasmática geralmente ocorre devido a um processo degenerativo celular, com diminuição ou perda das funções hepáticas. Isso indica que a MOF se mostrou tóxica ao tecido hepático quando utilizada nesta dosagem (2000 mg/Kg).

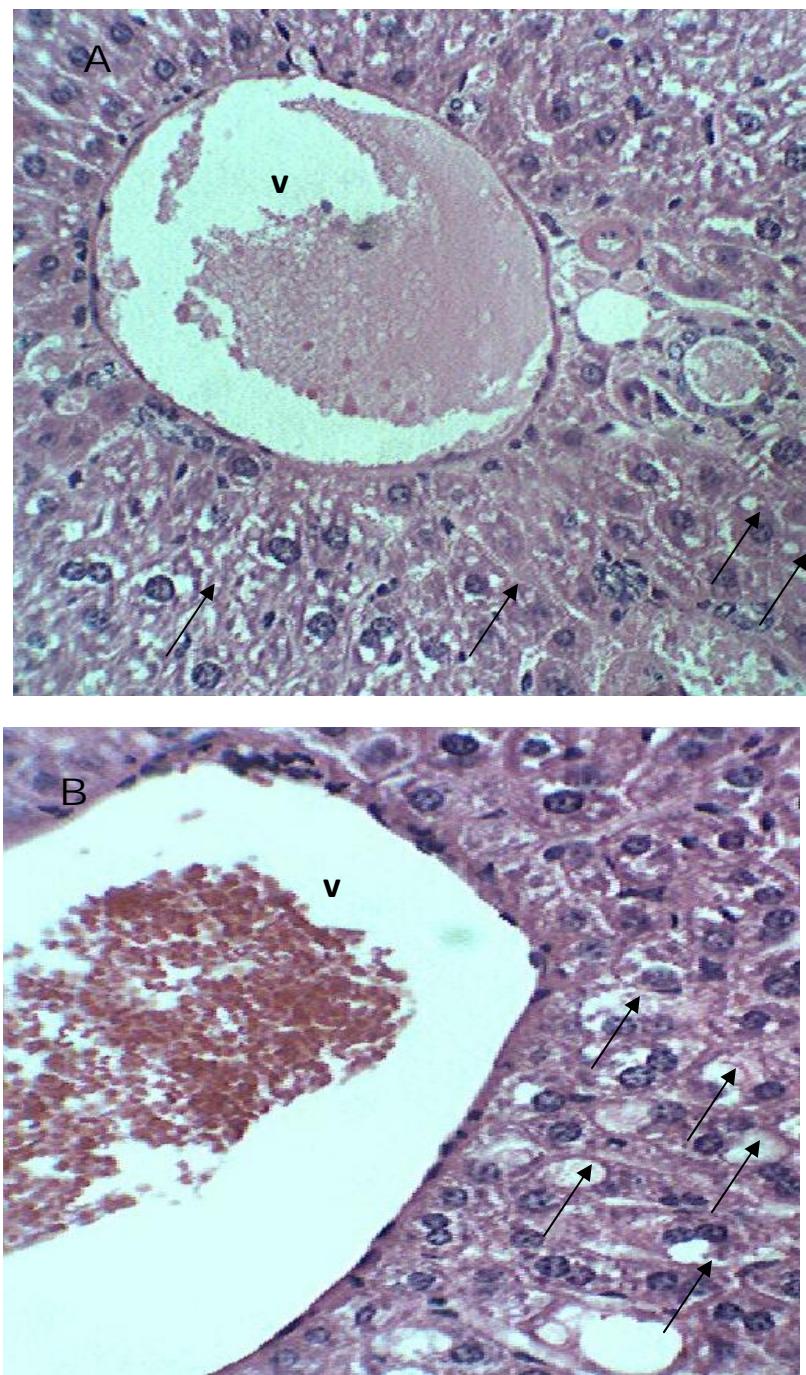


Figura 29. Fotomicrografias características de tecido hepático coletado de animais que receberam MOF, mostrando comprometimento da integridade dos hepatócitos com evidente vacuolização citoplasmática (**setas finas**): **A)** 100X e **B)** 400X. Desordenação dos feixes celulares e processo de congestão vascular em veias centrolobularres (**v**). H.E.

Na Figura 30, vemos alteração do tecido pulmonar provavelmente devido ao aumento deste processo hipertensivo sugerido anteriormente. O espessamento das camadas alveolares devido à formação de um exudato, indicando uma provável indução inflamatória do produto (setas curtas) e congestão da rede de capilares local. Todos esses fatores favorecem disfunções nas trocas gasosas. Neste caso a MOF também se mostrou tóxica.

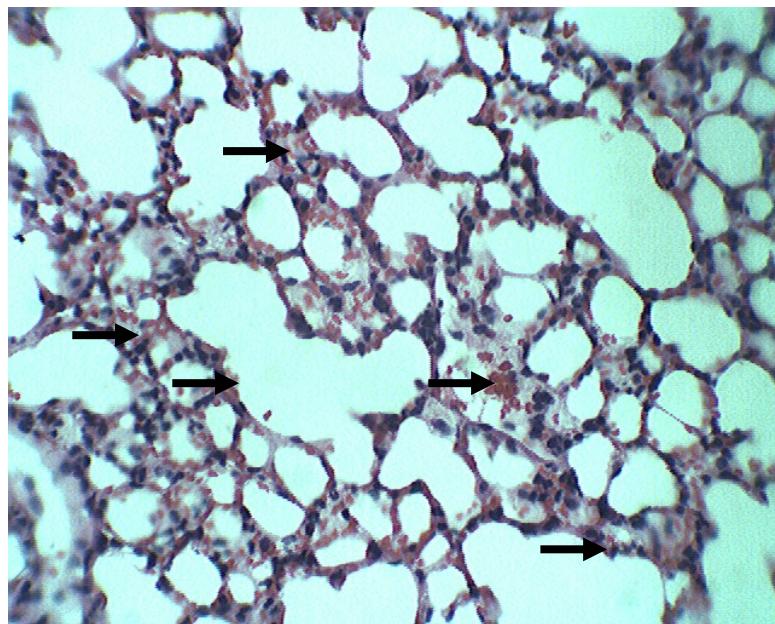


Figura 30. Fotomicrografia característica de tecido pulmonar coletado de animais que receberam MOF, mostrando comprometimento da integridade dos alvéolos com evidente espessamento de suas paredes devido à exudação linfocitária e congestão da rede vascular local (**setas curtas**): H.E., 100X.

Na Figura 31, podemos observar que o baço não apresentou alterações funcionais. Percebemos a presença de nódulos linfáticos ativados (setas curvas), estando presentes tanto em fisiologia normal quanto podendo ter sido ativados por indução de processos inflamatórios. Neste caso, não podemos precisar se tal processo é advindo da indução de tal processo ocasionado pela MOF ou se pertence à fisiologia normal do animal. Também não observamos alterações vasculares no tecido, provavelmente por não ser um órgão ligado diretamente a processos metabólicos ou de excreção como fígado e rins.

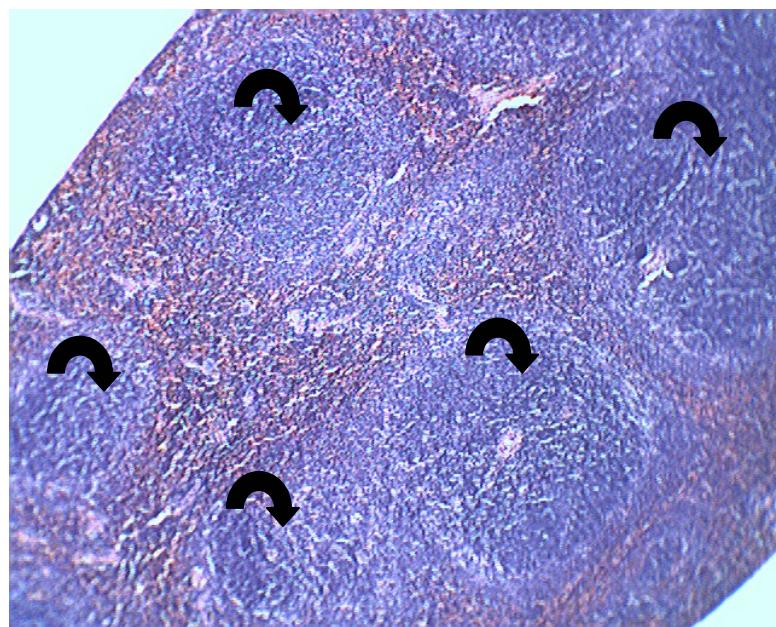


Figura 31. Fotomicrografia característica do baço coletado de animais que receberam MOF, mostrando nódulos linfáticos ativados (**setas curvas**): H.E., 100X.

Nas imagens referentes ao corte do tecido cardíaco (Figura 32) vemos alguns vasos da parede ventricular congestionados, mostrando que o coração também foi afetado no ensaio onde a MOF foi administrada⁷².

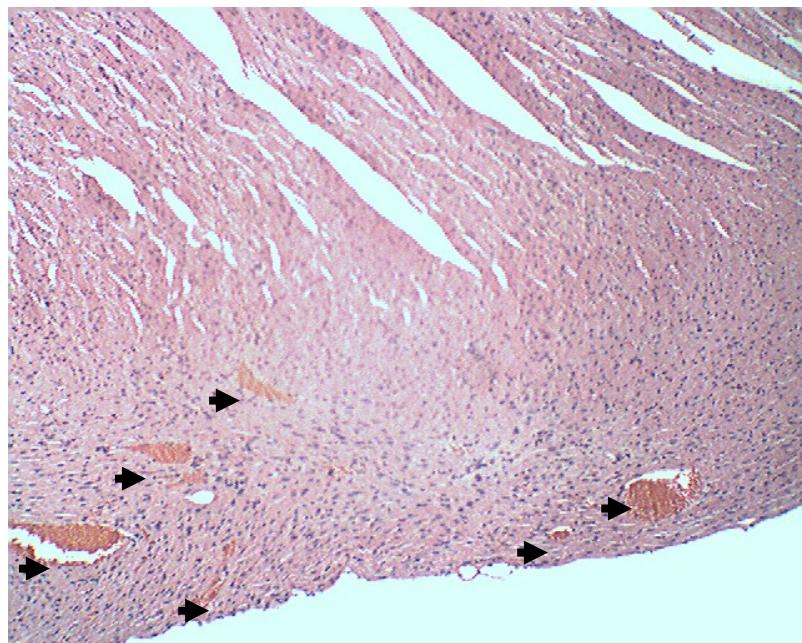


Figura 32. Fotomicrografia da parede ventricular do coração de animais submetidos à toxicidade aguda com MOF. Notar congestionamento vascular (**cabeça de seta**) entre as fibras cardíacas estriadas. H.E.: 100X.

4.1.10 Avaliação antitumoral *in vivo* do sistema MOF-6MP

Após os experimentos de avaliação antitumoral do sistema MOF-MP relativos aos ensaios com o sarcoma 180, foi realizada análise estatística mostrando significância na redução de volume do tumor apenas nos grupos G4 e G5 conforme apresentado na Tabela 8. Observamos que a MOF-Zn apresenta uma ação de inibição do crescimento do líquido ascítico duas vezes maior do que a MOF-A lavada e seca. Isso indica que a MOF-A atua em sinergismo com o zinco na diminuição do volume tumoral. Como foi visto que *in vitro* nenhuma das duas amostras apresentaram ação inibitória, é provável que o zinco presente na amostra esteja atuando no sistema imunológico dos animais, possibilitando uma redução tumoral. No caso do sistema MOF-6MP, nota-se que a ação inibitória da mesma e da droga sozinha foi a mesma, mostrando que a MOF-A não diminui a ação do fármaco no organismo.

Tabela 8. Relação dos grupos do experimento e volume tumoral do ensaio com sarcoma 180.

Tratamento	Volume do líquido ascítico (mL)	% inibição tumoral
Controle	6,4 ± 1,6	-
MOF-A	5,8 ± 0,8	9,4
MOF + Zn	5,2 ± 0,8	18,7
MP	3,8 ± 1,2	40,6
MOF -6MP	3,8 ± 1,1	40,6

Com relação ao número de células viáveis e de células totais, apenas G5 mostrou-se significativo em relação ao controle, o que leva a crer que o sistema MOF-6MP além de não ter apresentado toxicidade durante o tratamento, também foi mais eficiente do que o fármaco sozinho, uma vez que o sistema reduziu a viabilidade celular quando comparada ao controle (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação do ensaio antitumoral do sarcoma 180

Tratamento	Cél. Viáveis (N x 10 ⁷)	Cél. Mortas (N x 10 ⁷)	Células totais (N x 10 ⁷)	% inibição tumoral
Controle	12,5 ± 1,4	0,20 ± 0,01	12,68 ± 1,5	-
MOF	13,3 ± 1,4	0,19 ± 0,01	13,50 ± 1,5	-
MOF + Zn	10,6 ± 1,8	0,34 ± 0,1	10,8 ± 1,8	15,2
MP	9,8 ± 1,7	0,12 ± 0,02	9,94 ± 1,7	21,6
MOF-6MP	9,5 ± 1,3	0,15 ± 0,01	9,6 ± 1,4	24,0

Os dados representam a média ± desvio padrão (n=7). Os valores foram significativos para p < 0,05

Carcinoma de Ehrlich

Tumores ascíticos de Ehrlich foram implantados em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) e tratados com as seguintes substâncias: G1 controle, G2 MOF-A (sem lavar), G3 6MP, G4 sistema MOF-6MP 1:2 massa e G5 MOF-6MP 1:4 massa. Os volumes ascíticos medidos estão na Tabela 10.

Tabela 10. Avaliação da atividade antitumoral de carcinoma de Ehrlich

Grupos	Volume do líquido ascítico (mL)	% inibição tumoral
G1	6,8 ± 0,3	-
G2	4,0 ± 2,8	41,17
G3	7,5 ± 2,8	-
G4	4,1 ± 2,7	39,7
G5	1,0 ± 1,5	85,3

Os dados representam a média ± desvio padrão (n=7). Os valores foram significativos para p < 0,05

As análises estatísticas feitas pelo teste “t” de Student e Anova indicam que quando comparados ao grupo controle, o único grupo que não mostra significância na diminuição de volume do tumor ascítico foi o grupo tratado com a 6MP. Isso provavelmente se deve ao fato da droga ter uma baixa biodisponibilidade e pelo fato da mesma ser mais indicada para o tratamento de leucemia, câncer de origem conjuntiva, enquanto o carcinoma de Ehrlich é um tumor de origem epitelial. Quando a droga se encontra presente no sistema, existe ação farmacológica anteriormente nula, mostrando que a MOF-A permite a atuação da 6MP no carcinoma de Ehrlich. Este fato pode estar relacionado à proteção do fármaco de ser metabolizado pelas enzimas hepáticas, com isso aumentando sua concentração na corrente sanguínea. A MOF-A também apresentou ação antitumoral, provavelmente pelo zinco presente na rede, já que a mesma não passou pelo processo de lavagem. A inibição tumoral observada no G5, provavelmente se deve ao fato de sinergismo entre o zinco presente na MOF-A e o aumento da biodisponibilidade da droga no organismo. Esse resultado é um dos principais pontos para obtenção de um carreador eficiente, onde o mesmo melhora as propriedades de um fármaco já conhecido.

4.1.11 Avaliação histológica antitumoral carcinoma de Ehrlich

Nas avaliações dos tecidos dos animais submetidos aos ensaios antitumorais com o carcinoma de Ehrlich obtivemos os seguintes resultados descritos abaixo.

Nas Figuras de 33 a 37, observamos os cortes histológicos dos fígados dos animais dos respectivos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 (Figuras 33, 34, 35, 36 e 37 respectivamente). Podemos notar que o grupo que recebeu a MOF, mostra-se com alterações teciduais referentes a possíveis degenerações celulares como vacuolização citoplasmática. Também podemos notar uma grande atividade mitótica, causada possivelmente por uma dificuldade em metabolização da MOF. Praticamente as mesmas características apresentadas na toxicidade aguda, porém, a dose utilizada na toxicidade aguda foi 400 vezes maior que a utilizada no ensaio antitumoral, mostrando que a MOF apresenta toxicidade mesmo em pequenas concentrações no organismo. No grupo que

recebeu a 6MP, o tecido se mostrou saudável. No G5 e G4 que receberam o sistema MOF-6MP, podemos observar que praticamente não observamos alterações graves, diferentemente do G2. Uma provável explicação para o fato de a MOF sozinha ser bastante tóxica enquanto que quando a mesma se encontra associada ao fármaco não apresentar tanta toxicidade, pode ser uma possível mudança estrutural entre as duas. As duas estruturas distintas devem ter uma interação diferente quando entram em contato com o organismo onde a segunda não desencadeia processos degenerativos.

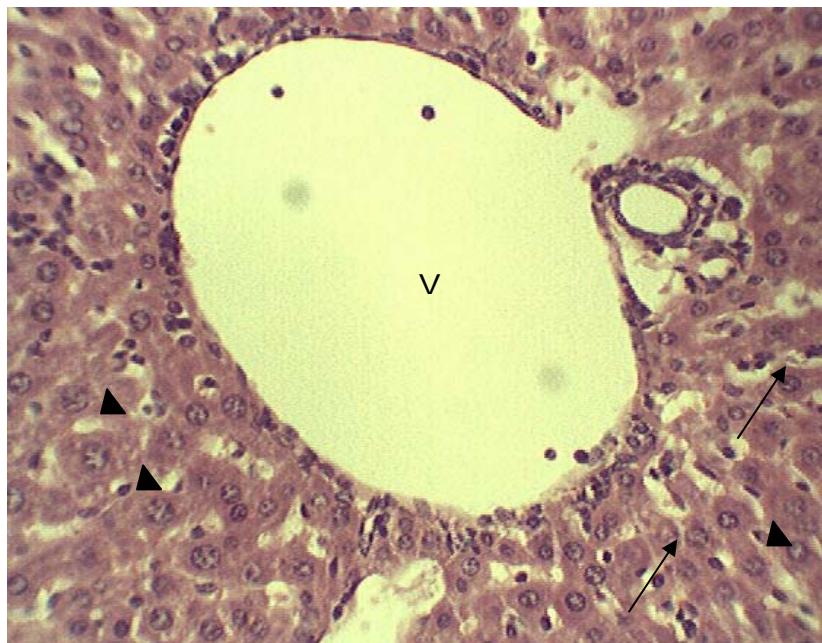


Figura 33. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G1 (controle): observamos veia centrolobular (v), hepatócitos (**cabeça de seta**) e capilares sinusóides (**seta fina**) preservados. H.E.: 200X.

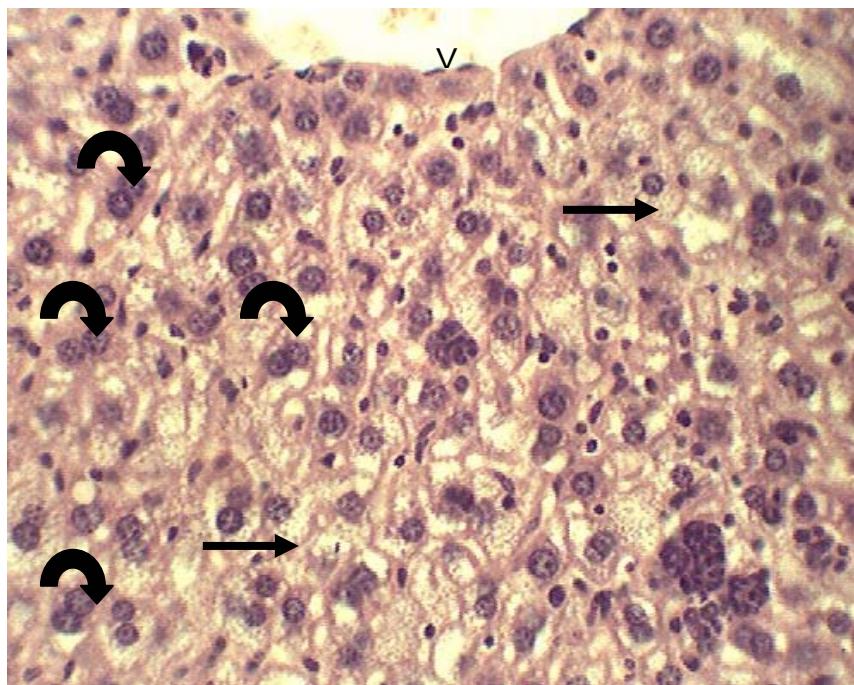


Figura 34. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G2 (MOF): observamos veia centrolobular (v), intensa atividade mitótica nos hepatócitos (setas curvas) e vacuolização citoplasmática (setas retas) preservados. H.E.: 200X.

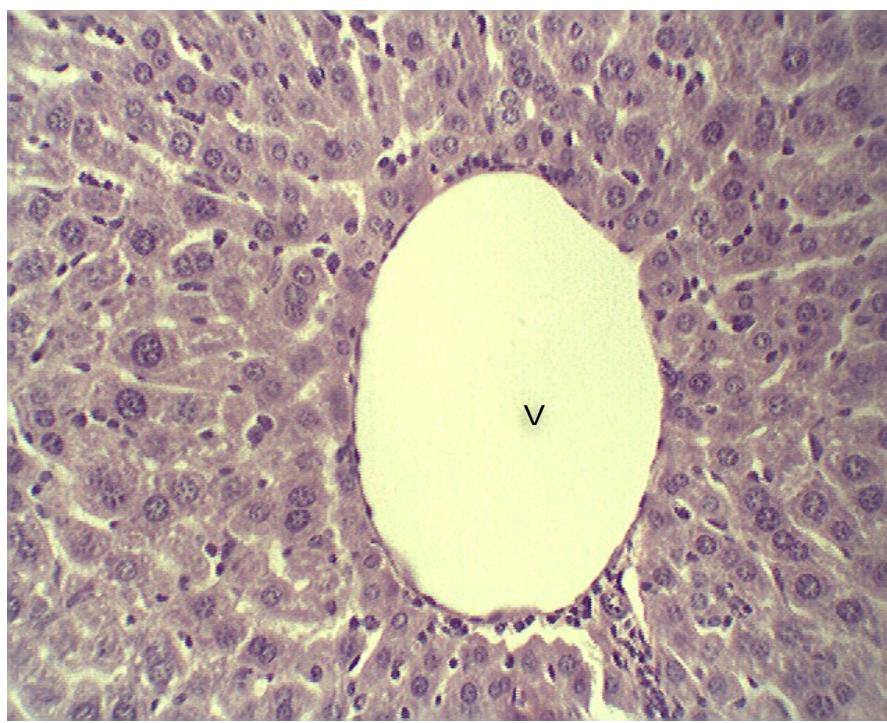


Figura 35. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G3 (6MP): observamos veia centrolobular (v), hepatócitos e capilares sinusóides preservados. H.E.: 200X.

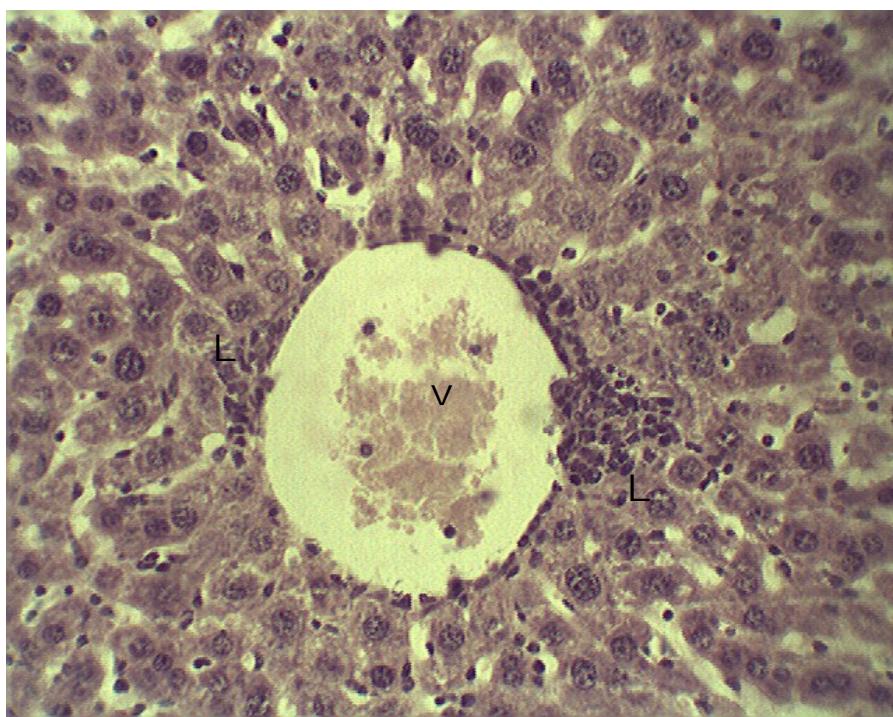


Figura 36. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G4 (MOF-6MP 1:2 em massa): observamos veia centrolobular (v), com infiltrado linfocitário perivasculares (L) Hepatócitos e capilares sinusóides preservados. H.E.: 200X.



Figura 37. Fotomicrografia do fígado de camundongos do Grupo G5 (MOF-6MP 1:4 em massa): observamos veia centrolobular (v), alguns hepatócitos com núcleos volumosos (seta curta). Capilares sinusóides preservados. H.E.: 100X.

Observamos nas seguintes imagens referentes ao baço, coração e rim dos grupos 1, 2, 3 (Figura 38), 4 e 5 (Figura 39). Os órgãos referentes aos grupos 1, 3, 4 e 5 não apresentam alterações teciduais severas enquanto o grupo que recebeu apenas a MOF apresenta várias alterações no rim, demonstrando uma toxicidade renal mesmo em pequenas concentrações da MOF em contato com o organismo. O coração, que no ensaio de toxicidade aguda apresentou congestionamento de vasos da parede ventricular, não apresentou alterações teciduais nesse ensaio antitumoral, mostrando com isso que a MOF não causa alterações ventriculares nessas concentrações.

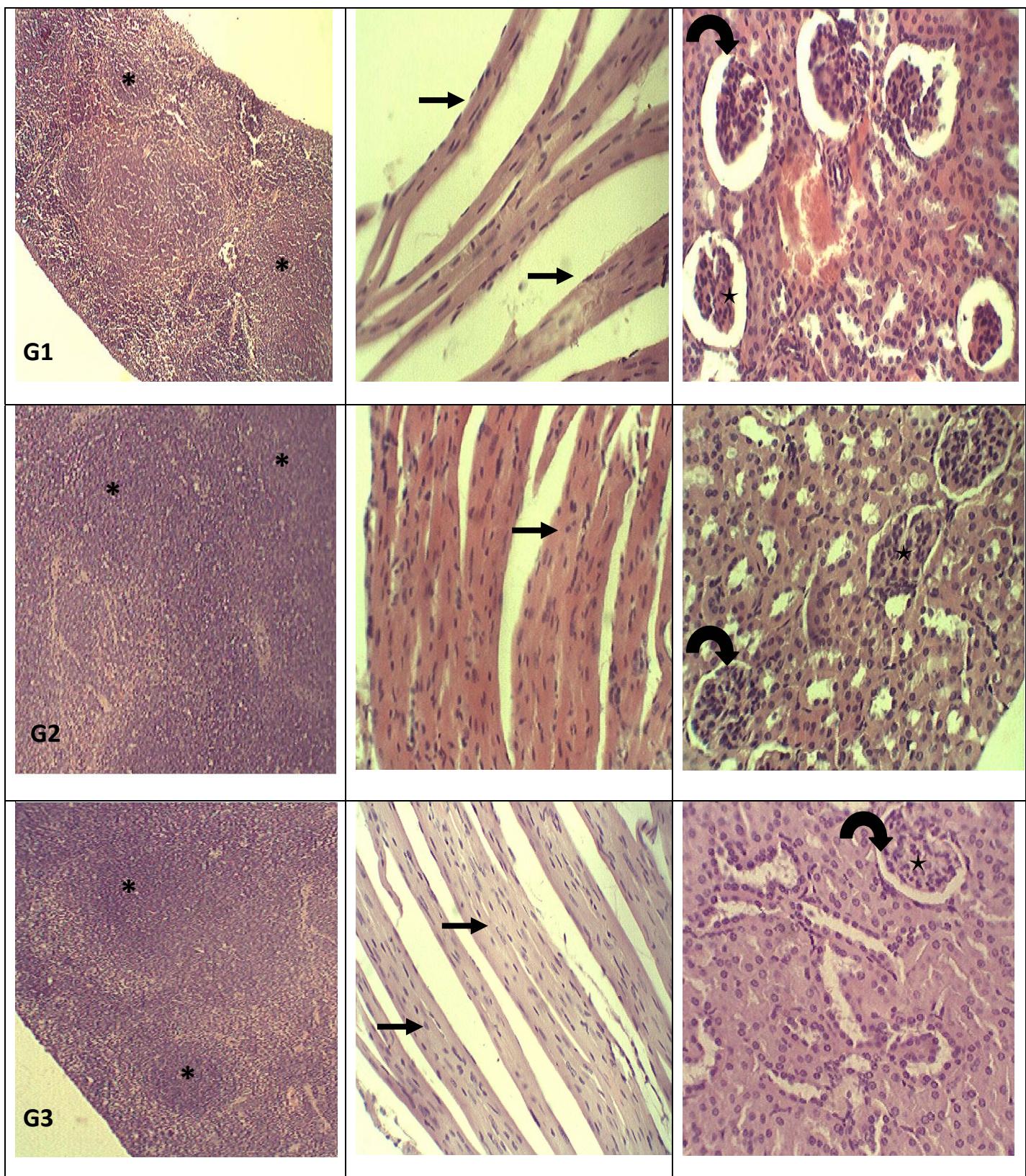


Figura 38. Fotomicrografias de órgãos (baço, coração e rins, respectivamente) de animais (grupos G1, G2 e G3). **Grupo G1:** baço sem alterações (presença de nódulos linfáticos*); coração com fibras cardíacas estriadas (setas) sem alterações e no rim observamos glomérulos renais (estrelas) com espaços subcapsulares preservados (seta curva). **Grupo G2:** observamos no rim evidente redução dos espaços

subcapsulares quando comparados ao controle, demais órgãos sem alterações.
Grupo G3: não observamos alterações nos órgãos avaliados. H.E.: 100X.

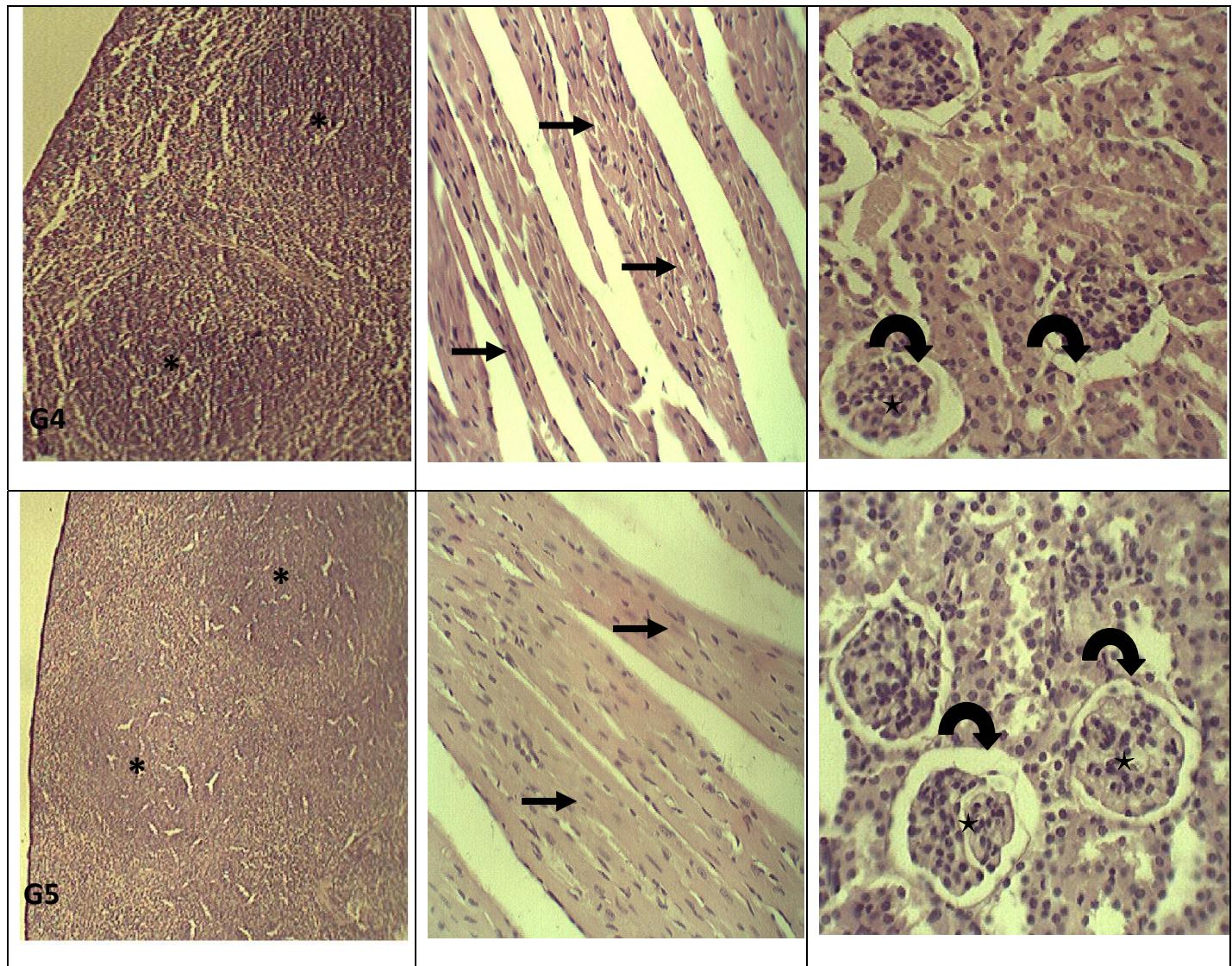


Figura 39. Fotomicrografias de órgãos (baço, coração e rins, respectivamente) representando os grupos G4 e G5. Grupo G4 e G5: baço sem alterações (presença de nódulos linfáticos); Coração com fibras cardíacas estriadas, sem alterações e no rim observamos glomérulos renais com espaços subcapsulares preservados. H.E.: 100X.

5.CONCLUSÕES

Podemos concluir que a MOF Zn(BDC)(H₂O)₂ foi obtida através de síntese solvotermal nas condições acima descritas. As condições onde a MOF apresentou uma morfologia mais uniforme foi quando a amostra foi preparada em concentrações cinco vezes menor que a preparação convencional. Este fato foi atestado pela microscopia eletrônica de varredura, onde se observou duas fases predominantes em tais amostras.

Também observamos que a MOF sintetizada em quaisquer das duas condições (normal ou em concentração cinco vezes menor) quando passa por processo de lavagem ou secagem, sua estrutura é alterada, mostrando que a água apresenta influência na formação da estrutura cristalina. Este fato pode ser ratificado pela técnica de difratometria de raios-x.

Através do experimento do perfil de liberação, podemos observar que a droga é liberada deste para o meio quando colocado em um meio que simula as condições iónicas do plasma sanguíneo, demonstrando assim, que a MOF apresenta condições de adsorção e liberação de um fármaco em determinado meio.

Corroboramos pelo ensaio antitumoral *in vitro* que a MOF não apresenta ação antumoral em linhagens de células tumorais de laringe e que nos sistemas MOF-MP inibem em média 40% crescimento dessas células, demonstrando assim que tais sistemas atuam toxicamente neste tipo de linhagem celular.

Através de ensaios de toxicidade aguda, podemos concluir que a MOF não desencadeou padrões comportamentais dignos de nota, na dose de 2000mg/kg. Porém, a análise histológica dos órgãos dos animais submetidos ao experimento demonstrou uma alta toxicidade tecidual no fígado, rim, coração e pulmão, causando alterações na fisiologia desses órgãos.

Concluímos que os sistema MOF-6MP nas proporções 1:1 e 1:2 em mol e 1:1, 1:2 e 1:4 em massa, apresentam atividade antitumoral em diferentes proporções em ensaios utilizando carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180.

Também concluímos que em relação a inibição do volume tumoral ascítico de carcinoma de Ehrlich, o sistema MOF-6MP 1:4 em massa demonstrou ser o mais eficiente. Com relação ao sarcoma 180, o mesmo sistema na proporção 1:1 massa se mostrou ser o mais eficiente tanto na redução do volume tumoral ascítico quanto na inibição do crescimento de células tumorais.

A avaliação histológica dos órgãos dos animais que foram submetidos aos ensaios antitumorais, demonstrou que a MOF sozinha se mostra tóxica aos órgãos estudados no ensaio mesmo em concentrações pequenas (5mg/kg). Este experimento também mostrou que a mesma quando se encontra no sistema praticamente não apresenta alterações teciduais sugerindo que a MOF após passar pelo processo de incorporação do fármaco altera suas propriedades e em contato com o organismo não desencadeia reações causadoras de alterações teciduais.

6.PERSPECTIVAS

- Estudar processos capazes de obtenção de apenas uma fase cristalina durante a preparação da MOF;
- Propor um mecanismo pelo qual a MOF altera sua morfologia quando submetidos a processos de lavagem e desidratação;
- Correlacionar o gráfico do perfil de liberação do fármaco do sistema com o tipo de cinética de liberação do sistema;
- Obter a estrutura cristalográfica da MOF e do sistema MOF-6MP através da técnica de difração de raios-x de monocristal;
- Realizar ensaios antitumorais in vitro com outras linhagens de células tumorais em diferentes concentrações do sistema;
- Avaliar as possíveis interações celulares da MOF e do sistema MOF-6MP;
- Estudar os mecanismos pelo qual a MOF-6MP atua no organismo e libera o fármaco do sistema;
- Realizar estudos antitumorais com carcinoma de Ehrlich utilizando para a averiguação de atividade inibitória a contagem de células dos tumores ascíticos.

7.REFERÊNCIAS

- 1.a) Kumar, V; Abbas, A. *Bases Patológicas das Doenças*, Rio de Janeiro-RJ; Ed. Elsevier. 7º edição. p.281, 2005.
- b)http://www.cancervic.org.au/about-cancer/for-schools/general_cancer
acessado em 10/04/2009
2. Hoffee, P. A.; *Genética Médica Molecular*, Rio de Janeiro-RJ; Ed. Guanabara Koogan. 1º edição. p.154-162, **2000**.
3. Karlson, P.; Gerok, W.; Gross, W. *Patobioquímica*. Ed. Guanabara Koogan; Rio de Janeiro-RJ, 3º edição. p.278, **1992**.
4. Brasileiro Filho, G.; Pittella, J. E. H.; Pereira, F. E. L.; Babirra, E. A.; Barbosa, A. J. A. *Bogliolo Patologia*, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 5ª edição, p153-186. **1994**.
5. Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Advanced drug delivery reviews*, 54, **2002**, 631-651.
6. Feng, S.S.; Chien, S. *Chemical engineering science*. 58, **2003**, 4087-4114.
7. Gerber, B.; Müller, H.; Reimer, T.; Krause, A.; Friese, K. *Breast Cancer Research and Treatment Publisher*. 79, **2003**, 265-276.
8. Glennie, M.J. de Winkel, G.J.V. *Drug Discovery Today*, 8, **2003**, 11.
9. Jain, R.K. *Journal of Controlled Release* 74, **2001**, 7–25.
10. Ooyama, A.; Oka, T.; Zhao, H; Yamamoto, M.; Akiyama, S.; Fukushima, M. *Cancer Letters* 267, **2008**, 26–36.
11. Chhabra, S.; Sachdeva, V.; Singh, S. *International Journal of Pharmaceutics*. 342, **2007**, 72-77.
12. Saltzman, W. M., *Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy*. Oxford University press, Inc., **2001**, p-30.
13. www.inca.gov.br acessado em 20/04/2009.

14. Rajk Kapoor, B.; Sankari, M.; Sumithra, M.; Anbu, J.; Harikrishnan, N.; Gobinath, M.; Suba, V.; Balaji, R. *Bioscience, Biotechnology and Biochemical*, 71, **2007**, 2177-2188.
15. Nanoparticle and target systems for cancer therapy, Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J.O. *Advanced drug delivery reviews*, 56, **2004** 1649-1659.
16. Dreher, M.R.; Raucher, D.; Balu, N.; Colvin, O.M.; Ludeman, S.M.; Chilkoti, A. *Journal of Controlled Release*. 91, **2003**, 31-43.
17. McCarron, P.A.; Hall, M. *International Journal of Pharmaceutics*. 348, **2008**, 115-124.
18. Kheirolomoom, A.; Ferrara, K.W. *Biomaterials* 28, **2007**, 4311-4320.
19. Wang, Y.; Chang, H.I.; Wertheim, D.F.; Jones, A.S.; Jackson, C.; Coombes, A.G.A. *Biomaterials*. 28, **2007**, 4619-4627.
20. Patnaik, S.; Sharma, A.K.; Garg, B.S.; Gandhi, R.P.; Gupta, K.C. *International Journal of Pharmaceutics*. 342, **2007**, 184-193.
21. Juzenas, P.; Chen, W.; Sun, Y. P.; Coelho, M. A. N.; Generalov, R.; Generalova, N.; Christensen, I. L. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, **2008**, 1600–1614.
22. Pedersen, M.; Bjerregaard, S.; Jacobsen, J.; Sørensen, A. M. *International Journal of Pharmaceutics* 176, **1998**, 121–131.
23. Regí, M. V.; Balas, F.; Arcos, D. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 46, **2007**, 7548-7558.
24. Nishiyama, N.; Morimoto, Y.; Jang, W-D.; Kataoka, K. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, **2009**, 327–338.
25. Liu, Y.; Her, J-H.; Dailly, A.; Ramirez-Cuesta, J. R.; Neumann, D. A.; Brown, C. M. *Journal of the American Chemical Society*, 130, **2008**, p 11813–11818.
25. http://denebola.if.usp.br/FisMatl/animacoes/dente_de_serra_1/dente_de_serra_11.html acessado em 18/03/2009.

26. Fraceto, L. F.; Gonçalves, M. M.; Moraes, C. M.; Araújo, D. R.; Zanella, L.; Paula, E. *Química. Nova*, 30, **2007**, 1203-1207.
27. Jacobsen, J.; van Deurs, B.; Pedersen, M; Rassing, M. R. *International Journal of Pharmaceutics* 125, **1995**, 165-184.
28. Jacobsen, J.; Bjerregaard, S.; Pedersen, M. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 48, **1999**, 217-224.
29. Pedersen, M.; Bjerregaard, S.; Jacobsen, J.; Larsen, A. R.; Sørensen, A. M. *International Journal of Pharmaceutics* ,165, **1998**, 57–68.
30. Rama, A. C. R.; Veiga, F; Figueiredo, I. V.; Sousa, A.; Caramona, M. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* , 41, **2005**, 115-119.
31. Influences of Material Characteristics on Ibuprofen Drug Loading and Release Profiles from Ordered Micro- and Mesoporous Silica Matrices. Andersson, J.; Rosenholm, J.; Areva, S.; Lindén, M. *Chemistry of Materials*. **2004**, 16, 4160-4167.
32. Fournier, E.; Passirani, C.; Montero-Menei, C. N.; Benoit, J. P. *Biomaterials* 24, **2003**, 3311-3331.
33. Klose, D.; Siepmann, F.; Elkharraz, K.; Siepmann, J. *International Journal of Pharmaceutics*, 354, **2008**, 95–103.
34. Fan, J.; Yu, C.; Gao, F.; Lei, J.; Tian, B.; Wang, L.; Luo, Q.; Tu, B.; Zhou, W.; Zhao, D. *Angewandte Chemie. Int. Ed.*, 42, **2003**, 3146 – 3150.
35. Cohen, S.M. *Current Opinion in Chemical Biology* , 11, **2007**,115-120.
36. Rowsell, J. L. C.; Yaghi, O. M. *Microporous and Mesoporous Materials*, 73 **2004**, 3–14.
37. Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. 38.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T. W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W.; McCullen, S. B.; Higgins, J. B.; Schlenker, J. L. *Journal of the American. Chemical Society*, 114, **1992**, 10834-10843.
39. James, S. L. *Chemical Society Review*, 32, **2003**, 276–288.

40. Yaghi, O. M.; O'Keeffe, M. *Journal of Solid State Chemistry*, 152, **2000**, 1-2.
41. Zhang, H. W.; Zhang, Z. Q.; Wang, L. *Current Applied Physics*, 9, **2009**, 750–754.
42. A. K.; Ting, T-W.; Chen, S-M. *Talanta*, 79, **2009**, 38–45.
43. Kitagawa, S.; Kitaura, R.; Noro, S-I. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 43, **2004**, 2334 –2375.
44. Horcajada, P.; Márquez- Alvarez, C.; Rámila, A.; Pérez-Pariente, J.; Regí, M. V. *Solid State Sciences* , 8 ,**2006**, 1459-1465.
45. Tao, Y; Kanoh, H.; Abrams, L.; Kaneko, K. *Chemical Reviews*, 106, **2006**, 896-910 896.
46. Cundy, C. S.; Cox, P. A. *Chemical Reviews*, 103, **2003**, 663-701.
47. Azas, T.; Pteilh, T. C.; Aussénac, F.; Baccile, N; Coelho, C.; Devoisselle, J. M.; Babonneau, F.; *Chemistry of Materials*; 26, **2006**, 6382-6390.
48. Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T. W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W.; McCullen, S. B.; Higgins, J. B.; Schlenker, J. L. *Journal of the American Society*, 114, **1992**, 10834-10843.
48. Janiak, C. *Dalton Trans.* **2003**. 2781-2804.
49. Férey, G. *Chemical Society Reviews*. 37, **2008**, 191–214.
50. Rowsell, J. L. C.; Yaghi, O. M. *Journal of the American Chemical Society*, 128, **2006**, 1304-1315.
51. Walton, K. S.; Snurr, R. Q. *Journal of the American Society*, 129, **2007**, 8552-8556.
52. Rosi, N. L.; Eckert, J.; Eddaoudi, M.; Vodak, D. T.; Kim, J.; O'Keeffe, M.; Yaghi, O. M. *Science*, 300, **2003**, 1127-1129.

53. <http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.ua.pt/dq/ReadImage.aspx%3Fobj%3D2935&imgrefurl> acessado em 28/04/2009
54. O'Keeffe, M.; Eddaoudi, M.; Li, H.; Reineke, T.; Yaghi, O. M. *Journal of Solid State Chemistry* 152, **2000**, 3-20.
55. Reticular synthesis and the design of new materials. Yaghi, O. M.; O'Keeffe, M.; Ockwig, N. W.; Chae, H. K.; Eddaoudi, M.; Kim, J. *Nature* , 2003, 423, 705-714.
56. A. R.; Yaghi, O. M. *Journal of the American Chemical Society*, 127, **2005**, 17998-17999.
57. Rosseinsky, M. J. *Microporous and Mesoporous Materials*, 73, **2004**, 15–30.
58. Patricia Horcajada, P.; Serre, C.; Maurin, G.; Ramsahye, N. A.; Balas, F.; Regi, M. V.; Sebban, M.; Taulelle, F.; Férey, G. *Journal of the American Chemical Society*, 130, **2008**, 6774–6780.
59. Anderson, J.; Rosenholm, J.; Areva, S.; Lindn, M. *Chemistry of Materials*, 16, **2004**, 4160-4167.
60. Horcajada, P.; Rámila, A.; Pariente, J. P.; Regí, M. V.; *Microporous and Mesoporous Materials*; 68, **2004**, 105-109.
61. Horcajada, P.; Serre, C.; Vallet-Regí, M.; Sebban, M.; Taulelle, F.; Férey, G. *Angewandte Chemie. Int. Ed*, 45, **2006**, 5974 –5978.
62. Llewellyn, P. L.; Maurin, G.; Devic, T.; Loera-Serna, S.; Rosenbach, N.; Serre, C.; Bourrelly, S.; Horcajada, P.; Filinchuk, Y.; Férey, G. *Journal of the American Chemical Society*, 130, **2008**, 12808–12814.
63. Piao, F.; Yokoyama, K.; Ma, N.; Yamauchi, T. *Toxicology Letters*, 145, **2003**, 28–35.
64. Li, H.; Eddaoudi, M.; O'Keeffe, M.; Yaghi, O. M. *Nature*, 402, **1999**, 276-279.

65. Chandrashekhar, N. S.; HIREMATH, S. R. R. *Biol. Pharm. Bull.* 31, **2008**, 656-661.
66. Wanderley, K. *Monografia de graduação*, Recife-Brasil, **2007**.
67. Alley, M. C.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, M. J.; Fine, D. L.; Abbott, B. J.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *Cancer Research*, 48, **1998**, 589-601.
68. Nakamoto, N. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Applications in Coordination, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*. 1997, página: 59-60.
69. Anokhima, E. V.; Zanda, M. V.; Wang, X.; Jacobson, J. *Journal of the American Chemical Society*, 127, **2005**, 15000-15001.
69. Schaate, A.; Klingelhöfer, S.; Behrens, P.; Wiebcke, M. *Crystal Growth & Design*, 8, 2008, 3200-3205.
70. H.J. Zhu, R.H. Hill, *Journal of Non-Crystalline Solids* 311, **2002**, 174–184.
71. Silverstein, R. M.; Webster, F. X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 6^a edição, editora LTC, Rio de Janeiro-RJ, 2000.
72. Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 11^a edição, **2008**.