

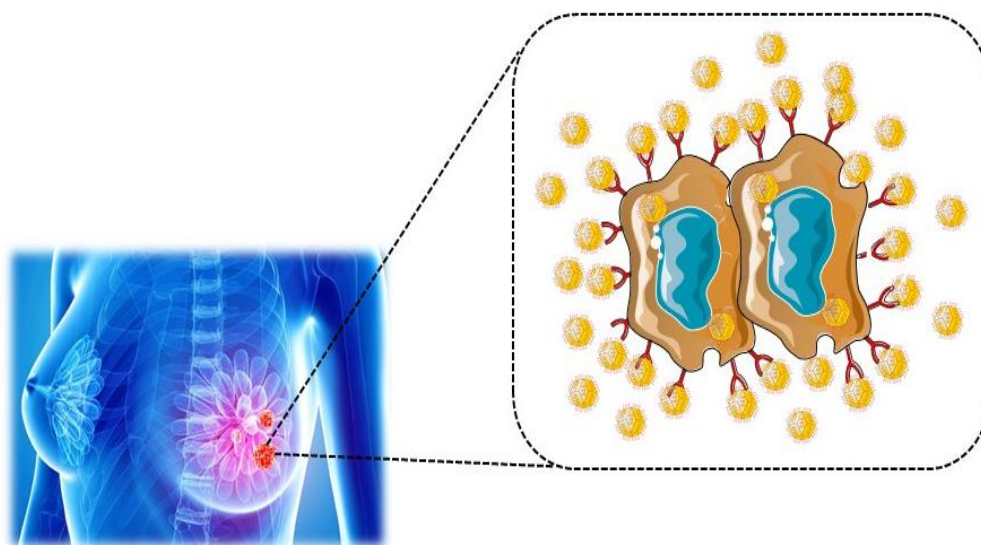


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA



Encapsulação de curcumina em bioMOF-100 funcionalizado com folato: desenvolvimento e avaliação do potencial no tratamento do câncer de mama



RENATA CAROLINA ALVES

Araraquara
2021

RENATA CAROLINA ALVES

Encapsulação de curcumina em bioMOF-100 funcionalizado com folato: desenvolvimento e avaliação do potencial no tratamento do câncer de mama

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli
Coorientadora: Profa. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Araraquara
2021

A474e Alves, Renata Carolina.
Encapsulação de curcumina em bioMOF-100 funcionalizado com folato: desenvolvimento e avaliação do potencial no tratamento do câncer de mama / Renata Carolina Alves. – Araraquara: [S.n.], 2021. 163 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa: Ciências.

Orientador: Marlus Chorilli.
Coorientadora: Regina Célia Galvão Frem.

1. Câncer. 2. Sistemas de Liberação. 3. bioMOFs. 4. Curcumina. 5. Funcionalização. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Frem, Regina Célia Galvão, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Encapsulação de curcumina em bioMOF-100 funcionalizado com folato: desenvolvimento e avaliação do potencial no tratamento do câncer de mama

AUTORA: RENATA CAROLINA ALVES

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

COORIENTADORA: REGINA CÉLIA GALVÃO FREM

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. MÁRCIA REGINA COMINETTI (Participação Virtual)
Departamento de Gerontologia / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UFSCar - São Carlos

Prof. Dr. RICARDO BENTES DE AZEVEDO (Participação Virtual)
Departamento de Genética e Morfologia / Universidade de Brasília

Prof. Dr. SEVERINO ALVES JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Química Fundamental / Centro de Ciências Exatas e da Natureza - UFPE - Recife

Araraquara, 12 de novembro de 2021

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Renata Carolina Alves

Data de Nascimento: 27 de maio de 1988

Naturalidade: São Carlos – SP

Nacionalidade: Brasileira

Filiação: Pai: Valdecir Alves Junior Mãe: Gislaine Cristina Nóbrega Alves

Nome em citações bibliográficas: Alves, R. C.

Endereço profissional

Departamento de Medicamentos e Fármacos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Rodovia Araraquara – Jaú Km 01, Campus Ville, CEP: 14800-903 – Araraquara, SP

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2017-2021: Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Farmacotécnica.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Tese: Encapsulação de curcumina em bioMOF-100 funcionalizado com folato: desenvolvimento e avaliação do potencial no tratamento do câncer de mama.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Bolsa: FAPESP Número do Processo: 2017/26065-2

Abril de 2019: Licenciatura em Química

Faculdade Mozarteum de São Paulo.

Maior - Novembro de 2019: Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE)

Área de Concentração: Development of design strategies and synthetic methodology for porous materials.

University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania.

Projeto: Surface modification with folic acid in a curcumin-loaded mesoporous Metal-Organic Frameworks by “click” reactions.

Orientadores: Prof. Dr. Marlus Chorilli (Brasil) e Prof. Dr. Nathaniel L. Rosi (Estados Unidos).

Bolsa: FAPESP Número do Processo: 2018/26405-0

2015-2017: Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Inorgânica.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IQ-UNESP, Araraquara.

Dissertação: Síntese e caracterização de BioMOFs (*Metal Organic Frameworks* Biocompatíveis) para incorporação de fármacos.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Bolsa: CAPES.

2009-2014: Bacharelado em Química com ênfase tecnológica.

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar

Monografia: Toxicidade de metais em brinquedos.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

01. ALVES, R. C.; SHULTE, Z. M.; LUIZ, M. T.; SILVA, P. B.; FREM, R. C. G.; ROSI, N. L.; CHORILLI, M. Breast cancer targeting of a drug delivery system through postsynthetic modification of curcumin@N₃-bio-MOF-100 via click chemistry. *Inorganic Chemistry*, v. 60, p. 11739-11744, 2021.
02. QUIJA, C. R.; ALVES, R. C.; HANCK-SILVA, G.; FREM, R. C. G.; ARROYOS, G.; CHORILLI, M. Metal-organic frameworks for diagnosis and therapy of infectious diseases. *Critical Reviews in Microbiology*, Ahead-of-print, p.1-36, 2021.
03. QUIJA, C. R.; LIMA, C.; SILVA, C.; ALVES, R. C.; FREM, R.; CHORILLI, M. Application of MIL-100 (Fe) in drug delivery and biomedicine. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 61, n. 102217, p. 1-17, 2021.
04. SILVA, P. B.; ARAÚJO, V. H. S.; FONSECA-SANTOS, B.; SOLCIA, M. C.; RIBEIRO, C. M.; SILVA, I. C.; ALVES, R. C.; PIRONI, A. M.; SILVA, A. C. L.; VICTORELLI, F. D.; FERNANDES, M. A.; FERREIRA, P. S.; SILVA, G. H.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M. Highlights regarding the use of metallic nanoparticles against pathogens considered a priority by the world health organization. *Current Medicinal Chemistry*, v. 28, p. 1906-1956, 2021.

05. LUIZ, M. T.; DI FILIPPO, L. D.; ALVES, R. C.; ARAÚJO, V. H. S.; DUARTE, J. L.; MARCHETTI, J. M.; CHORILLI, M. The use of TPGS in drug delivery systems to overcome biological barriers. *European Polymer Journal*. V. 142, n. 110129, p. 1-15, 2021.
06. ALVES, R. C.; LUCENA, G. N.; FARIAS, R. L.; SILVA, P. B.; SILVA, I. C.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; FERREIRA, A. M. C.; FREM, R. C. G. Copper (II) biocompatible coordination solids as potential platforms for diclofenac delivery systems. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 289, n. 121479, p.1-8, 2020.
07. ALVES, R. C.; FERNANDES, R. P.; FONSECA-SANTOS, B.; VICTORELLI, F. D.; CHORILLI, M. A critical review of the properties and analytical methods for the determination of curcumin in biological and pharmaceutical matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 49, n. 2, p. 138-149, 2019.
08. OSHIRO-JÚNIOR, J.; ALVES, R. C.; SILVA, G. H.; SATO, M. R.; RODERO, C.; ELOY, J. O.; CHORILLI, M. Stimuli-responsive drug delivery nanocarriers in the treatment of breast cancer. *Current Medicinal Chemistry*, v. 26, p. 1-19, 2019.
09. SILVA, P. B.; MACHADO, R. T. A.; PIRONI, A. M.; ALVES, R. C.; ARAÚJO, P. R.; DRAGALZEW, A. C.; DALBERTO, I.; CHORILLI, M. Recent advances in the use of metallic nanoparticles with antitumoral action – review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 26, p. 2108-2146, 2019.
10. LUCENA, G. N.; ALVES, R. C.; ABUÇAFY, M. P.; CHIAVACCI, L. A.; SILVA, I. C.; PAVAN, F. R.; FREM, R. C. G. Zn-based porous coordination solid as diclofenac sodium carrier. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 260, p. 67-72, 2018.
11. FREM, R. C. G.; ARROYOS, G.; FLOR, J. B. S.; ALVES, R. C.; LUCENA, G. N.; SILVA, C. M.; COURA, M. F.; MOFs (Metal-Organic Frameworks): uma fascinante classe de materiais inorgânicos porosos. *Química Nova*, v. 41, n. 10, p. 1178-1191, 2018.
12. ALVES, R. C.; FERNANDES, R. P.; ELOY, J. O.; SALGADO, H. R. N.; CHORILLI, M. Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 48, n. 2, p. 110-118, 2018.
13. CAETANO-SILVA, M. E.; ALVES, R. C.; LUCENA, G. N.; FREM, R. C. G.; BERTOLDO-PACHECO, M. T.; LIMA-PALLONE, J. A.; NETTO, F. M. Synthesis of whey peptide-iron complexes: influence of using different iron precursor compounds. *Food Research International*, v. 101, p. 73-81, 2017.

Capítulo de livro

01. FREM, R. C. G.; ALVES, R. C.; LUCENA, G. N.; ARROYOS, G.; FLOR, J. B. S.; FÁVARO, M. A.; COURA, M. F. **The Fascinating Chemistry of MOFs**. IN: Recent Advances in Complex Functional Materials. From Design to Application. Editors: Longo, Elson, La Porta, Felipe de Almeida (Eds.) Springer, 2017. 615p. ISBN 978-3-319-53898-3.

Patente

01. MANSUR, M. T. M. N.; SILVA, M. F. G. F.; ALVES, R. C.; GONÇALVES, D. M.; OLIVEIRA, K. R. P. Método de avaliação da atividade antimicrobiana de uma composição sobre fitopatógenos e composição antibacteriana. Situação: depositada.

Apresentações de trabalhos

01. ALVES, R. C.; FREM, R. C. G.; CHORILLI, M. Curcumin incorporated in a bMOF-100 progenitor for evaluation in breast cancer treatment. In: XIX BMIC, Fortaleza, 2018.

02. ALVES, R.C.; FREM, R. C. G.; LUCENA, G. N. Drug delivery of diclofenac sodium by Zn(II)-based BioMOF. In: XVIII BMIC, Hotel Colina Verde – São Pedro, 2016.

03. ALVES, R.C.; FREM, R. C. G.; LUCENA, G. N. Cu(II) cluster based on mixed ligands for drug delivery of diclofenac sodium. In: XVIII BMIC, Hotel Colina Verde – São Pedro, 2016.

04. ALVES, R. C.; FREM, R. C. G.; LUCENA, G. N. Synthesis, characterization and luminescent properties of a Bio-Metal Organic Framework based on adenine ligand. In: Workshop Australia-Unesp: building a task force on materials for life, Araraquara, 2015.

05. ALVES, R. C.; SILVA, M. M.; BATISTA, A. A.; DINELLI, L. R. Eletrodo modificado com a supramolécula{Zn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄} aplicado na detecção de dopamina. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2012.

06. ALVES, R. C.; SILVA, M. M.; BATISTA, A. A.; DINELLI, L. R. Eletrodo de pasta de carbono modificado com a supramolécula{Mn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄}CH₃COO, aplicado na detecção do sildenafil (Viagra). In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2012.

Participação em eventos científicos

01. JACS in Session with ACS Applied Materials & Interfaces and Inorganic Chemistry on the topic of Metal-Organic Frameworks: Outlooks and Opportunities. ACS webinar, on Tuesday June 8, 2021.

02. Metal-Chelate Chemistry and its Impact on Molecular Imaging & Other Diseases, seminar presented by Professor Carolyn Anderson – University of Pittsburgh. Chevron 150 – University of Pittsburgh. September 19, 2019.

03. Innovating Bimetallic Active Sites for Small Molecule Activation, seminar presented by Professor Connie Lu – University of Minnesota. Chevron 150 – University of Pittsburgh. October 24, 2019.

04. XIX Brazilian Meeting in Inorganic Chemistry (BMIC), realizado no período de 24 a 28 de setembro de 2018, Fortaleza, 2018.

05. XVIII Brazilian Meeting in Inorganic Chemistry (BMIC), realizado no período de 25 a 30 de setembro de 2016, Hotel Colina Verde – São Pedro, 2016.

06. Workshop Austrália-Unesp: Materials for Life, realizado no dia 16 de julho de 2015, Instituto de Química, UNESP-Araraquara.
07. Workshop Internacional Year of Light, realizado no dia 5 de março de 2015, Instituto de Química, UNESP-Araraquara.
08. XVII Disciplina Intersemestral “Química Forense: Uma análise prática da Química que soluciona crimes”, realizado no período de 04 a 08 de fevereiro de 2013, Departamento de Química da FFCLRP/USP, Campus de Ribeirão Preto.
09. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizado no período de 28 a 31 de maio de 2012, Águas de Lindóia.
10. VIII Semana da Química, realizado no período de 01 a 05 de agosto de 2011, Departamento de Química, UFSCar - São Carlos.

4. ESTÁGIOS E BOLSAS

Bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) durante o doutorado, realizado no período de julho de 2018 a setembro de 2021.

Bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) durante o mestrado, realizado no período de março de 2015 a março de 2017.

Estágio curricular obrigatório na empresa Faber – Castell (São Carlos – SP), realizado no período de dezembro de 2013 a junho de 2014.

Bolsa no Programa de Educação Tutorial – PET concedida pelo MEC de janeiro de 2010 a novembro de 2013.

Estágio não obrigatório na empresa Dissoltex Indústria Química LTDA (São Carlos – SP), realizado no período de janeiro a fevereiro de 2011.

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Professora particular de Química na escola Maquifísica (São Carlos – SP), outubro de 2014 a dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais (Gislaine Cristina Nóbrega Alves e Valdecir Alves Júnior) por todo carinho, empenho e por sempre me incentivarem nos meus sonhos e nunca me deixarem desistir nos momentos mais difíceis nos quais eu queria desistir.

Ao meu marido Richard por ser esse companheiro de vida, meu melhor amigo e por estar sempre ao meu lado me incentivando, mesmo que isso seja ficar no laboratório comigo até às 4 h da manhã.

Ao Prof. Marlus Chorilli por ter acreditado em mim e no meu potencial, e fazer com que eu deixasse de lado minha insegurança fazendo com que eu crescesse profissionalmente. E por ser além de meu orientador, meu amigo, para me pedir calma quando tudo estava dando errado e me fizesse ver com mais clareza como poderia solucionar os problemas.

“O verdadeiro heroísmo consiste em persistir por mais um momento, quando tudo parece perdido”.

W. F. Grenfel

AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigado....

Aos meus pais Valdecir e Gislaine e irmã Fernanda, por todo apoio, carinho, admiração, horas de conselhos e por me darem coragem de prosseguir e nunca desistir dos meus sonhos e objetivos.

Ao meu marido por estar sempre presente, apoiando, incentivando e torcendo por mim. E mesmo nos momentos difíceis me incentivar para que eu conquistasse meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marlus Chorilli pela orientação, amizade, ensinamentos, colaboração científica e, principalmente, por sempre acreditar no meu potencial, me impulsionando a buscar o meu melhor.

À minha coorientadora, Prof. Dr. Regina Célia Galvão Frem pela orientação, amizade e ensinamentos adquiridos na área de MOFs.

Ao Instituto de Química da UNESP pela infraestrutura oferecida.

Aos técnicos que sempre me auxiliaram quando preciso, em especial ao técnico Rafael Romano, por toda a paciência e rapidez com as análises.

Ao grupo LATIG (análise térmica) pela realização das medidas de TG-DSC.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e seus alunos (Raquel Santos Faria, Amanda Alencar Cabral Moraes, José Athayde Vasconcelos Moraes e Henrique Loback Lopes de Araújo) da Universidade de Brasília – UnB pela parceria estabelecida e pela disponibilidade de realização dos experimentos in vitro e in vivo.

Ao Prof. Dr. Nathaniel L. Rosi por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Pittsburgh, e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao grupo de pesquisa Applied MOFs e colegas de trabalho pela parceria e convívio no dia a dia.

Ao pós- doutorando Renan Lira de Farias pelos estudos computacionais para a proposição da estrutura do RCA.

A minha grande amiga e colaboradora científica Patrícia Bento, pela amizade incondicional, parceria de trabalhos, ombro amigo quando tudo parecia perdido e por sempre estar ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Aos meus amigos Guilherme e Jader por sempre estarem comigo, me incentivando e apoiando. Pelas risadas e choros compartilhados. Sem sombra de dúvidas vocês deixavam o meu dia a dia mais leve.

As agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento que viabilizou a realização desta tese.

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida durante todo o doutorando, possibilitando realização de estudos no país (número do processo: 2017/26065-2) e no exterior (número do processo: 2018/26405-0), que foi de fundamental importância para que o trabalho fosse concluído.

Enfim, meu muito obrigado a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

O câncer é um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, resultando na formação de um novo tecido chamado de tumor maligno. O câncer de mama é o mais incidente e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres, representando a quinta causa de morte por câncer em geral. Tumores de mama triplo negativos, que não apresentam os marcadores tradicionais de câncer de mama, são considerados os mais agressivos e não dispõem de terapia específica, sendo utilizada a quimioterapia convencional, associada a diversos efeitos colaterais e baixa especificidade. Com o intuito de tentar melhorar essas limitações da terapia tradicional, há uma busca crescente no desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer de mama, utilizando por exemplo, sistemas de liberação de fármacos. Dentre os diversos sistemas estudados, *Biocompatible Metal Organic Frameworks* (bioMOFs), ou seja, polímeros de coordenação, podem ser promissores e atrativos para incorporação e liberação de fármacos devido à sua área superficial e tamanhos de poros relativamente elevados, biodegradabilidade intrínseca e possibilidade de funcionalização pós-síntese. Dentro deste contexto, o objetivo desta tese foi desenvolver dois novos sistemas carreadores de fármacos (RCA e bioMOF-101) contendo curcumina incorporada, cuja superfície destes materiais foi revestida com moléculas de ácido fólico, a fim de promover o direcionamento destes sistemas até a região tumoral. Ambos os sistemas carreadores RCA e bioMOF-101 foram sintetizados e caracterizados empregando diversas técnicas de caracterização, como: espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG), difração de raios-X de pó (DRX-pó), análise térmica (TG-DSC), microscopia óptica de luz polarizada e análise elementar. Após as caracterizações ambos os materiais foram submetidos à ensaios de encapsulação do fármaco, cujas eficiências de encapsulação foram de 32,80% para o CCM@RCA-1D e 99,42% para a CCM@bioMOF-101-1D. A partir da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H foi possível verificar o aparecimento de sinais referentes ao ácido fólico, sugerindo sucesso na funcionalização destas matrizes. Os materiais com e sem ácido fólico foram submetidos à ensaios de liberação do fármaco em pH dependente. Com esses ensaios foi possível verificar que ambas as matrizes apresentaram taxas de liberação maiores em pH ácido. Testes *in vitro*, como viabilidade celular e tipo de morte celular foram avaliados em ambas as séries de compostos (CCM@RCA-1D, CCM@RCA-1D/FA, CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA) em linhagens tumorais de mama (MCF-7, 4T1, MDA-MB-231) e linhagem normal (NHI/3T3). Os resultados

revelaram uma baixa toxicidade dos materiais e morte celular por apoptose tardia. Estudos *in vivo*, foram realizados com os compostos CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA e apesar de não apresentarem uma redução na região tumoral, o composto CCM@bioMOF-101-1D/FA revelou uma redução no volume alveolar, sendo este um indicativo de sua eficácia frente ao modelo testado. Assim, esses resultados indicam que as matrizes estudadas podem ser carreadores promissores no tratamento do câncer de mama.

Palavras Chave: Câncer, Sistemas de Liberação, bioMOFs, Curcumina, Funcionalização.

ABSTRACT

Cancer is a group of diseases that have in common the disordered growth of cells, resulting in the formation of new tissue called a malignant tumor. Breast cancer is the most incident and the most frequent cause of cancer death in women, representing the fifth leading cause of cancer death overall. Triple negative breast tumors, which do not have the traditional breast cancer markers, are considered the most aggressive and do not have specific therapy, being used conventional chemotherapy, associated with several side effects and low specificity. In order to try to improve these limitations of traditional therapy, there is a growing search for the development of new treatments for breast cancer, using, for example, drug delivery systems. Among the various systems studied, Biocompatible Metal Organic Frameworks (bioMOFs), that is, coordination polymers, can be promising and attractive for drug incorporation and release due to their relatively high surface area and pore sizes, intrinsic biodegradability and possibility of functionalization post-synthesis. Within this context, the objective of this thesis was to develop two new drug carrier systems (RCA and bioMOF-101) containing incorporated curcumin, whose surface of these materials was coated with folic acid molecules, in order to promote the targeting of these systems to the region tumor. Both RCA and bioMOF-101 carrier systems were synthesized and characterized using various characterization techniques, such as: infrared vibrational spectroscopy (FTIR), high resolution electron microscopy (FEG-SEM), powder X-ray diffraction (PXRD), thermal analysis (TG-DSC), polarized light optical microscopy and elemental analysis. After the characterizations, both materials were submitted to drug encapsulation tests, whose encapsulation efficiencies were 32.80% for CCM@RCA-1D and 99.42% for CCM@bioMOF-101-1D. From the ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy technique, it was possible to verify the appearance of signals referring to folic acid, suggesting success in the functionalization of these matrices. The materials with and without folic acid were submitted to drug release tests at dependent pH. With these tests it was possible to verify that both matrices presented higher release rates in acidic pH. In vitro tests such as cell viability and type of cell death were evaluated in both series of compounds (CCM@RCA-1D, CCM@RCA-1D/FA, CCM@bioMOF-101-1D and CCM@bioMOF-101-1D /FA) in breast tumor cell lines (MCF-7, 4T1, MDA-MB-231) and normal cell line (NHI/3T3). The results revealed a low toxicity of the materials and cell death by late apoptosis. In vivo studies were performed with the compounds CCM@bioMOF-101-1D and CCM@bioMOF-101-1D/FA and despite not showing a reduction in the tumor region, the

compound CCM@bioMOF-101-1D/FA revealed a reduction in alveolar volume, which is an indication of its effectiveness against the tested model. Thus, these results indicate that the studied matrices can be promising carriers in the treatment of breast cancer.

Keywords: Cancer, Drug Delivery Systems, BioMOFs, Curcumin, Functionalization.

LISTA DE ABREVIACÕES

NDC	Ácido 2,6-naftaleno dicarboxílico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FA	Ácido fólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPDC	Ácido 4-4'-Bifenildicarboxílico
MCF-7	Adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário humano
4T1	Adenocarcinoma mamário murino
ALT	Alanina aminotransferase
CSD	Cambridge Structural Database
CV	Coeficiente de variação
IC ₅₀	Concentração inibitória média
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector" photodiodearray"
CCM	Curcumina
DO	Densidade óptica
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRX	Difração de raios-X de pó
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
EE	Eficiência de encapsulação
FTIR	Espectroscopia vibracional no infravermelho
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
NIH/3T3	Fibroblasto embrionário murino
FDA	Food and Drug Administration
MCH	Hemoglobina corpuscular média
IS	Índices de seletividade
ICSD	Inorganic Crystal Structure Database
INCA	Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva
PI	Iodeto de propídeo
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MCA	Medicina complementar e alternativa
MOFs	Metal-Organic Frameworks
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução
EDC	N-[3-(dimetilamino) propil] -3- etilcarbodiimida
NHS	N-hidroxissuccinimida

RCA	Protótipo da bioMOF-100
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
HER2	Receptor epidermal humano 2
SBU	Secondary building units
TG-DSC	Simultaneous thermogravimetry and differential scanning calorimetry
TC	Tomografia computadorizada
RE-/RP-/HER2-	Triplo negativo
RE+/RP+/HER2+	Triplo positivo
MCV	Volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa do número de novos casos de câncer por sexo, no Brasil no triênio 2020-2022.	33
Figura 2. Representação da estrutura química da curcumina.	35
Figura 3. Principais tipos de sistemas de liberação de fármacos estudados para a terapia do câncer.	37
Figura 4. Organização dos vértices metálicos em complexos discretos e MOFs.	38
Figura 5. Diferentes estratégias para a utilização de MOFs como sistemas de liberação de fármacos: 1) fármaco adsorvido nos poros da MOF; 2) fármaco como ligante orgânico constituinte da própria estrutura do material; 3) fármaco localizado na superfície da MOF. ..	40
Figura 6. Estrutura química do ácido fólico.	43
Figura 7. Espectro vibracional no infravermelho do composto obtido.	54
Figura 8. Perfis de difração de raios-X de pó para a bioMOF-100: simulado pelo ICSD (número da ficha: 833315), sólido obtido tal como sintetizado (RCA) e ativado (RCA-1).	56
Figura 9. Microscopia óptica de luz polarizada dos compostos solvatados: A) bioMOF-100, B) RCA.	57
Figura 10. Imagens MEV-FEG do composto sintetizado.	58
Figura 11. Curvas TG-DSC obtidas para o RCA.	59
Figura 12. Curvas TG-DSC obtidas para o RCA-1.	60
Figura 13. (a) Fragmento de repetição da BioMOF-100 utilizando como modelo 3D de entrada para geração de confôrmeros. (b) Conjunto dos 67 confôrmeros gerados a partir da subunidade de repetição da bioMOF-100 (CCDC 833315). Na figura, íons de Zn (II) estão representados em cor roxa, átomos de N em azul, átomos de C em verde, átomos de O em vermelho e átomos de H em branco.	63
Figura 14. Estrutura expandida do polímero de coordenação a partir do confôrmero 19. Visão dos canais largos ao longo das direções [110] (esquerda) e [101] centro. Visão do polímero ao longo do eixo cristalográfico c.	64

Figura 15. Representação da estrutura cristalina simulada da bioMOF-100, a qual dispõe de 85,5% de voids por cela unitária. A sonda utilizada consistiu em uma molécula esférica de H ₂ (g) no estado gasoso, contendo 1,2 Å de raio.....	65
Figura 16. (a-b) cavidades acessíveis referentes aos canais de solventes existentes ao longo da direção cristalográfica [110]......	66
Figura 17. Pose de ancoragem melhor pontuada para uma molécula de solvente DMF hospedada em um dos canais da estrutura simulada para a bioMOF-100. Todos os átomos de hidrogênio não polares foram suprimidos para melhor visualização. Na pose, os átomos de C estão representados em verde, átomos de N em azul, átomos de O em vermelho, íons de Zn (II) em cinza e átomos de H em branco. Os contatos intermoleculares estão representados por linhas tracejadas de cor preta.	67
Figura 18. Isoterma de fisissorção de N ₂ para o composto ativado (RCA-1)..	68
Figura 19. (a) Isoterma de adsorção de N ₂ para o composto CPP-9; (b) Isoterma de CO ₂ para o composto CPP-9.	69
Figura 20. Padrão de difração de raios-X de pó para o RCA-1, CCM@RCA-1D e CCM@RCA-3D.	71
Figura 21. Padrão de difração de raios-X de pó da CCM livre e da amostra CCM@RCA-3D	72
Figura 22. Imagens de MEV-FEG para RCA: A) antes da incorporação de CCM; B) CCM@RCA-1D; C) CCM@RCA-3D.	73
Figura 23. Espectros vibracionais no infravermelho dos compostos RCA-1, CCM livre e CCM@RCA-1D.	74
Figura 24. Curvas TG-DSC para o composto CCM@RCA-1D.	75
Figura 25. Curvas TG-DSC da CCM.	76
Figura 26. Representação das moléculas de FA na superfície da matriz contendo o fármaco.	77
Figura 27. Espectros de RMN de ¹ H para os compostos RCA, CCM, CCM@RCA-1D, FA e CCM@RCA-1D/FA, em dmsd-d ₆	78
Figura 28. Perfil de liberação da CCM nas amostras do composto RCA.	79

Figura 29. Gráfico representativo do mecanismo de morte celular dos compostos CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D /FA para linhagem celular MCF-7.....	85
Figura 30. Gráfico representativo do mecanismo de morte celular dos compostos CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D /FA na linhagem celular 4T1.	86
Figura 31. Delineamento experimental. Sendo, (s.c.) subcutâneo; (i.p.) intraperitoneal; (D1-6) dias de administração dos tratamentos; (D7) eutanásia.	96
Figura 32. Espectro vibracional no infravermelho do composto obtido.	97
Figura 33. Estrutura química dos ligantes ponte ácido 4-4'-bifenildicarboxílico (BPDC) e ácido 2,6-naftaleno dicarboxílico (NDC).	99
Figura 34. Perfis de difração de raios-X de pó para o material obtido antes do processo de ativação (vermelho), após ativação (azul) e para a bioMOF-101 simulado (preto) obtido na base de dados ICSD (número da ficha: 988068).	100
Figura 35. Curvas TG-DSC obtida para a bioMOF-101 como sintetizada.	101
Figura 36. Curvas TG-DSC da bioMOF-101-ativado.	102
Figura 37. Padrão de difração de raios-X de pó para a bioMOF-101-ativado e CCM@bioMOF-101-1D.	103
Figura 38. Espectros vibracionais no infravermelho dos compostos bioMOF-101-ativado, CCM livre e CCM@bioMOF-101-1D.	104
Figura 39. Curvas TG-DSC do composto CCM@bioMOF-101-1D.	105
Figura 40. Representação das moléculas de FA na superfície do carreador.	108
Figura 41. Espectros de RMN de ^1H para os compostos bioMOF-101, CCM, CCM@bioMOF-101-1D, FA e CCM@bioMOF-101-1D/FA, em dms o -d $_6$	108
Figura 42. Perfil de liberação da CCM nas amostras do composta bioMOF-101.	110
Figura 43. Gráfico representativo do mecanismo de morte celular dos compostos CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA para a linhagem celular MCF-7.	116
Figura 44. Gráfico representativo do mecanismo de morte celular dos compostos CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D /FA na linhagem celular 4T1.	117

Figura 45. Resumo dos dados in vivo. (A) Peso corporal ao longo do tempo; (B) Volume tumoral ao longo do tempo; (C) Peso do tumor; (D) Peso relativo dos órgãos. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos.	119
Figura 46. Percentual de aumento do volume alveolar ao final do tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Letra diferentes representam diferença estatística entre grupos.	120
Figura 47. Prancha histológica retratando as imagens do pulmão e da região tumoral.	121
Figura 48. Gráfico representativo dos dados de análise bioquímica. A) Teores de alanina aminotransferase (ALT); B) Teores de creatinina e C) Teores de ureia. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Teste t de Student: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$	125
Figura 49. Cromatograma típico da CCM (50 $\mu\text{g/mL}$) obtido pelo método cromatográfico em solução metanólica.	134
Figura 50. Curva analítica da CCM em solução de metanol obtida pelo método cromatográfico.	136
Figura 51. Cromatograma típico da CCM (50 $\mu\text{g/mL}$) obtido pelo método cromatográfico em meio receptor em $\text{pH}=5,0$ (azul) e $\text{pH}=7,4$ (vermelho).	139
Figura 52. Curvas analíticas da CCM em meio receptor obtidas pelo método cromatográfico: A) em $\text{pH} = 5,0$ e B) em $\text{pH} = 7,4$	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. MOFs como sistemas de liberação de fármacos.	41
Tabela 2. Reagentes e solventes utilizados neste capítulo.	47
Tabela 3. Principais frequências na região do infravermelho do material obtido (RCA) e o da literatura (bioMOF-100). ¹⁰⁶	55
Tabela 4. Análise elementar para o RCA e a comparação com a bioMOF-100.	61
Tabela 5. Nível de probabilidade de correlação, identificação do confômero e desvio-médio quadrático entre o confômero e a subunidade de entrada.	64
Tabela 6. Testes para avaliação da eficiência de encapsulação.	70
Tabela 7. Dados referentes à termogravimetria (TG) dos compostos RCA-1 e CCM@RCA-1D.	76
Tabela 8. Percentual de CCM liberada após 132 horas de experimento.	80
Tabela 9. Valores de R^2 referente aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo de liberação <i>in vitro</i> da CCM para as amostras do composto RCA.	81
Tabela 10. Valores de IC_{50} dos precursores e da série de compostos do RCA juntamente com seus valores de IS. $IS^* = IC_{50} (NIH/3T3) / IC_{50}(MCF-7)$; $IS^{**} = IC_{50} (NIH/3T3) / IC_{50}(MDA-MB-321)$ e $IS^{***} = IC_{50} (NIH/3T3) / IC_{50}(4T1)$	83
Tabela 11. Reagentes e solventes utilizados neste capítulo.	90
Tabela 12. Principais frequências na região do infravermelho do material sintetizado neste trabalho.	98
Tabela 13. Dados referentes à termogravimetria (TG) dos compostos bioMOF-101-ativado e CCM@bioMOF-101-1D.	106
Tabela 14. Dados referentes ao encapsulamento da CCM em diferentes matrizes.	107
Tabela 15. Percentual de CCM liberada após 132 horas de experimento.	111
Tabela 16. Valores de R^2 referente aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo de liberação <i>in vitro</i> da CCM para as amostras do composta bioMOF-101.	112

Tabela 17. Valores de IC ₅₀ dos precursores e da série de compostos da bioMOF-101 juntamente com seus valores de IS. $IS^* = IC_{50(NIH/3T3)} / IC_{50(MCF-7)}$; $IS^{**} = IC_{50(NIH/3T3)} / IC_{50(MDA-MB-321)}$ e $IS^{***} = IC_{50(NIH/3T3)} / IC_{50(4T1)}$	114
Tabela 18. Análise do hemograma após os tratamentos. (MCV): volume corpuscular médio; (MCH): hemoglobina corpuscular média; e (MCHC): concentração de hemoglobina corpuscular média. Os dados estão representados como média ± desvio padrão.....	123
Tabela 19. Análise bioquímica contendo os teores obtidos de alanina aminotransferase (ALT), creatinina e ureia. Os dados estão representados como média ± desvio padrão. Teste t de Student: *P<0,05; ***P<0,001.....	126
Tabela 20. Parâmetros analisados em uma validação analítica.	131
Tabela 21. Reagentes e solventes utilizados no trabalho.....	132
Tabela 22. Valores das áreas referentes ao pico de CCM em solução metanólica para a construção da curva analítica por CLAE-DAD.....	135
Tabela 23. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de CCM em solução metanólica através da técnica de CLAE-DAD.....	136
Tabela 24. Determinação da precisão intracorrida (repetibilidade) de CCM em solução metanólica por meio da técnica de CLAE-DAD.	137
Tabela 25. Determinação da precisão intermediária de CCM em solução metanólica através da técnica de CLAE-DAD.....	138
Tabela 26. Valores das áreas referentes ao pico da CCM em meio receptor em pH=5,0 e pH=7,4 para a construção das curvas analíticas por CLAE-DAD.	140
Tabela 27. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção das curvas analíticas de CCM em meio receptor com os valores de pH = 5,0 e 7,4 através da técnica de CLAE-DAD.....	142
Tabela 28. Determinação da precisão intracorrida (repetibilidade) de CCM em meio receptor em pH = 5,0 e 7,4 por meio da técnica de CLAE-DAD.....	144
Tabela 29. Determinação da precisão intermediária de CCM em meio receptor em valores de pH = 5,0 e 7,4 através da técnica de CLAE-DAD.....	146

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	28
OBJETIVOS	30
Objetivo geral	30
Objetivos específicos.....	30
1 REVISÃO DA LITERATURA	32
1.1 Câncer de Mama.....	32
1.2 Curcumina no câncer de Mama	34
1.3 Uso de Sistemas Liberação de Fármacos na Terapia do Câncer	36
1.4 MOFs como sistemas de liberação de fármacos.....	37
1.5 Funcionalização com ácido fólico	42
2 CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO RCA.....	46
2.1 Introdução.....	46
2.2 Material e Métodos.....	46
2.2.1 Materiais	46
2.2.2 Métodos	47
2.2.3 Caracterizações.....	48
2.2.4 Avaliação textural do composto RCA	49
2.2.5 Análise do teor de zinco por complexometria com EDTA ¹⁰⁷	49
2.2.6 Metodologia computacional para proposição estrutural do RCA	50
2.2.7 Ensaio de encapsulação do fármaco CCM	51
2.2.8 Funcionalização da matriz com ácido fólico	51
2.2.9 Ensaio de liberação do fármaco CCM in vitro	52
2.2.10 Aplicação biológica in vitro	52
2.2.10.1 Ensaio de viabilidade celular	52
2.2.10.2 Ensaio de morte celular	53
2.3 Resultados e Discussão.....	54
2.3.1 Caracterizações do composto RCA	54
2.3.2 Proposição estrutural do RCA utilizando método computacional	61
2.3.3 Avaliação textural do composto RCA.....	68
2.3.4 Ensaio de encapsulação do fármaco	69
2.3.5 Funcionalização do composto com ácido fólico.....	77
2.3.6 Ensaio de liberação do fármaco in vitro	79
2.3.7 Aplicação biológica in vitro	82
2.4 Conclusão	87
3 CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA BIOMOF-101.....	89
3.1 Introdução.....	89
3.2 Material e Métodos.....	89
3.2.1 Materiais	89
3.2.2 Métodos	90
3.2.3 Caracterizações.....	91
3.2.4 Ensaio de encapsulação do fármaco CCM	92
3.2.5 Funcionalização da matriz com ácido fólico	92
3.2.6 Ensaio de liberação do fármaco CCM in vitro	92
3.2.7 Aplicação biológica in vitro	93
3.2.7.1 Ensaio de viabilidade celular	93
3.2.7.2 Ensaio de morte celular	93

3.2.8 Aplicação biológica in vivo	94
3.2.8.1 Manutenção dos animais	94
3.2.8.2 Indução tumoral e tratamento – Experimento de eficácia terapêutica.....	94
3.3 Resultados e Discussão.....	96
3.3.1 Caracterizações do composto bioMOF-101	96
3.3.2 Ensaio de encapsulação do fármaco	102
3.3.3 Funcionalização do composto com ácido fólico.....	107
3.3.4 Ensaio de liberação do fármaco in vitro	109
3.3.5 Aplicação biológica in vitro	113
3.3.6 Aplicação biológica in vivo	118
3.4 Conclusão	127
4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO	130
4.1 Introdução	130
4.2 Material e Métodos	131
4.2.1 Materiais	131
4.2.2 Métodos	132
4.2.2.1 Revalidação do método analítico para quantificação de CCM por CLAE-DAD.....	132
4.3 Resultados e Discussão.....	133
4.3.1 Avaliação do método para quantificação de CCM incorporada.....	133
4.3.1.1 Linearidade	134
4.3.1.2 Precisão.....	137
4.3.2 Avaliação do método para quantificação de CCM liberada	138
4.3.2.1 Linearidade	139
4.3.2.2 Precisão.....	143
4.4 Conclusão	147
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	147
6 REFERÊNCIAS	148
ANEXO I	162

1 INTRODUÇÃO

A industrialização e os avanços das ciências médicas ocasionaram uma significativa alteração da demografia mundial, devido à redução das taxas de mortalidade e ao aumento da expectativa de vida. Como consequência, houve uma alteração no perfil de mortalidade, com diminuição da taxa de mortes provocadas por doenças infecciosas e aumento da taxa de mortes associadas a doenças crônico-degenerativas, especialmente doenças cardiovasculares e câncer.

Estima-se que, ao longo do século XXI, o câncer se torne a principal causa de morte nos países subdesenvolvidos, devido à falta de acesso a programas de detecção precoce e aos serviços de tratamento. De particular interesse, o câncer de mama é o tipo de neoplasia maligna que mais acomete as mulheres, sendo o segundo mais incidente em todo o mundo.¹ Nos últimos anos tem-se investigado a presença de marcadores específicos neste câncer, sendo os principais grupos identificados os receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) e o receptor epidermal humano 2 (HER2).²

É importante considerar que os tumores de mama triplo negativos, que não apresentam os marcadores tradicionais de câncer de mama, como RE, RP e HER2, são considerados os mais agressivos e não dispõem de terapia específica, sendo utilizada a quimioterapia tradicional, associada a diversos efeitos colaterais.³ Neste sentido, um outro marcador bioquímico bastante relevante é o receptor de folato, expresso em baixa quantidade por células normais, sendo essa expressão aumentada em diversos tipos de tumores (ovário, próstata e mama).^{4,5} Assim, o ácido fólico, necessário para a biossíntese de bases nucleotídicas e aminoácidos, pode ser empregado para o direcionamento de nanopartículas a células com superexpressão de receptor de folato.

O tratamento utilizado para câncer de mama com presença de metástase é a quimioterapia que, apesar de ser efetiva, muitas vezes é associada a limitações, como por exemplo, desenvolvimento de resistência à terapia, além de efeitos colaterais indesejados. Um outro ponto importante é a necessidade de utilização de mais de um fármaco para que o tratamento se torne eficaz. Portanto, o desenvolvimento de novas modalidades de tratamentos é de extrema importância não só para o tratamento, mas também para prevenir a progressão do câncer em fase metastática.⁶

Com o intuito de melhorar essas limitações presentes na terapêutica convencional, há uma busca por tratamentos utilizando Medicina Complementar e Alternativa (MCA), sendo esta reconhecida pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. Ao contrário dos fármacos já vigentes na terapia convencional, os compostos baseados em plantas e produtos naturais são

capazes de combater o câncer por várias vias, além de normalmente não apresentarem toxicidade para as células normais.^{7,8}

A curcumina (CCM) é um composto polifenólico hidrofóbico derivado dos rizomas de *Curcuma longa*, conhecido popularmente como açafrão. Estudos mostraram que a CCM possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-HIV, antimicrobiana, antiangiogênica e antitumoral, além de apresentar baixa toxicidade.⁹⁻¹³ Apesar da CCM ser vista como um fármaco em potencial na terapia do câncer e na quimioprevenção, esta possui limitações que incluem baixa solubilidade em água em condições de pH fisiológico e ácido, hidrólise rápida em pH alcalino e instabilidade em presença de luz.¹⁴

Portanto, o desenvolvimento de um sistema de liberação que permita a administração eficiente da CCM é de suma importância para que se possa aproveitar o potencial deste agente antitumoral.¹⁵ Diversos sistemas carreadores de fármacos, tais como nanopartículas poliméricas, lipossomas, hidrogéis, microemulsões, nanocápsulas e nanoesferas e sistemas inorgânicos (*Metal-Organic Frameworks* – MOFs e sólidos de coordenação) estão sendo estudados com o objetivo de obter um produto final com uma melhor biodisponibilidade da CCM.^{16,17}

Desta forma, tendo observado tais limitações e a necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer de mama, o tema proposto nesta tese é desenvolver sistemas carreadores de fármacos contendo CCM incorporada, cuja superfície destes materiais é revestida com moléculas de ácido fólico, como uma estratégia de direcionamento às células tumorais de mama.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Encapsular CCM nos dois compostos sintetizados (RCA e bioMOF-101), funcionalizá-los com folato para avaliação destes carreadores em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama.

1.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o RCA e bioMOF-101;
- Validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de CCM;
- Encapsular a CCM em ambos os compostos;
- Caracterizar os materiais contendo CCM encapsulada;
- Funcionalizar o RCA e bioMOF-101 com ácido fólico;
- Caracterizar os compostos após funcionalização;
- Realizar ensaio de liberação *in vitro* de CCM;
- Realizar experimentos *in vitro* em diferentes linhagens celulares tumorais de mama;
- Realizar experimentos *in vivo*.



CAPÍTULO 1



1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer de Mama

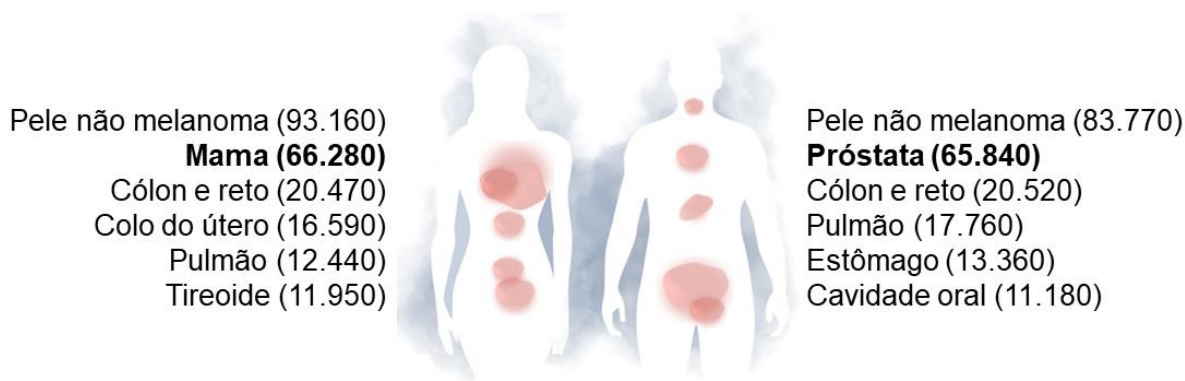
Câncer é um termo usado para denominar um conjunto vasto de doenças caracterizadas pela multiplicação descontrolada de células atípicas, o que leva à formação de tumores (tecido anormal). Esses tumores possuem a propriedade de se disseminarem entre os tecidos normais, sendo que esse processo de deslocamento das células cancerígenas implica na formação de um tumor secundário, chamado de metástase.¹⁸

O câncer de mama é o tipo de neoplasia maligna que mais acomete as mulheres, sendo o segundo mais incidente em todo o mundo. Em 2020, o diagnóstico e tratamento desta doença foram dificultados pela pandemia do COVID-19, apresentando 2,3 milhões de novos casos e 685.000 mortes em todo o mundo. Já neste ano de 2021, estima-se que só nos Estados Unidos 43.600 mulheres e 530 homens morrerão de câncer de mama.^{19,20}

O principal fator de risco para o câncer de mama é o envelhecimento da população, pois as pessoas que vivem mais ficam mais expostas aos agentes externos causadores de doença; porém, há outros fatores de risco bem estabelecidos, como os relacionados à vida reprodutiva (menarca, primeira gestação tardia, uso de anticoncepcionais) e ao histórico familiar de câncer de mama, podendo ser observadas alterações em genes relacionados à regulação, ao metabolismo hormonal e ao reparo de DNA.²¹ Apesar de apresentar um bom prognóstico quando diagnosticado em fase inicial, o câncer de mama é o tipo de neoplasia que mais leva a óbito na população feminina brasileira. Essa elevada taxa de mortalidade normalmente está relacionada ao seu diagnóstico tardio.^{22,23}

Segundo os dados do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA) a estimativa para o Brasil no triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil novos casos de câncer, sendo que o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguidos pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada)²⁴, como mostrado na Figura 1.

Figura 1. Estimativa do número de novos casos de câncer por sexo, no Brasil no triênio 2020-2022.



Fonte: Adaptado INCA.²⁴

Por ser uma doença heterogênea, o câncer de mama é classificado de acordo com alguns parâmetros clínicos, histopatológicos e moleculares, a fim de prever sobre o comportamento do tumor e fornecer estratégias terapêuticas. Com relação aos parâmetros moleculares, a classificação é realizada levando em consideração a presença ou ausência de marcadores imunohistoquímicos, incluindo o RE, RH, HER2, marcadores de proliferação KI67 e citoqueratinas, os quais são responsáveis por controlar a sinalização do crescimento celular.^{25,26} Esses marcadores podem ser combinados, permitindo assim que haja uma subclassificação em categorias individuais com características bem específicas, tais como, RE+ (RE+/HER2-), HER2+ (RE-/HER2+), triplo negativo (RE-/RP-/HER2-) e triplo positivo (RE+/RP+/HER2+).²

É importante considerar que os tumores de mama triplo negativos, que não apresentam os marcadores tradicionais de câncer de mama, como RE, RP e HER2, são considerados os mais agressivos e não dispõem de terapia específica, sendo utilizada a quimioterapia tradicional, associada a diversos efeitos colaterais.³ Neste sentido, um outro marcador bioquímico bastante relevante é o receptor de folato, expresso em baixa quantidade por células normais, sendo essa expressão aumentada em diversos tipos de tumores (ovário, próstata e mama).^{4,5} Assim, o ácido fólico, necessário para a biossíntese de bases nucleotídicas e aminoácidos, pode ser empregado para o direcionamento de nanopartículas a células com superexpressão de receptor de folato.

Destacamos estudos prévios que demonstraram a expressão aumentada de receptor de folato em células de câncer de mama do tipo triplo negativas.^{5,27,28} O estudo de Zhang e colaboradores (2014), por exemplo, correlacionou a expressão de receptor de folato com tumores de mama triplo negativos, resultando em prognóstico desfavorável. Portanto, uma hipótese coerente é que nanopartículas funcionalizadas com folato poderiam ser empregadas

para o direcionamento a células de câncer de mama do tipo triplo negativas com expressão de receptor de folato.⁵

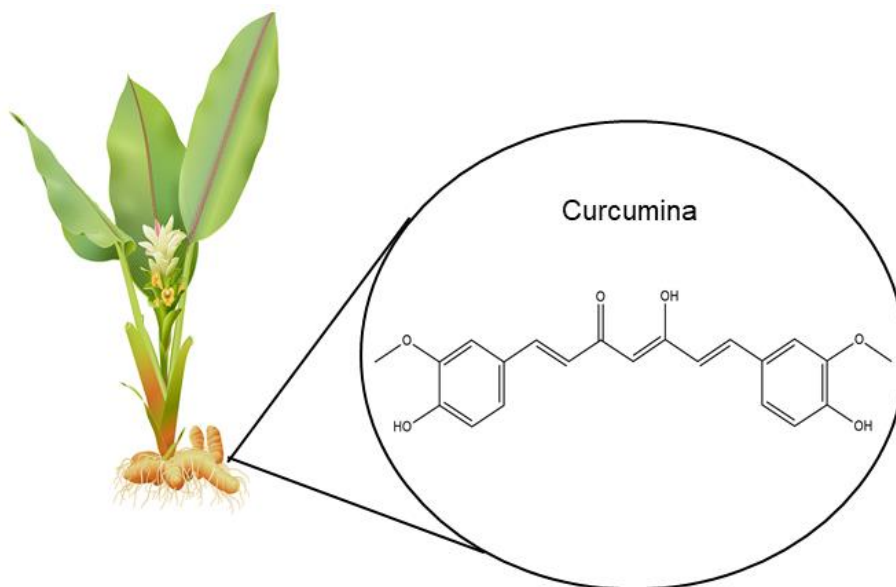
O tratamento utilizado para câncer de mama com presença de metástase é a quimioterapia que, apesar de ser efetiva, muitas vezes é associada a limitações, como por exemplo, desenvolvimento de resistência à terapia, além de efeitos colaterais indesejados. Um outro ponto importante é a necessidade de associação de mais de um fármaco para que o tratamento se torne eficaz. Portanto, o desenvolvimento de novas modalidades de tratamentos é de extrema importância não só para o tratamento, mas também para prevenir a progressão do câncer em fase metastática.⁶

1.2 Curcumina no câncer de Mama

Atualmente há uma busca crescente por tratamentos médicos menos invasivos e danosos à saúde. Desta forma, a MCA vem ganhando cada vez mais destaque nesta área por utilizar produtos naturais em terapias e práticas diagnósticas, com o intuito de trazer o efeito terapêutico desejado com uma menor toxicidade.²⁹

A CCM é um composto polifenólico hidrofóbico derivado dos rizomas de *Curcuma longa* (Figura 2), conhecido popularmente como açafrão. Há séculos ela vem sendo utilizada no Sudeste Asiático, devido aos seus múltiplos efeitos farmacológicos, sendo presente na culinária mundial. A CCM é considerada pela *Food and Drug Administration* (FDA) como GRAS – Geralmente Reconhecido como Seguro – já que é bem tolerada mesmo em quantidades elevadas. Uma revisão sobre o potencial terapêutico *in vivo* da CCM revelou seus efeitos nos sistemas gastrointestinal, respiratório e cardiovascular, e efeitos anti-inflamatórios, antidiabéticos, hepatoprotetores, neuroprotetores, quimioprotetores, antineoplásicos, antialérgicos e antimicóticos.⁹⁻¹³

Figura 2. Representação da estrutura química da curcumina.



Fonte: Adaptado de Alves et al., 2018.⁹

Estudos mostraram que a CCM inibiu o desenvolvimento de células tumorais de pulmão³⁰, colorretal³¹, gástrico³², mama³³, cervical³⁴, vulva³⁵, ovário³⁶ e osteossarcoma.³⁷ Além disso, suas propriedades anticancerígenas foram atribuídas à modulação de diversas vias moleculares, sendo que no câncer de mama essa modulação está relacionada ao ciclo celular e proliferação, apoptose, senescência, propagação do câncer e angiogênese. Em grande parte, o NFkB, PI3K/Akt/mTOR, MAPK e JAK/STAT são as principais vias de sinalização envolvidas, impedindo assim o crescimento tumoral, progressão e propagação maligna da doença.^{38,39}

Apesar da CCM ser altamente lipofílica ($\log P = 2,5$) facilitando assim sua passagem pelas membranas celulares e por ser vista como uma molécula em potencial na terapia do câncer e na quimioprevenção ela apresenta baixa solubilidade em água, além de sofrer uma rápida degradação na presença de luz e em meio aquoso, dificultando assim sua utilização na terapêutica.⁴⁰

Os estudos realizados nas três últimas décadas, relacionados com a absorção, biodistribuição, metabolismo e excreção da CCM, revelaram baixa absorção e alto metabolismo hepático, restringindo a sua biodisponibilidade.⁹ Portanto, o desenvolvimento de um sistema de liberação que permita a administração eficiente da CCM é de suma importância para que se possa aproveitar o potencial deste agente antitumoral.⁴¹

1.3 Uso de Sistemas Liberação de Fármacos na Terapia do Câncer

Atualmente, o câncer de mama é tratado principalmente por ressecção cirúrgica e quimioterapia por ser menos invasiva.^{42,43} No entanto, os quimioterápicos possuem uma alta toxicidade, acarretando efeitos colaterais. Além disso, as formulações farmacêuticas convencionais não possuem atividade de direcionamento ao tumor e apenas uma pequena quantidade do fármaco é direcionada à região tumoral após a entrada na circulação sistêmica, diminuindo a eficiência terapêutica do mesmo.⁴⁴

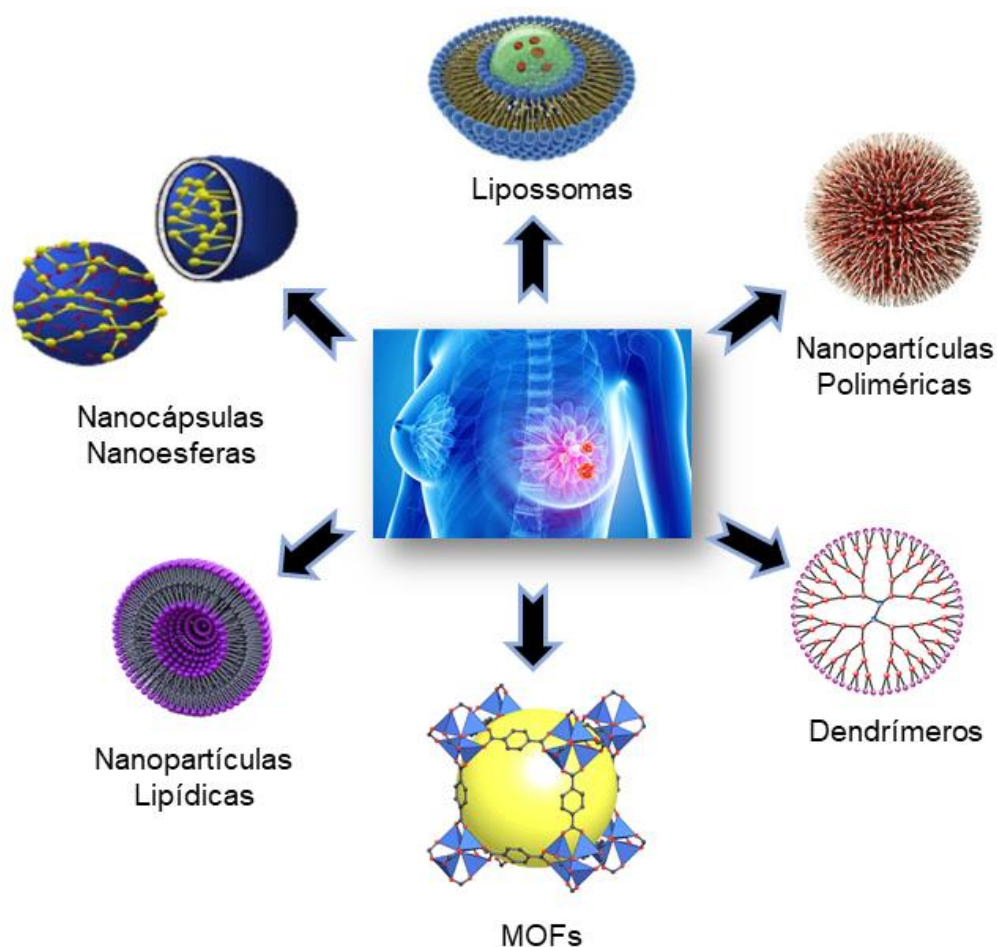
Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos tem ganhado cada vez mais destaque por apresentarem vantagens quando comparados com as preparações convencionais, tais como:⁴⁵

- Proteção do fármaco contra a degradação prematura;
- Melhora no perfil de liberação do fármaco;
- Direcionamento do fármaco para a região desejada;
- Redução da toxicidade do tratamento;
- Liberação sustentada do fármaco;
- Maior tempo de circulação sistêmica;
- Redução na frequência de administração do fármaco.

O termo sistema de liberação de fármaco (*Drug Delivery Systems*) começou a ser usado em 1960. O intuito desses sistemas é melhorar a eficácia dos tratamentos contra diversas doenças por possuírem a capacidade de se deslocar para o alvo terapêutico, poupando fisiologicamente as células e os tecidos saudáveis, melhorando assim a qualidade de vida do paciente e potencializando a ação do princípio ativo.⁴⁶ Em 2005, nanopartículas contendo o fármaco paclitaxel começaram a ser utilizadas no tratamento do câncer de mama.⁴⁷

Diversos sistemas de entrega de fármacos, tais como nanopartículas poliméricas, lipossomas, dendrímeros, nanopartículas lipídicas, nanocápsulas, nanoesferas e sistemas inorgânicos, como as MOFs tem sido estudados, como mostrado na Figura 3, para auxiliar na terapia do câncer.^{48,49}

Figura 3. Principais tipos de sistemas de liberação de fármacos estudados para a terapia do câncer.

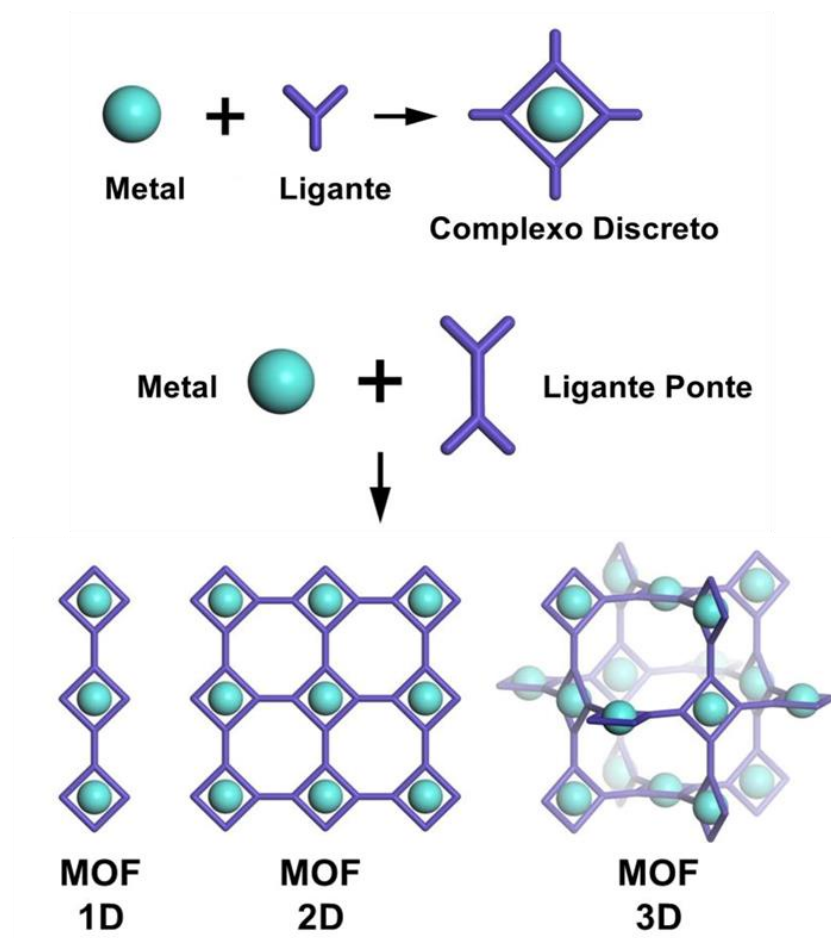


Fonte: Autor

1.4 MOFs como sistemas de liberação de fármacos

O termo “*metal-organic framework*” popularizado por Omar Yaghi e colaboradores na década de 1990,^{50,51} refere-se a uma classe de materiais cristalinos que apresentam redes estendidas em 1D, 2D e 3D formadas pela ligação entre íons ou complexos metálicos/clusters bem definidos – também conhecidos como *secondary building units* (SBUs) – com ligantes orgânicos politópicos (Figura 4). A ligação química metal-ligante envolvida na formação desses materiais é de natureza predominantemente covalente do ácido/base de Lewis (íon metálico e ligante, respectivamente), visto que se tratam de compostos de coordenação.⁵²

Figura 4. Organização dos vértices metálicos em complexos discretos e MOFs.



Fonte: Autor

O grande interesse nesta classe de materiais está relacionado ao fato da estrutura das MOFs poder ser determinada com precisão átomo por átomo, o que permite prever e controlar suas propriedades, tais como, alta cristalinidade, porosidade, valores elevados de área específica, baixa densidade, boa estabilidade térmica, além da possibilidade de funcionalização.^{53,54} Dentro dessa perspectiva, estudos vêm sendo realizados envolvendo aplicações das MOFs em diferentes áreas como armazenamento⁵⁵ e separação de gases,⁵⁶ catálise,⁵⁷ liberação de fármacos,⁵⁸ fotônica,⁵⁹ entre outras.

Sistemas para liberação de fármacos têm desempenhado importante papel no que se refere à modos alternativos de administração de fármacos, vacinas e agentes de diagnóstico. Apesar do grande avanço da indústria farmacêutica observado no último século, as formulações atuais são normalmente incapazes de se localizar em grande quantidade nos sítios específicos de ação. Quando um fármaco é administrado, via de regra, suas moléculas se difundem e se distribuem por todo o corpo, podendo resultar em efeitos colaterais indesejáveis. Portanto, distribuição não

específica e o acúmulo inadequado de agentes terapêuticos continuam sendo grandes desafios para o desenvolvimento de medicamentos.⁶⁰

Atualmente, abordagens que buscam a administração controlada e em sítios específicos de ação mostram-se mais favoráveis frente aos métodos tradicionais. A melhoria nos resultados terapêuticos centra-se principalmente em fatores como baixas dosagens, distribuição específica, redução na biodegradação, diminuição na frequência de administração, manutenção do nível terapêutico e, conseqüentemente, redução nos efeitos colaterais e melhor adesão do paciente ao tratamento.^{61,62}

As inovações que vêm sendo observadas na área de Química de Materiais aliada a Nanotecnologia vêm auxiliando no desenvolvimento de diversos sistemas para liberação de fármacos, criando transportadores biodegradáveis, biocompatíveis, direcionáveis e que apresentam respostas a diversos estímulos. Entretanto, alguns fatores devem ser levados em consideração antes do desenvolvimento desses sistemas, entre eles a difusão, a estrutura da matriz, capacidade de adsorção, cinética e estímulos para a liberação.^{63,64}

Nesse sentido, as MOFs apresentam-se como materiais promissores pela possibilidade do uso de blocos de construção biológica- e ambientalmente compatíveis a fim de minimizar a toxicidade desses materiais e aumentar a biocompatibilidade. As bioMOFs⁶⁵ são compostos que envolvem o uso de metais biocompatíveis (zinco, ferro, cobre, por exemplo) e biomoléculas, como aminoácidos, nucleotídeos, bases nitrogenadas, açúcares, dentre outros.⁶⁶

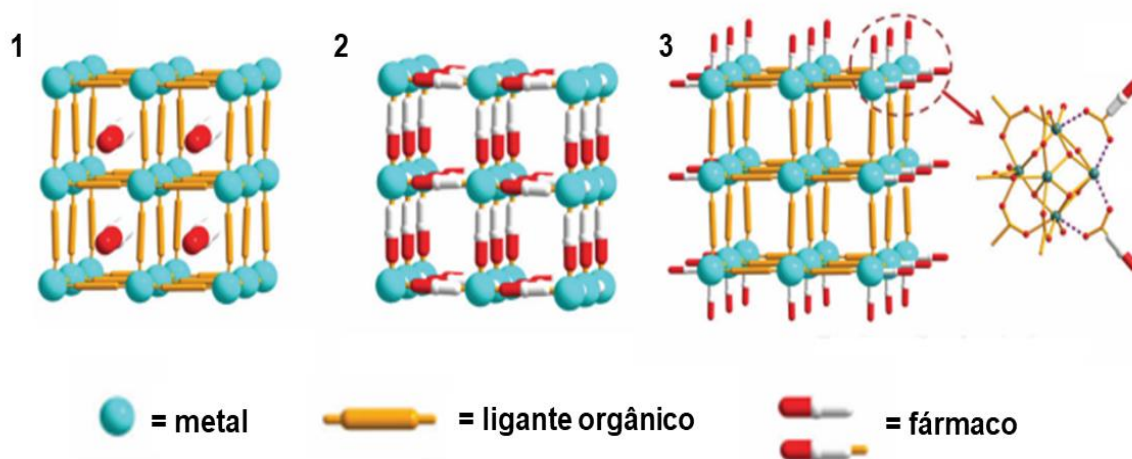
A utilização de blocos de construção que possuam biomoléculas pode oferecer algumas vantagens adicionais às MOFs, como maior diversidade e flexibilidade estrutural, impactando significativamente nas propriedades do biomaterial obtido. Além disso, os centros quirais de algumas biomoléculas proporcionam a possibilidade de combinar quiralidade e porosidade em um único material, dando-lhe seletividade em processos de reconhecimento molecular.⁶⁶

As bioMOFs exibem outras características que as fazem boas transportadoras de fármaco, incluindo sua área superficial e tamanhos de poros relativamente elevados (para encapsulação do fármaco), biodegradabilidade intrínseca (como resultado de ligações metal-ligante relativamente lábeis) e possibilidade de funcionalização pós-síntese, o que pode melhorar a interação do fármaco com as paredes do poro.⁶⁷ As bioMOFs também podem ser reduzidas para escala nanométrica, a fim de permitir a entrada de fármacos nas células.⁶⁸

Desta forma, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para o uso de MOFs como sistemas de liberação de fármacos. Como mostra a Figura 5, a primeira estratégia – e mais comumente usada – ocorre quando o fármaco está localizado nos poros da MOF por meio de

interações não covalentes e não alteram a estrutura do material; na segunda o próprio ligante constituinte do material apresenta atividade terapêutica e na terceira e mais recente, o fármaco está localizado na superfície do material, em sítios metálicos insaturados ou com defeitos.⁶⁹

Figura 5. Diferentes estratégias para a utilização de MOFs como sistemas de liberação de fármacos: 1) fármaco adsorvido nos poros da MOF; 2) fármaco como ligante orgânico constituinte da própria estrutura do material; 3) fármaco localizado na superfície da MOF.



Fonte: Adaptado de Wang et al., 2018.⁶⁹

Na segunda abordagem, o uso de MOFs com áreas específicas elevadas não é necessário.⁷⁰ Algumas bioMOFs têm sido construídas utilizando esta estratégia, tais como a bioMIL-5, baseada em íons Zn^{2+} e ácido azelaico, um agente antibacteriano,⁷¹ a bioMOF Mg-galato que apresenta atividades antioxidantes,⁷² a bioMIL-1, uma MOF biodegradável contendo íons Fe^{3+} e vitamina B_3 ⁷³ e uma MOF de zinco com curcumina, sendo esta uma biomolécula com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.⁷⁴

Por outro lado, quando um fármaco é adsorvido na estrutura porosa de um bioMOF, vários fatores podem influenciar a sua cinética de liberação, incluindo concentrações exógenas de íons, pH e temperatura. Segundo Tan e colaboradores⁷⁵ a liberação do fármaco 5-Fluoruracil a partir da MOF Ui-66- NH_2 foi simultaneamente controlada pelo pH e pela concentração de Ca^{2+} em células tumorais ósseas. A Tabela 1 resume importantes estudos de liberação que mostram a potencial aplicabilidade das MOFs como sistemas transportadores de fármacos.

Tabela 1. MOFs como sistemas de liberação de fármacos.

MOF	Fármaco	Eficiência de Encapsulação	Taxa de liberação	Ref.
[Zn(NO ₂ -BDC)(dmbpy) _{0.5}] _n	Busulfan	21,5%	5%, 0 - 20 horas 5%, 20-36 horas	76
[Cu ₂ (L ₂)(H ₂ O) ₂] _n	5-fluorouracil	42,0%	96%, 5 dias	77
ZIF-8	5-fluorouracil	51,0%	95%, 21 horas	78
[Zn ₈ (O) ₂ (CDDDB) ₆ (DMF) ₄ (H ₂ O)] _n	5-fluorouracil	53,3%	65%, 3 dias	79
[Cu(L'')(4,4'-bipy)(H ₂ O)] _n	5-fluorouracil	27,5%	61%, 4 dias	80
Fe-MIL-53-NH ₂	5-fluorouracil	23,0%	97%, 1 dia	81
IFMC-1	5-fluorouracil	30,5%	89%, 5 dias	82
Zn-TATAT	5-fluorouracil	33,3%	86%, 7 dias	83
MOF-74	Ibuprofeno	23,0%	50%, 4 horas	84
[Zn ₂ (1,4-bdc) ₂ (dabco)] _n	Ibuprofeno	15,0%	80%, 12 dias	85
MIL-53-Fe	Ibuprofeno	20,0%	100%, 21 dias	86
MIL-53-Al	Ibuprofeno	60,7%	100% 7dias	87
bioMOF-1	Procainamida	42,3%	100%, 3 dias	88
MIL-53(Fe)	Diclofenaco de sódio	63,2%	63%, 3 dias	89
BioMOF-Zn	Diclofenaco de sódio	51,6%	56%, 2 dias	90
MIL-100 (Fe)	Doxorrubicina	17,2%	85%, 35 dias	91
ZIF-8	Doxorrubicina	40,9%	42%, 5 dias	92
bioMOF-100	Etilefrina	16,7%	80%, 10 dias	93
NZIF-8	Curcumina	88.2%	43%, 2 dias	94
ZIF-8	Curcumina	83,3%	88%, 3 dias	16
IRMOF-3	Curcumina	52,0%	55%, 1 dia	95

NO₂-BDC= 5-nitroisofalato; dmbpy= 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina; L = 2,5-di(3',5'-dicarboxilfenil)piridina; L''= ácido 1,1',4',1'',4'',1'''- quaterfenil-3,5,3'',5'''-tetracarboxílico 1,3,5-benzenotrisbenzoato; CDDDB= ácido 4,4'-(9-H carbazol-3,6-dil)dibenzóico; L'''= ácido difenilmetano-4,4'-dicarboxílico; 4,4'-bipy= 4,4'-bipiridina; 1,4-bdc= ácido benzeno-1,4-dicarboxílico; dabco= 1,4-diazobiciclo [2.2.2] octano; PEG= polietilenoglicol 5 kDa; IFMC: Institute of Functional Material Chemistry; Pi:ácido 5-(2-propiniloxi) isoftálico; pDBI = (1,4-bis(5-carboxi-1H-2-benzoimidazol)benzeno)).

Fonte: Autor

É importante salientar que os estudos utilizando MOFs como transportadores de fármacos para aplicações na área biomédica estão apenas no início e, portanto, requisitarão inúmeras investigações detalhadas para posterior aplicação em uso clínico. Essas pesquisas envolvem a avaliação da toxicidade destes materiais in vivo, a determinação da estabilidade em ambiente biológico, a investigação dos mecanismos de degradação no organismo, a modificação de superfícies das MOFs para melhorar o reconhecimento celular e também estudos que avaliam o comprometimento do metabolismo e farmacocinética.⁹⁶

1.5 Funcionalização com ácido fólico

Apesar da quimioterapia e da radioterapia serem hoje tratamentos utilizados para o câncer, ambos possuem uma alta toxicidade e limitações devido à presença dos indesejáveis efeitos colaterais. Essa toxicidade sensibiliza não só as células tumorais, mas também as células normais devido a não seletividade da terapia, diminuindo assim a qualidade de vida do paciente.⁹⁷

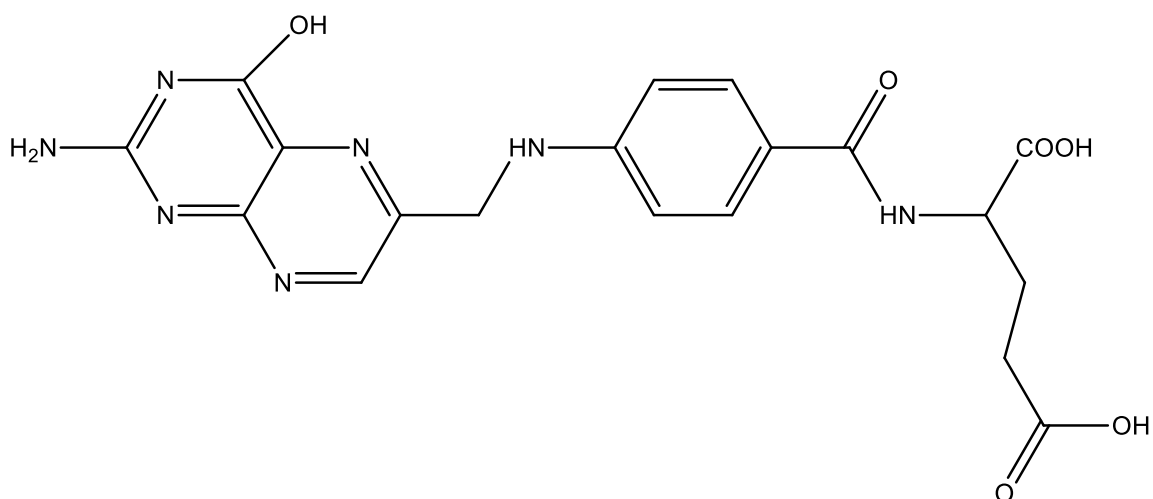
Com o intuito de melhorar as desvantagens contidas no tratamento convencional, os sistemas de liberação de fármacos podem ser funcionalizados. Os sistemas não funcionalizados demonstram uma seletividade tumoral relativa, como consequência do direcionamento passivo decorrente ao efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR; do inglês *enhanced permeability and retention effect*) as quais já possuem uso clínico aprovado.⁹⁸ Já os sistemas funcionalizados têm como objetivo aumentar a liberação do fármaco em sítios específicos. Na superfície desses sistemas, haverá a presença de determinadas moléculas que podem ser anticorpos, proteínas, açúcares, ácidos nucleicos e vitaminas, que irão promover interações específicas no local de interesse (interações do tipo antígeno-anticorpo e ligação ligante-receptor).⁹⁹

Dessa forma, é possível aumentar a seletividade do sistema carreador de fármaco através da funcionalização desses materiais. Assim, carreadores funcionalizados com ácido fólico apresentam a vantagem de possuir aplicações para diversos tipos de tumores, incluindo o de mama, já que a seletividade deste carreador possibilitará que a célula tumoral internalize este sistema, por se ligar aos receptores de folato que são superexpressos nestas células (cerca de 100 – 300 vezes mais que em células normais) via endocitose.¹⁰⁰

O ácido fólico (Figura 6) é um membro da família das vitaminas do complexo B (vitamina B9), que apresenta fórmula molecular $C_{19}H_{19}N_7O_6$ (massa molar = 441,4 g/mol). É um

aminoácido necessário para a síntese das bases purinas e pirimidinas e apresenta alta afinidade pelos receptores de folato.¹⁰¹

Figura 6. Estrutura química do ácido fólico.



Fonte: Autor

Dando ênfase para as MOFs, diferentes metodologias podem ser empregadas para promover a funcionalização na superfície destes materiais. Dentre essas metodologias as mais utilizadas são a modificação pós-sintética e a troca de ligante. Ambas permitem a introdução de grupos funcionais que são frequentemente incompatíveis com as condições de reação solvotérmicas, normalmente usadas para realizar a síntese das MOFs. Várias reações já foram relatadas para promover a troca de ligante, tais como reações de condensação, reações de cicloadição e metalação. Já as modificações pós-sintéticas têm sido amplamente utilizadas, para MOFs com aplicações biológicas, sendo esta metodologia a escolhida para a inserção do ácido fólico no presente estudo.^{102–104}

Pesquisas recentes que utilizam MOFs funcionalizadas com folato têm demonstrado que seu acoplamento proporciona aumento da captação celular e redução da citotoxicidade das formulações em células saudáveis. Laha e colaboradores⁹⁵ sintetizaram a IRMOF-3 contendo CCM encapsulada e funcionalizada com ácido fólico (IRMOF-3@CCM@FA) visando o tratamento do câncer de mama. O material apresentou uma eficiência de encapsulação de 98% e após 24 horas 55% da CCM foi liberada em pH = 5,5. Estudos *in vitro* revelaram que o material funcionalizado induziu danos ao DNA mediado por ROS e ao DNA mitocondrial, seguido por apoptose. Já os estudos *in vivo* mostraram uma redução significativa do tumor e a capacidade de sobrevivência dos camundongos foi aumentada. Alves e colaboradores¹⁰⁵ desenvolveram uma

MOF mesoporosa N₃-bio-MOF-100 carregada com CCM e funcionalizada com ácido fólico (CCM@N₃-bio-MOF-100/FA). Os materiais mostraram biocompatibilidade e um aumento na liberação da CCM em meio ácido, revelando uma liberação de fármaco pH responsiva. Além disso, os ensaios *in vitro* revelaram uma baixa citotoxicidade dos compostos e um aumento na captação celular nas amostras funcionalizadas, evidenciando a potencialidade de direcionamento às células tumorais dos sistemas funcionalizados.



CAPÍTULO 2



2 CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO RCA

2.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sistemas de liberação utilizando as MOFs requer uma série de avaliações para que sua eficácia seja comprovada. Em um primeiro momento o material é sintetizado e caracterizado por diversas técnicas, sendo elas espectroscópicas, difratométricas e termoanalíticas. Após isso, é avaliada a quantidade de fármaco que foi incorporado nos poros deste material e subsequentemente a taxa de liberação deste fármaco tanto em pH fisiológico quanto no pH de interesse, que neste trabalho, utilizamos pH ácido, por estarmos trabalhando na região tumoral. Os ensaios *in vitro* também foram realizados já que são de suma importância para que consigamos avaliar aspectos como biocompatibilidade e citotoxicidade do sistema desenvolvido.

Desta forma, esse capítulo visa avaliar o primeiro sistema desenvolvido nesta tese, evidenciando todas as técnicas de caracterização utilizadas e sua aplicação biológica para verificarmos a eficácia deste primeiro sistema como um potencial aplicação no tratamento do câncer de mama.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Os principais reagentes e solventes utilizados neste capítulo, por apresentarem elevada pureza, foram utilizados sem nenhum tratamento ou purificação prévia e estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Reagentes e solventes utilizados neste capítulo.

Reagente/Solvente	Procedência
N,N-Dimetilformamida (DMF)	Merck
Água Destilada	-
Ácido 4-4'-Bifenildicarboxílico (BPDC)	Aldrich
Adenina	Aldrich
Curcumina (CCM)	Inlab
Acetato de zinco	Vetec
N-hidroxissuccinimida (NHS)	Aldrich
N-[3-(dimetilamino) propil] -3- etilcarbodiimida (EDC)	Aldrich
Ácido fólico	Aldrich
Metanol	Synth
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Synth
Tween-20	Neon
Cloreto de sódio	Synth
Cloreto de potássio	Synth
3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT)	Invitrogen
Fosfato de potássio monobásico anidro	Synth
Fosfato de sódio bifásico anidro	Synth

Fonte: Autor.

2.2.2 Métodos

❖ Síntese da bioMOF-100

A síntese foi realizada como descrito por An e colaboradores.¹⁰⁶ Foram preparadas soluções estoque dos ligantes adenina e BPDC e do sal do metal em DMF: adenina (2,5 mL; 0,125 mmol), BPDC (2,5 mL; 0,25 mmol) e acetato de zinco dihidratado (5 mL; 0,25 mmol). Para a preparação das soluções estoque foi necessário manter sob sonicação para completa dissolução dos reagentes, sendo que a solução de adenina além de sonicação utilizou aquecimento. As soluções estoque foram colocadas em vials de vidro de 20 mL e adicionou-se 2,5 mL de DMF, 1 mL de metanol e 0,25 mL de água ultrapura. O recipiente foi fechado e colocado em estufa de programação controlada e mantido a 85 °C por 24 h. Após término da

reação o recipiente foi retirado da estufa e deixado resfriar sob temperatura ambiente. Um precipitado branco foi obtido, filtrado e lavado três vezes com DMF (10 mL) e seco sob vácuo. Após a secagem, a bioMOF-100 tal como sintetizado, intitulado neste trabalho de RCA foi submetido ao processo de ativação para retirada dos solventes presentes nos poros. O processo de ativação ocorreu por meio de aquecimento do material a 160 °C por 24 horas sob vácuo. Após esse processo a bioMOF-100-ativado foi denominado RCA-1.

2.2.3 Caracterizações

❖ Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrômetro Nicolet IS5 Thermo Scientific (4000-400 cm^{-1}), com resolução de 4 cm^{-1} , usando pastilha de KBr.

❖ Difração de raios-X de pó (DRX)

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

❖ Microscopia óptica de luz polarizada

As imagens de microscopia de luz polarizada foram obtidas em um microscópio óptico Labomed Lx 400P. Uma pequena quantidade das amostras suspensas em DMF foi colocada sobre uma lâmina de vidro, a qual foi coberta com uma lamínula e analisada no microscópio óptico.

❖ Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um microscópio de alta resolução (TOPCON SM-300) operando entre 10 e 20 kV. As amostras foram colocadas em suporte e coberta com uma fina camada de carbono.

❖ Análise Térmica

As curvas TG-DSC foram obtidas utilizando um sistema de análise térmica da Mettler Toledo, modelo TG/DSC-1. A atmosfera será de gás inerte (N_2) como gás de purga a uma vazão

de 50 mL/min, massa da amostra de aproximadamente 10 mg e cadinhos de $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$ de 70 μL , razão de aquecimento de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ e intervalo de temperatura de 30 – 1000 $^\circ\text{C}$.

❖ **Espesctroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H foram registrados no espectrômetro Avance III 600 HD (14,1 T, Sonda: Triple Inverse TCI Cryo-probehead), localizado no Instituto de Química – UNESP Araraquara. As amostras foram digeridas com ácido clorídrico deuterado (DCI) para completa solubilização. Utilizou-se dimetilsulfóxido deuterado ($\text{dms}\text{-d}_6$) para dissolução das amostras. Os deslocamentos químicos obtidos foram referenciados pelos solventes. O software utilizado para aquisição foi o TopSpin v. 3.2.

❖ **Análise Elementar**

A análise elementar foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química – USP São Paulo usando um microanalisador ELEMENTAR ANALYSER CHN modelo 2400 Perkin-Elmer, que permite a determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de $\pm 0,5\%$.

2.2.4 Avaliação textural do composto RCA

Informações sobre a textura porosa da amostra foram obtidas por meio de dados de adsorção-dessorção de N_2 , usando o método volumétrico estático e intervalo de pressão relativa entre 0,002 e 0,998 e o equipamento ASAP 2020- Micrometrics, equipado com transdutores para baixas ($p < 10\text{mmHg}$) e altas pressões ($10 < p < 1000\text{mmHg}$). As amostras foram pré-tratadas a 200 $^\circ\text{C}$ sob vácuo da ordem de 10^{-3} mmHg durante 24 h para eliminar vapores adsorvidos nas cavidades. Importante salientar que antes da realização dessas medidas, o material (RCA) foi previamente ativado em estufa à vácuo por 24h e temperatura de 160 $^\circ\text{C}$, com a finalidade de retirar as moléculas de solvente presente nos poros do composto.

2.2.5 Análise do teor de zinco por complexometria com EDTA¹⁰⁷

Para a análise do teor de zinco foram pesados 5 mg da amostra em uma balança analítica com incerteza de 0,01 mg. A amostra foi aberta pela adição de 5 gotas de solução aquosa de HNO_3 (70 % m/m) a quente. Após o resfriamento, adicionou-se 1 mL de solução tampão de acetato de amônio 2 mols/L e, em seguida, um excesso conhecido de solução de EDTA 0,01 mol/L, suficiente para complexar todo o zinco (II) presente na amostra. Seguiu-se o ajuste do pH para $5 \pm 0,1$ e a adição do indicador alaranjado de xilenol, em quantidade suficiente para

observar a cor amarela. Em seguida, a mesma foi submetida à titulação com solução ZnCl_2 0,01 mol/L, previamente padronizada com EDTA. A viragem foi observada pelo aparecimento da cor rosa. O teor de zinco foi calculado empregando a Equação 1:

Equação 1:
$$T_{\text{Zn}} = M_{\text{Zn}} \times (C_{\text{EDTA}} \times V_{\text{EDTA}} - C_{\text{ZnCl}_2} \times V_{\text{ZnCl}_2}) \div m_{\text{amostra}}$$

onde,

T_{Zn} = teor de zinco

M_{Zn} = concentração da solução de EDTA

C_{EDTA} = concentração da solução de EDTA

V_{EDTA} = volume da solução de EDTA

C_{ZnCl_2} = concentração da solução de cloreto de zinco

V_{ZnCl_2} = volume da solução de cloreto de zinco

M_{amostra} = massa da amostra pesada

2.2.6 Metodologia computacional para proposição estrutural do RCA

Para proposição estrutural e compreensão do fenômeno de solvatação do material sintetizado neste capítulo, dois estudos computacionais foram realizados: análise *in silico* de polimorfos e ancoragem molecular em colaboração com o Dr. Renan Lira de Farias do Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica do Instituto de Química da Unesp de Araraquara. Para a análise *in silico* de polimorfos as coordenadas atômicas tridimensionais da bioMOF-100 foram adquiridas no banco de dados de estruturas cristalinas CSD (The Cambridge Structural Database) com o código CCDC 833315, as quais foram posteriormente convertidas em coordenadas cartesianas utilizando o software Mercury v2021.1.¹⁰⁸ Em seguida, através do módulo “polymorph generator”, disponível no pacote de ferramentas “CSD-materials”, foram identificadas as possíveis conformações para a unidade de repetição utilizando a biblioteca de rotâmeros, considerando as restrições geométricas da molécula de entrada. Após a seleção dos confôrmeros mais prováveis, se aplicou o cálculo de minimização das estruturas cristalinas (coordenadas atômicas e constantes de cela) em nível semi-empírico PM7¹⁰⁹ com auxílio do software MOPAC2016.¹¹⁰ O protocolo de desvio-médio quadrático para as sobreposições foi conduzido com o auxílio do software Biovia Discovery

Studio Visualizer¹¹¹ versão acadêmica. Finalmente, para a interpretação dos dados, cálculo das voids e geração de figuras foi utilizado o CCDC Mercury v2021.1.

Para o estudo de ancoragem molecular, vale ressaltar que antes da realização do cálculo, a estrutura da molécula de DMF foi construída e previamente minimizada por mecânica molecular (MM) com o software Biovia DSV. Em seguida, se aplicou a otimização geométrica em nível semi-empírico PM7 utilizando o software MOPAC2016, sendo salvas as coordenadas atômicas em formato PDB (*.pdb). A estrutura da macromolécula, resultante da triagem de polimorfos, foi de forma similar convertida ao formato PDB. Ambas as estruturas foram carregadas como arquivos de entrada no servidor online PachDock.¹¹² Em seguida, para a realização da simulação de interações hóspede-hospedeiro manteve-se o algoritmo do servidor no status “default”. As 100 poses foram geradas, mas apenas as 10 melhores pontuadas foram selecionadas para uma inspeção visual. Finalmente, as imagens com de alta resolução foram obtidas no software Biovia DSV.

2.2.7 Ensaio de encapsulação do fármaco CCM

O fármaco CCM foi encapsulado na matriz, com base na metodologia utilizada por Haydar e colaboradores.¹¹³ Em suma, dissolveu-se 50 mg de CCM em 10 mL de metanol, para obtenção de uma solução de 5 mg/mL de CCM. Após completa dissolução do fármaco, 50 mg da matriz RCA-1 foi dispersa nesta solução. O recipiente foi fechado e mantido sob agitação por períodos de contato de 1 e de 3 dias. Ao final, as suspensões de coloração alaranjada foram centrifugadas a 9.000 rpm por 15 min. Os sobrenadantes foram recolhidos e submetidos à análise de CLAE-DAD para determinação indireta da quantidade de CCM adsorvida. Os pellets obtidos após a centrifugação foram lavados três vezes para retirada do excesso de CCM contido nos materiais, sendo a cada lavagem ressuspensão em metanol e centrifugado. Após as lavagens, os pellets foram secos em dessecador e submetidos à espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios-X de pó e análise térmica. Depois desse processo, os pellets foram chamados de CCM@RCA-1D e CCM@RCA-3D, para as amostras obtidas após, respectivamente, um e três dias de contato da curcumina com a matriz porosa.

2.2.8 Funcionalização da matriz com ácido fólico

A funcionalização da matriz contendo CCM encapsulada (amostra CCM@RCA-1D) com folato foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Chowdhuri e colaboradores¹¹⁴ que consiste na ativação do ácido fólico através da adição de NHS e EDC. Primeiramente, foi

dissolvido 25 mg de ácido fólico em 10 mL de uma mistura 50:50 (v/v) de DMSO e água ultrapura. O pH da solução foi mantido entre 7,5 - 8,5 por adição de uma solução de NaOH (1 mol/L) e em seguida adicionou-se 50 mg de EDC e 50 mg de NHS. A ativação do ácido fólico foi mantida no escuro durante 3h a 30 °C. Em seguida, foram adicionados 15 mg do composto CCM@RCA-1D à respectiva solução ativada com folato. A reação ficou sob agitação no escuro por 12 horas. Após o período reacional, o material obtido (CCM@RCA-1D/FA) de coloração laranja-avermelhada foi lavado várias vezes e então seco à vácuo. A eficiência de funcionalização foi avaliada por RMN.

2.2.9 Ensaio de liberação do fármaco CCM *in vitro*

O estudo *in vitro* do perfil de liberação, visando avaliar a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo, foi desenvolvido de acordo com o estudo de Tiwari e colaboradores.¹⁶ A liberação do fármaco foi realizada com estímulos de pH em condições ácidas (pH=5) e fisiológicas (pH=7,4) em solução de tampão fosfato salino (PBS) acrescida de Tween-20 (0,5 v/v %). Inicialmente foram dissolvidos 2 mg dos compostos CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA em 12 mL de solução de PBS + Tween-20 sob agitação 500 rpm a 37 °C. Após intervalos de tempos selecionados (0,5 – 132 h), as amostras foram centrifugadas e uma alíquota de 1 mL dos sobrenadantes foi retirada para determinação do teor de CCM. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de tampão PBS + Tween-20 ao meio para reposição. As alíquotas retiradas foram então submetidas à análise de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da quantidade de CCM liberada.

2.2.10 Aplicação biológica *in vitro*

2.2.10.1 Ensaio de viabilidade celular

Em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e a aluna de doutorado Raquel Santos Faria, do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, foram realizados ensaios de viabilidade celular. Para avaliar a atividade citotóxica dos compostos obtidos neste trabalho, foi utilizado o método colorimétrico do MTT. O princípio desse método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Para a realização deste teste foram utilizadas três linhagens celulares tumorais de mama: MCF-7 (ATCC HTB-22™), MDA-MB-231(ATCC HTB-26™) e

4T1(ATCC CRL-2539™) e uma linhagem não tumoral murina de fibroblasto embrionário NIH/3T3 (ATCC CRL-1658™).

Em suma, 5×10^3 de células foram plaqueadas em placas de 96 poços na ausência ou presença do composto em diluição seriada (3,125 – 1000 µg/mL). Para as diluições utilizou-se o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementados com 0,4% de DMSO e 0,025% Tween-80. Após tratamento de 24 horas, as células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao final do período de incubação, foram adicionados aos poços de cultivo celular 15 µL de MTT na concentração de 5 mg/mL, e após 3 h de incubação com o MTT, foram acrescentados 150 µL DMSO. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro a 595 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da Equação 2:

Equação 2: % Viabilidade = Absorbância do Tratamento/Absorbância do controle negativo*100

O valor de IC₅₀ (concentração em µg / mL que inibe 50% da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.2.10.2 Ensaio de morte celular

Em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e a aluna de doutorado Raquel Santos Faria, do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, foi realizado este ensaio para identificar o tipo de morte induzida pelos tratamentos com as matrizes (CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA). Para isso, foram realizadas as marcações em dois tipos celulares (MCF-7 e 4T1) com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI). Com esse experimento é possível identificar células em apoptose, necrose e células viáveis. Foram plaqueadas 1×10^5 células em placas de 12 poços. As células foram tratadas com CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA nas concentrações de 55,3 µg/mL e 38,7 µg/mL para as células MCF-7 e 103,2 µg/mL e 108,6 µg/mL para as células 4T1, respectivamente. Após tratamento, as células foram tripsinizadas e o pellet das células foi ressuspensão em 500 µL de PBS gelado e centrifugado a 2000 rpm, por 5 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, 100 µL de tampão de ligação (0,1 M de Hepes (pH 7,4), 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl₂) foi adicionado ao pellet. Em seguida, foram acrescentados em cada microtubo 5 µL de solução de Anexina V e 10 µL de solução de PI (50 µg/mL). Os microtubos foram deixados por 15 minutos protegidos

da luz e em temperatura ambiente. Por fim, 300 μL de tampão de ligação foram acrescentados. As amostras foram colocadas em gelo e a aquisição dos dados foi feita no citômetro FACSCalibur com o auxílio do software *CellQuest-Pro*. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um agente oxidante que age diretamente na membrana lipídica e no DNA, levando a ruptura da membrana, ocasionando morte celular por necrose. Este, na concentração de 29,4 μM , foi utilizado como controle positivo do experimento.

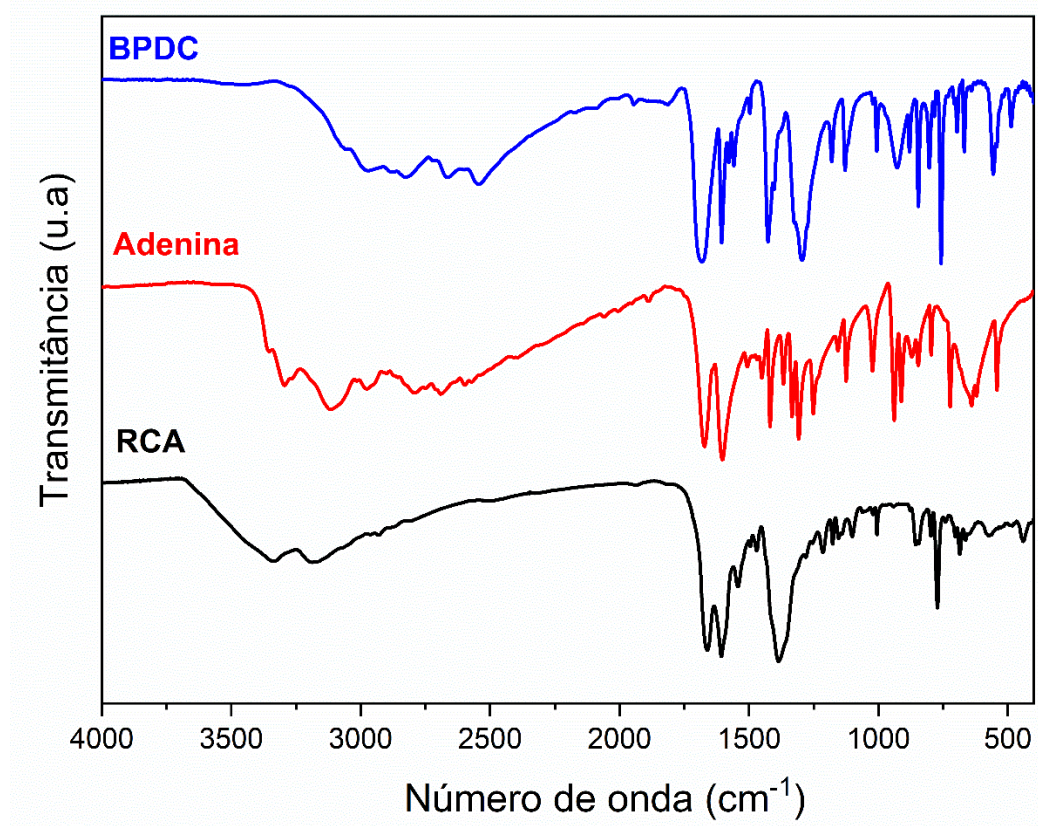
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterizações do composto RCA

❖ Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)

O espectro vibracional na região do infravermelho do composto RCA está ilustrado na Figura 7.

Figura 7. Espectro vibracional no infravermelho do composto RCA.



Fonte: Autor

As bandas e respectivas atribuições referentes às frequências vibracionais do material obtido, bem como aquelas descritas na literatura, estão compiladas na Tabela 3.

Tabela 3. Principais frequências na região do infravermelho do material obtido (RCA) e o da literatura (bioMOF-100).¹⁰⁶

Atribuição	Número de onda/ cm^{-1}	
	bioMOF-100	RCA
$\nu_{\text{as}}\text{NH}$	3341 <i>br</i>	3335 <i>br</i>
$\nu_{\text{s}}\text{NH}$	3185 <i>br</i>	3184 <i>br</i>
$\nu\text{CH}_{\text{alifático}}$	2929 <i>w</i>	2927 <i>w</i>
$\nu\text{C=O} + \delta\text{NH}_2$	1669 <i>s</i>	1665 <i>s</i>
$\nu\text{O-C=O} + \nu\text{C=N} + \nu\text{C=C}$	1607 <i>s</i>	1607 <i>s</i>
$\delta\text{C-NH}$	1547 <i>w</i>	1543 <i>m</i>
$\delta_{\text{np}}\text{OH} + \delta\text{N=CH}$	1467 <i>w</i>	1467 <i>w</i>
$\gamma\text{C-H}$	1386 <i>s</i>	1384 <i>s</i>
$\nu\text{C-O}$	1255 <i>w</i>	1255 <i>w</i>
$\nu\text{C-NH}_2$	1212 <i>m</i>	1215 <i>m</i>
$\delta_{\text{np}}\text{C}_{\text{Ar-H}} + \delta\text{C-N=C} + \nu\text{C-N=C}$	1176 <i>w</i>	1171 <i>w</i>
$\delta_{\text{np}}\text{C}_{\text{Ar-H}} + \delta\text{C-N=C} + \nu\text{C-N=C}$	1152 <i>m</i>	1153 <i>w</i>
$\delta_{\text{np}}\text{C}_{\text{Ar-H}} + \delta\text{C-N-C}$	1097 <i>m</i>	1099 <i>m</i>
$\nu\text{NC} + \gamma\text{NH}_2$	856 <i>m</i>	857 <i>m</i>
$\nu\text{NC} + \gamma\text{NH}_2$	843 <i>m</i>	843 <i>m</i>
$\delta_{\text{fp}}\text{C}_{\text{Ar-C}_{\text{Ar-C}_{\text{Ar}}}}$	773 <i>s</i>	774 <i>s</i>

ν = estiramento, δ = deformação angular, γ = deformação fora do plano.

b = broad, *m* = médium, *s* = strong, *v* = very, *w* = weak, *np* = no plano, *fp* = fora do plano.

Fonte: Autor

Com base nas atribuições contidas na Tabela 3 e na observação do espectro vibracional mostrado na Figura 7, pode-se inferir por esta técnica que muito provavelmente houve a formação do material desejado. Pode ser observada a presença de ambos os ligantes adenina ($\nu_{\text{as}}\text{NH}$ em 3335 cm^{-1} e $\nu_{\text{s}}\text{NH}$ em 3184 cm^{-1}) e BPDC ($\nu\text{C=O}$ em 1665 cm^{-1} e $\nu\text{C-O}$ em 1255 cm^{-1}) na esfera de coordenação do composto. As bandas observadas no espectro vibracional do material sintetizado nesse trabalho estão bem próximas àsquelas presentes no espectro da

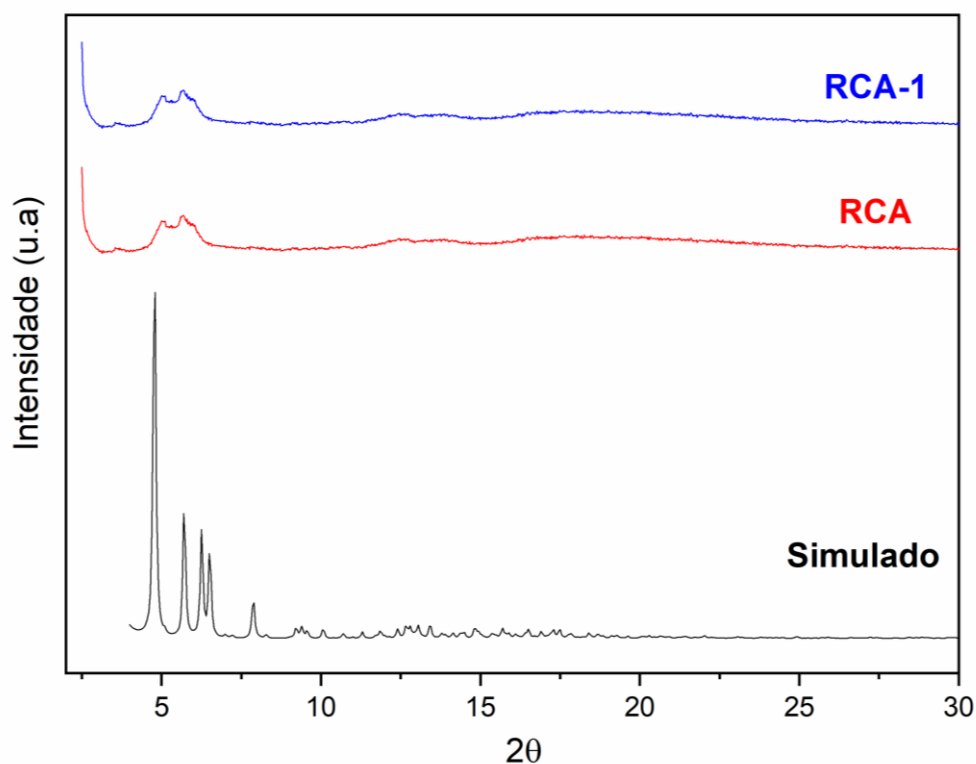
bioMOF-100 reportado por An e colaboradores¹⁰⁶ o que sugeria, em uma primeira análise, o sucesso na obtenção da fase desejada.

❖ Difração de raios-X de pó (DRX)

Uma vez que a síntese utilizada neste trabalho foi uma adaptação daquela reportada na literatura,¹⁰⁶ houve a necessidade de verificar se o padrão de difração se manteve inalterado.

A Figura 8 apresenta os padrões de difração das amostras RCA (em vermelho), RCA-1 (em azul) e o padrão de difração da bioMOF-100 (em preto) obtido através da base de dados Inorganic Crystal Structure Database (ICSD).

Figura 8. Perfis de difração de raios-X de pó para a bioMOF-100: simulado pelo ICSD (número da ficha: 833315), sólido obtido tal como sintetizado (RCA) e ativado (RCA-1).



Fonte: Autor

Comparando os difratogramas, é possível verificar que o RCA apresenta um perfil cristalino diferente daquele observado no difratograma do composto bioMOF-100. No difratograma do material sintetizado neste trabalho, é possível verificar apenas a presença dos dois primeiros picos de difração no mesmo valor de 2θ ($4,98^\circ$ e $5,70^\circ$) do material simulado. Além disso, houve um alargamento destes picos e uma diminuição de suas intensidades,

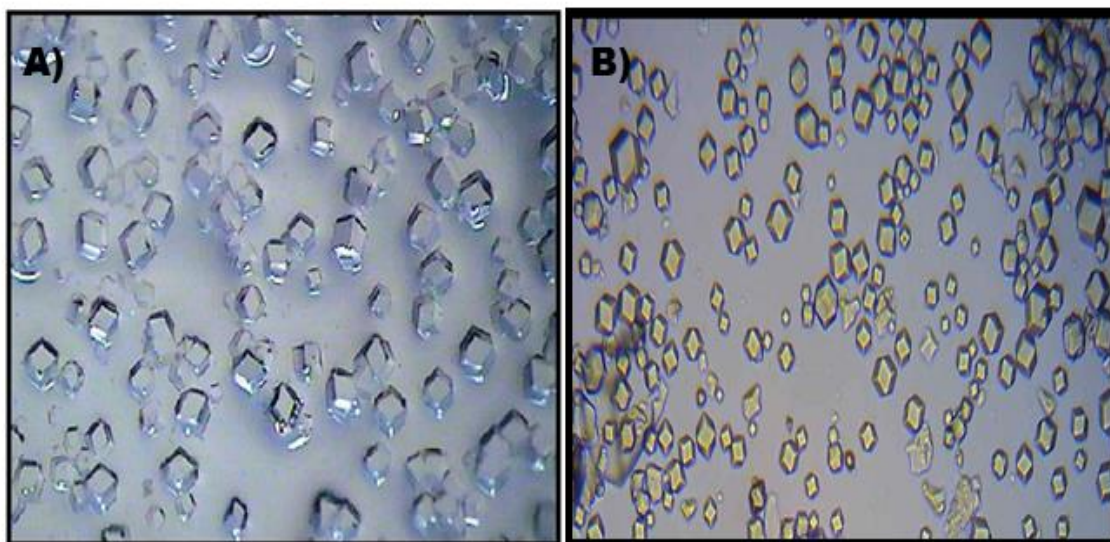
indicando que houve uma modificação na estrutura do material que será posteriormente confirmada com os dados de análise elementar e modelagem molecular.

Por outro lado, após o processo de ativação (160 °C, 24h, vácuo) a amostra RCA-1 manteve o mesmo padrão de difração observado para o composto de origem, sendo este um resultado bastante positivo, posto que revela que o processo de ativação não alterou a natureza cristalina do composto.

❖ Microscopia óptica de luz polarizada

Através da microscopia óptica foi possível observar que os cristais do composto RCA apresentam a mesma morfologia cúbica que os cristais da bioMOF-100 como mostrado na Figura 9.

Figura 9. Microscopia óptica de luz polarizada dos compostos solvatados: A) bioMOF-100¹⁰⁶, B) RCA.

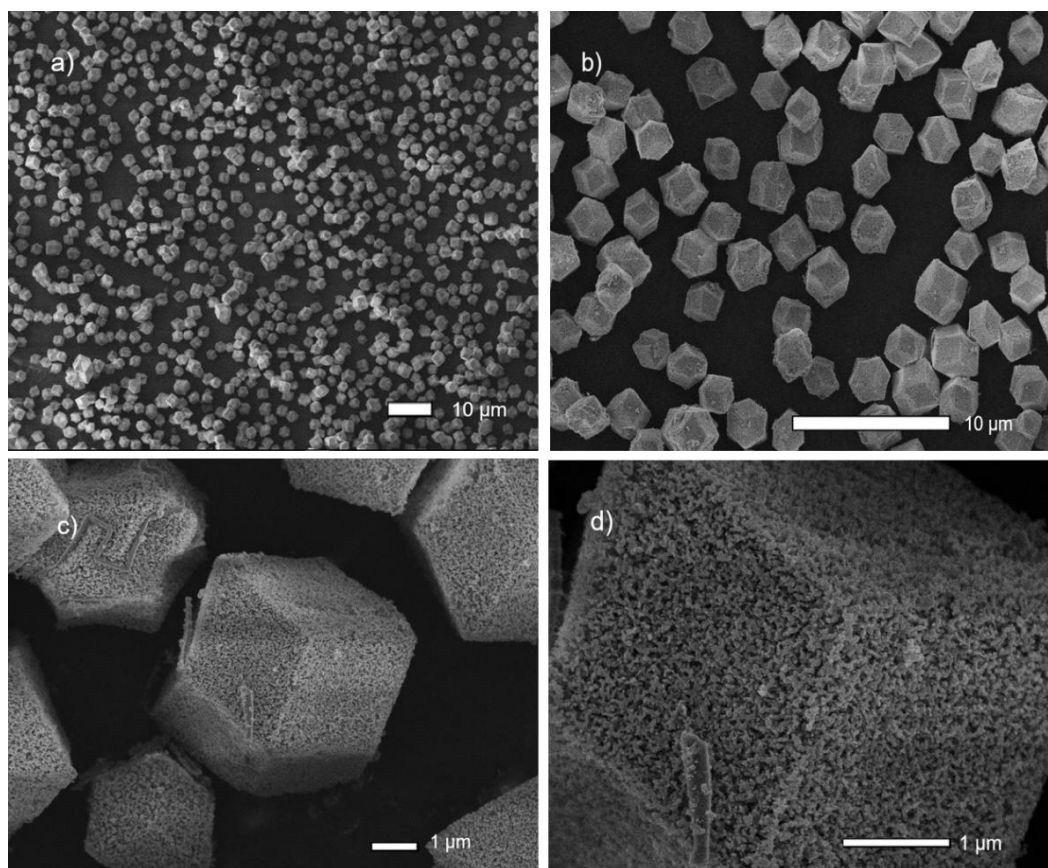


Fonte: Autor

❖ Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)

Para avaliar a morfologia, o tamanho médio e a textura das partículas referentes ao sólido obtido neste trabalho, foi utilizada a técnica de MEV-FEG como mostrado na Figura 10.

Figura 10. Imagens MEV-FEG do composto RCA obtido nesse trabalho.



Fonte: Autor

As imagens MEV-FEG mostram que o composto RCA é formado por unidades nanométricas de baixa cristalinidade, que se organizam para formar partículas com morfologia cúbica (como já evidenciado pela microscopia óptica, ver Figura 9). Além disso, pode ser verificada também uma relativa homogeneidade de tamanho, que varia aproximadamente de 2 a 4 micrômetros. Além disso, através dessas imagens foi possível verificar uma alta porosidade de superfície (poros do tipo interpartícula), o que propiciou a investigação do material como um sistema de liberação de fármaco.

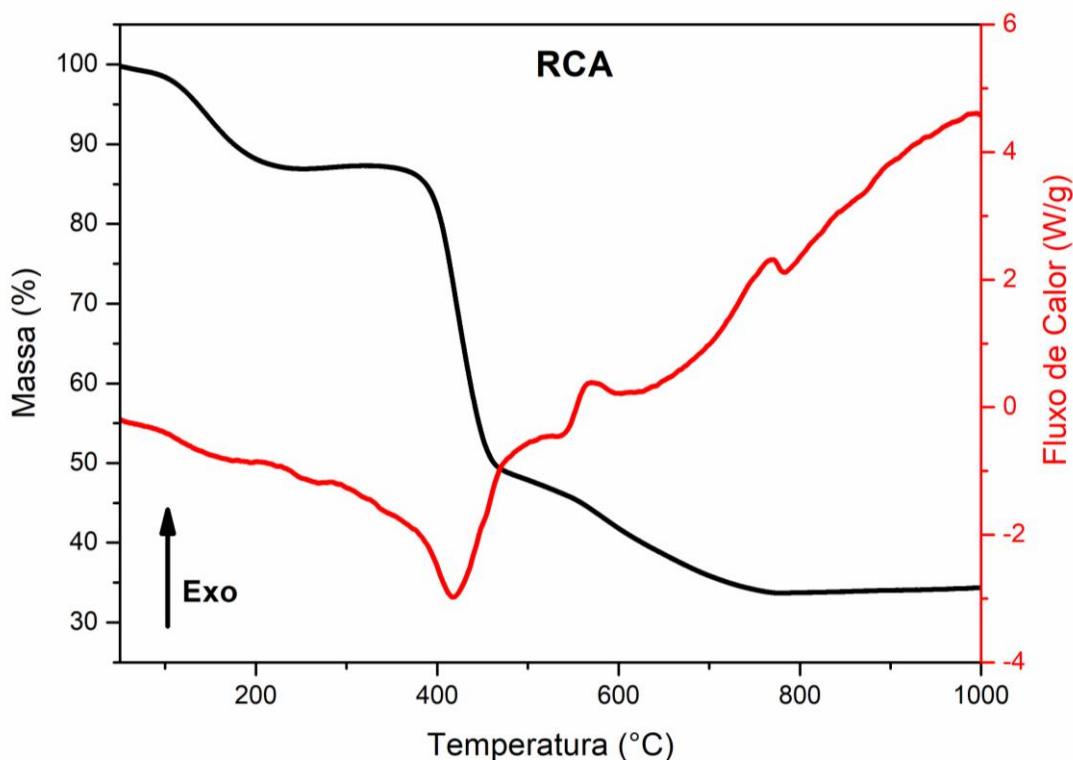
❖ Análise Térmica

A Figura 11 apresenta as curvas TG-DSC do composto RCA. A curva TG mostra perdas de massa em três etapas, apresentando dois patamares bem definidos. A perda de massa observada no início do aquecimento, entre 30-113 °C (3,84%) pode ser atribuída a desidratação do material. A segunda perda de massa de 11,43%, observada entre 113-374 °C, sugere a eliminação do solvente DMF e de cátions dimetilamônio, oriundos da decomposição térmica do DMF em condições solvotérmicas. A terceira perda de massa de 50,75%, observada entre

374 e 782 °C, correspondente ao pico endotérmico na curva DSC em 417 °C, seguidos de dois eventos exotérmicos em 571 e 767 °C, os quais podem ser referentes à decomposição dos dois ligantes, seguida da pirólise do material. Sugere-se a formação de óxido de zinco (ZnO) como resíduo estável final (33,98 % em massa).

A temperatura onset (T_{onset}) encontrada para o RCA, que tem sido utilizada como indicativo da estabilidade térmica de um composto, é de 374 °C.

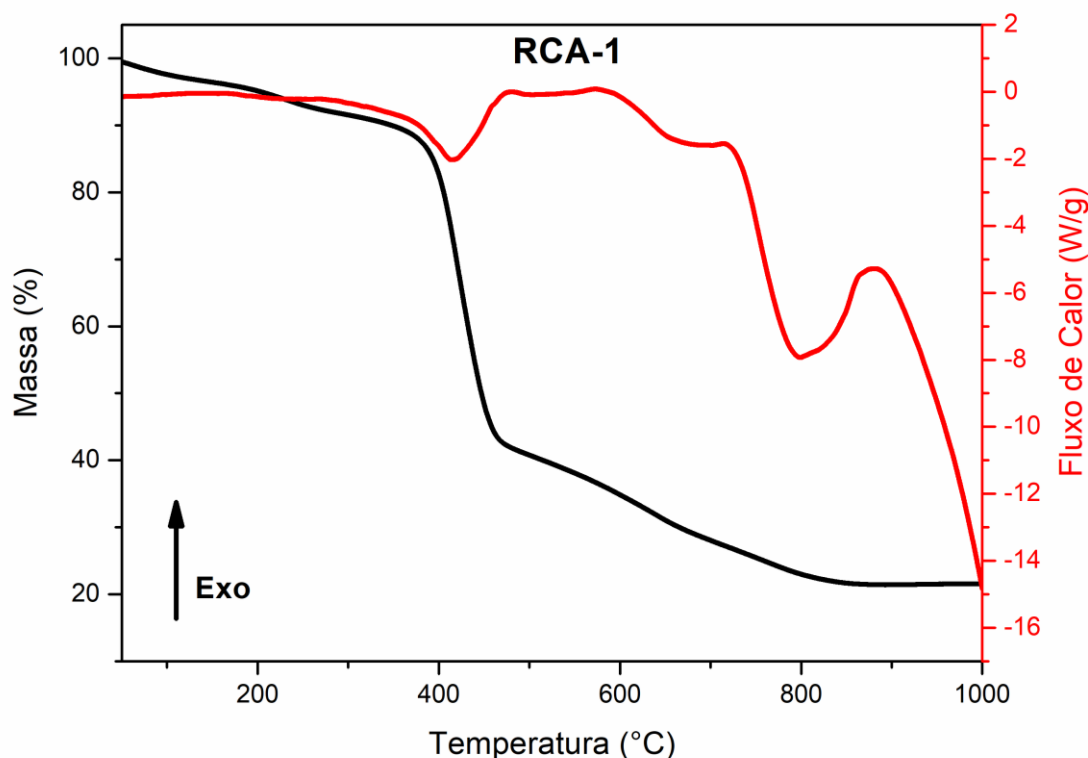
Figura 11. Curvas TG-DSC obtidas para o composto RCA.



Fonte: Autor

A Figura 12 apresenta as curvas TG-DSC do composto RCA-1. Após o processo de ativação, realizado via aquecimento a 160 °C por 24 horas sob vácuo, foi possível observar a variação da T_{onset} de 374 → 355 °C e também uma perda de massa de 10,65% entre 30-355 °C referente à saída das moléculas de solvente. Essa perda de 10,65% apresentada na curva TG da amostra RCA-1 é inferior à diferença de massa de 15,27% observada na curva termogravimétrica do composto RCA (no intervalo de temperatura entre 30 °C e a T_{onset}), demonstrando que o processo de ativação foi eficiente (mas não completo) na remoção das moléculas de solvente oclusas na estrutura porosa do material.

Figura 12. Curvas TG-DSC obtidas para o composto após o processo de ativação (amostra RCA-1).



Fonte: Autor

Vale ressaltar que ambas as curvas TG mostradas nas Figuras 11 e 12 referentes ao material sintetizado neste trabalho estão de acordo com os dados da literatura.¹⁰⁶ A T_{onset} atribuída por An e colaboradores para a bioMOF-100 é de 350 °C, que corrobora com os dados apresentados, uma vez que houve um aumento da taxa de aquecimento das curvas apresentadas, o que ocasionou um pequeno deslocamento do gráfico, ocasionando um leve aumento da T_{onset} do material sintetizado.¹¹⁵

❖ Análise elementar e fórmula mínima

Uma vez que o material sintetizado possui um perfil cristalino diferente da bioMOF-100, foi realizada a análise elementar do composto RCA para avaliar o teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio e posterior comparação com os dados obtidos na literatura. Para determinar o teor de zinco contido na amostra foram utilizadas as seguintes técnicas: análise térmica e complexometria com EDTA.

A titulação complexométrica foi realizada em triplicata, sendo encontrado um valor médio de 16,25% de zinco. Pela análise térmica foi encontrado um valor médio de 15,67%. Uma vez que a diferença entre os valores das análises é de 0,6% e a análise térmica é uma

técnica mais precisa que a complexometria com EDTA, utilizou-se então o valor de 15,67% para o teor de zinco contido no composto RCA.

A Tabela 4 apresenta os resultados da análise elementar e do teor de zinco para esse material.

Tabela 4. Análise elementar para o RCA e a comparação com a bioMOF-100.

Resultados	% dos elementos				
	C	H	N	O*	Zn
RCA	46,78	4,08	11,90	21,57	15,67
bioMOF-100	45,43	7,51	14,84	24,59	7,63

%O = $\%(100 - \text{Zn} - \text{C} - \text{N} - \text{H})$

Fonte: Autor

A partir dos resultados analíticos mostrados na Tabela 4, bem como os dados espectroscópicos, foi possível propor para o composto RCA a fórmula mínima $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{Zn}$. Comparando os resultados obtidos com os dados da literatura¹⁰⁶ para a bioMOF-100 foi possível verificar que houve uma alteração na estrutura original, resultado esse que corrobora com os dados de difração de raios-X de pó mostrados na Figura 8.

2.3.2 Proposição estrutural do RCA utilizando método computacional

❖ Predição de polimorfos para a estrutura cristalina da bioMOF-100

A partir da imagem gerada por microscopia óptica, Figura 9b, foram observados os hábitos cristalinos do RCA que, tal qual a bioMOF-100, Figura 9a, apresenta uma morfologia cúbica e uma distribuição heterogênea de tamanho das partículas. Essas observações foram confirmadas pela análise de MEV-FEG (Figura 10a-d).

Não obstante, à 1 micrômetro de resolução, Figura 10d, a inspeção por MEV-FEG revelou uma natureza relativamente amorfa do RCA, ao passo que unidades nanométricas se agregam para compor as faces dos cubos. A baixa cristalinidade do RCA pode estar associada à larga cela unitária e baixa densidade cristalina (sugestivo de canais internos).¹⁰⁶ Como resultado, obtém-se a redução da resolução e intensidades dos picos de difração. Além disso, as cavidades em potencial podem conter solventes desordenados de baixa densidade molecular (ex. água e DMF), o que também influencia negativamente nas características da difração.¹¹⁶

Apesar disso, é importante notar que, no estado sólido cristalino, um mesmo composto (ou substância) pode apresentar diferentes conformações e/ou empacotamentos, gerando fases cristalinas distintas que culminam em diferentes propriedades físico-químicas.¹¹⁷ Dessa forma, a partir da estrutura cristalográfica da bioMOF-100, depositada no CCDC 833315, é observada a correlação não óbvia entre os dados de difração de raios-X de pó para o RCA e aqueles encontrados na literatura para a bioMOF-100. Assim, empregou-se a técnica *in silico* de geração de confôrmeros,^{108,118} para um melhor entendimento acerca do polímero de coordenação obtido.

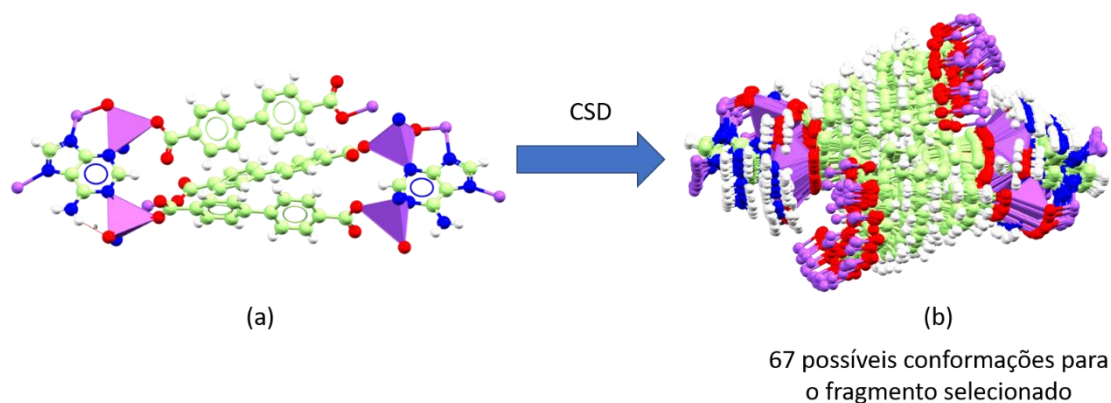
❖ **Análise conformacional e desenho da estrutura cristalina**

A capacidade de gerar prováveis confôrmeros a partir de uma molécula ou fragmento molecular é particularmente útil ao se realizar uma triagem de múltiplos componentes *in silico* com base na complementaridade molecular.¹¹⁹

A ferramenta “*conformer generator*” disponível no software CCDC Mercury 1 é capaz de gerar, para um modelo 3D de entrada, comprimentos e ângulos de ligação minimizados com base nos valores médios correspondentes, particionando em seguida a molécula em rotâmeros. De tal modo, bibliotecas de rotâmeros e modelos de anel baseados em estruturas depositados no CSD-system são utilizadas para gerar uma árvore de confôrmeros de alta probabilidade com geometrias de ligação rotativa preferenciais, não proibidas e geometrias de anel. Assim, um conjunto final de confôrmeros é agrupado (cluster) de acordo com a similaridade de conformação e otimizado localmente no espaço de torção. Embora o algoritmo de busca não utilize explicitamente parâmetros energéticos como critério, a apreciação estatística de conformações de alta e baixa probabilidades tem gerado conformações equivalentes às aquelas encontradas no CSD¹¹⁹ e no *Protein Data Bank*.¹²⁰

A bioMOF-100 apresenta como unidades básicas de repetição os vértices como blocos de construção zinco-adeninato octaédricos unidos por pontes de BPDC. A fim de serem obtidos possíveis confôrmeros, as coordenadas cartesianas dessa subunidade foram adotadas como estrutura de entrada (Figura 13a). O sistema truncado das SBU's não permite rotações ou variações nos ângulos de torção; logo, restrições conformacionais foram aplicadas para essas entidades moleculares antes do cálculo. De forma similar, foram conduzidas restrições para os anéis do BPDC devido à natureza química parcialmente dupla das ligações aromáticas. Finalmente, todas as ligações rotacionáveis foram consideradas livres.

Figura 13. (a) Fragmento de repetição da bioMOF-100 utilizando como modelo 3D de entrada para geração de confôrmeros. (b) Conjunto dos 67 confôrmeros gerados a partir da subunidade de repetição da bioMOF-100 (CCDC 833315). Na figura, íons de Zn (II) estão representados em cor roxa, átomos de N em azul, átomos de C em verde, átomos de O em vermelho e átomos de H em branco.



Fonte: Autor

Como resultado, foram obtidas 67 diferentes conformações cujas sobreposições se encontram disponíveis na Figura 13b. A etapa de triagem levou em consideração algoritmos baseados em conhecimento (biblioteca CSD) que escalonam entre 0 a 1 o nível de probabilidade das melhores conformações, ou seja, 0 = baixa correlação, 0,5 = aceitável e 1 = alta correlação.

Em seguida, uma nova triagem foi realizada levando-se em consideração o protocolo de desvio médio quadrático (RMSD) para os átomos pesados entre as estruturas geradas de maiores probabilidades e a molécula de referência. Como resultado, os confôrmeros 40, 14, 41, 12 e 19 os quais possuem maiores probabilidades, exibiram resultados de desvio inferiores a 1 Å, mostrados na Tabela 5. Isso sugere que a própria estrutura cristalina da bioMOF-100 já se configura em sua forma mais estável, sendo monofásica.

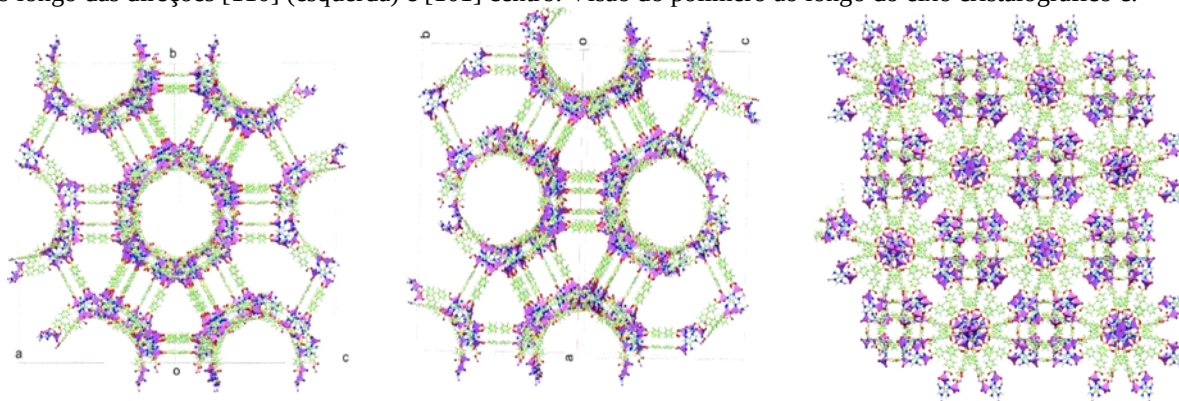
Tabela 5. Nível de probabilidade de correlação, identificação do confômero e desvio-médio quadrático entre o confômero e a subunidade de entrada.

Probabilidade	Confômero	RMSD /Å
1	40	0,8902
1	14	0,9107
1	41	0,9509
1	12	0,9808
1	19	0,9974

Fonte: Autor

Para confirmar essa observação, a conformação 19 foi adotada como “*template*” para expansão do polímero de coordenação, a qual exhibe o maior desvio em relação à estrutura modelo, ou seja 0,9974 Å. Como esperado, obteve-se uma estrutura cristalina similar à bioMOF-100 (Figura 14), a qual dispõe de um sistema cristalino cúbico de alta simetria e grupo espacial 230 ($Ia\bar{3}d$). São observados canais ao longo das direções cristalográficas [110] e [101]. Além disso, ao longo do eixo cristalográfico *c* podem ser identificados com nitidez as estruturas truncadas das SBU’s conectadas por pontes de BPDC.

Figura 14. Estrutura expandida do polímero de coordenação a partir do confômero 19. Visão dos canais largos ao longo das direções [110] (esquerda) e [101] centro. Visão do polímero ao longo do eixo cristalográfico *c*.

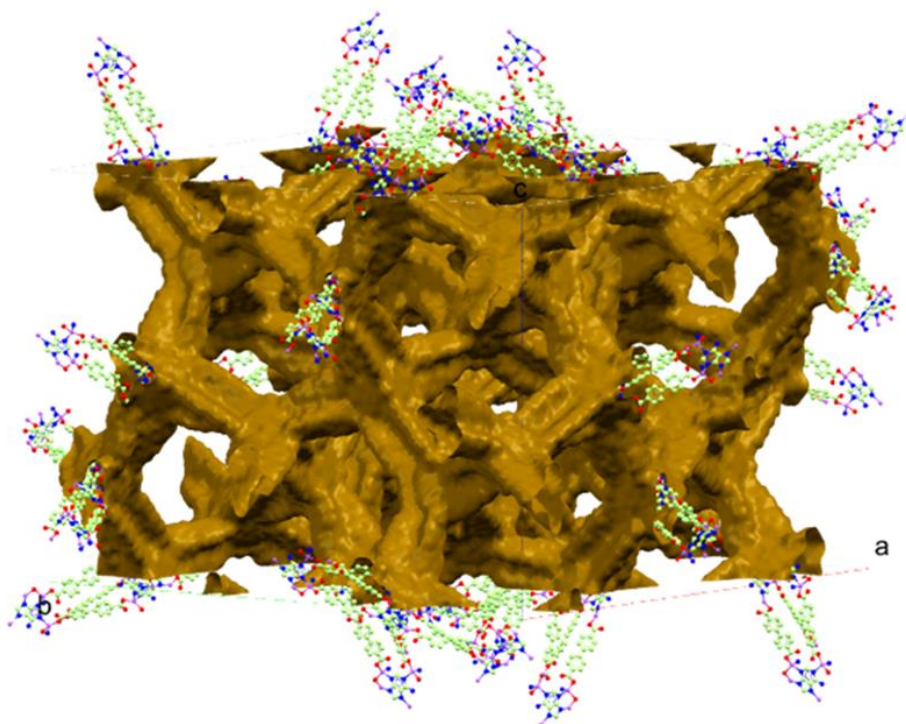


Fonte: Autor

❖ Análise de “voids”

A baixa densidade cristalina da estrutura simulada é confirmada pela análise das “voids”, ou seja, espaços vazios capazes de conter sondas esféricas de um dado raio,¹²¹ como pode ser observado na representação ilustrada na Figura 15.

Figura 15. Representação da estrutura cristalina simulada da bioMOF-100, a qual dispões de 85,5% de voids por cela unitária. A sonda utilizada consistiu em uma molécula esférica de $H_2(g)$ no estado gasoso, contendo 1,2 Å de raio.



Fonte: Autor

Neste trabalho foi utilizada a sonda de 1,2 Å referente a uma molécula de simetria quase esférica de $H_2(g)$. Foi verificado que 85,5 % da cela unitária consiste em “voids”. Em seguida, o mesmo protocolo foi aplicado para estrutura experimental da bioMOF-100, o qual apresentou um valor 75,3 % de “voids” por cela unitária. É sabido que cristais compactos com esse mesmo grupo espacial ($Ia\bar{3}d$) apresentam em média uma cela unitária com apenas 25,407 % de “voids”.

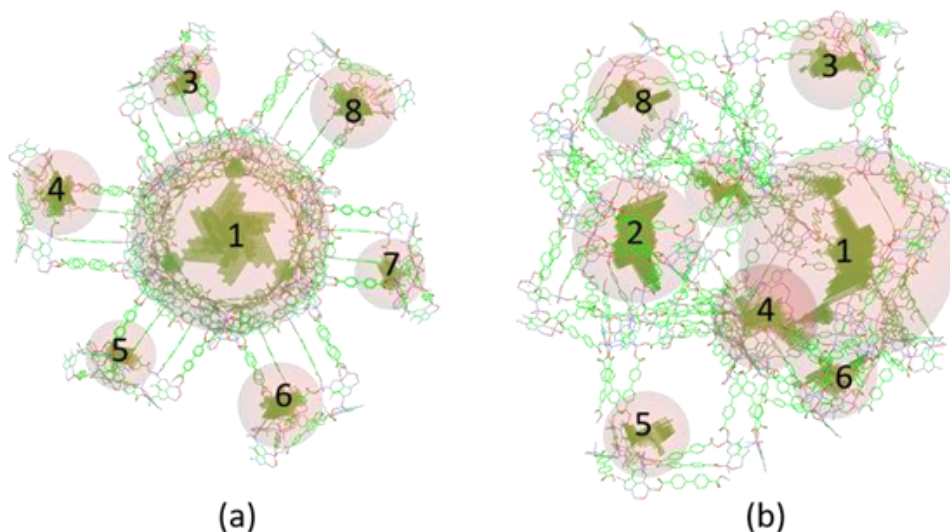
Logo, apesar da característica monofásica para a bioMOF-100, existe uma possibilidade de redução de sua cristalinidade por aumento da vacância de seus poros.¹²¹ Essa predição pode estar diretamente ligada às características de seus perfis de difração, sugerindo uma explicação para os resultados encontrados no difratograma (Figura 8) e imagens de MEV-FEG (Figura 10)

obtidas para o RCA, tendo em vista a formação de poros superficiais em potencial nas faces dos cubos com baixa resolução culminando na diminuição das intensidades dos picos de difração.

❖ Ancoragem molecular do tipo hóspede-hospedeiro

Para a análise de ancoragem molecular foi considerado um fragmento da estrutura modelada, a qual apresenta em sua cela unitária pelo menos oito cavidades disponíveis, as quais são relativas aos canais de solventes ao longo de [110], como ilustrado nas Figuras 16a-b. A partir da implementação do algoritmo de busca PatchDock¹¹² foram realizados cálculos de ancoragem (*docking*) para identificação dos potenciais sítios de ligação frente a uma molécula de solvente, DMF, previamente minimizada por método semi-empírico PM7.¹⁰⁹

Figura 16. (a-b) Cavidades acessíveis referentes aos canais de solventes existentes ao longo da direção cristalográfica [110].

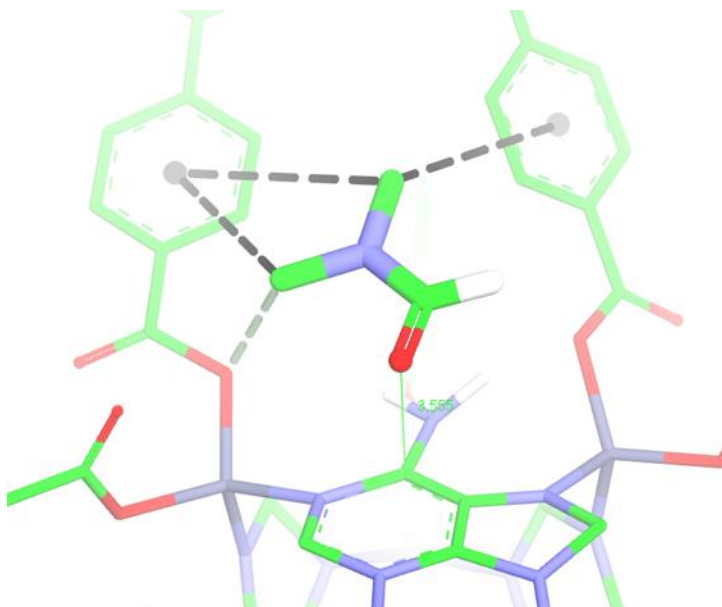


Fonte: Autor

Os resultados da ancoragem molecular para a pose melhor pontuada (ver Figura 17), revelam que a molécula de DMF oferece apropriada complementariedade aos bolsões de ligação da bioMOF-100 simulada, formando diferentes padrões de reconhecimento intermolecular.^{118,119,122,123} Interações de hidrogênio não clássicas do tipo C—H... π entre as metilas do DMF e o fragmento aromático do BPDC podem ser identificadas, assim como contatos do tipo C—H...O entre uma das metilas e um dos átomos de O do grupamento carboxilato do BPDC. Finalmente, embora em apropriada orientação, a distância entre o átomo de O do grupamento C=O do DMF e a centroide do anel aromático do adeninato consiste em

aproximadamente 3,56 Å, o que é maior em 0,34 Å da soma dos raios de van der Waals para as respectivas subunidades.^{124,125} Logo, não será considerada uma interação entre as partes (Figura 17).

Figura 17. Pose de ancoragem melhor pontuada para uma molécula de solvente DMF hospedada em um dos canais da estrutura simulada para a bioMOF-100. Todos os átomos de hidrogênio não polares foram suprimidos para melhor visualização. Na pose, os átomos de C estão representados em verde, átomos de N em azul, átomos de O em vermelho, íons de Zn (II) em cinza e átomos de H em branco. Os contatos intermoleculares estão representados por linhas tracejadas de cor preta.



Fonte: Autor

Tendo em vista que amplas vacâncias podem interferir na cristalinidade, a partir da análise da pose de ancoragem molecular é sugerida a importância do solvente na estabilização da estrutura cristalina. A molécula de DMF está intermediando uma maior compactação entre subunidades paralelas de BPDC, como mostrado na Figura 17. Logo, existe uma tendência de que após a remoção do DMF por aquecimento, haveria um aumento dos graus de liberdade do BPDC com consequente alargamento dos canais na estrutura. É importante salientar que o protocolo de ancoragem aplicado neste trabalho tratou ambos, hóspede e hospedeiro, em modo rígido.¹¹²

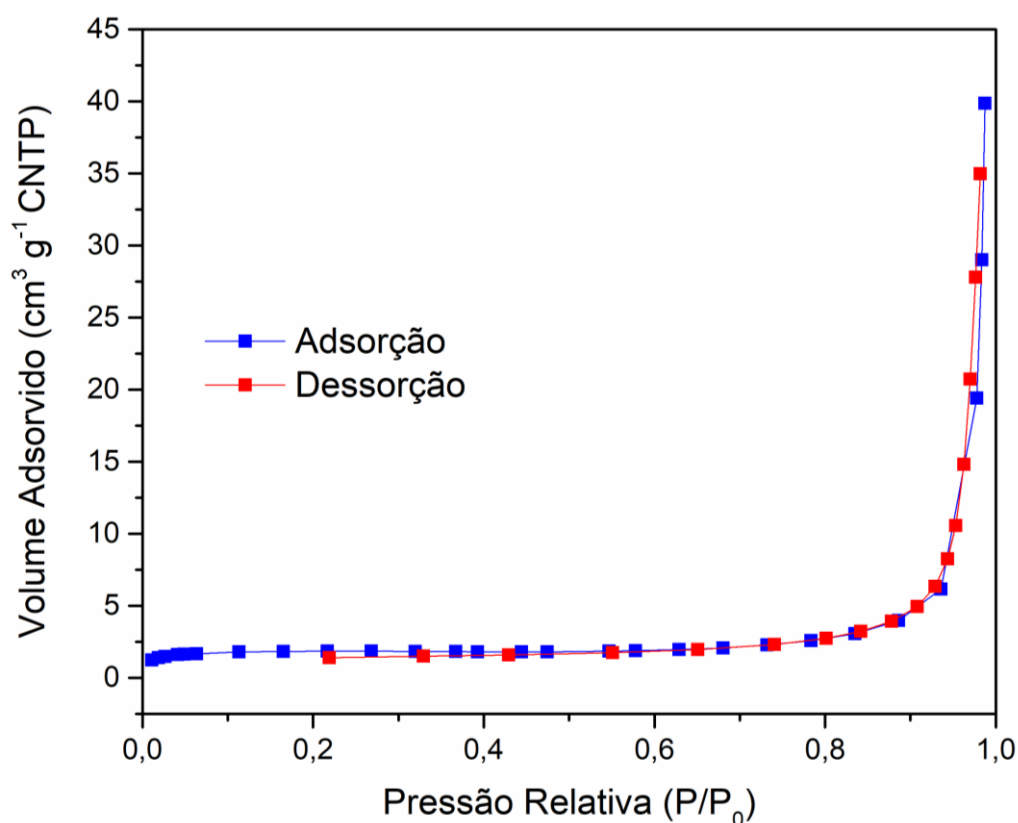
Com base nos resultados obtidos pelo método computacional, somado aos dados de análise elementar, podemos concluir que o composto RCA é um protótipo da bioMOF-100, por possuir características semelhantes da MOF. Porém, o aumento da vacância em seus poros acabou gerando uma diminuição e supressão de alguns picos de difração, além do fato da

presença de moléculas de solventes contidas em seus poros alterar a fórmula mínima do material.

2.3.3 Avaliação textural do composto RCA

A amostra RCA-1 foi submetida à medida de fisissorção de nitrogênio a 77 K para avaliação textural do material. As isotermas de adsorção/dessorção obtidas estão ilustradas na Figura 18.

Figura 18. Isotermas de fisissorção de N_2 para o composto ativado (amostra RCA-1).

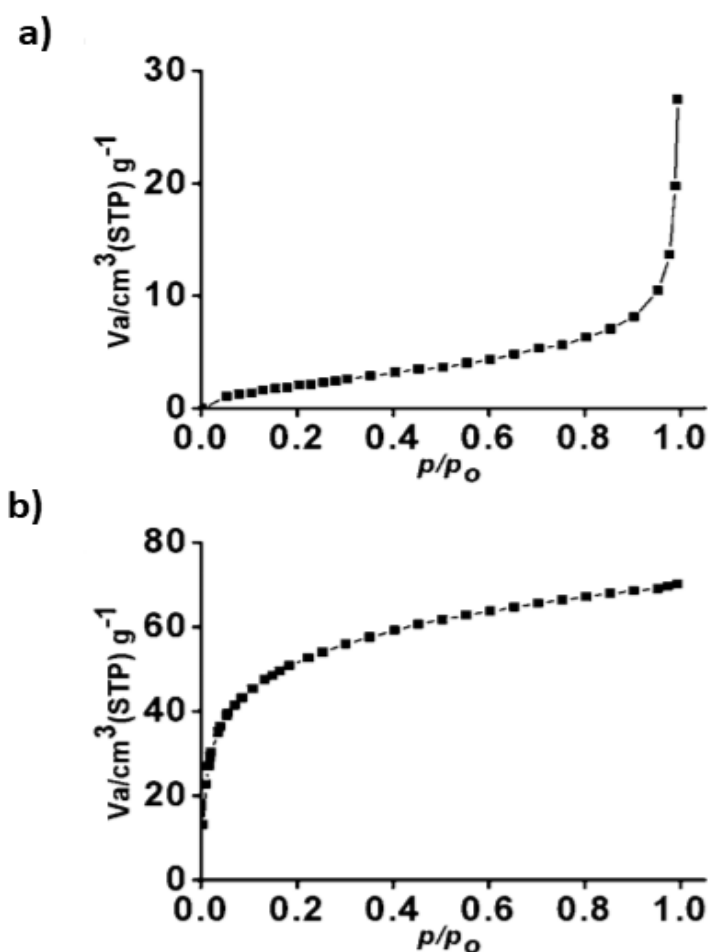


Fonte: Autor

Como ilustrado na Figura 18, observou-se uma isoterma com comportamento de adsorção de multicamadas. As áreas específicas de BET e Langmuir do composto RCA-1 são 5,32 e 7,90 m^2/g , respectivamente. Esses valores de áreas específicas podem ser explicados, pelo fato de conter na estrutura, moléculas de solventes aderidas aos poros, como mostrado nos resultados obtidos usando método computacional. A presença destas moléculas oclui os poros do material, dificultando a entrada do gás, culminando em valores baixos de áreas específicas.

Além disso, um outro fator deve ser levado em consideração nessa discussão. O tipo de gás utilizado nas medidas de adsorção/dessorção pode interferir no tipo de isoterma obtido. Como mostrado na Figura 19, Lee e colaboradores¹²⁶ realizaram medidas de adsorção com dois gases diferentes (CO_2 e N_2) para um mesmo composto e verificaram que houve uma maior adsorção em CO_2 , já que muito provavelmente a energia térmica é relativamente mais alta neste caso, sendo suficiente para superar a interação do quadrupolo.

Figura 19. (a) Isotherma de adsorção de N_2 para o composto CPP-9; (b) Isotherma de CO_2 para o composto CPP-9.



Fonte: Lee et al.¹²⁶

2.3.4 Ensaio de encapsulação do fármaco

Por se tratar de um protótipo da bioMOF-100, a matriz RCA foi submetida à ensaio de encapsulação do fármaco CCM, que possui um tamanho de 17,35 Å (1,735 nm), possibilitando então sua entrada nos poros do material. Além disso, o sistema pode interagir com a CCM por meio de interações intermoleculares como ligações de hidrogênio entre a carbonila dos grupos

carboxilatos presentes no ligante ponte BPDC do material e o grupamento hidroxila fenólico da CCM, auxiliando assim na sua encapsulação.

❖ Caracterizações do composto RCA após ensaio de encapsulação

Em um primeiro momento foram realizados vários testes para avaliar a eficiência de encapsulação (EE) do fármaco na matriz. Para isso alguns parâmetros foram testados como a razão entre o fármaco e a matriz, bem como o tempo de contato, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Testes para avaliação da eficiência de encapsulação.

Razão RCA:CCM	Tempo de Contato (dias)	EE (%)
1:1	1	32,80
1:3	1	32,75
1:3	2	38,82
1:3	3	44,00
1:3	4	41,06
1:3	7	17,66
1:4	4	12,19
1:4	7	23,65
1:2	7	25,13
2:1	7	23,67

Fonte: Autor

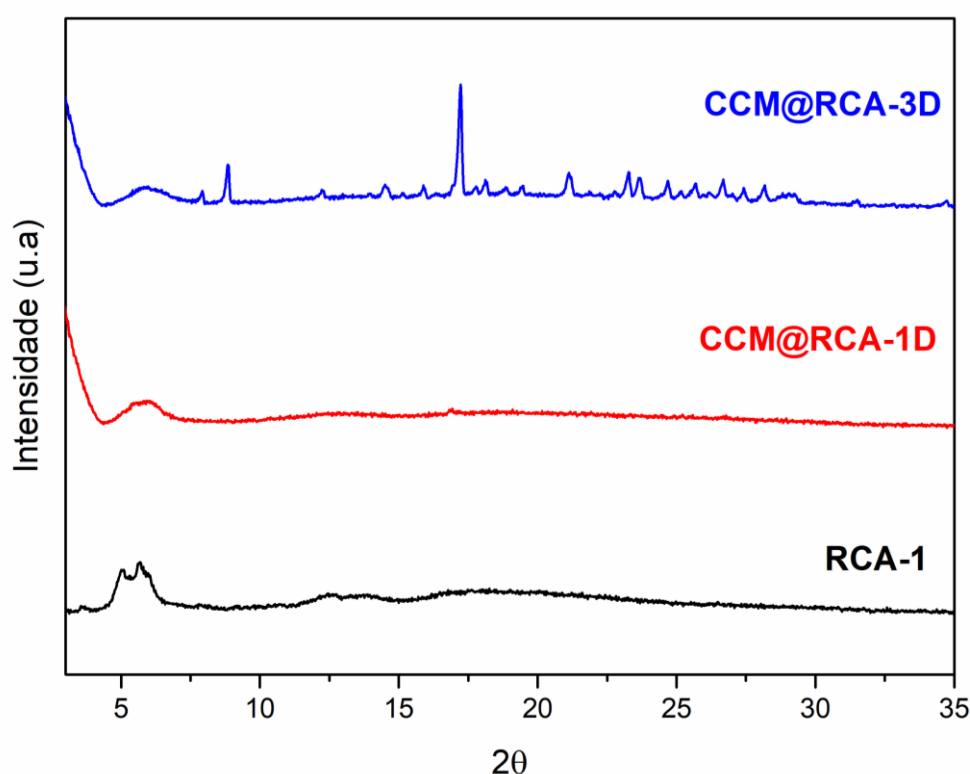
Como destacado em vermelho na Tabela 6, duas amostras foram selecionadas para posterior caracterização. Tais amostras foram escolhidas de acordo com dados contidos em literatura.^{86,113,127} Vale ressaltar que apesar do composto RCA apresentar grandes vacâncias com moléculas de solvente aderidas, sua eficiência de encapsulação foi bastante satisfatória uma vez que MOFs mesoporosas como o MIL-100 (Fe), por exemplo, possuem taxas de encapsulação dessa mesma ordem: 46 % e 26 % quando fármacos grandes como o flurbiprofeno (11,46 Å)¹¹³ e busulfan (13,4 Å)¹²⁷ são incorporados, respectivamente, nos poros da matriz com tempo de contato de 1 dia.

Diante disso, ambas as amostras foram então caracterizadas pelas técnicas de FTIR, difração de raios-X de pó, MEV-FEG e análise térmica para verificar se houve a entrada do

fármaco nos poros do material e se após incorporação não houve alteração da estrutura do material.

A Figura 20 ilustra os difratogramas de raios-X de pó do RCA-1, bem como dos materiais obtidos após incorporação da CCM com tempos de contato de 1 e 3 dias (amostras CCM@RCA-1D e CCM@RCA-3D, respectivamente).

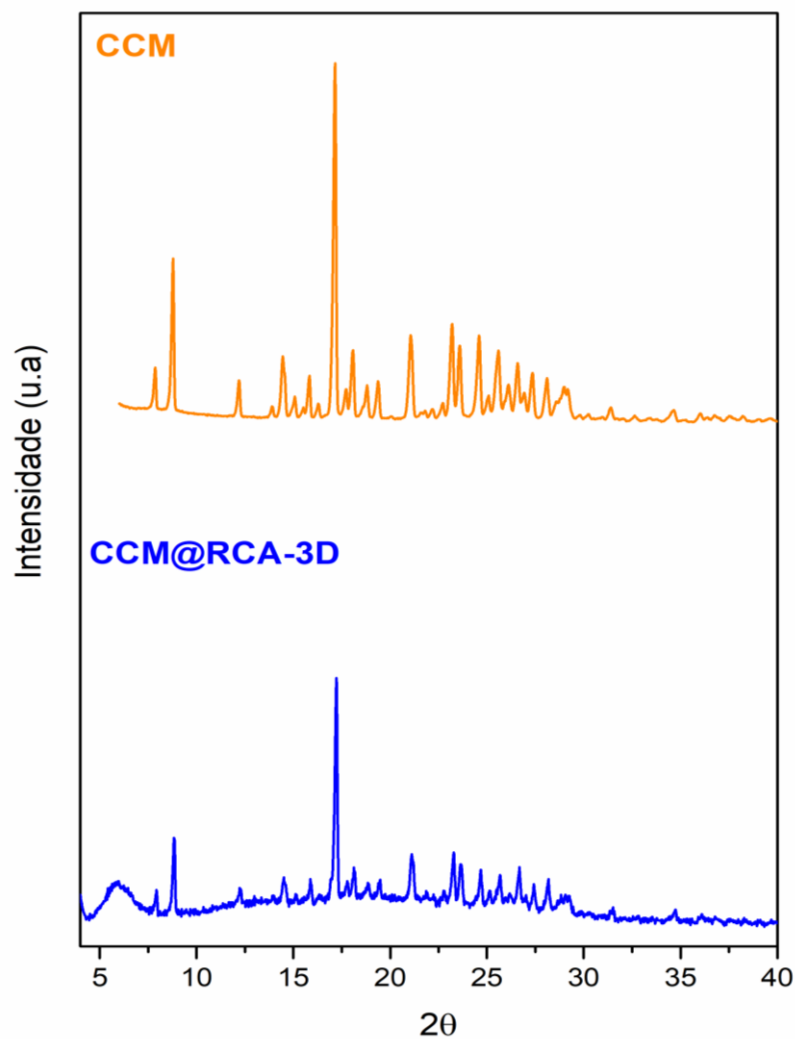
Figura 20. Padrão de difração de raios-X de pó das amostras RCA-1, CCM@RCA-1D e CCM@RCA-3D.



Fonte: Autor

Com base nos resultados obtidos por essa técnica, pode-se inferir que após o encapsulamento do fármaco, o padrão de difração do material CCM@RCA-1D manteve-se inalterado, indicando que o processo de encapsulação não alterou a estrutura da matriz metalorgânica. Já para o composto CCM@RCA-3D verificou-se que houve uma alteração no perfil do difratograma. Comparando o difratograma do composto CCM@RCA-3D com o difratograma da CCM livre, percebe-se que os picos adicionais que aparecem são da CCM livre, como mostrado na Figura 21. Segundo Vasconcelos e colaboradores¹²⁸ tal fato ocorre quando parte do fármaco fica adsorvida na superfície do material e não apenas incorporada nos poros.

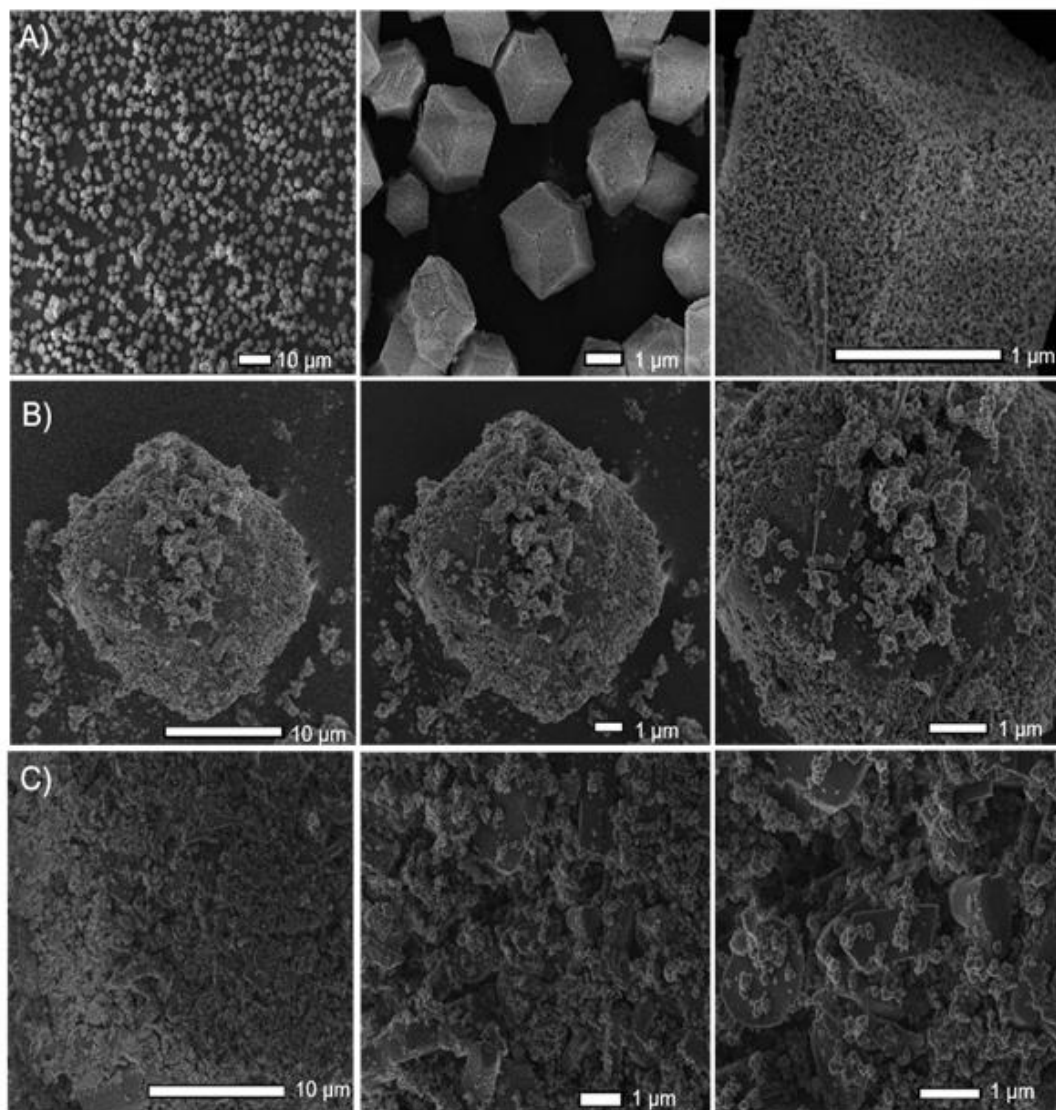
Figura 21. Padrão de difração de raios-X de pó da CCM livre e da amostra CCM@RCA-3D.



Fonte: Autor

Para avaliar se houve a ruptura da estrutura do material após o processo de encapsulação os materiais foram submetidos à análise de MEV-FEG, como mostrado na Figura 22.

Figura 22. Imagens de MEV-FEG para RCA: A) antes da incorporação de CCM; B) CCM@RCA-1D; C) CCM@RCA-3D.



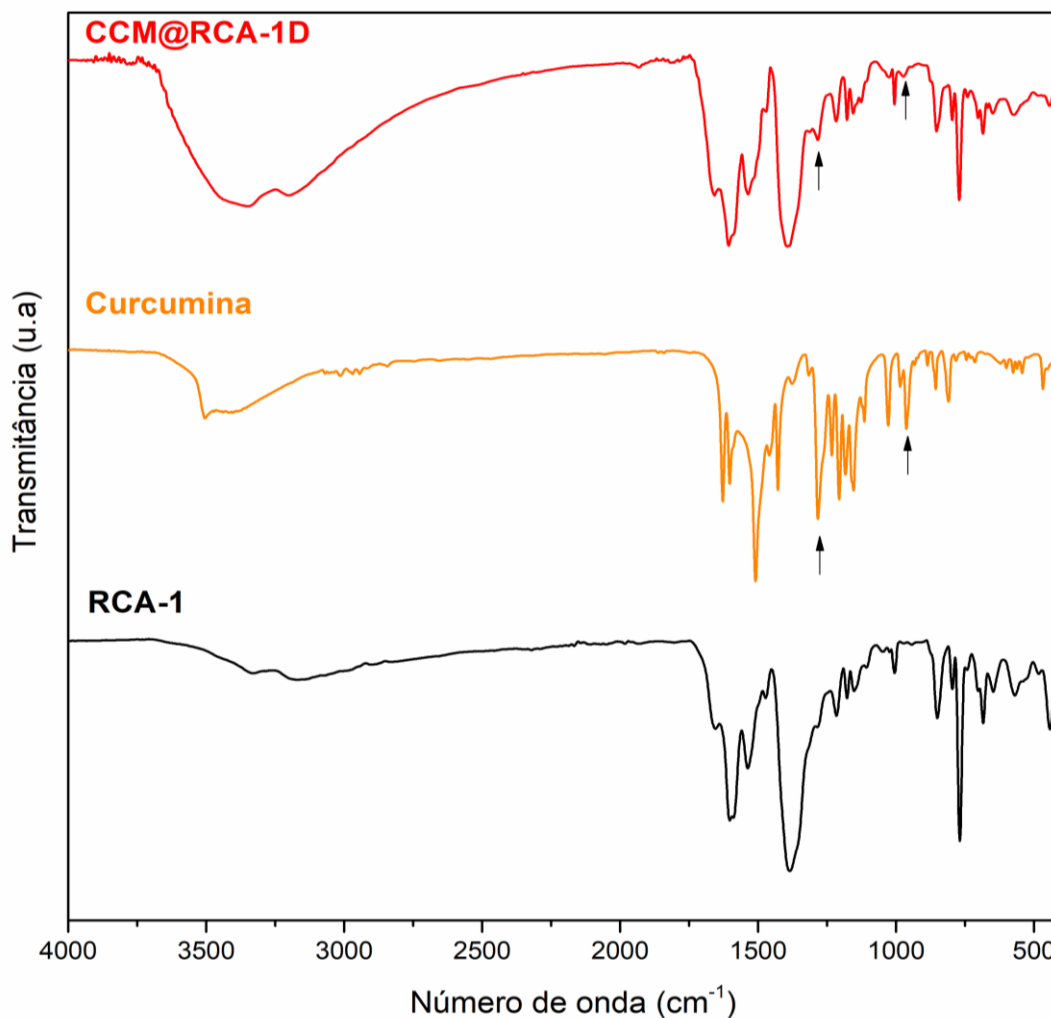
Fonte: Autor

Com base nas imagens de microscopia foi possível verificar que a morfologia cúbica do material foi mantida quando houve a incorporação do fármaco com tempo de contato de 1 dia (como mostrado na Figura 22 B), mas quando aumentou-se o tempo de contato para 3 dias, não há o aparecimento desta morfologia (como mostrado na Figura 22 C). Tal resultado evidência uma possível ruptura da estrutura do material. Desta forma, apesar do material CCM@RCA-3D ter apresentado uma EE maior que do material CCM@RCA-1D, não prosseguimos os estudos com este composto devido à perda de sua morfologia cúbica.

A Figura 23 mostra um estudo comparativo entre os espectros no infravermelho das amostras CCM@RCA-1D, CCM livre e RCA-1. Como destacado na figura, a presença do

fármaco na matriz pode ser observada pelo aparecimento das bandas em 1283 cm^{-1} , referente à deformação angular $\delta(\text{C}=\text{CH})$ e estiramento carbono-oxigênio da região enólica $\nu(\text{C}-\text{O})$, e em 973 cm^{-1} associada ao estiramento carbono-hidrogênio *trans* ao anel benzênico $\nu(\text{C}-\text{H})$.¹²⁹⁻¹³¹

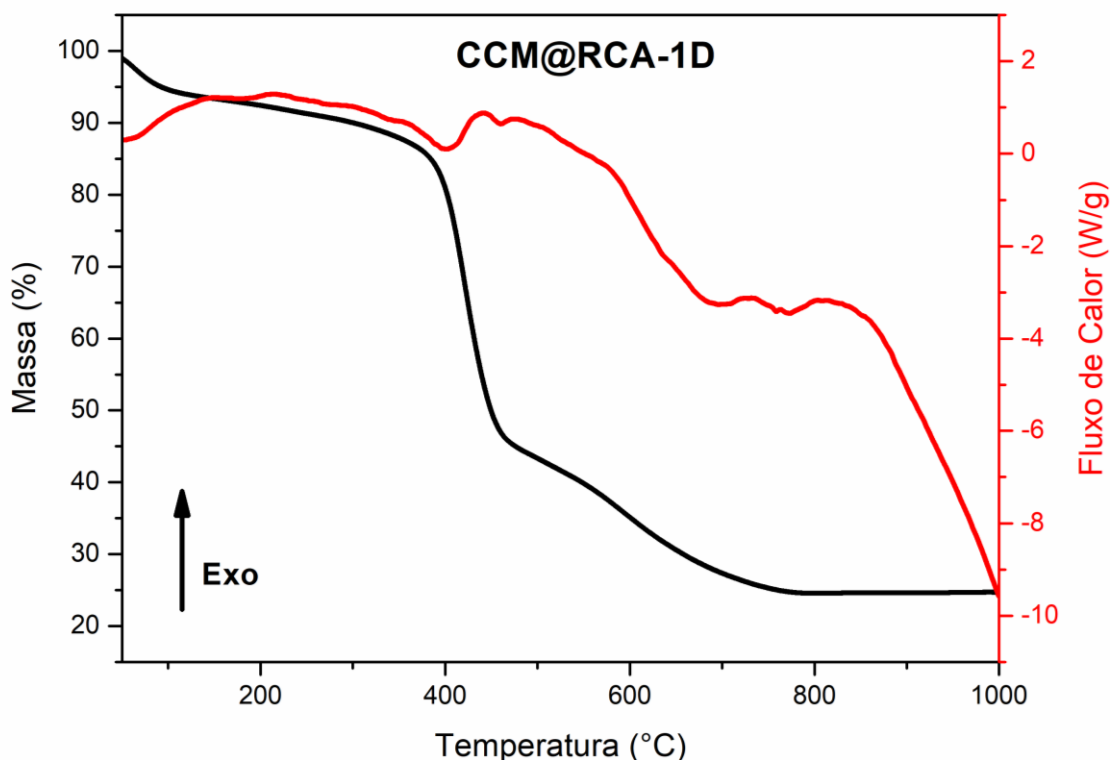
Figura 23. Espectros vibracionais no infravermelho dos compostos RCA-1, CCM livre e CCM@RCA-1D.



Fonte: Autor

A Figura 24 apresenta as curvas TG-DSC do composto obtido após ensaio de encapsulação da CCM com tempo de contato de 1 dia (CCM@RCA-1D).

Figura 24. Curvas TG-DSC para o composto CCM@RCA-1D.



Fonte: Autor

A curva TG apresenta perdas de massa em três etapas, sendo a primeira de 5,77% entre 30-110 °C, que pode ser atribuída à desidratação do material. A segunda perda de 6,07% de massa, observada entre 110-355 °C, sugere a saída de moléculas de solvente e moléculas de CCM retidas nos poros e/ou na superfície do material, uma vez que como mostrado na Figura 25, a decomposição térmica da curcumina inicia-se em 190 °C. Já a saída da matéria orgânica pode ser associada à perda de 63,06% da massa entre 355-790 °C. Na etapa final, é observada a formação do resíduo associado a 24,71% da massa do material.

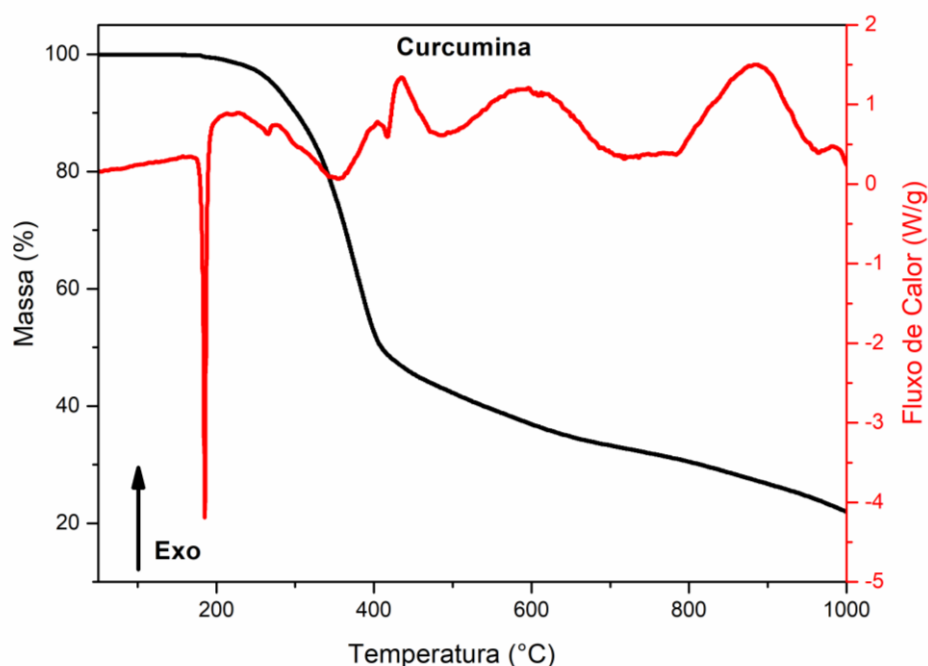
Para uma melhor avaliação dos resultados obtidos após o ensaio de encapsulação, a Tabela 7 resume os dados obtidos nas curvas TG-DSC para os compostos RCA-1 e CCM@RCA-1D.

Tabela 7. Dados referentes à termogravimetria (TG) dos compostos RCA-1 e CCM@RCA-1D.

Composto	Atribuição	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)
RCA-1	Solventes	T _{amb.} – 355	10,65
	Eliminação matéria orgânica	355 – 840	68,51
	Resíduo	840 – 1000	20,84
CCM@RCA-1D	Desidratação	T _{amb.} – 110	5,77
	Solvente + CCM	110 – 355	6,07
	Eliminação matéria orgânica	355 – 790	63,06
	Resíduo	790 – 1000	24,71

Fonte: Autor

Com base na Tabela 7, pode-se inferir que houve o aparecimento de uma perda de massa no composto CCM@RCA-1D que pode ser atribuída não só à saída de moléculas de solvente, mas também ao início da decomposição térmica do fármaco, pois como mencionado anteriormente sua decomposição inicia-se em 190 °C.

Figura 25. Curvas TG-DSC da CCM.**Fonte:** Autor

❖ Eficiência de encapsulação da CCM

Uma vez que os parâmetros de linearidade e precisão, determinados na validação do método analítico para quantificação do fármaco, estão de acordo com as normas da ANVISA (Brasil, 2017) foi possível então determinar a concentração de CCM contida no sobrenadante do composto RCA, a partir da equação da reta, mostrada no capítulo 4 desta Tese.

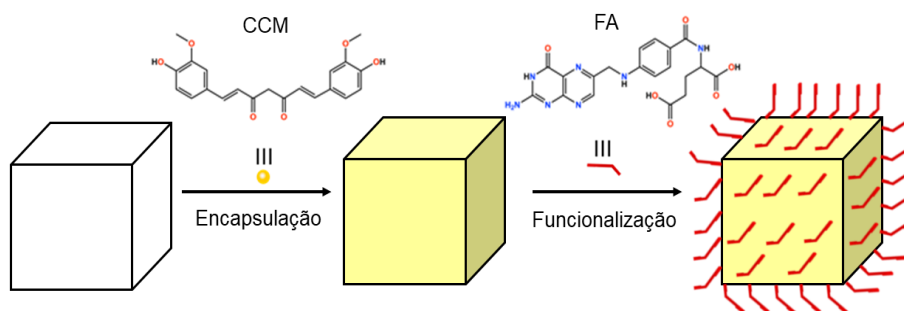
Substituindo o valor de y pela área medida e considerando o fator de diluição igual a 100, a concentração de CCM no sobrenadante para a amostra CCM@RCA-1D foi de 4,02 mg/mL. Como a concentração inicial da CCM era de 5 mg/mL, a concentração final do sobrenadante após 1 dia de contato para o material foi de 67,2 %. Desta forma, o composto CCM@RCA-1D apresentou uma EE de 32,80%.

2.3.5 Funcionalização do composto com ácido fólico

A espectroscopia de RMN de ^1H foi empregada para avaliar se houve o aparecimento de sinais característicos do ácido fólico no espectro da amostra CCM@RCA-1D/FA.

Uma vez que moléculas de CCM se encontram oclusas nos poros do material espera-se que as moléculas de ácido fólico (FA) fiquem localizadas na superfície da matriz, como mostrado na Figura 26, para que estas possam ser encontradas pelos receptores de ácido fólico presentes nas células tumorais e isso permita um maior direcionamento do carreador.^{5,27,28}

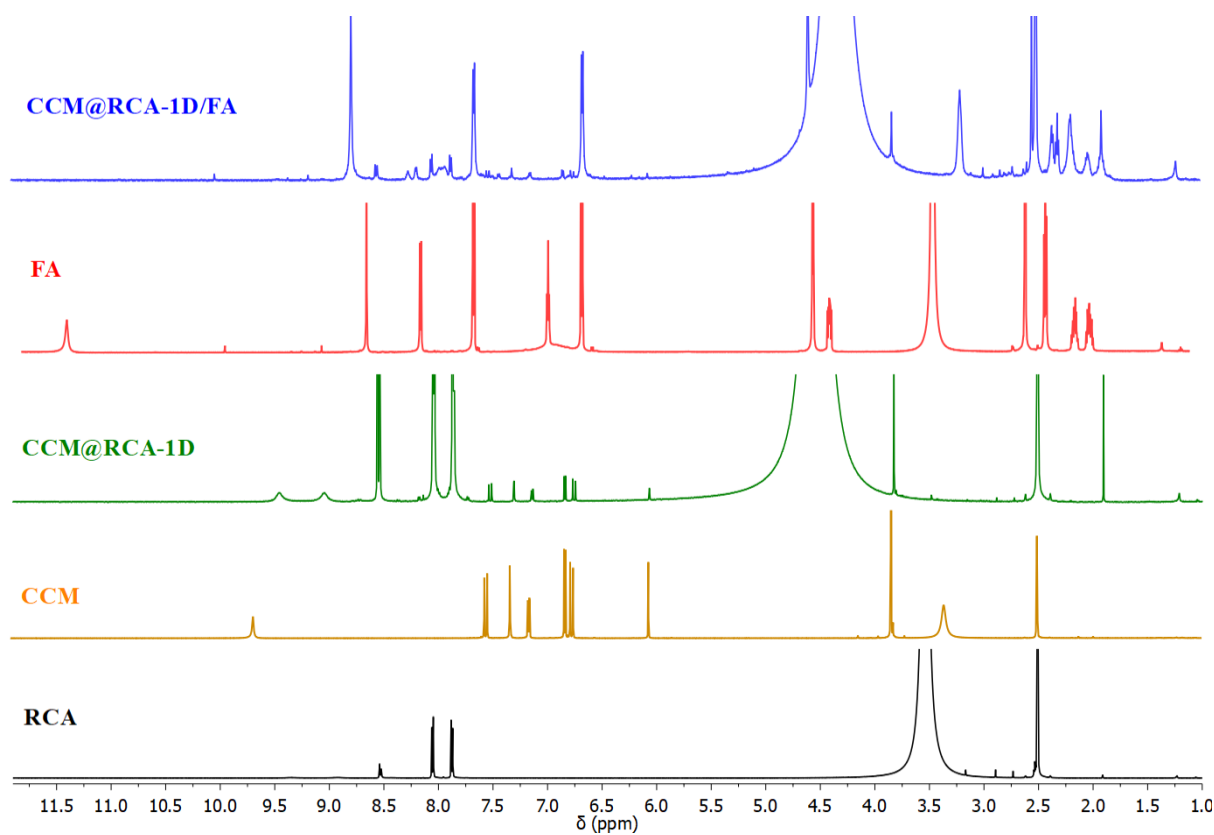
Figura 26. Representação das moléculas de FA na superfície da matriz contendo o fármaco.



Fonte: Autor

A Figura 27 apresenta os espectros de RMN de ^1H para os compostos RCA, CCM, CCM@RCA-1D, ácido fólico e CCM@RCA-1D/FA.

Figura 27. Espectros de RMN de ^1H para os compostos RCA, CCM, CCM@RCA-1D, FA e CCM@RCA-1D/FA, em dmsO-d_6 .



Fonte: Autor

Comparando os espectros de RMN de ^1H das amostras após a digestão com ácido clorídrico deuterado, observa-se que o espectro do RCA apresenta sinais em 8,5 e 8,0 ppm referentes aos ligantes adenina e BPDC presentes na estrutura do material. Quando se compara o espectro CCM@RCA-1D com os espectros do RCA e CCM, pode-se verificar a presença de sinais em 8,5 e 8,0 ppm referentes aos ligantes e também um conjunto de sinais compreendidos entre 7,75 – 6 ppm, comprovando então a presença da CCM na matriz. Por fim, comparando o espectro do material CCM@RCA-1D/FA com os espectros do RCA, CCM e FA, percebe-se a presença de sinais em 8,5 e 8,0 ppm referentes aos ligantes, um conjunto de sinais em 7,75 – 6 ppm referente a CCM e um conjunto de sinais compreendidos nas regiões 9,0 – 6,0 e 3,0 – 1,5 ppm associados ao FA, sugerindo tanto a presença da CCM quanto do FA na matriz.

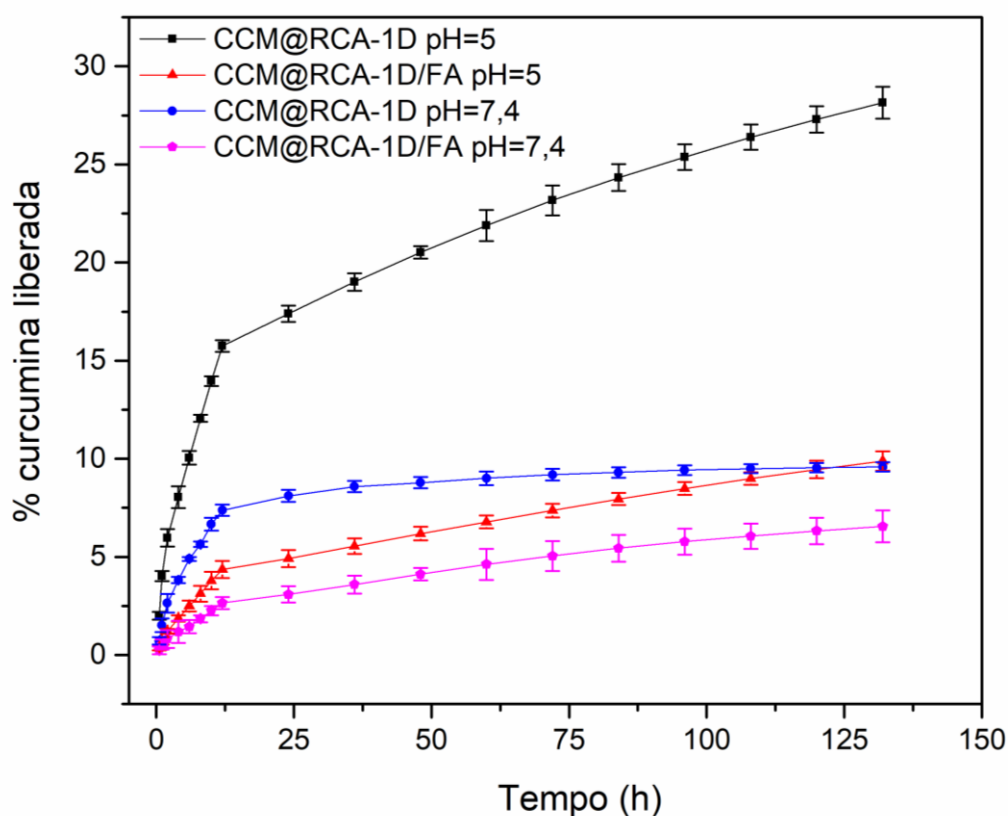
Vale ressaltar ainda que quando analisa-se o espectro da amostra CCM@RCA-1D/FA, verifica-se que a intensidade dos sinais associados ao folato é muito maior que os sinais associados à CCM. Tal fato pode ser explicado por haver uma maior quantidade de moléculas de FA no material, já que este encontra-se em sua superfície.

2.3.6 Ensaio de liberação do fármaco *in vitro*

Os materiais CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA foram então submetidos a ensaios de liberação do fármaco *in vitro*. O perfil de liberação da CCM foi estudado em tampão PBS + Tween-20 (0,5 v/v %) nos valores de pH 5,0 e 7,4, à temperatura de 37 °C. Novamente os parâmetros de linearidade e precisão foram avaliados, sendo mostrados no capítulo 4 desta tese, estando em concordância com as normas da ANVISA (Brasil, 2017).

Com base na equação da reta (vide capítulo 4) e substituindo o valor de y pela área medida e considerando um fator de diluição igual a 100 foi possível determinar a quantidade de CCM liberada nos materiais, CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA, em pH ácido e fisiológico, como mostrado na Figura 28.

Figura 28. Perfis de liberação da CCM nas amostras.



Fonte: Autor

Com base na Figura 28, observa-se que houve uma maior liberação para os compostos sem a presença do FA após 132 horas de experimento. Isso se deve ao fato, provavelmente, do ácido fólico impedir a saída das moléculas de CCM, já que o folato está presente na superfície dos materiais. Além disso, verifica-se que para a amostra CCM@RCA-1D em pH= 5,0 obteve-se uma maior taxa de liberação quando comparado ao ensaio realizado para essa mesma amostra

em pH=7,4. Esse resultado é bastante positivo, pois segundo Zheng e colaboradores¹³² promover uma liberação sensível ao pH pode diminuir a liberação prematura do fármaco durante a circulação sanguínea e aumentar sua liberação devido aos microambientes ácidos das regiões tumorais, sendo desta forma benéfico para a inibição tumoral *in vivo*.

A Tabela 8 resume os dados de liberação obtidos para os compostos avaliados após 132 horas de experimento.

Tabela 8. Percentual de CCM liberada das amostras após 132 horas de experimento.

pH	Compostos	% CCM liberada
5,0	CCM@RCA-1D	28,14
	CCM@RCA-1D/FA	9,89
7,4	CCM@RCA-1D	9,58
	CCM@RCA-1D/FA	6,55

Fonte: Autor

Os valores de liberação máxima da CCM para os compostos apresentados na Tabela 8 foram relativamente baixos após 132 horas de experimento, o que indica uma possível coordenação do fármaco aos sítios de coordenação vazios dos íons de zinco do RCA, indicando, portanto, que pode ter havido também uma adsorção química.

Diferentes modelos matemáticos foram utilizados para analisar e descrever a cinética de liberação do fármaco a partir das matrizes em que eles estão incorporados, dentre eles: Baker & Lonsdale, Korsmeyer-Peppas, Hixon & Crowell, Higuchi, Primeira Ordem e Weibull, como mostrado nas Tabela 9 para a série de compostos do RCA. Os modelos que apresentam valores de R^2 mais próximo a 1,00 foram considerados como mais adequados para descrever a cinética de liberação dos compostos avaliados.

Tabela 9. Valores de R^2 referente aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo de liberação *in vitro* da CCM para as amostras do composto RCA.

Modelos matemáticos	Valores de R quadrado (R^2)			
	pH = 5,0		pH = 7,4	
	CCM@RCA-1D	CCM@RCA-1D/FA	CCM@RCA-1D	CCM@RCA-1D/FA
Baker & Lonsdale	0,8898	0,9784	0,5436	0,9916
Korsmeyer-Peppas	0,9789	0,9877	0,8919	0,9943
Hixon & Crowell	0,2886	0,6643	0,5406	0,7269
Higuchi	0,8664	0,9765	0,5250	0,9909
Primeira Ordem	0,3263	0,6713	0,5196	0,7312
Weibull	0,9917	0,9912	0,9941	0,9963
	k = 41,1520	k = 49,3791	k = 9,3718	k = 26,0829
	b = 0,4145	b = 0,4233	b = 0,7074	b = 0,4790

Fonte: Autor

Com base na análise da tabela pode-se verificar que os compostos apresentaram um perfil de liberação que segue o modelo matemático de Weibull. Este modelo pode ser utilizado com sucesso em praticamente todos os tipos de curvas de liberação, porém é considerado mais útil para comparar os perfis de liberação de fármacos incorporados à sistemas matriciais,^{133,134} corroborando com o tipo de sistema utilizado neste trabalho. Vale destacar que este modelo é frequentemente aplicado à análise de estudos de dissolução e liberação, porém seu uso tem sido criticado, pois não há uma base cinética para sua utilização e nem uma natureza física que explique seus parâmetros.¹³³

No entanto, Papadopoulos e colaboradores¹³⁵ observaram uma correlação matemática entre o parâmetro b e o expoente n da equação de Peppas e concluíram que o parâmetro b também está relacionado ao mecanismo de transporte do fármaco e às propriedades físicas da matriz de liberação. Assim, estima-se que $b \leq 0,75$ indica difusão Fickiana (é caracterizada pela alta velocidade de difusão do solvente para o interior da matriz e baixa velocidade de relaxamento polimérico), de b na faixa de $0,75 < b < 1$ está relacionado com um mecanismo combinado de difusão Fickiana e transporte Case II (fenômeno de intumescimento do polímero, com relaxamento da matriz ou liberação mediante erosão) e $b > 1$ determina que o transporte do fármaco na matriz segue um mecanismo complexo de liberação.

A partir destas informações, pode-se verificar que os valores de b , mostrados na Tabela 9 sugerem um perfil de difusão Fickiana, ou seja, o único processo ocorrendo é a difusão do fármaco pela matriz, não havendo, portanto, rompimento da estrutura das matrizes.

2.3.7 Aplicação biológica *in vitro*

❖ Ensaio de viabilidade celular

No presente trabalho, a atividade citotóxica para a série de compostos derivados da matriz RCA e seus precursores foi avaliada em três linhagens tumorais de mama: MCF-7, MDA-MB-231 e 4T1 e frente a uma linhagem não tumoral murina NIH/3T3 (fibroblasto embrionário), por meio do ensaio colorimétrico de MTT, com o intuito de avaliar a citotoxicidade dos compostos em diferentes linhagens celulares tumorais de mama que apresentam uma maior expressão de receptor de folato quando comparado com a linhagem não tumoral.

Os valores obtidos de IC_{50} juntamente com os índices de seletividade (IS) estão mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de IC₅₀ dos precursores e da série de compostos do RCA juntamente com seus valores de IS. IS* = IC₅₀ (NIH/3T3) / IC₅₀(MCF-7); IS** = IC₅₀ (NIH/3T3) / IC₅₀(MDA-MB-321) e IS*** = IC₅₀ (NIH/3T3) / IC₅₀(4T1).

Compostos	IC ₅₀ (µg/mL)						
	NIH/3T3	MCF-7	IS*	MDA-MB-231	IS**	4T1	IS***
Adenina	—	—	—	—	—	—	—
BPDC	—	—	—	—	—	—	—
CCM	25,87 ± 7,3	27,40 ± 6,23	0,94	26,63 ± 5,8	0,97	—	—
Ácido Fólico	—	—	—	—	—	—	—
RCA	42,85 ± 4,05	56,55 ± 7,01	0,76	84,51 ± 6,02	0,51	—	—
CCM@RCA-1D	34,19 ± 6,14	49,25 ± 6,05	0,70	69,00 ± 5,15	0,50	93,33 ± 9,9	0,37
CCM@RCA-1D/FA	—	35,61 ± 3,07	—	713,9 ± 9,38	—	97,64 ± 10,96	—

Fonte: Autor

Com base nos dados apresentados na Tabela 10, pode-se observar que a inibição da proliferação celular dos compostos foi diversificada frente às linhagens celulares estudadas. Para a linhagem não tumoral, os precursores dos compostos (ácido fólico, adenina e BPDC) e o composto CCM@RCA-1D/FA não inibiram a proliferação celular nas concentrações testadas. Já a CCM e os compostos RCA e CCM@RCA-1D foram capazes de inibir a proliferação dessas células com IC_{50} de 25,87; 42,85 e 34,19 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Quando avalia-se essa série de compostos nas linhagens tumorais de mama, verificou-se que para a linhagem celular MCF-7 e 4T1 cuja expressão de receptor de ácido fólico é mais baixa quando comparada com a linhagem MDA-MB-231, verificamos que os compostos CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA foram capazes de inibir a proliferação celular em ambas as células. Porém quando analisamos os dados para a linhagem MDA-MB-231, cuja expressão de receptor de ácido fólico é maior, verificamos que o composto funcionalizado (CCM@RCA-1D/FA) não apresentou efeito significativo frente a proliferação celular na concentração testada, não sendo possível em um primeiro momento avaliar a ação de *targeting* do ácido fólico nas diferentes linhagens tumorais de mama.

Analisamos também os valores do IS, que consiste na razão entre os valores de IC_{50} obtidos para as células normais e aqueles obtidos para as tumorais. Quanto maior o valor de IS, o agente analisado é mais ativo contra a célula tumoral e menos citotóxico para a célula normal do hospedeiro, ou seja, mais seletivo é o fármaco. Desta forma, verificou-se que dentre os compostos analisados, RCA foi o material que apresentou uma maior seletividade frente à linhagem tumoral MCF-7 ($IS = 0,76$).

Vale ressaltar que a busca por compostos mais seletivos é de grande interesse na área médica e esse é o grande desafio por parte dos pesquisadores quando se trata do desenvolvimento de novos sistemas para o tratamento do câncer. Assim, compostos que apresentem valores de $IS > 3$ são considerados promissores agentes antitumorais.¹³⁶

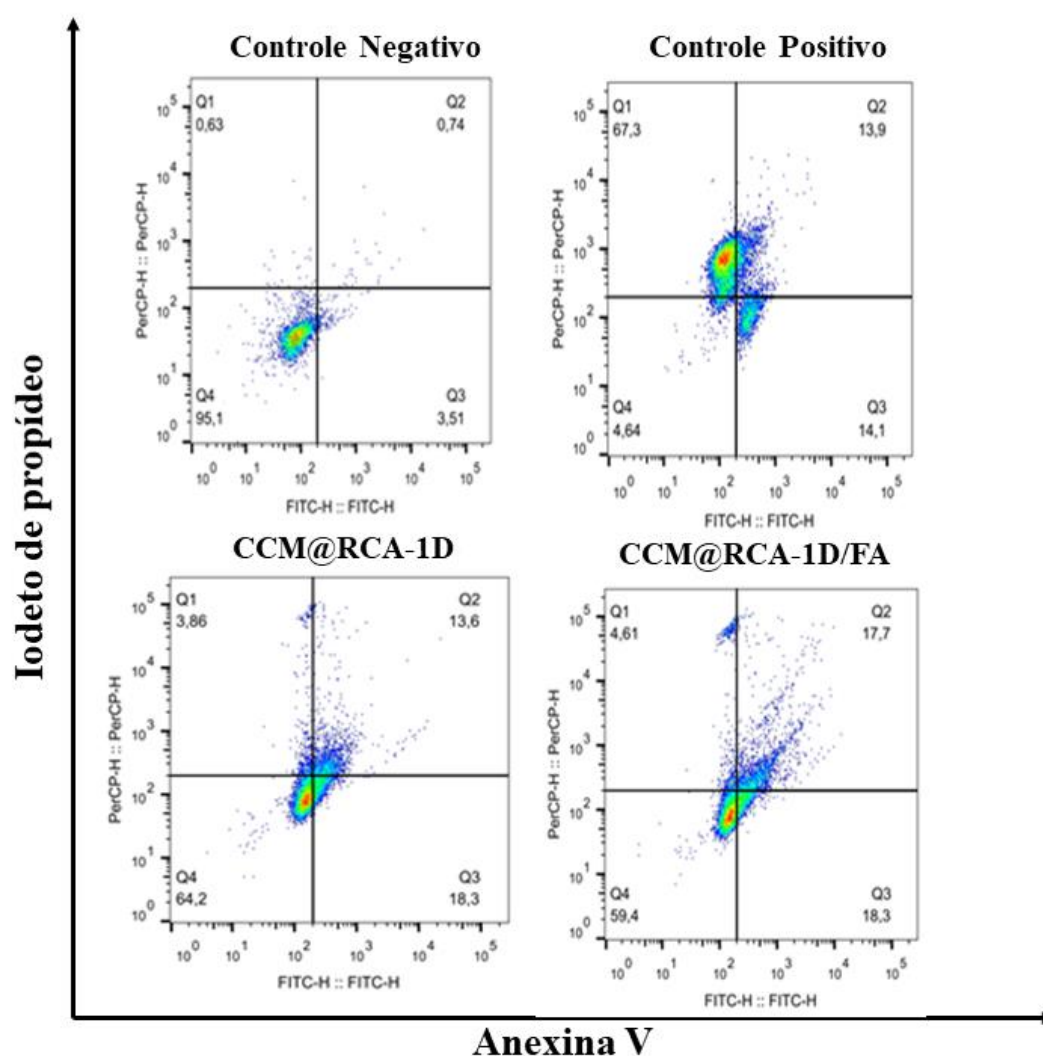
❖ Ensaio de morte celular

Foram avaliados os mecanismos de morte celular para a série de compostos sob investigação nesse trabalho frente às duas linhagens tumorais (MCF-7 e 4T1) cujos resultados de IC_{50} foram mais promissores. Para realização do experimento, após 24 horas de exposição, as amostras e as células foram marcadas com Anexina V e PI e analisadas por citometria de fluxo. O ajuste dos parâmetros do equipamento para a detecção adequada dos dois marcadores

foi realizado utilizando células marcadas apenas com Anexina V e células marcadas apenas com PI após o tratamento com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 24 horas.

A detecção da marcação por Anexina V é representada pelo eixo X (FITC-H) e a detecção do PI corresponde ao eixo Y (PerCP-H). Cada *Dot plot* está dividido em quatro quadrantes. O quadrante 1 (Q1) representa as células marcadas apenas com o PI (A^- / PI^+); o Q2 representa as células marcadas com o PI e com a Anexina V (A^+ / PI^+); o Q3 representa as células marcadas apenas com a Anexina V (A^+ / PI^-) e o Q4 representa as células não marcadas (A^- / PI^-). A Figura 29 mostra os resultados obtidos para a primeira linhagem avaliada, MCF-7.

Figura 29. Gráfico representativo do mecanismo de morte celular dos compostos CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA para linhagem celular MCF-7.

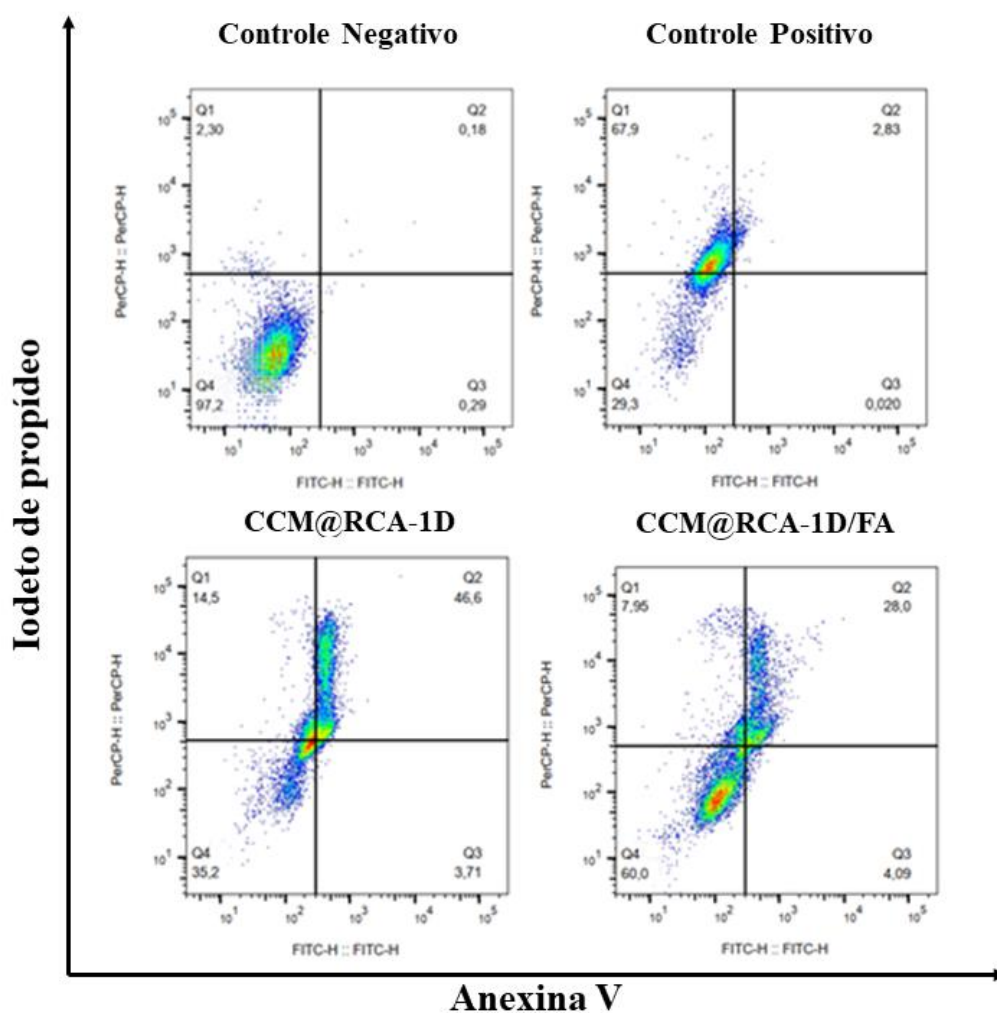


Fonte: Autor

Com base nos resultados obtidos é possível notar uma porcentagem de células nos quatro quadrantes para ambos os compostos. O CCM@RCA-1D apresentou: 3,86 % em Q1, 13,6 % em Q2, 18,3 % em Q3, e 64,2 % em Q4. Já CCM@RCA-1D/FA apresentou: 4,61 % em Q1, 17,7 % em Q2, 18,3 % em Q3, e 59,4 % em Q4. Estes resultados sugerem que após 24 horas de exposição, grande parte das células se encontra em estado de morte celular apoptose tardia e/ou necrose.

O mesmo estudo foi realizado para a linhagem celular 4T1, como mostrado na Figura 30.

Figura 30. Gráfico representativo do mecanismo de morte celular dos compostos CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D /FA na linhagem celular 4T1.



Fonte: Autor

Com base nos resultados, é possível notar uma porcentagem de células nos quatro quadrantes para ambos os materiais analisados. O composto CCM@RCA-1D apresentou: 14,5

% em Q1, 46,6 % em Q2, 3,71 % em Q3, e 35,2 % em Q4. Já o material funcionalizado apresentou: 7,95 % em Q1, 28,0 % em Q2, 4,09 % em Q3, e 60,0 % em Q4. Assim, os dados sugerem que ambos os compostos induziram a morte celular por apoptose tardia e/ou necrose, assim como visto para a linhagem tumoral MCF-7, não alterando, portanto, o mecanismo de morte celular nas diferentes linhagens.

2.4 CONCLUSÃO

Utilizando-se a síntese solvotérmica e partindo-se de íons zinco(II) e dois diferentes ligantes, adenina (N-donor) e bifenildicarboxilato, BPDC (O-donor) e se valendo das mais diversas técnicas de caracterização, obtivemos um protótipo da bioMOF-100, denominado nesta tese de RCA. Devido às suas características porosas, este material foi avaliado em ensaios de encapsulação do fármaco CCM, cuja eficiência de incorporação obtida para o compósito CCM@RCA-1D foi de 32,80%.

Empregando a técnica de RMN de ^1H , verificou-se a presença de um conjunto de sinais referentes ao ácido fólico, evidenciando que a funcionalização ocorreu de maneira efetiva. O ensaio de liberação de fármaco mostrou que o composto CCM@RCA-1D/FA apresentou uma taxa de liberação de fármaco menor que o composto CCM@RCA-1D. Além disso, a liberação foi mais efetiva em pH ácido.

Os ensaios de viabilidade celular evidenciaram que a inibição da proliferação celular dos compostos foi diversificada frente às diferentes linhagens celulares testadas. Comparando as linhagens tumorais de mama, verificamos que nas linhagens MCF-7 e 4T1 cuja expressão de receptor de ácido fólico é mais baixa quando comparada com a linhagem MDA-MB-231, os compostos CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA foram capazes de inibir a proliferação celular em ambas as células. Porém, quando analisamos os dados para a linhagem MDA-MB-231, cuja expressão de receptor de ácido fólico é maior, verificamos que o composto funcionalizado (CCM@RCA-1D/FA) não apresentou efeito significativo frente a proliferação celular na concentração testada, não sendo possível em um primeiro momento avaliar a ação de *targeting* do ácido fólico nas diferentes linhagens tumorais de mama.

Avaliamos também o mecanismo de morte celular dos compostos e os resultados revelaram que nas duas linhagens celulares testadas (4T1 e MCF-7) as células se encontram em apoptose tardia para ambos os compostos, CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA.



CAPÍTULO 3



3 CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA BIOMOF-101

3.1 INTRODUÇÃO

No presente capítulo é relatada a síntese e caracterização de uma MOF (bioMOF-101) já reportada na literatura por Li e colaboradores.¹³⁷ Por se tratar de uma MOF mesoporosa, com tamanho de poro de 2,10 nm, essa foi submetida à ensaios de encapsulação e liberação de fármaco. Para avaliar se houve a entrada do fármaco nos poros do material, este foi caracterizado pelas técnicas FTIR, PXRD e TG-DSC. Subsequentemente, em pH dependente, analisamos o teor de fármaco liberado desta matriz.

Os mesmos ensaios *in vitro* realizados para o composto anterior (RCA) foram realizados para este composto, para avaliarmos a sua biocompatibilidade e citotoxicidade. Com esse rol de dados o material foi então submetido à experimentos *in vivo* para avaliar se as amostras funcionalizadas apresentam um maior direcionamento às células tumorais e também verificar a eficácia deste sistema como um possível tratamento para o câncer de mama.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Os principais reagentes e solventes utilizados neste capítulo, por apresentar elevada pureza, foram utilizados sem nenhum tratamento ou purificação prévia e estão listados na Tabela 11.

Tabela 11. Reagentes e solventes utilizados neste capítulo.

Reagente/Solvente	Procedência
DMF	Merck
Água Destilada	-
Adenina	Aldrich
Ácido 2,6-naftaleno dicarboxílico (NDC)	Aldrich
CCM	Inlab
Acetato de zinco	Vetec
NHS	Aldrich
EDC	Aldrich
Ácido fólico	Aldrich
Metanol	Synth
DMSO	Synth
Tween-20	Neon
Cloreto de sódio	Synth
Cloreto de potássio	Synth
MTT	Invitrogen
Fosfato de potássio monobásico anidro	Synth
Fosfato de sódio bifásico anidro	Synth
Cetamina e Xilaxina	Agener e União

Fonte: Autor.

3.2.2 Métodos

❖ Síntese da bioMOF-101

A síntese foi realizada como descrito por Li e colaboradores.¹³⁷ Foram preparadas soluções estoque dos ligantes adenina (0,05 M) e NDC (0,1 M) e do sal do metal (0,05 M) em DMF. Para a preparação das soluções estoque foi necessário manter sob sonicação para completa dissolução dos reagentes, sendo que a solução de adenina além de sonicação utilizou aquecimento. Em um vial de vidro de 20 mL foram adicionados 9 mL da solução de acetato de zinco dihidratado, 3 mL das soluções estoque dos ligantes e 1,5 mL de água ultrapura. O recipiente foi fechado e colocado em estufa de programação controlada e mantido a 85 °C por 24 h. Após término da reação o recipiente foi retirado da estufa e deixado resfriar sob

temperatura ambiente. Um precipitado branco foi obtido, filtrado e lavado três vezes com DMF (10 mL) e seco sob vácuo. Após a secagem, a bioMOF-101 tal como sintetizado, foi submetido ao processo de ativação para retirada dos solventes presentes nos poros. O processo de ativação ocorreu por meio de aquecimento do material a 160 °C por 24 horas sob vácuo, sendo após esse processo denominado de bioMOF-101-ativado.

3.2.3 Caracterizações

❖ Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrômetro Nicolet IS5 Thermo Scientific (4000-400 cm^{-1}), com resolução de 4 cm^{-1} , usando pastilha de KBr.

❖ Difração de raios-X de pó (DRX)

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

❖ Análise Térmica

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

❖ Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H foram registrados no espectrômetro Avance III 600 HD (14,1 T, Sonda: Triple Inverse TCI Cryo-probehead), localizado no Instituto de Química – UNESP Araraquara. As amostras foram digeridas com ácido clorídrico deuterado (DCl) para completa solubilização. Utilizou-se dimetilsulfóxido deuterado ($\text{dms}\text{-d}_6$) para dissolução das amostras. Os deslocamentos químicos obtidos foram referenciados pelos solventes. O software utilizado para aquisição foi o TopSpin v. 3.2.

3.2.4 Ensaio de encapsulação do fármaco CCM

O fármaco CCM foi encapsulado na matriz, com base na metodologia utilizada por Haydar e colaboradores.¹¹³ Em suma, dissolveu-se 50 mg de CCM em 10 mL de metanol, para obtenção de uma solução de 5 mg/mL de CCM. Após completa dissolução do fármaco, 50 mg da matriz bioMOF-101-ativado foi dispersa nesta solução. O recipiente foi fechado e mantido sob agitação por um período de contato de 1 dia. Ao final, a suspensão de coloração alaranjada foi centrifugada a 9.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e submetido à análise de CLAE-DAD para determinação indireta da quantidade de CCM absorvida. O pellet obtido após a centrifugação foi lavado 3x para retirada do excesso de CCM contido no material, sendo a cada lavagem ressuspensionado em metanol e centrifugado. Após as lavagens, o pellet foi seco em dessecador e submetido à espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios-X de pó e análise térmica. Depois desse processo, o pellet foi renomeado por CCM@bioMOF-101-1D.

3.2.5 Funcionalização da matriz com ácido fólico

A funcionalização da matriz contendo CCM encapsulada (CCM@bioMOF-101-1D) com folato foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Chowdhuri e colaboradores¹¹⁴ que consiste na ativação do ácido fólico através da adição de NHS e EDC. Primeiramente, foi dissolvido 25 mg de ácido fólico em 10 mL de uma mistura 50:50 (v/v) de DMSO e água ultrapura. O pH da solução foi mantido entre 7,5-8,5 por adição de uma solução de NaOH (1 mol/L) e em seguida adicionou-se 50 mg de EDC e 50 mg de NHS. A ativação do ácido fólico foi mantida no escuro durante 3 h a 30 °C. Em seguida foram adicionados 15 mg do composto CCM@bioMOF-101-1D à respectiva solução ativada com folato. A reação ficou sob agitação no escuro por 12 horas. Após o período reacional o material obtido (CCM@bioMOF-101-1D/FA) de coloração laranja-avermelhada foi lavado várias vezes e então seco à vácuo. A eficiência de funcionalização foi avaliada por RMN.

3.2.6 Ensaio de liberação do fármaco CCM *in vitro*

O estudo *in vitro* do perfil de liberação, visando avaliar a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo, foi desenvolvido de acordo com o estudo de Tiwari e colaboradores.¹⁶ A liberação do fármaco foi realizada com estímulos de pH em condições ácidas (pH=5) e fisiológicas (pH=7,4) em solução de tampão fosfato salino (PBS) acrescida de Tween-20 (0,5 v/v %). Inicialmente foi dissolvido 2 mg dos compostos CCM@bioMOF-101-1D e

CCM@bioMOF-101-1D /FA em 12 mL de solução de PBS + Tween-20 sob agitação 500 rpm a 37 °C. Após intervalos de tempos selecionados (0,5 – 132 h), as amostras foram centrifugadas e uma alíquota de 1 mL dos sobrenadantes foi retirada para determinação do teor de CCM. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de tampão PBS + Tween-20 ao meio para reposição. As alíquotas retiradas foram então submetidas à análise de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da quantidade de CCM liberada.

3.2.7 Aplicação biológica *in vitro*

3.2.7.1 Ensaio de viabilidade celular

Em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e a aluna de doutorado Raquel Santos Faria, do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, foram realizados ensaios de viabilidade celular. Para avaliar a atividade citotóxica dos compostos obtidos neste trabalho, foi utilizado o método colorimétrico do MTT. O princípio desse método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.

Para o teste do MTT, 5×10^3 de células foram plaqueadas em placas de 96 poços na ausência ou presença do composto em diluição seriada (3,125 – 1000 µg/mL). Para as diluições utilizou-se o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementados com 0,4% de DMSO e 0,025% Tween-80. Após tratamento de 24 horas, as células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao final do período de incubação, foram adicionados aos poços de cultivo celular 15 µL de MTT na concentração de 5 mg/mL, e após 3 h de incubação com o MTT, foram acrescentados 150 µL DMSO. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro a 595 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da Equação 2, mostrada no capítulo anterior.

O valor de IC₅₀ (concentração em µg / mL que inibe 50% da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.2.7.2 Ensaio de morte celular

Em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e a aluna de doutorado Raquel Santos Faria, do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília,

foi realizado este ensaio para identificar o tipo de morte induzida pelos tratamentos com as matrizes (CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA). Para isso foram realizadas as marcações em dois tipos celulares (MCF-7 e 4T1) com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI). Com esse experimento é possível identificar células em apoptose, necrose e células viáveis. Foram plaqueadas 1×10^5 células em placas de 12 poços. As células foram tratadas com CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA nas concentrações de 91,6 $\mu\text{g/mL}$ e 145,1 $\mu\text{g/mL}$ para as células MCF-7 e 105,8 $\mu\text{g/mL}$ e 117,4 $\mu\text{g/mL}$ para as células 4T1, respectivamente. Após tratamento, as células foram tripsinizadas e o pellet das células foi ressuspensionado em 500 μL de PBS gelado e centrifugado a 2000 rpm, por 5 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, 100 μL de tampão de ligação (0,1 M de Hepes (pH 7,4), 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl_2) foi adicionado ao pellet. Em seguida, foram acrescentados em cada microtubo 5 μL de solução de Anexina V e 10 μL de solução de PI (50 $\mu\text{g/mL}$). Os microtubos foram deixados por 15 minutos protegidos da luz e em temperatura ambiente. Por fim, 300 μL de tampão de ligação foram acrescentados. As amostras foram colocadas em gelo e a aquisição dos dados foi feita no citômetro FACSCalibur com o auxílio do software *CellQuest-Pro*. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um agente oxidante que age diretamente na membrana lipídica e no DNA, levando a ruptura da membrana, ocasionando morte celular por necrose. Este, na concentração de 29,4 μM , foi utilizado como controle positivo do experimento.

3.2.8 Aplicação biológica *in vivo*

3.2.8.1 Manutenção dos animais

Foram obtidos 25 camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, da linhagem Balb/c com idade entre 6-8 semanas, mantidos no biotério do Departamento de Genética e Morfologia da UnB, com a temperatura mantida em aproximadamente 23 °C, ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas e recebendo água e ração *ad libitum*. Para realização deste experimento todos os princípios éticos sobre experimentação e manipulação animal foram respeitados com aprovação pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA – UnB) (certificado 132/2019).

3.2.8.2 Indução tumoral e tratamento – Experimento de eficácia terapêutica

Para realização deste experimento, os animais foram divididos em cinco grupos, sendo eles: 1) animais saudáveis sem tumor; 2) animais com tumor sem tratamento; 3) animais com tumor

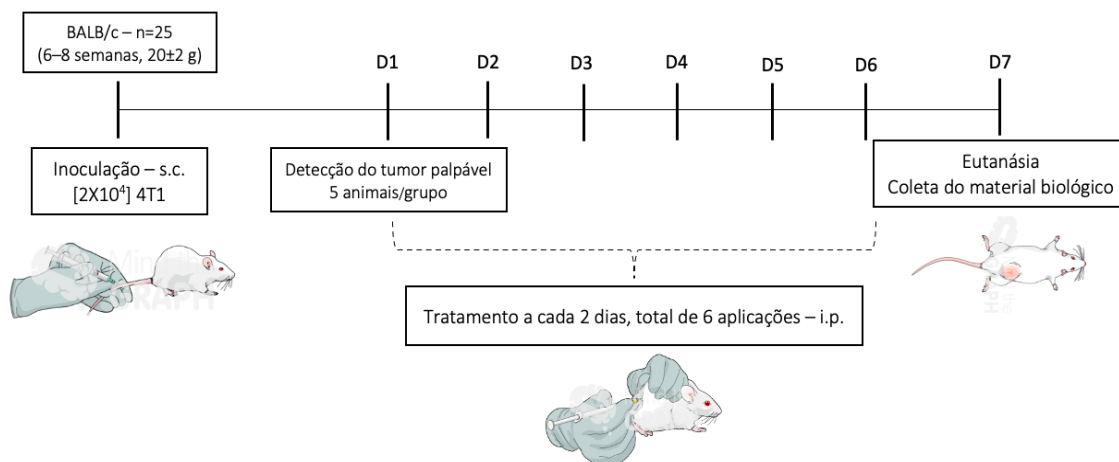
tratados com curcumina livre (dose: 2,5 mg de curcumina/kg de peso corpóreo); 4) animais com tumor tratados com CCM@bioMOF-101-1D (dose: 2,5 mg de curcumina/kg de peso corpóreo) e 5) animais com tumor tratados com CCM@bioMOF-101-1D/FA (dose: 2,5 mg de curcumina/kg de peso corpóreo). Os animais dos grupos com tumor receberam o transplante de 2×10^4 células 4T1 (Células de Adenocarcinoma Murino, Linhagem ATCC-CRL-2539) na região do flanco direito. Para isso, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) via intraperitoneal.

Após detecção de um tumor palpável na maioria dos animais, estes foram divididos em cinco grupos experimentais contendo cinco animais, conforme mencionado anteriormente, e receberam o tratamento correspondente no total de seis vezes, com intervalos de dois dias entre cada tratamento. A pesagem dos animais e diâmetro tumoral foram mensurados duas vezes por semana ao longo de todo o experimento. Além disso, a medida do volume alveolar foi acompanhada nos animais semanalmente por meio de tomografia computadorizada (TC). Esta técnica permite verificar possíveis alterações fisiológicas, bem como formações de nódulos metastáticos na região pulmonar, onde, para isso, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com solução de cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e colocados em decúbito ventral no leito do tomógrafo PET/SPECT/CT (Bruker, Billerica, EUA) para a captura de imagens da região torácica do animal. Foram utilizados os seguintes parâmetros: baixa dose (200 μ A), baixa voltagem (35 μ A) e qualidade padrão da TC. As imagens obtidas foram analisadas com o software PMOD 3.307 (PMOD Technologies LLC, Albira software Suíte). Os dados gerados foram apresentados em mm^3 do volume alveolar.

Decorridos dois dias após o último tratamento, os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico (xilazina - 30 mg/kg; cetamina - 300 mg/kg) por via intraperitoneal. Após constatada a sedação dos animais, foi feita a retirada de 800 μ L de sangue para análise hematológica e bioquímica. Em seguida, pulmão e tumor (se presente) foram retirados e imediatamente pesados e fixados com paraformaldeído 4%, seguido do processamento histológico padrão para coloração com hematoxilina e eosina.

O esquema experimental da eficácia terapêutica *in vivo* está representado na Figura 31.

Figura 31. Delineamento experimental. Sendo, (s.c.) subcutâneo; (i.p.) intraperitoneal; (D1-6) dias de administração dos tratamentos; (D7) eutanásia.



Fonte: Autor.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterizações do composto bioMOF-101

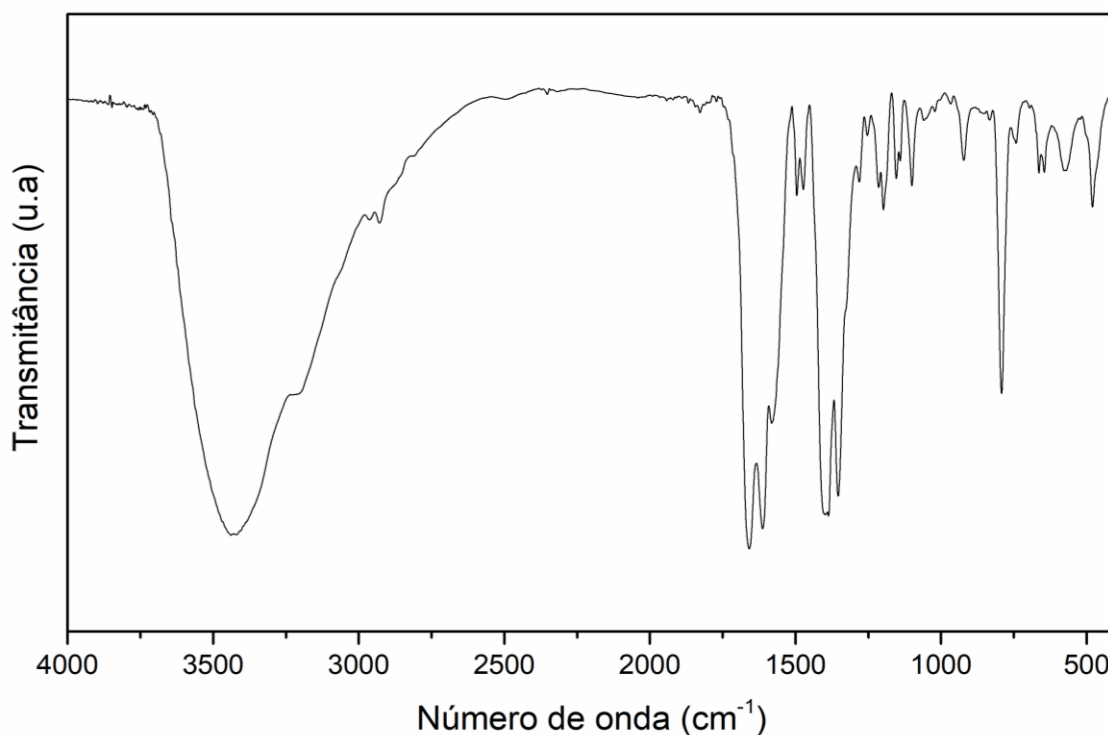
Como o intuito desta Tese é avaliar o potencial das MOFs como sistemas de liberação de fármacos no tratamento do câncer de mama, uma outra bioMOF já descrita na literatura¹²⁵ foi sintetizada (bioMOF-101) e utilizada para esse fim.

A escolha deste material se valeu no fato de ser uma bioMOF que apresenta o mesmo metal e um ligante de natureza semelhante ao do RCA, o ácido 2,6-naftalenodicarboxílico (NDC), para que pudéssemos assim, promover uma comparação dos resultados obtidos entre os materiais sintetizados neste trabalho.

❖ Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)

O espectro vibracional na região do infravermelho da bioMOF-101 está ilustrado na Figura 32.

Figura 32. Espectro vibracional no infravermelho do composto obtido.



Fonte: Autor

As bandas e respectivas atribuições referentes às frequências vibracionais do material sintetizado estão compiladas na Tabela 12.

Tabela 12. Principais frequências na região do infravermelho do material sintetizado neste trabalho.

Atribuição	Número de onda / cm^{-1}
	Material obtido
νOH	3431 <i>br</i>
$\nu_s\text{NH}$	3190 <i>br</i>
$\nu\text{CH}_{\text{alifático}}$	2964/2930 <i>w</i>
$\nu\text{C=O} + \delta\text{NH}_2$	1662 <i>s</i>
$\nu\text{O-C=O} + \nu\text{C=N} + \nu\text{C=C}$	1612 <i>s</i>
$\delta\text{C-NH}$	1578 <i>w</i>
$\delta_{\text{np}}\text{OH} + \delta\text{N=CH}$	1473 <i>w</i>
$\gamma\text{C-H}$	1392 <i>s</i>
$\nu\text{C-O}$	1252 <i>w</i>
$\nu\text{C-NH}_2$	1214 <i>m</i>
$\delta_{\text{np}}\text{C}_{\text{Ar-H}} + \delta\text{C-N=C} + \nu\text{C-N=C}$	1198 <i>m</i>
$\delta_{\text{np}}\text{C}_{\text{Ar-H}} + \delta\text{C-N=C} + \nu\text{C-N=C}$	1153 <i>m</i>
$\delta_{\text{np}}\text{C}_{\text{Ar-H}} + \delta\text{C-N-C}$	1099 <i>m</i>
$\nu\text{NC} + \gamma\text{NH}_2$	833 <i>w</i>
$\delta_{\text{fp}}\text{C}_{\text{Ar-C}_{\text{Ar-C}_{\text{Ar}}}}$	791 <i>s</i>

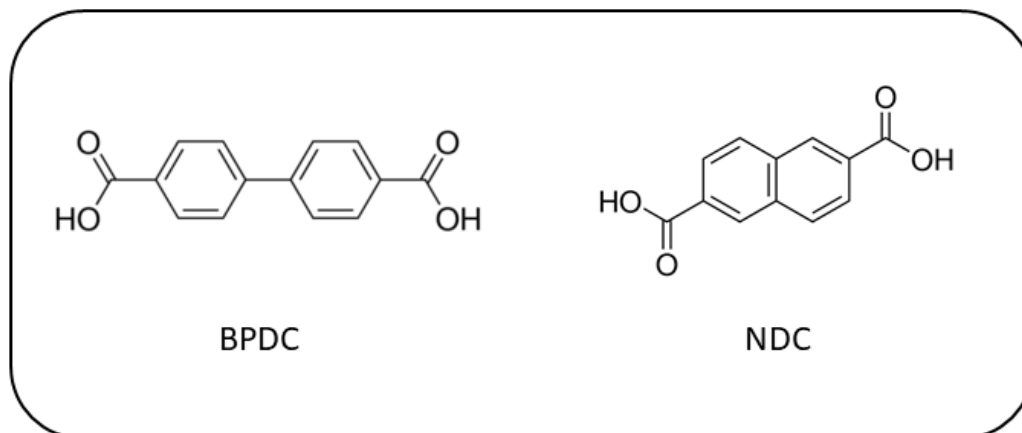
ν = estiramento, δ = deformação angular, γ = deformação fora do plano.

b = broad, *m* = médium, *s* = strong, *v* = very, *w* = weak, *np* = no plano, *fp* = fora do plano.

Fonte: Autor

Com base nas atribuições contidas na Tabela 12 e na observação do espectro vibracional mostrado na Figura 32, pode-se inferir que ambos os ligantes adenina ($\nu_s\text{NH}$ em 3190 cm^{-1} e $\nu\text{C-NH}_2$ em 1214 cm^{-1}) e NDC ($\nu\text{C=O}$ em 1662 cm^{-1} e $\nu\text{C-O}$ em 1252 cm^{-1}) estão presentes na esfera de coordenação dos íons de zinco (II). Vale ressaltar que não se comparou as bandas características na região do infravermelho do material sintetizado com o contido na literatura¹²⁵ uma vez que os autores do artigo sintetizaram a bioMOF-101 pela troca do ligante ponte BPDC presente na bioMOF-100 pelo ligante NDC. Porém, ambos os ligantes ponte BPDC e NDC, cujas estruturas químicas estão mostradas na Figura 33, são da família dos ácidos dicarboxílicos possuindo então os mesmos estiramentos na região do infravermelho.

Figura 33. Estrutura química dos ligantes ponte ácido 4-4'-bifenildicarboxílico (BPDC) e ácido 2,6-naftaleno dicarboxílico (NDC).



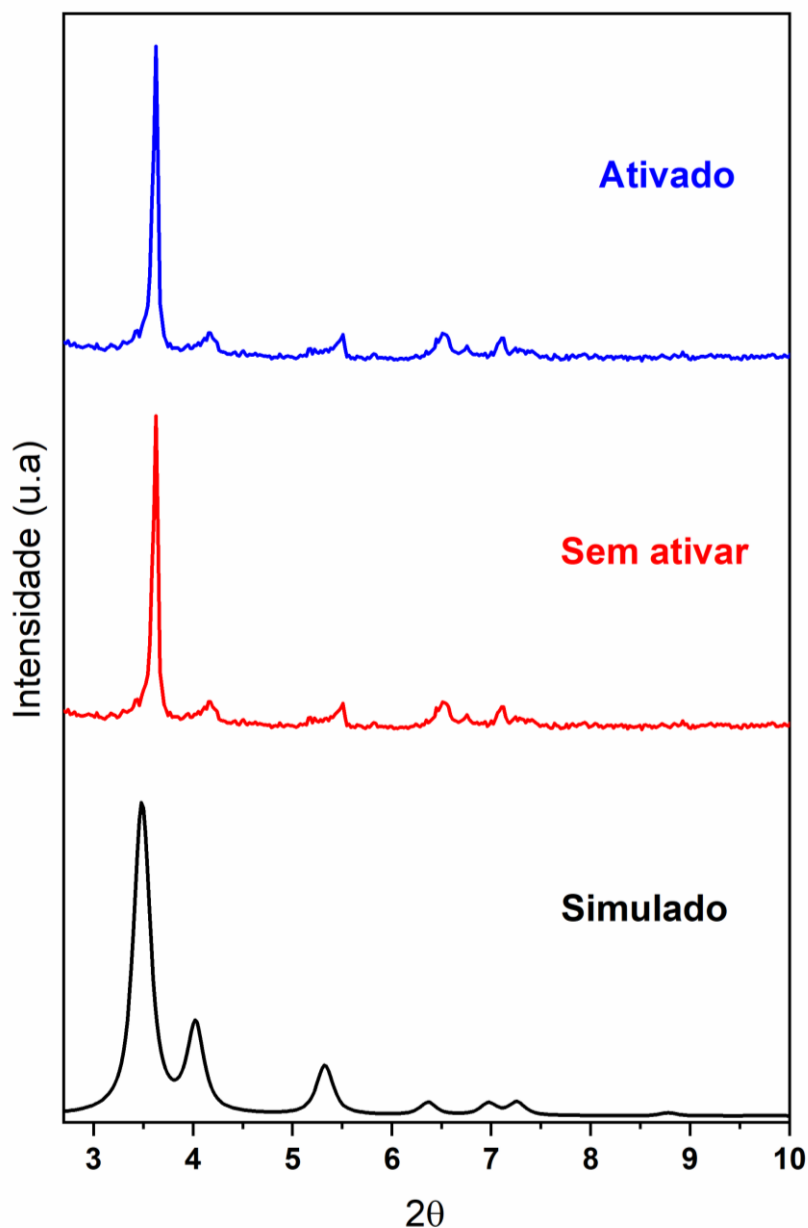
Fonte: Autor

❖ Difração de raios-X de pó

Uma vez que a síntese utilizada neste trabalho foi uma síntese já reportada na literatura,¹²⁵ houve a necessidade de verificar se o padrão de difração se manteve inalterado após a síntese do material.

A Figura 34 apresenta os padrões de difração do material obtido antes do processo de ativação, após o processo de ativação e o padrão de difração da bioMOF-101 obtido na base de dados ICSD.

Figura 34. Perfis de difração de raios-X de pó para o material obtido antes do processo de ativação (vermelho), após ativação (azul) e para a bioMOF-101 simulado (preto) obtido na base de dados ICSD (número da ficha: 988068).



Fonte: Autor

Analisando os difratogramas, pode-se inferir que após a realização da síntese, o perfil cristalino do material obtido se manteve o mesmo quando comparado com o da literatura, indicando a formação com sucesso da fase desejada. Além disso, pode-se inferir também que após o processo de ativação (160 °C, 24 h, vácuo) a bioMOF-101 sintetizada neste trabalho manteve o mesmo padrão de difração observado para o composto sem ativar, sendo este um

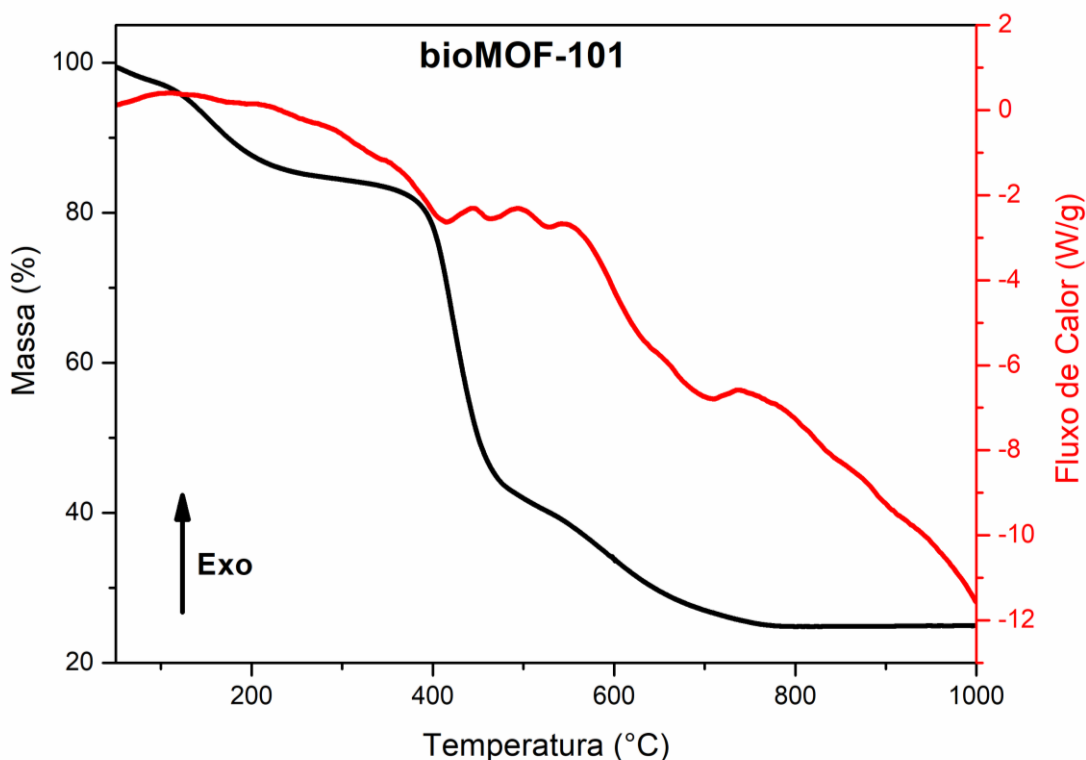
resultado bastante positivo, uma vez que o processo de ativação não alterou a natureza cristalina do material.

❖ Análise Térmica

A Figura 35 apresenta as curvas TG-DSC da bioMOF-101 tal como sintetizado neste trabalho. A perda de massa observada no início do aquecimento, entre 30-260 °C (14,96%), pode ser atribuída à desidratação do material e saída de moléculas de solvente contido nos poros. Na segunda perda de massa de 60,26% observam-se duas etapas referentes à decomposição da matéria orgânica (260-465 °C) seguida da pirólise do material (465-800 °C), com posterior formação de óxido de zinco (ZnO) como resíduo estável até 1000 °C (24,95%).

A temperatura *onset* (T_{onset}), que tem sido utilizada como indicativo da estabilidade térmica de um composto encontrada para a bioMOF-101 é de 355 °C.

Figura 35. Curvas TG-DSC obtida para a bioMOF-101 como sintetizada.



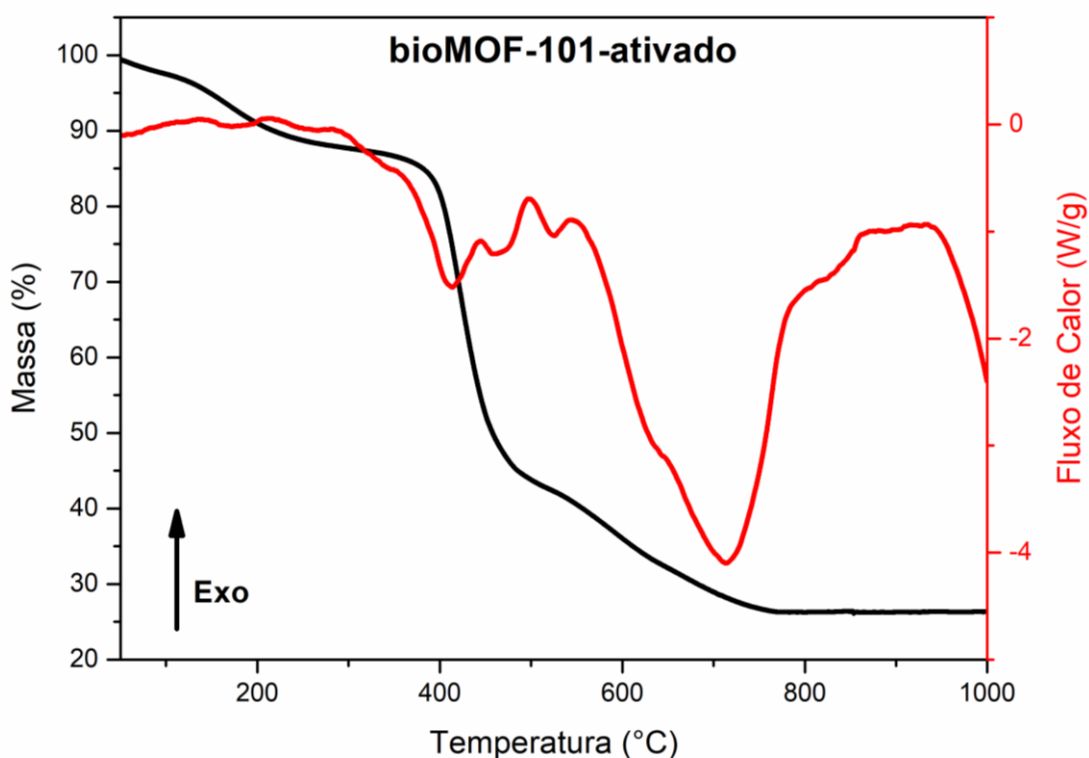
Fonte: Autor

A Figura 36 mostra as curvas TG-DSC para a bioMOF-101 ativada. Após o processo de ativação, realizado via aquecimento a 160 °C por 24 horas sob vácuo, foi possível observar uma perda de massa de 11,51% entre 30-260 °C referente à saída das moléculas de solvente. Essa perda de massa é inferior àquela (14,96%) observada na curva termogravimétrica da bioMOF-

101 tal como sintetizada, mostrando que o processo de ativação foi eficiente (mas não completo) na remoção das moléculas de solvente oclusas nos poros do material.

Vale ressaltar ainda, que não houve alteração na T_{onset} após o processo de ativação e que ambas as curvas TG mostradas (Figuras 35 e 36) referentes ao material sintetizado neste trabalho estão de acordo com os dados da literatura.¹²⁵

Figura 36. Curvas TG-DSC da bioMOF-101 ativado.



Fonte: Autor

3.3.2 Ensaio de encapsulação do fármaco

Uma vez que as caracterizações apresentadas para o material sintetizado neste trabalho estão em concordância com os dados contidos na literatura, podemos inferir que houve a formação do material desejado, a bioMOF-101.

Segundo Li e colaboradores¹²⁵ a bioMOF-101 apresenta curva de adsorção que se assemelha a uma isoterma do tipo IV, sendo característico de materiais mesoporosos, apresentando um tamanho de poro de 2,10 nm, área específica de 4410 m² g⁻¹ e volume de poro de 2,83 cm³ g⁻¹.

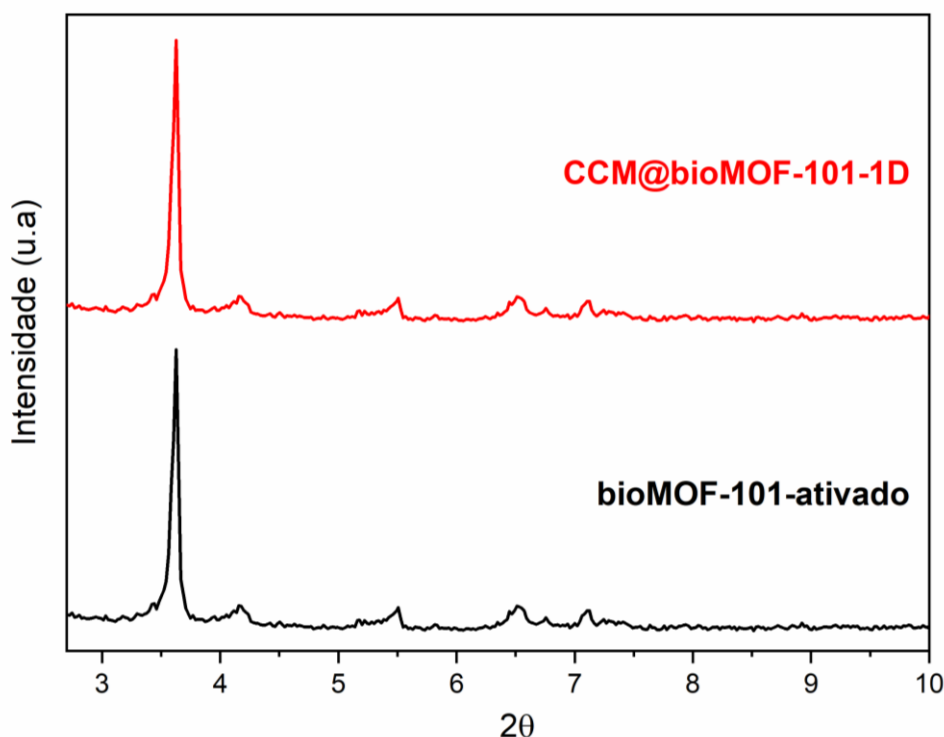
Por se tratar de um material poroso, o mesmo foi então submetido à ensaios de encapsulação do fármaco CCM, nas mesmas condições que o material apresentado no capítulo

2 desta Tese, para posterior comparação dos resultados. O material encapsulado também foi caracterizado pelas técnicas de FTIR, difração de raios-X de pó e análise térmica para verificar se houve a entrada do fármaco nos poros da matriz.

❖ Caracterizações do composto após ensaio de encapsulação

A Figura 37 ilustra os difratogramas de raios-X de pó da bioMOF-101-ativado e do material obtido após ensaio de encapsulação com tempo de contato de 1 dia (CCM@bioMOF-101-1D). Com base nos resultados obtidos por essa técnica, pode-se inferir que após o encapsulamento, o padrão de difração da bioMOF-101-ativado manteve-se inalterado, indicando que o processo de encapsulação não alterou a estrutura do material.

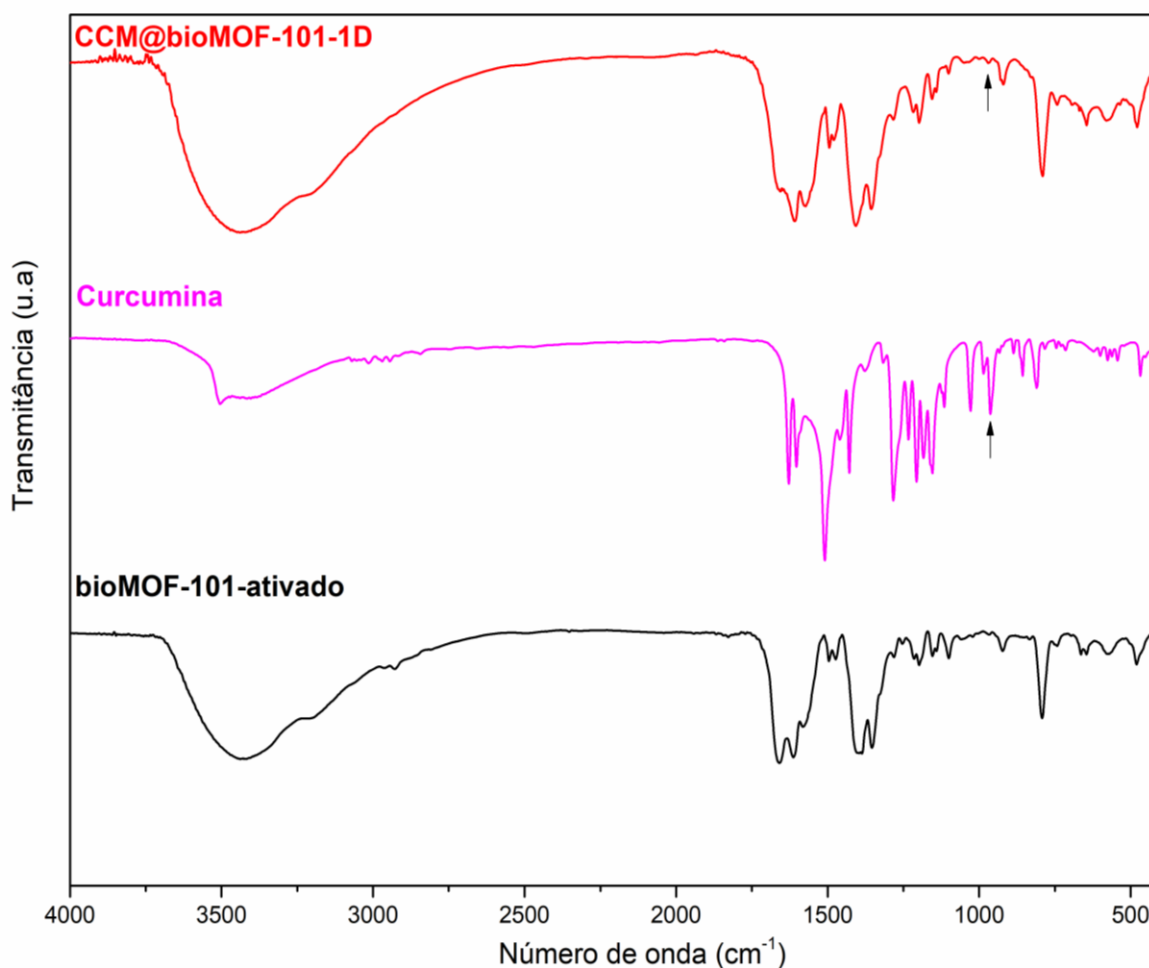
Figura 37. Padrão de difração de raios-X de pó para a bioMOF-101-ativado e CCM@bioMOF-101-1D.



Fonte: Autor

A Figura 38 mostra um estudo comparativo entre os espectros na região do infravermelho do CCM@bioMOF-101-1D, CCM livre e bioMOF-101-ativado. Como destacado na figura, a presença do fármaco na matriz porosa pode ser observada pelo aparecimento da banda em 973 cm^{-1} associada ao estiramento carbono-hidrogênio *trans* ao anel benzênico $\nu(\text{C-H})$.¹²⁹⁻¹³¹

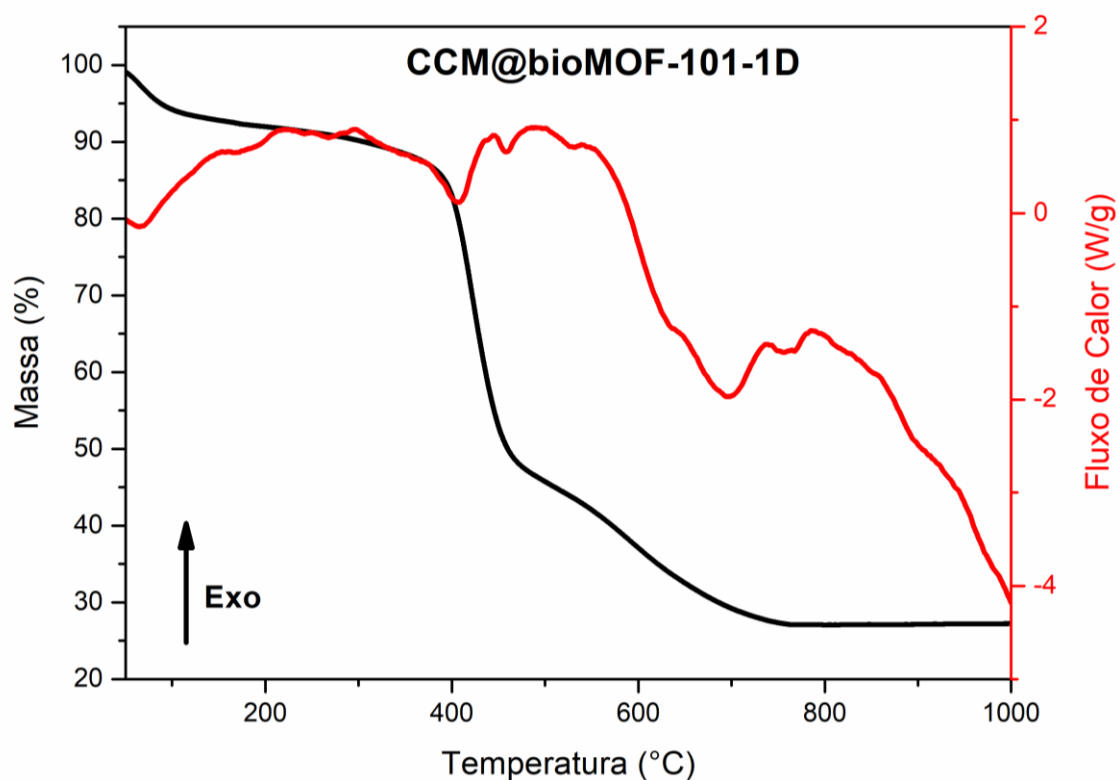
Figura 38. Espectros vibracionais no infravermelho dos compostos bioMOF-101-ativado, CCM livre e CCM@bioMOF-101-1D.



Fonte: Autor

A Figura 39 apresenta as curvas TG-DSC do composto obtido após ensaio de encapsulação (CCM@bioMOF-101-1D). A primeira perda de massa, correspondente a 6,15%, observada entre 30-110 °C, pode ser atribuída a desidratação do material. Já a segunda perda de massa de 5,30% entre 110-350 °C sugere a saída de moléculas de solvente oclusas nos poros do material, juntamente com moléculas de CCM, uma vez que a decomposição térmica da CCM inicia-se em 190 °C, como já mostrado anteriormente (ver Figura 25). A terceira perda de massa de 61,95% está associada a dois eventos consecutivos referentes a decomposição da matéria orgânica (350-460 °C) seguida da pirólise do material (460-765°C), com posterior formação de óxido de zinco (ZnO) como resíduo estável até 1000 °C (27,24%).

Figura 39. Curvas TG-DSC do composto CCM@bioMOF-101-1D.



Fonte: Autor

Para uma melhor avaliação dos resultados obtidos após o ensaio de encapsulação, a Tabela 13 resume os dados obtidos nas curvas TG-DSC para os compostos bioMOF-101-ativado e CCM@bioMOF-101-1D.

Tabela 13. Dados referentes à termogravimetria (TG) dos compostos bioMOF-101-ativado e CCM@bioMOF-101-1D.

Composto	Atribuição	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)
bioMOF-101-ativado	Solventes	T _{amb.} – 260	11,51
	Eliminação matéria orgânica	260 – 485	43,21
	Pirólise	485 – 770	18,89
	Resíduo	770 – 1000	26,35
	Desidratação	T _{amb.} – 110	6,15
CCM@bioMOF-101-1D	Solvente + CCM	110 – 350	5,30
	Eliminação matéria orgânica	350 – 460	38,58
	Pirólise	460 – 765	23,37
	Resíduo	765 – 1000	27,24

Fonte: Autor

Com base na análise na Tabela 13, percebe-se que para o composto CCM@bioMOF-101-1D houve um aumento na perda de massa referente à pirólise do material, além do aparecimento de uma perda de massa a mais que na curva TG do composto bioMOF-101-ativado, sugerindo assim a presença do fármaco na matriz porosa.

❖ Eficiência de encapsulação da CCM

Seguindo as normas da ANVISA (Brasil, 2017), avaliamos os parâmetros de linearidade e precisão para determinar a concentração de CCM contida no sobrenadante do composto sintetizado a partir da equação da reta, mostrada no capítulo 4 desta Tese.

Substituindo o valor de y pela área medida e considerando o fator de diluição igual a 100, a concentração de CCM no sobrenadante para a amostra CCM@bioMOF-101-1D foi de 0,0286 mg/mL. Como a concentração inicial da CCM era de 5 mg.mL⁻¹, a concentração final do sobrenadante após 1 dia de contato para o material foi de 0,58 %. Desta forma, o composto CCM@bioMOF-101-1D apresentou uma EE de 99,42%.

Devido às limitações da CCM (baixa solubilidade em água em condições de pH fisiológico e ácido, hidrólise rápida em pH alcalino e instabilidade em presença de luz¹⁴), esta

vem sendo utilizada em diferentes matrizes. A Tabela 14 traz alguns resultados de estudos de encapsulamento de CCM, bem como a matriz hospedeira utilizada e a EE.

Tabela 14. Dados referentes ao encapsulamento da CCM em diferentes matrizes.

Hospedeiro	EE (%)	Referência
NZIF-8	88,20	138
ZIF-8	83,33	16
IRMOF-3	98,00	95
N ₃ -bioMOF-100	25,64	139
Lipossoma	81,50	140
Sílica mesoporosa	17,90	141
Nanopartícula (folato-quitosana)	96,47	142
Nanopartícula (PLGA)	49,56	143

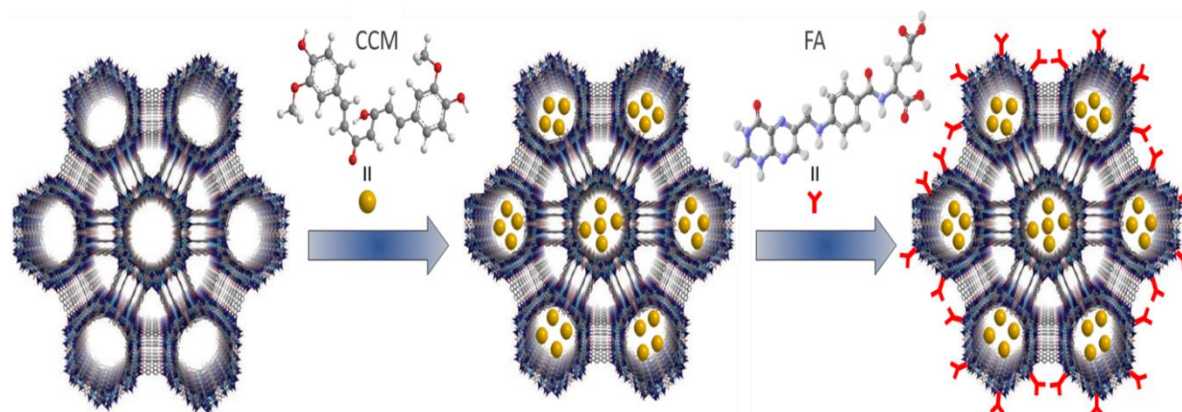
Fonte: Autor

Com base nos dados apresentados na Tabela 14, de um modo geral há uma alta taxa de incorporação de CCM nos mais variados sistemas, o que corrobora com os resultados obtidos. A incorporação da CCM em MOFs ainda é muito pouco explorada, tendo sido testada apenas na ZIF-8, IRMOF-3 e N₃-bioMOF-100 como mostrado na tabela. Apesar de ambas as MOFs, ZIF-8 e IRMOF-3, apresentarem uma EE alta, a MOF testada neste trabalho, bioMOF-101, apresentou um valor de EE superior, evidenciando resultados bastante satisfatórios.

3.3.3 Funcionalização do composto com ácido fólico

A espectroscopia de RMN de ¹H foi empregada para avaliar se houve o aparecimento de sinais característicos do ácido fólico no espectro da amostra CCM@bioMOF-101-1D/FA. Uma vez que as moléculas de CCM se encontram oclusas nos poros do material, espera-se que as moléculas de FA fiquem localizadas na superfície do material, como mostrado na Figura 40, para que estas possam ser encontradas pelos receptores de ácido fólico presentes nas células tumorais e isso permita um maior direcionamento destes carreadores.^{5,27,28}

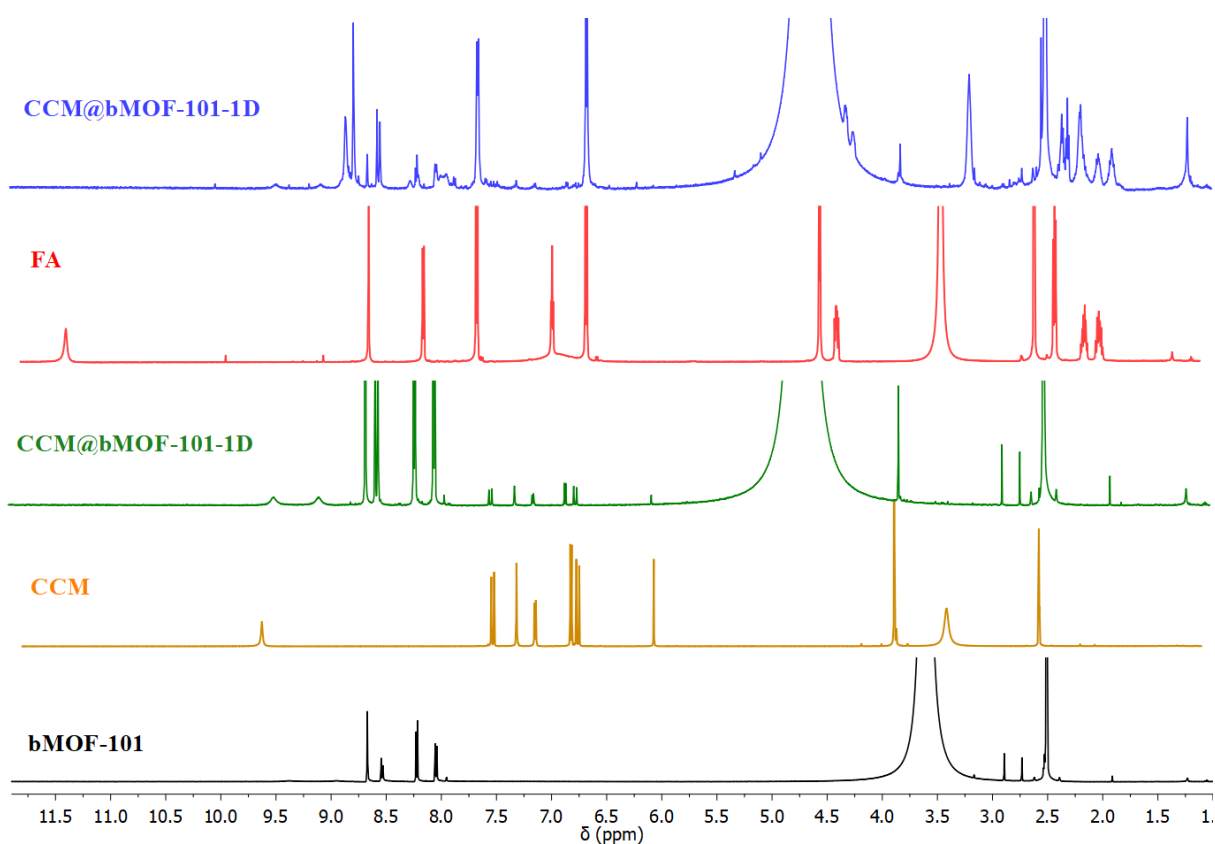
Figura 40. Representação das moléculas de FA na superfície do carreador.



Fonte: Autor

A Figura 41 apresenta os espectros de RMN de ^1H para os compostos bioMOF-101, CCM, bioMOF-101-1D, FA e CCM@bioMOF-101-1D/FA.

Figura 41. Espectros de RMN de ^1H para os compostos bioMOF-101, CCM, CCM@bioMOF-101-1D, FA e CCM@bioMOF-101-1D/FA, em $\text{dms}\text{-d}_6$.



Fonte: Autor

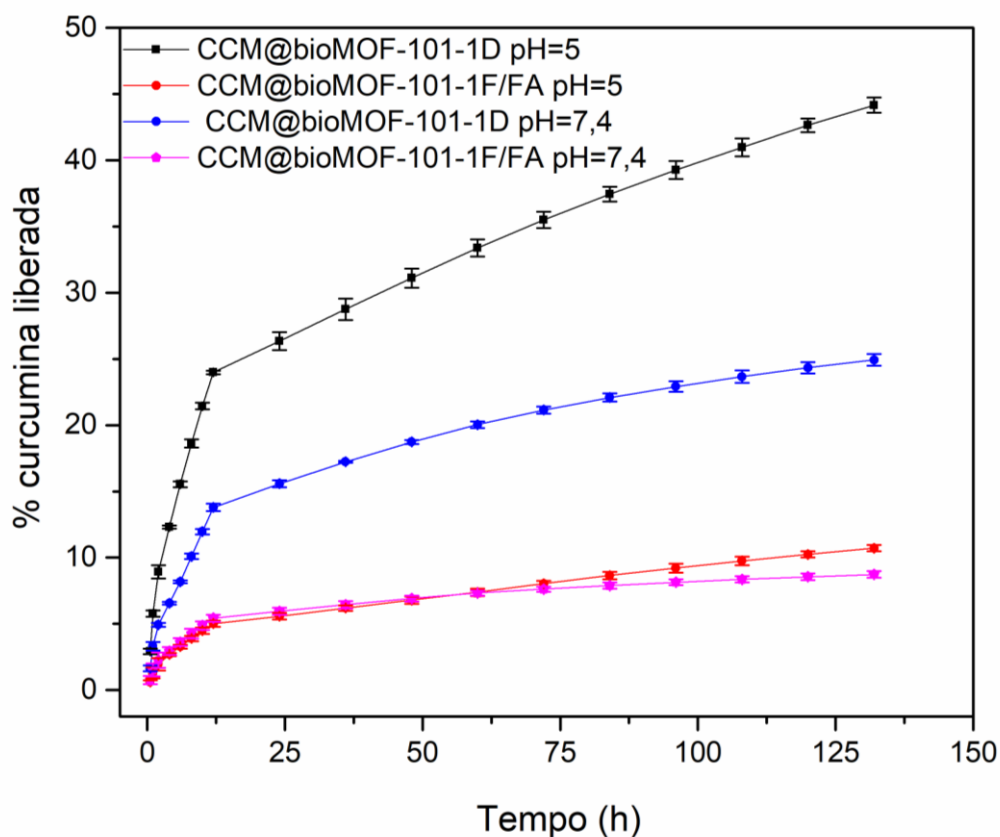
Comparando os espectros de RMN de ^1H das amostras após a digestão com ácido clorídrico deuterado, observa-se que o espectro da bioMOF-101 apresenta um conjunto de sinais entre 8,75 – 7,90 ppm referentes aos ligantes adenina e NDC presentes na estrutura do material. Quando compara-se o espectro obtido para a amostra CCM@bioMOF-101-1D com os espectros da bioMOF-101 e CCM, pode-se verificar a presença de um conjunto de sinais referentes aos ligantes em 8,75 – 7,90 ppm e outro conjunto de sinais referentes a CCM compreendida na região entre 7,75 – 6,0 ppm, comprovando a presença da CCM na matriz porosa. Por fim, comparando o espectro do material CCM@bioMOF-101-1D/FA com os espectros da bioMOF-101, CCM e FA, percebe-se a presença de um conjunto de sinais nas regiões entre 8,75 – 7,90 ppm associados aos ligantes, outro conjunto de sinais entre 7,75 – 6,0 ppm referente a CCM e um outro conjunto de sinais compreendidos nas regiões 9,0 – 6,0 e 3,0 – 1,5 ppm associados ao FA, indicando assim a presença tanto da CCM quanto do ácido fólico na matriz.

3.3.4 Ensaio de liberação do fármaco *in vitro*

Os materiais CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA foram submetidos a ensaios de liberação do fármaco *in vitro*. O perfil de liberação da CCM foi estudado em tampão PBS + Tween-20 (0,5 v/v %) nos valores de pH 5,0 e 7,4, à temperatura de 37 °C.

Novamente avaliamos os parâmetros de linearidade e precisão, de acordo com as normas da ANVISA (Brasil, 2017). Com base na equação da reta (vide capítulo 4) e substituindo o valor de y pela área medida e considerando um fator de diluição igual a 100 foi possível determinar a quantidade de CCM liberada nos materiais, em pH ácido e fisiológico como mostrado na Figura 42.

Figura 42. Perfil de liberação da CCM nas amostras baseadas na bioMOF-101.



Fonte: Autor

Com base na Figura 42, observa-se que os compostos CCM@bio-MOF-101-1D e CCM@bio-MOF-101-1D/FA apresentaram um perfil de liberação muito semelhante aos compostos apresentados no capítulo anterior, sendo que os carreadores sem a presença do FA apresentaram uma maior liberação de CCM após 132 horas de experimento, além do fato dos materiais em pH ácido apresentarem uma maior taxa de liberação quando comparado com os resultados obtidos em pH fisiológico, corroborando novamente a hipótese inicial do trabalho.

A Tabela 15 resume os dados de liberação obtidos para os compostos avaliados após 132 horas de experimento.

Tabela 15. Percentual de CCM liberada após 132 horas de experimento.

pH	Compostos	% CCM liberada
5,0	CCM@bioMOF-101-1D	44,16
	CCM@bioMOF-101-1D/FA	10,72
7,4	CCM@bioMOF-101-1D	24,93
	CCM@bioMOF-101-1D/FA	8,72

Fonte: Autor

Vale ressaltar que a liberação máxima de CCM para os compostos apresentados na Tabela 15 foram superiores quando comparados com os compostos derivados da matriz RCA. Isso se deve ao fato da bioMOF-101 ser uma matriz muito porosa, resultando em uma alta taxa de incorporação e uma maior liberação de CCM.

Diferentes modelos matemáticos foram utilizados para analisar e descrever a cinética de liberação do fármaco a partir das matrizes em que eles estão incorporados, dentre eles: Baker & Lonsdale, Korsmeyer-Peppas, Hixon & Crowell, Higuchi, Primeira Ordem e Weibull, como mostrado na Tabela 16 para a série de compostos da bioMOF-101. Os modelos que apresentam valores de R^2 mais próximo a 1,00 foram considerados como mais adequados para descrever a cinética de liberação dos compostos avaliados.

Tabela 16. Valores de R^2 referente aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo de liberação *in vitro* da CCM para as amostras do composta bioMOF-101.

Modelos matemáticos	Valores de R quadrado (R^2)			
	pH = 5,0		pH = 7,4	
	CCM@bioMOF-101-1D	CCM@bioMOF-101-1D/FA	CCM@bioMOF-101-1D	CCM@bioMOF-101-1D/FA
Baker & Lonsdale	0,9163	0,9496	0,9103	0,7686
Korsmeyer-Peppas	0,9796	0,9876	0,9785	0,9680
Hixon & Crowell	0,3911	0,5112	0,3583	0,0762
Higuchi	0,8822	0,9455	0,8918	0,7580
Primeira Ordem	0,4478	0,5206	0,3906	0,0617
Weibull	0,9903	0,9938	0,9936	0,9933
	k = 80,6649	k = 14,0898	k = 30,5338	k = 9,9505
	b = 0,3888	b = 0,6123	b = 0,4899	b = 0,4473

Fonte: Autor

Com base na análise da tabela pode-se verificar que os compostos CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA também apresentaram um perfil de liberação que segue o modelo matemático de Weibull, com um perfil de difusão Fickiana.

3.3.5 Aplicação biológica *in vitro*

❖ Ensaio de viabilidade celular

Foi investigada a atividade citotóxica para a série de compostos da bioMOF-101 e seus precursores nas mesmas linhagens realizadas no capítulo anterior (MCF-7, MDA-MB-231, 4T1 e NIH/3T3).

Os valores obtidos de IC_{50} juntamente com os índices de seletividade (IS) estão mostrados na Tabela 17.

Tabela 17. Valores de IC₅₀ dos precursores e da série de compostos da bioMOF-101 juntamente com seus valores de IS. IS* = IC₅₀ (NIH/3T3) / IC₅₀(MCF-7); IS** = IC₅₀ (NIH/3T3) / IC₅₀(MDA-MB-321) e IS*** = IC₅₀ (NIH/3T3) / IC₅₀(4T1).

IC ₅₀ (µg/mL)							
Compostos	NIH/3T3	MCF-7	IS*	MDA-MB-231	IS**	4T1	IS***
Adenina	—	—	—	—	—	—	—
NDC	—	—	—	—	—	—	—
CCM	25,87 ± 7,3	27,40 ± 6,23	0,94	26,63 ± 5,80	0,97	—	—
Ácido Fólico	—	—	—	—	—	—	—
bioMOF-101	—	238,7 ± 10,60	—	372,5 ± 7,50	—	—	—
bioMOF-101-1D	—	84,2 ± 7,40	—	235,4 ± 11,50	—	96,75 ± 9,10	—
bioMOF-101-1D/FA	—	137,1 ± 8,05	—	288,6 ± 8,15	—	108,8 ± 8,60	—

Fonte: Autor

Com base nos dados apresentados na Tabela 17, pode-se observar que a inibição da proliferação celular dos compostos foi diversificada frente às linhagens celulares estudadas. Para a linhagem não tumoral, apenas a CCM foi capaz de inibir a proliferação dessas células com IC de 25,87 µg/mL.

Quando avalia-se essa série de compostos nas linhagens tumorais de mama, percebemos que os materiais bioMOF-101, CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA conseguiram inibir a proliferação celular nas três linhagens testadas. Porém, quando analisamos os valores de IC₅₀ obtidos é possível verificar que apesar da linhagem MDA-MB-231 ser a que expressa uma maior quantidade de receptor de folato, quando comparada com as demais células testadas, esta revelou resultados menos promissores.

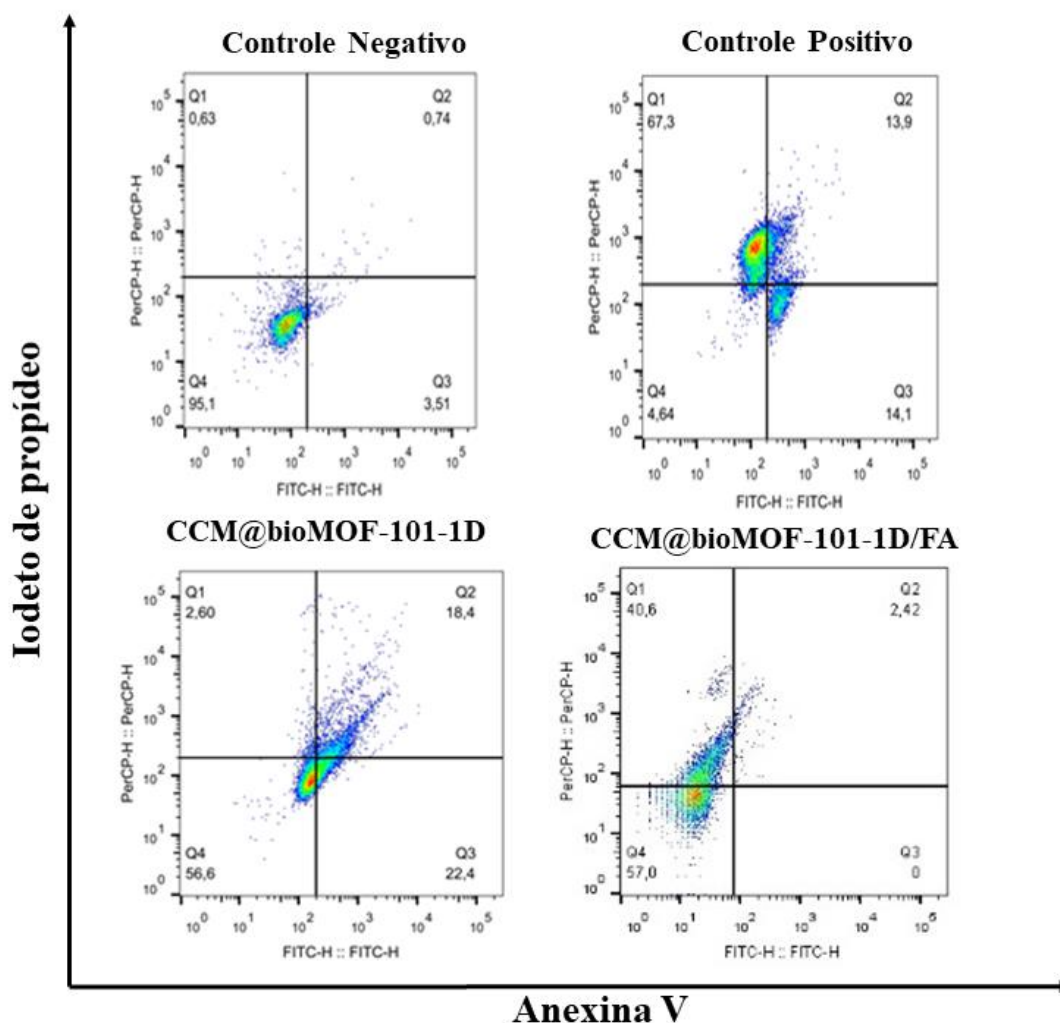
Vale destacar que não foi possível analisar os valores de IS dos compostos bioMOF-101, CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA uma vez que estes não conseguiram inibir a proliferação celular na linhagem normal, não sendo possível então realizar o cálculo.

❖ **Ensaio de morte celular**

O mecanismo de morte celular também foi avaliado para a série de compostos da bioMOF-101. Vale lembrar que este ensaio foi realizado nas mesmas condições e mesmas linhagens celulares utilizadas no capítulo anterior desta Tese.

A Figura 43 mostra os resultados obtidos para a primeira linhagem celular avaliada, MCF-7.

Figura 43. Gráfico representativo do mecanismo de morte celular dos compostos CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA para a linhagem celular MCF-7.



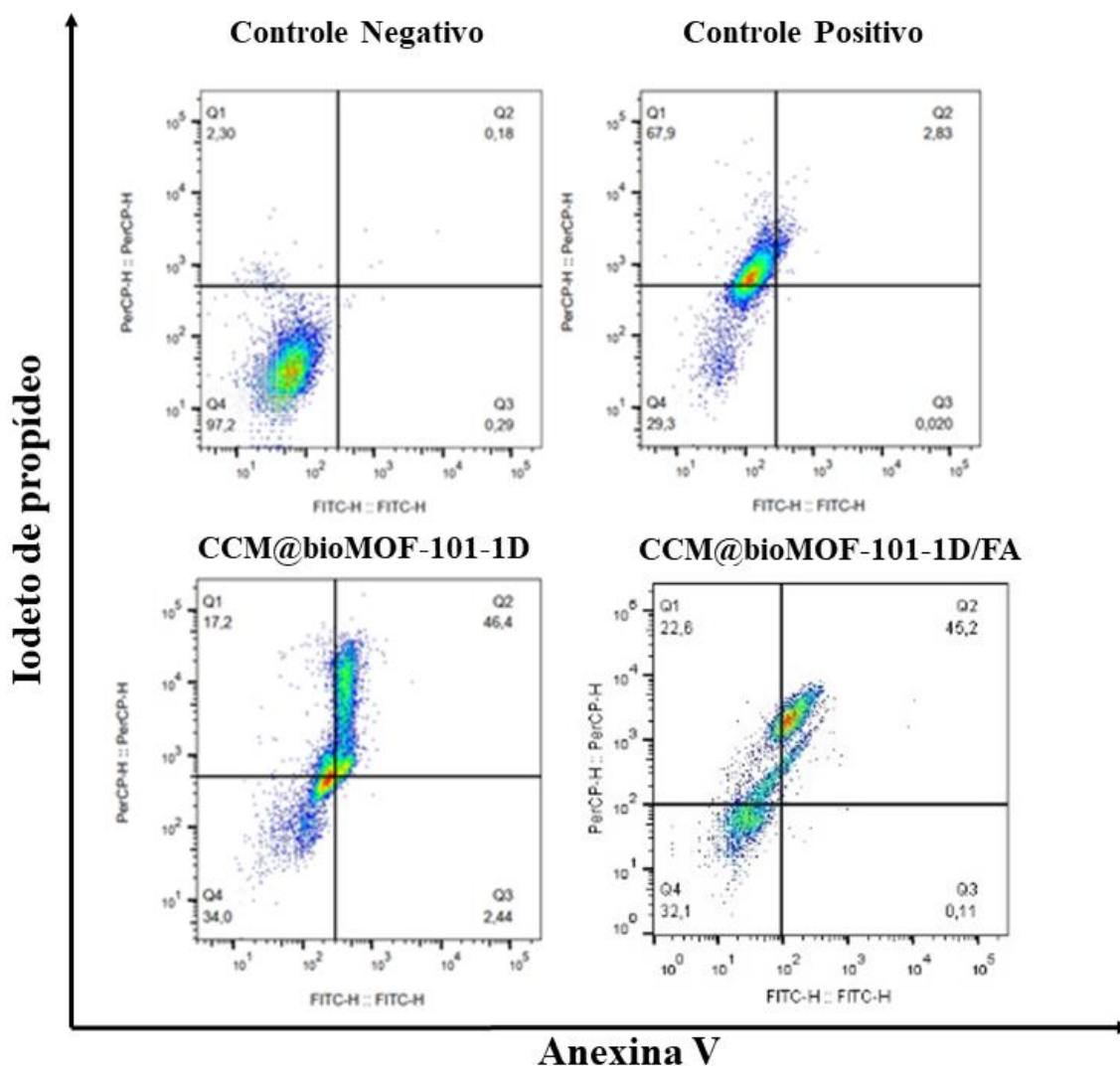
Fonte: Autor

Com base na figura é possível notar uma porcentagem de células nos quatro quadrantes para o composto CCM@bioMOF-101-1D, cujos valores são: 2,60 % em Q1, 18,4 % em Q2, 22,4 % em Q3, e 56,6 % em Q4. Assim os resultados obtidos para este material sugerem que as células se encontraram em estado de morte celular por apoptose tardia e/ou necrose. Já para o composto CCM@bioMOF-101-1D/FA é possível notar uma porcentagem de células em apenas três quadrantes, cujos valores são: 40,6% em Q1, 2,42% em Q2 e 57,0% em Q4. Com base neste resultado podemos notar que ocorreu majoritariamente a formação de duas grandes populações

nos quadrantes Q1 e Q4, sugerindo assim que após a exposição por 24 horas, parte das células se manteve viáveis e/ou não apoptóticas e a outra parte sofreu morte por necrose.

O mesmo estudo foi realizado para a linhagem celular 4T1, como mostrado na Figura 44.

Figura 44. Gráfico representativo do mecanismo de morte celular dos compostos CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D /FA na linhagem celular 4T1.



Fonte: Autor

Com base na figura é possível notar uma porcentagem de células nos quatro quadrantes para o composto CCM@bioMOF-101-1D, cujos valores são: 17,2 % em Q1, 46,4 % em Q2, 2,44 % em Q3, e 34,0 % em Q4. Assim os resultados obtidos para este material sugerem que as células se

encontraram em estado de morte celular por apoptose tardia e/ou necrose. Já para o composto CCM@bioMOF-101-1D/FA é possível notar uma porcentagem de células em apenas três quadrantes, cujos valores são: 22,0% em Q1, 46% em Q2 e 32,0% em Q4. Com base neste resultado podemos notar que ocorreu a formação de três populações, sugerindo assim que grande parte das células está em estado de morte celular por apoptose tardia e/ou necrose. Vale ressaltar que estes resultados corroboram e se assemelham aos resultados obtidos no capítulo anterior desta tese.

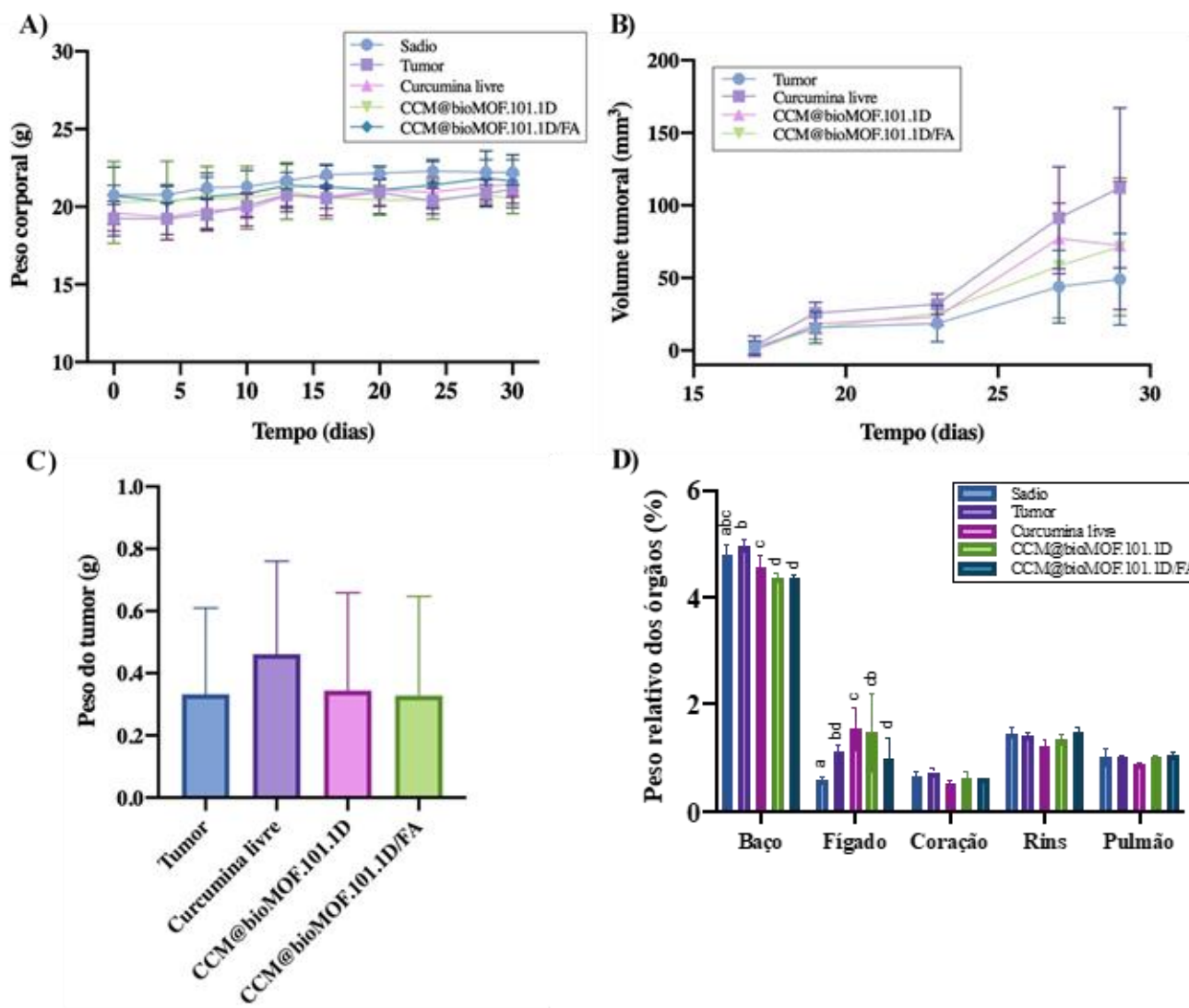
3.3.6 Aplicação biológica *in vivo*

Após as avaliações *in vitro*, a eficácia antitumoral das matrizes (CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA) foi avaliada em modelo murino Balb/c. Experimentos com animais são importantes, pois contribuem para o desenvolvimento da ciência possibilitando a descoberta de medidas profiláticas, ajudando a elucidar questões sobre o desenvolvimento de tumores e o mecanismo de ação dos compostos utilizados.

Os camundongos são um dos mais importantes animais experimentais, pois seu ciclo de vida é curto e possuem semelhanças fisiológicas com o ser humano.¹⁴⁴ Camundongos da linhagem Balb/c são utilizados pela facilidade na administração de fármacos e na coleta de sangue.¹⁴⁵ As células da linhagem 4T1 foram escolhidas uma vez que são facilmente transplantáveis e por ser um dos modelos experimentais capazes de desenvolver metástases nos locais afetados pelo câncer de mama em humanos e por permitirem a comparação entre os estudos *in vitro* e *in vivo*.¹⁴⁶

O acompanhamento do peso corporal dos animais é um importante indicador da avaliação da toxicidade do tratamento utilizado.¹⁴⁷ Assim, neste estudo foi realizado o monitoramento da variação do peso corporal dos animais ao longo de todo o experimento, como mostrado na Figura 45A. Com base na figura, não foi observada diferença estatística entre os grupos em relação à variação do peso dos animais, mostrando que não houve influência dos mesmos no crescimento dos camundongos. O volume tumoral ao longo do tempo e o peso tumoral ao final do experimento também foram avaliados e os resultados obtidos estão representados na Figura 45B e 45C, respectivamente. O peso relativo dos órgãos está representado na Figura 45D, onde pode-se observar que foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos quanto ao peso relativo do baço e do fígado.

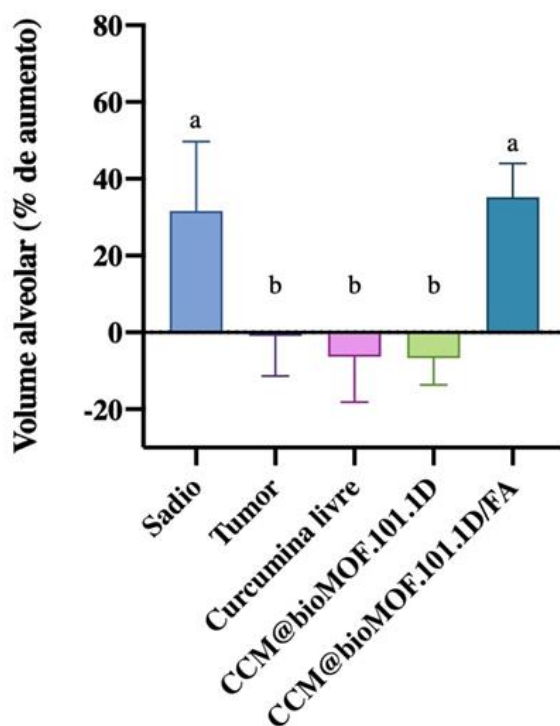
Figura 45. Resumo dos dados in vivo. (A) Peso corporal ao longo do tempo; (B) Volume tumoral ao longo do tempo; (C) Peso do tumor; (D) Peso relativo dos órgãos. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos.



Fonte: Autor

Na Figura 46 está representado o percentual de aumento do volume alveolar ao final do tratamento em relação ao volume detectado antes do enxerto das células tumorais. Pode-se perceber uma redução de volume alveolar em relação aos animais sadios para os animais do grupo tumor (sem tratamento), curcumina livre e os animais do grupo CCM@bioMOF-101-1D. Para o grupo CCM@bioMOF-101-1D/FA, não foi encontrada diferença estatística em relação ao volume alveolar do grupo sadio, indicando um possível efeito da matriz porosa na prevenção da mudança fenotípica na região do pulmão.

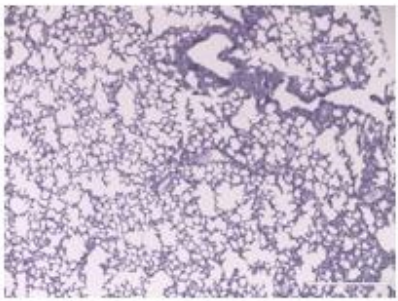
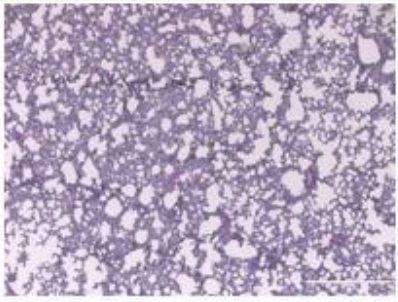
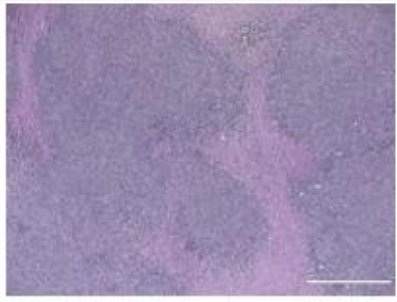
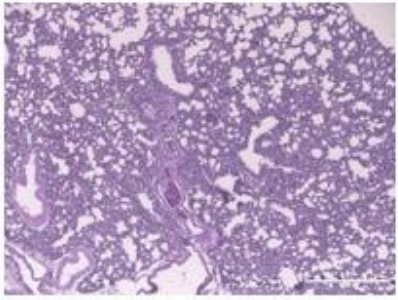
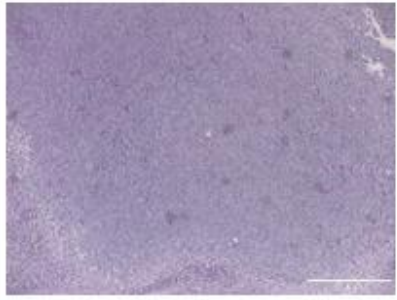
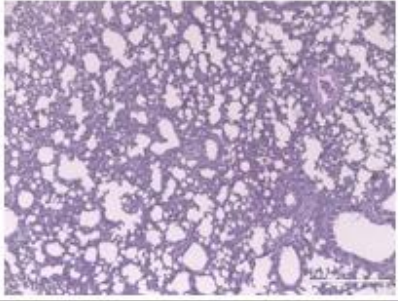
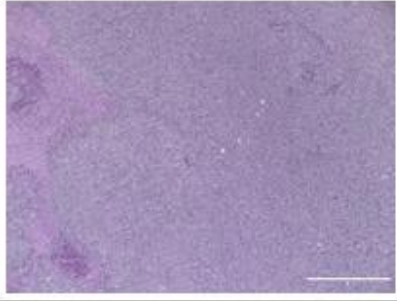
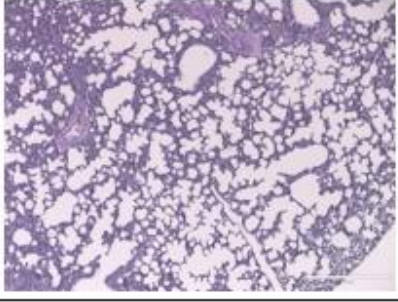
Figura 46. Percentual de aumento do volume alveolar ao final do tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos.



Fonte: Autor

Para observar a diferença no volume alveolar entre os grupos, foram analisados cortes histológicos do pulmão, como mostrado na Figura 47. Com os dados da histologia é possível observar uma disfunção endotelial do pulmão nos grupos que receberam enxerto tumoral, onde o tecido pulmonar possui características fibrinoides, o que a literatura¹⁴⁸ retrata como sendo uma característica que precede a uma formação metastática no pulmão.

Figura 47. Prancha histológica retratando as imagens do pulmão e da região tumoral.

Grupos	Pulmão	Tumor
Sadio		
Tumor		
Curcumina livre		
CCM@bioMOF.101.1D		
CCM@bioMOF.101.1D/FA		

Fonte: Autor

A toxicidade associada a terapias contra o câncer, podem resultar em um diagnóstico de anemia, risco de infecções, baixa contagem de leucócitos, entre outros.¹⁴⁹ Assim, foi realizada uma análise de hemograma completa de cada grupo (Tabela 18), avaliando taxas de glóbulos brancos, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e plaquetas. Com base nos valores apresentados, verificamos que todos os parâmetros analisados apresentaram valores normais.

Tabela 18. Análise do hemograma após os tratamentos. (MCV): volume corpuscular médio; (MCH): hemoglobina corpuscular média; e (MCHC): concentração de hemoglobina corpuscular média. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Sadio	Tumor	Curcumina livre	CCM@bioMOF.101.1D	CCM@bioMOF.101.1D/FA
Glóbulo brancos ($10^3/\mu\text{L}$)	$4,48 \pm 1,06$	$8,34 \pm 3,51$	$23,36 \pm 13,56$	$28,38 \pm 25,12$	$17,12 \pm 13,67$
Eritrócito ($10^6/\mu\text{L}$)	$10,96 \pm 0,23$	$10,77 \pm 0,38$	$10,28 \pm 0,53$	$10,48 \pm 0,60$	$10,94 \pm 0,67$
Hemoglobina (g/dL)	$16,80 \pm 0,51$	$15,92 \pm 0,44$	$15,12 \pm 0,78$	$15,00 \pm 0,54$	$15,94 \pm 0,51$
Hematócrito (%)	$41,50 \pm 1,04$	$41,46 \pm 1,24$	$39,62 \pm 1,93$	$39,43 \pm 1,67$	$42,18 \pm 1,16$
MCV (fL)	$37,88 \pm 0,82$	$38,52 \pm 0,38$	$38,52 \pm 0,48$	$37,60 \pm 0,59$	$38,64 \pm 1,55$
MCH (pg)	$15,40 \pm 0,23$	$14,82 \pm 0,19$	$14,70 \pm 0,14$	$14,30 \pm 0,32$	$14,62 \pm 0,58$
MCHC (g/dL)	$40,44 \pm 1,34$	$38,38 \pm 0,13$	$38,18 \pm 0,18$	$38,03 \pm 0,25$	$37,78 \pm 0,68$
Plaquetas ($10^3/\text{dL}$)	$1008,00 \pm 51,11$	$955,00 \pm 67,04$	$951,40 \pm 163,40$	$928,67 \pm 116,17$	$996,50 \pm 188,63$

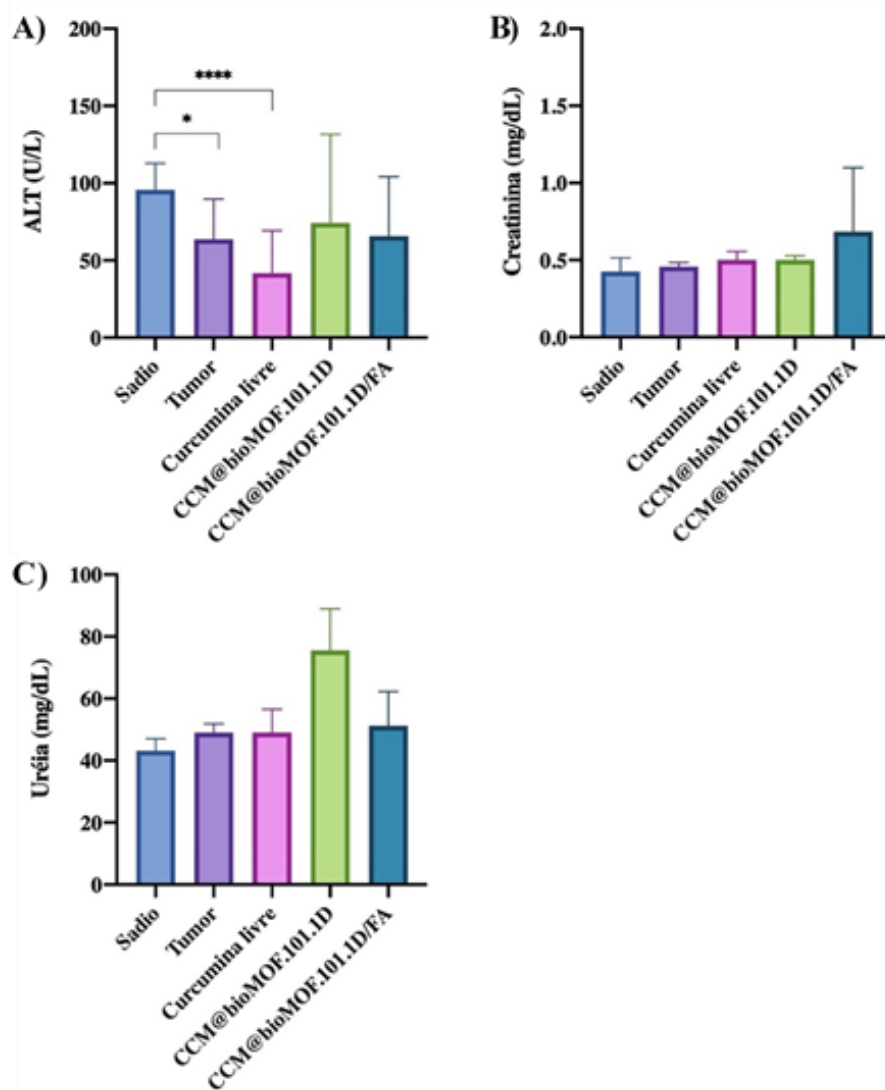
Fonte: Autor

O aumento dos níveis plasmáticos de creatinina é um indicativo de sobrecarga renal, nefrotoxicidade e insuficiência renal aguda. O aumento da creatinina ocorre quando se faz uso de um composto que pode causar toxicidade renal, comprometendo a eficácia da filtração glomerular e a redução da excreção urinária da creatinina, causando aumento de creatinina no sangue.¹⁵⁰

A enzima transaminase pirúvica é um indicador de lesão nas células hepáticas provocadas por drogas tóxicas ou por infecções.¹⁵¹ As transaminases podem ser encontradas nos tecidos, e no caso da transaminase pirúvica encontram-se predominantemente no fígado, coração e rim. Esta é considerada como um indicador de dano hepatocelular.¹⁵² Alguns processos patológicos envolvendo o fígado podem causar aumento nas enzimas hepáticas e essas mudanças podem ser induzidas por agentes químicos, como fármacos.¹⁴⁷

Assim, neste estudo foi realizada análise bioquímica dos analitos ALT, creatinina e ureia, como representadas na Figura 48 e Tabela 19. Com base nos resultados obtidos, é possível notar que foram encontradas alterações significativas nas taxas de ALT, indicativo de possível disfunção hepática, em relação aos animais saudáveis para os animais do grupo tumor sem tratamento e tratados com curcumina livre, o que sugere uma possível redução da toxicidade hepática dos grupos que foram tratados com os compostos CCM@bio-MOF-101-1D e CCM@bio-MOF-101-1D/FA.

Figura 48. Gráfico representativo dos dados de análise bioquímica. A) Teores de alanina aminotransferase (ALT); B) Teores de creatinina e C) Teores de ureia. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Teste t de Student: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.



Fonte: Autor

Tabela 19. Análise bioquímica contendo os teores obtidos de alanina aminotransferase (ALT), creatinina e ureia. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Teste t de Student: *P<0,05; ***P<0,001.

	Sadio	Tumor	Curcumina livre	CCM@bioMOF.101.1D	CCM@bioMOF.101.1D/FA
ALT (U/L)	95,80 $\pm$ 17,12	63,80 $\pm$ 25,91*	41,80 $\pm$ 27,42***	74,25 $\pm$ 57,32	65,80 $\pm$ 38,49
Creatinina (mg/dL)	0,43 $\pm$ 0,09	0,46 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,41
Ureia (mg/dL)	43,20 $\pm$ 3,83	49,00 $\pm$ 2,92	49,00 $\pm$ 7,58	75,50 $\pm$ 13,48	51,20 $\pm$ 11,08

Fonte: Autor

3.4 CONCLUSÃO

Utilizando-se a síntese solvotérmica e se valendo das técnicas de caracterização foi possível reproduzir o material bioMOF-101. Por se tratar de um material mesoporoso, este foi submetido a ensaios de encapsulação. Para comparação com o outro material sintetizado (RCA), os mesmos parâmetros foram utilizados no ensaio de encapsulação do fármaco. O material CCM@bioMOF-101-1D obteve uma EE de 99,42%, sendo um resultado bastante promissor.

A funcionalização também foi avaliada utilizando a técnica de RMN de ^1H , e os espectros mostraram a presença de um conjunto de sinais referentes ao ácido fólico, evidenciando que a funcionalização ocorreu de maneira efetiva. Realizou-se a liberação da CCM em pH dependente e os compostos apresentaram taxa de liberação menor quando comparados com os compostos sem funcionalizar. Além disso, os compostos a base da bioMOF-101 também apresentaram uma liberação mais efetiva em pH ácido.

Os ensaios de viabilidade celular revelaram que apenas a CCM foi capaz de inibir a proliferação celular na linhagem normal. Já nas linhagens tumorais de mama, os compostos bioMOF-101, CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA conseguiram inibir a proliferação celular nas três linhagens testadas, o que corrobora com o trabalho. Porém quando analisamos os valores de IC_{50} obtidos é possível verificar que apesar da linhagem MDA-MB-231 ser a que expressa uma maior quantidade de receptor de folato quando comparado com as demais células testadas, esta revelou resultados menos promissores.

Avaliamos também o mecanismo de morte celular dos compostos e os resultados revelaram que para a linhagem celular MCF-7 as células se encontraram em apoptose tardia quando o composto testado foi CCM@bioMOF-101-1D e em necrose para o composto CCM@bioMOF-101-1D/FA. Já para a linhagem 4T1 as células se encontraram em apoptose tardia para ambos os compostos testados.

No estudo *in vivo*, não foi possível observar uma redução na região tumoral após tratamento com os compostos testados. No entanto, os mesmos não revelaram toxicidade frente ao modelo utilizado, de acordo com os ensaios hematológicos. Além disso, foi possível observar que no grupo tratado com CCM@bioMOF-101-1D/FA houve uma redução na mudança fenotípica do endotélio pulmonar em relação aos outros grupos de tratamento. A redução do volume alveolar parece estar relacionada pelo tecido mais fibrinoide do endotélio pulmonar na transição endotelial-

mesenquimal, o que corroborou com as imagens histológicas dos pulmões, indicando uma possível eficácia do material CCM@bioMOF-101-1D/FA, visto que esse foi o único grupo que apresentou uma morfologia pulmonar semelhante aos animais saudáveis. Esses resultados, portanto, sugerem que a redução na disfunção pulmonar apresentada pode representar um alvo de ação da matriz porosa para prevenir ou retardar o surgimento de metástases pulmonares. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para investigar essa eficácia.



CAPÍTULO 4



4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

4.1 INTRODUÇÃO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos na área farmacêutica, uma vez que consegue separar, identificar e quantificar uma vasta gama de compostos presentes nos mais diversos tipos de matrizes, em um curto período de tempo, com uma alta resolução, eficiência e sensibilidade.¹⁵³

O princípio básico deste método consiste na injeção de um analito em uma coluna constituída de um material poroso (fase estacionária) e um líquido (fase móvel) que será bombeado em alta pressão através desta coluna. A fase móvel irá transportar os analitos através da coluna, onde ocorrerá a separação pelas diferenças de afinidade dos analitos com a fase estacionária. Assim é possível separar uma mistura em seus componentes individuais e, simultaneamente, determinar a concentração de cada componente.^{154,155}

Os detectores UV são os detectores de CLAE mais comuns, pois são robustos, compactos, fáceis de manusear e muitos analitos absorvem luz nesta faixa de frequência. Observando a complexidade das amostras e suas características moleculares, a escolha por um método de separação acoplado a um detector baseado na absorção na região UV-Vis se demonstra pertinente e adequada. Dessa maneira, as amostras podem ser analisadas em um sistema acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD), que pode medir vários comprimentos de onda ao mesmo tempo e detectar a absorção na região do UV para o Vis (180-780 nm).¹⁵⁶

A utilização de um detector multicanal traz uma maior robustez do ponto de vista analítico, tendo em vista a complexidade amostral decorrente dos diferentes compostos químicos utilizados para a formação das matrizes contidas neste trabalho e a incorporação dos mesmos. Além disso, uma vez que se trata de um sistema multicanal onde nenhuma parte é movida para alterar o comprimento de onda ou para fazer a varredura, há uma minimização de erros mecânicos ou desvios dos analitos com o tempo.¹⁵⁷

Diferentes métodos utilizando CLAE-DAD são reportados na literatura para promover a quantificação da CCM nas mais variadas matrizes¹⁵⁸⁻¹⁶¹, demonstrando a importância da técnica para a quantificação de fármaco. Porém vale ressaltar que antes de promover a quantificação é necessário que o método analítico seja validado.

A validação visa conferir a confiabilidade do método escolhido além de avaliar a sua reprodutibilidade. O procedimento é realizado analisando diferentes parâmetros, chamados de figuras de mérito, como: precisão, exatidão, robustez, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), especificidade, seletividade, linearidade entre outros. Vale destacar, que existe diferenças nos parâmetros avaliados tendo em vista o tipo de método utilizado, caso seja um procedimento novo, padrão, modificado, quando a técnica será utilizada apenas com caráter qualitativo, quando será avaliada a concentração em níveis elevados ou baixos, sendo os parâmetros demonstrados na Tabela 20 segundo normativa da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).¹⁶²

Tabela 20. Parâmetros analisados em uma validação analítica.

Tipo de Método	Novo	Padrão	Modificado	Qualitativo	Quantitativo (nível elevado)	Quantitativo (nível baixo)
Exatidão	✓	✓	✓	✗	✓	✓
Repetitividade	✓	✓	✓	✗	✓	✓
Reprodutibilidade	✓	☑	☑	✗	✓	✓
LD	☑	☑	✗	✓	✗	✓
LQ	☑	☑	☑	✗	✗	✓
Linearidade	✓	☑	✗	✗	✓	✗
Especificidade	✓	✗	✗	✓	✓	✓
Robustez	✓	✗	✗	✓	✓	✓
✓ Obrigatório; ☑ Se relevante; ✗ Não necessário						

Fonte: Autor

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

Os principais reagentes e solventes utilizados neste capítulo, por apresentar elevada pureza, foram utilizados sem nenhum tratamento ou purificação prévia e estão listados na Tabela 21.

Tabela 21. Reagentes e solventes utilizados no trabalho.

Reagente/Solvente	Procedência
Acetonitrila grau HPLC	Merck
Água Deionizada	-
Curcumina (CCM)	Inlab
Ácido acético	Merck
Coluna C18	Phenomenex
Metanol	Synth

Fonte: Autor.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Revalidação do método analítico para quantificação de CCM por CLAE-DAD

❖ Parâmetros para testar a metodologia analítica

Com o objetivo de garantir a quantificação da CCM nos materiais obtidos, foi testada a metodologia proposta por Fonseca-Santos et al.¹⁶³ baseando-se na Resolução RE nº 166, (BRASIL, 2017).¹⁶⁴ Os experimentos foram realizados em cromatógrafo SPD M20A (Shimadzu), equipado com detector DAD, detecção em 425 nm, com bomba LC-20A, instalado no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP Araraquara. A separação foi realizada em coluna C18 de fase reversa (Luna, Phenomenex) 250 x 4,60 mm (5 µm). A fase móvel foi constituída de acetonitrila e água deionizada (2,0% de ácido acético, pH=3) com vazão de 1,2 mL.min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e temperatura ajustada a 33 °C. As amostras foram eluídas com o programa de eluição em modo isocrático 50% (v/v).

Para testar a metodologia escolhida avaliou-se os seguintes parâmetros: linearidade e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), conforme descrito pelo guia da ANVISA (Brasil, 2017).

❖ Linearidade

A linearidade foi avaliada pela média de três curvas analíticas da CCM. A partir de uma solução-mãe na concentração de 0,1 mg/mL, foram preparadas sete diluições, com concentrações variando de 0,5 – 75,0 µg/mL. A leitura dos sete níveis de concentração foi realizada em triplicata para cada curva padrão. A linearidade foi avaliada através da análise de regressão linear, utilizando

ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados e a qualidade do ajuste do modelo foi avaliada por meio de análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 0,05%.

❖ **Precisão**

Repetibilidade: A precisão intracorrida ou repetibilidade foi avaliada por meio de três níveis de concentrações da curva analítica: baixa (1,0 µg/mL), média (50 µg/mL) e alta (75 µg/mL), no mesmo dia sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Precisão intermediária: A precisão intercorrida ou intermediária foi realizada nas mesmas condições, com analistas diferentes em dias diferentes e consecutivos. Os resultados foram analisados através do coeficiente de variação. Os ensaios foram realizados em triplicata. A proximidade entre os resultados obtidos na repetibilidade e na precisão intermediária foi verificada, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), conforme a Equação 3, na qual DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

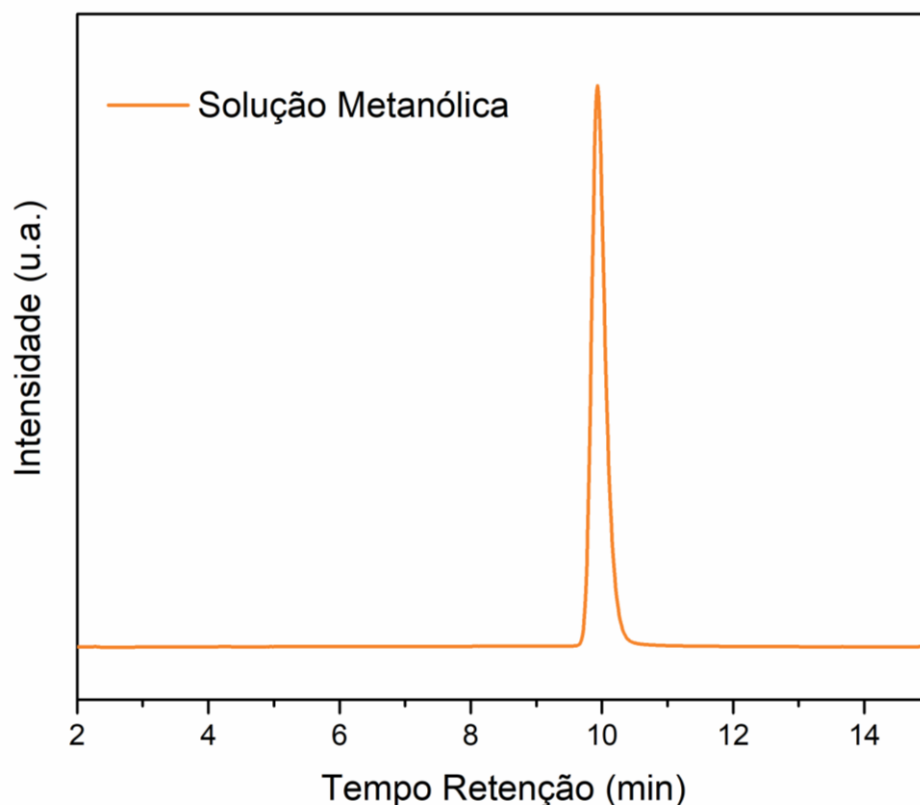
$$\text{Equação 3:} \quad \text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Avaliação do método para quantificação de CCM incorporada

Com o objetivo de avaliar a quantidade de CCM que foi incorporada nos poros dos materiais sintetizados (RCA e bioMOF-101), foi utilizado a metodologia proposta por Fonseca-Santos et al.¹⁶³ O cromatograma obtido pelo método escolhido está representado na Figura 49, demonstrando a resolução e a simetria do pico correspondente a CCM, sendo seu tempo de retenção de 9,93 minutos em solução de metanol.

Figura 49. Cromatograma típico da CCM (50 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico em solução metanólica.



Fonte: Autor

4.3.1.1 Linearidade

A curva analítica em metanol foi realizada nas concentrações de 0,5 a 75 µg/mL. Para cada concentração foram realizadas três injeções e os resultados médios das áreas dos picos cromatográficos obtidos foram utilizados para o estudo de regressão linear.¹⁶⁴

Na Tabela 22 encontram-se os resultados obtidos a partir da injeção das sete concentrações do padrão CCM em solução metanólica e a Figura 50 representa a curva analítica obtida na qual pode-se observar a linearidade dos resultados, pois o coeficiente de correlação encontrado foi de 0,99943.

Tabela 22. Valores das áreas referentes ao pico de CCM em solução metanólica para a construção da curva analítica por CLAE-DAD.

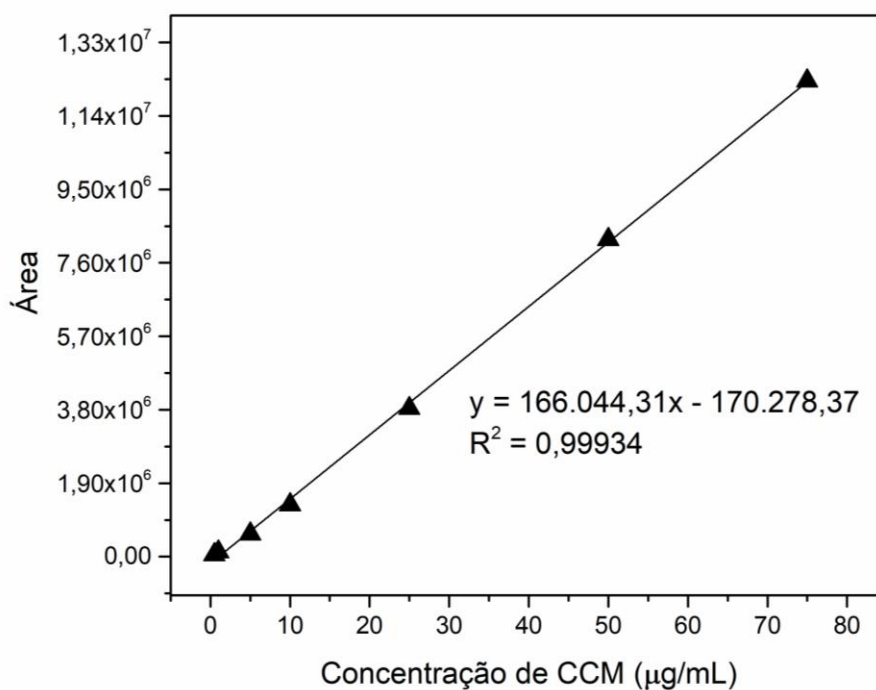
CCM($\mu\text{g/mL}$)	Área ^a	Área média $\pm$ DP ^b	CV ^c (%)
0,5	51.776	51.669 $\pm$ 92	0,18
	51.613		
	51.619		
1	126.251	125.526 $\pm$ 664	0,53
	124.947		
	125.379		
5	587.494	587.930 $\pm$ 378	0,50
	588.148		
	588.148		
10	1.343.222	1.344.736 $\pm$ 1.477	0,11
	1.344.814		
	1.346.172		
25	3.869.224	3.868.681 $\pm$ 596	0,83
	3.868.044		
	3.868.774		
50	8.170.885	8.169.634 $\pm$ 1.116	0,69
	8.169.277		
	8.168.740		
75	12.263.644	12.306.081 $\pm$ 41.988	0,34
	12.306.992		
	12.347.606		

^aValor médio das três determinações

^bDP= Desvio Padrão

^cCV= Coeficiente de variação

Fonte: Autor

Figura 50. Curva analítica da CCM em solução de metanol obtida pelo método cromatográfico.

Fonte: Autor

A ANOVA foi calculada para os dados obtidos a partir da curva analítica da CCM representado na Tabela 23.

Tabela 23. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de CCM em solução metanólica através da técnica de CLAE-DAD.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F _{calculado}	F _{tabelado}
Entre Concentrações	6	406875151133804	67812525188967	2672,94*	2,85
Regressão Linear	1	406519970623425	406519970623425	16023,63*	4,60
Desvio de Linearidade	5	355180510379	71036102076	2,80	2,96
Dentro (resíduo)	14	355180510379	25370036456		
Total	20	406887193509110			

*Significativo para $p < 0,05\%$

Fonte: Autor

Com base na análise estatística, pode-se inferir que não existe desvio significativo das linearidades ($F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ aceitando assim a hipótese da igualdade – H_0) e que existe regressão linear nos dados obtidos para o limite de confiança de 5% ($F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ rejeitando a hipótese H_0).

4.3.1.2 Precisão

Para garantir a confiabilidade das análises do fármaco, o método deve ser preciso, ou seja, os resultados de uma série de leituras de uma mesma amostra devem ser próximos um dos outros. Assim a precisão foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

❖ Repetibilidade

O coeficiente de variação (CV%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas no mesmo dia, conforme apresentado na Tabela 24 foi de 0,41%, tendo o maior valor na concentração de 1 µg/mL que foi de 0,97%, demonstrando assim, que o método é preciso por apresentar valores inferiores à 5%.

Tabela 24. Determinação da precisão intracorrída (repetibilidade) de CCM em solução metanólica por meio da técnica de CLAE-DAD.

CCM (µg/mL)	Área ^a	Área média	CV ^b (%)	CV Geral (%)
1	125.909	126.583	0,97	0,41
	125.839			
	128.001			
50	8.140.878	8.141.320	0,03	
	8.139.011			
	8.144.071			
75	12.265.977	12.244.877	0,23	
	12.213.623			
	12.255.030			

^aValor médio das determinações

^bCV = Coeficiente de variação

Fonte: Autor

❖ Precisão Intermediária

O CV percentual (%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes, conforme apresentado na Tabela 25, foi de 0,37%, tendo o maior valor na concentração de 1 µg/mL que foi de 0,91%, quando foi preparada pelo analista A no primeiro dia de ensaio, demonstrando assim, que o método é preciso por apresentar valores inferiores à 5%.

Tabela 25. Determinação da precisão intermediária de CCM em solução metanólica através da técnica de CLAE-DAD.

Dia	Analista	CCM(µg/mL)	Área média ^a	CV ^b (%)	CV Geral (%)
1	A	1	126.583	0,97	0,37
		50	8.141.320	0,03	
		75	12.244.877	0,23	
2	B	1	130.767	0,11	
		50	7.932.102	0,23	
		75	12.314.858	0,65	

^aValor médio das determinações

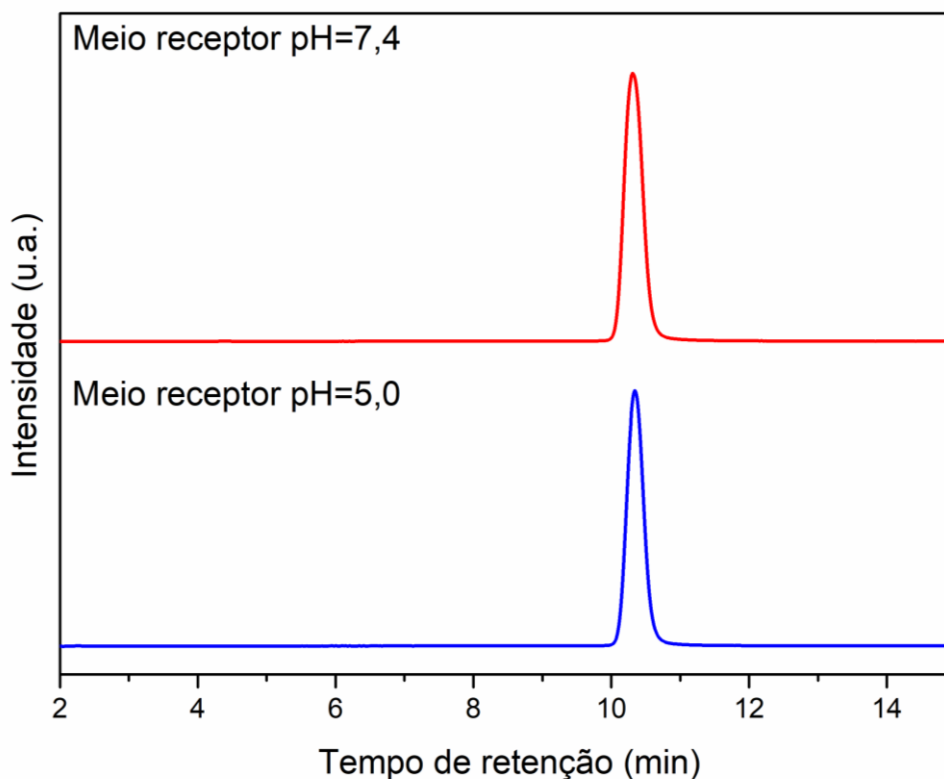
^bCV = Coeficiente de variação

Fonte: Autor

4.3.2 Avaliação do método para quantificação de CCM liberada

Com o objetivo de avaliar a quantidade de CCM que foi liberada pelos materiais sintetizados (RCA e bioMOF-101), foi utilizado a metodologia proposta por Fonseca-Santos et al.¹⁶³ O cromatograma obtido pelo método escolhido está representado na Figura 51, demonstrando a resolução e a simetria do pico correspondente a CCM, sendo seu tempo de retenção de 10,31 minutos, com o meio receptor (PBS + Tween-20) em pH = 5,0 e pH = 7,4.

Figura 51. Cromatograma típico da CCM (50 $\mu\text{g/mL}$) obtido pelo método cromatográfico em meio receptor em pH=5,0 (azul) e pH=7,4 (vermelho).



Fonte: Autor

4.3.2.1 Linearidade

As curvas analíticas em meio receptor foram realizadas nas concentrações de 0,5 a 75 $\mu\text{g/mL}$. Para cada concentração foram realizadas três injeções e os resultados médios das áreas dos picos cromatográficos obtidos foram utilizados para o estudo de regressão linear.¹⁶⁴

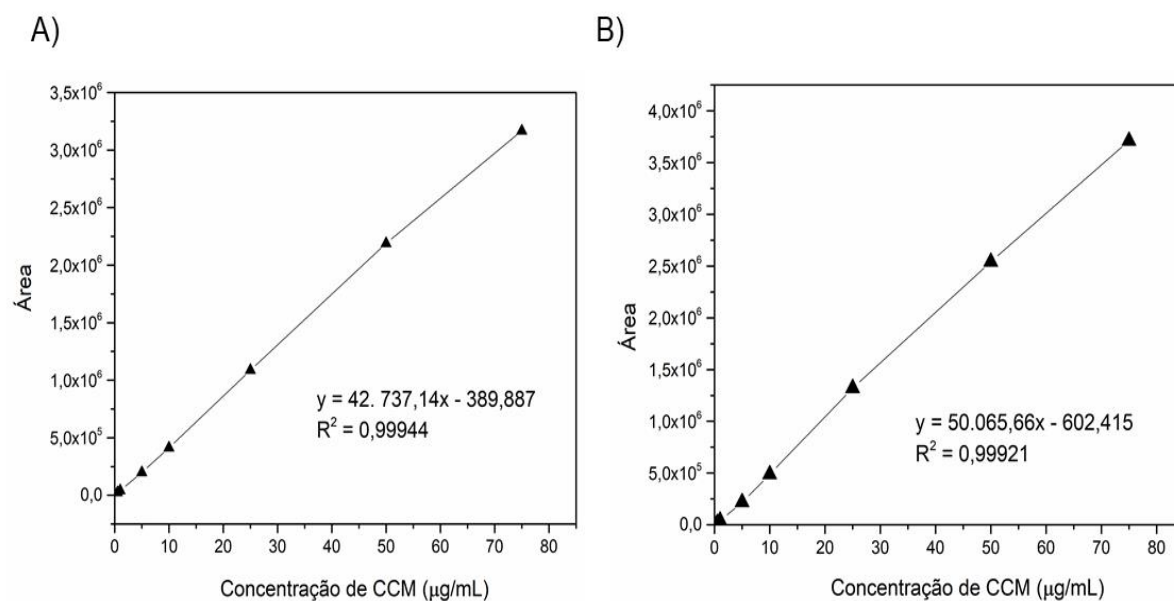
Na Tabela 26 encontram-se os resultados obtidos a partir da injeção das sete concentrações do padrão CCM em meio receptor em pH = 5,0 e 7,4. A Figura 52 representa as curvas analíticas obtidas nas quais pode-se observar a linearidade dos resultados, pois o coeficiente de correlação encontrado para os valores de pH 5,0 e 7,4 foram de 0,99944 e 0,99921, respectivamente.

Tabela 26. Valores das áreas referentes ao pico da CCM em meio receptor em pH=5,0 e pH=7,4 para a construção das curvas analíticas por CLAE-DAD.

CCM (µg/mL)	pH 5,0			pH 7,4		
	Área ^a	Área média ± DP ^b	CV ^c (%)	Área ^a	Área média ± DP ^b	CV ^c (%)
0,5	25.008	24.147±747	3,09	17.775	17.559±188	1,07
	23.673			17.426		
	23.759			17.476		
1	40.219	40.500±457	1,13	38.019	37.909±96	0,25
	40.255			37.864		
	41.028			37.844		
5	197.399	197.575±437	0,22	218.398	217.849±722	0,33
	198.073			218.119		
	197.253			217.031		
10	411.853	411.647±189	0,05	487.843	487.129±774	0,16
	411.483			486.306		
	411.604			487.237		
25	1.087.404	1.087.050±369	0,03	1.319.676	1.320.531±1.724	0,13
	1.086.668			1.322.516		
	1.087.078			1.319.401		
50	2.186.559	2.189.539±2.622	0,12	2.540.152	2.541.235±1.609	0,06
	2.190.568			2.540.469		
	2.191.491			2.543.084		
75	3.166.760	3.168.004±1.101	0,03	3.705.042	3.709.504±4.373	0,12
	3.168.855			3.709.688		
	3.168.399			3.713.782		

^aValor médio das três determinações^bDP= Desvio Padrão^cCV= Coeficiente de variação**Fonte:** Autor

Figura 52. Curvas analíticas da CCM em meio receptor obtidas pelo método cromatográfico: A) em pH = 5,0 e B) em pH = 7,4.



Fonte: Autor

A ANOVA foi calculada para os dados obtidos a partir das curvas analíticas da CCM representado na Tabela 27.

Tabela 27. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção das curvas analíticas de CCM em meio receptor com os valores de pH = 5,0 e 7,4 através da técnica de CLAE-DAD.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	pH 5,0				pH 7,4			
		Soma de Quadrados	Variância	F _{cal.}	F _{tab.}	Soma de Quadrados	Variância	F _{cal.}	F _{tab.}
Entre Concentrações	6	406875151133804	4491896821333	4166,86*	2,85	36995431854628	6165905309105	2969,93*	2,85
Regressão Linear	1	406519970623425	26936288864766	24987,18*	4,60	36966366268768	36966366268768	17805,56*	4,60
Desvio de Linearidade	5	355180510379	3018412647	2,80	2,96	29065585860	5813117172	2,80	2,96
Dentro (resíduo)	14	355180510379	1078004517			29065585860	2076113276		
Total	20	406887193509110				36995483552147			

*Significativo para $p < 0,05\%$

Fonte: Autor

Com base na análise estatística pode-se inferir que não existe desvio significativo das linearidades ($F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$, aceitando assim a hipótese da igualdade – H_0) e que existe regressão linear nos dados obtidos para o limite de confiança de 5% ($F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ rejeitando a hipótese H_0).

4.3.2.2 Precisão

Para garantir a confiabilidade das análises do fármaco, o método deve ser preciso, ou seja, os resultados de uma série de leituras de uma mesma amostra devem ser próximos um dos outros. Assim a precisão foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

❖ Repetibilidade

O coeficiente de variação (CV%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas no mesmo dia, conforme apresentado na Tabela 28, foi de 0,51% e 0,47%, tendo o maior valor na concentração de 1 µg/mL que foi de 1,30% e 1,17% para os valores de pH = 5,0 e 7,4, respectivamente. Demonstrando assim, que o método é preciso por apresentar valores inferiores à 5%.

Tabela 28. Determinação da precisão intracorrída (repetibilidade) de CCM em meio receptor em pH = 5,0 e 7,4 por meio da técnica de CLAE-DAD.

CCM (µg/mL)	pH 5,0				pH 7,4			
	Área ^a	Área média	CV ^b (%)	CV Geral (%)	Área ^a	Área média	CV ^b (%)	CV Geral (%)
1	40.388	40.876	1,30	0,51	36.870	37.336	1,17	0,47
	40.800				37.732			
	41.441				37.405			
50	2.185.832	1.189.908	0,14	0,51	2.540.004	2.545	0,15	0,47
	1.191.895				2.538.443			
	2.189.908				2.545.738			
75	3.166.963	3.165.731	0,08	0,51	3.712.299	3.710.790	0,09	0,47
	3.167.383				3.713.288			
	3.162.846				3.706.782			

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

❖ Precisão Intermediária

O CV percentual (%) entre as amostras de mesma concentração e realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes, conforme apresentado na Tabela 29, foi de 0,64%, tendo um maior valor na concentração de 1,0 µg/mL que foi de 1,96%, quando foi preparada pelo analista B no segundo dia de ensaio, para o pH = 5,0. Já para o pH=7,4 o CV% foi de 0,41%, tendo um maior valor na concentração de 1,0 µg/mL que foi de 1,17%, quando foi preparada pelo analista A no primeiro dia de ensaio. Com base nos valores apresentados, pode-se inferir que o método é preciso, por apresentar valores inferiores à 5 %.

Tabela 29. Determinação da precisão intermediária de CCM em meio receptor em valores de pH = 5,0 e 7,4 através da técnica de CLAE-DAD.

Dia	Analista	CCM (µg/mL)	pH 5,0		CV Geral (%)	pH7,4		CV Geral (%)
			Área média ^a	CV ^b (%)		Área média ^a	CV ^b (%)	
1	A	1	40.876	1,30	0,64	37.336	1,17	0,41
		50	2.189.212	0,14		2.541.395	0,15	
		75	3.165.731	0,08		3.710.790	0,09	
		1	40.535	1,96		36.716	0,83	
2	B	50	2.188.984	0,18		2.543.640	0,03	
		75	3.167.033	0,15		3.703.991	0,20	

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

4.4 CONCLUSÃO

O método analítico escolhido demonstrou ser eficaz para avaliar a quantidade de CCM que foi incorporada e liberada nas matrizes sintetizadas neste trabalho, apresentando linearidade e precisão nos dados.

As matrizes não demonstraram ter interferência no comprimento de onda escolhido para a quantificação da CCM (425 nm).

Os resultados obtidos para todos os parâmetros estudados se demonstraram satisfatórios tendo em vista o DPR relativo menor que 5%, com valores dentro do estipulado para quantificação de materiais, estabelecido pela ANVISA, dentro da área farmacêutica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível avaliar as MOFs, em especial duas séries de bioMOFs, como sistemas carreadores de fármacos com posterior avaliação de sua eficácia antitumoral para o câncer de mama em modelos *in vitro* e *in vivo*.

A primeira série apresentada, denominada nesta tese de RCA, revelou por estudos computacionais, ser um protótipo de uma MOF já reportada em literatura, a bioMOF-100. Esta apresentou uma eficiência de encapsulação satisfatória para este tipo de carreador e uma liberação de CCM pH dependente. A técnica de RMN de ^1H contribui para avaliarmos a funcionalização desta matriz com ácido fólico.

Nos estudos *in vitro*, nos valem de três linhagens tumorais de mama (MCF-7, 4T1 e MDA-MB-231) e uma linhagem normal (NIH/3T3) para avaliarmos a melhor viabilidade celular desta série de compostos, cujos resultados revelaram resultados bastante promissores nas linhagens MCF-7 e 4T1. Avaliamos também o mecanismo de morte celular para os compostos CCM@RCA-1D e CCM@RCA-1D/FA nas duas linhagens com melhores resultados de viabilidade celular. E em ambas as linhagens (4T1 e MCF-7) as células revelaram um mecanismo de morte por apoptose tardia.

Uma segunda série de compostos foi então sintetizada, sendo novamente uma bioMOF também reportada em literatura, a bioMOF-101. A escolha desta bioMOF se respaldou no fato dela apresentar características muito semelhantes da anterior, cuja principal diferença entre elas é a troca do ligante ponte. Esse material foi então submetido aos mesmos ensaios do composto RCA, para posterior comparação.

Os resultados revelaram uma altíssima eficiência de encapsulação, sendo de 99,42% e os resultados de liberação de fármaco também mostraram uma liberação de CCM pH dependente. Novamente a técnica de RMN de ^1H nos auxiliou na verificação da funcionalização da matriz com ácido fólico. Estudos de viabilidade e morte celular também foram realizados para esta série de compostos e assim como esperado os resultados foram muito semelhantes aos obtidos para a série de compostos do RCA.

Diante dos resultados promissores *in vitro*, a série de compostos da bioMOF-101 foram então submetidos à ensaios *in vivo*, para avaliação de sua eficácia antitumoral. Apesar de no modelo testado, não ser possível visualizar uma redução na região tumoral após tratamento com os compostos CCM@bioMOF-101-1D e CCM@bioMOF-101-1D/FA, verificamos uma redução na mudança fenotípica do endotélio pulmonar, sendo este, um resultado bastante interessante, mas que ainda precisa de mais estudos para conclusão da eficácia antitumoral do composto CCM@bioMOF-101-1D/FA.

6 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020. Genebra: WHO, 2003.
<https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>. Acesso em: 15 de setembro de 2021.
2. Bertos, N. R. & Park, M. Breast cancer — one term, many entities? *J. Clin. Invest.* **121**, 3789–3796 (2011).
3. Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 674–690 (2016).
4. Meng, H. *et al.* Conjugates of folic acids with BSA-coated quantum dots for cancer cell targeting and imaging by single-photon and two-photon excitation. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 117–123 (2011).
5. Zhang, Z. *et al.* Folate Receptor α Associated With Triple-Negative Breast Cancer and Poor Prognosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **138**, 890–895 (2014).
6. M. Yallapu, M., Jaggi, M. & C. Chauhan, S. Curcumin Nanomedicine: A Road to Cancer Therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 1994–2010 (2013).
7. Nobili, S. *et al.* Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol. Res.* **59**, 365–378 (2009).

8. Treasure, J. Herbal Medicine and Cancer: An Introductory Overview. *Semin. Oncol. Nurs.* **21**, 177–183 (2005).
9. Carolina Alves, R., Perosa Fernandes, R., Fonseca-Santos, B., Damiani Victorelli, F. & Chorilli, M. A Critical Review of the Properties and Analytical Methods for the Determination of Curcumin in Biological and Pharmaceutical Matrices. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **49**, 138–149 (2019).
10. Vishvakarma, N. K. Novel antitumor mechanisms of curcumin: implication of altered tumor metabolism, reconstituted tumor microenvironment and augmented myelopoiesis. *Phytochem. Rev.* **13**, 717–724 (2014).
11. Prasad, S., Tyagi, A. K. & Aggarwal, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. *Cancer Res. Treat.* **46**, 2–18 (2014).
12. Naksuriya, O., Okonogi, S., Schiffelers, R. M. & Hennink, W. E. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials* **35**, 3365–3383 (2014).
13. Ji, J.-L., Huang, X.-F. & Zhu, H.-L. Curcumin and its Formulations: Potential Anti-Cancer Agents. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **12**, 210–218 (2012).
14. Sharma, R. A., Gescher, A. J. & Steward, W. P. Curcumin: The story so far. *Eur. J. Cancer* **41**, 1955–1968 (2005).
15. Bisht, S. & Maitra, A. Dextran-doxorubicin/chitosan nanoparticles for solid tumor therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **1**, 415–425 (2009).
16. Tiwari, A., Singh, A., Garg, N. & Randhawa, J. K. Curcumin encapsulated zeolitic imidazolate frameworks as stimuli responsive drug delivery system and their interaction with biomimetic environment. *Sci. Rep.* **7**, 12598 (2017).
17. Sun, M. *et al.* Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine* **7**, 1085–1100 (2012).
18. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). O que é câncer? Rio de Janeiro: INCA, 2018. Acesso em: 20 de setembro de 2021.
19. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.
20. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 7–33 (2021).
21. Stuchey, A. Breast Cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.* **54**, 96–102 (2011).
22. Lee, J. H. & Nan, A. Combination Drug Delivery Approaches in Metastatic Breast

- Cancer. *J. Drug Deliv.* **2012**, 1–17 (2012).
23. Lee, B. L. *et al.* Breast cancer in Brazil: present status and future goals. *Lancet Oncol.* **13**, e95–e102 (2012).
 24. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.
<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 20 de setembro de 2021.
 25. Makki, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin. Med. Insights Pathol.* **8**, CPath.S31563 (2015).
 26. Dai, X., Xiang, L., Li, T. & Bai, Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J. Cancer* **7**, 1281–1294 (2016).
 27. Tacha, B.; Bremer, R. Folate receptor alpha is frequently expressed in triple negative breast cancers. In: Biocare Medical, 26., 2013, Concord. Modern Pathology. Berlim, 2013. Supl. 2: 71A. <https://biocare.net/wp-content/uploads/SP-FR100.pdf>.
 28. Song, D.-G. *et al.* Effective adoptive immunotherapy of triple-negative breast cancer by folate receptor-alpha redirected CAR T cells is influenced by surface antigen expression level. *J. Hematol. Oncol.* **9**, 56 (2016).
 29. Fadus, M. C., Lau, C., Bikhchandani, J. & Lynch, H. T. Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. *J. Tradit. Complement. Med.* **7**, 339–346 (2017).
 30. Al-Kinani, M. A., Haider, A. J. & Al-Musawi, S. Design, Construction and Characterization of Intelligence Polymer Coated Core–Shell Nanocarrier for Curcumin Drug Encapsulation and Delivery in Lung Cancer Therapy Purposes. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **31**, 70–79 (2021).
 31. Pricci, M. *et al.* Curcumin and Colorectal Cancer: From Basic to Clinical Evidences. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2364 (2020).
 32. Barati, N., Momtazi-Borojeni, A. A., Majeed, M. & Sahebkar, A. Potential therapeutic effects of curcumin in gastric cancer. *J. Cell. Physiol.* **234**, 2317–2328 (2019).
 33. Harini, L. *et al.* An ingenious non-spherical mesoporous silica nanoparticle cargo with curcumin induces mitochondria-mediated apoptosis in breast cancer (MCF-7) cells. *Oncotarget* **10**, 1193–1208 (2019).
 34. Wang, J. *et al.* Curcumin-Loaded TPGS/F127/P123 Mixed Polymeric Micelles for Cervical Cancer Therapy: Formulation, Characterization, and In Vitro and In Vivo Evaluation. *J. Biomed. Nanotechnol.* **13**, 1631–1646 (2017).
 35. Pourhanifeh, M. H. *et al.* Therapeutic role of curcumin and its novel formulations in

- gynecological cancers. *J. Ovarian Res.* **13**, 130 (2020).
36. Yallapu, M. M. *et al.* Curcumin induces chemo/radio-sensitization in ovarian cancer cells and curcumin nanoparticles inhibit ovarian cancer cell growth. *J. Ovarian Res.* **3**, 11 (2010).
 37. Xu, C., Wang, M., Guo, W., Sun, W. & Liu, Y. Curcumin in Osteosarcoma Therapy: Combining With Immunotherapy, Chemotherapeutics, Bone Tissue Engineering Materials and Potential Synergism With Photodynamic Therapy. *Front. Oncol.* **11**, (2021).
 38. Banik, U., Parasuraman, S., Adhikary, A. K. & Othman, N. H. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 98 (2017).
 39. Liu, D. & Chen, Z. The Effect of Curcumin on Breast Cancer Cells. *J. Breast Cancer* **16**, 133 (2013).
 40. Khalil, N. M. *et al.* Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA–PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **101**, 353–360 (2013).
 41. Bisht, S. & Maitra, A. Dextran–doxorubicin/chitosan nanoparticles for solid tumor therapy. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **1**, 415–425 (2009).
 42. Buchholz, T. A. Radiation Therapy for Early-Stage Breast Cancer after Breast-Conserving Surgery. *N. Engl. J. Med.* **360**, 63–70 (2009).
 43. Florescu, A., Amir, E., Bouganim, N. & Clemons, M. Immune Therapy for Breast Cancer in 2010—Hype or Hope? *Curr. Oncol.* **18**, 623 (2011).
 44. Fang, X., Cao, J. & Shen, A. Advances in anti-breast cancer drugs and the application of nano-drug delivery systems in breast cancer therapy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **57**, 101662 (2020).
 45. Pentenero, M. Nanotechnology: a novel adjunctive aid to fight cancer. *Oral Dis.* **23**, 273–275 (2017).
 46. Safari, J. & Zarnegar, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *J. Saudi Chem. Soc.* **18**, 85–99 (2014).
 47. Sung, J. C., Pulliam, B. L. & Edwards, D. A. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends Biotechnol.* **25**, 563–570 (2007).
 48. Mei, L. *et al.* Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 880–890 (2013).
 49. Jain, A. K. & Jain, S. Advances in oral delivery of anti-cancer prodrugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **13**, 1759–1775 (2016).

50. Yaghi, O. M., Li, G. & Li, H. Selective binding and removal of guests in a microporous metal–organic framework. *Nature* **378**, 703–706 (1995).
51. Yaghi, O. M. & Li, H. Hydrothermal Synthesis of a Metal–Organic Framework Containing Large Rectangular Channels. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10401–10402 (1995).
52. Frem, R. *et al.* MOFs (Metal–Organic Frameworks): Uma fascinante classe de materiais inorgânicos porosos. *Quim. Nova* (2018) doi:10.21577/0100-4042.20170285.
53. Farha, O. K. *et al.* Metal–Organic Framework Materials with Ultrahigh Surface Areas: Is the Sky the Limit? *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 15016–15021 (2012).
54. Furukawa, H. *et al.* Ultrahigh Porosity in Metal–Organic Frameworks. *Science* (80-.). **329**, 424–428 (2010).
55. Férey, G. *et al.* Why hybrid porous solids capture greenhouse gases? *Chem. Soc. Rev.* **40**, 550–562 (2011).
56. Férey, G. & Serre, C. Large breathing effects in three-dimensional porous hybrid matter: facts, analyses, rules and consequences. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1380 (2009).
57. *Metal Organic Frameworks as Heterogeneous Catalysts*. (Royal Society of Chemistry, 2013). doi:10.1039/9781849737586.
58. Erucar, I. & Keskin, S. Efficient Storage of Drug and Cosmetic Molecules in Biocompatible Metal Organic Frameworks: A Molecular Simulation Study. *Ind. Eng. Chem. Res.* **55**, 1929–1939 (2016).
59. *Metal–Organic Frameworks for Photonics Applications*. vol. 157 (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
60. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951 (2015).
61. Joshi, D., Garg, T., Goyal, A. K. & Rath, G. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Deliv.* **23**, 363–377 (2016).
62. Ogawa, C. A. & Plepis, A. M. G. Liberação In Vitro de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno. *Polímeros* **12**, 115–122 (2002).
63. Itokazu, M., Sugiyama, T., Ohno, T., Wada, E. & Katagiri, Y. Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents. *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 536–538 (1998).
64. Diarra, M., Pourroy, G., Muster, D., Zingraff, M. & Boymond, C. Elaboration and evaluation of an intraoral controlled release delivering system. *Biomaterials* **19**, 1523–1527 (1998).
65. Horcajada, P. *et al.* Metal–Organic Frameworks in Biomedicine. *Chem. Rev.* **112**,

- 1232–1268 (2012).
66. Imaz, I. *et al.* Metal–biomolecule frameworks (MBioFs). *Chem. Commun.* **47**, 7287 (2011).
 67. McKinlay, A. C. *et al.* BioMOFs: Metal–Organic Frameworks for Biological and Medical Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* **49**, 6260–6266 (2010).
 68. Ma, P. *et al.* Inorganic nanocarriers for platinum drug delivery. *Mater. Today* **18**, 554–564 (2015).
 69. Wang, L., Zheng, M. & Xie, Z. Nanoscale metal–organic frameworks for drug delivery: a conventional platform with new promise. *J. Mater. Chem. B* **6**, 707–717 (2018).
 70. Liu, R., Yu, T., Shi, Z. & Wang, Z. The preparation of metal–organic frameworks and their biomedical application. *Int. J. Nanomedicine* 1187 (2016) doi:10.2147/IJN.S100877.
 71. Tamames-Tabar, C. *et al.* A Zn azelate MOF: combining antibacterial effect. *CrystEngComm* **17**, 456–462 (2015).
 72. Cooper, L. *et al.* A biocompatible porous Mg-gallate metal–organic framework as an antioxidant carrier. *Chem. Commun.* **51**, 5848–5851 (2015).
 73. Miller, S. R. *et al.* Biodegradable therapeutic MOFs for the delivery of bioactive molecules. *Chem. Commun.* **46**, 4526 (2010).
 74. Su, H. *et al.* A highly porous medical metal–organic framework constructed from bioactive curcumin. *Chem. Commun.* **51**, 5774–5777 (2015).
 75. Tan, L.-L. *et al.* Ca²⁺, pH and thermo triple-responsive mechanized Zr-based MOFs for on-command drug release in bone diseases. *J. Mater. Chem. B* **4**, 135–140 (2016).
 76. Ma, D.-Y. *et al.* Hydrostable and Nitryl/Methyl-Functionalized Metal–Organic Framework for Drug Delivery and Highly Selective CO₂ Adsorption. *Inorg. Chem.* **54**, 6719–6726 (2015).
 77. Liu, J.-Q. *et al.* A combined experimental and computational study of novel nanocage-based metal–organic frameworks for drug delivery. *Dalt. Trans.* **44**, 19370–19382 (2015).
 78. Gao, X., Hai, X., Baigude, H., Guan, W. & Liu, Z. Fabrication of functional hollow microspheres constructed from MOF shells: Promising drug delivery systems with high loading capacity and targeted transport. *Sci. Rep.* **6**, 37705 (2016).
 79. Bag, P. P., Wang, D., Chen, Z. & Cao, R. Outstanding drug loading capacity by water stable microporous MOF: a potential drug carrier. *Chem. Commun.* **52**, 3669–3672

- (2016).
80. Liu, J.-Q. *et al.* Two isoreticular metal–organic frameworks with CdSO₄-like topology: selective gas sorption and drug delivery. *Dalt. Trans.* **43**, 17265–17273 (2014).
 81. Gao, X. *et al.* Controllable Synthesis of a Smart Multifunctional Nanoscale Metal–Organic Framework for Magnetic Resonance/Optical Imaging and Targeted Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 3455–3462 (2017).
 82. Qin, J.-S. *et al.* N-rich zeolite-like metal–organic framework with sodalite topology: high CO₂ uptake, selective gas adsorption and efficient drug delivery. *Chem. Sci.* **3**, 2114 (2012).
 83. Sun, C.-Y. *et al.* Chiral Nanoporous Metal–Organic Frameworks with High Porosity as Materials for Drug Delivery. *Adv. Mater.* **23**, 5629–5632 (2011).
 84. Hu, Q. *et al.* A Low Cytotoxic Cationic Metal–Organic Framework Carrier for Controllable Drug Release. *J. Med. Chem.* **57**, 5679–5685 (2014).
 85. Motakef-Kazemi, N., Shojaosadati, S. A. & Morsali, A. In situ synthesis of a drug-loaded MOF at room temperature. *Microporous Mesoporous Mater.* **186**, 73–79 (2014).
 86. Horcajada, P. *et al.* Flexible Porous Metal–Organic Frameworks for a Controlled Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6774–6780 (2008).
 87. Wu, Y. *et al.* Magnetic Metal–Organic Frameworks: γ -Fe₂O₃@MOFs via Confined In Situ Pyrolysis Method for Drug Delivery. *Small* **10**, 2927–2936 (2014).
 88. An, J., Geib, S. J. & Rosi, N. L. Cation-Triggered Drug Release from a Porous Zinc–Adeninate Metal–Organic Framework. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 8376–8377 (2009).
 89. Liu, K. *et al.* Photoreactivity of Metal–Organic Frameworks in Aqueous Solutions: Metal Dependence of Reactive Oxygen Species Production. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 3634–3640 (2016).
 90. Lucena, G. N. *et al.* Zn-based porous coordination solid as diclofenac sodium carrier. *J. Solid State Chem.* **260**, 67–72 (2018).
 91. Deng, K. *et al.* Aptamer-Mediated Up-conversion Core/MOF Shell Nanocomposites for Targeted Drug Delivery and Cell Imaging. *Sci. Rep.* **5**, 7851 (2015).
 92. Zhang, H. *et al.* Rational Design of Metal Organic Framework Nanocarrier-Based Codelivery System of Doxorubicin Hydrochloride/Verapamil Hydrochloride for Overcoming Multidrug Resistance with Efficient Targeted Cancer Therapy. *ACS Appl.*

- Mater. Interfaces* **9**, 19687–19697 (2017).
93. Oh, H., Li, T. & An, J. Drug Release Properties of a Series of Adenine-Based Metal-Organic Frameworks. *Chem. - A Eur. J.* **21**, 17010–17015 (2015).
 94. Zheng, M., Liu, S., Guan, X. & Xie, Z. One-Step Synthesis of Nanoscale Zeolitic Imidazolate Frameworks with High Curcumin Loading for Treatment of Cervical Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 22181–22187 (2015).
 95. Laha, D. *et al.* Fabrication of curcumin-loaded folic acid-tagged metal organic framework for triple negative breast cancer therapy in in vitro and in vivo systems. *New J. Chem.* **43**, 217–229 (2019).
 96. Keskin, S. & Kızılel, S. Biomedical Applications of Metal Organic Frameworks. *Ind. Eng. Chem. Res.* **50**, 1799–1812 (2011).
 97. Tagde, P., Kulkarni, G. T., Mishra, D. K. & Kesharwani, P. Recent advances in folic acid engineered nanocarriers for treatment of breast cancer. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **56**, 101613 (2020).
 98. Marcucci, F. & Lefoulon, F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Discov. Today* **9**, 219–228 (2004).
 99. Yokoyama, M. Drug targeting with nano-sized carrier systems. *J. Artif. Organs* **8**, 77–84 (2005).
 100. Martin, L. P. *et al.* Characterization of folate receptor alpha (FR α) expression in archival tumor and biopsy samples from relapsed epithelial ovarian cancer patients: A phase I expansion study of the FR α -targeting antibody-drug conjugate mirvetuximab soravtansine. *Gynecol. Oncol.* **147**, 402–407 (2017).
 101. Samadian, H., Hosseini-Nami, S., Kamrava, S. K., Ghaznavi, H. & Shakeri-Zadeh, A. Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 2217–2229 (2016).
 102. Furukawa, H., Cordova, K. E., O’Keeffe, M. & Yaghi, O. M. The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks. *Science (80-.)*. **341**, 1230444 (2013).
 103. Liu, C., Luo, T.-Y., Feura, E. S., Zhang, C. & Rosi, N. L. Orthogonal Ternary Functionalization of a Mesoporous Metal–Organic Framework via Sequential Postsynthetic Ligand Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 10508–10511 (2015).
 104. Tanabe, K. K. & Cohen, S. M. Postsynthetic modification of metal–organic frameworks—a progress report. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 498–519 (2011).
 105. Alves, R. C. *et al.* Breast Cancer Targeting of a Drug Delivery System through Postsynthetic Modification of Curcumin@N 3 -bio-MOF-100 via Click Chemistry.

- Inorg. Chem.* acs.inorgchem.1c00538 (2021) doi:10.1021/acs.inorgchem.1c00538.
106. An, J. *et al.* Metal-adeninate vertices for the construction of an exceptionally porous metal-organic framework. *Nat. Commun.* **3**, 604 (2012).
 107. De Oliveira, C. N. Titulação complexométrica de zinco, cobre e cobalto. *Eclética Química J.* **10**, 7 (2018).
 108. Macrae, C. F. *et al.* Mercury 4.0 : from visualization to analysis, design and prediction. *J. Appl. Crystallogr.* **53**, 226–235 (2020).
 109. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* **19**, 1–32 (2013).
 110. Stewart, J. J. P. Mopac 2016, Mopac 2016; Stewart Computational Chemistry: CO, USA, 2016.
 111. Biovia, D. S. Biovia Discovery Studio Visualizer, v. 20.2.0.16349; BIOVIA: San Diego: Dassault Systèmes, 2020.
 112. Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R. & Wolfson, H. J. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res.* **33**, W363–W367 (2005).
 113. AL Haydar, M., Abid, H., Sunderland, B. & Wang, S. Metal organic frameworks as a drug delivery system for flurbiprofen. *Drug Des. Devel. Ther.* **Volume 11**, 2685–2695 (2017).
 114. Ray Chowdhuri, A., Bhattacharya, D. & Sahu, S. K. Magnetic nanoscale metal organic frameworks for potential targeted anticancer drug delivery, imaging and as an MRI contrast agent. *Dalt. Trans.* **45**, 2963–2973 (2016).
 115. Ionashiro, M.; Caires, F. J.; Gomes, D. J. C. *Giolito: Fundamentos da termogravimetria e análise térmica diferencial/calorimetria exploratória diferencial.* (2014).
 116. Spek, A. L. Platon Squeeze: a tool for the calculation of the disordered solvent contribution to the calculated structure factors. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **71**, 9–18 (2015).
 117. Braga, D., Giaffreda, S. L., Grepioni, F., Maini, L. & Polito, M. Design, synthesis, characterization and utilization of hydrogen bonded networks based on functionalized organometallic sandwich compounds and the occurrence of crystal polymorphism. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 1267–1285 (2006).
 118. Cole, J. C. *et al.* Generation of crystal structures using known crystal structures as

- analogues. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **72**, 530–541 (2016).
119. Vologzhanina, A. V. Intermolecular Interactions in Functional Crystalline Materials: From Data to Knowledge. *Crystals* **9**, 478 (2019).
 120. Berman, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
 121. Rawat, S. & Chaturvedi, S. Effect of temperature on the evolution dynamics of voids in dynamic fracture of single crystal iron: a molecular dynamics study. *Philos. Mag.* **101**, 657–672 (2021).
 122. Fokoue, H. H., Pinheiro, P. S. M., Fraga, C. A. M. & Sant’Anna, C. M. R. Is there anything new about the molecular recognition applied to medicinal chemistry? *Quim. Nova* **43**, 78–89 (2020).
 123. Rösel, S. *et al.* London Dispersion Enables the Shortest Intermolecular Hydrocarbon H···H Contact. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 7428–7431 (2017).
 124. Rowland, R. S. & Taylor, R. Intermolecular nonbonded contact distances in organic crystal structures: Comparison with distances expected from van der Waals Radii. *J. Phys. Chem.* **100**, 7384–7391 (1996).
 125. Bondi, A. van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.* **68**, 441–451 (1964).
 126. Lee, H. J., Cho, W. & Oh, M. Fluorescent octahedron and rounded-octahedron coordination polymer particles (CPPs). *CrystEngComm* **12**, 3959 (2010).
 127. Chalati, T. *et al.* Porous metal organic framework nanoparticles to address the challenges related to busulfan encapsulation. *Nanomedicine* **6**, 1683–1695 (2011).
 128. Vasconcelos, I. B. *et al.* Cytotoxicity and slow release of the anti-cancer drug doxorubicin from ZIF-8. *RSC Adv.* **2**, 9437 (2012).
 129. Kolev, T. M., Velcheva, E. A., Stamboliyska, B. A. & Spiteller, M. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. *Int. J. Quantum Chem.* **102**, 1069–1079 (2005).
 130. Mohan, P. R. K., Sreelakshmi, G., Muraleedharan, C. V. & Joseph, R. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **62**, 77–84 (2012).
 131. Pawar, H. Phytochemical Evaluation and Curcumin Content Determination of Turmeric Rhizomes Collected From Bhandara District of Maharashtra (India). *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **4**, (2014).
 132. Chen, Y. *et al.* Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics. *Molecules* **17**, 5972–5987 (2012).

133. Rathbone, M. J. et al. *Modified-Release Drug Delivery Technology*. 2. ed. S.i: CRC Press, 2008. 528 p.
134. Lopes, C. M., Lobo, J. M. S. & Costa, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **41**, 143–154 (2005).
135. Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M. & Macheras, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int. J. Pharm.* **309**, 44–50 (2006).
136. Chelopo, M. P. et al. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **66**, 407–414 (2013).
137. Li, T., Kozłowski, M. T., Doud, E. A., Blakely, M. N. & Rosi, N. L. Stepwise Ligand Exchange for the Preparation of a Family of Mesoporous MOFs. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 11688–11691 (2013).
138. Zheng, M., Liu, S., Guan, X. & Xie, Z. One-Step Synthesis of Nanoscale Zeolitic Imidazolate Frameworks with High Curcumin Loading for Treatment of Cervical Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 22181–22187 (2015).
139. Alves, R. C. et al. Breast Cancer Targeting of a Drug Delivery System through Postsynthetic Modification of Curcumin@N 3 -bio-MOF-100 via Click Chemistry. *Inorg. Chem.* **60**, 11739–11744 (2021).
140. Chen, Y. et al. Preparation of curcumin-loaded liposomes and evaluation of their skin permeation and pharmacodynamics. *Molecules* **17**, 5972–5987 (2012).
141. Kotcherlakota, R. et al. Curcumin loaded mesoporous silica: an effective drug delivery system for cancer treatment. *Biomater. Sci.* **4**, 448–459 (2016).
142. Esfandiarpour-Boroujeni, S., Bagheri-Khoulenjani, S., Mirzadeh, H. & Amanpour, S. Fabrication and study of curcumin loaded nanoparticles based on folate-chitosan for breast cancer therapy application. *Carbohydr. Polym.* **168**, 14–21 (2017).
143. Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M. & Chauhan, S. C. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *J. Colloid Interface Sci.* **351**, 19–29 (2010).
144. Castello Branco, A. C. da S. Parâmetros Bioquímicos E Hematológicos De Ratos Wistar E Camundongos Swiss Do Biotério Professor Thomas George. *Rev. Bras. Ciências da Saúde* **15**, 209–214 (2011).
145. M. Chorilli, D. C. Michelin & H. R.N. Salgado. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.* **28**, 11–23 (2005).

146. Pulaski, B. A. & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr. Protoc. Immunol.* **39**, (2000).
147. Costa, J. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol,. *Rev Cienc Farm Apl.* **33**, 421–428 (2012).
148. Smeda, M. *et al.* Nitric oxide deficiency and endothelial-mesenchymal transition of pulmonary endothelium in the progression of 4T1 metastatic breast cancer in mice. *Breast Cancer Res.* **20**, 1–15 (2018).
149. Djazayeri, K. *et al.* Accelerated recovery of 5-fluorouracil-damaged bone marrow after rosiglitazone treatment. *Eur. J. Pharmacol.* **522**, 122–129 (2005).
150. Steven, L. S. & S. *Urinary system. In: Fundamentals of veterinary clinical pathology.* (2002).
151. Martin, D. W., Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. *Harper's review of biochemistry.* (1981).
152. Al-Habori, M., Al-Aghbari, A., Al-Mamary, M. & Baker, M. Toxicological evaluation of Catha edulis leaves: a long term feeding experiment in animals. *J. Ethnopharmacol.* **83**, 209–217 (2002).
153. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Pierina, S. B. *Fundamentos de Cromatografia.* (2006).
154. Pallavi, M. & Patil, N. Hplc Method Development-a Review. *Rev. Artic. J. Pharm. Res. Educ. J. homepage* **1**, 243–260 (2017).
155. Sabir, A. M., Moloy, M. & Bhasin, P. S. Hplc Method Development and Validation: a Review. *Int. Res. J. Pharm.* **4**, 39–46 (2016).
156. Chang, Y.-Y. *et al.* Comparison of three chemometric methods for processing HPLC-DAD data with time shifts: Simultaneous determination of ten molecular targeted anti-tumor drugs in different biological samples. *Talanta* **224**, 121798 (2021).
157. Zhao, L., Wen, E., Upur, H. & Tian, S. High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector Method for the Simultaneous Determination of Five Compounds in the Pulp and Seed of Sea Buckthorn. *Pharmacogn. Mag.* **13**, 136–140.
158. Bergonzi, M. C., Hamdouch, R., Mazzacuva, F., Isacchi, B. & Bilia, A. R. Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions. *LWT - Food Sci. Technol.* **59**, 148–155 (2014).
159. Razavi, N. & Es'haghi, Z. Curcumin loaded magnetic graphene oxide solid-phase extraction for the determination of parabens in toothpaste and mouthwash coupled with high performance liquid chromatography. *Microchem. J.* **148**, 616–625 (2019).
160. Vidal, Ò. *et al.* Determination of Curcuminoids by Liquid Chromatography with Diode

- Array Detection: Application to the Characterization of Turmeric and Curry Samples. *Curr. Anal. Chem.* **16**, 95–105 (2020).
161. Chao, I. C. *et al.* Simultaneous quantification of three curcuminoids and three volatile components of curcuma longa using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography. *Molecules* **23**, (2018).
 162. ANVISA, A. N. de V. S.-M. da S. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União* no141, 25 julh.
 163. Fonseca-Santos, B., Gremião, M. P. D. & Chorilli, M. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals in in vitro performance tests. *Arab. J. Chem.* **10**, 1029–1037 (2017).
 164. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Anvisa, 2017.
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 01 de outubro de 2021.



ANEXO



ANEXO I

Durante o desenvolvimento do projeto de doutorado foi concedida a Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE). O estágio foi realizado no período de 15 de maio à 14 de novembro de 2019, com a supervisão do Professor Dr. Nathaniel L. Rosi, da Universidade de Pittsburgh, que possui renomada expertise na síntese de novas MOFs e suas aplicações.

O projeto consistiu no desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco funcionalizado com ácido fólico para posterior aplicação no tratamento do câncer de mama. Em suma o projeto estava dividido em 4 partes.

A primeira parte consistia na síntese e caracterização da MOF, N₃-bio-MOF-100. Após isso, o material foi submetido a ensaio de encapsulação do fármaco, curcumina, sendo denominado de CCM@N₃-bio-MOF-100. Por apresentar um grupamento azida em sua estrutura, o material foi então funcionalizado com ácido fólico via *click chemistry*. Por fim, a última etapa consistiu na avaliação do perfil de liberação deste carreador tanto em pH ácido quanto em pH fisiológico, sendo o composto final denominado de CCM@N₃-bio-MOF-100/FA.

Desta forma, durante o estágio BEPE, foi possível desenvolver todo o projeto proposto. Ao retornar ao Brasil, foi realizado os experimentos *in vitro*, para avaliação deste carreador como um possível tratamento para o câncer de mama. Tal trabalho culminou na publicação de um artigo científico, como mostrado na Figura S1.

Figura S1. Primeira página do artigo publicado na revista *Inorganic Chemistry*, referente ao trabalho realizado durante o estágio BEPE.

Inorganic Chemistry

pubs.acs.org/IC

Forum Article

Breast Cancer Targeting of a Drug Delivery System through Postsynthetic Modification of Curcumin@N₃-bio-MOF-100 via Click Chemistry

Renata C. Alves,* Zachary M. Schulte, Marcela T. Luiz, Patrícia Bento da Silva, Regina C. G. Frem, Nathaniel L. Rosi, and Marlus Chorilli

Cite This: *Inorg. Chem.* 2021, 60, 11739–11744

Read Online

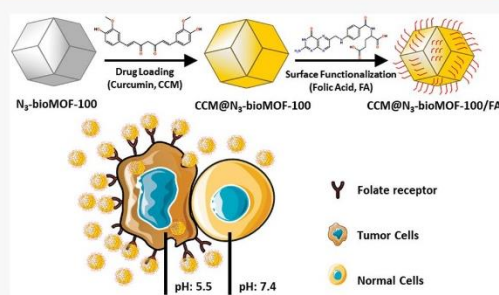
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Metal–organic frameworks (MOFs) offer many opportunities for applications across biology and medicine. Their wide range of chemical composition makes toxicologically acceptable formulation possible, and their high level of functionality enables possible applications as delivery systems for therapeutics agents. Surface modifications have been used in drug delivery systems to minimize their interaction with the bulk, improving their specificity as targeted carriers. Herein, we discuss a strategy to achieve a tumor-targeting drug-loaded MOF using “click” chemistry to anchor functional folic acid (FA) molecules on the surface of N₃-bio-MOF-100. Using curcumin (CCM) as an anticancer drug, we observed drug loading encapsulation efficiencies (DLEs) of 24.02 and 25.64% after soaking N₃-bio-MOF-100 in CCM solutions for 1 day and 3 days, respectively. The success of postsynthetic modification of FA was confirmed by ¹H NMR spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). The stimuli-responsive drug release studies demonstrated an increase of CCM released under acidic microenvironments. Moreover, the cell viability assay was performed on the 4T1 (breast cancer) cell line in the presence of CCM@N₃-bio-MOF-100 and CCM@N₃-bio-MOF-100/FA carriers to confirm its biological compatibility. In addition, a cellular uptake study was conducted to evaluate the targeting of tumor cells.



INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is one of the most common types of cancer among females worldwide with over 2 million cases reported in 2018, of which 6.6% were fatal.¹ Among all BC subtypes, triple negative breast cancer (TNBC) is considered the most invasive and aggressive, accounting for approximately 20% of all cases and representing about 50% of BC mortality.² The applicability of typical treatments such as hormonal therapy and specific drug targeting through HER2 receptors in TNBC cases is limited due to the absence of estrogen, progesterone, and HER2 receptors in patients.³ Furthermore, the remarkable development of multidrug resistance (MDR) to most common chemotherapeutics, such as taxanes and anthracyclines, has become a challenge for TNBC treatment.⁴

Curcumin (CCM) is a natural compound isolated from the rhizome of *Curcuma longa* that has shown antitumor properties against several solid tumors, including BC.^{5,6} CCM reduces tumor growth by inhibiting the expression and function of P-glycoprotein (P-gp), an efflux pump related to MDR.^{5,7} However, the inherent hydrophobicity and low bioavailability of CCM pose a serious challenge toward incorporation into viable BC treatments. Therefore, drug

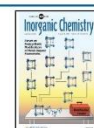
delivery systems (DDSs) such as liposomes, solid lipid nanoparticles, polymeric nanoparticles, and metal–organic frameworks (MOFs) have been proposed to overcome these limitations.^{8,9}

MOFs, which are crystalline, intrinsically porous materials composed of metal ions or clusters interconnected by organic ligands,¹⁰ have shown great promise for biomedical applications.^{11–15} Bio-MOFs in particular, a subclass of MOFs that utilize biocompatible metal ions and organic linkers with relatively lower cytotoxic properties compared to other MOFs, have been proposed as highly promising materials for DDS.^{16–18} One of the first examples of drug uptake and release in MOFs was shown by Rosi et al. where cationic procainamide was loaded into anionic bio-MOF-1 and

Special Issue: Postsynthetic Modification of Metal–Organic Frameworks

Received: February 22, 2021

Published: June 8, 2021



ACS Publications

© 2021 American Chemical Society

11739

<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c00538>
Inorg. Chem. 2021, 60, 11739–11744