

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 12/11/2023.

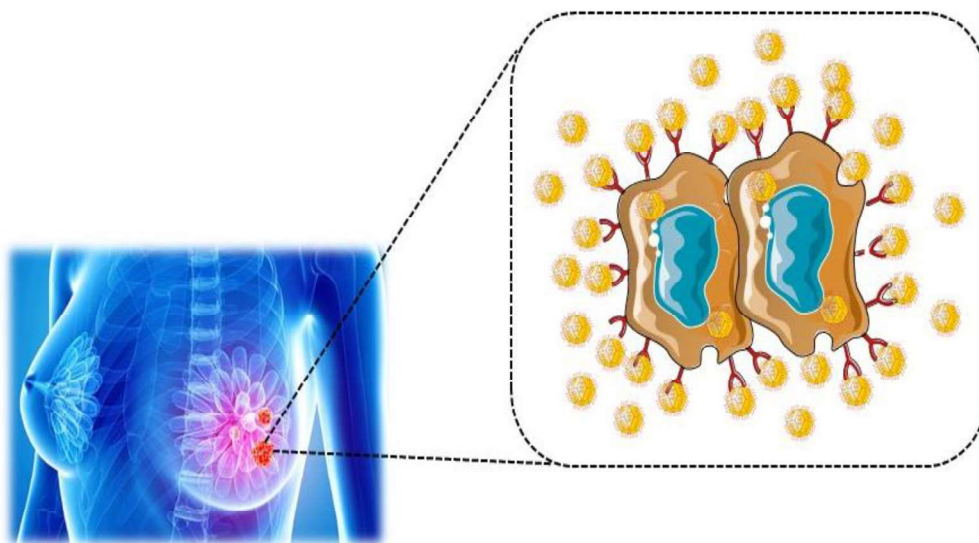


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
ARARAQUARA

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.

Maio - 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 $\{Zn-TPyP[RuCl_3(dppb)]_4\}$ 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 $\{Mn-TPyP[RuCl_3(dppb)]_4\}CH_3COO$, 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	Coefficiente 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 <i>voids</i> 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 dmso-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 ¹ H para os compostos bioMOF-101, CCM, CCM@bioMOF-101-1D, FA e CCM@bioMOF-101-1D/FA, em dmso-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 μ 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 μ g/mL) obtido pelo método cromatográfico em meio receptor em pH=5,0 (azul) e pH=7,4 (vermelho).	139
Figura 52. Curvas analíticas da CCM em meio receptor obtidas pelo método cromatográfico: A) em pH = 5,0 e B) em 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 confôrmero e desvio-médio quadrático entre o confôrmero 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 predizer 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

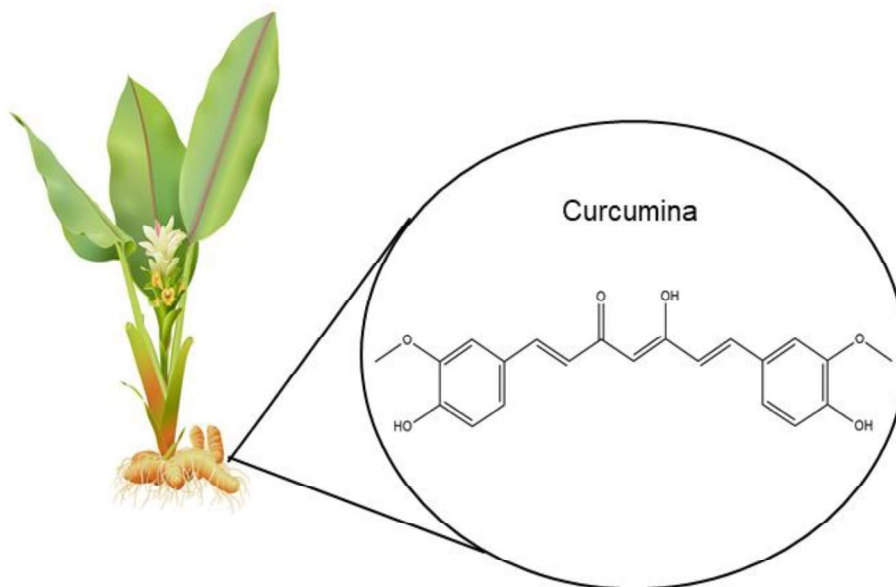
O tratamento utilizado para câncer de mama com presença de metástase é a quimioterapia que, apesar de ser efetiva, muitas vezes é associada a limitações, como por exemplo, desenvolvimento de resistência à terapia, além de efeitos colaterais indesejados. Um outro ponto importante é a necessidade de associação 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

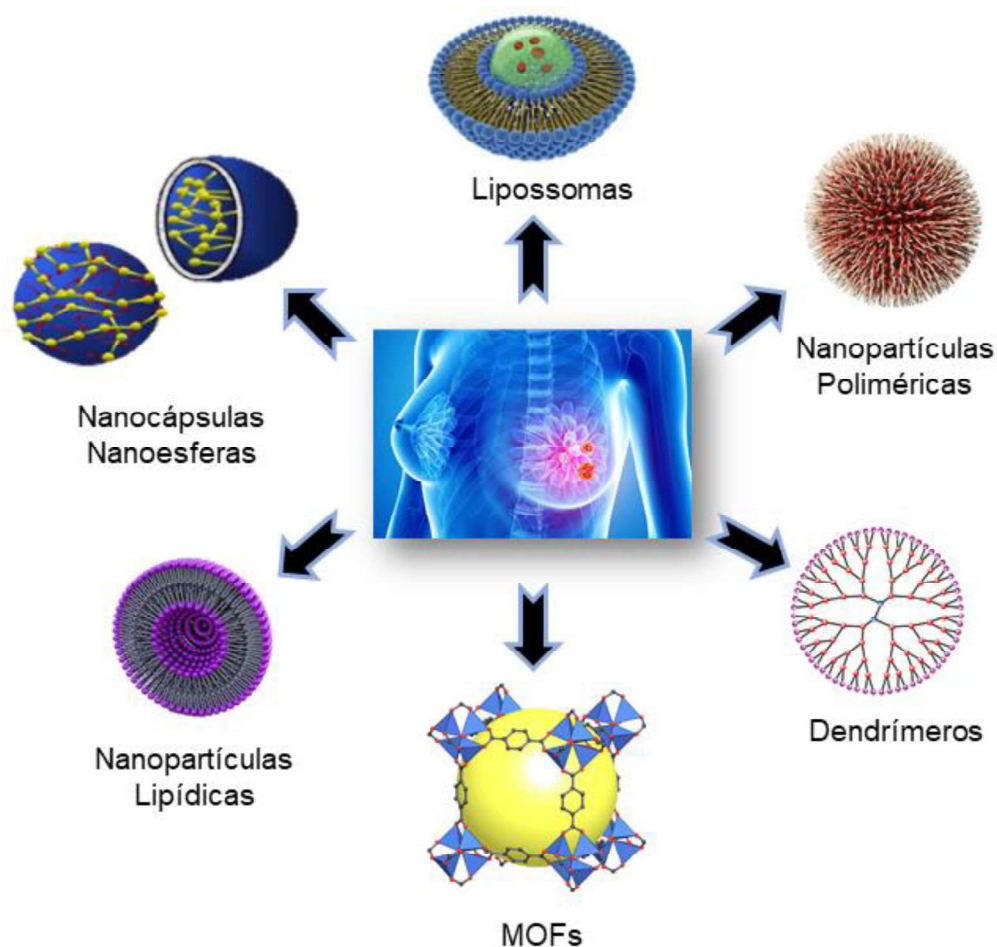
Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos tem ganhado cada vez mais destaque por apresentarem vantagens quando comparados com as preparações convencionais, tais como:⁴⁵

- 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.

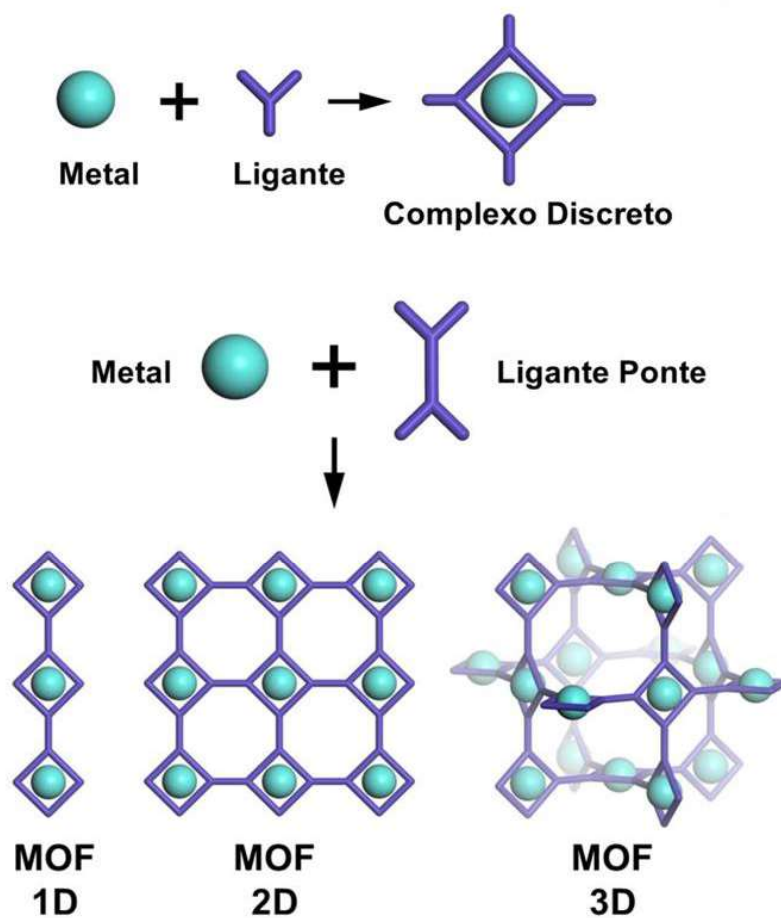


Fonte: Autor

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, consequentemente, 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

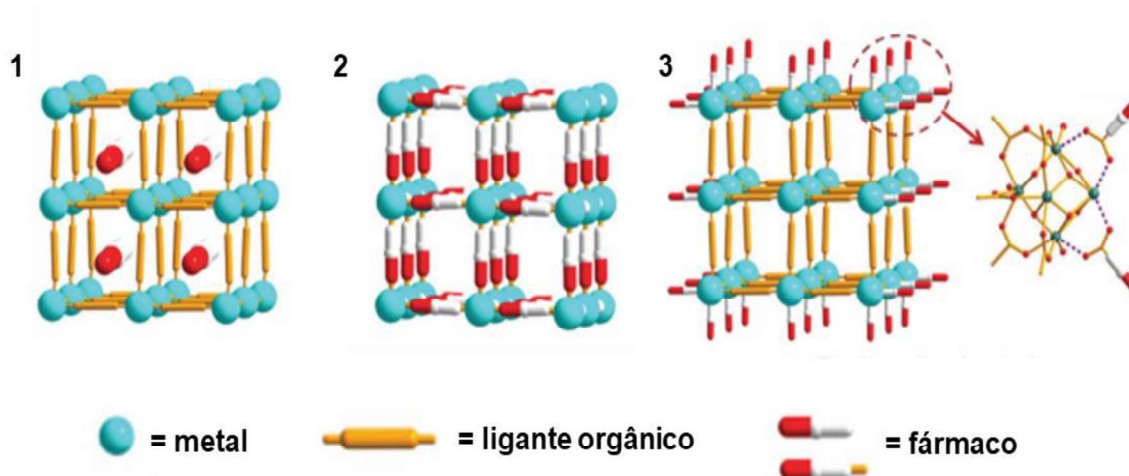
A utilização de blocos de construção que possuam biomoléculas pode oferecer algumas vantagens adicionais às MOFs, como maior diversidade e flexibilidade estrutural, impactando significativamente nas propriedades do biomaterial obtido. Além disso, os centros quirais de algumas biomoléculas proporcionam 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

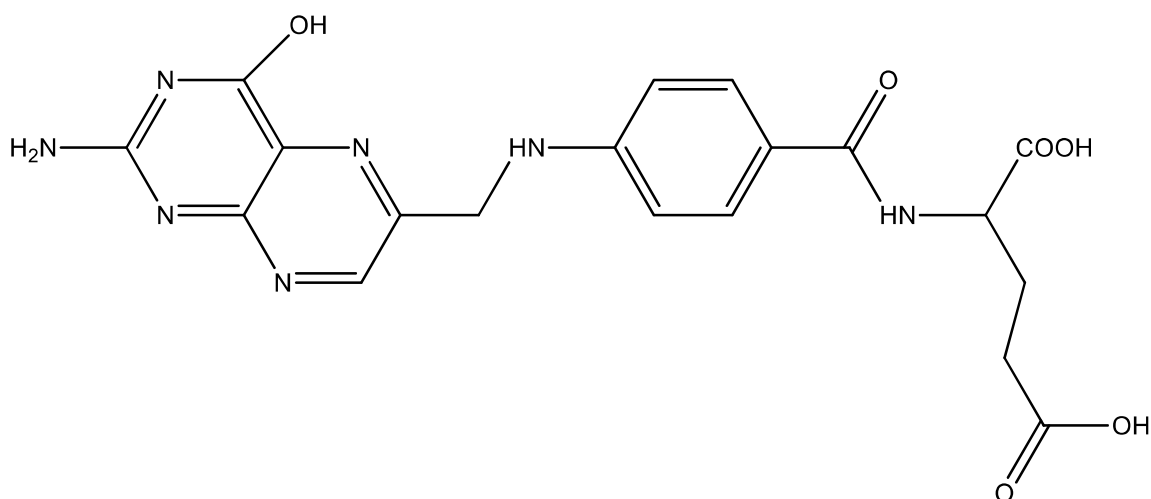
Com o intuito de melhorar as desvantagens contidas no tratamento convencional, os sistemas de liberação de fármacos podem ser funcionalizados. Os sistemas não funcionalizados demonstram uma seletividade tumoral relativa, como consequência do direcionamento passivo decorrente ao efeito de permeabilidade 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.

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* no 141, 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

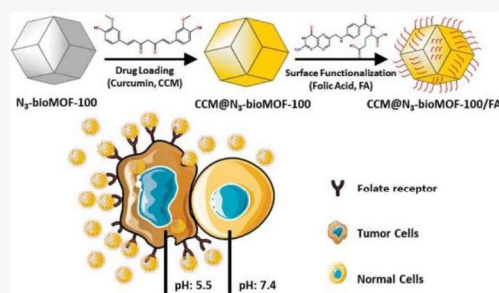
ACCESS |

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 antitumoral 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

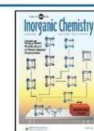
delivery systems (DDSs) such as liposomes, solid lipid nanoparticles, polymeric nanoparticles, and metal–organic frameworks (MOFs) have been proposed to overcome these limitations.^{8,9}

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