



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FLÁVIA RAQUEL SANTOS LUCENA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTITUMORAL DE 5-
FLUOROURACIL INCORPORADO A REDES DE COORDENAÇÃO
MULTIFUNCIONAIS

RECIFE

2013

FLÁVIA RAQUEL SANTOS LUCENA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTITUMORAL DE 5-
FLUOROURACIL INCORPORADO A REDES DE COORDENAÇÃO
MULTIFUNCIONAIS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento.

RECIFE

2013

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

L935a Lucena, Flávia Raquel Santos

Avaliação da toxicidade, atividade antitumoral de 5-fluorouracil incorporado a redes de coordenação multifuncionais / Flávia Raquel Santos Lucena. – Recife: O Autor, 2013.

105 f. : il.

Orientador: Silene Carneiro do Nascimento

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.
Inclui bibliografia

1. Farmacologia 2. Medicamentos – Desenvolvimento 3. Toxicologia I. Nascimento, Silene Carneiro do (Orientadora) II. Título.

615

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-080

FLÁVIA RAQUEL SANTOS LUCENA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTITUMORAL DE 5-FLUOROURACIL
INCORPORADO A REDES DE COORDENAÇÃO MULTIFUNCIONAIS**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Julianna Ferreira C. de Albuquerque

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Onaldo Guedes Rodrigues

Universidade Federal de Campina Grande

Profa. Dra. Ana Luíza Mucillo Baisch

Universidade Federal do Rio Grande

Dedico à minha tia-avó **Mary Stella França dos Santos** (*in memoriam*), pelos ensinamentos e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Silene Carneiro do Nascimento**, que desde o mestrado foi minha orientadora, tendo depositado em mim confiança em desenvolver este projeto de tese. Pela sua verdadeira amizade, pelas oportunidades profissionais e conselhos pessoais, pela paciência e “injeções” de ânimo nos momentos em que demonstrei cansaço, por me ensinar a lidar com as dificuldades do dia-a-dia, controlando cada vez mais meu estresse evidente. Respeito, ética, profissionalismo e amizade foram valores que vivenciei ao seu lado, durante essa caminhada que hoje resulta na realização de um sonho pessoal, que certamente não terei como retribuir. Levarei sempre comigo os ensinamentos e dedicação que me foram prestados.

Ao Prof. Dr. da UFPE **Severino Alves Júnior**, pelos conhecimentos repassados a mim na área química e pelos cursos e viagens de colaboração com outras universidades que certamente enriqueceram a minha tese;

Ao Prof. Dr. da UFPE **Edvaldo Rodrigues de Almeida** meu “pai acadêmico” pelos primeiros ensinamentos enquanto eu ainda era estudante de graduação. Muitos foram os projetos desenvolvidos, os trabalhos apresentados em congresso e artigos publicados em periódico internacional. Foi em seu laboratório que eu descobri o amor pela pesquisa;

Aos Profs. Doutores da UFS **Ricardo Freire, Nivan da Costa Júnior**, pela colaboração na realização dos experimentos de química teórica.

Ao Prof. Dr. da UFRN **Ademir Oliveira da Silva** pelo apoio técnico na realização das análises térmicas das minhas amostras;

Ao Prof. Dr. da UFPE **Pedro Rolin** por ceder o espaço do seu laboratório para a realização de alguns experimentos e por me apresentar o **Danilo Fontes** que se mostrou sempre disponível, interessado em ajudar. Danilo meu filho por mim essa parceria continua !

A profa. Dra. da UFPE **Gardênia Militão** que juntamente com a Dra. **Valéria** contribuíram muito na realização da citometria de fluxo;

Aos amigos **Maria Rodrigues e Eduardo Henrique** pela ajudas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*;

Aos amigos da química **Fausthon, Carlos, Marcos e Jadson** pela contribuição técnica, amizade e bons momentos, adoro vocês meninos!

Aos meus pais **José Victor de Lucena e Raquel Cristina Santos Lucena** pelo amor, pela dedicação, por investirem na minha educação e principalmente pelos “nãos” pois foram de extrema importância no processo do meu amadurecimento, agradeço à Deus por tê-los comigo;

Aos meus **tios, tias e primos** e irmã **Maura Cristina Santos Lucena** vocês compõem o que tenho demais importante, minha família!

Aos meus sogrão e sogrinha **Josemar Rodrigues de Souza e Tereza Cristina Oliveira Araújo de Souza** por me tratarem como filha, por me receberem sempre de braços abertos e por tantas vezes me aconselharem da melhor maneira possível, pois, como bem diz meu sogrão: “tudo na vida tem um jeito”

Ao meu amor, amigo, a primeira pessoa que penso quando acordo cedinho **Rafael Araújo de Souza** pelo carinho, dedicação por me fazer tão

feliz, por tudo que temos construído e iremos construir ao longo de nossas vidas, seremos sempre muito felizes meu amor!

Aos amigos **Gerson Lima e Eduardo de Paula**, vocês sim serão para sempre meus amigos, na saúde e na doença, perto ou longe por todos os dias de nossas vidas!! Ok, Gerson nossa amizade só acaba se você formar uma banda para ir tocar na noite com Rafael, brincadeira...

E finalmente agradeço a todos que, direta ou indiretamente contribuíram e contribuem para as minhas realizações pessoais e profissionais e para a execução deste trabalho, MUITO OBRIGADA!!!!

“Não há maior sabor na vida que o desenvolvimento dos dons naturais, caminhar para a plenitude, na satisfação e alegria da evolução das potencialidades...”

Jalzinete Maria Rodrigues de Souza

RESUMO

Avaliação da Toxicidade, Atividade Antitumoral de 5-Fluorouracil Incorporado a Redes de Coordenação Multifuncionais

Tese de Doutorado, Autor: FLÁVIA RAQUEL SANTOS LUCENA. Orientadora: Dra. Silene Carneiro do Nascimento. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade federal de Pernambuco, Recife, 2013.

Relatos na literatura vêm utilizando nanopartículas com o objetivo de carrear drogas e diminuir seus efeitos colaterais. Dentro dessa perspectiva estão as redes coordenadas a metais orgânicos ou MOFs. Este trabalho teve como objetivo realizar a incorporação de um fármaco antitumoral em uma rede de coordenação, visando melhorar sua biodisponibilidade para o organismo, bem como avaliar a toxicidade deste sistema *in vitro* e *in vivo*. Para isso foi realizado estudo teórico-computacional que nos permitiu escolher o melhor fármaco a ser utilizado (5-fluorouracil) e a melhor rede de coordenação (Cu-BTC MOF), levando em consideração os tamanhos das moléculas dos mesmos em relação ao tamanho dos poros das MOFs Cu-BTC e MIL-53(Al). Os resultados das caracterizações químicas realizadas (UV-VIS, IV, CNHS, DRX, TGA/DTG e DSC) indicaram uma incorporação de 0,82 g de 5-fluorouracil para cada 1 g de MOF Cu-BTC após sete dias de agitação. A cultura celular *in vitro* demonstrou que o sistema 5-FU + Cu-BTC MOF apresentou atividade citotóxica significativa quando comparado ao fármaco em solução. O teste de verificação do mecanismo de morte celular utilizando a citometria de fluxo indicou ser a apoptose o mecanismo de ação responsável para eliminação das células tumorais. O estudo de dissolução indicou uma liberação lenta e controlada de 39% do fármaco nos primeiros 30 minutos seguida da liberação de 82% do fármaco em 48 horas. Alterações histológicas só foram evidenciadas quando utilizada a dose de 750mg/kg sendo esta, a dose letal (DL50) encontrada. O teste da peritonite, verificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e produção de óxido demonstraram que o sistema 5-FU + Cu-BTC MOF reduziu o número de leucócitos, os níveis de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, indicando que o sistema apresentou também atividade antiinflamatória para os testes realizados. Os resultados indicaram ser o sistema 5-FU+Cu-BTC MOF

um excelente carreador de fármaco, com indicação de atividade anti-inflamatória, excelente atividade citotóxica via mecanismo de apoptose e liberação lenta e gradual do fármaco, o que possibilitou a diminuição na toxicidade do mesmo acompanhado de uma significativa melhora terapêutica.

Palavras chaves: 5-Fluorouracil, Cu-BTC, apoptose celular, drug delivery.

ABSTRACT

Evaluation of Toxicity, Antitumor Activity of 5-Fluorouracil the Embedded Multifunction Network Coordination

Doctoral Thesis, Author: FLÁVIA RAQUEL SANTOS LUCENA. Advisor: Dra. Silene Carneiro do Nascimento. Post-Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, 2013.

Reports in the literature have used nanoparticles with the aim of carrying drugs and reduce their side effects. Within this perspective the networks are coordinated to metals or organic MOFs. This study aimed to accomplish the incorporation of an antitumour drug in a coordination network, aiming to improve its bioavailability to the body, and to evaluate the toxicity of this system *in vitro* and *in vivo*. For this study was conducted theoretical and computational allowing us to choose the best drug to be used (5-fluorouracil) and better coordination network (Cu-BTC MOF), taking into account the molecules sizes in relation to the MOFs pores sizes of Cu-BTC and MIL-53 (Al). The results of chemical characterization (UV-VIS, IR spectroscopy, CNHS, DRX, TGA/DTG e DSC) indicated an incorporation of 0.82 g of 5-fluorouracil for each 1 g of Cu-BTC MOF after seven days of stirring. The *in vitro* cell culture system demonstrated that 5-FU + Cu-BTC MOF showed significant cytotoxicity as compared to the drug solution. The verification test of cell death mechanism using flow cytometry showed apoptosis is the mechanism of action responsible for the elimination of tumor cells. The dissolution study indicated a slow and controlled release of the 39% of the drug within 30 minutes followed by the release of 82% of drug in 48 hours. Histological changes were seen only when used at a dose of 750mg/kg this being the lethal dose found (DL50). The peritonitis test checked the levels of pro-inflammatory cytokines and production of oxide system shown that 5-FU + Cu-BTC MOF reduced the leukocyte counts, levels of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide, indicating that the system also showed anti-inflammatory activity for the realized tests. The results indicated that the system 5-FU + Cu-BTC MOF an excellent drug carrier, indicating anti-inflammatory activity, excellent cytotoxicity and apoptosis

mechanism a slow and gradual release of the drug, which led to the decrease in toxicity the same accompanied by a significant therapeutic improvement.

Key words: 5-Fluorouracil, apoptosis cellular, drug delivery.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1 Panorama atual das terapias antitumorais.....	06
2.2 Nanopartículas e terapia antitumoral.....	12
2.3 Polímeros de coordenação e MOF(s) Metal organic frame- work	18
2.4 Metal organic framework (MOFs) como carreadores de fár- macos e outras aplicações para o câncer.....	22
2.5 Utilização de 5-Fluorouracil e nanopartículas nas terapias Antitumorais.....	26
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
5. ANEXOS.....	42
Material complementar I – Estudo teórico-computacional.....	43
ARTIGO I.....	50
Material complementar II – Estruturas químicas dos compostos utili- zados nos estudos experimentais.....	69
ARTIGO II.....	70
ARTIGO III.....	87
6. CONCLUSÕES.....	103

1. INTRODUÇÃO

O progresso envolvendo estudos relacionados à biologia clínica do câncer demonstra que a mesma, não acompanhou os avanços nos estudos que relacionam a sua biologia fundamental. Insuficiência na capacidade de administrar o agente terapêutico de modo seletivo e específico tem causado os danos colaterais relativos à alta toxicidade, que em parte são responsáveis por essa discrepância (MORENO-ASPITIA; PEREZ, 2009). O mais importante é o reconhecimento de que apenas 1 entre 10 partes por 100.000 de anticorpos monoclonais administrados por via intravenosa atingem seus objetivos no parênquima vivo. Essas limitações são similares quando considerados os agentes de contraste para imagens (DUCAN, 2003).

Existem dois objetivos gerais que devem ser alcançados para levar a eficácia por dose de qualquer agente terapêutico de contraste ou de imagem: aumentar sua seletividade em relação ao alvo (ALLEN, 2002) e dotar o agente que inclui a formulação terapêutica com meios para superar as barreiras biológicas que previnem a chegada deste agente ao destino final (JAIN, 1998). O sistema terapêutico ideal precisa ser diretamente seletivo contra as células que estão em estágio inicial da transformação fenotípica maligna (SRINIVAS; BARKER; SRIVASTAVA, 2002).

A realização de um sistema ideal enfrenta grandes desafios, incluindo: a identificação de marcadores tumorais, a compreensão da biologia celular neoplásica ao longo do tempo, implantação desses marcadores no rastreamento de células tumorais, criação de protocolos para a detecção precoce de tumores e desenvolvimento de tecnologias para o conjunto

biomarcador-alvo utilizado para a entrega do fármaco, tendo ao mesmo tempo a capacidade de evitar as barreiras biológicas (FERRARI, 2005).

No campo da nanotecnologia os sistemas de liberação controlada de fármacos se destacam por apresentarem às características citadas a cima e tem apresentado um crescente avanço (EMERICH & THANOS, 2006). Entre eles, as nanopartículas com propriedades carreadoras que foram inicialmente desenvolvidas em meados dos anos 70 com o objetivo de transportar substâncias no organismo vivo objetivando melhorar a eficácia terapêutica e diminuir o efeito tóxico das substâncias nelas carreadas (MONTASSER et al., 2000 ; FATTAL & VAUTHIER, 2002).

Visando aumentar a captação pelo tumor e melhorar as estratégias de transporte do fármaco para o local específico KUMAR (2000) relatou em sua revisão estudos sobre o desenvolvimento de métodos para redução da captação de nanopartículas poliméricas biodegradáveis pelas células do sistema reticular endotelial.

Nas últimas quatro décadas, a tecnologia polimérica de liberação controlada proporcionou avanços positivos em várias áreas de interesse médico; principalmente, a oftalmologia, a pneumologia, endocrinologia, a cardiologia, ortopedia, imunologia e a neurologia, essas tecnologias visam sobre tudo maximizar os efeitos terapêuticos e minimizar os efeitos colaterais (FAROKHZAD & LANGER, 2006).

Dentre as nanoestruturas utilizadas devido as suas diversas funções estão as Metal Organic Frameworks (MOFs), representadas por estruturas cristalinas constituídas por íons metálicos ou *clusters* coordenados por

moléculas orgânicas, muitas vezes rígidas para formar estruturas uni, bi ou tridimensionais porosas. Dentre suas aplicações estão: o armazenamento de gases, utilização como sensores, catálise e mais recentemente como carreadores de fármacos e agentes de imagem para diversos alvos como células tumorais, nas busca de novas terapias contra o câncer (FÉREY, 2008).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PANORAMA ATUAL DAS TERAPIAS ANTITUMORAIS

O câncer é definido como um grupo de doenças que se caracterizam pela perda do controle da divisão celular e pela capacidade de invadir outras estruturas orgânicas. O surgimento de uma célula cancerígena se deve a diversos fatores dentre estes podemos exemplificar alguns mais significativos como fatores biológicos (psicológicos, microbiológicos, genéticos e imunológicos) e químicos (exposição a compostos reconhecidamente carcinogênicos) e físicos (mecânicos, radiações ionizantes), resultado de uma cascata de reações de células anormais (NO; CHOI; KIM, 2009).

Os cânceres se iniciam com uma única célula que por algum motivo passou a replicar seu erro, sendo assim a compreensão das mutações celulares e vias de sinalizações envolvidas na função de células anormais mutagênicas têm sido utilizadas através da genômica, proteômica e técnicas de sinalização no rastreamento de possíveis mecanismos das alterações celulares para que novas drogas com mais eficácia e/ou menor toxicidade possam ser a partir daí viabilizadas (ROBERT,2007).

Nos países desenvolvidos, em média, cerca de uma pessoa em cinco morre de câncer. Esta proporção nos países em desenvolvimento é de uma morte para cada quinze indivíduos, porém deve-se considerar a estrutura etária mais jovem das populações destes países (CURADO et al., 2009).

Como decorrência da constante queda da mortalidade por doenças cardiovasculares observadas em diferentes partes do mundo desde os anos 60, o câncer já assumiu em alguns países o papel de principal causa de morte na população (AUSTRALIAN BUREAU OF STATISTIC, 1999).

Segundo estudo realizado por FILHO-WUNSCH & MONCAL (2002) visando estabelecer o panorama da mortalidade por câncer no Brasil entre os anos de 1980 e 1995, os cânceres de pulmão e o de mama foram às principais causas de morte por câncer entre homens e mulheres respectivamente. As taxas de mortalidade por câncer de pulmão e outros relacionados ao tabaco foram mais altas no sul e sudeste. As populações femininas do norte e nordeste apresentaram mortalidade alta por câncer do cólon de útero em relação às de outras regiões, o inverso ocorreu com o câncer de mama.

Ainda segundo os autores, apesar das mortes por câncer serem maiores nas regiões sul e sudeste, observa-se um padrão de crescimento nas taxas de cânceres associado às regiões menos desenvolvidas, o que de fato pode ser constatado nas estatísticas atuais publicadas pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), da Organização Mundial de Saúde (OMS), mostrando que a maioria dos 12,7 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de mortes pela doença em todo o mundo ocorreram em países em desenvolvimento (CURADO, 2009).

Os tumores mais comumente diagnosticados em todo o mundo são pulmão (1,61 milhão de casos ou 12,7% do total), mama (1,38 milhão ou 10,9%) e colo-retal (1,23 milhão ou 9,7%). As causas mais comuns de morte por câncer ocorrem devido aos tumores de pulmão (1,38 milhão ou 18,2% do total), estômago (740 mil ou 9,7%) e fígado (690 mil ou 9,2%) (CURADO, 2009; AUSTRALIAN BUREAU OF STATISTIC, 1999).

Em relação aos tratamentos utilizados no combate ao câncer, os tipos mais utilizados e conhecidos são: a radioterapia, quimioterapia, a

hormônioterapia e a cirurgia. A quimioterapia pode ser indicada antes ou após uma cirurgia e ainda isoladamente, sem que haja indicação cirúrgica. Em certos casos ela é feita em conjunto com a radioterapia. Porém a indicação do tipo de tratamento a ser feito depende de vários fatores, como o tipo de tumor, localização e estágio da doença, sendo feito sempre de acordo com uma programação, que deve ser discutida com o médico, quando do início do tratamento (RAGAZ et al., 1997)

A duração do tratamento dependerá da resposta do tumor às medidas terapêuticas adotadas, indicado por meio de acompanhamento clínico das condições gerais individuais do paciente. A resposta individual ao tratamento é um dos fatores importantes na determinação do intervalo e de sua duração (RAGAZ et al., 1997).

As drogas quimioterápicas têm a vantagem de se distribuir por todos os tecidos orgânicos, atingindo desta forma, todas as células cancerosas. No entanto, células saudáveis também serão atingidas o que irá caracterizar os eventos relacionados aos efeitos colaterais, que se apresentam diferente em cada pessoa uma vez que dependerá do tipo de droga utilizada e das condições imunológicas e fisiológicas do paciente (SCHEINBERG, 2010).

A imunoterapia é uma forma de tratamento baseado na estimulação do sistema imunológico contra a célula tumoral por meio do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica, com o objetivo de induzir específica ou inespecificamente o ataque às células cancerígenas. As células tumorais produzem alguns tipos de proteínas que passam ser reconhecidas pelas células de defesa do organismo, ocorrendo assim à destruição das células do

tumor. Como exemplo, podemos citar o uso de anticorpos monoclonais, contra proteínas específicas, encontradas nas paredes das células neoplásicas, estas carregam consigo toxinas que atingem apenas as células do câncer (WALDMAN, 2003).

De acordo com os compostos utilizados e os seus mecanismos de ação, a imunoterapia é classificada em ativa (específica ou inespecífica) e passiva. A ativa tem a finalidade de intensificar a resistência do crescimento tumoral, onde substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica (imunoterapia inespecífica uso de BCG e derivados) e as vacinas de células tumorais (imunoterapia específica-vacinas e soros produzidos por cultura celular do próprio paciente) são utilizadas (WALDMAN, 2003).

A imunoterapia passiva vai objetivar proporcionar capacidade imunológica de combate a doença com o uso de anticorpos antitumorais e substâncias como interleucinas e interferonas (WALDMAN, 2003).

Os hormônios sexuais são de grande importância na oncologia porque estão profundamente envolvidos no desenvolvimento de diversos tumores malignos: câncer de mama, útero, próstata dentre outros, devido ao alto grau de dependência que estes tumores costumam manter em relação aos hormônios, o bloqueio à ação hormonal permite inibir seu crescimento (MAKAR, 2000).

A hormonioterapia raramente tem objetivo curativo quando usada isoladamente, sendo assim usual sua associação com a quimioterapia (câncer de mama e do sistema hemolinfopoético) com a cirurgia (câncer de endométrio) e com a radioterapia (câncer de próstata). A hormonioterapia pode

ser indicada para tratamentos paliativos de metástases ósseas e de tumores hormoniossensíveis (MAKAR, 2000).

Em relação às cirurgias, as mesmas são classificadas em cirurgia curativa, paliativa e preventiva. A cirurgia curativa é apropriada para tumores iniciais e normalmente sólidos, que consiste no conhecimento do mecanismo de propagação dos tumores e na retirada de órgãos ou das regiões afetadas pela neoplasia. A cirurgia paliativa é indicada para diminuir o sofrimento do paciente e proporcionar melhores condições de vida, enquanto que a cirurgia preventiva tem por finalidade impedir que a célula maligna se transforme, destruindo-a ou evitando que entre em contato com agentes cancerígenos (MARQUES, 2005).

Outra forma terapêutica indicada no combate ao câncer é a radioterapia que se utiliza de radiação ionizante para o tratamento de certos tipos de cânceres e algumas doenças benignas. Junto com cirurgia e quimioterapia, a terapia de radiação (radioterapia) é um dos mais importantes métodos de tratamento do câncer. Pelo menos 50% dos pacientes com câncer receberão radioterapia em algum estágio durante o curso de sua doença. É atualmente usada para tratar tumores sólidos localizados, como os tumores de pele, cérebro, da mama ou colo do útero, e também pode ser usado para tratar leucemia e linfoma (TOBIAS, 1992).

A maioria dos tipos de radiação não atacam especificamente as células cancerígenas e, portanto, causam danos aos tecidos normais ao redor do tumor. Os efeitos adversos são um dos fatores limitantes do sucesso do tratamento com radiação. A radioterapia pode ser basicamente dividida em

duas formas: externa (teleterapia) e interna (braquiterapia). Na teleterapia um feixe de radiação ionizante é apontado para a região alvo do corpo (campo), penetrando-lhe através da pele. A radioterapia externa, atualmente utiliza, além das fontes radioativas de origem nuclear, aceleradores lineares que produzem diferentes tipos de feixes e diferentes energias de raios X (FLINTON, 1998^a).

A braquiterapia, por outro lado, utiliza fontes radioativas para implantes ou moldagens em regiões próximas ao leito tumoral. São utilizadas fontes radioativas com formas de sementes, tubos ou micro-fontes que são aplicadas por tempo determinado ou mesmo inseridas permanentemente no órgão liberando radiação a este durante um determinado tempo útil (NAKANO et al., 2005).

Mesmo com todo o aparato de terapias acima citadas, o tratamento ideal do câncer ainda é alvo de muita discussão entre os pesquisadores da área, uma vez que o principal objetivo da pesquisa quimioterápica ainda não foi alcançado. Este objetivo visa principalmente à descoberta de novos agentes capazes de inibir especificamente a multiplicação de células neoplásicas, sem afetar a divisão celular normal (HORCAJADA 2010).

Os tratamentos de primeira escolha discutidos até aqui e empregados na terapia do câncer são destituídos de toxicidade seletiva, provocando efeitos colaterais graves, dentre eles a inibição da resposta imunológica, fator este considerado crítico para a recuperação do paciente. O conceito de intensidade da dose, ou aumento da quantidade de quimioterapia aplicada por unidade de tempo, tem sido alvo de intensa investigação (FENG & HUANG, 2001).

Neste sentido o emprego de tecnologia farmacêutica de sistemas transportadores de fármacos vem ao encontro da necessidade de diminuição da dose com otimização dos efeitos terapêuticos, podendo assim, dentre outras vantagens, aumentar a seletividade do agente antitumoral, minimizar sua toxicidade e elevar as taxas de cura em diferentes tipos de câncer (MU & FENG, 2003).

A nanoencapsulação constitui um importante campo para o desenvolvimento de novas formulações, uma vez que possibilita, de maneira racional e efetiva, aumentar a eficiência terapêutica de substâncias já utilizadas no tratamento de grande variedade de doenças, além disso, torna possível a utilização de fármacos potencialmente tóxicos, como é o caso de muitos antineoplásicos (MU & FENG, 2003).

2.2 NANOPARTÍCULAS E TERAPIA ANTITUMORAL

A nanomedicina surgiu como uma possível solução para muitos dos problemas associados com o tratamento atual de câncer, que tem como principais problemas a dificuldade de detecção precoce da doença e o tratamento seletivo das células tumorais, que submete paciente a compostos extremamente tóxicos e não específicos a estas células, acarretando sérios efeitos colaterais o que inviabiliza o tratamento no tocante a expectativa e qualidade de vida (FERRARI, 2005).

A evolução do conhecimento científico a cerca dos estudos envolvendo as nanopartículas como alternativas para esses problemas é resultado, principalmente, das propriedades desses compostos. O tamanho das mesmas presta-se particularmente bem ao tratamento eficaz do câncer, pois partículas

nesta ordem de grandeza possuem uma grande área superficial, o que as torna ideais para funcionalização, através de ligações a anticorpos monoclonais e considerando que essas partículas são menores do que a maioria das formas terapêuticas atuais, elas são capazes de ter mais fácil acesso aos lugares que até antes do uso das nanopartículas se encontravam inacessíveis (RODRÍGUEZ & FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2007).

As células cancerosas possuem um padrão diferenciado em relação as células normais, pois as mesmas tem proliferação e diferenciação descontrolados, além disso essas células promovem alterações no sistema de vascularização e no sistema endotelial. Os tumores sólidos quando atingem um tamanho maior que 2mm precisam criar seu próprio sistema de vasos sanguíneos, a fim de entregar nutrientes e oxigênio para sustentar o seu crescimento. As células cancerosas passam a produzir de maneira exacerbada fatores de crescimento endotelial como o VEGF e outros fatores angiogênicos, afim de provocar um aumento da microdensidade de vasos dentro do tumor (JAIN, 2005).

Além da densidade vascular, devido à rápida produção de vasos de sangue, essa vasculatura tende a ser altamente permeável. Isso resulta em um aumento da pressão intersticial o que torna o carreamento de drogas por macropartículas menos eficiente (MAEDA et al., 2007 ; NETTI et al., 1995). Associado também ao aumento da produção de vasos sanguíneos no tumor, está a maior susceptibilidade dos mesmos a moléculas pequenas que apresentam maior permeabilidade e efeito de retenção, uma vez que a

drenagem linfática não é suficiente para livrar os tumores dessas pequenas moléculas (MATSUMURA & MAEDA, 1986)

O carregamento de drogas por sistemas nanoparticulados é considerado uma técnica valiosa para aperfeiçoar a liberação controlada de drogas. A miniaturização de um sistema carreador de drogas até a escala nanométrica permite boa estabilidade, absorção e transferência tissular quantitativa e assim, a esperada atividade farmacodinâmica. Além disso, os efeitos colaterais e as reações por corpo estranho poderão ser reduzidos, simultaneamente à obtenção de tolerância local e sistêmica (MAEDA et al., 2008).

Estas partículas funcionam como vetores circulantes *in vivo* dotados de propriedades requintadas como controle de liberação e direcionamento seletivo ao alvo no tumor. Com a liberação da dose correta da droga especificamente nos tecidos ou nas células-alvo, o organismo não é sobrecarregado com doses massivas de drogas que apresentam efeitos colaterais graves, como acontece com os quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer (PORTNEY & OZKAN, 2006).

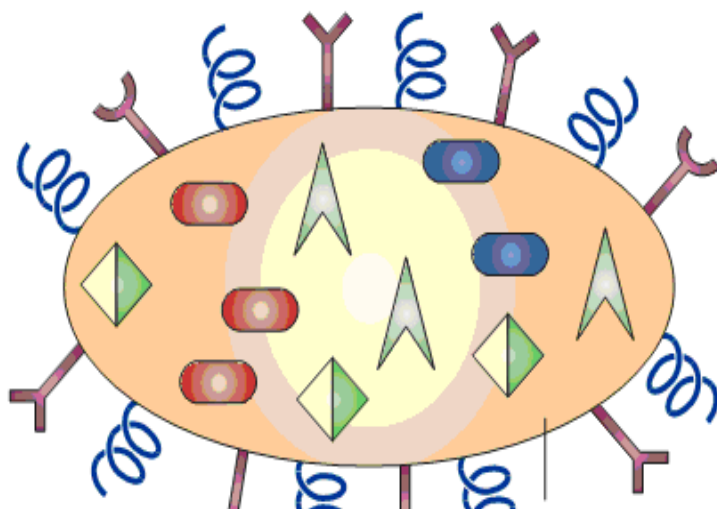
As tecnologias que estão sendo utilizadas como alternativas promissoras em relação aos desafios do tratamento do câncer incluem: nanosondas, nanocristais, nanopolímeros, quantum dots, dendrímeros e mais recentemente as redes de metais orgânicos, cada uma dessas tecnologias estão submetidas a extensas pesquisas para determinar o mecanismo pelo qual irão agir na inviabilização do tumor (FERRARI et al., 2005).

Nanovetores injetáveis por via intravenosa pertencem à classe dos nano-objetos de maior interesse e aplicações relacionadas ao câncer. Seu uso

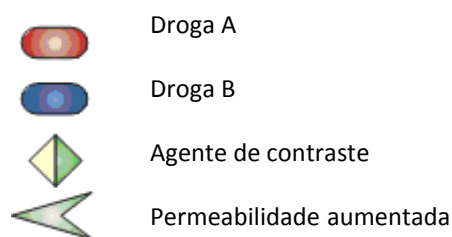
como marcadores moleculares permite a detecção da doença nos estágios iniciais além de também serem utilizados como agentes terapêutico na aplicação de drug-delivery permitindo uma diminuição substancial dos efeitos colaterais e deletérios e ainda podem ser utilizados como uma combinação das duas formas, interceptando e contendo as lesões antes mesmo da apresentação do fenótipo maligno, com mínima ou nenhuma perda na qualidade de vida (FERRARI et al., 2005).

Vários tipos de nanopartículas estão sendo utilizadas em ressonância magnética como agentes de contraste em protocolos clínicos dentre elas nanopartículas de gadolínio (OYEWUMI & MUMPER, 2004) e nanopartículas de ferro (SCHELLENBERGER et al., 2002; YAN; KOPELMAN; REDDY, 2002). Nanopartículas lipídicas de baixa densidade estão sendo utilizadas para melhorar a imagem de ultrasons (MAY; ALLEN; FERRARA, 2002).

Para cada modalidade clínica atualmente é possível desenvolver nanopartículas que podem melhorar os sinais de transmissão combinados com a capacidade de segmentação biomolecular (BLOCH et al., 2004; SULLIVAN & FERRARI, 2005). Nanovetores em geral possuem uma dupla constituição, caracterizada por um núcleo constituindo o material terapêutico e/ou agente de imagem e modificadores de superfície biológica, que irão ser responsáveis pela melhora na distribuição e dispersão das nano partículas no sítio tumoral **(Figura 1)**.



AGENTES TERAPÊUTICOS OU DE IMAGEM



MODIFICADORES DE SUPERFÍCIE

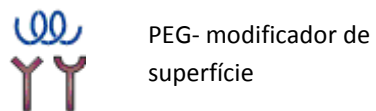


Figura 1: Nanopartícula Multifuncional. Ilustração da capacidade de um ou mais agentes terapêuticos; bioreconhecimento por conjugação a anticorpos; modificadores de superfície que permitem o não reconhecimento pelo retículo endotelial; amplificação do sinal de imagem por agentes de contraste.

A grande vantagem clínica do uso de nanovetores é a entrega específica de grandes quantidades terapêuticas de drogas ou agentes de imagem por um processo de bioreconhecimento. Métodos que possibilitam esse bioreconhecimento estão sendo testados e o mais comum é a ligação covalente de anticorpos as nanopartículas considerando o seu tamanho e suas propriedades físicas (DUCAN, 2003; NASHAT; MORONNE; FERRARI, 1998).

Nanovetores são projetados com o intuito de reduzir a metabolização do fármaco e posterior eliminação dos metabolitos do mesmo pela urina (*clearance*), proteger os princípios ativos da degradação enzimática e evitar obstáculos no processo de direcionamento ao alvo específico, como por exemplo: a exclusão da proteção exercida pela barreira hematoencefálica ou do endotélio vascular, bem como o sequestro das nanopartículas pelo retículo endotelial (KLIBANOV et al., 1991; PARK, 2002).

Os desafios envolvendo a nanotecnologia no câncer teriam como cenário ideal, a detecção precoce do processo de transformação celular, por processos não invasivos que funcionariam como um *screening* da doença, por exames rotineiros através de técnicas como, por exemplo: análise dos padrões proteômicos de amostras de sangue, imagens dos contornos de lesões e ainda análise do perfil molecular *in vivo* (FERRARI, 2005).

A biologia do hospedeiro e suas doenças seriam determinadas com precisão, o que de certa forma facilitaria a formação de um plano de intervenção, que envolveria a contenção ou erradicação das populações celulares malignas e a proteção simultânea dos tecidos saudáveis em uma rotina que poderia ser repetida várias vezes. A eficácia do tratamento poderia

ser acompanhada em tempo real e a terapêutica seria suplantada por uma prevenção personalizada (FERRARI, 2005).

Através da integração da nanotecnologia com as pesquisas relacionadas à biologia do câncer, esses aspectos já começam a se tornar realidade como demonstram os vários estudos na literatura científica que apontam os polímeros de coordenação como eficientes carreadores de fármacos e ferramenta de imagem e diagnóstico (KLIBANOV et al., 1991; KOBAYASHI et al., 2004; PARK, 2002).

2.3 POLÍMEROS DE COORDENAÇÃO E MOF(s) METAL ORGANIC FRAMEWORK

Durante a última década uma grande quantidade de sólidos tem sido descritos por conter íons metálicos ligados a espécies moleculares. Essa coleção de compostos tem sido denominada de metal organic framework (MOFs), polímeros de coordenação, materiais híbridos orgânicos-inorgânicos (EDDAOUDI et al., 1998; JAMES, 2006). Cada termo carrega sua própria conotação em relação às quais compostos estão englobados de modo que algumas tentativas de diferenciação dos termos têm sido encontradas na literatura (BIRDHA; RAMANAN; VITTAL, 2009).

Não há consenso na literatura sobre a diferenciação de polímero de coordenação e rede de metais orgânicos (MOFs). Alguns autores sugerem que os termos são sinônimos (CHRISTOPH, 2003) e outros propõem definições baseadas nas ligações químicas (TRANCHEMONTAGNE & MENDOZ-CORTÉS, 2009).

Para BIRADHA, RAMANAN & VITTAL (2009), MOFs são compostos cristalinos constituídos de íons metálicos ou *clustres* coordenados frequentemente a moléculas orgânicas rígidas que formam estruturas uni, bi ou tridimensionais porosas. Essa definição parece ser muito específica para cristalinidade e dimensionalidade, estando restrita apenas a extensão da rede por ligações covalentes ou coordenadas e não por outras interações não-ligantes ou fracas. Além disso, a porosidade é uma característica adicional não sendo específica para a classificação.

De fato foi YAGHI (1995) quem primeiro introduziu o termo metal organic framework (MOF) para o complexo 4,4-bipiridil que exibiu uma extensa interação entre metais orgânicos. De acordo com o mesmo, o termo polímero de coordenação é sem dúvida o mais “nebuloso”, pois significa simplesmente a extensa conexão do metal e ligantes através de ligações coordenadas sem levar em consideração a morfologia ou estrutura final.

O termo coordenação de polímeros é muito amplo e abrange todas as estruturas baseadas em íons metálicos ligados a uma cadeia infinita com arquitetura uni, bi ou tridimensional por ligantes geralmente contendo átomos de carbono. Considerando que o termo MOF é muito utilizado para redes de três dimensões, acaba por ser não usual o uso deste termo para longas redes uni ou bidimensionais (STEED & ATWOOD, 2009).

O termo framework tem sido definido como uma estrutura no estado sólido-cristalino, onde há fortes ligações interatômicas que não estão confinadas em um único plano, em contraste com uma estrutura em camada. Seguindo esta definição estruturas em camadas não devem ser consideradas

“frameworks structures” ou estruturas em rede, por isso estruturas uni e bidimensionais são descritas por alguns autores como polímeros de coordenação enquanto que estruturas tridimensionais são denominadas metal-organic framework (STEED & ATWOOD, 2009).

Essa classificação é diferente daquela descrita por TRANCHEMONTAGNE et al., 2009 que propuseram recentemente que esta diferenciação deveria se basear nos tipos de ligação metal-ligante e que o uso do termo MOF não deveria ser restrito apenas a tridimensionalidade da estrutura, porosidade ou a propriedade de adsorção de gases.

Sendo assim, para um sólido ser denominado de Metal-Organic Framework (MOF), o mesmo deve apresentar algumas características dentre elas: ligação forte, que será responsável pela robustez da estrutura formada pelas conexões das unidades que deverão estar disponível para modificações através de sínteses orgânicas e pela estrutura geometricamente bem definida; a outra propriedade é que esses sólidos devem ser altamente cristalinos, critério importante para o estabelecimento preciso da sua estrutura (YAGHI & LI, 1995; JANIÁK, 2003; TRANCHEMONTAGNE et al., 2009).

Segundo FERÉY (2008) as MOFs são materiais que tem recebido grande atenção como um adsorvente molecular de alto desempenho, devendo-se isso em parte as suas propriedades: grande área superficial interna, baixas densidades e alta microporosidade. Além disso, outro atrativo é sua estrutura altamente cristalina que permite uma uniformidade dos seus canais porosos, além da determinação da posição de cada um dos átomos que compõem a rede (FERÉY, 2008).

Com base nos estudos experimentais e computacionais, tornou-se cada vez mais claro que as modificações nos centros coordenados metálicos, podem melhorar e muito o desempenho das MOFs nas aplicações acima citadas (TAYLOR-PASHOW *et al.*, 2009).

Em relação à obtenção desses nanomateriais a forma mais comum de preparação dos mesmos é através de sínteses solvotermiais, dentre elas a hidrotermal, processo que utiliza a água como solvente propiciando a ocorrência de modificações estruturais no material em questão, acompanhadas ou não de reações químicas com o solvente (solvatação ou solvólise) onde os cristais são crescidos lentamente em uma solução contendo o metal e o ligante sob altas temperaturas e pressões (YAGH & LI, 1995; TAYLOR-PASHOW *et al.*, 2009).

Esta rota produz pós com alta pureza e cristalinidade, tamanho médio de partículas, desde nanométricas até micrométricas com estreita distribuição das mesmas, além do controle estequiométrico. É uma técnica rápida quando utilizado o microondas com alto rendimento de produto, podendo controlar o tamanho e morfologia das partículas se alterada as variáveis do processo (CHEETHAM; FERREY; LOISEAU, 1999).

O objetivo primordial de uma boa síntese é a obtenção de monocristais de boa qualidade que permita uma análise estrutural eficaz. O design da MOF está relacionado às forças intermoleculares que limitam a previsibilidade das mesmas, por isso muitos esforços vêm sendo aplicados com o intuito de tentar identificar e modificar as condições de síntese de forma a se obter a estrutura desejada e um protocolo de síntese reproduzível, isso muitas vezes

requer mudanças na concentração e/ou polaridade do solvente, pH, temperatura. A variação de apenas um desses parâmetros pode levar a mudanças no cristalito, alterar o rendimento da reação ou mesmo provocar o surgimento de novas fases (WANG ET al., 2002).

Objetivando o melhor aproveitamento das utilidades das MOFs como adsorventes, catalisadores e mesmo com o objetivo de funcionalizar essas partículas, tem-se percebido na literatura o crescente número de artigos envolvendo pós-sínteses dessas nanopartículas (MULFORT et al., 2009).

TAYLOR-PASHOW et al., 2009 sintetizaram uma MOF de ferro carboxilado com a estrutura da MIL-101 (MIL= Material Institut Lavoisier). Eles demonstraram uma nova estratégia envolvendo altas taxas de carregamento de drogas e agentes de contraste para diagnóstico de células tumorais utilizando modificações pós-sintéticas nas MOFs através de ligações dos componentes de imagem e da droga nos pontos de conexão metal-ligante.

MULFORT et al., 2009 propuseram alterações pós-sintéticas com o objetivo de aumentar a adsorção de H_2 para isso eles introduziram uma hidroxila funcionalizada e trocaram os prótons da hidroxila por cátions de lítio e magnésio metais que melhoram a adsorção de H_2 , através de métodos de solução. Os autores também sugerem que esta estratégia também pode ser empregada para metais que facilitam a catálise química

2.4 METAL ORGANIC FRAMEWORK (MOFs) COMO CARREADORES DE FÁRMACOS E OUTRAS APLICAÇÕES PARA O CÂNCER

A síntese de novos compostos bioativos com atividade terapêutica de alto peso molecular e baixa solubilidade em água tornam-se cada vez mais

complexas e os processos para sua comercialização ainda são considerados lentos. Isto requer a utilização de sistemas de suporte para melhorar a atividade dessas moléculas. Esses sistemas geralmente permitem um melhor controle dos níveis plasmáticos da droga, aumentando a eficiência e diminuindo a toxicidade, bem como aumentando a estabilidade da droga devido à proteção da biodegradação. Sistemas poliméricos mistos têm sido propostos como uma alternativa para melhorar o carreamento de fármacos (FREIBERG & ZHU, 2004).

Uma rota alternativa utilizando as MOFs, estrutura metal-orgânica tem sido proposta como novos sistemas de liberação controlada de fármacos. Estes sólidos são dotados de um grande volume de poros regulares, juntamente com grupos orgânicos altamente sintonizados que permitem uma modulação do tamanho dos poros (HORCAJADA et al., 2006).

O primeiro exemplo levando em consideração foi o modelo de adsorção que envolve a MOF MIL-100 e MIL-101 na adsorção de ibuprofeno. Esses sistemas exibiram uma alta capacidade de armazenamento da droga até 1,4 g por grama de sólido poroso, e uma liberação controlada do fármaco em condições fisiológicas de 3-6 dias (HORCAJADA et al., 2006).

Segundo UEMURA et al., (2002) o esqueleto das MOFs podem ser por vezes flexíveis, aumentando o tamanho de seus poros cerca de 50 à 230% sem quebras de ligações aparentes dependendo da estrutura do ligante (MELLOT-DRANZNIK et al., 2005; SERRE et al., 2007) a primeira estrutura que obedeceu a essas características foi a família das MOFs MIL-53 que

modulava o tamanho do seu poro na presença dos gases (BOURRELLY et al., 2005).

HORCAJADA et al., (2006) demonstraram que a MOF MIL-101(Cr) pode adsorver 138%wt de ibuprofeno e que a MOF MIL-53(Al) pode adsorver 20%wt de ibuprofeno. A liberação do ibuprofeno a partir dessas MOFs também foi avaliada e os autores constataram que MIL-101(Cr) liberou o fármaco lentamente e em vários estágios, completando a liberação após seis dias. Já a MIL-53 mostrou uma liberação ainda mais lenta, sendo a mesma completada após 21 dias.

Diante dessa propriedade, HORCAJADA et al., (2008) resolveram estudar a adsorção e liberação do Ibuprofeno nas MOFs MIL-53(Cr) e MIL-53(Fe). Eles observaram que a quantidade de droga adsorvida não depende do metal que constitui a estrutura, ambas as MOFs adsorveram cerca de 20%wt de ibuprofeno e em relação à cinética de liberação, foi observado que a total liberação da droga ocorreu de forma lenta em até 3 semanas.

Horcajada et al., (2010) sintetizaram uma gama de nanocarreadores com fins de carregamento de drogas e agentes de imagem. O grupo tem sintetizado algumas MOFs em meio aquoso e etanólico, biologicamente e ambientalmente não tóxicas dentre estas estão as MOFs (MIL-53, MIL-88 A, MIL-88Bt, MIL-89, MIL-100 e MIL-101-NH₂). Essas MOFs foram analisadas em relação a sua biocompatibilidade, perfil de degradação, e propriedades de imagem.

A eficiência dessas MOFs como carreadores de fármacos foi testada utilizando fármacos antivirais e antitumorais: bulsufan (BU), trisfotato de

azidotimidina (AZT-TP), cidovir (CDV) e doxorrubicina (DOXO). Para as aplicações biológicas as MOFs foram recobertas por um polímero biocompatível, o polietilenoglicol (PEG), onde os autores observaram que os mesmos evitaram a agregação das partículas (HORCAJADA et al., 2008; HORCAJADA et al., 2010).

Segundo HORCAJADA et al., (2010) a incorporação do bursufan (BU), fármaco antitumoral utilizado para cânceres como leucemias e mielomas na MOF MIL-100 foi considerada extremamente alta uma vez que incorporação da mesma foi 5x maior do que o melhor polímero testado e 60x maior do que em lipossomos. Esses achados indicam uma boa perspectiva para a terapia utilizando o bursufan, uma vez que com o uso das MOFs em questão foram conseguidas ótimas taxas de incorporação do fármaco.

Em relação ao uso dessas nanoestruturas como agentes de contraste, para diagnóstico, HORCAJADA et al., (2010) observaram que a eficiência do agente de contraste através da espectroscopia de Mossbauer onde ambos os gradientes eco e spin demonstraram que os órgãos tratados se apresentaram mais escuros do que os normais.

Considerando ainda o uso das MOFs como agentes de contraste, foi demonstrado por TAYLOR-PASHOW et al., (2009) que modificações pós-sintéticas, através da introdução de ligantes radioativos, têm permitido uma melhora na qualidade de imagem fornecida para diagnóstico, como também tem influenciado diretamente nas taxas de adsorção e liberação de drogas.

Resultados envolvendo MOFs em terapia do câncer vêm abrindo novas perspectivas em relação à melhoria dos tratamentos para essa patologia. NanoMOFs carboxiladas têm apresentado muitas vantagens quando utilizadas como carreadores de fármacos não tóxicos e biocompatíveis, de fácil obtenção através de métodos de síntese solvotermiais principalmente, que possibilitam ainda uma funcionalização específica dessas estruturas por processos pós-sintéticos cada vez mais presentes na literatura (UEMURA et al., 2002; HORCAJADA et al., 2006 ; HORCAJADA et al., 2010).

2.5 UTILIZAÇÃO DE 5-FLUOROURACIL E NANOPARTICULAS NAS TERAPIAS ANTITUMORAIS

Pesquisas relacionadas à cura do câncer compreendem um dos campos mais desafiadores da comunidade científica, principalmente quando se leva em consideração a dificuldade de se obter um tratamento eficaz de baixa toxicidade e alta especificidade. A quimioterapia é o tratamento mais utilizado como alternativa de cura de cânceres localizados e metastáticos, porém a mesma apresenta os entraves já discutidos em relação à distribuição seletiva de droga, toxicidade e efeitos colaterais (SCHEINBERG, 2010).

Os nanocarreadores têm representado uma ferramenta que vem sendo cada vez mais utilizada para minimizar os problemas associados com a liberação controlada do fármaco. Estudos vêm demonstrando que a inclusão de fármacos nessas partículas nano ou micrométricas tem apresentado eficácia no controle de sua liberação (YASSIN et al., 2010) Uma das drogas mais utilizadas nas quimioterapias atuais é o análogo de pirimidina de largo

espectro, o 5-Fluorouracil aplicado em tratamentos de cânceres de mama, glioblastomas e câncer de cólon (PANDOLFO et al., 2005). Este fármaco interfere na síntese do DNA, atuando principalmente como inibidor da timidilato sintetase, através da ligação do seu metabólito fluorodeoxiribonucleotídeo monofosfato (FdUMP) a esta enzima inativando a mesma e inibindo a síntese das timinas.

Um segundo mecanismo é a incorporação de outro metabólito da droga, ao RNA mensageiro no momento de sua transcrição, no lugar da uracila formando assim, um falso RNA. Entretanto, sua meia-vida curta, larga distribuição tecidual e sua alta toxicidade limitam sua aplicabilidade médica (PANDOLFO et al., 2005).

Tentando minimizar os problemas relacionados à toxicidade desta droga, HAGIWARA et al., (1996) estudaram o efeito farmacológico de 5-Fluorouracil encapsulados em microesferas compostas de poli(glicosídeo-co-lactídeo) contra carcinomatose peritoneal em animais. Estes autores estudando a sua toxicidade verificaram que a dose letal da droga encapsulada foi reduzida pela metade quando comparado com a droga administrada em solução.

Desde então alguns estudos relacionados a diferentes tipos de encapsulação desta droga, a fim de diminuir sua toxicidade e melhorar sua biodisponibilidade, vêm sendo reportados na literatura. SINHA et al., (2004) verificaram a liberação controlada *in vitro* de 5-Fluorouracil para câncer de cólon utilizando um revestimento por compressão, o objectivo dos autores foi o de conceber uma formulação com um peso de revestimento consideravelmente reduzido e as concentrações de goma para entrega colônica de 5-fluorouracil

para o tratamento do cancro colo-rectal. Os autores verificaram ainda um perfil de dissolução lento da droga quando a mesma estava comprimida a um revestimento contendo um mistura de goma xantana e goma guar que são polissacarídeos utilizados na indústria farmacêutica como emulsificantes, espessantes e estabilizantes.

YASSIN et al., (2010) estudaram a otimização do uso de 5-fluorouracil para o tratamento de cancer de colón utilizando nanopartículas sólidas-lipídicas. Os autores sintetizaram diferentes tipos de nanopartículas e avaliaram o grau de incorporação e perfil de liberação da droga em relação ao tamanho de partícula, os autores conseguiram uma eficiência de 59% de encapsulação, seguida de um perfil de liberação de cerca de 28,8% da droga na primeira hora de experimento e de mais 52% de liberação após 48 horas de experimento para uma das formulações sintetizadas.

Blanco et al., (2010) estudaram a liberação de 5-Fluorouracil a partir de um hidrogel de aplicação subcutânea. Os autores concluíram que a liberação de 5-fluorouracil a partir destes hidrogéis permite que a droga permaneça no plasma de 1 a 5 dias, tempo este considerado bastante longo quando considerada seu curto tempo de meia-vida plasmática (15min). Estes resultados demonstraram uma melhoria de até 98 vezes em comparação com a administração do fármaco por via intraperitoneal.

A administração de 5-Fluorouracil por implantação de hidrogéis poliméricos pareceu ser uma boa alternativa para a terapia com este fármaco, uma vez que quando liberado, o mesmo resultou em uma concentração plasmática terapeuticamente adequada do fármaco durante um longo período

de tempo. Recentemente AYDIN & PULAT (2012) realizaram o estudo do 5-Fluorouracil encapsulado a nanopartículas de quitosana para a verificação do perfil de liberação dependente da variação do pH. Os autores verificaram um perfil de liberação controlada e sustentada do fármaco, variando suas quantidades de 29 - 60,8% de acordo com a variação do pH. Os resultados demonstraram que partículas de quitosana dependentes do pH, podem ser usadas como uma alternativa inteligente para a entrega específica e localizada da droga no sítio tumoral, uma vez que estas nanopartículas são pH dependentes.

O 5-Fluorouracil encapsulado à nanopartículas de quitosana não só ofereceu vantagens sobre as terapias de drogas convencionais em relação ao perfil de liberação do fármaco, como também apresentou características que podem contribuir para melhorar os efeitos secundários em relação à dosagem para a obtenção do efeito terapêutico com diminuição da toxicidade, como demonstrado em vários estudos da literatura que apotam a nanoencapsulação como uma inteligente alternativa para o tratamento do câncer (HORCAJADA et al., 2006 ; HORCAJADA et al., 2010; YASSIN et al.,2010 ; ADYN & PULAT, 2012).

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Incorporar fármacos antitumorais utilizados em neoplasias humanas em redes de coordenação (MOFs), a fim de melhorar sua biodisponibilidade para o organismo, bem como avaliar o desempenho dessas estruturas em relação a sua capacidade de incorporar o fármaco escolhido, de realizar liberação controlada do mesmo e verificar sua toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo teórico-computacional para a verificação dos tamanhos das moléculas dos fármacos: cisplatina, doxorrubicina, carboplatina, oxaliplatina e 5-fluorouracil em relação ao tamanho dos poros das redes de coordenação MOFs (A-100) - MIL-53(Al) e (Basolite C300) – Cu-BTC;
- Caracterizar o sistema escolhido através das técnicas de difratometria de raio-x de pó, espectroscopia de infra-vermelho, análise elementar (CNHS), análise termogravimétrica (TGA) e colorimetria de varredura (DSC);
- Incorporar o fármaco indicado pelo estudo teórico nas redes de coordenação e determinar a melhor taxa de incorporação;
- Avaliar o tempo de degradação do carreador;
- Realizar o estudo de dissolução do fármaco a partir do carreador;
- Realizar a atividade citotóxica frente as linhagens tumorais humanas MCF-7 (câncer de mama), HT-29 (câncer de cólon), NCI-292 (carcinoma de pulmão), e HL-60 (leucemia promielocítica);

- Determinar a toxicidade *in vivo* (DL-50)
- Realizar o estudo histopatológico (fígado, rins e baço) dos animais;
- Verificar o mecanismo de morte celular associado ao sistema;
- Quantificar os níveis de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico, para avaliar uma possível atividade anti-inflamatória do sistema fármaco-carreador.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T. M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. **Nature Review Drug Discovery**, v. 2, p. 750–763, 2002.

Australian Bureau of Statistics. Causes of death, Australia, 1997. ABS Catalogue n. 3303.0. Belconnen: **Australian Bureau of Statistics**; 1999.

AYDIN, R.S.T., PULAT, M. 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: Evaluation of controlled release kinetics. **Journal of nanomaterials**. v. 2012, article ID 313961, 2012.

BARANI, H., MONTAZER, M. A Review on Applications of Liposomes in Textile Processing. **Journal of Liposome Research**, v.18, n.3. p.249-262, 2008.

BIRDHA, K., RAMANAN, A., VITTAL, J.J. Coordination Polymers Versus Metal-Organic Framework. **Crystal Growth & Design**. v.9, n.7, p.2969-2970, 2009.

BLANCO, M.D., GARCIA, O., GOMEZ, C., SASTRE, R.L., TEIJON, L.M. In-vivo Drug Delivery of 5-Fluorouracil using Poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylamide) Hydrogels. **The journal of pharmacy and pharmacology**. v.52, p. 1319–1325, 2010.

BLOCH, S. H., WAN, M., DAYTON, P. A., FERRARA, K. W. Optical observation of lipid- and polymer-shelled ultrasound microbubble contrast agents. **Applied Physics Letters**. v.84, p. 631–633, 2004.

BOURRELLY, S., LLEWELLYN, P.L., SERRE, C. MILLANGE, F., LOISEAU, T., FÉREY, G. Different Adsorption Behaviors of Methane and Carbon Dioxide in the Isotypic Nanoporous Metal Terephthalates MIL-53 and MIL-47. **Journal of the American Chemical Society**. v.127, n.39, p.13519-13521, 2005.

CHEETHAM, A. K ; FERREY, G ; LOISEAU, T. "Open-framework inorganic materials". **Angewandte Chemie, International Edition**. v.38 n.22. p.3268–3292, 1999.

CHRISTOPH, J. Engineering coordination polymers towards applications. **Dalton Transactions**: v.1, p. 2781–2804, 2003.

CURADO, M.P., EDWARDS, B., SHIN, H.R., FERLAY, J., HEANUE, M., BOYLE, P., STORM, H. Cancer incidence in five continents. **IARC Scientific Publication**, v. IX n. 160, 2009.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. ***Nature Review Drug Discovery***, v. 2, p. 347–360, 2003.

EDDAOUDI, H. Li, M., GRO, T.L.O., YAGH, M.I. Establishing Microporosity in Open Metal-Organic Frameworks: Gas Sorption Isotherms for Zn(BDC) (BDC=1,4-Benzenedicarboxylate). ***Journal of American Chemistry Society***. v.120, p.8571-8572, 1998.

EMERICH D.F., THANOS C.G. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. ***Biomolecular Engineering***, v. 23, p. 171-184, 2006.

FAROKHZAD O.C., LANGER R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v. 58, n. 14, p.1456-1459, 2006.

FATTAL E., VAUTHIER C. Nanoparticle as Drug Delivery Systems, ***Encyclopedia of Pharmaceutical Technology***, p.1864-1881, 2002.

FENG, S.S., HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. ***Journal of controlled release***. v.71, p.53-79, 2001.

FÉREY, G. Hybrid porous solids: Past, present, future. ***Chemical Society Review***. n.37, v.1, p. 191-241, 2008.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. ***Nature Review***, v.5, p. 161-171, 2005.

FILHO-WUNSCH, V., MONCAU, J.E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: Padrões regionais e tendências temporais. ***Revista da Associação Médica Brasileira***, v.48, n.3, p.250-257, 2002.

FLINTON, D. Radiotherapy: current pratic. In: Cherry, P., Duxbury, A. (eds.). Practical radiotherapy physics and equipment. ***Lenders: Greewich Medical Media***, p. 3-7, 1998a.

FREIBERG, S., ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release ***International Journal of Pharmacology***. v. 282. p.1-18, 2004.

GILLES, E. M., FRECHET, J. M. J. Designing macromolecules for therapeutic applications: Polyester dendrimer polyethylene oxide 'bow-tie' hybrids with tunable molecular weights and architecture. **Journal of American Chemical Society**, v.124, p.14137–14146, 2002.

HAGIWARA, A., TAKAHASHI, T., SAWAIL, K., SAKAKURAL, C., TSUJIMOT, H., IMANISHIL, T., OHGAKIL, M., YAMAZAKIL, J., MURANISHI, S., YAMAMOTO, A., FUJITA, T. Pharmacological Effects of 5-Fluorouracil Microspheres on Peritoneal Carcinomatosis in Animals. **British Journal of Câncer**. v.74, p.1392-1396, 1996.

HORCAJADA, P., SERRE, C., VALLET-REGI, M., SEBBAN, M., TAULELLE, F., FÉREY, G. Metal-organic framework as efficient materials for drug delivery. **Angewandete Chemie International Edition**. v.118, n. 36, p. 6120-6124-, 2006

HORCAJADA, P., SERRE, C., MAURIN, G., RAMSAHYE, N.A., BALAS, F., VALLET-REGÍ, M., SEBBAN, M., TAULELLE, F., FERREY, G. Flexible porous metal-organic framework for a controlled drug delivery. **Journal of American Chemical Society**. v.130, p. 6774-6780, 2008.

HORCAJADA, P., CHALATI, T., SERRE, C. GILLET, B., SEBRIE, C., BAATI, T., EUBANK, J.F., HEURTAUX, D., CLAYETTE, P., KREUZ, C., CHANG, J-S., HWANG, Y. K., MARSAUD, V., BORIES, P-N., CYNOBER, L., GIL, G., FÉREY, G., COUVREUR, P., GREF, R. Porous metal- organic Framework nanoscale Carriers as a potencial platform for drug delivery and Imaging. **Nature Materials**. v.9, p.172-178, 2010.

JAIN, R.K. Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in anti-angiogenic therapy. **Science**. v. 307, n. 5706, p. 58-62, 2005.

JAIN, R.K. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. **Nature Medicine**, v. 4, p. 655-657, 1998.

JAMES, S.L. Metal-Organic Framework. **Chemical Society Review**. v. 32, p. 276-288, 2006.

JANIAK, C. Engineering coordination polymers towards applications (Dalton perspective). **Dalton Transactions**. n.14, p. 2781-2804, 2003.

KLIBANOV, A. L., et al. Activity of amphipathic PEG 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and unfavourable for immunoliposome binding to target. **Biochimics and Biophysics Acta**. v.1062, p. 142–148, 1991.

KOBAYASHI, H., CHOYKE, P. L., BRECHBIEL, M. W., WALDMANN, T. A. Lymphatic drainage imaging of breast cancer in mice by micro-magnetic resonance lymphangiography using a nano-size paramagnetic contrast agent. **Journal of the National Cancer Institute**. v.96, p. 703–708, 2004.

KUMAR M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.2, p. 234-258, 2000.

MAEDA, S., SHINCHI, H., KURAHARA, H., MATAKI, Y., NOMA, H., MAEMURA, K., ARIDOME K., YOKOMINE, T., NATSUGOE, S., AIKOU, T., TAKAO, S., Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. **British Journal of Cancer**. v.97, p.405–411, 2007.

MAEDA, S., SHINCHI, H., KURAHARA, H., MATAKI, Y., MAEMURA, K., SATO, M., NATSUGOE, S., AIKOU, T., TAKAO, S. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. **British Journal cancer**. v.98, n.8, p.1389-1397, 2008.

MAKAR, A.P. Hormone therapy in epithelial ovarian cancer. **Endocrine-related cancer**, v.7, p. 85-93, 2000.

MARQUES, R.G. Cirurgia: arte e ciência. In Marques, R.G. Técnica Operatória e Cirurgia experimental. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.3-18, 2005.

MATSUMURA, Y., MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Câncer Research**. v.46, p.6386-6392, 1986.

MAY, D. J., ALLEN, J. S., FERRARA, K. W. Dynamics and fragmentation of thick-shelled microbubbles. IEEE Trans. **Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control**, v. 49, p. 1400–1410, 2002.

MELLOT-DRANZNIEKS, C., SERRE, C., SURBLÉ, S., AUDEBRAND, N., FÉREY, G. Very Large Swelling in Hybrid Frameworks: A Combined Computational and Powder Diffraction Study. **Journal of American Chemical Society**. v.127, n.46, p.16273-16278, 2005.

MONTASSER I., BRIANÁON S., LIETO J., FESSI H. MÈthodes díobtention et mÈcanismes de formation de nanoparticules polymÈriques. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 55, p. 155-167, 2000.

MORENO-ASPTIA A, PEREZ E.A. Anthracycline- and/or taxane-resistant breast cancer: results of a literature review to determine the clinical challenges and current treatment trends. **Clinical Therapeutics**, v.31, p.1619–1640, 2009.

MU, L., FENG, S.S., A novel controlled release formulation for the anticancer paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. **Journal of Control Release**. v.86, p.33-48, 2003.

MULFORT, K.L., FARHA, O.K., STERN, C.L., SARJEANT, A.A., HUPP, J.T. Post-synthesis alkoxide formation within metal-oirganic framework materials: A strategy for incorporating highly coordinatively unsaturated metal ions. **Journal of the American Chemical Society**. v.131, p. 3866-3868, 2009.

NAKANO, T., NAKASHIMA, Y., YONEMITSU, Y., SUMIYOSHI, S., CHEN, Y. X., AKISHIMA, Y., ISHII, T., LIDA, M., SUEISHI, K. Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphagiogenic factors in the atherosclerotic Intiman of human coronary arteries. **Human Pathology**. v.36, p.330-340, 2005.

NASHAT, A. H., MORONNE, M., FERRARI, M. Detection of functional groups and antibodies on microfabricated surfaces by confocal microscopy. **Biotechnology and Bioengennering**. v. 60, p. 137-146, 1998.

NETTI, P.A., BAXTER, L.T., BOUCHER, Y., SKALK, R., JAIN,R.K. Time-dependent Behavior of Interstitial fluid pressure in solid tumors: implications for drug delivery. **Cancer research**. v.55, p. 5451-5458, 1995.

NO M, CHOI E.J, KIM, I.A. Targeting HER2 signaling pathway for radiosensitization: alternative strategy for therapeutic resistance. **Cancer Biology & Therapy**. V.8, p.2351–2361, 2009.

OYEWUMI, M.O., MUMPER, R.J. Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice. **Journal of Controlled Release**, v. 24, p. 613–626, 2004.

PANDOLFO, M., ARAÚJO, R.A., NASCIMENTO, L., GOULART, L.R. Farmacogenoma do Fluorouracil. Análise de Polimorfismo no gene da Diidropirimidina Desidrogenase. **Infarma**. v. 17, n. 3/ 4, p. 62-65, 2005.

PARK, J. W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. **Breast Cancer Research**. v.4, p.95–99, 2002.

PORTNEY, N.G., OZKAN, M. Nano-oncology: drug delivery, imaging and sensing. **Anal Bioanal Chemical**. v. 384, p. 620-630, 2006.

RAGAZ, J., STEWART, M.J., NHU LE, PLENDERLEITH, I.H., SPINELLI, J.J., BASCO, V.E., WILSON, K.S., KNOWLING, M.A., COPPIN, C.L., PARADIS, M., COLDMAN, A.J., OLIVOTTO, I.A. Adjuvant radiotherapy and chemotherapy In node-positive premenopausal women with breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.337, n.14, p. 956-962, 1997.

ROBERT A. W. The Biology of Cancer, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, NY, 2007.

RODRÍGUEZ, J. A., FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Synthesis, properties and applications of oxide nanomaterials. New York: John Wiley & Sons, 2007.

SANTOS, C.N. e CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: A bala acertou? **Química Nova**, v. 25, n.6B, p. 1181-1185, 2002.

SCHEINBERG, G. Câncer: as novas frentes de ataque. **Revista Galileu**, n.120, p. 41-52, 2010.

SCHELLENBERGER, E. A. et al. Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI. **Molecular Imaging** v.1, p.102–107, 2002.

SERRE, C., MELLOTT-DRANZNIKES, C., SURBLÉ, S., AUDERBRAND, N., FILINCHUK, Y., FÉREY, G. Role of Solvent-Host Interactions That Lead to Very Large Swelling of Hybrid Frameworks. **Science**. v.315, n.5820. P.1828-1831, 2007

SINHA, V.R., MITTAL, B.R., BHUTANI, K.K, KUMRIA, R. Colonic drug delivery of 5-fluorouracil: an in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**. v.269, n. 1, p. 101-108, 2004.

SRINIVAS, P.R., BARKER, P. & SRIVASTAVA, S. Nanotechnology in early detection of cancer. **Laboratory Investigation**. v. 82, p. 657–662, 2002.

STEED, J.W., ATWOOD, J.L. Supramolecular chemistry. **J. Wiley & Sons: Chichester**, v.2, p. 538-539, 2009.

SULLIVAN, D., FERRARI, M. Nanotechnology and tumor imaging: seizing an opportunity. **Molecular Imaging**, v.6, n.4, p. 292-294, 2005.

TOBIAS, J. S. Interventional radiation therapy: Techniques-brachytherapy. **British Journal of Surgery**. v. 79, n.5, p. 471- 479, 1992.

TAYLOR-PASHOW, K.M.L., DELLA-ROCCA, J., XIE, Z., TRAN, S., LIN, W. Postsynthetic Modifications of Iron-carboxylate nanoscale metal-organic framework for imaging and drug delivery. **Journal of the American Chemical Society**. v.40, n.131, p. 14261-14263, 2009.

TRANCHEMONTAGNE, D.J., MENDOZ-CORTÉS, J.L., O'KEEFE, M., YAGHI, O.M. Secondary building units, nets and bonding in the chemistry of metal-organic frameworks. **Chemical Society Reviews**. v. 38, n.5, 1257–1283, 2009.

UMEMURA, K., KITAGAWA, S., KONDO, M., FUKUI, K., KITAURA, R., CHANG, I.C., MIZUTANI, T. Novel flexible frameworks of porous cobalt(II) coordination polymers that show selective guest adsorption based on the switching of hydrogen-bond pairs of amide groups. **Chemistry European Journal**. v.8, n.16, p. 3586-3600, 2002.

WALDMAN, T.A. Immunotherapy: past. Present and future. **Nature Medicine**, v.9, n.3, p. 269-277, 2003.

WANG, Q.M., SHEN, D., BULOW, M.L., LAU, S., DENG, F.R., FITCH, N.O., LEMCOFF, SEMANSCIN, J. Metallo-organic molecular sieve for gas separation and purification. **Microporous and Mesoporous Materials**. v.55, p. 217-230, 2002.

WOLD, L.E., ABERLE, N.S. Doxorubicin induces cardiomyocyte dysfunction via a p38 MAP kinase-dependent oxidative stress mechanism. **Cancer Detection and Prevetion**, v. 29, p. 294–299, 2005.

YAGHI, O. M., Li, H. L. Hydrothermal Synthesis of a Metal-Organic Framework Containing Large Rectangular Channels. **Journal of the American Chemical Society**. v. 117, p. 10401–10402, 1995.

YAN, F., KOPELMAN, R., REDDY, R. Synthesis and characterization of silica-embedded iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 4, p. 72–76, 2004.

YASSIN, A.E.B., ANWER, Md. K., MOWAFY, H.A., EL-BAGORY, I.M., MOSHEN A., BAYOMI, M.A., ALSARRA, I.A. Optimization of 5-flurouracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer. **Internacional Journal of Medical Science**. v.7, n.6, 398-408, 2010.

5. ANEXOS

COMPLEMENTARY MATERIALS

I - THEORETICAL STUDY OF ANTICANCERS DRUGS INCORPORATED INTO CU-BTC MOF CAVITIES

1. Backgrounding

Theoretical study was performed in order to re select which of the drugs used have molecular size compatible with the pore size provided by Cu-BTC and MIL-53 (Al) MOFs in order to improve our experimental protocol.

2. Methodology

Theoretical section

Theoretical tools were used to evaluate the possibility of incorporating antitumor drugs into the Cu-BTC MOF. Initially, we used B3LYP/6-31G* model to determine the three-dimensional structure of each drug and compared them with the pore sizes of Cu-BTC MOF. The B3LYP/6-31G* calculations were carried out using the Gaussian 2003 software [1].

The pore sizes of the Cu-BTC MOF were also measured. However, semiempirical PM6 method was used in this case due to the high computational cost of the DFT methodology [2]. This choice can be justified by the fact that the PM6 is the only semiempirical method that possesses parameters for copper.

We also chose to apply periodic conditions to calculate the solid state structure using translation vectors to repeat the unit cell in all directions. This procedure was detailed by Stewart in 2007 [2]. The semiempirical calculations were performed using the MOPAC 2009 package. The keywords used were: PM6 - the PM6 Hamiltonian to be used; MERS (n1,n2,n3) – instructions for replication of the unit cell; GRAPHF – generate file for graphics; T = 20D – time of 30 days requested; XYZ – Cartesian coordinate system used; and AUX – output auxiliary information.

The solid state calculations present some advantages when compared to the vacuum calculations [3]. The principal advantage is that the solid state calculations provide better predictions of the borders of the solid. Another advantage is the higher computational efficiency of the process. In short, the solid state calculations are faster and more accurate.

3. Results and Discussion

The dimensions of each drug in the three space directions were calculated and the results are presented in (table 1). It is possible to observe that as 5-fluorouracil has a planar structure it has only two measurable dimensions, making this drug the smallest in the group of molecules chosen for this study. We may also notice that the doxorubicin is the largest one, featuring two dimensions larger than 10 Å.

Table 1: Dimension of the drugs calculated using BLYP/6-31G* methodology.

Drug	X (Å)	Y (Å)	Z (Å)	N ^a
5-Fluorouracil	5.40	4.51	0.00	12
β-lapachone	9.03	8.98	3.83	32
Cisplatin	5.00	5.00	2.40	11
Carboplatin	8.03	6.00	4.82	25
Oxaliplatin	10.43	5.82	2.80	29
Doxorubicin	15.06	13.45	5.52	68

^a N = number of atoms in the structure.

Figure 1 show the crystallographic and PM6 structures of the Cu-BTC MOF. The PM6 calculation agrees closely with the crystallographic one, although a slight distortion of the coordinated water molecules in the PM6 structure is observed. (Table 2) shows a comparison between the crystallographic and PM6 cell parameters. The calculated cell parameters are similar to the crystallographic quantities. For instance, the errors in the a, b and c cell parameters were 0.4 Å (about 1.5%) while errors of 0.3 degrees in α , β and γ cell parameters were observed (about 0.3 %). If we analyze the volume of the calculated Cu-BTC structure the error is about 4%.

A better view of the good results obtained with PM6 semiempirical model is provided by the overlap of the crystallographic and PM6 structures presented in figure S1 of the supplementary material. The good agreement between the two structures is clear. The RMSD (Root-mean-square deviation), calculated using the Cache software was only 0.0044 [4].

Table 2. Comparison between crystallographic and theoretically calculated cell parameters for Cu-BTC.

Structure	Cell Parameters						
	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	volume (Å ³)
X-Ray	26.3	26.3	26.3	90.0	90.0	90.0	18280
PM6	26.0	26.0	25.9	90.2	89.7	89.7	17530
Unsigned error	0.3	0.3	0.4	0.2	0.3	0.3	750

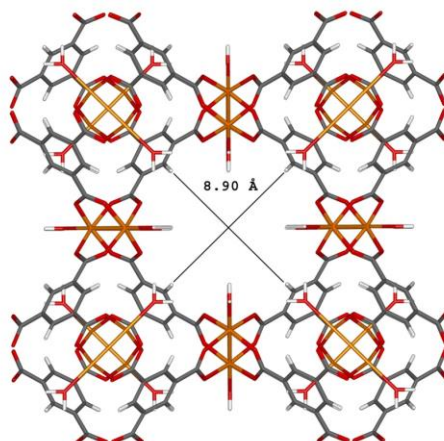


Figure 1: Representation of the main pore based on the crystallographic structure of Cu-BTC MOF

The largest pore, visible in (figure 1) measures 8.90 Å in the crystallographic structure and 8.95 Å in the PM6 calculated structure. It can be noted that the slight distortion in the water molecules does not affect the pore size. Moreover, according to TGA analyses, water molecules originally present in the pores are eliminated during the incorporation process (see discussion on thermal analyses results article 1). Although this orientation shows only one pore, the Cu-BTC presents three different pores.

(Figure 2) shows the same crystallographic structure in a different orientation. In this figure, the two other pores are visible. The crystallographic diameters of these pores are 7.50 Å and 6.00 Å while the PM6 values are 8.30 Å and 5.10 Å. Once again, PM6 dimensions are similar to the experimental values.

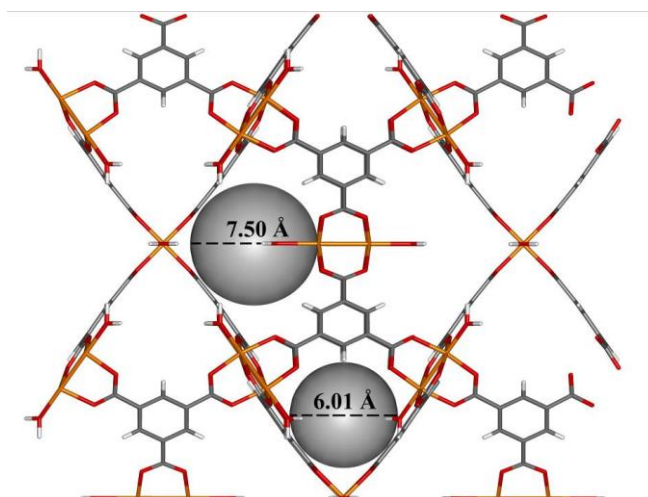


Figure 2: Orientation showing the dimensions of the two smaller pores of Cu-BTC MOF based on crystallographic structure.

Based on a comparison of drug dimensions and pore sizes we can suggest that only doxorubicin, β -lapachone and oxaliplatin present at least these dimensions larger than 8.9 Å. Therefore probably only these drugs will not fit into the Cu-BTC MOF. Analysis of the DFT drug dimensions (see table 1) indicates that 5-fluorouracil and cisplatin can be inserted simultaneously into two different pores of Cu-BTC.

4. Conclusion

From the above mentioned results, we chose 5-fluorouracil to perform experiments to determine the incorporation efficiency into Cu-BTC pores.

5. References

- [1] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B.

B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, Gaussian 2003, Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 2003.

- [2] J. J. P. Stewart, *J. Mol. Model.* 2007, **13**, 1173-1213.
- [3] M. O. Rodrigues, F. A. Paz, R. O. Freire, G. F. de Sa, A. Galembeck, M. C. Montenegro, A. N. Araujo, S. Alves, *J. Phys. Chem. B* 2009, **113**, 12181-12188.
- [4] CAChe program, Fujitsu Ltd., Chiba, Japan 2001.

ARTIGO I

Improving the Cytotoxic Activity and Slow Release of 5-Fluorouracil Using the Metal Organic Framework Cu-BTC Against Human Cancer Cells

Flávia Raquel S. Lucena¹, Fausthon Fred da Silva², Danilo Augusto F.

Fontes³, Pedro José R. Neto³, Silene C. do Nascimento¹

¹ Antibiotics Department, UFPE, 50590-470, Recife - PE, Brazil;

² Fundamental Chemistry Department, UFPE, 50590-470, Recife - PE, Brazil;

³ Pharmaceutical Sciences Department, UFPE, 50590-470, Recife-PE, Brazil.

Improving the Cytotoxic Activity and Slow Release of 5-Fluoruracil Using the Metal Organic Framework Cu-BTC Against Human Cancer Cells

Flávia Raquel S. Lucena¹, Fauston Fred da Silva², Danilo Augusto F. Fontes³, Pedro José R. Neto³, Silene C. do Nascimento¹

¹ Department of Antibiotics, UFPE, 50590-470, Recife - PE, Brazil

² Department of Fundamental Chemistry, UFPE, 50590-470, Recife - PE, Brazil

³ Departament of Pharmaceutical Sciences, UFPE, 50590-470, Recife-PE, Brazil

ABSTRACT

In this article, the possibility of associating anticancer drugs with the MOFs and cytotoxicity against human cancer cells was evaluated, we choose 5-flourouracil (5-FU) to perform experiments to determine the efficiency of drug association with the Cu-BTC MOF pores. Structural characterization encompasses elemental analysis (CHNS), Differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TG/DTG), Fournier transform infrared (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD) . The chemical characterization of the material indicated the presence of drug associated with the coordination network. The cytotoxicity tests were carried out against four cell lines: NCI-H292, MCF-7, HT29 and HL60. The MOF-associated drug was extremely cytotoxic against the human breast cancer adenocarcinoma (MCF-7) cell line and against human acute

promyelocytic leukemia cells (HL60). The drug demonstrated a slow release profile where 82% of the drug was released in 48 hours. This improvement of cytotoxic activity suggests that the association between the 5-fluorouracil and the Cu-BTC MOF modulates the cytotoxic activity of the drug.

Keywords: Anticancer drugs; MOFs; Cytotoxic Activity

Corresponding author. Tel: +0055-81-21268347

E-mail address: flavia_19lucena@yahoo.com.br

Introduction

Cancer is a group of diseases characterized by loss of control of cell division and by the ability to invade other organic structures. The process begins with a single cell that develops a mutation in a gene responsible for either cell cycle control or apoptosis and replicates uncontrollably. The problem with current cancer therapies is that they lack selectivity. The ideal therapeutic system must directly target the cells that are in the early stages of malignant transformation.

Polymeric controlled release technology has had an impact on different areas of medicine, having been incorporated into several different products already present in medical practice [1]. Among the nanostructures employed in this technology, Metal Organic Frameworks (MOFs) is one of the most exciting recent developments. These structures are crystalline solids formed by metal ions or clusters coordinated by organic molecules to create one-dimensional or three-dimensional rigid structures [2].

Some potential applications for MOFs include gas storage containers, sensors, catalyst and more recently, drug carries and imaging agents for several tumor cell targets [3], [4]. In 2009, Taylor-Pashow and co-workers synthesised an iron-carboxylated MOF with the structure of MIL-101, suggesting that MOFs can be used as novel carriers for drugs and diagnostic contrast agents, as they have high rates of incorporation. Another important feature that should be emphasized is that MOFs can be modified post-synthetically by linking different groups to the metal-ligand complex [5], [6].

Horcajada et al (2008) studied the adsorption and release of ibuprofen by the MOFs MIL-53 (Cr) and MIL-53 (Fe). They observed that the amount of drug adsorbed is independent on the metal that constitutes the structure. Both MOFs adsorbed approximately 20 wt % of ibuprofen. Analysis of the release kinetics revealed that total drug release occurred within three weeks [7]. The same group synthesized biologically and environmentally non-toxic MOFs (MIL-53, MIL-88, MIL- 88 Bt, MIL-89, MIL-100 and MIL-101-NH₂). These MOFs were analyzed with respect to their biocompatibility, degradation profile and imaging properties. The efficiency of these MOFs as drug carriers was tested using the following antiviral and antitumor drugs: bulsufan, azidothymidine triphosphate, cidovir and doxorubicin [8].

For biological applications, the MOFs were coated with biocompatible polymer, polyethylene glycol, wich prevented aggregation of particles [8]. Studies involving MOFs in cancer therapy have opened new perspectives for improving treatments. Non-toxic, biocompatible carboxylated nano-MOFs are easy to obtain and have exhibited many advantages as drug carriers.

In this paper we initially carried out a study to evaluate the possibilities of associate 5-Fluorouracil with the Cu-BTC MOF to perform experiments to determine the efficiency of drug association with the Cu-BTC MOF pores and evaluate the improvement of cytotoxic activity of the drug and the slow release of the drug.

2. Methodology

2.1 - Experimental section

The association was performed using 5-FU 99% (Sigma Aldrich) and the Cu-BTC MOF - Basolite™ C300 (688814) produced by BASF. The drug (300 mg) was dissolved in 150 mL of Milli-Q ultrapure water and 100 mg of Cu-BTC were added, in a proportion of 3:1 (w/w - drug/MOF). The resulting suspension was kept under stirring at room temperature for seven days. Aliquots were removed after one, three and seven days, then centrifuged (4500 rpm) for 20 minutes and the supernatant was analysed by UV-Vis spectroscopy to determine the amount of drug present in the metal organic framework. The analysis was performed in triplicate.

Elemental analysis (CHNS) measurements were performed in a CE Instruments elemental analyser, model EA1110. FT-IR spectra were collected from KBr discs utilizing a Bruker spectrophotometer (IFS-66) with Fourier transform (spectral range 4,000 to 400 cm^{-1}). The results were analysed using the OPUS Spectroscopic Software from Bruker. TG/DTG curves were obtained in the temperature range between 20-900°C, using a Shimadzu TGA 50 thermobalance under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL min^{-1}); a heating rate of 10°C min^{-1} ; and an alumina crucible containing approximately 3 mg of the sample. The instrument calibration was performed before the tests using a calcium oxalate monohydrate standard, according to the American Society for Testing and Materials. The DSC data were recorded in a DSC 50 cell (Shimadzu) in the 25-600°C temperature range under a dynamic nitrogen atmosphere (100 mL min^{-1}) in an alumina crucible containing 2.0 mg of the sample; a heating rate of 10°C min^{-1} was used. The powder patten XDR were

obtained in a Bruker D8 Advance X-Ray diffractometer ($K\alpha(\text{Cu})$ 1,54 Å), in the range 5 ° to 50 °, step 0.02 ° and acquisition time 1 second.

For in vitro release study, were used transparent hard gelatin capsules containing 110.97 mg of incorporation, which was equivalent to 50 mg of 5-FU. Dissolution (dissolutor, Varian, model VK-7000/7010/750D) was performed in PBS (pH: 6.8), volume of 500 mL at 37 ± 0.5 and screw speed of 100 RPM. The collections were performed on days 0.5, 1.5, 5.5, 15, 20, 24, 39, 44 and 48 hours. At every given time, a sample was collected from 2.5 mL to be analyzed on HPLC, followed by replacement of the dissolution medium. The samples were filtered on Millipore® membrane 0.22 µm in pore size, 13 mm (Millex). All analyzes were performed in triplicate. The samples obtained from dissolution studies were individually subjected to analysis by HPLC - DAD using isocratic mobile phase 85 % of acetonitrile: 15 % of water (v/v) with a 2mL/min flow, the oven temperature was 25°C, with a stationary phase C18 column (250 x 4.6 mm / 5 µm), and 20 µL injection volume of the samples. The LC system used was a high performance liquid chromatograph (HPLC) Shimadzu® equipped with a quaternary pump model LC - 20ADVP, powered by helium degasser model DGU - 20A, PDA detector model SPD - 20AVP, oven model CTO-20A SVP, auto sampler model SIL - 20A DVP and controller model SCL - 20AVP. The data were processed by software Shimadzu® LC solution 2.0.

2.3 - Biological section

The cytotoxicity tests were carried out against four cell lines: NCI-H292 cells (lung mucoepidermoid carcinoma), MCF-7 cells (breast adenocarcinoma),

HT29 cells (colon adenocarcinoma) and HL60 cells (promyelocytic leukemia). The cells were maintained in DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (see Supporting Information). Drugs were considered cytotoxic when the rates of cell growth inhibition exceeded 40%, according to the protocol established by Geran, 1972 [9].

2. Results and Discussion

Drug loadings, expressed in g 5-FU per gram Cu-BTC after one, three and seven days of stirring were 0.2884, 0.6391 and 0.8221 respectively. Longer contact times did not improve drug loading. This result shows that owing to the high surface area of the host structure it takes relatively long times for the drug molecules to reach the metal-organic framework. This result also allowed us to choose an optimal contact time of seven days.

Cu-BTC contains C, O and H atoms but lacks N atoms. Therefore, the presence of the drug on this structure was indicated by the appearance of N atoms in the elemental analysis. The theoretical and experimental results are represented in table 1 conform to the proportions demonstrated in the TGA analysis.

Table 1. CNHS Elementar analysis.

Sample	%N	%C	%H	%S
THEORETICAL				
(Cu-BTC)	0.0	25.8	4.3	0.0
(CuBTC/5-FU)	2.4	30.2	3.0	0.0
EXPERIMENTAL				
(Cu-BTC . 12 H ₂ O)	0.0	26.3	3.7	0.0
(Cu-BTC.6H ₂ O+0.82 5-FU)	2.5	30.7	2.8	0.0
CU-BTC – C ₁₈ H ₆ Cu ₃ O ₁₂ / 5-FU- C ₉ H ₃ FN ₂ O ₂				

Figure 1 shows the FTIR spectra of the precursors and the product obtained. In the infrared spectrum of Cu-BTC, there is a very strong band centered at 3450 cm⁻¹ assigned to the OH stretching from water molecules. The broadness of this band is consistent with extensive hydrogen bonding from both coordinated and non-coordinated water molecules. Bands at 1644 cm⁻¹ and 1373 cm⁻¹ are assigned to asymmetric and symmetric (OCO⁻) stretching from carboxylate groups.

Additional bands at 1587 and 1450 cm⁻¹ are due to C=C stretching from the aromatic rings. The FTIR spectrum for 5-FU is characterized by a broad band at 3133 cm⁻¹, assigned to NH stretching, in addition to bands at 1724 cm⁻¹ and 1660 cm⁻¹ arising from the two distinct carbonyl groups in 5-FU structure. The spectrum for Cu-BTC/5-FU sample shows bands from both host and guest species, some of them shifted due to the occurrence of intermolecular interactions.

The spectrum exhibits the NH stretching band centered at 3150 cm⁻¹ and at higher wavenumbers an envelope of OH stretching bands (centered at 3550,

3498, 3460 and 3388 cm^{-1}). Those bands are probably due to the coordinated water molecules which were partially resolved after removal of the non-coordinated ones during the association process, as shall be discussed on the basis of thermal analysis. At lower wavenumbers we can observe the carbonyl bands from 5-FU at 1708 and 1660 cm^{-1} in addition to the carboxylate bands from Cu-BTC at 1631, 1617 and 1382 cm^{-1} . Bands from both species in this region are slightly shifted as mentioned [10].

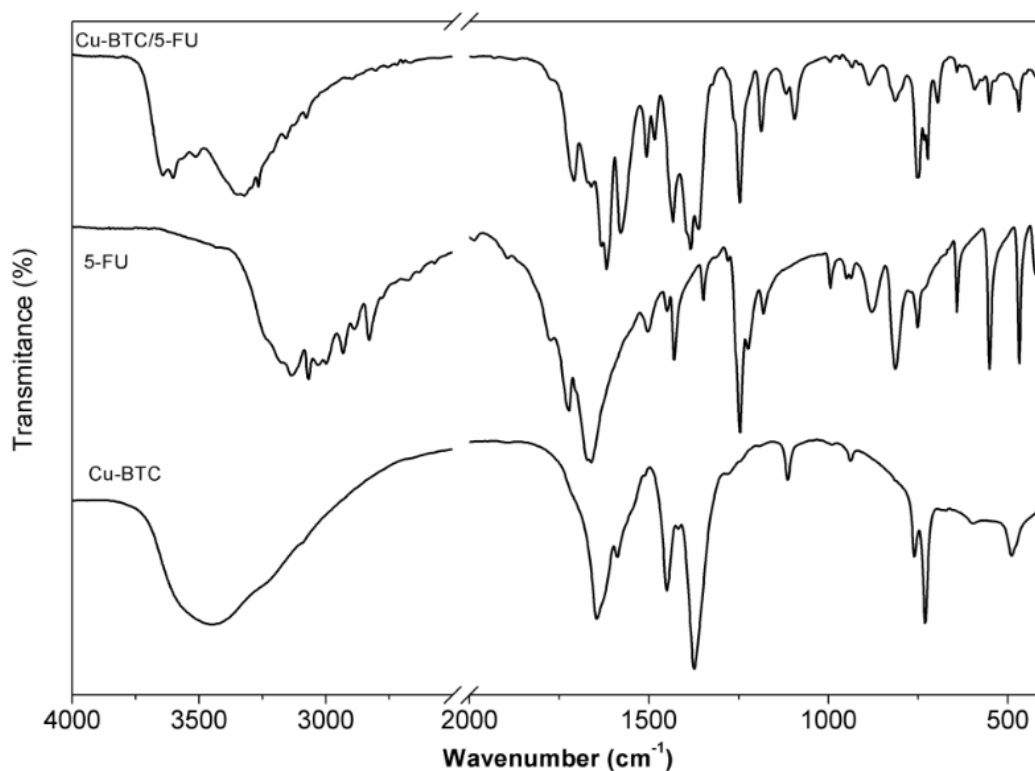


Figure 1: FTIR spectra of Cu-BTC MOF

Thermal analysis data complemented characterization allowing us to make a picture of the sample Cu-BTC/5-FU. Figure 2 shows DSC curves for the drug 5-fluorouracil, showing that the free drug starts to decompose at nearly 260 °C with a peak in DTG at 303 °C. DSC for 5-FU shows that actually the solid drug melts at 279 °C and decomposes subsequently after melting.

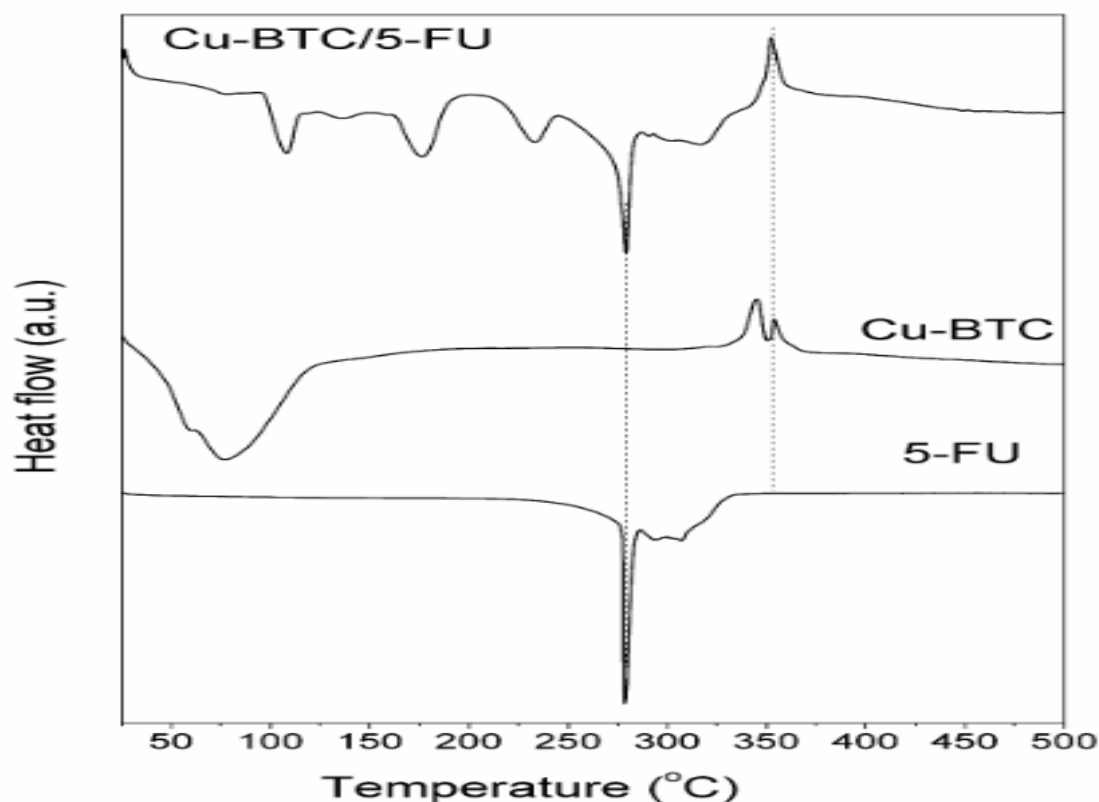


Figure 2: DSC curves Cu-BTC/5-FU ; Cu-BTC; 5-FU

Analyzing the thermal analysis curves TG/DTG (Figure 3) and DSC (Figure 2) for Cu-BTC we see that the sample starts to lose adsorbed and non-coordinated water molecules below 100 °C. After losing nearly 30% of the whole mass the TG curve shows a plateau from 150 °C which is disturbed by very discrete mass losses at 160°C and 225 °C, followed by a major mass loss starting from 320 °C (peaked at 352 °C and 381 °C in the DTG curve), assigned to decomposition of the framework structure.

This event can be assigned to both decomposition of the organic ligands and release/decomposition of the coordinated water molecules. In the Cu-BTC DSC curve these events are observed as a broad endothermic event

centered at 77 °C along with two exothermic ones at 344 and 354 °C. Finally for the Cu-BTC/5-FU sample the thermal analysis curves show interesting features.

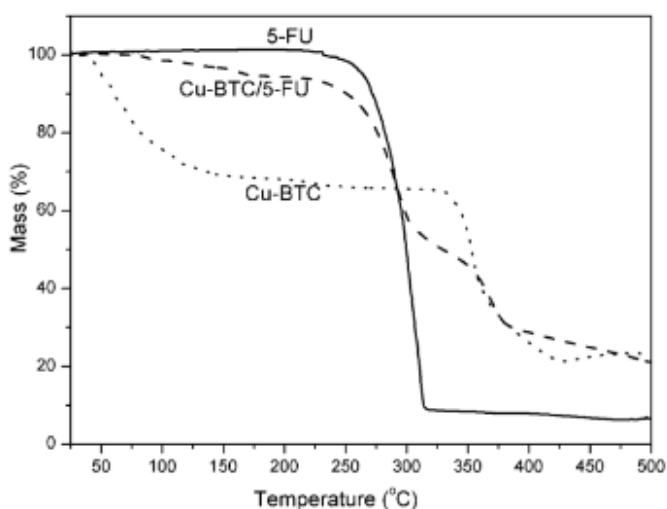
TG curves shows that the initial thermal event observed for the original MOF is absent which suggests that the non-coordinated water molecules originally present in the pores are probably replaced for 5-FU molecules during the association process [11]. This is also consistent with observations made from FTIR analysis. A very small mass loss is observed at 163 °C, which can be related to trace residual non-coordinated water molecules, followed by a significant loss at 286 and 294 °C.

The last event is probably related to decomposition of 5-FU and considering that the peak is broad and shows two unresolved minima, it suggests two structural situations for this molecule (see DSC discussion). Another mass loss is observed at 370 °C due to the decomposition of the MOF. Both the decomposition of the host and of the guest are shifted in comparison with the free samples.

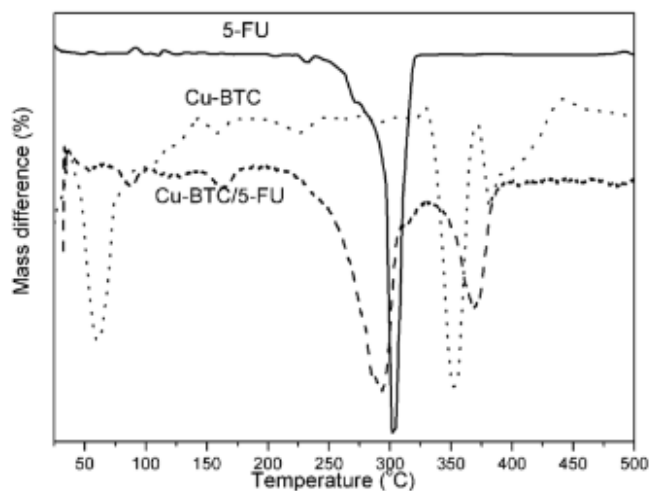
From DSC curve for Cu-BTC/5-FU (see figure 2) we can observe the presence of several endothermic events (108, 177, 233, 279 °C) along with an exothermic event at 352 °C. The sharp endothermic event at 279 °C (drug melting) suggests that despite a careful isolation procedure, some 5-FU crystals may have remained some free molecules (possibly physical adsorbed) in Cu-BTC/5-FU sample.

Although previous works with other MOFs having larger pores suggested that several molecules could occupy the pores and the surface area. Thus we propose here that our sample contains a slight fraction of 5-FU crystals,

probably as a result of the equilibrium between the free and associated species which makes difficult a complete purification. Despite this, it is clear that drug association with the metal organic framework (Cu-BTC) occurs to a great extent as can be inferred from significant changes in the DSC curve, in special in the interval of water release and MOF decomposition.



(A)



(B)

Figure 3: Thermal analysis curves TG (A) and DTG (B) for 5-FU; Cu-BTC and Cu-BTC/5-FU.

The adsorption process results from the interaction between the guest molecule and the adsorbent material, in our case, the Cu-BTC and 5-FU. Those interactions, in general, are very weak (physisorption), but, in some cases, the host-guest interactions affinity is strong and due the chemisorption and structural changes may occur. In this perspective, the X-ray powder diffraction becomes a powerful tool to investigate those crystalline transformations.

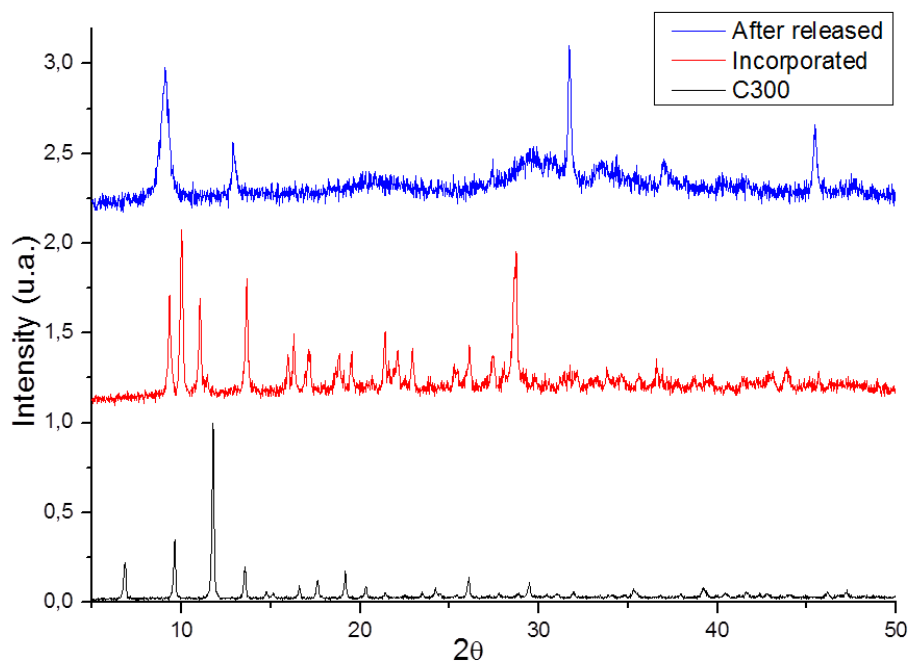
The Figure 4 (in black) shows the experimental powder pattern of the Cu-BTC used in the 5-FU incorporation. This diffractogram, as expected, shows all peaks corresponding to the $[\text{Cu}_2(\text{BTC})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ structure (cubic, space group Fm-3m) synthesized by Williams and co-workers [12]. The most intense peaks are located in 11.6° , 9.5° and 6.7° related to the [222], [220] and [200] diffraction plans, respectively.

After the drug incorporation, the samples was collected the powder pattern, and the result (Figure 4, in red) shows different diffraction peaks regarding to the Cu-BTC. Although the sample still has strong crystalline character, this result suggests that there was a structural change in the Cu-BTC during the incorporation process, probably due to the supramolecular interactions between the drug and the MOF.

The drug incorporation is confirmed by the intense signal located in 28.8° , related to the [220] diffraction plane of the 5-FU, in agreement with the literature [13, 14]. This observation is in good agreement with IR-spectroscopy, TGA and elementary analysis results.

After the dissolution test, the incorporated 5-FU was released and, again, was collected the powder pattern, shown in the Figure 4 (in blue). As expected,

was not observed the diffraction peak of the drug, which is in good agreement with the dissolution test results, and once again, was detected structural changes in the Cu-BTC, experiencing a slight amorphization in the



structure.

Figure 4: Powder pattern XDR (black- C300) – Cu-BTC MOF; (red- incorporated) – Cu-BTC/5-FU and (blue- after release) – sample after dissolution test.

The release profile was conducted in order to ascertain whether the drug is output from the system in the physiological environment. The experiment demonstrated during the prolonged drug release 48 hours. Initially, 39.4% of the drug was released from the MOF in the first 30 minutes, this can be attributed to the drug in its free form as indicated in DSC curve. Then, the release proceeded more slowly being released about 60% in 15 hours of study, the dissolution reached 82.0% at 48 hours.

The release of 5-FU "in vitro", found in our system resembles the one extended release "in vivo", which are offered two doses of the drug (Figure 5). The first, called immediate-release initial dose required to produce the desired pharmacological effect without causing damage to the body. The second, called maintenance dose is released gradually, in order to prolong the extent of pharmacological response¹⁵

Graphic 1. Dissolution profile of 5-fluorouracil from Cu-BTC MOF

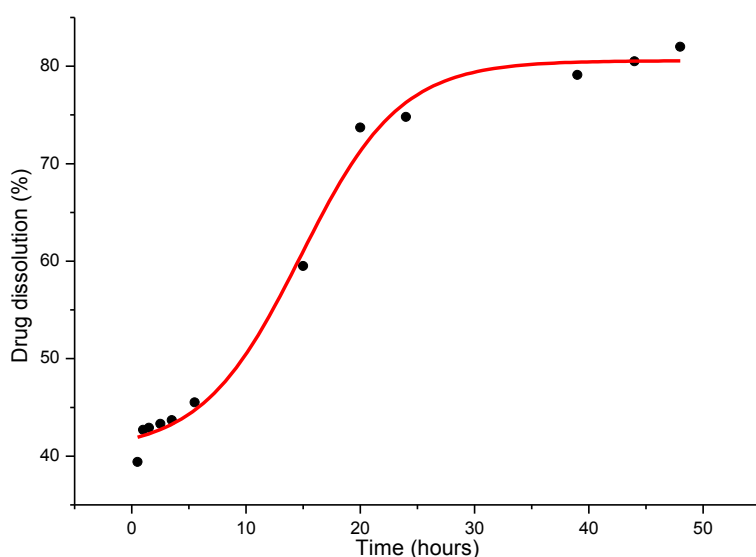


Table 2 shows the IC₅₀ values for inhibition of cellular activity of at least 70%. We observed that 5-fluorouracil exhibited cytotoxic activity against MCF-7 and HL-60 cells. The IC₅₀ value for the MCF-7 cells was very low (1.735 µg/mL) when the drug was associated with the MOF, this can be attributed to prolonged drug release as indicated in dissolution study, allowing the maintenance of the biological effect, since the active principle of the drug being released slowly and continues.

The same was true for the HL-60 cells. The IC₅₀ values decreased significantly when the drug was associated with the network, suggesting that the association between the 5-fluorouracil and the Cu-BTC MOF are responsible by the modulation of the cytotoxic activity of the drug (see table 2).

Table 2. IC₅₀ (µg/mL) compared to the human tumor lines.

Cell Line	CU-BTC	5-FU	Cu-BTC/5-FU
MCF-7	3.49*	20	1.735**
HT-29	> 25	> 25	> 25
HL-60	> 25	8.601	4.615
NCI-H292	> 25	> 25	> 25

** Very toxic * Toxic

2. Conclusions

All characterization and the dissolution tests techniques evidenced that the drug has been associated with the metal organic framework Cu-BTC forming an incorporation system. Despite the presence of the drug in the pores of the coordination network have produced changes in its structure it became clear that there was a controlled release of the same as shown in dissolution study.

The technology of controlled release of drugs represents one of the frontiers of science, which involves different aspects multidisciplinary and can contribute greatly to the advancement of human health. Delivery systems, often described as "drug delivery systems", offer numerous advantages when compared to other conventional dosage. In fact, numerous studies in the

literature provide evidence of the following: greater therapeutic efficacy, with gradual and controlled release of the drug from the matrix degradation, significant decrease toxicity and increased length of stay in the circulation, nature and composition of vehicles varied and, contrary to what one might expect, there was a predominance of instability and decomposition mechanisms of drug (bio premature inactivation).

The coordination network was considered nontoxic against most cell lines used (Cu-BTC was toxic against MCF-7 cells) The system Cu-BTC/ 5-Fu were extremely cytotoxic against the human breast cancer cell line MCF-7 and against human acute promyelocytic leukemia cells (HL60).

This improvement of cytotoxic activity and the slow liberation of the drug from the Cu-BTC network suggests that the association of the 5-Fluorouracil with the Cu-BTC metal organic framework modulates the cytotoxic activity of the drug. Additional studies are needed to understanding of the mechanisms involved in this modulation, seeking post-synthetic modifications that may result in specificity for these systems.

Acknowledgements

We appreciate the financial support from the Brazilian agencies, institutes and networks: CNPq, CAPES, FAPITEC-SE, INAMI and RENAMI. We are also grateful to CENAPAD (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho), at Campinas, Brazil.

REFERENCES

- [5] M. Ferrari, *Nature Review*, 2005, **5**, 161-171.

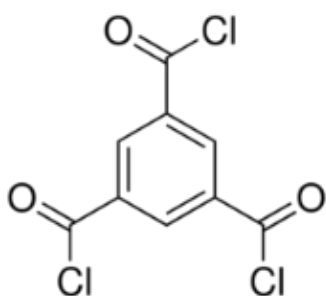
- [6] J. Roswell, O.M. Yaghi, *Micro and Mesoporous Mater.*, 2004, **73**, **3**, 3-14.
- [7] G. Férey, *Chem. Soc. Rev.* 2008, **37**(1), 191-241.
- [8] P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P.K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Férey, R.E. Morris, C. Serre, *Chem. Rev.* 2012, **112**(2) 1232-1268.
- [9] K. M. L. Taylor-Pashow, J. Della-Rocca, Z. Xie, S. Tran, W. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 14261-14263.
- [10] K. Umemura, S. Kitagawa, M. Kondo, K. Fukui, R. Kitaura, I. C. Chang, T. Mizutani, *Chemistry- A European Journal*. 2002, **8**, 3586-3600.
- [11] P. Horcajada, C. Serre, G. Maurin, N. A. Ramsahye, F. Balas, M. Vallet-Regí, M. Sebban, F. Taulelle, G. Férey *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**, 6774-6780.
- [12] P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J.F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J.-S. Chang, Y.K. Hwang, V. Marsaud, P.-N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Férey, P. Couvreur, R. Gref *Nature Materials*, 2010, **9**, 172-178.
- [13] N.H. Geran, M. Greenberg, M. M. Macdonalda, A. M. Schumacher, B. J. Abbott. *Cancer Chemical Report* 1972, **3**, 1-88.
- [14] R.M. Silverstein; G.C. Bassler; T.C. Morrill. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. xiv, 490 p. ISBN 8521615213 (broch.).
- [15] S.Y Stephen Chui, M.F. Samuel; LO, Jonathan P.H Charmant, A. Guy Orpen, Ian D. Williams, *Scienc*, 1999, **283**, 1148- 1150.
- [16] S. S-Y .Chui; Lo, S. M-F., Charmant, J. P. H., Orpen, A. G., Williams, I. D. *Science*, 1999, **26**, 1148-1150.
- [17] S.C. Dhawale; A.S. Bankar; M.N. Patro. *International Journal of Pharm Tech Research*, 2010, **2**, 1112-1118.

[18] K.N. Jarzemska; M. Rubsik; R. Kaminski; K. Wozniak; P.M. Dominiak
Crystal Growth & Design, 2012, **12**, 2508-2524.

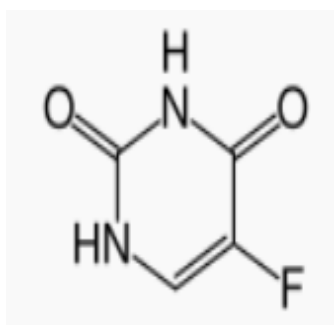
[19] H.C. Ansel; L.V. Allen-Jr; N.G. Popovich. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

SUPLEMATARY MATERIAL II

COMPOUNDS CHEMICAL STRUCTURES USED IN THIS EXPERIMENTAL STUDY



Trimesic acid – organic binder Cu-BTC-MOF constituent



5-Fluorouracil – chemical structure

ARTIGO II

Acute toxicity and histopathological analyses of 5-fluorouracil incorporated in the Cu-BTC metal organic framework

Flávia R. S. Lucena^{1}, Eduardo H. da Silva², Paloma L. de Medeiros³, Silene
C. Nascimento¹*

¹Culture Cells Laboratory. Federal University of Pernambuco. 50670-901
Recife PE. Brazil.

²Bioassays for Research and Development of Drugs Laboratory Federal
University of Pernambuco. 50670-901 Recife PE. Brazil.

³Tissue Culture Laboratory - Federal University of Pernambuco. 50670-901
Recife PE. Brazil.

Acute toxicity and histopathological analyses of 5-fluorouracil incorporated in the Cu-BTC metal organic framework

Flávia R. S. Lucena^{1*}, Eduardo H. da Silva², Paloma L. de Medeiros³, Silene C. Nascimento¹

¹Culture Cells Laboratory. Federal University of Pernambuco. 50670-901 Recife PE. Brazil.

² Bioassays for Research and Development of Drugs Laboratory Federal University of Pernambuco. 50670-901 Recife PE. Brazil.

³ Tissue Culture Laboratory - Federal University of Pernambuco. 50670-901 Recife PE. Brazil.

ABSTRACT

The determination of LD50 of the drug 5-Fluorouracil (5-FU) incorporated into the metal organic framework Cu-BTC MOF was determined and histopathological studies were conducted using doses of 325 and 750 mg/kg. The results indicated that there was a significant reduction of LD50 of the drug incorporated in the network in relation to the drug solution. No alterations were observed in organ weights or in the photomicrographs of animals belonging to the group treated with 325mg/kg of the system Cu-BTC MOF + 5-FU. The LD50 for the system 5-FU + Cu-BTC MOF was determined at 750 mg/kg.

Key Words: Cu-BTC MOF, 5-Fluorouracil, toxicity

*Correspondence author: Flávia Raquel Santos Lucena. *E-mail address:* flavia_19lucena@yahoo.com.br

Introduction

In the field of nanotechnology systems for drug delivery were initially developed in the mid-70s in order to carry substances in organisms, tissues or even cells, to improve the therapeutic efficacy and decrease the toxic effect of these drugs^{1,2}. In order to increase the uptake by the tumor and improve the transport of the drug strategies for the specific location, Kumar et al (2000), reported on their review studies about development of methods to reduce the uptake of biodegradable polymer nanoparticles by cells of the endotelial reticular system³. In the last four decades, the technology of controlled release polymer had an impact on different areas of medicine with different products already present in medical practice⁴.

Among the nanostructures used due to its various functions are the Metal Organic Frameworks or MOFs are crystalline structures consisting of metal ions or clusters coordinated by organic molecules, often rigid structures to form one, two or three-dimensional porous. Among its uses are the storage of gases, used as sensors, catalysis and more recently as carriers of drugs and imaging agents for many of them targeting tumor cells, new therapies against cancer⁵. The first example considered was the model that involves the adsorption of ibuprofen into the cavities of MOF MIL-100 and MIL-101 (MIL= Material Institut Lavoisier). The systems exhibited a high storage of capacity up to 1.4 g drug per gram of porous solid and a controlled release of the drug in physiological conditions, around 3 to 6 days⁶

Horcajada et al (2010) have synthesized a variety of purposes-carrying nanocarriers drugs and imaging agents. This group has some MOFs

synthesized in aqueous and ethanol extracts, biologically and environmentally non-toxic, among these are the MOFs (MIL-53, MIL-88 A, MIL-88Bt, MIL-89, MIL-100 e MIL-101_NH₂). These MOFs were analyzed in relation to their biocompatibility, degradation profile, and properties of image. The efficiency of these MOFs as carriers of drugs was tested using antiviral and antitumor drugs: bulsufan (BU), trisofato of azidothymidine (AZT-TP), cidovir (CDV) and doxorubicin (DOXO).

Busulfan (BU) antitumour drug used for cancers such as leukemia and myeloma into the MIL-100 MOF was considered extremely high since incorporation of the same was 5X higher than the best polymer tested and 60x higher than the liposome^{8,9}.

In our study we used the antitumour drug 5- fluorouracil (5-FU) that is one of the major anticancer agents used clinically for the treatment of stomach, colorectal, head, and neck cancers: 5-FU is poorly selective toward tumor, so its therapy causes high incidences of toxicity in the bone marrow, gastrointestinal tract, central nerve system and skin¹⁰. To optimize the efficacy of 5-FU, it is often administrated by continuous infusion as well as in combination with other cytotoxic with biochemical modulations^{11,12}. Our study aimed to evaluate the possible improvement of 5-FU toxicity and it's therapeutic effects after the incorporation of the drug in the Cu-BTC metal-organic framework.

2. Materials and Methods

2.1 5-fluorouracil incorporation

For this study we used the drug-carrier system (MOF Cu-BTC + 5 - Fluorouracil) where in each 1g of MOF contained 0.82 g of drug. All studies on the chemical characterization of the material were carried out in the Chemical Department of Pernambuco Federal University, as described in another study conducted by our group (see supplementary material).

2.2 Animals used in the pharmacological tests:

Swiss albino female mice (*Mus musculus*) were used, weighing between 30-35 grams, with an average age of two months. The animals were monitored according to the norms of the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and separated into batches of six animals each. The experiments were conducted according to the National Cancer Institute protocol¹³ and approved by the UFPE- Animal Experimentation Ethic Committee: 23076.024149/2012-48.

2.3 Toxicity verification and DL50 determination

LD50 was determined by using used the formula $DL50 = DF - E(a.b)/n$ ^{14,15} where:

DF- minimum dose capable of killing all animals;

a- Difference between the two consecutive doses administered;

b- Average of died animals between two consecutive doses;

n- number of mice per lot.

The initial dose of 325mg/kg was tested using a factor of 1.2 until the dose of 2000mg/kg. Sample containing MOF 5-FU/Cu-BTC was diluted in water and administered to animals orally. The animals were observed for 1 hour uninterrupted, where was observed and recorded the signs and toxicity displayed by these animals.

We counted the number of deaths in 48 hours and the weight variation of animals followed for 14 days. On the 15th day the organs (liver, kidneys and spleen) of the surviving animals were taken to the histopathological analysis. The control group received a saline solution (0.1mL/10g) of bode weight.

2.4 Histopathological Analysis

Tissues samples (liver, spleen and kidney) were removed and were fixed immediately in 10% neutral-buffered formalin. They were processed in 5µm thick paraffin blocks, sectioned and stained with mayer's hematoxylin and eosin. The microscopy analysis was performed with video microscope system (MOTIC BA200 microscope, MOTIC video-camera)¹⁶.

2.5 Statistical Analysis

The results are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Data were analyzed using the software graph pad prism v. 5.0. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test were used to evaluate the differences among the treatments. $P < 0.05$ values were considered statistically significant.

3 Results and Discussion

3.1 Toxicity acute and LD 50 determination

The LD50 was determined in 750mg/kg and the signs of toxicity presented by animals were: piloerection, writhing and intense agitation. In relation to body weight of the animals received doses of 325 mg/kg and 750mg/kg was found that there was no significant difference between treated groups compared to control group. But when considering the organs weight, it was found significant differences when comparing the liver and the kidneys of treated animals when compared to the animals of control group (table 1). These differences of the organs weights between groups corroborate the results observed in the photo-micrographs of the histopathological study, which also demonstrated structural changes to these organs after the treatment with 750mg/kg doses.

Table 1: Body and organs weight of animals subjected to acute toxicity

Results (mean $\pm$ SD)	Control (g)	Treated*(g)	Treated**(g)
Body weight (g)	38.96 $\pm$ 2.03	35.18 $\pm$ 2.74	32.15 $\pm$ 2.75
Organs weight (g)			
Liver	2.27 $\pm$ 0.15	1.67 [#] $\pm$ 0.28	1.67 [#] $\pm$ 0.11
Spleen	0.24 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.01
Kidneys	0.27 $\pm$ 0.02	0.19 [#] $\pm$ 0.09	0.19 [#] $\pm$ 0.01

*dose 325mg/kg ** dose 750mg/kg

statistically significant difference compared to control (p<0,05).

These results indicate that the metal organic framework could be acted like a system for controlled of drug, modulating the drug toxicity and improving its bioavailability, reducing their systemic toxicity when compared to the drug solution. The slow release of the drug from the Cu-BTC MOF may be one mechanism related with the reduction of the toxicity of this drug since during the incorporation process of the drug may have occurred formation of hydrogen bond between the carrier structure and the group fluoride of 5-FU molecule (see supplementary information).

Similar results regarding the reduction of toxicity of 5-fluorouracil were observed when 5-fluorouracil was encapsulated into the microspheres to verify the pharmacological effect of the drug in relation to the treatment of peritoneal carcinomatosis in mice. The authors achieved an improved LD50 incorporating the drug into microspheres. The LD50 was around 535 mg/kg when compared to the LD50 of drug solution (241 mg/kg).¹⁷ In our study was found a significant further improvement when the drug incorporated into the coordination network (750 mg/kg).

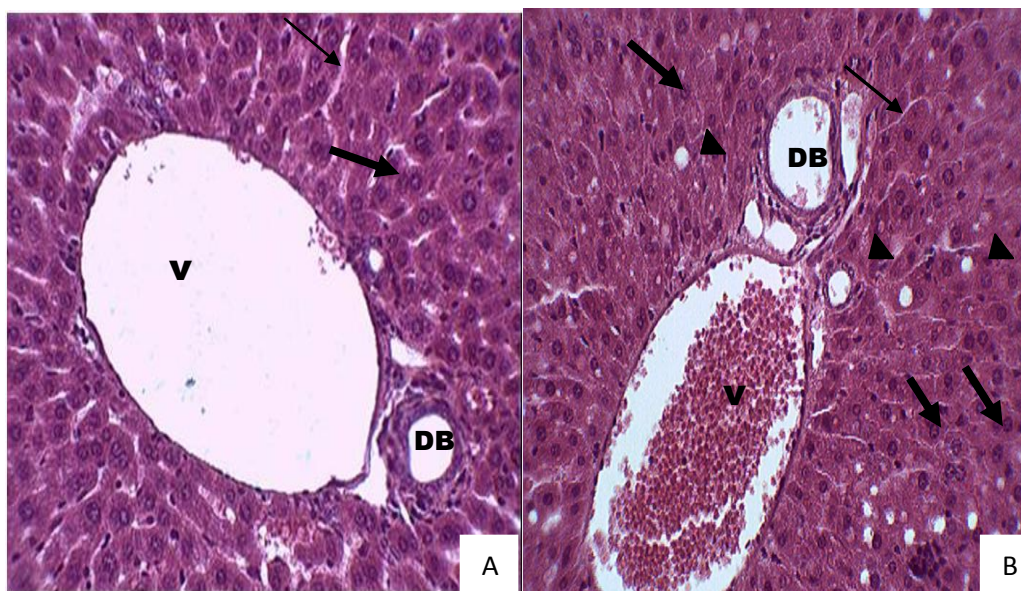
3.3 Histopathological analysis

Liver and spleen photo-micrographs to control group and the treated group (325 mg/kg) showed no significant differences between the groups. In both groups there was preservation of structures visualized without changes.

When considering the dose of 750mg/kg (figure 1B) was verified the presence of cytoplasmatic vacuoles in liver parenchyma in relation to control

group (figure 1A), which is in agreement with the results In relation to the body weight difference when compared treated with control group (table 1).

Figure 1



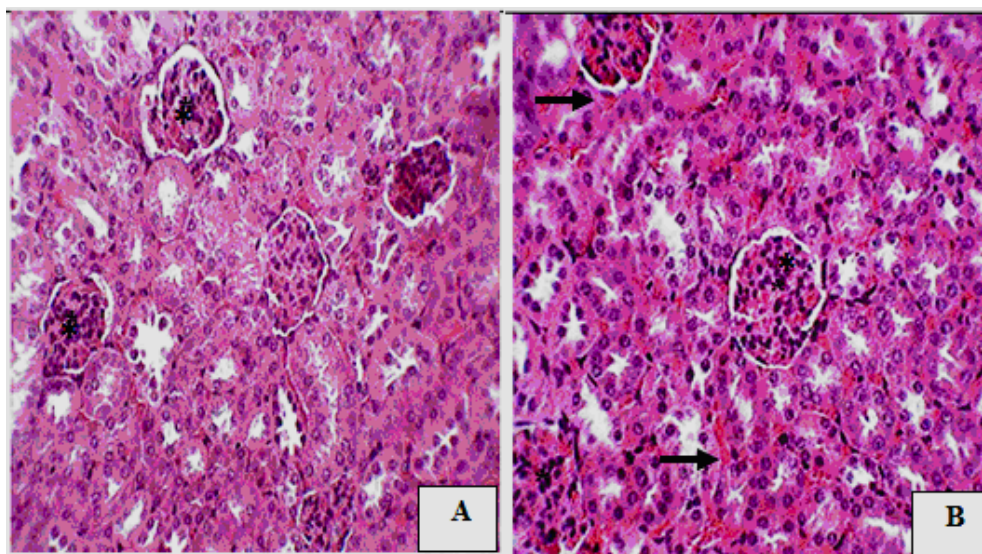
Liver photomicrography control group (saline): **A)** central vein (**v**), hepatocytes preserved (middle **arrow**) and capillary sinusoids (**thin arrow**) preserved. Bile duct (**DB**) no change. **B)** Liver photomicrography treated group (750mg/Kg Cu-BTC/5-FU): central vein (**v**), bile duct (**BD**) and sinusoids capillary (**thin arrow**) no changes. Vacuolated evident in the hepatic parenchyma (**arrow heads**) H.E.: 400X.

In the Kidneys was observed a reduction in the subcapsular space of some glomeruli at a dose of 325mg/kg compared to the control, which also is in agreement with the (table 1) also evidenced a significant difference in the weight of kidneys in the control group compared to animals of treated groups.

Considering the dose of 750mg/kg (figure 2 B) it was found that besides reducing the subcapsular space of the kidneys glomeruli, blood congestion was evident between the tubules in relation to control group

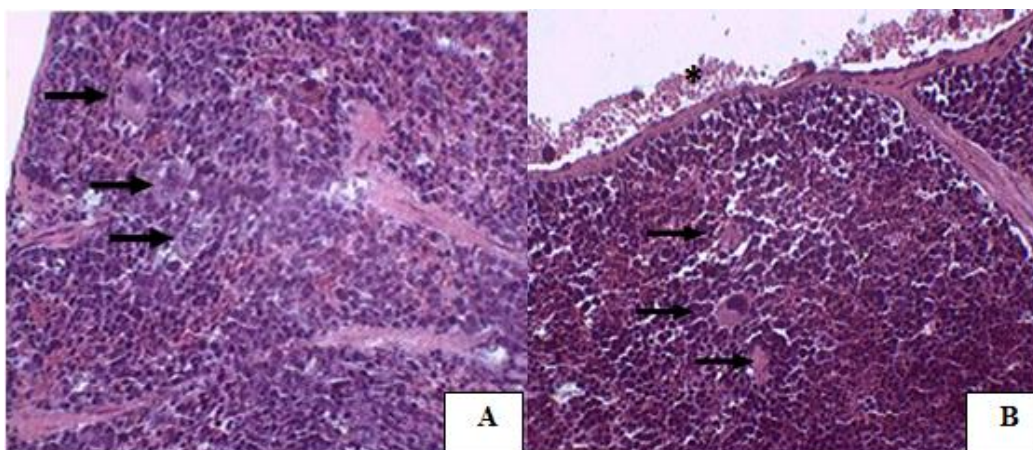
(figure 2 A) The spleen showed a significant increase of the lymph nodes, and also verified the presence of per capsular inflammatory infiltrates (figure 3 B) in relation to control group (figure 3 A), corroborating the results described above in relation to the toxicity of this doses.

Figure 2



Kidney photomicrograph control group (Saline) **A)** cortical region, the presence of renal glomeruli with preserved subcapsular spaces (**asterisk**). **B)** Kidney photomicrograph treated group (750mg/kg Cu-BTC/5-FU): Reduction of subcapsular glomeruli spaces (**asterisk**). Blood congestion between the tubules (**arrow**) (400X) H.E.

Figure 3



Spleen photomicrograph control group (Saline) **A)** apparently preserved spleen showing giant cells (**arrow**). Spleen photomicrograph treated group (750mg/kg Cu-BTC/5-FU) **B)** presence of giant cells (**arrow**) and clear leukocyte infiltrate (**asterisk**). 400x. H.E.

4. Conclusions

The nanoencapsulation is an important field for developing new formulations, since it allows, in a rational and effective to increase the therapeutic effectiveness of substances already used in the treatment of variety of diseases in addition makes possible the use of drugs potentially toxic, as is the case of many antineoplastic¹⁸

5-FU is one of the most efficacious anti-cancer drugs against many cancers, however intraperitoneal 5-FU is readily absorbed into the systemic circulation, causing a rather steep decline in its concentration in the tissues and the further doses are required to maintain the effect which contributes to increasing its systemic toxicity¹⁹

These results indicated that Cu-BTC MOF is a good alternative like a new drug carrier because was observed a relevant reduction of 5-Fluorouracil (5-FU) toxicity when compared to the toxicity of the drug in solution, these results are according to the literature which showed a reduction in toxicity when the drug is encapsulated in carrier structures, small particles, such as microspheres¹⁸

Comparing with the literature our studies demonstrated that DL50 of 5-Fu associated with Cu-BTC MOF (750mg/kg) reduced by almost three times the DL50 value found for 5-FU in solution (241mg/kg) and reduced by two times the

LD50 determined by Hagiwara et al (1996) (535mg/kg), without causing severe damage as demonstrated in photomicrographs where changes were not seen in the organs when was used the dose of 325 mg/kg body weight¹⁷

Nanoparticles are gradually absorbed selectively through milky spots, which are a kind of lymphatic apparatus located on the peritoneal surface. It means that intraperitoneal microspheres and other particles like metal organic frameworks containing anti-cancer drug can target the malignant cells and presenting a lower systemic toxicity.

Another study realized by our group demonstrated that the drug showed a controlled release from this nanocarrier (Cu-BTC MOF), where 82% of the drug was released within 48 hours of the experiment, these results are consistent with the decrease of the toxicity because the slow release of drugs can act by modulating the toxicity of the drug since this allows the user maintenance delayed release of the therapeutic effect without exposing the body to new dosages of the drug at a much reduced time¹⁷⁻¹⁹.

These results indicate that metal organic framework Cu-BTC MOF acted as an efficient nanocarrier of 5-fluorouracil decreasing the systemic toxicity of the drug used in our studies.

5. References

1. MONTASSER I., BRIANÁON S., LIETO J., FESSI H. J. *Pharm Belgique*, v. 55, p. 155-167, 2000.
2. FATTAL E., VAUTHIER C. *Encyclopedia of Pharmac. Technol.*, p.1864-1881, 2002.

3. KUMAR M.N.V.R. *J. of Pharm. Pharmaceut. Science*, v. 3, n.2, p. 234-258, 2000.
4. FAROKHZAD O.C., LANGER R. *Advanc. Drug Del. Rev.*, v. 58, n. 14, p.1456-1459, 2006.
5. FÉREY, G. *Chem. Soc. Rev.* n.37, v.1, p. 191-241, 2008.
6. HORCAJADA, P., SERRE, C., VALLET-REGI, M., SEBBAN, M., TAULELLE, F., FÉREY. *Angewandete Chem. Intern. Ed.* v.118, n. 36, p. 6120-6124-, 2006.
7. HORCAJADA, P., CHALATI, T., SERRE, C. GILLET, B., SEBRIE, C., BAATI, T., EUBANK, J.F., HEURTAUX, D., CLAYETTE, P., KREUZ, C., CHANG, J-S., HWANG, Y. K., MARSAUD, V., BORIES, P-N., CYNOBER, L., GIL, G., FÉREY, G., COUVREUR, P., GREF, R. *Nature Mat.* v.9, p.172-178, 2010.
8. SLATTERY, J.T., SANDERS, J.E., BUCKNER, C.D., SCHAFFER, R.L., LAMBERT, K.W., LANGER, F.P., ANASETTI, C., BENSINGER, W.I., FISHER, L.D., APPELBAUM, F.R., HANSEN, J.A. *Bone Marrow Transp.* v.16, p.31- 42, 1995.
9. HASSAN, Z., NILSSON, C., HASSAN, M. Liposomal busulphan: Bioavailability and effect on bone marrow in mice. *Bone Marrow Transplantation.* v.22, p. 913-918, 1998.
10. CAMPOS, J.; DOMÍNGUEZ, J. F.; GALLO, M. A.; ESPINOSA, A. *Curr. Pharm. Des.* v. 6, p. 1797, 2000.
11. LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. *Nat. Rev. Cancer*, v.3, p. 331, 2003.
12. PETERS, G. J.; VAN DER WILT, C. L.; VAN MOORSEL, C. J. A.; KROEP, J. R.; BERGMAN, A. M.; ACKLAND, S. P.; *Pharmacol. Ther.* v. 87, p.227, 2000.
13. GERAN, R. I.; GREENBERG, N.H.; MACDOLNARD, M.M.; SCHUMACHER, A.M.; ABBOTT, B.J.; *Cancer. Chemother.* v3, 1972.

14. KARBER, G.; BEHRENS, B. 1.ed. London: Griffin Ch. An C, 1964.
15. BERLION, M. Tese de Doutorado. Grenoble, Universite, p. 323, 1988.
16. KIERNAN J. 3ª Ed. Londres: Hodder Arnold. p.160, 2005.
17. HAGIWARA, A.; TAKAHASHI, T.; SAWAI, K,.; SAKAKURA, C.; TSUJIMOTO, H.; IMANISHI, T.; OHGAKI, M.; YAMAZAKI, J.; MURANISHI, S.; YAMAMOTO, A.; FUJITA, T. *Br J Cancer*. v.74 n.9 p.1392-6,1996.
18. MU, L., FENG, S.S., *J. of cont. rel.* v.86, p.33-48, 2003.
19. SPEYER, J.L; SUGARBAKER, P.H; COLLINS, J.M; DEDRICK, R.L; KLECKER, R.W.Jr.; MYERS ,C.E. *Cancer res*, v.41, n.5, p.1916-1922, 1981.

**Acute toxicity and histopathological analyses of 5-fluorouracil
incorporated in the Cu-BTC metal organic framework**

Flávia R. S. Lucena^{1}, Eduardo H. da Silva², Paloma L. de Medeiros³,
Fausthon Fred da Silva⁴, Silene C. Nascimento¹*

Supplementary Information

Table 1. CNHS Elementar analysis.

Sample	%N	%C	%H	%S
THEORETICAL				
(Cu-BTC)	0.0	25.8	4.3	0.0
(CuBTC/5-FU)	2.4	30.2	3.0	0.0
EXPERIMENTAL				
(Cu-BTC . 12 H ₂ O)	0.0	26.3	3.7	0.0
(Cu-BTC . 6H ₂ O + 0.82 5-FU)	2.5	30.7	2.8	0.0
CU-BTC – C ₁₈ H ₆ Cu ₃ O ₁₂ / 5-FU- C ₉ H ₃ FN ₂ O ₂				

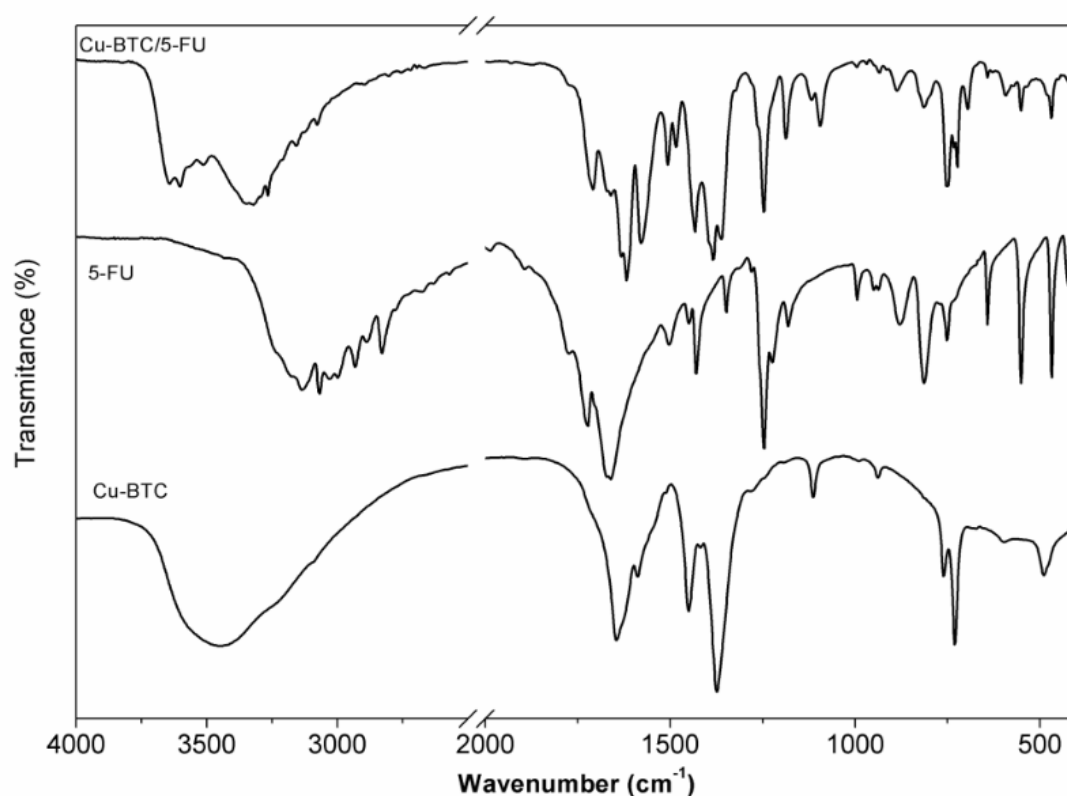


Figure 1: FTIR spectra of Cu-BTC MOF

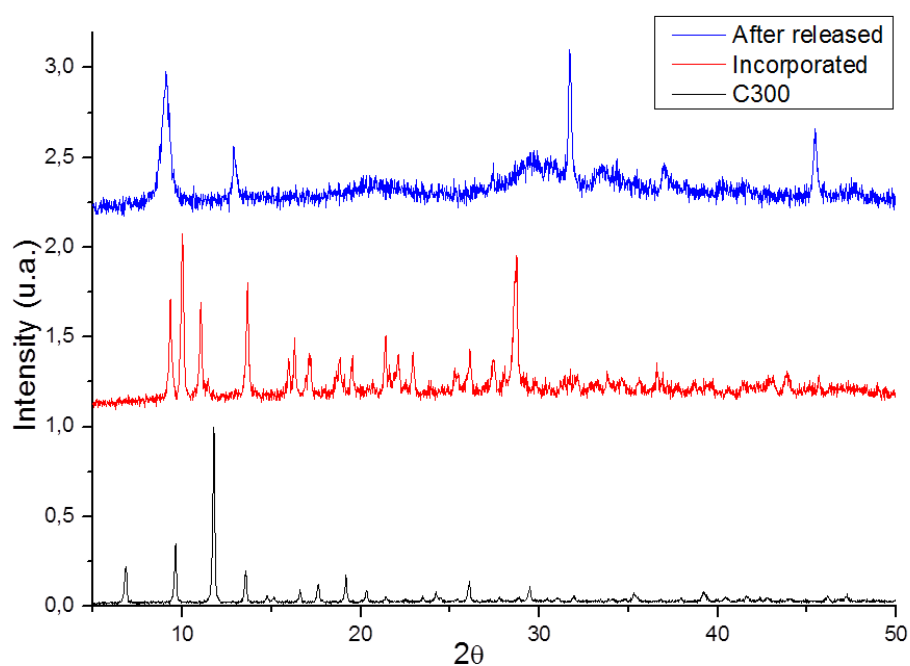


Figure 4: Powder pattern XDR (black- C300) – Cu-BTC MOF; (red- incorporated) – Cu-BTC/5-FU and (blue- after release) – sample after dissolution test.

ARTIGO III

Induction of Cell Death by Apoptosis and Anti-Inflammatory Activity of 5-Fluorouracil Incorporated into the Metal Organic Framework Cu-BTC

Flávia R. S. Lucena^{1}, Larissa C.C. de Araújo¹, Maria do D. Rodrigues¹,
Teresinha G. Silva¹, Valéria Rêgo A. Pereira², Gardênia Carmen G. Militão³,
Silene C. Nascimento¹*

¹Antibiotics Department - Federal University of Pernambuco. 50670-901
Recife- PE. Brazil.

²Immunology Department - Federal University of Pernambuco. 50670-901
Recife- PE. Brazil.

³Physiology and Pharmacology Department- Federal University of
Pernambuco- 50670-901 Recife- PE. Brazil.

**Induction of Cell Death by Apoptosis and Anti-Inflammatory Activity of 5-
Fluorouracil Incorporated into the Metal Organic Framework Cu-BTC**

Flávia R. S. Lucena^{1}, Larissa C.C. de Araújo¹, Maria do D. Rodrigues¹, Teresinha G. Silva¹, Valéria Rêgo A. Pereira², Gardênia Carmen G. Militão³, Silene C. Nascimento¹*

¹Antibiotics Department - Federal University of Pernambuco. 50670-901 Recife- PE. Brazil.

²Immunology Department - Federal University of Pernambuco. 50670-901 Recife- PE. Brazil.

³Physiology and Pharmacology Department- Federal University of Pernambuco- 50670-901 Recife- PE. Brazil.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the mechanism associated with cytotoxic activity displayed by the drug 5-Fluorouracil incorporated and Cu-BTC MOF. Studies realized by our group have demonstrated great advantages in using this systems. Flow cytometry was done to indicated that apoptosis is the mechanism responsible for the cell death. Also, the anti-inflammatory activity was evaluated by the peritonitis testing and the production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines was measured. The results indicated that the drug incorporated in Cu-BTC MOF decreased significantly the number of leukocytes in the peritoneal cavity of rodents as well as reduced levels of cytokines and nitric oxide production. These results suggest that 5-Fluorouracil incorporated in Cu-BTC MOF promotes tumor cell death by apoptosis and has anti-inflammatory activity associated, which is extremely important in antitumor therapies.

Key Words: Cu-BTC MOF, 5-Fluorouracil, apoptosis, anti-inflammatory and citotoxyc activities.

*Correspondence author: Flávia Raquel Santos Lucena. *E-mail address:* flavia_19lucena@yahoo.com.br

1. Introduction

5-Fluorouracil (5-FU) a pyrimidine analog, is one of the broad spectrum anticancer drugs¹⁻³ used in the treatment of malignancies like glioblastoma⁴ and breast cancer⁵ Since 5-FU interferes with DNA synthesis, it principally acts as a thymidylate synthase inhibitor.^{6,7} However, short half-life, wide distribution, and various side effects⁸⁻¹⁰ limit its medical applicability. To overcome the above mentioned limitations, an ample number of studies has been carried out on sustained drug delivery systems for 5-fluorouracil.

Rahman et al (2006) prepared and evaluate the colon-specific microspheres of 5-fluorouracil for the treatment of colon cancer. The authors observed that the results clearly indicate that there is great potential in delivery of 5-FU to the colonic region as an alternative to the conventional dosage form¹¹

Lekha Nair et al (2011) studied the Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid). 5-FU-entrapped PLGA 50-50 nanoparticles showed smaller size with a high encapsulation efficiency of 66%. Nanoparticles with PLGA 50-50 combination exhibited better cytotoxicity than free drug in a dose-time-dependent manner against both the tumor cell lines¹².

Horcajada et al (2010) reported the efficiency of these MOFs (Metal Organic Framework) as carriers of drugs was tested using antiviral and antitumor drugs: bulsufan (BU), trisofato of azidothymidine (AZT-TP), cidovir (CDV) and doxorubicin (DOXO). According to Horcajada et al (2010) the incorporation of (BU), antitumour drug used for cancers such as leukemia and myeloma into the

MIL-100 MOF was considered extremely high since incorporation of the same was 5X higher than the best polymer tested and 60 x higher than the liposome¹³

Extensive research within the last two decades has revealed that most chronic illnesses, including cancer, diabetes, and cardiovascular and pulmonary diseases, are mediated through chronic inflammation. Thus, suppressing chronic inflammation has the potential to delay, prevent, and even treat various chronic diseases, including cancer, several drugs including: dexamethasone and doxorubicin have been packaged as nanoparticles and proven to be useful in “nano-chemoprevention” and “nano-chemotherapy”^{13,14}

Given this perspective our group has been checking out the advantages gained by drugs known in the literature in relation to their therapeutic effects when incorporated in these nanocarriers. Recent studies realized by our group showed 5-Fluorouracil incorporated into the Cu-BTC MOF had an excellent rate of incorporation of the drug 0.82g of drug per 1 g of MOF. This system showed an excellent cytotoxic activity against human cancer cell lines, breast cancer cells (MCF-7) and promyelocytic leukemia cancer cells (HL-60). Regarding the profile of drug release *in vitro* result reported a slow and gradual release of the drug, 82% of drug in 48 hours of observation (supplementary material)

Another study by our group showed a significant reduction of *in vivo* toxicity of the drug 5-Fluorouracil incorporated into Cu-BTC MOF compared to the drug in solution (supplementary material), similar results were observed in literature¹⁵

Thus in this perspectives this study aimed to evaluate the action mechanism associated with the antitumor activity of the 5-Fluorouracil

incorporated into Cu-BTC and a possible anti-inflammatory activity, since studies in the literature show a close relationship between inflammation and the appearance of new cancers.

2. Materials and Methods

2.1 System Drug-MOF used

For this study we used the drug-carrier system (MOF Cu-BTC + 5 - Fluorouracil) where in each 1g of MOF contained 0.82 g of drug. All studies on the chemical characterization of the material were carried out in the Chemical Department of Pernambuco Federal University as described in an article published by (supplementary material).

2.2 Animals used in the pharmacological tests

For the tests, swiss albino female mice (*Mus musculus*) were used, weighing between 30-35 grams, with an average age of two months. The animals were monitored according to the norms of the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The experiments were conducted according to the National Cancer Institute protocol¹⁶ and approved by the UFPE- Animal Experimentation Ethic Committee: 23076.024149/2012-48.

2.3 Apoptosis tests verification

Previews results from our group indicated that MOF-Cu-BTC possesses an IC_{50} of 5 $\mu\text{g/mL}$ on HL-60 cells after 72 h incubation (see supplementary material). Thus, we perform an apoptosis test at 5 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$. HL60 (3×10^5 cells/mL) were plated onto 24-well tissue culture plates and treated with (MOF Cu-BTC, 5 – Fluorouracil and 5-FU incorporated into the Cu-BTC) for 72 h at 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$. After the 72 h incubation period, cells were pelleted and resuspended in 1x Binding Buffer. The pellet was incubated for 10 minutes with 5 μL of the annexin-V and 10 μL of the propidium iodide (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit-SIGMA).

Cell fluorescence was determined by flow cytometry in a FACS Calibur cytometer (Becton,Dickinsonand Company, NewJersey, USA) using the Cell Quest software. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis.

2.4 Peritonitis induced by carrageenan

In this assay, were used 6 groups of 6 animals, treated groups received orally 25, 50 and 75 mg/kg of Incorporation. The others group received orally saline vehicle (0.1mL/10g) was used as negative control or dexamethasone (0.5mg/kg) as positive control. One hour after the treatment, the inflammation was induced by intraperitoneal (i.p) application of 0.1mL/10g carrageenan (1% in saline solution).

After 4 hours the animals were euthanized in a chamber of CO₂ so were injected into the peritoneal cavity 3 mL of phosphate buffered saline PBS containing EDTA to collect the peritoneal fluids. The total leukocyte count was determined in hematology analyzer Micros 60®. The exudates were centrifuged and the supernatant stored at - 20 ° C for analysis of nitric oxide and cytokines levels¹⁷

2.5 Analysis of Nitric oxide production

The nitrite accumulated in the samples was measured as an indicator of NO production using the Griess reaction. Briefly, the samples were mixed with an equal volume of Griess reagent in a 96-well microtiter plate and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was read at 540 nm using an ELISA reader and the nitrite concentrations were determined by comparison with a standard curve of sodium nitrite.¹⁷

2.6 Measurement of cytokines

The concentrations of TNF- α and IL-1 β were measured using sandwich ELISA kits, specific for mice, according to the manufacturer's instructions (eBioscience, SanDiego, California, USA). The detection limit used was 8-1000 pg/mL. The experiments were done in triplicate¹⁸

2.7 Statistical Analysis

The results are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Data were analyzed using the software graph pad prism v. 5.0. One-way ANOVA followed

by the Newman-Keuls test were used to evaluate the differences among the treatments. P values < 0.05 were considered statistically significant.

3 Results and Discussion

3.1 Cytotoxic activity and Apoptosis tests

As observed in another study done by our group, (see supplementary material) 5-fluorouracil exhibited cytotoxic activity on MCF-7 and HL-60 cells. The IC₅₀ values for the MCF-7 and HL-60 cells were very low when the drug was associated with the MOF, suggesting a modulation of cytotoxic activity, since the coordination network enabled a good cytotoxic activity combined with a reduction in LD₅₀. The Apoptosis test realized in this study demonstrated that 5-fluorouracil incorporated into Cu-BTC MOF induced cell death by apoptosis mechanism to the dose of 10µg/mL (graphic 1).

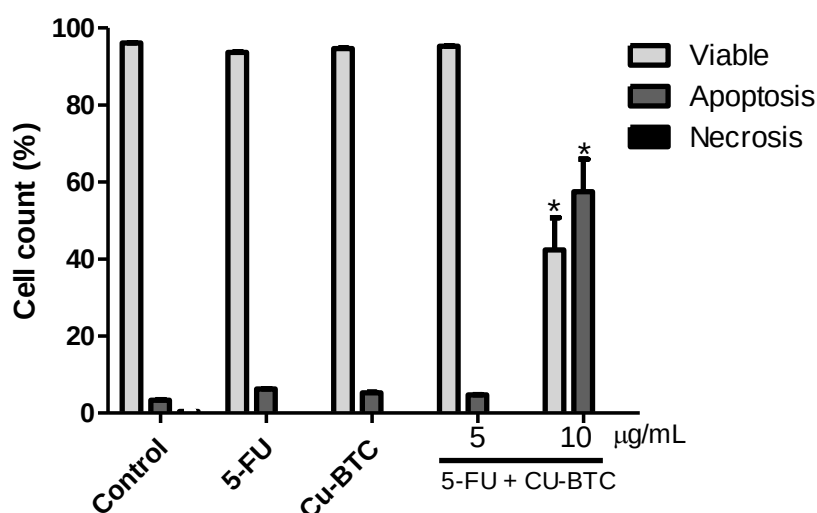
These results are according with the peritonitis test that showed a decrease in levels of TNF-α and NO in the tumor site, which may have contributed to the maintenance of the required levels of these substances in the activation of caspases that activate apoptosis. Experience since then has indicated that when expressed locally by the cells of the immune system, TNF-α has a therapeutic role, however when dysregulated and secreted in the circulation, TNF-α can mediate a wide variety of diseases, including cancer¹⁹

TNF-α has itself been shown to be one of the major mediators of inflammation is also produced by tumors and can act as an endogenous tumor promoter. The role of TNF-α has been linked to all steps involved in

tumorigenesis, including cellular transformation, promotion, survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis²⁰.

Considering this information the results found in our experiments demonstrated that 5-fluorouracil associated with MOF Cu-BTC may have favored the process of induction of cell death by apoptosis.

Graphic 1: checking mechanism necrosis x apoptosis by flow cytometry



* $p < 0.05$.

3.2 Peritonitis test

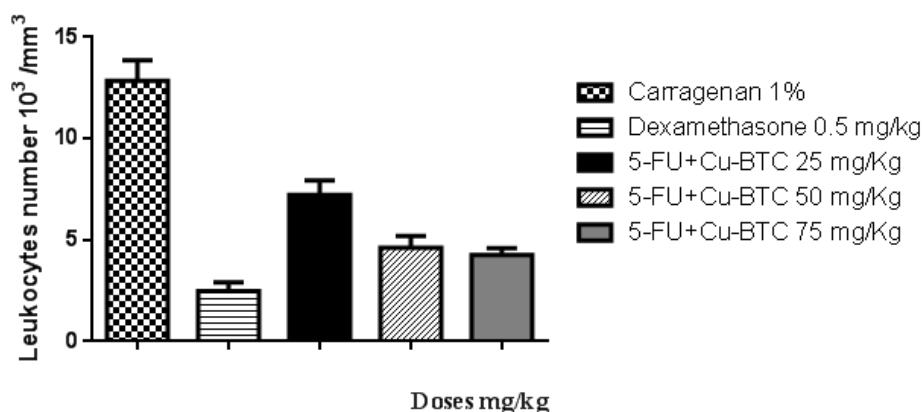
Currently inflammatory processes are rather taken into consideration when one wants to get success in antitumor therapies, chronic inflammation that because of some organ, like the liver increases the number of cell divisions and thus the risk of mutations. Tumor cells produce various cytokines and chemokines that attract leukocytes²¹. The direct evidence for the association of chronic inflammation with malignant diseases is in colon carcinogenesis in individuals with inflammatory bowel diseases²². The concept in clinical trials

reveals that inflammation is a potential therapeutic target in cancer treatment and antiinflammatory drugs are thereby potentially useful as adjuvant therapy¹⁹.

This test was conducted in order to verify the process of secondary mechanism of action by which the drug embedded in coordination network has its cytotoxic activity which may be enhanced by modulation of immune cells such as polymorphonuclear leukocytes. Through this test we suggest that the cytotoxic and antitumor activity of the drug is related to the route of leukocyte activation or suppression of the inflammatory process, which is closely related to the processes related to tumor angiogenesis, parallel production of inflammatory interleukins and TNF- α , IL-6 among others²⁰.

The results showed that a possible way of action of the drug incorporated in the network to coordinate the performance of this system is as an anti-inflammatory agent, since it caused a reduction of inflammation in 43.7, 64 and 66.8% respectively for doses of 25, 50 and 75 mg/kg when compared to negative control group with inflammation induced by carrageenan 1% in saline. The inhibition of leukocyte data is described in (graphic 2).

Graphic 2: Peritonitis test leukocytes number x doses of 5-FU+Cu-BTC



3.3 Analysis of Nitric oxide production and cytokines levels determination

Tumor-associated macrophages are a significant component of inflammatory infiltrates in neoplastic tissues and are derived from monocytes that are recruited largely by monocyte chemotactic protein (MCP) chemokines. The proinflammatory cytokines, including tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), induce direct effects on stromal and neoplastic cells in addition to their roles in regulating leukocyte recruitment¹⁴.

The direct evidence for the association of chronic inflammation with malignant diseases is in colon carcinogenesis in individuals with inflammatory bowel diseases²⁰. The emerging concept in clinical trials reveals that inflammation is a potential therapeutic target in cancer treatment and antiinflammatory drugs are thereby potentially useful as adjuvant therapy²³.

The exudates removed from the abdominal cavity of the animals subjected to the test of carrageenan induced peritonitis were analyzed and levels of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines have been shown in table 2 and 3. It was observed that there was a statistically significant and dose dependent NO production and cytokine treated groups when considered by doses of 25 and 75mg/kg body weight.

These results being in agreement with the results on the number of white blood cells found in the peritoneal cavity animals, indicating a possible anti-inflammatory action of this system (tables 2 and 3).

Table 2: Effect of 5-FU+ CuBTC on the NO production in the carrageenan test.

Treatment	NO (μ M)
Control group	21.30 $\pm$ 3.62
Dexamethasone	1.77 $\pm$ 0.44*
25mg/kg (5-FU+Cu-BTC)	0.78 $\pm$ 0.07*
75mg/kg (5-FU+Cu-BTC)	0.63 $\pm$ 0.02*

*Statistically significant difference compared to control (p <0.05)

Data are expressed by mean standard deviation (Mean $\pm$ standard deviation).

Table 3: Effect of 5-FU+ CuBTC on the TNF- α e IL-1 β productions in the carrageenan test induced peritonitis.

Compound	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
Control	502,11 $\pm$ 3,31	751,00 $\pm$ 15,04
Dexamethasone	126.39 $\pm$ 13.15*	289.35 $\pm$ 18.62*
75mg/Kg (5-FU+Cu-BTC)	117.39 $\pm$ 37.86*	238.70 $\pm$ 5.62*
25 mg/Kg (5-FU+Cu-BTC)	300.9 $\pm$ 26.11*	617.18 $\pm$ 12.62*

* Statistically significant difference compared to control (p <0.05)

Data are expressed by mean standard deviation (Mean $\pm$ standard deviation).

4. Conclusions

As noted in the results obtained by our group, 5-fluorouracil incorporated into the Cu-BTC MOF appears to be a great tool in the treatment of cancer, since we obtained a rate optimal encapsulation (0.82g of the drug for every 1 g of Cu-BTC MOF), together with a reducing drug toxicity and controlled release of drug from the carrier (supplementary material).

Nanoparticle therapeutics is an emerging treatment modality in cancer and other inflammatory disorders. The National Cancer Institute has recognized nanotechnology as an emerging field with the potential to revolutionize modern medicine for detection, treatment, and prevention of cancer²⁴. More selective therapies, such as angiogenesis inhibitors, vascular disrupting agents, and estrogenan HER-2-targeted therapies have been developed to treat cancer, these approaches have increased patient survival because of treatment efficacy²⁵.

Most solid tumors possess unique features, including enhanced angiogenesis, defective vasculature and lymphatics, increased vascular permeability, which stimulate their growth. Rationally designed nanoparticles can take advantage of these tumor features to deliver chemotherapeutics selectively and specifically¹⁴.

These results together the death of cancer cells through the mechanism of apoptosis and anti-inflammatory activity associated with decreased levels of the proinflammatory cytokines, directly related to the maintenance of chronic inflammation processes, indicate this system as a viable alternative when considering an ideal system for cancer treatment, since it showed the controlled

release properties, low toxicity to normal cells and also an indication of anti-inflammatory activity which could act as an adjuvant treatment²⁶.

5. References

1. Cai C, Zhou K, Wu Y, Wu L. **Enhanced liver targeting of 5-fluorouracil using galactosylated human serum albumin as a carrier molecule.** *J Drug Target.* 2006, 14:55–61.
2. Cao S, Rustum YM. **Synergistic antitumor activity of irinotecan in combination with 5-fluorouracil in rats bearing advanced colorectal cancer: role of drug sequence and dose.** *Cancer Res.* 2000;60: 3717–3721.
3. Kubota T. **Recent progress in combination therapy of low-dose CDDP/5-FU in Japan. Theoretical basis for low-dose CDDP/5-FU therapy.** *Jpn J Cancer Chemother.* 1999, 26:1536–1541.
4. Shapiro WR, Green SB, Burger PC, et al. **A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma.** *J Neurosurg.* 1992, 76:772–781.
5. Hutchins LF, Green SJ, Ravdin PM, et al. **Randomized, controlled trial of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil versus cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil with and without tamoxifen for high-risk, node-negative breast cancer: treatment results of Intergroup Protocol INT-0102.** *J Clin Oncol.* 2005, 23:8313–8321.
6. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. **5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.** *Nat Rev Cancer.* 2003, 3:330–338.
7. Parker WB, Cheng YC. **Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil.** *Pharmacol Ther.* 1990, 48:381–395.
8. Fata F, Ron IG, Kemeny N, O'Reilly E, Klimstra D, Kelsen DP. **5-fluorouracil-induced small bowel toxicity in patients with colorectal carcinoma.** *Cancer.* 2000, 86:1129–1134.
9. Paolo AD, Danesi R, Falcone A, et al. **Relationship between 5-fluorouracil disposition, toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients.** *Ann Oncol.* 2001, 12:1301–1306.

10. van Kuilenburg ABP, Haasjes J, Richel DJ, et al. **Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene.** *Clin Cancer Res.* 2000, 6:4705–4712.
11. Rahman, Z., Kohli,K., Khar,R.K., Ali,M., Charoo,N.A., Shamsheer, A.A.A. **Characterization of 5-Fluorouracil Microspheres for Colonic Delivery,** *AAPS Pharm Sci Tech* 2006, 7(2):E1-E9.
12. Lekha Nair K,¹ Sankar Jagadeeshan,² S Asha Nair,² and GS Vinod Kumar. **Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA.** *Int J Nanomedicine.* 2011, 6:1685–1697
13. Horcajada, P., Chalati, T., Serre, C. Gillet, B., Sebbie, C., Baati, T., Eubank, J.F., Heurtaux, D., Clayette, P., Kreuz, C., Chang, J-S., Hwang, Y. K., Marsaud, V., Bories, P-N., Cynober, L., Gil, G., Férey, G., Couvreur, P., Gref, R. **Porous metal- organic framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging.** *Nature materials.* 2010, 9:172-178.
14. Hareesh B. Nair, Bokyoung Sung, Vivek R. Yadav, Ramaswamy Kannappan, Madan M. Chaturvedi, and Bharat B. Aggarwal . **Delivery of anti-inflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer.** *Biochem Pharmacol.* 2010, 15; 80(12):1833–1843.
15. Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K, Sakakura C, Tsujimoto H, Imanishi T, Ohgaki M, Yamazaki J, Muranishi S, Yamamoto A, Fujita T. **Pharmacological effects of 5-fluorouracil microspheres on peritoneal carcinomatosis in animals.** *Br J Cancer.* 1996, 74(9):1392-6.
16. Geran RI, Greenberg NH, Macdonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. **Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems.** *Cancer. Chemother..* 1972, Rep. 3.
17. Uchôa, F.T.; Silva, T.G.; Lima, M.C.A; Galdino, S.L.; Pitta, I.R.; Costa, T.D. **Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: an anti-inflammatory candidate.** *J. of Pharm. Pharmac.,* 2009, 61:339-345.

18. Aggarwal BB. **Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword.** *Nat Rev Immunol* 2003, 3(9):745-756.
19. Bharat B. Aggarwal, Shishir Shishodia, Santosh K. Sandur, Manoj K. Pandey, Gautam Sehti. **Inflammation and Cancer: How Hot is the link?** *Biochem. and Pharmac.*, 2006, (2), 1605-1621.
20. Longhi-balbinot, D. T.; Lanznaster, D.; Baggio, C. H.; Silva, M. D.; Cabrera, C. H.; Facundo, V. A.; Santos, A. R. S. **Anti-inflammatory effect of triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice.** *J. Ethnoph.*, 2012, 142(1):59-64, 2012.
21. Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM. **Perspectives for cancer prevention with natural compounds.** *J Clin Oncol.* 2009; 27:2712–25.
22. Itzkowitz SH, Yio X. **Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 287:G7–17.
23. Danese S, Mantovani A. **Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer.** *Oncogene.* 2010, 29:3313–23.
24. Kawasaki ES, Player A. **Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer.** *Nanomedicine.* 2005, 1:101–9.
25. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. **Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution.** *Cancer Lett.* 2008; 267:133–64.
26. D. Sun, X. Zhuang, X. Xiang, Y. Liu, S. Zhang, C. Liu, S. Barnes, W. G., D. Miller, H-G. Zhang. **A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes.** *Mol Ther.* 2010, 18(9): 1606–1614.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

Em relação aos resultados obtidos nos experimentos de química teórica-computacional pôde-se concluir que o fármaco 5-Fluorouracil e cisplatina foram os fármacos que apresentaram as menores dimensões compatíveis com os poros apresentados por ambas as MOFs estudadas MIL-53(Al) e Cu-BTC.

Os resultados de incorporação/inserção do fármaco nos poros das redes de coordenação o protocolo apresentou a taxa de 0,82g de fármaco para cada 1 g de MOF utilizada após sete dias de agitação.

Considerando as caracterizações químicas dos materiais, os resultados indicaram que o processo de incorporação provavelmente ocorreu por processos de fisorção e quimisorção como discutido nos resultados apresentados pela difratometria de raio-X, apesar da mudança estrutural que ocorreu na rede de coordenação, experimentos como à análise elementar, Infra-vermelho e análises térmica demonstraram a presença do fármaco na rede de coordenação.

O Perfil de dissolução do fármaco demonstrou que o mesmo apresentou uma liberação lenta, com dois perfis de liberação, sendo uma parte liberada nos primeiros 30 minutos podendo ser atribuída a droga adsorvida na superfície da MOF Cu-BTC, responsável pelo efeito farmacológico e o segundo perfil de liberação que ocorreu dentro de 48 horas, provavelmente do fármaco contido nos poros responsável pela manutenção desse efeito.

Considerando os experimentos *in vivo* foi verificada uma redução na DL-50 do fármaco livre em relação ao fármaco incorporado na MOF Cu-BTC, a

mesma foi determinada em 750mg/kg de incorporação. Este efeito provavelmente está relacionado com o perfil de dissolução lento da droga, que possibilita a manutenção do efeito terapêutico pela liberação lenta do fármaco a partir da MOF Cu-BTC.

Os estudos que verificavam o número de leucócitos na cavidade peritoneal, produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias demonstraram que houve uma redução significativa desses parâmetros o que contribui para a melhora da atividade antitumoral do fármaco, uma vez que os processos de inflamação crônica estão intimamente relacionados com a tumorigênese.

Experimentos *in vitro* demonstraram que o fármaco incorporado a MOF Cu-BTC apresentou atividade citotóxica frente às células MCF-7 e HL-60. A citometria de fluxo indicou ser a indução da apoptose celular o mecanismo responsável pela morte das células tumorais, sendo o sistema em questão uma alternativa promissora nos estudos relacionados as terapias anti-câncer que visam a obtenção de um sistema seletivo, de baixa toxicidade para as células saudáveis e liberação controlada dos princípios ativos que permite a manutenção do efeito terapêutico.