UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LIVIA DE QUEIRÓZ CARVALHO SILVA

Nanopartículas de PLGA e PLGA peguado com TPGS contendo docetaxel: Avaliação *in vitro* do potencial para tratamento do câncer de próstata

Ribeirão Preto
2020

LIVIA DE QUEIRÓZ CARVALHO SILVA

Nanopartículas de PLGA e PLGA peguado com TPGS contendo docetaxel: Avaliação *in vitro* do potencial para tratamento do câncer de próstata

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador(a): Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas em 13/11/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Livia de Queiróz Carvalho

Nanopartículas de PLGA e PLGA peguilado com TPGS contendo docetaxel: Avaliação *in vitro* do potencial para tratamento do câncer de próstata. Ribeirão Preto, 2020 **106 p.**; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Marchetti, Juliana Maldonado

1. Biodisponibilidade . 2. Nanomateriais. 3. Câncer de Próstata

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Livia de Queiróz Carvalho Silva

Título do trabalho: Nanopartículas de PLGA e PLGA peguado com TPGS contendo docetaxel: Avaliação *in vitro* do potencial para tratamento do câncer de próstata.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao meu marido Emerson por ser exatamente quem você é, por me apoiar a cada escolha em minha vida, por acreditar em mim, ser meu parceiro de todas as horas, compartilhando tudo. Obrigada por estar comigo nessa jornada, por me fazer feliz, por me fazer olhar ao horizonte sempre com a melhor perspectiva. Obrigada por se doar tanto a mim, pelos melhores momentos que passamos juntos e também pelos mais difíceis. Sem o seu amor eu nada seria. Amo você!

Dedicatória

A Deus pela fé, pela permissão da vida e por estar a frente de nossas decisões nos orientando, nos seguindo e nos acalentando quando necessário for.

Ao meu pai Valdir pelo amor incondicional, pelas sábias palavras, por me guiar sempre no caminho do bem, por me lembrar que é preciso SONHAR e acreditar e lutar por eles mesmo que eles sejam difíceis, aos meus irmãos Rafael e Antônio e cunhadas Luaine e Natália por serem mais que irmãos ou irmãs, são meus melhores amigos, os que estão comigo a cada passo sempre. Aos meus sobrinhos Maria Júlia e João Pedro por tanto amor. A minha mãe Nilza que de onde ela estiver sei que está torcendo pela minha felicidade, minha eterna mãe a quem guardo no coração com muito amor e com muita saudade.

Ao meu marido Emerson pelo apoio e por toda dedicação a mim e por me ensinar valores tão importantes como a humildade e a beleza da vida. Obrigada por toda sua família, meus sogros Sr. Antonio e Sra. Antonia por estarem sempre ao nosso lado, torcendo, se preocupando e por tantas comemorações que fazemos juntos de meus cunhados Angeli e Sérgio, Eder e Eunice, Ebert e Taiana, Everton e Juliana e os nossos queridos sobrinhos: Gabriella, Maria Antonia, Anna Clara, João Victor, Sophia, Miguel e a Rafaella que tanto nos alegram, amo vocês.

Em especial agradecimento aos meus queridos padrinhos Paulo e Vilma por serem como pais para mim, torcendo, vibrando, ou acolhendo em cada situação não importa qual. Obrigada por tanto amor de vocês.

A toda minha família, meus avós Lourdes e Antônio, tios Nilva e Jurandir, José Henrique e Aline e primos diretos Alessandra, Adriana, Vinícius, Marina e Vitor e os primos indiretos Gustavo, André, Driele, e os pequenos Lucca e Enzo.

A todos os meus amigos que estão sempre conosco em todos os momentos de nossas vidas, curtindo juntos alegrias, compartilhando conquistas ou até mesmo as dificuldades. Vocês são essenciais, são nossos irmãos.

A minha médica Dra Maria Priscila Cescato e psicólogo Dr. Rodrigo César Martins pelos aconselhamentos, paciência, cuidados e assistência oferecidos.

A minha querida orientadora, prof^a Dra Juliana Maldonado Marchetti pela confiança, pelos ensinamentos teóricos, ensinamentos pessoais, pelo carinho, apoio e pela contribuição técnica-científica neste projeto e em minha carreira.

Ao meu amigo Josimar Eloy por cada ensinamento, pela paciência, pela imensa colaboração na minha trajetória profissional, pela conduta ética, pela grandiosa colaboração técnica-científica neste projeto, pelas discussões científicas ocasionadas, pelos cuidados ao transmitir cada ensinamento ou sugestões divergentes, pelo capricho ao revisar cada item seja figura, tabela ou texto, por sempre me apoiar, por sempre acreditar que podemos fazer melhor juntos. Obrigada meu amigo por tanto de tudo.

Aos funcionários do laboratório de tecnologia farmacêutica: Às professoras Juliana Marchetti e aos técnicos e/ou especialistas Angela, Fabiola, Henrique, José Orestes pela imensa contribuição técnico-científica, colaboração em análises específicas e contribuições diárias, pelo aprendizado profissional, pessoal e pelo ótimo relacionamento.

Aos meus amigos do grupo LM Nano: Juliana Abriata, Giovanni Raspantini e Marcela Tavares por tantos aprendizados, pelas discussões técnico-científicas, pela paciência, pelos ensinamentos minuciosos e também pelo respeito e momentos de diversão.

As minhas queridas amigas Fabíola e Ana Vitória, por toda identificação que temos, pelos conhecimentos compartilhados, pela cumplicidade, pela alegria, pelas risadas, abraços, momentos de sensibilidade, pela parceria e pela eternidade que gostaria que essa amizade tão bonita seguisse.

Aos amigos de laboratório de tecnologia farmacêutica Angelo Caron e Juliana Rosa pela amizade, por aprendizados e discussões técnico científicas.

Aos colaboradores José Augusto pelos ensaios de micrografia de transmissão, à Fabiana Moraes pelas análises de citometria de Fluxo, ao Eduardo Tozatto pelas análises de microscopia confocal e ao Clóvis Júnior pelas análises de infra-vermelho. A profa^o Délia Plácido e profa^o Marina Batistute pelos ensinamentos estatísticos aplicados a este trabalho. A profa^o Regina Andrade por acompanhar toda a trajetória sempre incentivando nosso trabalho.

À pós-graduação e a todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-RP pela colaboração direta ou indiretamente neste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Cnpq

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Agradecimento

“O progresso é irreversível, tudo alcança tudo invade. Mas se não tiver amor no caminho, não
temos felicidade”

“Dito por Antônio de Souza Carvalho escrito por Francisco Candido Xavier”

RESUMO

Silva, L.Q.C. **Nanopartículas de PLGA e PLGA peguado com TPGS contendo docetaxel: Avaliação *in vitro* do potencial para tratamento do câncer de próstata.** 2020. 106f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens (atrás apenas do câncer de pele não-melanoma). A taxa de mortalidade é em torno de 20% ficando atrás apenas do câncer de pulmão. O tratamento do câncer por via oral é uma abordagem atraente devido à sua natureza não invasiva e melhor adesão do paciente. No entanto, devido a baixa biodisponibilidade por via oral a maioria dos fármacos anticancerígenos não podem ser administrados por esta via. Por este motivo, a administração de quimioterápicos pela via parenteral pode ser vantajosa. Neste contexto, o desenvolvimento das nanopartículas oferecem numerosas vantagens, tais como, menor tamanho de partícula, maior estabilidade e maior efeito EPR (*enhanced permeability and retention*). Estes sistemas são capazes de se extravasar, se acumular passivamente em tumores sólidos, via efeito EPR, onde o endotélio capilar é defeituoso ao redor do tumor e assim são absorvidos sendo este o principal mecanismo de ação da nanopartícula. Além disso, a nanopartícula pode permitir a manutenção de níveis plasmáticos do fármaco, com a possibilidade de aumento do intervalo entre aplicação das doses. Estas características permitem a redução de efeitos colaterais sistêmicos do fármaco. Neste trabalho um sistema de liberação composto por polímeros biodegradáveis para carrear o quimioterápico docetaxel pela via parenteral foi estudado. As nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação e a caracterização físico-química compreende análises de tamanho de partícula, polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulação de docetaxel, capacidade de carregamento, morfologia por microscopia eletrônica de transmissão, caracterização quanto a DSC, TGA, FTIR e as análises *in vitro* de *uptake* celular e de citotoxicidade realizadas em células de câncer de próstata. As nanopartículas preparadas segundo o planejamento fatorial apresentaram resultados de tamanho de partícula, em torno de 100nm, PDI em torno de 0,15 e potencial zeta maior em módulo que 30mV e negativo, considerados satisfatórios para a via parenteral. Os resultados de eficiência de encapsulação foram em torno de 80%. A avaliação da morfologia por microscopia eletrônica mostrou nanopartículas com formatos arredondados. A caracterização por DSC, TGA e FTIR não evidenciou interações moleculares entre a composição das nanopartículas que se mostraram estáveis no estudo de estabilidade coloidal e por último a avaliação do *uptake* realizados em células de câncer de próstata e os ensaios de citotoxicidade demonstraram, respectivamente que a nanopartícula é eficientemente internalizada e o sistema nanoestruturado com fármaco promove citotoxicidade com menores dosagens em relação ao fármaco livre.

Palavras-chave: biodisponibilidade, biopolímeros, citotoxicidade, nanotecnologia, PLGA.

ABSTRACT

SILVA, L.Q.C. Nanoparticles of PLGA and PLGA pegylated with TPGS containing docetaxel: In vitro evaluation of the potential for treatment of prostate cancer. 2020. 106f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

In Brazil, prostate cancer is the second most common among men (behind only non-melanoma skin cancer). The mortality rate is around 20% losing than to lung cancer. Oral medicine to cancer treatment is an attractive approach due to its non-invasive nature and better patient compliance. However, due to the low bioavailability by the oral route administration, most anticancer drugs cannot be administered by this route. For this reason, the administration of chemotherapy by parenteral route may be advantageous.

In this context, the development of nanoparticles offers numerous advantages, such as, smaller particle size, greater stability and greater EPR effect (enhanced permeability and retention). These systems are able to leak, passively accumulate in solid tumors, route the EPR effect, where the capillary endothelium is defective around the tumor and are thus absorbed, this being the main mechanism of action of the nanoparticle. In addition, a nanoparticle may allow the maintenance of plasma drug levels, with the possibility of increasing the interval between application of doses. These characteristics include effects reduction, systemic effects of the drug. In this work, a delivery system composed of biodegradable polymers for transporter or chemotherapy docetaxel by parenteral route is being studied. As PLGA and PLGA-PEG nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation technique and physical chemical characterization were done, like the particle size, polydispersity, zeta potential and docetaxel encapsulation efficiency, drug loading, transmission electron microscopy morphology, DSC, TGA, FTIR characterization and as analysis cell uptake performed in prostate cancer cells and in vitro cytotoxicity. The nanoparticles prepared according to the factorial design presented particle size, 100nm around, PDI less than 0.2 and zeta greater in the module than 30mV and negative, satisfactory tests for parenteral route. The results of encapsulation efficiency were around 80%. An evaluation of the morphology by electron microscopy showed nanoparticles with rounded shapes. A characterization by DSC, TGA and FTIR does not show molecular interactions of nanoparticles that are stable in the study of colloidal stability and, finally, uptake evaluation tests carried out on prostate cancer cells and the cytotoxicity tests demonstrated respectively, that the nanoparticle is efficiently internalized and the nanostructured drug system promotes cytotoxicity with lower dosages compared to the free drug.

Keywords: bioavailability, biopolymers, cytotoxicity, nanotechnology, PLGA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema reprodutor masculino.....	02
Figura 2. Ação androgênica da testosterona.....	05
Figura 3. Estrutura química do docetaxel.....	08
Figura 4. Principais benefícios dos sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados	10
Figura 5. Esquematização de um sistema que pode ser nanocápsulas ou nanoesfera...	11
Figura 6. Estrutura química do co-polímero de ácido lático e glicólico 50:50 (PLGA).....	12
Figura 7. Estrutura química do poli(ácido lático-co-ácido glicólico)-pegulado (PLGA-PEG).....	13
Figura 8. Estrutura química do D-alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS).....	14
Figura 9. Ilustração do processo de nanoprecipitação para obtenção das nanopartículas poliméricas	22
Figura 10. Representação gráfica da influência da razão FA:FO, concentração de TPGS e quantidade de PLGA nas respostas A) média de tamanhos de partícula B) polidispersão C) potencial zeta.....	39
Figura 11. Representação gráfica da influência da razão FA:FO, concentração de TPGS e quantidade de PLGA-PEG nas respostas A) média de tamanhos de partícula B) polidispersão C) potencial zeta.....	41
Figura 12. Gráficos da distribuição do tamanho de partículas de a) PLGA F16 e b) PLGA-PEG-F16.....	43
Figura 13. Representação gráfica da curva analítica de docetaxel.....	45
Figura 14. A) Gráfico da distribuição normal dos resíduos do método analítico para a quantificação de docetaxel e B) Gráfico da distribuição de resíduos do método analítico para a quantificação de docetaxel.....	46
Figura 15. Fotomicrografias obtidas na avaliação da morfologia das nanopartículas a) PLGA-CTRL b) PLGA-DTX c) PLGA-PEG-CTRL d) PLGA-PEG-DTX (todos aumento de 200.000).....	51
Figura 16. Representação das curvas termogravimétricas de diferentes amostras.....	52
Figura 17. Representação gráfica de DSC de diferentes amostras.....	54

Figura 18. Gráficos de transmitância em análises de infra-vermelho para as formulações a) PLGA-CTRL b) PLGA-DTX c) PLGA-PEG-CTRL e d) PLGA-PEG-DTX.....	56
Figura 19. Gráficos de transmitância em análises de infra-vermelho para as formulações a) PLGA-CTRL b) PLGA-DTX c) PLGA-PEG-CTRL e d) PLGA-PEG-DTX.....	57
Figura 20. Resultados obtidos nos estudos de estabilidade, perfil de potencial zeta em amostras de A) PLGA-CTRL e PLGA-DTX e B) PLGA-PEG-CTRL e PLGA-PEG-DTX.....	61
Figura 21. Resultados obtidos nos estudos de estabilidade, perfil de distribuição de tamanho de partícula em amostras de A) PLGA-CTRL e PLGA-DTX e B) PLGA-PEG-CTRL e PLGA-PEG-DTX.....	61
Figura 22. Resultados obtidos nos estudos de estabilidade, perfil de índice de polidispersão (PDI) em amostras de A) PLGA-CTRL e PLGA-DTX e B) PLGA-PEG-CTRL e PLGA-PEG-DTX.....	62
Figura 23. Resultados obtidos nos estudos de estabilidade, perfil de eficiência de encapsulação em amostras de A)PLGA-DTX e B) PLGA-PEG-DTX.....	62
Figura 24. Avaliação do crescimento celular da linhagem DU 145 de células de câncer de próstata.....	63
Figura 25. Células confluentes da linhagem DU 145 de câncer de próstata.....	64
Figura 26. Fotomicrografias mostrando o <i>uptake</i> das células DU-145 de câncer de próstata por microscopia de confocal após tratamento de 1h, 4h e 24h com as nanopartículas de PLGA-CTRL contendo rodamina 123.....	65
Figura 27. Fotomicrografias mostrando o <i>uptake</i> das células DU-145 de câncer de próstata por microscopia de confocal após tratamento de 1h, 4h e 24h com as nanopartículas de PLGA-PEG-CTRL contendo rodamina 123.....	66
Figura 28. Resultados obtidos na avaliação do <i>uptake</i> celular por citometria de fluxo A) Grupo CTRL sem tratamento e sem iodeto de propídio (PI) e grupo CTRL+PI sem tratamento com PI B) Nanopartículas de PLGA-CTRL-R123 e PLGA-PEG-CTRL-R123 C) Porcentagem de células positivas para rodamina 123 com e sem PI (Q2+Q4) para nanopartículas de PLGA-CTRL-R123 e PLGA-PEG-CTRL-R123.....	68

Figura 29. Resultados na avaliação da viabilidade celular no estudo de citotoxicidade de A) PLGA-CTRL e de PLGA-DTX 24 e 48h B) PLGA-PEG-CTRL e de PLGA-PEG-DTX 24 e 48h e C) Docetaxel comercial 24 e 48h.....	71
Figura 30. Sigmoides do cálculo de IC-50 das nanopartículas de PLGA-DTX, PLGA-PEG-DTX 24h e 48h.....	73
Figura 31. Sigmoides do cálculo de IC-50 do fármaco docetaxel DTX genérico comercial 24h e 48h.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis mínimo, médio e máximo das variáveis utilizadas no Planejamento experimental por Box Behnken para as formulações de PLGA	23
Tabela 2 - Níveis mínimo, médio e máximo das variáveis utilizadas no Planejamento experimental por Box Behnken para as formulações de PLGA-PEG	23
Tabela 3 - Combinações fatoriais do planejamento experimental por Box Behnken para PLGA	24
Tabela 4 - Combinações fatoriais do planejamento experimental por Box Behnken para PLGA-PEG	25
Tabela 5 - Formulações e resultados obtidos no planejamento fatorial, com variáveis dependentes (quantidade de PLGA, concentração de TPGS e razão de FA/FO).....	38
Tabela 6 – Formulações e resultados obtidos pelo planejamento fatorial, com variáveis dependentes (quantidade de PLGA-PEG, concentração de TPGS e quantidade de fase orgânica).....	40
Tabela 7 – Resultados obtidos nas análises de distribuição da média de tamanhos de partícula, PDI e potencial zeta para PLGA e PLGA-PEG da formulação de escolha do planejamento experimental.....	42
Tabela 8 – Valores obtidos na validação analítica para determinação da precisão intra dia e inter-dia e exatidão.....	46
Tabela 9 – Resultados obtidos nas análises de tamanhos de partícula, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação da formulação de escolha do planejamento experimental de PLGA(F16).....	47
Tabela 10 – Resultados obtidos nas análises de tamanhos de partícula, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação da formulação de escolha do planejamento experimental de PLGA-PEG (F16).....	48
Tabela 11: Resultados obtidos nas análises de capacidade de carga e rendimento do processo.....	49
Tabela 12 – Resultados obtidos nas análises de distribuição de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, EE e NTA de nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG controle e com fármaco encapsulado para avaliação da morfologia das nanopartículas.....	50
Tabela 13 – Valores de temperatura (°C) de degradação obtidos no estudos de termogravimetria.....	53

Tabela 14 - Resultados médios de eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, PDI e potencial zeta de PLGA-DTX no estudo de estabilidade.....	60
Tabela 15 - Resultados médios de Eficiência de Encapsulação, tamanho de partícula, PDI e potencial zeta de PLGA-PEG-DTX no estudo de estabilidade.....	61
Tabela 16 – Valores estatísticos de p com relação ao tempo nos parâmetros de potencial zeta, distribuição de tamanho de partícula e PDI no estudo de estabilidade de PLGA-CTRL, PLGA-DTX e PLGA-PEG-CTRL e PLGA-DTX.....	62
Tabela 17 – Valores estatísticos de p por comparação do grupo CTRL como grupo com fármaco DTX nos parâmetros de potencial zeta, distribuição de tamanho de partícula e PDI no estudo de estabilidade das formulações controle e com fármaco de PLGA e PLGA-PEG	63
Tabela 18 - Resultados obtidos nas análises de distribuição de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, NTA e EE de nanopartículas de PLGA-CTRL e PLGA-PEG-CTRL e com fármaco encapsulado utilizadas nas análises de citotoxicidade.....	70
Tabela 19 - Resultados de IC 50 de fármaco DTX genérico comercial, PLGA-DTX e PLGA-DTX 24 e 48h.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Do inglês “ <i>ATP Binding Casset</i> ”
ABCB1	Genes que controlam proteínas transportadoras
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AKT	Do inglês “ <i>Serine-Threonine-Kinases Protein</i> ”
ATP	Adenosina Trifosfato
BAD	Proteína pró apoptótica
CA	Ácido Cólico
CC	Capacidade de carreamento ou carga
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTRL	Controle
DHT	Do inglês “ <i>Dihydrotestosterone</i> ”
DLS	Do inglês “ <i>Dynamic Ligth Scattering</i> ”
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
DTX	Docetaxel
EPR	Do inglês “ <i>Enhanced Permeability and Retention Effect</i> ”
ERSPC	Do inglês “ <i>European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer</i> ”
FA:FO	Fase Aquosa:Fase Orgânica
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Do inglês “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
FITC	Fluoresceína
FSBH	Fosfato de Sódio Bibásico Heptahidratado
FSMM	Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado
GDC0941	Ativo Inibidor de PI3K/AKT
GST	Glutathione S Transferase Tipo (GST)-P1 e GST(A)
HA	Ácido Hialurônico
HER 2	Do inglês “ <i>Receptor of Tyrosines Kinases</i> ”
IV-TF	Espectroscopia do Infra Vermelho com Transformada e Fourier
LF	Liofilizadas

MDR	Do inglês “ <i>Multiple Drug Resistance</i> ”
MDR1	Genes que controlam proteínas transportadoras
nm	Nanômetros
nM	Nano Molar
NTA	Rastreamento de nanopartículas do inglês “ <i>Nanotraking Analises</i> ”
PDI	Índice de Polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
P-gp	Do inglês “ <i>P-glicoprotein</i> ”
PI	Iodeto de Propídio
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-Cinase / Proteína Cinase B relacionada a proliferação celular
PIA	Do inglês “ <i>Proliferative Inflammatory Atrophy</i> ”
PLGA	Co-polímero do ácido lático e glicólico
PLGA-PEG	(Poli Ácido Lático - Co Ácido-glicólico) Peguilado
PLGA-DTX	Nanopartículas de PLGA com TPGS contendo docetaxel
PLGA-PEG-DTX	Nanopartículas de PLGA-PEG com TPGS contendo docetaxel
PLGA-PLC-DTX	Nanopartículas de PLGA – Coprolactona com docetaxel
PSA	Do inglês “ <i>Próstate Specific Antigen</i> ”
PSD	Polímero – Do inglês “ <i>Polysulfadimethoxine</i> ”
PTEN	Do inglês “ <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i> ”
PVDF	Filtro de Fluoreto de Polivinilideno
R	Rendimento
R123	Rodamina 123
R7	Peptídio de Penetração Celular
RDC 166	Resolução da Diretoria Colegiada 166 sobre Validação de Métodos Analíticos
RES	Do inglês “ <i>Rethiculo Endothelial System</i> ”
SHBG	Do inglês “ <i>sex-hormony-binding-globulin</i> ”
TEM	Fotomicrografias de Transmissão Eletrônica
TGA	Termogravimetria
TPGS	D-alfa Tocoferol Polietilenoglicol 1000 Succinato

LISTA DE SÍMBOLOS (opcional)

α	Alfa
Σ	Somatório
TM	Trademark
®	Marca Registrada
©	Copyright

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Lista de figuras	III
Lista de tabelas	IV
Lista de abreviaturas e siglas	V
Lista de símbolos	

1. INTRODUÇÃO	1
1.1.Câncer de próstata	2
1.1.1. Estágios do Câncer	3
1.1.2. Diagnóstico e progressão da doença	3
1.2. Docetaxel.....	6
1.3. Sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados	8
1.4. Nanopartículas poliméricas.....	10
1.5. PLGA (co-polímero do ácido lático e glicólico)	11
1.6. PLGA-PEG	12
1.7. TPGS	13
1.8. Mecanismo de internalização e liberação do fármaco	14
1.9. Planejamento Fatorial	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos gerais.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Materiais	20
3.1.1 Matérias Primas	20
3.1.2. Linhagem Celular	20
3.1.3. Equipamentos e Acessórios	21
3.2. Métodos	22
3.2.1. Preparo das nanopartículas poliméricas de PLGA e PLGA-PEG com TPGS sem fármaco e com fármaco pela técnica da nanoprecipitação	22
3.2.2. Planejamento Experimental.....	22
3.2.3. Análise da distribuição dos tamanhos de partícula e índice de polidispersão	25
3.2.4. Análise do potencial zeta	26
3.2.5. Método analítico para quantificação de docetaxel	26

3.2.6. Determinação da eficiência de encapsulação de DTX, capacidade de carga e rendimento do processo (R).....	28
3.2.7. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	29
3.2.8. Análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	30
3.2.9. Análise por termogravimetria (TGA):.....	30
3.2.10. Calorimetria exploratória diferencial (DSC):	30
3.2.11. Espectroscopia de infra-vermelho com transformada de fourier (IV-TF):.....	30
3.2.12. Estudos de Estabilidade	31
3.2.13. Experimentos de cultivo celular	31
3.2.14. Análise de <i>uptake</i> celular por microscopia confocal.....	32
3.2.15. Análise de <i>uptake</i> celular por citometria de fluxo	33
3.2.16. Análises de citotoxicidade.....	34
3.2.17. Análises Estatísticas.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.2. Planejamento experimental e análise da distribuição média dos tamanhos de partícula índice de polidispersão e potencial zeta.....	38
4.1. Validação Analítica para quantificação de docetaxel.....	44
4.3. Análise de eficiência de encapsulação (EE), capacidade de carregamento (cc) e rendimento do processo (R).....	47
4.4. Caracterização das nanopartículas por NTA e fotomicrografias de transmissão eletrônica	50
4.5. Análise por termogravimetria (TGA):.....	52
4.6. Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC):.....	53
4.7. Espectroscopia de infra-vermelho transformada de fourier (IV-TF):.....	55
4.8. Estudos de Estabilidade	59
4.9.1. Caracterização da linhagem celular	63
4.9.2. Análise de <i>uptake</i> celular por microscopia confocal.....	64
4.9.3. Análise de <i>uptake</i> celular por citometria de fluxo	67
4.9.4. Ensaio de Citotoxicidade	70
5. CONCLUSÕES:.....	76
6. REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1.Câncer de próstata

O câncer de próstata, segundo a Organização Mundial da Saúde, é o segundo tipo de câncer que acomete homens sendo o quarto tipo considerando homens e mulheres e até 2040 estima-se que haverá 29,5 milhões de novos casos no mundo. Aproximadamente 70% dos casos de morte ocorrem em países em desenvolvimento e um terço dos casos são devido a fatores comportamentais como má alimentação, uso de tabaco e álcool e falta de exercícios físicos. No Brasil, o câncer de próstata também é o segundo tipo mais comum entre os homens (atrás apenas do câncer de pele não-melanoma). A taxa de mortalidade é em torno de 20% perdendo apenas para o câncer de Pulmão (INCA, 2018, WHO, 2019).

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino que produz fluidos que ajudam o homem a transportar os espermatozoides durante o orgasmo masculino. Considerada um órgão estéril pois não possui flora normal, ela fica localizada na frente do reto e embaixo da bexiga composta de duas importantes estruturas a glândula epitelial e o estroma fibro muscular. A glândula epitelial é constituída de três tipos celulares, basal, neuroendócrina e a lumina. Essas células expressam receptores androgênicos, E-caderinas, integrinas e também o *prostate-specific antigen* (PSA) entre outras substâncias. Já o estroma fibro muscular é composto de fibroblastos, células dentríticas, células endoteliais, mastócitos, linfócitos e células nervosas (OMABE; EZEANI, 2011). A **Figura 1** ilustra o sistema reprodutor masculino e a localização da próstata, figura original reportada da National Cancer Institute (www.cancer.gov).

Figura 1: Sistema reprodutor masculino.

Fonte : National Cancer Institute (www.cancer.gov).

1.1.1. Estágios do Câncer

O câncer de próstata é dividido em 4 estágios da doença: o primeiro estágio é caracterizado por ser encontrado dentro da próstata sem acometimento de membranas, sendo livre de ações hormonais, assintomático na maioria dos casos ou minimamente sintomático. Neste estágio não há recomendação de quimioterápicos e o tumor é submetido a uma *brachyterapia* que é a inserção de micro agulhas radioativas colocadas sob orientação radiológica para emitir radiação às células afetadas pelo câncer. No segundo estágio o câncer de próstata está aumentado em relação ao primeiro, mas ainda não acomete membranas. No terceiro estágio o tumor já acomete membranas e começa a ter um contato com o meio externo, no quarto estágio o tumor apresenta metástases podendo acometer outros órgãos. Os sintomas desses estágios são sintomáticos podendo apresentar dor ao urinar, modificações no volume urinário e no número de vezes ao se urinar, inchaço da próstata entre outros. Do segundo ao quarto estágio o tratamento é composto por uma associação entre prostatectomia e/ou terapia de privação androgênica para reduzir os níveis de testosterona ou a remoção cirúrgica dos testículos para abaixar ou bloquear os andrógenos circulantes e/ou associadas a radioterapia e/ou quimioterapia e o medicamento de primeira escolha nesses tratamentos é o docetaxel (DTX) (GANJU et al., 2014).

1.1.2. Diagnóstico e progressão da doença

Desde o final da década de 1980 que o teste de PSA foi identificado e aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como um marcador diagnóstico para o câncer de próstata. O PSA é uma serina protease glicoproteica que promove a motilidade espermática via degradação de proteínas semenogelinas I e II. É produzido por células epiteliais e podem estar elevados no contexto de câncer de próstata, no entanto outras doenças também apresentam o mesmo marcador como em hiperplasia benigna da próstata, inflamação e infecção prostática e infarto prostático entre outras. E portanto há controvérsias e divergências sobre qual nível de PSA deveria ser induzida uma biópsia e por isso os exames retais (toque) ainda são muito utilizados e cálculos randomizados foram desenvolvidos com a finalidade de melhorar o diagnóstico. O estudo europeu randomizado para câncer de próstata (ERSPC) é um dos testes desenvolvidos e mais utilizados para auxiliar nas decisões sobre biópsia e também para avaliar índices de mortalidade e prognósticos da doença (BARRY; L.H., 2017; FERRO et al., 2016).

Alguns pesquisadores sugerem que existem alguns fatores que podem contribuir para o início do câncer de próstata, tais como a idade, a alimentação e o histórico familiar. Contudo, estima-se que um quinto dos casos de câncer de próstata podem ser resultados de inflamação crônica devido a agentes infecciosos ou fatores ambientais (OMABE; EZEANI, 2011).

É bem conhecido que as próstatas de homens mais velhos apresentam um espectro de lesões caracterizadas por atrofia do epitélio e as vezes alterações estromáticas. Esses focos contêm células com índice proliferativo aumentado em relação ao epitélio normal e geralmente estão associados com infiltrados inflamatórios que levam o nome de *Proliferative Inflammatory Atrophy* (PIA). Estima-se que um quinto dos casos de câncer de próstata são resultantes e surgem destas inflamações crônicas. Estes focos atróficos são lesões regenerativas, como evidenciado pela sua baixa taxa de apoptose e alta taxa de proliferação e são frequentemente encontrados adjacentes ao adenocarcinoma ou próximos a neoplasia intraepitelial prostática. Causas hipotéticas de PIA incluem resposta a infecção, trauma celular devido aos danos oxidativos, autoimunidade ou alterações relacionadas com hipóxia, tendo a expressão aumentada de glutathione-S-transferase (GST)-P1 e (GST)-A que são enzimas de desintoxicação de compostos muitas vezes carcinogênicos, o que sugere que essas lesões possam ficar sujeitas a maior estresse oxidativo, liberando radicais livres que podem reagir com outros compostos do micro ambiente como os fosfolipídios levando a alterações genômicas permanentes, pontos de mutação, deleções e outros que consequentemente levam a danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA). No entanto a perda de defesas contra espécies reativas geradas durante a inflamação podem aumentar a probabilidade da transição de PIA para o carcinoma de próstata (OMABE; EZEANI, 2011; PLATZ; MARZO, 2004).

O crescimento do câncer é dependente do balanço entre células que se proliferam e células que morrem. Os hormônios andrógenos são os principais reguladores deste balanço, estimulando a proliferação e inibindo a apoptose. A testosterona, principal andrógeno masculino circulante produzido pelos testículos se liga a albuminas e globulinas de ligação a hormônios sexuais (SHBG). Mas uma pequena fração fica livre solúvel no soro e essas, assim, entram nas células de próstata e ao entrarem são convertidas em dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α redutase. A DHT é 5 vezes mais potente que a testosterona em se ligar nos receptores androgênicos. Estes receptores estão localizados no citoplasma da célula de próstata e essa ligação resulta em fosforilação, dimerização e translocação do complexo para o núcleo onde se ligam aos receptores androgênicos do DNA, o qual por sua vez ativa a transcrição de genes específicos necessários ao crescimento, sobrevivência, desenvolvimento das células da próstata e também produção de PSA (FELDMAN; FELDMAN, 2001; OMABE; EZEANI, 2011).

Portanto os hormônios androgênicos regulam as via de ativação de crescimento das células e podem se tornar oncogênicos e a **Figura 2** mostra a ação androgênica da testosterona:

Figura 2: Ação androgênica da testosterona.

Fonte: Figura do artigo de (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

No entanto existem muitos outros mecanismos de desregulação na célula que podem levar ao estado cancerígeno, como os que não são dependentes de hormônios androgênicos, como por exemplo a mutação das enzimas glutathione transferases já citadas como enzimas de desintoxicação intracelular, esta é uma das primeiras e mais comum alteração genômica do câncer de próstata. A expressão aumentada dos receptores androgênicos faz com que a sensibilidade do mesmo esteja aumentada e ele responde inclusive em baixíssimas doses hormonais (FELDMAN; FELDMAN, 2001; GANJU et al., 2014). Alguns fatores de crescimento também podem atuar nos receptores androgênicos estimulando a proliferação celular mesmo quando há ausência dos hormônios andrógenos. Pode haver também a super expressão do membro receptor das tirosinas-quinases o receptor (HER-2) que podem ativar genes dependentes de receptores androgênicos que atuam na ausência dos andrógenos. O trastuzumabe (Herceptin) - um anticorpo monoclonal contra HER-2 / neu - foi desenvolvido como agente terapêutico para bloquear essa via, mas atualmente ele é prescrito para câncer de mama. A via proteína quinase-B (AKT) também pode estar ativada na progressão do tumor. A proteína AKT fosforila e inativa várias proteínas que são pró-apoptóticas como a BAD e prócaspases. A AKT é inativada pela proteína (*phosphatase and tensin homolog*) PTEN que é uma fosfatase lipídica supressora tumoral que ao inibir a AKT permite que as células entrem em apoptose, no entanto a PTEN geralmente está inativada no tumor. Essas vias citadas são

vias que dependem dos receptores androgênicos no entanto podem se desenvolver alternativamente à ausência de hormônios androgênicos (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

Diversos caminhos mostram como as células malignas podem controlar o crescimento celular e o aparecimento dos tumores. Medidas terapêuticas precisam resgatar as células dos mecanismos diversos afim de restaurar a regulação normal do crescimento, ou pelo menos bloquear a estimulação anormal que estimula o crescimento celular (FELDMAN; FELDMAN, 2001). Tais abordagens já estão sendo desenvolvidas, como exemplificado pelo uso dos medicamentos parenterais de docetaxel, paclitaxel, trastuzumabe para o tratamento de câncer e o uso de terapias combinadas. Já existe também aprovado pela FDA e também pela Anvisa o medicamento Abraxane que consiste em um sistema nanoestruturado entre paclitaxel e albumina sem solventes tóxicos e com eficácia para o tratamento de câncer de mama, pulmão, pâncreas e está sendo investigado uso para outros tipos de tumores sólidos por apresentar maior eficácia com riscos menores de morte justificando o uso de sistemas nanotecnológicos para o tratamento de câncer em geral (KUNDRANDA; NIU, 2015).

1.2. Docetaxel

O DTX, representado na Figura 3, é um taxano, insolúvel em água, portanto uma molécula hidrofóbica, cuja síntese inicia-se a partir do 10-deacetil baccarina III, que é isolado da espécie *Taxus baccata*. Suas propriedades físico-químicas principais são: peso molecular de 807,89 g/mol, a formula molecular é $C_{43}H_{53}NO_{14}$, o ponto de fusão é 232 °C e absorve na região do ultravioleta em 230 nm (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/148124>). Após sua liberação intracelular ocorre uma hidroxilação no grupo metila na cadeia C13 que é oxidada e convertida em sua forma cíclica que é a responsável por se ligar aos microtúbulos, inibindo a desmontagem do fuso, promovendo a estabilização destes durante a fase G2 da mitose, o que leva ao impedimento da divisão celular causando o início da apoptose das células cancerígenas e também a interrupção de vias que dependem dos microtúbulos. O docetaxel também atua na supressão dos receptores androgênicos que ativam a oncogênese (ANTO; CASSINELLO; CARBALLIDO, 2016; CLARKE et al., 1999; GANJU et al., 2014). Ele também é responsável por induzir a fosforilação da proteína Bcl-2 inativando-a. A Bcl-2 se liga na Bax uma proteína pró apoptótica e ao se ligar a ela inibe a apoptose, com a fosforilação da Bcl-2 a proteína Bax pode continuar a apoptose pela via das caspases (PIENTA, 2001). O metabolismo do DTX ocorre no fígado via citocromo P450, principalmente pelas isoformas CYP3A4 e CYP3A5. O

DTX é uma das primeiras escolhas para o tratamento do câncer metastático nas fases 3 e 4 da doença (GANJU et al., 2014; MUSUMECI et al., 2006).

Quimioterápicos da classe dos taxanos o qual incluem docetaxel, paclitaxel e carbazitaxel são os mais comumente utilizados como agentes anti-tumorais. Eles são efetivos contra um amplo range de tipos de cânceres como ovário, pulmão, cabeça e pescoço, esofágico, próstata e mama. A maior dificuldade dos taxanos é sua baixa solubilidade em água e portanto a necessidade de utilização de excipientes para melhorar a biodisponibilidade deles, como os tensoativos que conferem níveis de toxicidade indesejados. A formulação utilizada atualmente de docetaxel é um medicamento injetável com o fármaco em sua forma livre, na concentração de 40 mg/mL e o tensoativo utilizado é o tween ®80 (polissorbato 80) que apresenta diversos efeitos tóxicos (MUSUMECI et al., 2006). Além disso ele também pode oferecer resistência clínica significativa. A quimioresistência é um fator importante que limita o seu uso. Por isso as nanoformulações direcionadas ao alvo tumoral exibem excelentes mecanismos para superar a resistência ao fármaco além do que elas podem reduzir a dose de fármaco utilizada, minimizam efeitos colaterais, aumentam o acúmulo do fármaco intra celular e promovem a liberação sustentada (GANJU et al., 2014).

Os principais mecanismos de resistência ao DTX podem ser ocasionados principalmente por alterações genéticas subsequentes dos microtubulos, alteração na via de receptor androgênico, ou aumento do efluxo do fármaco, o que diminui sua concentração intra-celular, devido ao aumento da expressão de proteínas transportadoras de efluxo como ATP-binding cassette (ABC) ou a glicoproteína P-gp ou ainda através da expressão de genes como MDR1, ABCB1 que controlam a expressão dessas proteínas (GANJU et al., 2014).

A fim de tentar diminuir os mecanismos de resistência ao fármaco, melhorar a biodisponibilidade, diminuir dosagem e a toxicidade, sistemas de liberação nanoestruturados tem sido muito utilizados, pois aumentam a internalização do fármaco e oferecem diversas vantagens frente aos sistemas convencionais.

Figura 3 : Estrutura química do DTX.

Fonte: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/148124>).

1.3. Sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados

Sistemas de liberação convencionais de quimioterápicos, cirurgias, radiações, imunoterapias são as ferramentas mais utilizadas no combate ao câncer de próstata. No entanto, com relação ao tratamento com quimioterápicos, alguns fatores, como a alta toxicidade, a baixa biodisponibilidade oral, efeitos de primeira passagem, baixa solubilidade aquosa, baixo índice terapêutico, não especificidade na distribuição do fármaco e na liberação tanto em células normais quanto cancerígenas de sistemas convencionais fazem com que novos e eficientes tratamentos sejam necessários para diminuir os efeitos indesejados, melhorar a biodisponibilidade e diminuir as taxas de morbidade e mortalidade. Uma solução eficaz para contornar esses problemas pode ser possível através dos sistemas de liberação nanoestruturados (ABRIATA et al., 2017; ELOY et al., 2016; MASOOD, 2016; OLIVEIRA et al., 2010, 2014; SHARMA et al., 2015; TORCHILIN, 2012).

Sistemas de liberação nanoestruturados são capazes de controlar propriedades biológicas como por exemplo melhoram a farmacocinética do fármaco, melhorando sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção e também diminuem efeitos indesejados. Essas propriedades são possíveis devido a características importantes destes sistemas que oferecem potencialidades ao fármaco, dentre elas, o tamanho nanométrico confere maior estabilidade no meio de liberação, auxilia na passagem por barreiras celulares ou barreiras hemato-eciduais e estes sistemas nanométricos são capazes de extravasar nos tumores sólidos, onde o endotélio capilar é defeituoso, acumulando-se passivamente no local, através do efeito de retenção e permeação que estão aumentados no tumor, conhecido como efeito de retenção e permeação ao

tumor ou *enhanced permeability and retention effect* (EPR). Estas características permitem a redução de efeitos colaterais sistêmicos do fármaco, diminuem efeito de primeira passagem e adicionalmente, o fármaco pode ser liberado de forma sustentada a partir da nanopartícula, o que leva a manutenção de níveis plasmáticos, com a possibilidade de aumento do intervalo entre aplicações das doses. Além disso, a encapsulação do fármaco em nanopartículas confere maior proteção a ele frente a degradações químicas e enzimáticas. As nanopartículas também oferecem maior estabilidade aos mecanismos de resistência ao fármaco por aumentarem a sua internalização celular (ABRIATA et al., 2017; DING; ZHU, 2018; GANJU et al., 2014; GIODINI et al., 2017; TANG et al., 2015).

Segundo trabalhos prévios existem diferenças significativas entre nanopartículas com taxanos e estas moléculas livres. As nanopartículas liberam o fármaco de forma lenta e sustentada havendo diferenças portanto de dosagem e de tempo de exposição do fármaco, sendo que na nanopartícula o tempo de exposição é maior e a dosagem, em relação ao fármaco livre, menor. Estes estudos revelaram que as nanopartículas são menos tóxicas a células de fibroblastos normais do que as células tumorais devido ao tempo de crescimento das células serem diferentes e também menos fibroblastos encontram-se em divisão mitótica comparado as células tumorais (WANG et al., 2014).

A **Figura 4** esquematiza os principais benefícios advindos dos nanocarreadores de sistemas de liberação sustentados. Em ordem no sentido anti horário os principais benefícios são evasão do sistema imunológico, diminuição do clearance pelo sistema reticulo endotelial (RES), redução do volume de distribuição (redução de dosagens), aumento da biocompatibilidade e consequentemente redução da toxicidade, acúmulo do fármaco por efeito EPR e aumento no tempo de circulação sanguínea (GIODINI et al., 2017).

Figura 4: Principais benefícios dos sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados.

Fonte : Figura do artigo de (GIODINI et al., 2017).

1.4. Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são comumente utilizadas como sistemas de liberação nanoestruturados. Podem ser preparadas pela técnica da nanoprecipitação, onde polímeros e fármacos são dissolvidos em um solvente polar e miscível em água sendo então a solução adicionada a uma solução aquosa contendo tensoativo. As nanopartículas são formadas pela rápida difusão do solvente e precipitação do polímero formando a nanopartícula (FESSI, 1989). Na medida em que o solvente se difunde e o polímero precipita na forma de nanocápsulas ou nanoesferas, as nanopartículas obtidas são tipicamente caracterizadas por um tamanho bem definido e uma distribuição de tamanho estreita, para isso, parâmetros importantes devem ser ajustados para a melhor formação das nanopartículas, como concentração dos componentes, peso molecular dos polímeros, razão da fase orgânica/fase aquosa, velocidade da mistura, dinâmica de fluidos, por exemplo o aumento da concentração de polímeros pode aumentar a viscosidade da suspensão e consequentemente o tamanho das nanopartículas (CRUCHO; BARROS, 2017).

Com relação as características físico-químicas, as nanopartículas poliméricas requerem um tamanho menor que 200 nm, com tamanho desejado em torno de 100 nm devido ao efeito EPR de tumores sólidos, com índice de polidispersão baixo, menor que 0,2 e um potencial zeta

negativo afim de se evitar a opsonização e captação pelo sistema RES e maior que 30 mV em módulo a fim de evitar a agregação das nanopartículas em suspensão (GANJU et al., 2014).

A principal vantagem da técnica de nanoprecipitação é a facilidade de processamento, a reprodutibilidade, a formação sem exposição a condições drásticas de agitação ou temperatura e também é bastante aplicado a moléculas hidrofóbicas como é o caso do DTX, além disso, a técnica permite a produção de nanopartículas com alta eficiência de encapsulação e com tamanhos reduzidos (DING; ZHU, 2018). A **Figura 5** ilustra esquematicamente os possíveis sistemas de nanopartículas poliméricas formados, as nanoesferas ou nanocápsulas.

Figura 5: Esquematização de uma nanopartícula polimérica que pode ser nanocápsulas ou nanoesfera.

Fonte : Figura do artigo de (MIRANDA; RITA; FIGUEIRAS, 2014)

1.5. PLGA (co-polímero do ácido láctico e glicólico)

O co-polímero do ácido láctico e glicólico (PLGA) representado na **Figura 6** é um dos polímeros mais utilizados como material biodegradável na preparação de nanopartículas, devido à sua biocompatibilidade e biossegurança. O PLGA é aprovado pela FDA como um carreador efetivo para a liberação de fármacos. A composição da proporção entre os monómeros dos ácidos lácticos e glicólicos está correlacionada com a hidrofiliicidade e consequente taxa de hidratação do polímero sendo que o ácido glicólico é mais hidrofílico, o que é atribuído a ausência de grupos metilas. Assim, maiores quantidades de ácido glicólico na composição do polímero estão relacionados a uma maior captação de água e consequentemente maior erosão e degradação da partícula (LAKKIREDDY; BAZILE, 2016). A composição do polímero que foi utilizado é de 50:50 de ácido láctico e glicólico. Essa é a concentração mais utilizada em trabalhos publicados com a mesma finalidade (FONSECA, 2002; MU; FENG, 2003; PRESS, 2017).

A massa molecular do polímero também pode influenciar na taxa de degradação da partícula. Polímeros de alto peso molecular possuem cadeias poliméricas longas, e portanto, maior tempo de degradação em relação a polímeros de cadeias curtas. No entanto, a injeção intravenosa de nanopartículas de PLGA sem nenhuma modificação de superfície sofrem rapidamente um *clearance* sistêmico devido a ligação do PLGA com proteínas plasmáticas (opsoninas) presentes no soro sanguíneo e consequentemente sua captura por macrófagos de órgãos como fígado e baço, conhecido como sistema reticulo endotelial ou RES (LAKKIREDDY; BAZILE, 2016). Desta forma, uma estratégia para evadir do RES comumente descrita na literatura é a modificação do polímero com polietilenoglicol (PEG).

A hidrólise do PLGA forma metabólitos como o ácido lático e o ácido glicólico. E através do ciclo de Krebs, esses monómeros são endogenamente metabolizados em simples produtos como CO₂ e H₂O. (SHARMA et al., 2015)

Figura 6 : Estrutura química do co-polímero de ácido lático e glicólico 50:50 (PLGA).

Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/805726>.

1.6. PLGA-PEG

O polietilenoglicol (PEG) é uma molécula não iônica, hidrofílica, que possui alta biocompatibilidade, tem a finalidade de revestir a superfície da nanopartícula, sendo uma das técnicas mais empregadas de modificação de superfície. O PLGA ligado ao PEG poli(ácido lático-co-ácido glicólico)-peguilado (PLGA-PEG) representado na **Figura 7** permitem a evasão do sistema fagocítico mononuclear do RES e promovem assim um aumento no tempo de meia vida plasmática da nanopartícula. Presume-se que este mecanismo se dá pela repulsão estérica causada pelo PEG criada pelas barreiras hidratadas presentes na superfície das nanopartículas que previnem as mesmas da opsonização.

A alta hidrofiliabilidade ao redor das nanopartículas torna difícil as interações destas com macromoléculas presentes no corpo. É observado também que moléculas de PLGA-PEG possuem alta massa molecular, longas cadeias, sendo absorvidas em menor taxa,

comparativamente a outros polímeros, resultando em um aumento no tempo de residência da nanopartícula no organismo humano. No entanto ele não só previne interações com as opsoninas do sistema RES mas também previne interações entre nanopartículas e a superfície celular de células tanto do fígado como outras, o que pode diminuir o *uptake* celular, sendo uma desvantagem em potencial (SHARMA et al., 2015).

O uso de carreadores (em geral) com modificações de superfície em nanopartículas permite importantes resultados como o aumento no tempo de meia vida plasmáticas na circulação sanguínea. Melhorando assim a biodistribuição, seja por uma modificação ativa ou passiva, melhorando também respostas dependentes de estimulações fisiológicas como pH, temperatura o que permite uma melhor liberação intra-celular e também atuar em áreas como detecção de imagens com contrastes para ressonâncias magnéticas ou tomografias. O PEG além de ser um polímero protetor, possui uma série de propriedades como excelente solubilizante, alta flexibilidade de cadeia polimérica, baixa toxicidade e tem mínima influência nas propriedades biológicas celulares (TORCHILIN, 2012).

Figura 7: Estrutura química do poli(ácido lático-co-ácido glicólico)-peguilado (PLGA-PEG).

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2925222>.

1.7. TPGS

O D-alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS), representado na **Figura 8** é um produto que tem origem natural derivado da vitamina E e do PEG, possui uma natureza anfifílica sendo a cabeça polar hidrofílica e uma cauda apolar, o que o caracteriza como tensoativo. A presença da vitamina E é crucial para a manutenção da reação de oxidação celular e ela é um composto lipossolúvel com isoformas entre tocoferóis e tocotrienóis, o que torna o TPGS biocompatível pois os tocoferóis também são encontrados no organismo humano (CHOUDHURY et al., 2017).

O TPGS pode ter diversas funções no combate aos mecanismos de resistência a múltiplos fármacos de células cancerígenas, pois ele pode atingir a mitocôndrias das células resultando em desestabilização mitocondrial e ativação de mediadores apoptóticos, o que induz

atividade apoptogênica inclusive de forma seletiva a alguns tipos de câncer e isso também pode levar a uma depleção de ATP no espaço intra-celular. A diminuição do ATP intra celular pode diminuir o e-fluxo de fármacos mediados pela proteína transportadora P-gp pois a proteína P-gp depende da hidrólise do ATP pela ATP-ase para a conversão da proteína transportadora P-gp em seu estado conformacional ativo para o e-fluxo do fármaco. É conclusivo que o TPGS inibi a P-gp mas outros mecanismos de inibição dela ainda estão sendo estudados (YANG et al., 2018).

No preparo das nanopartículas, o tensoativo TPGS, pode ser usado como um excelente emulsionante, uma vez que pode facilitar a solubilização de fármacos hidrofóbicos, melhorando a absorção deles e aumentando a citotoxicidade e biodisponibilidade dos fármacos quimioterápicos (TAO et al., 2013).

Figura 8: Estrutura química do D-alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS).

Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/57668>.

1.8. Mecanismo de internalização e liberação do fármaco

Os principais mecanismos associados à internalização celular e subsequente acúmulo no interior da célula ou nos compartimentos celulares podem ser não direcionadas e/ou direcionadas com ligantes alvo e ambas representam uma estratégia para modular a captação celular de nanopartículas. As nanopartículas poliméricas apresentam rotas de internalização não direcionadas com base no efeito de retenção e captação tumoral (efeito EPR como já foi citado). A membrana plasmática desempenha um papel crítico na captação por endocitose, regulando funções importantes de adesão, comunicação e divisão celular. A endocitose envolve a geração de novas vesículas intracelulares fechadas pela membrana à partir da membrana plasmática com uma internalização concomitante de lipídios, proteínas, fluido extracelular e outros componentes. O tamanho, a morfologia, a carga superficial e as propriedades mecânicas

(cinéticas) das nanopartículas já citadas anteriormente podem influenciar na eficiência da captação celular não direcionada, facilitando melhores resultados terapêuticos (YAMEEN et al., 2014).

Após a internalização da nanopartícula na célula o primeiro mecanismo que ocorre para a liberação do fármaco é a formação de poros na nanopartícula devido a absorção de água e consequente difusão do fármaco por gradiente de potencial químico, em seguida pode haver convecção, onde a pressão osmótica direciona o fármaco bombeando o mesmo para fora da nanopartícula e dentro da célula. Devido ao intumescimento, mais poros são formados havendo a dissolução do polímero bem como sua erosão, hidrólise e consequentemente a dissolução do fármaco evidenciando que mais de um mecanismo ocorre na taxa de liberação do fármaco. Devido a uma degradação heterogênea o perfil de liberação não é de ordem zero e sim apresenta fases distintas formando uma liberação sustentada. Isso sem contar a liberação burst que ocorre primeiro e relaciona-se ao fármaco não encapsulado mas presente na superfície da nanopartícula (SHARMA et al., 2015).

Estudos indicam que a principal via de captação das nanopartículas é por via endossítica, no qual vesículas endossíticas precoces captam as nanopartículas e estas possuem um pH fisiológico. Nesse pH as nanopartículas manteriam sua carga líquida negativa e portanto seriam repelidas pelas membranas endossômicas carregadas negativamente também e assim seriam capturadas por endossomos e lisossomos tardios que são ácidos com pH em torno de 4-5 e neste pH as nanopartículas teriam um potencial catiônico líquido e também interagiriam com as membranas carregadas negativamente não por ruptura das vesículas endo-lisossômicas mas pela desestabilização localizada da membrana endo-lisossômica no ponto de contato com a nanopartícula, seguida pela extrusão da mesma através da membrana o que leva a fuga da nanopartícula para o compartimento citoplasmático e então os fármacos encapsulados podem ser liberados lentamente apresentando um efeito sustentado demonstrado neste artigo pela liberação de dexametasona de nanopartículas de PLGA (PANYAM et al., 2002). Outro estudo também mostrou a internalização via endocítica de nanopartículas de PLGA-PEG em células tumorais intestinais, neste caso houve fluorescência semelhante após uma hora e quatro horas de incubação e uma pequena queda em 24 horas sendo a fluorescência de 58,4%; 58,0% e 39% respectivamente para 5 μ M da substância isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugada a nanopartícula de PLGA-PEG (ZHIRNIK et al., 2018).

1.9. Planejamento Fatorial

Para o desenvolvimento da formulação foi utilizada a ferramenta de planejamento experimental por Box Behnken, onde múltiplos fatores são variados ao mesmo tempo, conferindo respostas diferentes analisadas estatisticamente (SINGH et al., 2014). O planejamento experimental tri modal provê vantagens significativas frente ao planejamento monomodal convencional, pois permite a variação concomitante de dois ou até mais parâmetros para avaliação de um resultado específico, dessa forma há a diminuição do número de experimentos relacionados ao estudo proposto além de proporcionar avaliação da proporção de cada variável nas respostas analisadas (GÜNDOĞDU et al., 2017).

O Box-Behnken é um desenho experimental fracionário de dois níveis com um design de bloco incompleto e em cada bloco, um certo número de fatores é colocado em todas as combinações enquanto que outros são mantidos nos níveis centrais. O fato de ter três níveis que podem ser codificados como -1 (baixo), 0 (médio) e +1 (alto) cria um designe quadrático e independente que fornece uma maneira mais fácil de organizar e interpretar os resultados (GÜNDOĞDU et al., 2017).

Com base no exposto, nanopartículas poliméricas de PLGA e de PLGA-PEG com TPGS podem representar uma estratégia promissora para melhorar a biodisponibilidade do DTX e sua eficácia no tratamento do câncer de próstata. Considerando a relevância da incidência do câncer de próstata no Brasil e também no mundo justifica-se a importância deste projeto.

2.1. Objetivos gerais

O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas de PLGA e PLGA-PEG com TPGS para encapsulação de DTX e a caracterização segundo análises físico-químicas. Após a caracterização as amostras foram testadas *in vitro* quanto a internalização celular e a citotoxicidade em células de câncer de próstata DU 145.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Preparação das nanopartículas pela técnica de nanoprecipitação;
- ✓ Otimização das nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG utilizando a ferramenta de planejamento experimental por Box Behnken;
- ✓ Avaliação do tamanho das nanopartículas e PDI pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS);
- ✓ Avaliação do potencial zeta da formulação por espalhamento de luz eletroforético;
- ✓ Validação do método analítico segundo RDC 166 com a avaliação da linearidade, seletividade, precisão e exatidão, limites de detecção e de quantificação;
- ✓ Avaliação da eficiência de encapsulação pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência;
- ✓ Avaliação das imagens das partículas controle e com fármaco por microscopia eletrônica de transmissão;
- ✓ Avaliação do tamanho das partículas e concentração de partículas por Análise de rastreamento (NTA);
- ✓ Avaliação da curva calorimétrica por calorimetria diferencial exploratória (DSC) de matérias primas e formulações controle e com fármaco;
- ✓ Avaliação da termogravimetria de matérias primas e formulações controle e com fármaco;
- ✓ Avaliação dos espectros de infra-vermelho por espectroscopia do infra-vermelho com transformada de Fourier (IV-TF) de matérias primas e formulações controle e com fármaco;
- ✓ Estudo de estabilidade coloidal das formulações controle e com fármaco de PLGA e PLGA-PEG
- ✓ Avaliação da internalização celular (*uptake*) por microscopia confocal de fluorescência e citometria de fluxo;
- ✓ Avaliação da citotoxicidade em células de câncer de próstata (linhagem DU-145).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1 Matérias Primas

- Acetona -Synth
- Acetonitrina, grau HPLC – Lichrosolv
- Água MilliQ (filtro Gradient) – Millipore
- DAPI – Sigma Aldrich
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma Aldrich
- Docetaxel P.A. (DTX) - APIchem
- Docetaxel genérico comercial injetável – Eurofarma
- Fluoromount – Sigma-Aldrich
- Fosfato de sódio bibásico heptahidratado P.A. Synth
- Fosfato de sódio monobásico – monohidratado . P.A. Synth
- Hidróxido de sódio P.A. – Synth
- KBr - Synth
- Meio de cultura RPMI 1640 – Sigma Aldrich
- Metanol, grau HPLC – Honeywell
- Paraformaldeído – Sigma Aldrich
- PLGA-50/50 co-polímero do ácido láctico e glicólico – Lactel Birmingham Polymers, Inc.
- PLGA-PEG poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)-peguilado – Resomer D 50105 – *Boehringer Ingelheim*
- Resazurina – Sigma Aldrich
- Rodamina 123 – Sigma Aldrich
- Solução de antibiótico contendo 10.000 U de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina - Sigma Adrich
- Soro Fetal Bovino – Gibco
- TPGS - D-alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 succinato – Basf e Sigma Aldrich
- Tripsina – Gibco

3.1.2. Linhagem Celular

- DU 145 – ATCC® HTB-81™

3.1.3. Equipamentos e Acessórios

- Analisador de rastreamento de partículas nanosight mod. NS 300 - Malvern Instruments
- Analisador termogravimétrico 4000 – Perkin Elmer;
- Balança analítica AdventureTM - Ohaus
- Balança analítica AUW220D - Shimadzu
- Banho ultrassônico – Quimis
- Calorímetro Exploratório Diferencial (DSC) Jade – Perkin Elmer
- Capela de fluxo laminar cell logic- Labconco
- Centrífuga 5430R – Eppendorf
- Citômetro de Fluxo - LSR Fortessa - BD
- Coluna LiChroCART® 250-4 mm RP-18 (5 µm)
- Cromatógrafo à líquido de alta eficiência ® modelo Dionex UltiMate 3000 - Thermo Fischer Scientific acoplado a um detector de arranjo de diodos e injetor automático
- Espectrofotômetro de infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR) IRTracer-100-Shimadzu
- Estufa de cultivo celular – Panasonic
- Leitor de microplacas synergy 2 - Biotek
- Leitor de partícula e potencial zeta Zetasizer-ângulo de detecção 173° Nano ZS– Malvern Instruments
- Liofilizador L101 - Liotop
- Medidor de Ph DM 20 – Digimed
- Mesa agitadora magnética MAG 15 – Marte
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 20 a 200 µL; 100 a 1000 µL e 1 a 5 mL – Finn timer ou eppendorf
- Microscópio Confocal SP 8 – Leica
- Microscópio Eletrônico de Varredura JEM – 100 CX2- JEOL
- Pré coluna LiChroCART®-4 mm RP-18 (5 µm)

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo das nanopartículas poliméricas de PLGA e PLGA-PEG com TPGS sem fármaco e com fármaco pela técnica da nanoprecipitação

As nanopartículas poliméricas foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação (FESSI, 1989), que consiste na mistura da fase orgânica (contendo fármaco e copolímero solúveis no solvente orgânico acetona) com a fase aquosa (contendo tensoativo solúvel em tampão fosfato 30mM pH 7.4). Para preparação da fase orgânica, diferentes quantidades do polímero PLGA ou PLGA-PEG de acordo com o item 3.2.2 de planejamento experimental ou formulações otimizadas foram solubilizados em acetona, sob agitação magnética a 600 rpm por 1 hora contendo ou não DTX. A fase aquosa, composta por tampão e o tensoativo TPGS, permaneceu também em agitação magnética por 1h a 600 rpm. A fase orgânica foi então vertida sobre a fase aquosa, objetivando a formação das nanopartículas. Para eliminação do solvente orgânico (acetona), os sistemas foram deixados em temperatura ambiente controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por 24h aproximadamente ou até que toda a acetona fosse evaporada, sob agitação magnética a 600 rpm. A **Figura 9** ilustra o processo de obtenção das nanopartículas poliméricas pela técnica de nanoprecipitação.

Figura 9: Ilustração do processo de nanoprecipitação para obtenção das nanopartículas poliméricas.

Fonte : Figura adaptada do artigo (ZHANG et al., 2014).

3.2.2. Planejamento Experimental

O método de Box Behnken escolhido para o planejamento experimental utilizou as seguintes variáveis para as nanopartículas sem fármaco, razão fase aquosa: fase orgânica, quantidade de polímero PLGA ou PLGA-PEG e a quantidade de TPGS. As quantidades

mínimas médias e máximas estão demonstradas nas **Tabelas 1 e 2** e foram escolhidas segundo levantamento bibliográfico de trabalhos prévios e também são variáveis que podem influenciar nas propriedades das nanopartículas (BELETSI; PANAGI; AVGOUSTAKIS, 2005; CHENG et al., 2007; SUN et al., 2014; TANG et al., 2015; ZHAO; FENG, 2014). Essas propriedades são as respostas escolhidas, tais como, distribuição dos tamanhos de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta que são especificações técnicas características das nanopartículas (LEPELTIER; BOURGAUX; COUVREUR, 2014). A primeira etapa do delinamento foi a seleção de 15 formulações de acordo com as **Tabelas 3 e 4** seguindo as quantidades determinadas pelo programa Box-Behnken, e após a avaliação das respostas uma formulação ideal foi gerada por meio de uma metodologia de otimização de respostas pelo software Minitab e outros ensaios de caracterização físico-química foram conduzidos.

Tabela 1: Níveis mínimo, médio e máximo das variáveis utilizadas no Planejamento experimental por Box Behnken para as formulações de PLGA.

Níveis	Fator	Razão FA:FO	Quantidade de PLGA (mg)	Quantidade de TPGS %
Mínimo	-1	3	60	0,2
Médio	0	2	90	0,4
Máximo	+1	1	120	0,6

Tabela 2: Níveis mínimo, médio e máximo das variáveis utilizadas no Planejamento experimental por Box Behnken para as formulações de PLGA-PEG.

Fator	Quantidade de Fase orgânica (mL)	Quantidade de PLGA – PEG (mg)	Quantidade de TPGS (mg)
-1	5,0	120	15
0	10,0	180	20
+1	15,0	240	25

Tabela 3: Combinações fatoriais do planejamento experimental por Box Behnken para PLGA.

Formulação	Razão FA:FO	Quantidade de PLGA	Quantidade de TPGS
1	-1	0	-1
2	0	+1	-1
3	-1	0	+1
4	-1	+1	0
5	+1	+1	0
6	+1	-1	0
7	+1	0	+1
8	0	0	0
9	0	-1	-1
10	0	0	0
11	0	-1	+1
12	-1	-1	0
13	0	+1	+1
14	0	0	0
15	+1	0	-1

Tabela 4: Combinações fatoriais do planejamento experimental por Box Behnken para PLGA-PEG.

Formulação	Quantidade de Fase Orgânica	Quantidade de PLGA-PEG	Quantidade de TPGS
1	0	-1	-1
2	0	-1	+1
3	0	+1	-1
4	0	+1	+1
5	-1	0	-1
6	-1	0	+1
7	+1	0	-1
8	+1	0	+1
9	-1	-1	0
10	-1	+1	0
11	+1	-1	0
12	+1	+1	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

3.2.3. Análise da distribuição dos tamanhos de partícula e índice de polidispersão

A determinação da distribuição dos tamanhos das nanopartículas poliméricas foi realizada segundo a técnica do espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS), no equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern, com ângulo de detecção de 173° e temperatura de trabalho de 25°C. Para tanto as nanopartículas poliméricas foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) com água Milli Q e submetidas à análise obtendo-se assim os valores de diâmetro médio das nanopartículas poliméricas distribuídas por intensidade representadas pelo índice de polidispersão.

A partícula em movimento na suspensão, iluminada pelo feixe de luz do equipamento, como um laser, espalha-se em todas as direções devido ao movimento browniano, a análise dessas flutuações de intensidade da luz espalhada é que vai fornecer a distribuição do tamanho hidrodinâmico médio das partículas (BHATTACHARJEE, 2016).

3.2.4. Análise do potencial zeta

O potencial zeta das nanopartículas foi determinado em todas as formulações em aparelho Zetasizer Nano ZS da Malvern, através da técnica de espalhamento de luz eletroforético, em temperatura de 25°C. Para a realização deste procedimento as nanopartículas em suspensão foram diluídas em água Milli-Q na concentração de 100 vezes para as amostras de PLGA e 200 vezes para PLGA-PEG. Em seguida, as amostras foram colocadas em células capilares e inseridas na câmara de análise. Um campo elétrico é aplicado a dispersão e as partículas carregadas se movem em direção ao eletrodo oposto (princípio da eletroforese). Dentro dessa camada difusa, existe um plano que atua como a interface entre as partículas em movimento e a camada de dispersante ao seu redor durante a eletroforese. Este plano hidrodinâmico que possui carga residual (e não a carga direta da partícula) é que confere o potencial zeta (BHATTACHARJEE, 2016).

3.2.5. Método analítico para quantificação de docetaxel

As condições cromatográficas foram validadas a partir de método já existente no grupo para quantificação de DTX. Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (marca Thermo Fischer Scientific® modelo Dionex UltiMate 3000), acoplado a um detector de arranjo de diodos e injetor automático. A coluna empregada foi a LiChroCART® 250-4 mm RP-18 (5 µm) com pré coluna 4-4 mm de mesmo modelo e material. A fase móvel foi constituída de metanol:água:acetonitrila na proporção de 60:25:15 (v/v/v), a vazão utilizada foi de 0,8 mL/min, o comprimento de onda foi em 232 nm, o tempo de retenção do fármaco correspondeu a 6,2 min e a temperatura foi de 25°C±1 (Raspantini, Giovanni Loureiro).

O método foi revalidado de acordo com as diretrizes da ANVISA (Resolução - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 – “Guia para validação de métodos analíticos”) e do ICH (International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use – guia Q2R1 incorporado em novembro de 2005).

3.2.5.1. Seletividade

A seletividade do método analítico foi demonstrada por meio da identificação ou quantificação do analito de interesse, sem interferências de outros componentes que podem estar presentes na amostra. Foi avaliada a seletividade do método de acordo com as

formulações obtidas com os polímeros utilizados PLGA e PLGA-PEG sem o fármaco DTX, filtradas em fluoreto de polivinilideno (PVDF) e também no filtro amicon de acordo com o procedimento de avaliação da eficiência de encapsulação afim de se avaliar se há sobreposição de sinais no tempo de retenção do fármaco.

3.2.5.2. Linearidade

A linearidade do método foi demonstrada por meio da capacidade de se obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito. Para isso 6 (seis) concentrações diferentes do padrão para as soluções foram preparadas em triplicata de maneira independente (0,25; 0,50; 1,00; 5,00 10,00 µg/mL em acetonitrila) sendo utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe do padrão (100 µg/mL). Para avaliação da linearidade, foi realizada a representação gráfica das respostas em função da concentração do analito; o gráfico de dispersão dos resíduos (homocedasticidade), a equação da reta de regressão linear de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados; e o coeficiente de determinação (r^2).

3.2.5.3. Precisão e Exatidão

A precisão foi expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula " $DPR=(DP/CMD) \times 100$ ", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. A repetibilidade foi avaliada pela obtenção de 3 amostras de cada uma das 6 concentrações, preparadas de forma independente, em um mesmo dia e em seguida da mesma maneira em 3 dias diferentes. Foi considerado preciso o método cujo o DPR intermediário (intra dia) e o da repetibilidade (inter dias) for inferior a 5% em todos os pontos analisados.

A exatidão de um método analítico é obtida por meio da comparação entre os resultados individuais do método em estudo com relação a um valor referência conhecido como o verdadeiro $\times 100$. Ela deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível. Mas quando a exatidão é determinada a partir de um método anteriormente validado, deve-se considerar cada concentração do analito. Os resultados foram expressos em forma de recuperação para cada concentração do analito (C) onde

$$(C\%) = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração teórica}} \times 100).$$

3.2.5.4. Limites de detecção e quantificação

O Limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ter o sinal detectado. Ele é calculado pela fórmula $(LD) = \frac{3,3 \times \text{desvio}}{\text{Coeficiente angular}}$. E o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas e é calculado pela fórmula $(LQ) = \frac{10,0 \times \text{desvio}}{\text{Coeficiente angular}}$.

3.2.6. Determinação da eficiência de encapsulação de DTX, capacidade de carga e rendimento do processo (R).

A eficiência de encapsulação foi obtida através de 3 etapas:

A primeira etapa consiste da separação dos nanocarreadores, do fármaco livre não encapsulado, através da filtração de 500 µL da suspensão (por filtração em filtro de 0,45 µm) e em seguida em filtro amicon 10Kda, que quantifica o DTX solúvel não encapsulado na formulação, em centrífuga eppendorf. A segunda etapa consiste na quantificação do fármaco encapsulado mais o fármaco livre solúvel não encapsulado, através da filtração em 0,45 µm da suspensão e 20 µL deste filtrado é solubilizado em acetonitrila na diluição de 50 x e passa por sonicação antes de ser quantificado a fim de quebrar possíveis estruturas e liberar o fármaco. A terceira etapa consiste da quantificação do fármaco total, onde 20 µL da suspensão sem filtrar é diluído em acetonitrila (50 x) e também passa por sonicação.

Após estes procedimentos de análise e quantificação de cada etapa a eficiência de encapsulação (EE), em porcentagem, foi obtida por meio da seguinte equação:

$$EE(\%) = \frac{(\mu\text{g DTX filtrado em } 0,45\mu\text{m} - \mu\text{g DTX solúvel})}{\mu\text{g DTX na fração total}} \times 100$$

As nanopartículas para análise de eficiência de encapsulação (EE) foram preparadas por método descrito no item 3.2.1. e analisadas em HPLC sob as condições analíticas descritas no item 3.2.5. e com preparo de amostra conforme descrito acima.

Para a avaliação da capacidade de carga e rendimento (R) da formulação as mesmas foram liofilizadas sem crioprotetor, no equipamento liofilizador (L101- Liotop) por 2dias.

A capacidade de carregamento ou carga (CC) foi obtida à partir da relação entre a massa de fármaco encapsulada obtida pela fração filtrada e o valor obtido de fármaco livre solúvel dividido pela massa de formulação recuperada após a liofilização, expresso em porcentagem (DIMCHEVSKA et al., 2017a).

$$CC(\%) = \frac{(\mu\text{g DTX filtrado em } 0.45\mu\text{m} - \mu\text{g DTX solúvel})}{\text{Massa de formulação recuperada}} \times 100$$

O rendimento (R) da formulação foi avaliado através da razão entre a massa total de sólidos da formulação (recuperada após a liofilização) e a massa pesada de cada componente da formulação evidenciando as possíveis perdas no processo de manipulação, o cálculo do rendimento segue a seguinte equação :

$$R(\%) = \frac{(\text{massa total da formulação liofilizada})}{\text{Soma das massas dos componentes da formulação}} \times 100$$

3.2.7. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento de nanopartículas – *Nanoparticles Tracking Analysis* (NTA) é uma técnica utilizada para visualizar e analisar partículas em dispersões líquidas, realizada no equipamento NanoSight NS300, Malvern. Com software utilizado é possível identificar e analisar, em tempo real, o movimento browniano de cada nanopartícula presente na dispersão e, com isso, determinar a distribuição dos tamanhos da nanopartícula por meio da equação de Stokes-Einstein (LUO et al., 2017). As amostras foram diluídas em proporções previamente testadas (sendo 5.000 x para as formulações controle e 10.000 x para as formulações contendo DTX de PLGA e PLGA-PEG) em água Milli Q e inseridas no compartimento de análise por meio de seringa, com temperatura de trabalho de 25°C. As amostras foram avaliadas na faixa de laser de 635 nm sendo as análises realizadas em quintuplicata.

3.2.8. Análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para a determinação da morfologia das nanopartículas suspensas. Para este procedimento 10 µL das amostras foram colocadas em uma grade revestida de cobre de 300 mesh. Em seguida, foram coradas com uma gota de acetato de uranila a 2% p/v e secas completamente à temperatura ambiente para posterior execução da análise microscópica que foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM100CXII cujas as imagens foram obtidas com uma câmera digital Hamamatsu ORCA HR e através do software Camera Configurator 5.6.

3.2.9. Análise por termogravimetria (TGA):

A análise por termogravimetria foi realizada a uma razão de aquecimento de 20 °C/min, na faixa de 30°C à 400 °C. O equipamento empregado foi um Perkin Elmer modelo TGA 4000. Por meio dessa técnica, foi possível determinar a temperatura de início da degradação térmica e a variação de massa em função do aumento da temperatura.

3.2.10. Calorimetria exploratória diferencial (DSC):

Esta técnica fornece informações sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância e/ou formulação, fornecendo dados sobre as temperaturas de transição ou de mudança de fases dos componentes analisados (MANNE et al., 2016). Com este objetivo, as amostras foram liofilizadas, pesadas em recipiente de alumínio e, sob atmosfera de nitrogênio, foram aquecidas na faixa de 20 a 300 °C a uma velocidade de aquecimento correspondente a 10°C/minuto. Após a realização desta análise, os dados foram submetidos ao Software Pyris do equipamento modelo JADE-DSC (Perkin Elmer) para posterior interpretação dos resultados obtidos.

3.2.11. Espectroscopia de infra-vermelho com transformada de fourier (IV-TF):

A técnica de espectroscopia de infra-vermelho é uma técnica muito sensível e específica, que fornece informações completas sobre a composição química de amostras em geral. A técnica pode oferecer informações estruturais fundamentais e servir como uma ferramenta de análise quantitativa para avaliar se há possíveis interações reacionais. A técnica identifica na

região do infra vermelho (próximo, médio e distante) todas as reações vibracionais entre cada molécula (BRUYNE et al., 2018).

As análises de espectroscopia de infra-vermelho com transformada de Fourier foram realizadas em equipamento Prestige-21 Shimadzu IR Tracer 100, sendo estas realizadas sob resolução de 2cm^{-1} , de 400 a 4000 cm^{-1} . Para essa análise, as formulações liofilizadas com e sem fármaco, os adjuvantes, insumos e o DTX, foram prensados em pastilhas com KBr, e avaliadas pela técnica de IV-TF para comparação.

3.2.12. Estudos de Estabilidade

Os estudos de estabilidade físico-química da formulação foram realizados por durante 28 dias à temperatura de 4°C . Formulações controle (CTRL) e com fármaco (DTX) de PLGA e PLGA-PEG foram realizadas em triplicata sendo avaliado os dados de distribuição de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, e eficiência de encapsulação conforme metodologia já descrita nos itens **3.2.3.**; **3.2.4.** e **3.2.6.**

Os estudos foram avaliados estatisticamente conforme descrito no item **3.2.17.**

3.2.13. Experimentos de cultivo celular

O cultivo celular da linhagem DU 145 de câncer de próstata foi realizada em meio RPMI suplementado com 10% p/p de soro fetal bovino com 1% p/p de antibiótico/antimicótico, contendo 10^4 unidades internacionais de penicilina e 10mg/mL de streptomycin. Cultivadas em garrafas de cultivo celular próprias para aderência e estas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO_2 e umidade controlada. A curva de crescimento celular foi estabelecida em 10 dias sendo tripsinizadas e contadas consecutivamente. A tripsinização consiste de lavagem com tampão fosfato salino (PBS) pH 7.4 para retirada de todo o meio de cultivo RPMI, seguido da adição da enzima tripsina na diluição 2x, incubação na estufa e adição novamente de meio RPMI afim de inativar a ação da tripsina. A linhagem foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa (UNESP) de origem da American Type Culture Collection.

3.2.14. Análise de *uptake* celular por microscopia confocal

Para o ensaio de microscopia confocal nanopartículas CTRL de PLGA e PLGA-PEG foram produzidas contendo rodamina 123. A rodamina 123 (R123) é um corante que se acumula em membranas principalmente nas mitocôndrias e são usadas para monitorar o potencial elétrico mitocondrial de células vivas, emitindo fluorescência durante a síntese de ATP das mitocôndrias (BARACCA et al., 2003). A rodamina 123 foi diluída na fase aquosa na concentração de 5 µg/mL e a solução de PLGA ou PLGA-PEG em acetona foi vertida sobre essa fase aquosa para formação da nanopartícula. As formulações de cada nanopartícula controle foram nomeadas de PLGA-CTRL-R123 e PLGA-PEG-CTRL-R123.

As células DU 145 foram plaqueadas em placas de 12 poços contendo 1 mL de meio com 1×10^4 células por poço sob uma lamínula adicionada previamente a cada poço. As placas permaneceram incubadas por 24h em condições de cultivo (37°C / 5% CO₂ e umidade controlada). Após 24 horas de cultivo, o meio de cultura foi removido e 1 mL da suspensão de nanopartículas CTRL de PLGA e de PLGA-PEG (contendo rodamina 123) diluídas na concentração de 1000 nM em meio RPMI foi adicionado nos tempos de 1h, 4h e 24h de internalização e as placas foram incubadas novamente nas mesmas condições de cultivo celular.

Após os tempos de internalização, os tratamentos foram removidos e os poços lavados com 2 mL de PBS, de modo a remover toda a formulação dos poços. Em seguida, as células das lamínulas foram então fixadas por 10 minutos utilizando-se 1 mL de solução aquosa de paraformaldeído a 2%(p/v). Após os 10 min de fixação os poços foram lavados novamente com PBS e em seguida 30 µL de uma solução de DAPI (3µg/mL) foram adicionados a lamínula e mantida em repouso por 10min. Uma última lavagem (com PBS) foi realizada e as lamínulas foram colocadas em uma lâmina histológica contendo fluoromount para a manutenção da fluorescência. As lâminas foram fotografadas em microscópio confocal de fluorescência Leica TCS SP8, utilizando um aumento de 40x e os comprimentos utilizados foram de excitação de 511 nm e emissão de 534 nm para a rodamina 123 e de 405 e 413-472 nm para o DAPI. O DAPI é um corante marcador dos núcleos celulares.

3.2.15. Análise de *uptake* celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia que utiliza vários marcadores fluorescentes para identificar e caracterizar populações de interesse celular, permitindo análises em dezenas de milhares de células por segundo. Os citômetros de fluxo utilizam lasers como fontes de luz para produzir sinais de luz dispersos e fluorescentes que são lidos por detectores como fotodiodos ou tubos fotomultiplicadores registrando as populações que estão marcadas com corantes diversos que emitem fluorescências (MACIOROWSKI; CHATTOPADHYAY; JAIN, 2017).

Nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG contendo rodamina 123, preparadas da mesma maneira que na análise por microscopia confocal, foram diluídas na concentração de 1000nM e foram analisadas em três tempos diferentes sendo 1h, 4h e 24h de internalização.

Para o plaqueamento celular 1 mL de uma suspensão de células DU 145 à 5×10^5 células/mL foi adicionada em placas de 12 poços e as placas ficaram incubadas por 24h em condições de cultivo (37°C / 5% CO_2 e umidade controlada) até adesão e formação da monocamada. Em seguida os tratamentos foram removidos e 1 mL da suspensão de nanopartícula (contendo rodamina 123) sem fármaco diluída na concentração de 1000 nM em meio de cultivo foi adicionado nos tempos de 1h, 4h e 24h e a placa incubada novamente nas mesmas condições de cultivo celular. Após os tempos estabelecidos os tratamentos foram removidos e os poços lavados com 2mL de PBS, de modo a remover a formulação dos poços. Em seguida as células foram tripsinizadas com 500 μL de tripsina 2x e incubadas, nas mesmas condições de cultivo, por 4 minutos, em seguida a tripsina foi neutralizada com o meio de cultura e foram removidas da placa para análise no citômetro de fluxo.

No citômetro de fluxo em cada amostra foi adicionado o iodeto de propídio (PI). O iodeto de propídio é uma molécula que se intercala ao DNA da célula mas ele não entra em membranas de células vivas e só consegue se internalizar em células que estão em degradação celular cuja as membranas estão rompidas, portanto células mortas em apoptose ou necrose (ERAY et al., 2001). Os comprimentos de excitação e emissão para a rodamina 123 foi de 511 nm e 534 nm e do iodeto de propídio foi de 488 nm e 670 nm.

3.2.16. Análises de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi avaliado através da viabilidade celular após tratamentos aplicados nas células e também em termos de IC₅₀, concentração em que apenas 50% das células apresentam viabilidade celular. Nestes casos utilizamos a resazurina como revelador. A resazurina é um corante azul, fracamente fluorescente e redutível a resofurina, um corante vermelho/rosa com alta fluorescência na região do vermelho. A resazurina é internalizada e é reduzida na mitocôndria que está em atividade, na presença de NADH ou NADPH que é o catalizador da reação resazurina em resofurina, marcando portanto células que estão vivas (BUENO et al., 2002)

Para a execução do protocolo, o plaqueamento celular foi realizado em placa de 96 poços sendo que em cada poço foi adicionado 100µL de uma suspensão celular à 10⁵ células/mL de forma que cada poço recebeu 1x10⁴ células. Foram plaqueadas para cada tratamento, sextuplicata de poços os quais foram incubados em condições de cultivo (37°C/5%CO₂ e umidade controlada).

Após a formação da monocamada celular por 24h, os meios de cultura foram removidos. Cada poço foi lavado com PBS e em seguida foram adicionados tratamentos, todos diluídos em meio RPMI da seguinte forma:

Grupo A) Controle negativo (células sem nenhum tratamento, somente meio de cultura RPMI)

Grupo B) Controle positivo (adição de DMSO 30%, p/p)

Grupo C) formulação comercial de DTX

Grupo D) Nanopartículas CTRL (PLGA e PLGA-PEG sem fármaco)

Grupo E) Nanopartículas com DTX (PLGA e PLGA-PEG com DTX)

De acordo com ensaios do próprio grupo de pesquisa da FCF-USP-RP o fármaco comercial foi avaliado nas seguintes concentrações diluídas em meio de cultura RPMI: 1nM; 10nM; 25nM; 50nM; 75nM; 100nM; 500nM e 1000nM.

As nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG com fármaco foram avaliadas nas concentrações de: 1nM; 5nM; 10nM; 15nM; 20nM; 25nM; 35nM e 50nM diluídas em meio de cultura RPMI. E as formulações controle foram adicionadas o mesmo equivalente em número de partículas de cada concentração avaliada.

Após 24 e 48h de tratamento, os mesmos (tratamentos) foram retirados e os poços foram lavados com 100 µL de PBS e em seguida foi realizada a adição da solução de

resazurina na concentração de 25µg/mL que permaneceu em reação por durante 4h, em seguida foi realizada leitura em equipamento Synergy 2 da Biotek. A fluorescência na faixa do vermelho foi excitação no comprimento de onda em 570 nm e emissão em 600 nm.

3.2.17. Análises Estatísticas

A maioria dos testes estatísticos utilizados foram testes não paramétricos pois a distribuição dos dados não seguem uma distribuição gaussiana principalmente devido ao número de amostragens ser inferior a 20 e não sendo possível a elaboração de uma curva padrão de distribuição normal. Nestes casos também a mediana é uma representação melhor dos dados do que a média (GRECH; CALLEJA, 2018).

O teste não paramétrico de Kruskal Wallis tem como hipótese nula que as medianas avaliadas são iguais, não havendo diferença entre elas e a hipótese alternada é que há diferença nas medianas. O p sendo $> 0,05$ aceita a hipótese nula (HAZRA A., 2016b). Este teste foi delineado para comparar as diferenças entre os tempos analisados em ensaios diversos, sendo utilizado na correlação entre os tempos nos estudos de estabilidade de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação nos estudos de estabilidade e também nos ensaios de citometria de fluxo na comparação dos tempos de 1,4 e 24h. E no ensaio de citotoxicidade para a comparação dos IC-50 entre 24h e 48h de cada amostra de PLGA e PLGA-PEG

O teste de Wilcoxon pareado foi um teste complementar que compara duas amostras pareadas, comparando a amostra controle com a amostra contendo o fármaco, a hipótese nula indica que mediana de x e a mediana de y é zero e para isso $p > 0,05$ (HAZRA A., 2016b). Ele foi utilizado nos estudos de estabilidade para comparar a variação entre os grupos controle e o grupo da formulação com fármaco nas análises de estabilidade coloidal das nanopartículas.

Quanto ao método da regressão linear, onde neste caso a hipótese nula é que o coeficiente angular não seja diferente estatisticamente de 0 e assim a relação linear não se aplica entre as duas variáveis estudadas e a hipótese alternada é que o coeficiente é diferente estatisticamente e ai sim haveria correlação linear entre as variáveis o que neste caso não é desejado (HAZRA A., 2016a). Ele foi utilizado para corroborar os dados no estudo de eficiência de encapsulação, sendo complementar ao teste de Kruskal Wallis.

O teste de Mann-Whitney é aplicado às amostras com tamanho pequeno, distribuição não normal e grupos não pareados. Desta forma, ele é a versão não paramétrica

do teste t. A maior separação dos dados em conjunto indica que as amostras são distintas, rejeitando-se a hipótese de igualdade das medianas, ou seja $p > 0,05$ (CARMO, 2012). Ele foi utilizado na comparação entre as amostras nos ensaios de *uptake* celular por citometria de fluxo e na comparação do IC 50 no teste de citotoxicidade, entre PLGA, PLGA-PEG e DTX comercial. Neste caso de avaliar o IC 50 entre as nanopartículas e o fármaco livre; o teste de hipótese não foi se as medianas eram iguais, mas sim o quanto a mediana da nanopartícula foi menor que o fármaco livre, sendo calculado então na versão *less than* do programa para o cálculo de p.

O teste Tukey de comparações múltiplas foi utilizado para amostras que atendem uma distribuição normal (o teste Tukey foi aplicado após anova apresentar significância), ele foi aplicado na comparação entre todas as diluições utilizadas e grupos utilizados no teste de citotoxicidade e faz comparação entre todos os pares de médias. Grupos de PLGA foram comparados somente com grupos de PLGA, grupos de PLGA-PEG foram comparados somente com grupos de PLGA-PEG

Todos os testes que foram realizados tiveram nível de significância de 95%,

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2. Planejamento experimental e análise da distribuição média dos tamanhos de partícula índice de polidispersão e potencial zeta.

Os resultados de distribuição média de tamanhos de partícula, PDI e potencial zeta das nanopartículas empregando planejamento experimental por Box-Benkhen para o polímero de PLGA estão apresentados na **Tabela 5**. Foram contempladas as seguintes variáveis: quantidade de polímero (PLGA), % de TPGS, e razão entre fase aquosa e fase orgânica (FA:FO) sendo que a fase aquosa foi fixada em 10 mL que corresponde ao volume final da formulação. Os resultados avaliados, conforme já foi citado, foram distribuição dos tamanhos de partícula, PDI e potencial zeta. A comparação gráfica entre as variáveis e seus respectivos resultados estão mostrados na **Figura 10**.

Tabela 5 – Formulações e resultados obtidos no planejamento fatorial, com variáveis dependentes (quantidade de PLGA, concentração de TPGS e razão de FA/FO)

Formulação	PLGA (mg)	TPGS % p/v	Razão FA/FO	Média dos tamanhos de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
F1	90	0,60	3	173,3	0,109	-54,2
F2	90	0,20	1	120,2	0,031	-47,8
F3	60	0,20	2	101,6	0,111	-47,1
F4	90	0,40	2	132,1	0,213	-54,2
F5	90	0,60	1	146,7	0,161	-49,0
F6	60	0,60	2	99,74	0,153	-42,6
F7	90	0,20	3	186,2	0,206	-51,9
F8	120	0,40	3	124,1	0,176	-60,6
F9	90	0,40	2	133,9	0,178	-62,0
F10	120	0,20	2	152,8	0,171	-64,5
F11	120	0,40	1	128,8	0,068	-47,0
F12	60	0,40	1	124,0	0,099	-48,9
F13	60	0,40	3	126,4	0,144	-50,1
F14	120	0,60	2	146,3	0,108	-56,1
F15	90	0,40	2	124,5	0,093	-54,4

Figura 10: Representação gráfica da influência da razão FA:FO, concentração de TPGS e quantidade de PLGA nas respostas A) média de tamanhos de partícula B) polidispersão C) potencial zeta.

A **Figura 10 A** mostra a relação da média dos tamanhos de partícula em função da razão fase aquosa:fase orgânica FA:FO, quantidade de PLGA e concentração de TPGS. Para o tamanho desejado de 100 nm, a razão ideal de FA:FO foi próxima de 1 e a quantidade de PLGA em torno de 60mg. Com relação a concentração de TPGS, os resultados demonstraram que a concentração próxima de 0,2% resultou em partículas menores quando a razão FA:FO se mantém próxima a 1. Observou-se que maiores razões de FA:FO ou maiores quantidades de TPGS e PLGA produziram nanopartículas maiores que 100 nm em acordo com estudos anteriores que relatam a influência destas variáveis no tamanho de partícula e também no PDI (CRUCHO; BARROS, 2017).

A **Figura 10 B** mostra o comportamento do PDI em função da razão de FA:FO, quantidade de PLGA e concentração de TPGS. Observamos um comportamento similar ao já relatado para tamanho de partícula ou seja a razão FA:FO em torno de 1, a quantidade de PLGA próxima a 60mg e a concentração de TPGS próxima de 0,2% resultaram em menores valores de PDI, apresentando uma distribuição dos tamanhos de partícula mais homogênea nestes

pontos mostrando como o aumento dessas concentrações interferem no tamanho de partícula e no PDI conforme foi citado na introdução.

Com relação ao potencial zeta, o ideal é que ele seja negativo preferencialmente maior que 30mV em módulo para garantir uma melhor estabilidade eletrostática da formulação, dificultando a agregação de partículas. Como todos os resultados apresentados na **Figura 10 C** foram negativos e maiores que 30mV em módulo, consideramos que todas as combinações das variáveis estudadas, de FA:FO, quantidade de PLGA e TPGS, resultaram em valores desejados de potencial zeta. Esta carga negativa é provavelmente resultante dos grupamentos OH presentes no PLGA e PLGA-PEG e que estão parcialmente ionizados em pH 7.4 da formulação (DIMCHEVSKA et al., 2017b).

Os resultados de distribuição dos tamanhos de partícula, PDI e potencial zeta das nanopartículas empregando planejamento experimental para o polímero de PLGA-PEG estão descritos na **Tabela 6**. Contemplamos as variações de quantidade de polímero PLGA-PEG, quantidade de TPGS e quantidade de fase orgânica, sendo que a quantidade da fase aquosa também foi fixada em 10 mL. Essas são as variáveis que podem influenciar as características das nanopartículas como já foi mencionado. Os resultados avaliados também foram distribuição dos tamanhos de partícula, PDI e potencial zeta. A comparação gráfica entre as variáveis e seus respectivos resultados estão mostrados na **Figura 11**.

Tabela 6 - Formulações e resultados obtidos no planejamento fatorial, com variáveis dependentes (quantidade de PLGA-PEG), concentração de TPGS e quantidade de fase orgânica.

Formulação	PLGA-PEG (mg)	TPGS (mg)	Quantidade de fase orgânica(mL)	Média dos tamanhos de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
F1	120	15	10	63,07	0,214	-27,3
F2	120	25	10	56,85	0,099	-27,8
F3	240	15	10	81,56	0,093	-35,1
F4	240	25	10	79,88	0,091	-39
F5	180	15	5	121,8	0,139	-34
F6	180	25	5	112,9	0,153	-29,7
F7	180	15	15	55,87	0,153	-39,5
F8	180	25	15	59,93	0,149	-28,4
F9	120	20	5	75,46	0,102	-32,2
F10	240	20	5	226,5	0,536	-24,8
F11	120	20	15	67,38	0,214	-24
F12	240	20	15	65,05	0,076	-32,2
F13	180	20	10	71,6	0,175	-38,4
F14	180	20	10	69,48	0,126	-34,9
F15	180	20	10	65,94	0,091	-22,4

Figura 11: Representação gráfica da influência da razão FA:FO, concentração de TPGS e quantidade de PLGA-PEG nas respostas A) média de tamanhos de partícula B) polidispersão C) potencial zeta.

Observando a **Figura 11 A** podemos verificar que a relação da média dos tamanhos de partícula em função da, quantidade de PLGA-PEG, quantidade de TPGS e quantidade de fase orgânica (FO). Para uma média de tamanhos desejados de 100 nm. A concentração de PLG-PEG para um tamanho de partícula desejado de 100 nm foi entre 150 mg e 200 mg do polímero. Neste caso verifica-se que o tamanho de partícula aumentou com o aumento da concentração do polímero. A presença de PEG torna o meio mais hidrofílico e pode diminuir a capacidade de encapsulação de fármacos hidrofóbicos que é o caso do DTX justificando a maior concentração de PLGA-PEG em relação as nanopartículas só de PLGA (ALMOUSTAFA; ALSHAWSH; CHIK, 2017). O TPGS pareceu não interferir no tamanho nas concentrações analisadas. E a quantidade de fase aquosa: fase orgânica correspondeu a quantidade de fase orgânica de 5 mL, sendo também expressa pela razão FA:FO igual a (10:5), verificou-se que maiores quantidades de FO poderiam produzir partículas bem menores que 100 nm isso se deve provavelmente ao fato de que maiores concentrações de fase orgânica diminui a viscosidade da suspensão e menores quantidades de fase orgânica deixa a suspensão mais viscosa e mantém as nanopartículas em torno de 100 nm.

A **Figura 11 B** mostra o comportamento do PDI em função da quantidade de fase orgânica, quantidade de PLGA-PEG e quantidade de TPGS. A quantidade de TPGS mostrou

menores resultados de PDI com maiores quantidades de TPGS, cujo máximo estudado foi de 25mg ou 0,25%. A quantidade de TPGS também associada a quantidade de fase orgânica de 5,0 mL, razão FA:FO igual a 2, também mostrou menores resultados em PDI e similarmente menores valores de PDI ocorreram com a quantidade de PLGA-PEG menor que 200 mg.

Com relação ao potencial zeta, a **Figura 11 C** mostra as variáveis estudadas de quantidade de fase orgânica e quantidade de TPGS, resultaram em valores desejados de potencial zeta ou seja valores maiores que 30mV em módulo e com carga negativa. Já para a variável PLGA-PEG, todos os resultados apresentados foram negativos mas alguns apresentaram-se menores que 30mV, para os casos em que a quantidade de fase orgânica correspondeu a 15 mL, ou seja uma razão FA:FO (0,6) mostrando que quantidades menores de FO produziram nanopartículas com potencial zeta maiores em módulo.

Considerando os dados obtidos com a realização do planejamento experimental para os dois polímeros sugeridos, a formulação ideal para o PLGA foi nomeada de PLGA F16 e a composição fornecida pelo estudo foi de 60 mg de PLGA, 0,22% p/v de TPGS, razão FA:FO de 1, sendo o volume final de formulação correspondente a 10 mL e para o polímero PLGA-PEG a formulação foi nomeada de PLGA-PEG F16 e sua composição foi de 160mg de PLGA-PEG, 0,25% p/v de TPGS e razão FA:FO de 2, sendo o volume final de formulação correspondente a 10 mL. Subsequentemente, estas formulações foram preparadas em triplicata e a média dos resultados estão apresentados na **Tabela 7** e a **Figura 12** mostra os gráficos da distribuição dos tamanhos de partícula a) PLGA e b) PLGA-PEG.

Tabela 7 - Resultados obtidos nas análises de distribuição da média de tamanhos de partícula, PDI e potencial zeta para PLGA e PLGA-PEG da formulação de escolha do planejamento experimental.

	Formulação	Média dos tamanhos de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta
Média ± DP	PLGA F16	125,13 ± 1,033	0,07 ± 0,025	- 49,53 ± 2,29
Média ± DP	PLGA-PEG F16	104,17 ± 3,65	0,143 ± 0,038	-35,93 ± 0,63

Figura 12 – Gráficos da distribuição do tamanho de partículas de a) PLGA F16 e b) PLGA-PEG-F16.

Os resultados das formulações otimizadas fornecidas como resultado do planejamento experimental apresentaram-se adequados em relação ao desejado para tamanho de partícula em torno de 100 nm, PDI menor que 0,2 e potencial zeta negativo e em módulo maior que 30mV. Levando-se em conta que o planejamento experimental delineado considera muitas variáveis, os resultados mostraram que o estudo apresentou-se de forma robusta, fornecendo dados que corroboram com as características previstas no planejamento e de acordo com as características e objetivos desejados neste trabalho de pesquisa. Desta forma estas foram as formulações de escolha para a caracterização dos estudos de nanopartículas contendo o fármaco DTX encapsulados. Os resultados de distribuição dos tamanhos de partícula, PDI e potencial zeta das nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG estão coerentes com outros trabalhos formulados. Por exemplo um destes estudos desenvolveu nanopartículas pela técnica de nanoprecipitação à partir de polímeros de PLGA, PLGA-TPGS e também uma formulação com um polímero com formato estrelar PLGA-TPGS-CA (ácido cólico). O ácido colico (CA) é um componente da bile e melhora a compatibilidade de polímeros incorporados a ele e também a penetração nas células. Essas nanopartículas formadas por este polímero estrelar apresentaram uma vantagem em relação as nanopartículas só de PLGA ou PLGA-TPGS em relação ao tamanho de partícula. O tamanho de partícula desta formulação apresentou-se menor que as outras duas formulações. No entanto as outras também se apresentaram dentro do parâmetro recomendado menor que 200 nm (ZENG et al., 2013). Assim, a peguilação da nanopartícula desenvolvida em nosso trabalho com o PLGA-PEG com TPGS, também apresentou tamanhos menores que as de PLGA com TPGS. A distribuição de tamanhos de partícula e o índice de polidispersão de nanopartículas que carregam fármacos desempenham um papel importante na captação celular e na liberação do fármaco, bem como na farmacocinética e biodistribuição. Podem assim ser extravasadas na vasculatura defeituosa do tumor e serem acumuladas pelo efeito conhecido por EPR já mencionado. Com relação ao potencial zeta, os valores apresentados no trabalho citado,

em termos absolutos, foram menores que 30mV porém negativos (ZENG et al., 2013). O potencial zeta maior que 30 em módulo ou em valor absoluto é importante para a estabilidade coloidal das formulações, sendo que ao serem negativos auxiliam na fuga do sistema RES. Os valores de potencial zeta do nosso trabalho tanto de PLGA quanto de PLGA-PEG foram acima de 30 em módulo e negativos. Outros trabalhos de PLGA-PEG também foram compatíveis com relação a tamanho, PDI e potencial zeta. Por exemplo, nanopartículas de PLGA-PEG contendo DTX para tratamento do câncer de mama (células MCF7) também preparadas pela técnica de nanoprecipitação, apresentaram tamanhos de partícula em torno de 125 nm e potencial zeta negativo mas um pouco abaixo de 30 em módulo (RAMANLAL CHAUDHARI et al., 2012).

4.1. Validação Analítica para quantificação de docetaxel

A validação analítica para quantificação de DTX em nanopartículas foi realizada seguindo os parâmetros preconizados pela ANVISA, a partir de método analítico desenvolvido previamente (Anvisa, 2017).

A seletividade foi avaliada mediante análise das amostras de nanopartículas controle, sem fármaco, de PLGA e PLGA-PEG. Os cromatogramas mostraram que não houve interferente no tempo de retenção de 6,2 min, correspondente à eluição do fármaco.

A linearidade mostrou respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do fármaco, apresentando coeficientes de determinação $r^2=0,999$ avaliada entre os limites de 0,25 µg/mL à 10 µg/mL previamente estabelecidos para este método e está representada na Figura 13 e a equação da reta foi $y = 0,5514 x - 0,0888$. Foi também realizado, conforme solicitado na RDC 166 de 2017, o teste de homocedasticidade e observou-se que não há correlação entre a distribuição dos resíduos e os resíduos seguem uma distribuição homocedastica, conforme gráficos apresentados nas **Figuras 14A e 14B**.

A precisão foi expressa por meio da repetibilidade intra dia e inter dia. A **Tabela 8** demonstra a dispersão dos resultados, calculados através do desvio padrão relativo (DPR). As amostras para avaliação da precisão foram preparadas de maneira independente intra dia (em triplicata) e inter dia (por 3 dias) e a variação aceitável foi de no máximo 5. Em função dos resultados apresentados, conclui-se que o método foi preciso nas condições avaliadas.

A exatidão foi expressa pela relação percentual entre a concentração média, determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, sendo a variação

aceitável de $100\% \pm 10$. Conforme observado na **Tabela 8**, a exatidão variou de 98,78% a 105,10%, portanto, mostrando-se adequada.

O limite de detecção representado pela menor quantidade de fármaco que pôde ser detectada na amostra foi de $0,06 \mu\text{g/mL}$ calculado a partir do desvio de coeficiente angular (0,5498). O limite de quantificação, também calculado pelo desvio do coeficiente angular (0,5498) e representado pela menor quantidade de fármaco quantificado em uma amostra com precisão e exatidão aceitáveis, foi $0,181 \mu\text{g/mL}$, sendo bem abaixo do limite mínimo proposto pelo método que é de $0,25 \mu\text{g/mL}$ sob as condições experimentais estabelecidas.

A validação mostrou que o método desenvolvido produziu resultados confiáveis e podem ser utilizados na caracterização do sistema proposto.

Figura 13: Representação gráfica da curva analítica de DTX.

Tabela 8-Valores obtidos na validação analítica para determinação da precisão intra-dia e inter-dia e exatidão.

[] docetaxel µg/mL	Média intra dia 1 µg/mL	Média intra dia 2 µg/mL	Média intra dia 3 µg/mL	Média inter dia µg/mL	DP inter dia	DPR Precisão	Exatidão (%) inter dia
0,25	0,272	0,254	0,262	0,263	0,007	2,7	105,1
0,50	0,542	0,505	0,508	0,518	0,017	3,2	103,6
1,00	1,025	0,984	0,967	0,992	0,024	2,4	99,1
2,50	2,416	2,481	2,511	2,470	0,040	1,6	98,7
5,00	5,017	4,978	5,003	5,000	0,016	0,3	99,9
10,00	9,993	10,083	9,998	10,025	0,041	0,4	100,2

Figura 14: A) Gráfico da distribuição normal dos resíduos do método analítico para a quantificação de DTX.B) Gráfico da distribuição de resíduos do método analítico para a quantificação de DTX.

4.3. Análise de eficiência de encapsulação (EE), capacidade de carregamento (cc) e rendimento do processo (R)

4.3.1. Eficiência de encapsulação

Foram obtidas três formulações com o fármaco DTX na formulação otimizada pelo planejamento experimental com PLGA F16 e com PLGA-PEG F16. As formulações foram preparadas com diferentes concentrações de fármacos que estão relacionadas com a quantidade de polímero da nanopartícula. Para PLGA foram avaliadas as proporções de fármaco em relação ao polímero de 1,0%, 5,0% e 10% e para o PLGA-PEG as proporções foram de 0,5%, 1,0% e 5,0%. As relações de fármaco:polímero que foram sugeridas para o PLGA partiram da relação de 5% já utilizada em trabalhos semelhantes do próprio grupo para DTX. Então a partir de 5% sugerimos um nível abaixo e um acima (1% e 10%) e com base nos resultados de PLGA as proporções foram revistas para PLGA-PEG. Como a relação equivalente a 10% de fármaco em relação ao PLGA não foi eficaz, a proporção de fármaco em relação ao polímero para o PLGA-PEG foi então diminuída para 0,5%, 1,0% e 5,0%. As proporções avaliadas estão relacionadas nas **Tabelas 9 e 10**. Então para PLGA, foram preparadas as nanopartículas F16.1, F16.2 e F16.3 contendo respectivamente 60 µg/mL, 300 µg/mL e 600 µg/mL de fármaco, sendo a quantidade de polímero PLGA fixa em 6000µg/mL e para PLGA-PEG, F16.1, F16.2 e F16.3 contendo respectivamente 80 µg/mL, 160 µg/mL e 800 µg/mL de fármaco com 16.000 µg/mL fixo de polímero PLGA-PEG, com a finalidade de se obter partículas com a menor distribuição de tamanhos e menor índice de polidispersão e potencial zeta negativo e acima de 30 mV em módulo. Além disso, idealmente a eficiência de encapsulação deve ser maior que 70% (DING; ZHU, 2018).

Tabela 9 - Resultados obtidos nas análises de tamanhos de partícula, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação da formulação de escolha do planejamento experimental de PLGA(F16).

Formulação (concentração de DTX)	Potencial Zeta (mV)	Média dos tamanhos de partícula (nm)	PDI	Eficiência de encapsulação (%)
PLGA F16.1 60 µg/mL	-52,33 ± 3,15	153.3 ± 25,45	0.12 ± 0,09	105.12 ± 17,17
PLGA F16.2 300 µg/mL	- 48,00 ± 2,75	127,4 ± 9,8	0,06 ± 0,01	87,5 ± 9,12
PLGA F16.3 600 µg/mL	-50,87 ± 10,41	126.23 ± 7,89	0.21 ± 0,01	13.28 ± 0,78

Tabela 10 - Resultados obtidos nas análises de tamanhos de partícula, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação da formulação de escolha do planejamento experimental de PLGA-PEG (F16).

Formulação (concentração de DTX)	Potencial Zeta (mV)	Média dos tamanhos de partícula (nm)	PDI	Eficiência de encapsulação (%)
PLGA-PEG F16.1 80 µg/mL	-33,37 ± 1,76	114,60 ± 8,13	0,16 ± 0,07	92,64 ± 4,41
PLGA-PEG F16.2 160 µg/mL	-34,73 ± 1,19	105,97 ± 5,16	0,13 ± 0,03	96,78 ± 1,20
PLGA-PEG F16.3 800 µg/mL	-35,50 ± 2,45	101,63 ± 1,94	0,12 ± 0,01	100,21 ± 8,91

Os ensaios de eficiência de encapsulação foram realizados em triplicata e os resultados das formulações de PLGA F16.1 (60 µg/mL) e F16.2 (300 µg/mL) foram acima de 80%, podendo se observar alta eficiência de encapsulação em torno de 100%. A formulação F16.3 (600 µg/mL) não apresentou bons resultados para eficiência de encapsulação de DTX, mostrando que a nanopartícula desenvolvida pode não ser adequada para encapsular quantidades muito elevadas de fármaco. Os resultados obtidos no presente trabalho de alta eficiência de encapsulação estão de acordo com trabalhos prévios. Por exemplo, um estudo preparou nanopartículas de PLGA, PLGA-TPGS e M(manitol)-PLGA-TPGS, contendo a relação de 200 mg de polímero para 20 mg de fármaco DTX e obteve eficiência de encapsulação de DTX equivalente 75%, 84% e 98%, respectivamente, sugerindo uma alta afinidade com o sistema proposto e demonstrando que estes biomateriais são promissores para a liberação *in vitro* e aplicação *in vivo* (TAO et al., 2013).

Os resultados de eficiência de encapsulação das formulações de PLGA-PEG F16.1 (80 µg/mL), F16.2 (160 µg/mL) e F16.3 (800 µg/mL) também foram acima de 80%, podendo se observar alta eficiência de encapsulação em torno de 100% inclusive para quantidades elevadas de fármaco (em torno de 800 µg/mL). No entanto para essa quantidade de fármaco de 800 µg/mL a formulação não se manteve estável visualmente dias após a análise. Considerando um trabalho que apresenta uma compilação de resultados de diversos trabalhos com DTX, com diversos tipos de PLGA-PEG os resultados compilados evidenciaram que o máximo de eficiência de encapsulação foi de 73,53%, sendo que a maioria dos trabalhos apresentou valores de EE menores que 10% utilizando a mesma técnica de nanoprecipitação no entanto com variações nas proporções poliméricas (ALMOUSTAFA; ALSHAWSH; CHIK, 2017). Portanto, os resultados de EE apresentados neste presente trabalho foram bastante elevados.

Para a condução dos ensaios seguintes foi escolhida a formulação de PLGA F16.2 (300 µg/mL) e PLGA-PEG 16.2 (160µg/mL) pois estas apresentaram eficiência de encapsulação acima de 70% sugerindo uma alta afinidade com o sistema proposto e essas concentrações também apresentaram tamanhos de partículas e polidispersão menores, além de estarem mais

próximas da concentração de 200µg/mL que foi utilizada em outros trabalhos do próprio grupo delineados com o mesmo fármaco e também com outros trabalhos prévios (ALMOUSTAFA; ALSHAWSH; CHIK, 2017). A partir deste momento a formulação PLGA F16.2 (300 µg/mL) será nomeada de PLGA-DTX e a formulação PLGA-PEG 16.2 (160µg/mL) de PLGA-PEG-DTX e as formulações controle sem o fármaco serão PLGA-CTRL e PLGA-PEG-CTRL. Após da avaliação da eficiência de encapsulação e definição das formulações PLGA-DTX e PLGA-PEG-DTX estas foram liofilizadas e avaliadas quanto a capacidade de carregamento e avaliação do rendimento do processo.

4.3.2. Capacidade de carregamento e rendimento do processo

A capacidade de carga e o rendimento do processo estão relacionados na **Tabela 11**:

Tabela 11: Resultados obtidos nas análises de capacidade de carga e rendimento do processo.

Formulação (concentração de DTX)	Capacidade de carga real %	Capacidade de carga teórica %	Rendimento do processo (%)	Eficiência de Encapsulação (%)
PLGA-DTX	0,673±0,07	2,2	83,18±0,77	79,15±4,15
PLGA-PEG-DTX	0,725±0,02	0,70	82,75±1,52	77,7±4,41

Pode-se observar que a nanopartícula de PLGA-DTX e PLGA-PEG-DTX obtiveram valores de EE parecidos. A encapsulação de um fármaco depende de vários fatores como o coeficiente de partição entre o núcleo hidrofóbico da partícula e a fase aquosa. A presença de PEG torna o meio mais hidrofílico e pode diminuir a capacidade de encapsulação de fármacos hidrofóbicos que é o caso do DTX (ALMOUSTAFA; ALSHAWSH; CHIK, 2017). No entanto ao avaliarmos a capacidade de carregamento não em termos absolutos mas comparando-se a capacidade de carga real em relação a teórica, a quantidade de fármaco encapsulada foi proporcionalmente maior para o PLGA-PEG-DTX. Pois, a proporção de fármaco em relação a quantidade de polímero é maior para o PLGA-PEG-DTX (1:100) que para o PLGA-DTX (1:20). Ou seja existem mais polímeros disponíveis ao DTX em PLGA-PEG-DTX do que em PLGA-DTX. Estudos discutem que aumentando a concentração do polímero, a agregação dele é aumentada, levando a uma estabilização mais rápida de NPs e a capacidade de carregamento de fármaco é aumentada (DIMCHEVSKA et al., 2017b).

O rendimento do processo foi de 83,18% para o PLGA- e 82,75% para o PLGA-PEG.

4.4. Caracterização das nanopartículas por NTA e fotomicrografias de transmissão eletrônica

Para a caracterização das nanopartículas quanto a análise de rastreamento de nanopartículas – NTA e fotomicrografias de transmissão eletrônica (TEM) foram preparadas nanopartículas controle e com fármaco de PLGA e PLGA-PEG. Estas formulações foram analisadas quanto a distribuição de tamanhos de partícula, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação como forma de controle de qualidade da partícula. Os resultados encontram-se apresentados na **Tabela 12** juntamente com os resultados de NTA quanto a distribuição de tamanhos de partícula e concentração por mL. Adicionalmente, a morfologia das nanopartículas controle e com fármaco foram evidenciadas na **Figura 15**.

Tabela 12: Resultados obtidos nas análises de distribuição de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, EE e NTA de nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG controle e com fármaco encapsulado para avaliação da morfologia das nanopartículas.

Formulação	Potencial Zeta (mv)	Média dos Tamanhos de Partícula (nm)	PDI	Eficiência de Encapsulação	NTA média de tamanhos (nm)	NTA concentração/mL
PLGA-CTRL	-51,8	124,0	0,057	-	112,9	$5,15 \cdot 10^{12}$ / mL
PLGA-DTX	-51,1	122,9	0,053	85,92%	112,1	$9,74 \cdot 10^{12}$ / mL
PLGA-PEG-CTRL	-32,4	90,07	0,096	-	107,9	$4,19 \cdot 10^{12}$ / mL
PLGA-PEG-DTX	-32,4	107,0	0,114	94,31%	122,1	$8,37 \cdot 10^{12}$ / mL

Todas as nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG controle ou com fármaco utilizadas para as análises de NTA e para as fotomicrografias de transmissão eletrônica apresentaram distribuição média de tamanhos de partícula em torno de 100 nm com potencial zeta negativo, PDI abaixo de 0,2 e eficiência de encapsulação acima de 70 %, portanto sendo adequadas a finalidade proposta e também apresentaram distribuição de tamanhos em NTA equivalente aos analisados por DLS e com índice de span menores que 0,55 para todas as formulações preparadas. A concentração de todas as nanopartículas foram por volta de 10^{12} / mL indicando que os processos de obtenção destas com fármaco ou sem fármaco ou com PLGA ou PLGA-PEG apresentam-se uniformes.

Figura 15: Fotomicrografias obtidas na avaliação da morfologia das nanopartículas a) PLGA-CTRL b) PLGA-DTX c) PLGA-PEG-CTRL d) PLGA-PEG-DTX (todos aumento de 200.000).

As fotomicrografias de transmissão (**Figura 15**) mostraram margens bem definidas e arredondadas sem agregação. Em comparação com a literatura outros trabalhos com o polímero PLGA e PLGA-PEG também mostraram nanopartículas com formatos arredondados. A micrografia da nanopartículas apresentadas em outros trabalhos inclusive já citados aqui que são advindas de um polímero não linear com formato estrelar (CA-PLGA-b-TPGS), e também de polímeros lineares de PLGA e PLGA-TPGS também mostraram formatos arredondados e sem agregação (ZENG et al., 2013). Em outro artigo de referência as nanopartículas utilizadas para as micrografias foram obtidas por nanoprecipitação, o tamanho médio foi de 70-200 nm e o formato também foi arredondado (FU et al., 2014).

Em geral a técnica de nanoprecipitação formam nanocápsulas que são caracterizadas como um sistema vesicular no qual o fármaco é comumente disperso no núcleo e é sondado por uma membrana polimérica como revestimento. As nanocápsulas protegem seus fármacos da degradação e aumentam o *uptake* celular enquanto que as nanoesferas produzidas por técnicas mais complexas como *spray-dried* apresentam o fármaco disperso e adsorvido na matriz polimérica. Elas são comumente utilizadas em casos de liberação ativa dos fármacos onde substâncias alvo são expressas na membrana matricial (TALEVI; GANTNER; RUIZ, 2015). As nanopartículas aqui apresentadas parecem ser nanocápsulas devido ao seu formato bem arredondado bem definido as margens da nanopartícula, mas são necessários outros ensaios para a correta afirmação.

4.5. Análise por termogravimetria (TGA):

A análise por termogravimetria possibilita determinar a temperatura de início da degradação térmica e a variação de massa em função do aumento da temperatura. A **Figura 16** mostra as curvas de degradação das amostras e a **Tabela 13** as temperaturas associadas aos picos de degradação de todos os adjuvantes da formulação, incluindo os fosfatos que compoem o tampão pH 7.4 (fosfato de sódio monobásico monohidratado - FSMM) e o fosfato de sódio bibásico heptahidratado - FSBH), o fármaco DTX e as formulações liofilizadas controle e com fármaco.

Figura 16: Representação das curvas termogravimétricas de diferentes amostras.

Tabela 13 - Valores de temperatura (°C) de degradação obtidos no estudos de termogravimetria.

Amostra	Temp. TGA
Nanopartícula de PLGA-CTRL (LF)	317,53 °C
Nanopartícula de PLGA-DTX (LF)	322,68 °C
PLGA insumo	355,53 °C
Docetaxel insumo	221,72 °C
TPGS insumo	396,78 °C
Nanopartícula de PLGA-PEG-CTRL (LF)	323,83 °C
Nanopartícula de PLGA-PEG-DTX (LF)	318,55 °C
PLGA-PEG insumo	357,76 °C
FSMM (Fosfato de sódio Monobásico Monohidratado) insumo	227,74 °C , 344,91 °C
FSBH (Fosfato de sódio Bibásico Heptahidratado) insumo	136 °C

O TGA (**Figura 16**) evidenciou que todos os adjuvantes, as nanopartículas controle e também com fármaco de PLGA e PLGA-PEG são termicamente estáveis até 300°C, enquanto que a degradação do DTX tem início logo após os 200°C conforme evidenciado na **Tabela 13**. Esta característica menos pronunciada nas nanopartículas com fármaco pode indicar que a encapsulação protegeu o fármaco ou que ele está molecularmente disperso nas nanopartículas (ELOY et al., 2016).

4.6. Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC):

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica na qual se realiza a medida do fluxo calorífico diferencial entre uma amostra de estudo e uma de referência como função da temperatura e tempo. As transições térmicas estão relacionadas com as mudanças de estado físico como a transição vítrea, com a degradação das cadeias poliméricas e também com o estado dos materiais se eles são amorfos ou cristalinos (MANNE et al., 2016). A **Figura 17** mostra a representação gráfica das curvas de DSC e picos de temperatura de cada curva de DSC e sua respectiva variação de entalpia para cada adjuvante da formulação, fármaco e formulações liofilizadas.

Figura 17: Representação gráfica de DSC de diferentes amostras.

Pode-se observar nos resultados obtidos que o DTX apresenta um pico endotérmico por volta de 166°C conforme verificado por outros pesquisadores que encapsularam DTX em partículas de PLGA. O pico do DTX não aparece na nanopartícula liofilizada de PLGA-DTX (LF) e também não aparece na nanopartícula liofilizada de PLGA-PEG-DTX (LF), o que pode significar que ele está encapsulado, possivelmente como dispersão molecular conforme também mostrado em trabalhos anteriores (ZENG et al., 2013).

O TPGS apresentou um pico a 37,85°C bastante característico com o observado na literatura (MU; FENG, 2003). Ele não apareceu nas formulações liofilizadas seja controle ou com fármaco nas duas preparações (PLGA e PLGA-PEG) demonstrando a dispersão deste adjuvante na nanopartícula. A curva de DSC de PLGA insumo possui um evento endotérmico por volta de 50°C já previamente descrito (MANOOCHEHRI et al., 2013) picos próximos apareceram nas formulações liofilizadas controle e com fármaco de PLGA. Picos próximos a 50°C também podem ser referentes aos fosfatos utilizados no tampão de preparo das

nanopartículas como pode-se observar nas amostras de sais (insumos) (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). O pico do PLGA a 155°C, não foi reproduzido nas amostras controle liofilizada tanto de PLGA quanto de PLGA-PEG, mas está em acordo com o trabalho prévio (CARRARO et al., 2017).

O polímero PLGA-PEG apresentou um evento endotérmico um pouco mais baixo que o PLGA devido a presença do PEG, que confere um efeito plastificante e apresenta-se por volta de 34°C (LAKKIREDDY; BAZILE, 2016). Essas temperaturas foram observadas tanto nas nanopartículas liofilizadas controle quanto com fármaco (DTX) de PLGA-PEG. Os fosfatos também apresentam pontos próximos a 205°C que indicam a formação de fosfato de sódio hidrogenado com o aumento de temperatura e em até 250°C a decomposição no resíduo final de sódio metafosfato. Esse picos podem ser observados nas formulações controle e com fármaco de PLGA e PLGA-PEG e em torno de 100°C também verifica-se a perda de água dos sais (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

4.7. Espectroscopia de infra-vermelho transformada de fourier (IV-TF):

A espectroscopia de infra-vermelho é uma ferramenta analítica muito utilizada para caracterizar fisicamente as conformações moleculares e arranjos de ligação de um composto orgânico (MONNIER, 2017). O espectro de absorção no infra-vermelho IV-TF foi utilizado para caracterizar eventuais interações entre o fármaco DTX e os polímeros PLGA e PLGA-PEG ou tensoativo TPGS após a nanoencapsulação. Os resultados são mostrados nas **Figuras 18 e 19**.

Figura 18: Gráficos de transmitância em análises de Infra-vermelho para DTX a) DTX e os adjuvantes b) TPGS c) PLGA e d) PLGA-PEG e) FSBH e f) FSMM.

Figura 19: Gráficos de transmitância em análises de infra-vermelho para as formulações a) PLGA-CTRL b) PLGA-DTX c) PLGA-PEG-CTRL e d) PLGA-PEG-DTX.

Espectros de IV-TF de DTX (**Figura 18A**) mostram estiramento característico de amida à 3400 cm^{-1} aproximadamente e de grupos hidroxila na região de $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$. Além disto apresentou estiramentos acentuados de $\text{C}=\text{O}$ de ésteres e também de amidas bastante característico em torno de $1650\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ e ligações $\text{C}-\text{O}$ de éter em 1250 cm^{-1} e ligações de anéis aromáticos em 750 cm^{-1} . Os estiramentos apresentados pelo DTX estão em acordo com sua estrutura molecular e também com a literatura (FAN; CHEN; SHEN, 2013).

O TPGS (**Figura 18 B**) apresentou estiramentos de $\text{C}=\text{O}$ de ésteres bastante característico em torno de $1650\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ e ligações $\text{C}-\text{O}$ de éter e éster em 1250 cm^{-1} e ligações de anéis aromáticos em 750 cm^{-1} . Além disso em 3400 os estiramentos representam hidroxilas terminais da molécula (KOULOUKTSI et al., 2019).

O espectro de IV-TF de PLGA (**Figura 18 C**) apresentou estiramento em torno de $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ característicos de associações poliméricas e também OH associados de acordo com os OH de grupos de ácidos carboxílicos presentes na estrutura do PLGA, além disso o espectro

apresentou em 3000 cm^{-1} estiramento característico de ligações CH₃, CH₂ e CH das cadeias poliméricas. Também foi observado em 1750 cm^{-1} estiramento de ligações de C=O de ésteres e também de ácidos carboxílicos, em 1250 cm^{-1} C-O de éter ou éster (CARRARO et al., 2017), (HUANG et al., 2014), (JOSHI; KUMAR; SAWANT, 2014), (GUPTA et al., 2014). Estes padrões de ligações também foram os mais evidentes nas nanopartículas encapsuladas e liofilizadas controle (**Figura 19 A**) e com fármaco (**Figura 19 B**).

O IV-TF de PLGA-PEG insumo (**Figura 18 D**) apresentou estiramento característico de dímeros poliméricos em torno de 3500 cm^{-1} , vibrações correspondentes a ligações CH₃, CH₂ e CH em 3000 cm^{-1} e apresentou em 1750 cm^{-1} estiramento de ligações de C=O de ésteres e também estiramento em torno de $1100\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ referente a ligações C-O-H (CARRARO et al., 2017), e em torno de 1500 cm^{-1} estiramentos característicos de amidas. O mesmo padrão de ligações se reproduziu nas nanopartículas encapsuladas e liofilizadas controle (**Figura 19 C**) e com fármaco (**Figura 19 D**).

As (**Figuras 18 E e F**) representam os insumos fosfatos utilizados no tampão para a formação das nanopartículas, essas imagens mostram claramente regiões que possam se sobrepor nas nanopartículas liofilizadas como em 3500 cm^{-1} representado pelas ligações O-H das moléculas de água presentes nos fosfatos hidratados cuja fórmula molecular é H₂NaO₄P (fosfato de sódio monobásico monohidratado) e H₁₅Na₂O₁₁P (Fosfato de sódio bibásico heptahidratado) corroborando com os ensaios de DSC que mostram a relação dos fosfatos nas nanopartículas liofilizadas controle e com fármaco.

Pela observação dos espectros de IV foi notado que as principais bandas dos polímeros PLGA e PLGA-PEG e das nanopartícula controle liofilizadas se sobrepõem às bandas do fármaco, sendo os espectros das nanopartículas sem fármaco, idênticos aos espectros das nanopartículas com fármaco. Apesar do polímero ter sobreposto as regiões de estiramento do fármaco, o polímero não mostrou alterações significativas entre as nanopartículas controle e com fármaco o que pode ser um indício de que não houve interações intermoleculares entre eles. O mesmo padrão foi verificado em outro trabalho, onde os picos das nanopartículas com o fármaco também não foram diferentes dos insumos sozinhos tanto de PLGA quanto de DTX mostrando que estes sistemas não demonstraram instabilidades (SOKOL et al., 2019). Os ensaios de DSC associados ao TGA e ao infra-vermelho fornecem dados que corroboram para a conclusão de que o sistema é estável não apresentando interações aparentes.

4.8. Estudos de Estabilidade

As avaliações estatísticas realizadas estão descritas conforme item 3.2.17 de metodologia. Com relação ao tempo entre as amostras os resultados de potencial zeta e distribuição de tamanho de partícula das formulações de PLGA-CTRL e PLGA-DTX apresentaram valores de $p > 0,05$ não apresentando variação estatística significativa. Já a formulação de PLGA-DTX no parâmetro de PDI o valor de p foi $< 0,05$, apesar de constar variação significativa, os valores brutos foram todos menores que a especificação técnica para este parâmetro, não acarretando prejuízos ao estudo de estabilidade. O PDI da formulação de PLGA-CTRL apresentou $p > 0,05$. Os valores médios das variáveis da nanopartícula com fármaco estão descritos na **Tabela 14** e destaca-se que a variação de tamanho de partícula foi de 129 nm à 130 nm, de PDI foi de 0,04 à 0,08 e o potencial zeta variou entre -44mV e -45mV considerando o T0 e o T28 dias. Os valores de p estão apresentados na **Tabela 16**, e quando se compara a variação entre os grupos controle PLGA-CTRL e os grupos de formulações com fármaco PLGA-DTX, os resultados de potencial zeta, distribuição de tamanho de partícula e PDI não mostraram variação estatística com $p > 0,05$. Demonstrando-se assim uma estabilidade do sistema coloidal dentro do prazo estipulado de 28 dias. Os valores de p estão apresentados na **Tabela 17**.

Os gráficos com os valores do estudo de estabilidade de potencial zeta, distribuição de tamanho de partícula e PDI para PLGA-CTRL e PLGA-DTX estão apresentados na **Figura 19 A, 20 A e 21.A** respectivamente.

Para a avaliação da estabilidade da eficiência de encapsulação para PLGA-DTX apresentado na **Figura 22** a variação entre os tempos analisados, apresentou valor de p de 0,833 sendo $>0,05$ não havendo variação significativa entre os tempos avaliados e os resultados médios foram entre 79,29% e 76,48% conforme **Tabela 14**. Nesta tabela é possível avaliar uma oscilação entre os dados de eficiência de encapsulação demonstrando que eles não foram reduzidos ou aumentados progressivamente e sim alternados e por isso foi realizado também para complementação dos dados o teste por regressão linear. O coeficiente angular é a inclinação da reta da distribuição dos dados. A equação foi $y = - 0,103 x + 79,40$ e neste caso o $p = 0,564$ indicou que o coeficiente angular não é estatisticamente diferente de zero, demonstrando a não relação de linearidade das variáveis e a ausência de variação significativa.

As mesmas avaliações foram realizadas para as formulações com PLGA-PEG-CTRL e PLGA-PEG-DTX. Ao serem comparados os tempos dos resultados de potencial zeta, distribuição de tamanho de partícula e PDI, com a exceção do valor de potencial zeta para a

formulação controle, todos os outros apresentaram valores de p maiores que 0,05. Para a formulação controle que apresentou $p < 0,05$ no potencial zeta, apesar de constar variação significativa todos os valores brutos ficaram dentro da especificação técnica para este parâmetro e portanto não apresentaram prejuízos ao estudo de estabilidade. Os valores médios das variáveis da nanopartícula de PLGA-PEG-DTX estão descritas na **Tabela 15** e destaca-se que a variação de tamanho de partícula ficou em torno de 103 nm de PDI foi de 0,128 à 0,132 e o potencial zeta variou entre -35mV e -33mV considerando o T0 e o T28 dias. Os valores de p do estudo das formulações de PLGA-PEG por tempo estão demonstrados na **Tabela 16**.

Comparando-se as amostras controle com a amostra contendo o fármaco, o valor de p para potencial zeta, distribuição do tamanho de Partícula e para o PDI foram maiores que 0,05 não havendo variação estatística entre a amostra PLGA-PEG-CTRL e PLGA-PEG-DTX. Os valores de p estão demonstrados na **Tabela 17**. Os gráficos do estudo de estabilidade de potencial zeta, distribuição de tamanho de partícula e PDI para PLGA-PEG-CTRL e PLGA-PEG-DTX estão apresentados nas **Figuras 20 B, 21 B e 22 B** respectivamente.

Para a avaliação da eficiência de encapsulação para PLGA-PEG-DTX apresentado na **Figura 23** a variação entre os tempos analisados, apresentou valor de p de 0,101 sendo $>0,05$ não havendo variação significativa entre os tempos avaliados e os resultados médios foram entre 85,45% e 89,44% conforme **Tabela 15**. Nesta **Tabela 15** é possível observar a mesma oscilação entre os dados de eficiência de encapsulação do PLGA-DTX demonstrando que eles não foram reduzidos ou aumentados progressivamente e sim alternados e por isso também foi realizado para complementação dos dados o teste por regressão linear. O coeficiente angular é a inclinação da reta da distribuição dos dados. A equação foi $y = -0,264x + 86,92$ e neste caso o $p = 0,078$ indicou que o coeficiente angular não é estatisticamente diferente de zero, demonstrando a não relação de linearidade das variáveis e a ausência de variação significativa.

Tabela 14: Resultados médios de eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, PDI e potencial zeta de PLGA-DTX do estudo de estabilidade.

PLGA-DTX	T0	T7d	T14d	T21d	T28d
Eficiência %	79,29±6,82	80,18±7,54	81,38±6,90	80,94±2,65	76,48±5,29
Tamanho(nm)	129,9±8,35	132,7±7,80	130,3±10,28	130,7±9,15	130,9±8,94
PDI	0,041±0,013	0,089±0,014	0,034±0,023	0,057±0,013	0,086±0,013
PZ (mV)	-44,47±1,20	-46,10±0,80	-45,17±0,25	-42,87±1,44	-45,17±0,50

Tabela 15: Resultados médios de Eficiência de Encapsulação, tamanho de partícula, PDI e potencial zeta de PLGA-PEG-DTX do estudo de estabilidade.

PLGA-PEG-DTX	T0	T7d	T14d	T21d	T28d
Eficiência %	85,45±1,82	82,42±1,55	93,65±4,39	90,53±6,97	89,44±4,80
Tamanho(nm)	103,4±0,90	104,1±1,89	101,4±0,96	105,2±3,17	103,8±1,44
PDI	0,128±0,019	0,141±0,015	0,115±0,003	0,165±0,032	0,132±0,012
PZ (mV)	-35,03±1,74	-34,20±0,45	-32,47±0,54	-33,20±1,28	-33,03±2,57

Figura 20: Resultados gráficos obtidos nos estudos de estabilidade, perfil de potencial zeta em amostras de A) PLGA-CTRL e PLGA-DTX e B) PLGA-PEG-CTRL e PLGA-PEG-DTX.

Figura 21: Resultados obtidos nos estudos de estabilidade, perfil de distribuição de tamanho de partícula em amostras de A) PLGA-CTRL e PLGA-DTX e B) PLGA-PEG-CTRL e PLGA-PEG-DTX.

Figura 22: Resultados obtidos nos estudos de estabilidade, perfil de índice de polidispersão (PDI) em amostras de A) PLGA-CTRL e PLGA-DTX e B) PLGA-PEG-CTRL e PLGA-PEG-DTX.

Figura 23: Resultados obtidos nos estudos de estabilidade, perfil de eficiência de encapsulação em amostras de A) PLGA-DTX e B) PLGA-PEG-DTX.

Tabela 16 - Valores estatísticos de p com relação tempo nos parâmetros de potencial zeta, distribuição de tamanho de partícula e PDI no estudo de estabilidade de PLGA-CTRL, PLGA-DTX e PLGA-PEG-CTRL e PLGA-DTX.

p	Potencial Zeta	tamanho de partícula	PDI	EE
PLGA-CTRL	0,204	0,998	0,071	
PLGA-DTX	0,145	0,711	0,037	0,833
PLGA-PEG-CTRL	0,041	0,411	0,141	
PLGA-PEG-DTX	0,360	0,424	0,166	0,101

Tabela 17 - Valores estatísticos de p por comparação do grupo CTRL como grupo com fármaco DTX nos parâmetros de potencial zeta, distribuição de tamanho de partícula e PDI no estudo de estabilidade das formulações controle e com fármaco de PLGA e PLGA-PEG .

p	Potencial Zeta	tamanho de partícula	PDI
PLGA (CTRL:DTX)	0,394	0,977	0,069
PLGA-PEG (CTRL:DTX)	0,451	0,410	1,00

4.9. Estudos em cultura celular

4.9.1. Caracterização da linhagem celular

As células DU 145 mostraram o seguinte perfil de crescimento celular em 10 dias avaliados em duplicata (145-A e 145-B), até o 5º dia mostrou aumento da viabilidade celular em seguida uma queda equilibrada dos valores de viabilidade e estagnação do crescimento celular conforme observado na **Figura 24**. A foto das células confluentes estão representadas na **Figura 25** e estão em acordo com a morfologia da ATCC .

Figura 24: Avaliação do crescimento celular da linhagem DU 145 de células de câncer de próstata.

Figura 25: Células confluentes da linhagem DU 145 de células de câncer de próstata.

4.9.2. Análise de *uptake* celular por microscopia confocal

O *uptake* das nanopartículas avaliados nas células DU-145 de câncer de próstata foram realizadas através da marcação com rodamina 123, que marca a membrana mitocondrial (BARACCA et al., 2003) . Para isso as formulações foram preparadas com o marcador rodamina 123 encapsulado nas nanopartículas e adicionadas as células nos tempos de tratamento de 1h, 4h, 24h. Neste experimento foi também marcado o núcleo das células com DAPI, que concede fluorescência azul para o núcleo celular.

A **Figura 26 e 27** mostram as marcações de núcleo e as marcações de rodamina que representam a internalização das nanopartículas, de PLGA-CTRL-R123 e de PLGA-PEG-CTRL-R123

Figura 26: Fotomicrografias mostrando o *uptake* das células DU-145 de câncer de próstata por microscopia de confocal após tratamento de 1h, 4h e 24h com as nanopartículas de PLGA-CTRL contendo rodamina 123 e DAPI.

As colorações azuis indicam a marcação do núcleo celular marcado pelo DAPI, a coloração vermelha indica a rodamina 123 internalizada junto com a nanopartícula de PLGA

Figura 27: Fotomicrografias mostrando o *uptake* das células DU-145 de câncer de próstata por microscopia de confocal após tratamento de 1h, 4h e 24h com as nanopartículas de PLGA-PEG-CTRL contendo rodamina 123 e DAPI.

As colorações azuis indicam a marcação do núcleo celular marcado pelo DAPI, a coloração vermelha indica a rodamina 123 internalizada junto com a nanopartícula de PLGA-PEG

Verifica-se no presente trabalho que as nanopartículas que continham rodamina 123 foram internalizadas e concentraram-se no citoplasma das células evidenciadas pela cor vermelha da R123 nas **Figuras 26 e 27**. Foi observado que após 1h de tratamento já havia *uptake* tanto para as formulações de PLGA quanto de PLGA-PEG assim como com 4h e 24h de tratamento.

A captação de sistemas particulados está relacionado com vários processos de captação celular como a fagocitose, a macropinocitose e a endocitose mediada por clatinas e endocitose mediada por caveolina. Colaboradores mostraram em um estudo com nanopartículas de PLGA-PEG e PLGA-PEG-ZOL (Sendo Zol um fármaco com forte afinidade pelos ossos) contendo também docetaxel que em células de metástase semelhante a ossos (linhagem BO2) as nanopartículas de PLGA-PEG e PLGA-PEG-ZOL são internalizadas com maior eficácia que o fármaco livre e a presença da molécula ZOL neste caso direcionou o tratamento para células ósseas específicas. A eficácia terapêutica das nanopartículas direcionadas carregadas com o fármaco dependem da captação celular, da distribuição celular e da quantidade de fármaco disponível após a internalização (RAMANLAL CHAUDHARI et al., 2012).

Outros estudos de microscopia de fluorescência relataram o *uptake* de nanopartículas de PLGA revestidas e não revestidas com quitosana, contendo rodamina 123 em células de câncer de pulmão no citoplasma, evidenciando a absorção desse corante dentro das células e consequentemente das nanopartículas (AHMAD et al., 2018), corroborando com os dados apresentados.

4.9.3. Análise de *uptake* celular por citometria de fluxo

Com o intuito de avaliar e quantificar a internalização ou *uptake* das formulações pelas células DU 145 foram realizados os estudos de citometria de fluxo. As nanopartículas foram produzidas contendo o agente fluoróforo rodamina 123 e foram aplicadas nas células nos tempos de tratamento de 1h, 4h e 24h. A **Figura 28 A, B e C** mostram o *uptake* celular para as nanopartículas de PLGA-CTRL-R123 e PLGA-PEG-CTRL-R123.

Figura 28: Resultados obtidos na avaliação do *uptake* celular por citometria de fluxo A) Grupo CTRL sem tratamento e sem iodeto de propídio (PI) e grupo CTRL+PI sem tratamento com PI B) Nanopartículas de PLGA-CTRL-R123 e PLGA-PEG-CTRL-R123 C) Porcentagem de células positivas para rodamina 123 com e sem PI (Q2+Q4) para nanopartículas de PLGA-CTRL-R123 e PLGA-PEG-CTRL-R123.

A **Figura 28 A** mostra os grupos controle onde o primeiro grupo são apenas células sem marcadores ou formulações demonstrando que estão vivas representadas no quadrante Q3 e sem marcação de rodamina 123. O segundo grupo controle são as células também sem tratamento mas com a adição de iodeto de Propídio (PI). Nesse grupo, portanto, é possível observar células vivas no quadrante Q3 e as que estão mortas no quadrante Q1, uma pequena quantidade de células mortas foi identificada no grupo controle.

As células DU 145 demonstraram a internalização das nanopartículas de PLGA-CTRL-R123 e PLGA-PEG-CTRL-R123 na **Figura 28 B** no grupo Q4 e uma pequena quantidade de células mortas que incorporaram o PI e a rodamina estão demonstradas no quadrante Q2 de cada tempo avaliado. A porcentagem de internalização representada pela soma dos quadrantes Q4 e Q2 de cada tempo está representada na **Figura 28 C** através dos gráficos. Não houve diferenças significativas nas porcentagens de internalização das nanopartículas de PLGA-PEG-CTRL-R123 entre os tempos avaliados onde o p foi de 0,068 sendo os resultados médios respectivamente de 1,4 e 24h de 84,6%, 87,1% e 86,6%. Já para as nanopartículas de PLGA-CTRL-R123 houve uma diferença entre os tempos de 1h, 4h e 24h sendo o valor de p de 0,039. Mas mesmo assim houve alta internalização em 1 h onde o valor médio foi 81,25% em 4h foi de 81,6 e em 24h foi de 84,5%. Estes resultados reforçam e corroboram com os ensaios de *uptake* celular por confocal que também apresentou internalização em todos os tempos. Artigos que também relataram a internalização de nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG por citometria de fluxo utilizando como marcador a cumarina-6, onde diversas formulações foram produzidas como, PLGA(50:50); PLGA-PEG-PLGA (PEG10%); PLGA-PEG (10%PEG) e PLGA-PEG (15%PEG) mostraram que a internalização de PLGA-PEG (15%PEG) em células de câncer de mama foi a formulação com maior *uptake* mas todas as outras também apresentaram internalização não havendo diferença significativa entre as formulações de PLGA e PLGA-PEG(10%PEG) (MORRIS ET AL., 2012). Que são semelhantes as que estão sendo discutidas aqui.

Outro estudo do nosso grupo de pesquisa realizado com nanopartículas de PLGA também apresentaram resultados semelhantes de *uptake* e citotoxicidade com o preparo de nanopartículas poliméricas de PLGA direcionadas ou não com folato contendo o fármaco paclitaxel para tratamento de câncer de ovário (LUIZ et al., 2019) e ainda outro estudo realizado com nanopartículas de PLGA-PEG revestidos com ácido hialurônico (HA) também em células de câncer de ovário foi demonstrado que a via de captação celular está relacionada a via de endocitose e verificou-se que as nanopartículas revestidas com ácido hialurônico resultaram em um maior *uptake* celular comparadas as nanopartículas de PLGA-PEG sem revestimento de HA (VANGARA; LIU; PALAKURTHI, 2013).

4.9.4. Ensaio de Citotoxicidade

As nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG para os ensaios de citotoxicidade foram produzidas e analisadas quanto a tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, NTA e eficiência de encapsulação. Os resultados estão descritos na **Tabela 18** e foram considerados aptos ao estudo proposto.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade celular foram expressos como a porcentagem de viabilidade celular (**Figura 29**) do IC-50 (**Tabela 19 e Figuras 30 e 31**) calculados em células da linhagem DU145 tratadas por 24 e 48 horas com as nanopartículas contendo DTX e o fármaco comercial nas diluições descritas em metodologia. As nanopartículas (sem o fármaco) tanto de PLGA-CTRL quanto de PLGA-PEG-CTRL não foram citotóxicas, apresentando viabilidade celular acima de 80% em todos os tempos e diluições utilizadas.

A **Figura 31** mostram a viabilidade celular em todas as diluições avaliadas e enfatizam as diferenças entre grupos controles de nanopartículas PLGA-CTRL e PLGA-PEG-CTRL com seus respectivos grupos com fármaco PLGA-DTX (**Fig 29 A**) e PLGA-DTX (**Fig 29 B**) após 24 e 48h de análise e também apresenta os resultados do fármaco comercial de DTX 24 e 48h de análise (**Fig 31 C**).

Tabela 18 - Resultados obtidos nas análises de distribuição de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, NTA e EE de nanopartículas de PLGA-CTRL e PLGA-PEG-CTRL e com fármaco encapsulado utilizadas nas análises de citotoxicidade.

	Distribuição de tamanho de partícula	PDI	Potencial Zeta	NTA tamanho de partícula	NTA concentração de partículas	Eficiência de encapsulação
PLGA-CTRL	125,2	0,052	-49,0	123,8	$7,62 \times 10^{12}$	-
PLGA-DTX	104,1	0,036	-36,0	103,1	$1,21 \times 10^{13}$	75,52
PLGA-PEG-CTRL	96,40	0,113	-35,6	116,9	$7,44 \times 10^{12}$	-
PLGA-PEG-DTX	104,4	0,148	-41,8	119	$6,92 \times 10^{12}$	85,95

Figura 29: Resultados na avaliação da viabilidade celular no estudo de citotoxicidade de **A)** PLGA-CTRL e de PLGA-DTX 24 e 48h **B)** PLGA-PEG-CTRL e de PLGA-PEG-DTX 24 e 48h e **C)** Docetaxel comercial 24 e 48h.

O teste Tukey de comparações múltiplas aplicado na comparação entre todas as diluições utilizadas e grupos utilizados apresentaram os seguintes resultados principais para PLGA e para PLGA-PEG:

- a) Verificou-se que os grupos controles (PLGA-CTRL e PLGA-PEG-CTRL) nas diferentes diluições não diferem estatisticamente entre si e também não diferem dos grupos controle negativo que contêm apenas meio de cultura, o que é desejado pois esses grupos não receberam tratamento com fármaco e demonstram que o sistema não é citotóxico para as células estudadas.
- b) Ao serem comparadas nanopartículas de PLGA-DTX de cada diluição entre os tempos de 24 com 48 h foi possível observar que nas diluições de 1nM; 5nM; 20 nM; 25 nM a variação não foi significativa sendo $p > 0,005$ mas para as diluições de 10 nM; 15 nM; 35 nM e 50 nM a variação entre os tempos foi significativa com $p < 0,005$. Avaliar a diferença entre os tempos de tratamento de cada diluição é importante na discussão de dosagens principalmente nos grupos mais concentrados, pois para uma mesma dosagem quanto maior o tempo verificou-se uma maior porcentagem de morte celular, indicando uma maior eficiência do sistema.
- c) Quando comparamos cada diluição de nanopartícula com fármaco com a mesma diluição do respectivo grupo controle tanto de 24 h quanto 48h, houve diferença estatística, inclusive para as menores diluições das nanopartículas de PLGA.
- d) Ao serem comparadas nanopartículas de PLGA-PEG-DTX de cada diluição entre os tempos de 24 com 48 h foi possível observar que nas diluições de 50 nM, 35 nM, 15 nM e 10 nM houve diferença estatística entre os tempos de 24 com 48 h analisados, as outras concentrações de 25 nM, 20 nM, 5 nM e 1 nM não apresentaram variação estatística entre os tempos analisados.
- e) Em PLGA-PEG a concentração de 5 nM de nanopartícula com fármaco não apresentou diferença estatística com o seu respectivo grupo controle no tempo de 24 h, mas apresentou diferença do grupo controle de 48 h e a concentração de 1 nM não apresentou diferença com seu respectivo controle em 24 e 48 h de análise. Todas as outras diluições apresentaram diferença entre o grupo controle e o com fármaco. Demonstrando que essas diluições CTRL também não apresentaram efeito citotóxico. Para as nanopartículas controle o menor valor de viabilidade para PLGA-CTRL e PLGA-PEG-CTRL foi em torno de 80% não havendo IC 50 para comparação com as amostras com fármaco.

A Tabela 19 e as figuras 30 e 31 mostram os resultados na avaliação do IC 50 das nanopartículas de PLGA, PLGA-PEG e do fármaco DTX genérico comercial.

Tabela 19 - Resultados de IC 50 (nM) de PLGA-DTX, PLGA-PEG-DTX e do fármaco DTX genérico comercial, 24 e 48h após tratamento e o p calculado entre a diferença de tempo de cada amostra.

Amostra	24 h	48 h	p
DTX-comercial	37,90	36,59	0,275
PLGA-DTX	8,098	7,69	0,827
PLGA-PEG-DTX	10,42	8,811	0,127

Figura 30: Sigmoides do cálculo de IC-50 das nanopartículas de PLGA-DTX, PLGA-PEG-DTX 24h e 48h.

Figura 31: Sigmoides do cálculo de IC-50 do fármaco DTX genérico comercial 24h e 48h.

Para a avaliação do IC 50, após 24 h de análise o IC50 do fármaco DTX genérico comercial foi de 37,9 nM, para as nanopartícula de PLGA-DTX foi de 8,098 nM e para a nanopartícula de PLGA-PEG foi de 10,42 nM. Após 48 h o IC50 da formulação comercial foi de 36,59 nM, para PLGA-DTX foi de 7,69 nM e para PLGA-PEG-DTX 8,811 nM. Ao serem comparados os valores de IC50 entre os tempos 24 e 48 h de cada formulação (PLGA-DTX e PLGA-PEG-DTX e fármaco DTX genérico comercial), a variação não foi significativa com $p > 0,05$ conforme **Tabela 19**.

Mas ao serem comparados os valores de IC50 da formulação comercial com o IC50 das nanopartículas de PLGA-DTX e PLGA-PEG-DTX tanto de 24h como de 48h a variação foi significativa com $p < 0,05$ evidenciando uma maior resposta com uma menor concentração (em torno de 4 vezes menor) para ambos sistemas nanoparticulados em relação ao fármaco DTX genérico comercial.

Comparando-se os IC-50 das nanopartículas de PLGA-DTX com PLGA-PEG-DTX 24h e 48h, as diferenças não foram significativas com $p > 0,05$ indicando a mesma eficiência entre os dois sistemas nanoparticulados com fármaco.

Diversos estudos corroboram com o aumento da eficácia do docetaxel em sistemas nanoparticulados. Em um destes trabalhos, a exposição a dose no atingimento do IC50 em células PC3 foi menor em nanopartículas de PLGA-PCL-DTX (PCL-co-polímero do ácido lático e glicólico – coprolactona) quando comparado ao DTX-livre (SANNA et al., 2011). Neste estudo, após 48h de incubação, a concentração de fármaco (5 $\mu\text{g/mL}$) nanoencapsulado aumentou em até 70% a citotoxicidade das nanopartículas carregadas com DTX em relação a mesma concentração

do fármaco livre o aumento foi de 45%. Nanopartículas livres de fármaco também não foram citotóxicas mesmo em altas concentrações (SANNA et al., 2011).

Um outro estudo realizado em células MCF-7 de câncer de mama, foi mostrada a encapsulação em PLGA conjugado com um pepitídio R7 e sintetizado com folato-PSD (polysulfadimethoxine-folato) o DTX + Gdc0941 (um inibidor de PI3/Akt) nomeada de formulação R7/PSD-Fol Nps. Neste estudo a viabilidade celular também diminuiu com o aumento do DTX nas formulações testadas para MCF-7, em que o IC₅₀ do DTX livre foi 1,7 vezes maior que a formulação R7/PSD-Fol Nps que continha o DTX nanoencapsulado (WANG et al., 2017). Também em células de câncer de mama MCF-7 outro estudo demonstrou uma diminuição de 2,36 vezes no valor de IC-50 de nanopartículas de PLGA-PEG-DTX comparada ao DTX livre em 48h de estudo e 3,87 vezes menor após 72h de análise (RAMANLAL CHAUDHARI et al., 2012).

5. CONCLUSÕES:

Os taxanos representam um papel importante no tratamento do câncer de próstata e uma estratégia de liberação apropriada para o agente terapêutico é crucial para a eficácia dos tratamentos das doenças. Os resultados aqui apresentados e discutidos referiram-se as técnicas para o desenvolvimento de nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG para o tratamento do câncer de próstata, avaliado *in vitro* em cultura celular. Foi evidenciado que no planejamento experimental os resultados apresentaram-se adequados em relação ao desejado para uma nanopartícula com uso pretendido parenteral, possuindo tamanho de partícula em torno de 100 nm, PDI menor que 0,2 e potencial zeta maior que 30mV em módulo e negativo, as nanopartículas resultantes do planejamento experimental foram avaliadas quanto a eficiência de encapsulação e os resultados indicaram alta eficiência de encapsulação de DTX para ambas as formulações com PLGA e PLGA-PEG acima de 70%. As concentrações de DTX de escolha foram de 300 µg/mL para PLGA e 160 µg/mL para PLGA-PEG. O formato das nanopartículas foi arredondado, não apresentando agregação. As análises de DSC, associadas a TGA e infra-vermelho evidenciam ausência de interação molecular entre os componentes da formulação. Os testes de estabilidade mostraram a manutenção das características físico-químicas da formulação pelo período de 28 dias avaliados a 4°C. A captação celular foi realizada por microscopia confocal e citometria de fluxo avaliados nas células de câncer de próstata *in vitro*, ambas técnicas mostraram o *uptake* celular, sendo a microscopia confocal uma técnica qualitativa e a citometria uma técnica quantitativa, a citometria de fluxo evidenciou *uptake* celular acima de 80%. A avaliação da citotoxicidade nas nanopartículas de PLGA-DTX e as de PLGA-PEG-DTX evidenciaram citotoxicidade aumentada em relação as nanopartículas PLGA-CTRL e PLGA-PEG-CTRL que não apresentaram citotoxicidade e os dois sistemas com DTX foram superiores ao fármaco livre em torno de 4 vezes, em relação ao IC50. A biocompatibilidade, a biossegurança e a biodegradabilidade de PLGA e os resultados apresentados das nanopartículas de PLGA fazem deste sistema promissor para a liberação de fármacos com maior disponibilidade para eficácia terapêutica e menores efeitos colaterais. Os resultados das nanopartículas de PLGA-PEG foram semelhantes ao sistema de PLGA e ainda a capacidade de carregamento deste sistema se mostrou mais eficaz corroborando para os futuros desenvolvimentos de produtos no mercado farmacêutico. Os atuais desenvolvimentos da nanotecnologia para medicamentos refletem produtos terapêuticos com maior potência, eficiência e especificidade, sendo o objetivo das terapias contra o câncer, prolongar a sobrevivência do paciente, melhorar sua qualidade de vida e também atingir sua remissão.

6. REFERÊNCIAS

ABRIATA, J. P. et al. Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1196–1203, 2017.

AHMAD, N. et al. Preparation and characterization of surface-modified PLGA-polymeric nanoparticles used to target treatment of intestinal cancer. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 432–446, 2018.

ALMOUSTAFA, H. A.; ALSHAWSH, M. A.; CHIK, Z. Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 533, n. 1, p. 275–284, 2017.

ANTO, L.; CASSINELLO, J.; CARBALLIDO, J. Role of taxanes in advanced prostate cancer. **Clinical Translational Oncology**, p. 972–980, 2016.

BARACCA, A. et al. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: Evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1606, n. 1–3, p. 137–146, 2003.

BARRY, M. J.; L.H., S. Prevention of prostate cancer morbidity and mortality primary prevention and early detection. **Medical Clinics of NA**, v. 101, n. 4, p. 787–806, 2017.

BELETSI, A.; PANAGI, Z.; AVGOUSTAKIS, K. Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 1, p. 233–241, 2005.

BHATTACHARJEE, S. Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not ? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BRUYNE, S. DE et al. Applications of mid-infrared spectroscopy in the clinical laboratory setting. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 0, n. 0, p. 1–20, 2018.

BUENO, C. et al. The excited-State interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions . Photophysics and photochemical reaction. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 4, p. 385–390, 2002.

CARMO, V. Teste de Mann-Whitney. **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2012.

CARRARO, T. C. M. M. et al. Assessment of in vitro antifungal efficacy and in vivo toxicity of amphotericin B-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 4, p. 519–529, 2017.

CHENG, J. et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 869–876, 2007.

CHOUDHURY, H. et al. Recent advances in TPGS-based nanoparticles of docetaxel for improved chemotherapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 506–522, 2017.

CLARKE, S. J. et al. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 36, n.

2, p. 99–100, 1999.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 771–784, 2017.

DIMCHEVSKA, S. et al. Efficacy assessment of self-assembled PLGA-PEG-PLGA nanoparticles: Correlation of nano-bio interface interactions, biodistribution, internalization and gene expression studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 533, n. 2, p. 389–401, 2017a.

DIMCHEVSKA, S. et al. Efficacy assessment of self-assembled PLGA-PEG-PLGA nanoparticles : Correlation of nano-bio interface interactions , biodistribution , internalization and gene expression studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 533, p. 389–401, 2017b.

DING, D.; ZHU, Q. Recent advances of PLGA micro / nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. **Materials Science & Engineering C**, n. December 2017, p. 1–20, 2018.

ELOY, J. O. et al. Co-loaded paclitaxel / rapamycin liposomes : Development , characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74–82, 2016.

ERAY, M. et al. Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17. **Cytometry**, v. 43, n. 2, p. 134–142, 2001.
FAN, X.; CHEN, J.; SHEN, Q. Docetaxel – nicotinamide complex-loaded nanostructured lipid carriers for transdermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 458, n. 2, p. 296–304, 2013.

FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nature**, v. 1, n. October, p. 34–45, 2001.

FERRO, M. et al. Biomarkers in localized prostate cancer. **Future Oncology**, v. 12, p. 399–411, 2016.

FESSI. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1–4, 1989.

FONSECA, C. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles preparation physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity.pdf. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 273–286, 2002.

FU, Y. C. et al. Aspartic acid-based modified PLGA-PEG nanoparticles for bone targeting: In vitro and in vivo evaluation. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 11, p. 4583–4596, 2014.

GANJU, A. et al. Nanoways to overcome docetaxel resistance in prostate cancer. **Drug Resistance Updates**, v. 17, n. 1–2, p. 13–23, 2014.

GIODINI, L. et al. Nanocarriers in cancer clinical practice : a pharmacokinetic issue. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 2, p. 583–599, 2017.

GRECH, V.; CALLEJA, N. Parametric vs. non-parametric tests. **Early Human Development**, v. 123, p. 48–49, 2018.

GÜNDOĞDU, T. K. et al. Experimental design methods for bioengineering applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 8551, n. July, 2017.

GUPTA, P. N. et al. Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA:poloxamer blend nanoparticles for cancer chemotherapy. **International journal of biological macromolecules**, v. 69C, p. 393–399, 2014.

HAZRA A., G. N. Biostatistics series module 6: correlation and linear regression. **Indian J Dermatol.**, v. 61(6):, p. 593–601, 2016a.

HAZRA A., G. N. . Biostatistics series module 3: comparing groups: Numerical variables. **Indian J Dermatol.** 2016, v. 61(3), p. 251– 260., 2016b.

HUANG, J. et al. Biodegradable self-assembled nanoparticles of poly (D , L -lactide-co-glycolide)/ hyaluronic acid block copolymers for target delivery of docetaxel to breast cancer. **Biomaterials**, v. 35, n. 1, p. 550–566, 2014.

JOSHI, G.; KUMAR, A.; SAWANT, K. Enhanced bioavailability and intestinal uptake of gemcitabine HCl loaded PLGA nanoparticles after oral delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 80–89, 2014.

KOULOUKTSI, C. et al. Preparation and characterization of alendronate depot microspheres based on novel poly(-ε-caprolactone)/Vitamin E TPGS copolymers. **International Journal of Pharmaceutics: X**, v. 1, n. March, p. 100014, 2019.

KUNDRANDA, M. N.; NIU, J. Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: Clinical development and future directions. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 3767–3777, 2015.

LAKKIREDDY, H. R.; BAZILE, D. Building the design , translation and development principles of polymeric nanomedicines using the case of clinically advanced poly (lactide (glycolide)) – poly (ethylene glycol) nanotechnology as a model : An industrial viewpoint ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 289–332, 2016.

LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “ Ouzo effect ” : Application to drug delivery devices ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 86–97, 2014.

LUIZ, M. T. et al. In vitro evaluation of folate-modified PLGA nanoparticles containing paclitaxel for ovarian cancer therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 105, n. December 2018, p. 110038, 2019.

LUO, P. et al. Application of nanoparticle tracking analysis for characterising the fate of engineered nanoparticles in sediment-water systems. **Journal of Environmental Sciences**, v. 64, p. 62–71, 2017.

MACIOROWSKI, Z.; CHATTOPADHYAY, P. K.; JAIN, P. Basic Multicolor Flow Cytometry. **Current Protocols in Immunology**, n. April, p. 1–38, 2017.

MANNE, M. et al. Recent advances and potential applications of modulated differential scanning calorimetry (mDSC) in drug development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 164–173, 2016.

MANOOCHEHRI, S. et al. Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1–10, 2013.

MASOOD, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 569–578, 2016.

MIRANDA, A.; RITA, A.; FIGUEIRAS, R. Aplicações da nanotecnologia em doenças do foro neurológico : vantagens e desafios Nanotechnology applications in forum neurological diseases : benefits and challenges. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 4, p. 14–30, 2014.

MONNIER, G. F. A review of infrared spectroscopy in microarchaeology : Methods , applications , and recent trends. **Journal of Archaeological Science: Reports**, n. April, p. 1–18, 2017.

MORRIS ET AL., 2012. Cellular delivery of PEGylated PLGA nanoparticles. **J Pharm Pharmacol.**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2012.

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

MUSUMECI, T. et al. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1–2, p. 172–179, 2006.

OLIVEIRA, G. F. et al. Chitosan-pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 1004–1009, 2010.

OLIVEIRA, J. et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs : Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 2014.

OMABE, M.; EZEANI, M. Infection, inflammation and prostate carcinogenesis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 1195–1198, 2011.

PANYAM, J. et al. Rapid endo-lysosomal escape of poly(dl -lactide- co -glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery . **The FASEB Journal**, v. 16, n. 10, p. 1217–1226, 2002.

PIENTA, J. Preclinical Mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in Prostate Cancer. **Seminars in Oncology**, v. 28, p. 3–7, 2001.

PLATZ, E. A.; MARZO, A. M. Epidemiology of inflammation and prostate cancer. **The Journal of Urology**, v. 171, n. 2, p. S36–S40, 2004.

PRESS, D. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application : pharmacokinetics and biodistribution profile. **International Journal of nanomedicine**, p. 935–947, 2017.

RAMANLAL CHAUDHARI, K. et al. Bone metastasis targeting: A novel approach to reach bone using zoledronate anchored PLGA nanoparticle as carrier system loaded with Docetaxel. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 3, p. 470–478, 2012.

RASPANTINI, G.L Desenvolvimento e catacterizo de nanoprculas de PCL-TPGS contendo docetaxel visando a terapia do cncer de prstata. 2018. 84f. Dissertao (Mestrado). Faculdade de Cincias Farmacuticas de Ribeiro Preto - Universidade de So Paulo, Ribeiro Preto, 2018.

ROWE; SHESKEY; QUINN. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. M.E: [s.n.].
SANNA, V. et al. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment : formulation , characterization , and cytotoxicity studies. **Nanoscale research letters**, p. 1–9, 2011.

SHARMA, S. et al. PLGA-based nanoparticles: a new paradigm in biomedical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 30–40, 2015.

SINGH, Y. et al. Reinvestigating nanoprecipitation via Box – Behnken design : a systematic approach. **Journal of Microencapsulation**, v. 2048, p. 1–11, 2014.

SOKOL, M. B. et al. Development of novel PLGA nanoparticles with co-encapsulation of docetaxel and abiraterone acetate for a highly efficient delivery into tumor cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 107, n. 4, p. 1150–1158, 2019.

SUN, Y. et al. Enhanced antitumor efficacy of vitamin E TPGS-emulsified PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 716–723, 2014.

TALEVI, A.; GANTNER, M.; RUIZ, M. Applications of Nanosystems to Anticancer Drug Therapy (Part I. Nanogels, Nanospheres, Nanocapsules). **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 9, n. 1, p. 83–98, 2015.

TANG, X. et al. Co-delivery of docetaxel and poloxamer 235 by PLGA-TPGS nanoparticles for breast cancer treatment. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 348–355, 2015.

TAO, W. et al. Docetaxel-loaded nanoparticles based on star-shaped mannitol-core PLGA-TPGS diblock copolymer for breast cancer therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 11, p. 8910–8920, 2013.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 302–315, 2012.

VANGARA, K. K.; LIU, J. L.; PALAKURTHI, S. Hyaluronic acid-decorated PLGA-PEG nanoparticles for targeted delivery of SN-38 to ovarian cancer. **Anticancer Research**, v. 2434, p. 2425–2434, 2013.

WANG, E. C. et al. Differential cell responses to nanoparticle docetaxel and small molecule docetaxel at a sub-therapeutic dose range. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 321–328, 2014.

WANG, Y. et al. Multifunctional nanoparticles loading with docetaxel and GDC0941 for reversing multidrug resistance mediated by PI3K / Akt signal pathway. **Molecular Pharmaceutics**, 2017.

YAMEEN, B. et al. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting ☆. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 485–499, 2014.

YANG, C. et al. Recent advances in the application of vitamin E TPGS for drug delivery. **Theranostics**, v. 8, n. 2, p. 464–485, 2018.

ZENG, X. et al. Cholic acid-functionalized nanoparticles of star-shaped PLGA-vitamin E TPGS copolymer for docetaxel delivery to cervical cancer. **Biomaterials**, v. 34, n. 25, p. 6058–6067, 2013.

ZHANG, K. et al. PEG-PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 183, n. 1, p. 77–86, 2014.

ZHAO, J.; FENG, S. S. Effects of PEG tethering chain length of vitamin E TPGS with a herceptin-functionalized nanoparticle formulation for targeted delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 35, n. 10, p. 3340–3347, 2014.

ZHIRNIK, A. S. et al. Evaluation of the Uptake of PLGA-PEG Nanoparticles by Human Cancer Cells. **Nanotechnologies in Russia**, v. 13, n. 1–2, p. 67–75, 2018.