GIOVANNI LOUREIRO RASPANTINI

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PCL-TPGS
contendo docetaxel visando terapia 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

Orientadora: Juliana Maldonado Marchetti

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 23/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

Resumo

RASPANTINI, G. L **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PCL-TPGS contendo docetaxel visando terapia do câncer de próstata**. 2018. 84f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O câncer de próstata é o tipo de câncer mais incidente no sexo masculino, sendo estimados 68.220 novos casos no Brasil para cada ano do biênio 2018-2019. Embora tenha-se observado um enorme progresso no tratamento do câncer de próstata nas últimas décadas, esta doença continua sendo a segunda maior causa de mortes relacionadas ao câncer em homens. Entre os fármacos indicados para o seu tratamento, o docetaxel aparece como escolha de primeira-linha dada sua grande eficácia terapêutica. Entretanto, efeitos adversos severos estão relacionados ao uso deste fármaco. Para superar estes problemas, a veiculação de quimioterápicos em sistemas de liberação nanoestruturados vem sendo amplamente estudada nos últimos anos, dados os diversos benefícios que oferece. Deste modo, o presente trabalho visou desenvolver, caracterizar e avaliar biologicamente nanopartículas poliméricas a base de um copolímero de policaprolactona-DL- α -tocoferol-polietilenoglicol-1000 (PCL-TPGS) contendo docetaxel para uso na terapia do câncer de próstata. As nanopartículas foram obtidas pela técnica de nanoprecipitação e caracterizadas por suas características físico-químicas, morfológicas e biológicas. Os sistemas foram obtidos com sucesso e possuem distribuição de tamanhos adequada para os objetivos propostos (PSD 130 ± 18 nm, PDI $0,10 \pm 0,04$ e ZP $-30,1 \pm 2,3$ mV), alto rendimento, eficiência de encapsulação e capacidade de carga ($98,7 \pm 3,2\%$, $96,2 \pm 1,1\%$ e $5,01 \pm 0,32\%$, respectivamente). Os estudos calorimétricos e espectroscópicos permitiram avaliar o estado físico do fármaco na nanopartícula e sugerir a encapsulação. Ensaio biológicos demonstraram elevada capacidade dos nanocarreadores contendo docetaxel em causar dano celular em linhagem de câncer de próstata (PC-3), atingindo EC₅₀ de $0,4760 \pm 0,092$ nM. A avaliação da internalização celular resultou em $97,64 \pm 1,21\%$, coerentes com os resultados de citotoxicidade. Estudos *in vivo* demonstraram eficácia do sistema desenvolvido em modelo animal, cuja capacidade de redução tumoral foi superior à formulação comercial de docetaxel. O sistema desenvolvido tem potencial para o aprimoramento da terapia citotóxica convencional em humanos, sendo necessários estudos posteriores para assegurar sua segurança clínica.

Palavras-chave: nanocarreador, nanopartículas poliméricas, nanotecnologia, PCL-TPGS, sistemas de liberação de fármacos, tumor

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de próstata

O câncer de próstata é o tipo de câncer mais incidente no sexo masculino, considerando todas as regiões do Brasil e excetuando-se os tumores de pele tipo não-melanoma. Segundo estimativa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer, estima-se 68.220 novos casos no Brasil para cada ano do biênio 2018-2019 - o que corresponde a 31,7% do total de casos de neoplasias malignas no país em homens. (INCA, 2017). A sua origem ocorre por mutação ou ativação anormal de genes controladores do crescimento e mitose celular, as células tumorais atuam competindo com os tecidos normais pelos nutrientes do organismo. Com seu crescimento incontrolável pode danificar tecidos e órgãos, levando assim a sérios comprometimentos na saúde (FERNÁNDEZ et al., 2014).

Embora tenha-se observado um enorme progresso no tratamento do câncer de próstata nas últimas décadas, esta doença continua sendo a segunda maior causa de mortes relacionadas ao câncer em homens. Considera-se um marco revolucionário na história do câncer a associação do antígeno específico da próstata (PSA, em inglês *prostate-specific antigen*) com o desenvolvimento da doença, o que facilitou o diagnóstico e aumentou os casos de sobrevida por meio da detecção do tumor em estádios iniciais (SHEN; ABATE-SHEN, 2010). Homens com elevados níveis de PSA são geralmente submetidos a uma biópsia para avaliar a potencial presença de câncer de próstata. A partir da biópsia, análises histopatológicas são conduzidas de modo a definir o estadiamento do câncer – cujo resultado implicará em diferentes tipos de tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Atualmente, existem três tipos principais de tratamento para o câncer de próstata: quimioterapia, radioterapia e remoção cirúrgica total ou parcial da próstata. A escolha da conduta terapêutica depende principalmente do estágio do câncer (Figura 1). No estágio I não há extravasamento das células tumorais para outros tecidos, tornando o câncer restrito à próstata. Neste caso, a doença é predominantemente assintomática ou levemente sintomática, tendo como conduta mais recomendada a remoção cirúrgica. Entretanto, opções como criocirurgia e ultrassom focalizado de alta intensidade (HIFU, do inglês *high intensity focused untrassound*) também estão

disponíveis (AL EKISH et al., 2013; KOMURA et al., 2014). No estadio II, o câncer já tem dimensões maiores dentro da próstata e se encontra em fase de crescimento, sendo necessária intervenção quimioterápica por meio de fármacos como docetaxel, mitoxantrona e platina/etoposídeo (APARICIO et al., 2013; SONG et al., 2013). No estadio III, já há branda proliferação das células tumorais para outros tecidos do corpo, sendo necessária a complementação com outros quimioterápicos e incidência de radiação (FERNÁNDEZ et al., 2014; SONG et al., 2013; SORENSEN et al., 2013). Ao chegar ao estadio IV – caracterizado por metástase generalizada – o tratamento é feito de forma paliativa e visando amenizar a dor, com o auxílio de radiação (GANJU et al., 2014).

Figura 1. Esquema geral do estadiamento de neoplasias de próstata. Adaptado de HealthCare Online®.

1.2. Docetaxel

O docetaxel é um quimioterápico antimitótico da classe dos taxanos. Atualmente bem estabelecido na terapêutica do câncer, é aprovado para uso em diversos países para o tratamento de câncer de mama, cabeça e pescoço, gástrico, próstata e fígado (BAKER et al., 2009). Consta na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da

Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017) como um dos principais quimioterápicos necessários para manutenção da saúde pública. Embora seja eficaz e consideravelmente seguro, seu uso está relacionado a importantes efeitos colaterais como neutropenia febril e distúrbios neurosensoriais. Estes efeitos adversos já foram documentados nos estudos clínicos de fase II e III, sendo potencialmente previstos e manejados (KELLY; ALKEN, 2013), mas ainda assim geram desconforto e diminuição da qualidade de vida do paciente.

É um pró-fármaco quimicamente análogo ao paclitaxel, obtido por semi-síntese a partir do mesmo (Figura 2). Lipofílico, sofre oxidação ao ser internalizado na célula, gerando então o metabólito ativo com ação farmacológica. Este se liga aos microtúbulos e os estabiliza durante a mitose, interrompendo a divisão celular na fase G2M e causando morte celular. Sua baixa solubilidade, coeficiente de partição e alto peso molecular, bem como outras propriedades físico-químicas (Tabela 1), tornam sua veiculação um desafio para a tecnologia farmacêutica.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do docetaxel.

Peso molecular	807,89 g/mol
Fórmula molecular	C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄
Ponto de fusão	232 °C
Solubilidade em água	0,274 mg/L
Absorções máximas no UV	230, 275, 283 nm
pKa	10,96
logP	2,59

Figura 2. Estrutura química do docetaxel.

Na terapêutica, considera-se o docetaxel como um fármaco bem estabelecido que gera resultados positivos na maioria dos casos – apresentando menor toxicidade sistêmica e maior captação celular, quando comparado ao paclitaxel. Entretanto, limitações clínicas como resistência pelas células tumorais, baixa solubilidade aquosa, rápida atividade fagocítica, *clearance* renal e distribuição não-seletiva (JAIN et al., 2016; ZHAO et al., 2010) devem ser consideradas. Além disto, a formulação comercial contendo docetaxel (Taxotere®) emprega o uso de polissorbato 80, um tensoativo não-iônico relacionado a relações de hipersensibilidade (DOU et al., 2014). Considerando os pontos levantados, é clara a necessidade de otimização da terapia do câncer de próstata; seja isto feito por meio da busca por novas moléculas ou pela tecnologia farmacêutica, como o emprego de nanopartículas, que podem permitir maior eficiência do tratamento.

1.3. Sistemas de liberação e nanotecnologia

O processo de desenvolvimento de um medicamento, desde o desenvolvimento da molécula até a chegada ao mercado, é um processo lento e caro. Porém, melhorar as propriedades de um medicamento já existente através das ferramentas que a tecnologia farmacêutica dispõe possibilita o melhor aproveitamento do seu potencial farmacológico, o que pode permitir o desenvolvimento de um novo medicamento de maneira mais econômica e em um período de tempo inferior, já que não há a etapa de síntese de um novo fármaco. Dentro deste contexto, têm destaque os sistemas de liberação de fármacos, ferramentas de tecnologia farmacêutica que possibilitam

melhorar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos indesejados. Estes sistemas permitem alterar as características de farmacocinética dos fármacos, como absorção, distribuição e excreção, gerando a possibilidade de um melhor planejamento para a ação do fármaco veiculado. Dentre os diversos benefícios concedidos ao fármaco pelos sistemas de liberação, destaca-se a possibilidade de liberação sustentada, o que certamente permite a redução da frequência de administração do medicamento e também redução de efeitos colaterais (HALEY; FRENKEL, 2008).

Particularmente, o emprego da nanotecnologia aplicada ao tratamento do câncer vem sendo largamente explorado nos últimos anos e resultados promissores têm sido alcançados. Isso se dá em função de propriedades desejáveis que sistemas de liberação nanoestruturados permitem, como a elevada razão superfície-volume da partícula, estabilidade, especificidade, encapsulação de fármacos, e biocompatibilidade. Estas propriedades em conjunto podem resolver problemas de muitos fármacos empregados no tratamento do câncer (SINGH; SHARMA; ROBERTSON, 2012).

Os sistemas de liberação de fármacos baseados em nanotecnologia são largamente empregados na veiculação de fármacos com propriedades antitumorais, já que direcionam a droga ao local do tumor, mantendo sua concentração em níveis suficientes até que a ação terapêutica seja exercida (KAWASAKI; PLAYER, 2005). A atual terapêutica utilizada no tratamento de câncer vem passando por mudanças, principalmente devido à necessidade de melhorar o índice terapêutico de quimioterápicos e reduzir seus efeitos colaterais, poupando as células sadias (HALEY; FRENKEL, 2008). O efeito de permeabilidade e retenção aumentada dos tumores (*Enhanced Permeability and Retention Effect*, EPR) é um fator que contribui para os benefícios da utilização de nanoestruturas em casos de tumores sólidos - esta é uma propriedade que faz com que tumores tendam a acumular passivamente nanopartículas em seu interior, conforme esquematizado na Figura 3. A explicação para este fenômeno é que objetivando uma rápida divisão, as células tumorais estimulam a produção de vasos sanguíneos fenestrados. A presença das fenestrações facilita o extravasamento e permeação das nanopartículas para o interior dos tumores, que acumulam estas partículas. Entretanto, o mesmo não ocorre com os vasos linfáticos, tornando a remoção das nanopartículas prejudicada. A sinergia entre estes fatores gera um maior acúmulo de sistemas nanoestruturados no interior

de tumores (MATSUMURA; MAEDA, 1986; SINGH; SHARMA; ROBERTSON P, 2012; YOSHIZAWA et al., 2011).

Figura 3. Representação esquemática do efeito EPR. Adaptado de KOZLOVA; EPPLÉ, 2013.

No atual cenário global, a utilização de nanoestruturas com finalidade terapêutica na oncologia ultrapassa a fase de desenvolvimento e encontra-se no mercado. Através de uma análise do mercado de sistemas de liberação nanoestruturados no setor oncológico por meio de abordagens de pesquisas de patentes em bancos de dados especializados, é possível traçar um perfil do desenvolvimento tecnológico da área e entender as perspectivas do mercado, bem como compreender as particularidades das patentes do setor. Dados gerados pela pesquisa de patentes através da plataforma *Derwent World Patents Index* (Clarivate Analytics®, EUA) indicam que até 2017, o setor de medicamentos nanoestruturados voltados para oncologia possui 2.212 patentes distribuídas em 567 famílias de patentes.

A análise da Figura 4, permite observar que o principal crescimento de patentes no segmento farmacêutico-oncológico de base nanotecnológica se deu entre 2010 e 2012, o que é coerente com o desenvolvimento científico da tecnologia nos anos

anteriores. As técnicas de avaliação de sistemas de liberação de fármacos evoluíram satisfatoriamente de maneira a prever as características físico-químicas e biológicas dos sistemas apenas em meados dos anos 2000, possibilitando um desenvolvimento tecnológico robusto ao final da década. A oscilação observada entre 2012 e 2014 foi mínima, não sendo possível inferir conclusões sobre diminuição do desenvolvimento. Nos anos 2015 e 2016, a redução do número de publicações é explicada pela fase de sigilo intrínseca do processo patentário, que acaba por perder os dados de algumas famílias de patentes não ser contada na criação banco de dados (NAMBISAN; NAMBISAN, 2017; SAMPAT; SHADLEN, 2017).

Figura 4. Perfil temporal de publicações de patentes no setor de medicamentos nanoestruturados voltados para a oncologia, entre os anos de 2006 e 2016.

Entretanto, nanocarreadores de fármacos apresentam potencial não apenas na terapia do câncer, mas em diversas outras doenças. Abriata e colaboradores (2017) evidenciaram os benefícios que nanopartículas poliméricas podem trazer ao tratamento da doença de Chagas (estágio avançado de infecções por *Trypanosoma cruzi*) ao avaliar a capacidade citotóxica de nanopartículas compostas por policaprolactona e ácido ursólico frente ao protozoário (ABRIATA et al., 2017). Saraiva e colaboradores (2011) apresentaram as diversas nanoestruturas descritas na literatura capazes de carrear óxido nítrico, molécula de produção endógena com diversas funções fisiológicas, principalmente no endotélio. Entre os carreadores, destacaram-se as micelas, nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e diversas nanopartículas inorgânicas (SARAIVA et al., 2011).

Quanto ao uso destes sistemas de liberação na terapia do câncer, Eloy e colaboradores (2016) demonstraram o processo de desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo* de lipossomas carreadores de paclitaxel e rapamicina, simultaneamente. Ao testar a formulação frente a linhagens celulares de câncer de mama, foi detectada sinergia entre os fármacos coencapsulados, diminuindo o EC₅₀ em aproximadamente 4 vezes (ELOY et al., 2016). Em sua tese de doutorado, Oliveira (2014) desenvolveu nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno objetivando um possível tratamento para o câncer de mama (OLIVEIRA, 2014).

Nos últimos anos, avanços significativos têm sido feitos no desenvolvimento de nanoestruturas funcionalizadas que permitem um direcionamento ativo e sítio-específico. Um imunolipossoma carreador de paclitaxel e rapamicina, semelhante ao citado anteriormente, foi desenvolvido por Eloy e colaboradores empregando o uso de trastuzumab, um anticorpo monoclonal com alta especificidade para HER2 - marcador tumoral expresso em determinados tipos de câncer de mama (ELOY et al., 2017). Quando comparado ao lipossoma não funcionalizado, o imunolipossoma desenvolvido apresentou maior citotoxicidade *in vitro* frente a linhagem celular HER2+, possivelmente devido a uma maior captação celular gerada pela ligação e consequente direcionamento do anticorpo.

Desta forma, o desenvolvimento de novos agentes carreadores se faz necessário tanto para moléculas novas quanto para moléculas já existentes. Cabe mencionar a existência de diversas formulações nanoestruturadas no mercado de diferentes composições contendo fármacos antitumorais, tais como Doxil® (doxirrubicina), Ambisome® (anfotericina), Abraxane® (paclitaxel), evidenciando o potencial e sucesso comercial de sistemas nanoestruturados na terapia do câncer. Entretanto, não há no mercado um produto nanoestruturado contendo docetaxel, o que estimula o desenvolvimento de formulações nanoestruturadas contendo este fármaco, abordados na presente proposta.

1.4. Nanopartículas poliméricas

Uma das principais limitações dos agentes quimioterápicos é a restrição de dosagem relacionada ao seu uso, uma vez que estas substâncias não são completamente seletivas para as células tumorais e acabam causando danos

teciduais em outras regiões do organismo. O uso de nanopartículas poliméricas como carreadores para estas moléculas vem sendo estudado como uma possibilidade de veiculação direcionada ao sítio de ação, reduzindo os efeitos colaterais e possibilitando uma maior eficácia terapêutica (DANHIER et al., 2012). Destaca-se a elevada estabilidade das nanopartículas poliméricas frente a outros sistemas com diferentes composições. Além disto, o número de administrações é diminuído e não oferece riscos para administração endovenosa, já que o tamanho em escala nanométrica das partículas não é capaz de obstruir os vasos (com calibre entre 4µm e 7µm). Cabe também mencionar que a superfície polimérica protege o fármaco de possíveis degradações metabólicas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SOPPIMATH et al., 2001). As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas a partir de polímeros naturais como a quitosana, gelatina e alginato; ou sintéticos como a policaprolactona (PCL) (Figura 5), poli-ácido láctico (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA), entre outros (SINHA et al., 2004). Também podem ser biodegradáveis, gerando metabólitos facilmente eliminados pelo organismo e excretados sem danos. A policaprolactona foi um dos primeiros polímeros sintéticos a ser utilizado para aplicações biomédicas, uma vez que é biodegradável, biocompatível e têm seu uso aprovado por agências regulatórias europeias e norte-americanas. Sua baixa cristalinidade também pode prolongar a liberação de determinados fármacos, útil em situações terapêuticas em que se deseja uma liberação controlada.

Figura 5. Estrutura química da policaprolactona (PCL).

Modificações na superfície das nanopartículas poliméricas podem possibilitar um maior tempo de circulação e consequentemente colaboram para o efeito de permeabilidade e retenção aumentada dos tumores. Entre as moléculas utilizadas para realizar tais modificações, o DL- α -tocoferol polietilenoglicol-1000 (TPGS) (Figura 6) – um derivado da vitamina E – é mencionado como inibidor da resistência tumoral mediada por glicoproteína-P (P-gp), bem como aumenta a permeação e biodisponibilidade oral de antitumorais. Guo e colaboradores apontam o TPGS como uma molécula versátil e de ampla utilização no desenvolvimento de sistemas de

liberação, atuando como tensoativo não-iônico que pode formar micelas estáveis em baixas concentrações (GUO et al., 2013). É utilizado em diversas formulações comerciais como solubilizante e dispersante, bem como possui alta capacidade de promoção de permeação celular – fator este intimamente relacionado com a resistência a múltiplos fármacos. Além disso, a porção PEG do TPGS aumenta a hidrofiliabilidade do sistema em que é empregado, sendo a PEGuilação uma estratégia clássica para aumentar o tempo de circulação de nanopartículas devido a redução do *clearance* por macrófagos (GUO et al., 2013).

Figura 6. Estrutura química do DL- α -tocoferol polietilenoglicol-1000 (TPGS)

O desenvolvimento de nanopartículas de copolímero de policaprolactona e DL- α -tocoferol polietilenoglicol-1000 (PCLPCL-TPGS) confere à estrutura do sistema um equilíbrio hidrofóbico-hidrofílico adequado, bem como uma vantagem inerente às duas moléculas.

Choudhury e colaboradores comentam avanços recentes em nanocarreadores empregando TPGS para a veiculação de docetaxel e ressaltam a alta incidência de abordagens bem sucedidas, principalmente empregando micelas poliméricas, nanopartículas poliméricas e lipossomas (CHOUDHURY et al., 2017). Nesse contexto, Zhang e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas poliméricas compostas por um copolímero de PCL-TPGS encapsulando genisteína, uma isoflavona da soja com potencial antitumoral. A atividade citotóxica foi avaliada pela incubação da formulação junto a células HeLa. O EC_{50} foi avaliado ao longo do tempo e após 72 horas as nanopartículas apresentaram um valor de $5,0 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$, enquanto solução do fármaco apresentou EC_{50} de $13,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$. O aumento da citotoxicidade e consequente redução do EC_{50} pode ser explicado pelo aumento da captação celular e inativação de Pgp conferidos pelo TPGS. Ensaios em modelos animais mostraram uma maior capacidade das nanopartículas poliméricas associadas ao TPGS em reduzir o volume tumoral, quando comparadas ao fármaco livre e nanopartículas sem

TPGS (GUO et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Bernabeu e colaboradores produziram nanopartículas poliméricas compostas por copolímero de PCL-TPGS carreando paclitaxel e avaliaram a eficácia *in vitro* e *in vivo* em modelo de câncer de mama, comparando-as com formulações referência de paclitaxel e nanopartículas de albumina carreando paclitaxel (Taxol® e Abraxane®, respectivamente). De um ponto de vista clínico, todos os parâmetros farmacocinéticos obtidos foram superiores às formulações comerciais, incluindo a área sobre a curva, tempo de meia vida, *clearance* e o volume de distribuição em estado de equilíbrio. (BERNABEU et al., 2014).

No mais, destaca-se que de acordo com prévias buscas na literatura, nenhum tipo de nanopartícula polimérica composta por PCL-TPGS foi estudada para encapsulação de docetaxel objetivando a otimização da terapia do câncer de próstata, representando um aspecto de novidade da presente proposta.

Figura 45. Fotomicrografia de tumores de próstata extraídos dos animais utilizados no estudo in vivo. Coloração HE e aumento de 100x. A – grupo controle; B – NP; C – DTX; D – NP-DTX.

5. CONCLUSÃO

O polímero composto por PCL-TPGS foi sintetizado com sucesso seguindo adaptações dos métodos descritos na literatura. A caracterização pelas diversas técnicas sugere que a estrutura química e propriedades físico-químicas são coerentes com os resultados esperados, o que permitiu o prosseguimento para as etapas de formulação.

O método analítico para avaliação da incorporação de docetaxel aos sistemas nanoestruturados foi desenvolvido e validado com êxito, mostrando-se seletivo, linear, preciso, exato e com limites de quantificação e detecção adequados aos objetivos propostos.

De acordo com as técnicas selecionadas e os resultados obtidos na presente pesquisa, concluímos que os sistemas nanoestruturados foram obtidos com sucesso e possuem as características adequadas para a administração pretendida.

O planejamento de experimentos mostrou-se útil no que diz respeito à economia de tempo e recursos, bem como possibilitou a discussão dos parâmetros de formulação e processo com maior propriedade, garantindo um maior entendimento do sistema desenvolvido. As técnicas utilizadas para a caracterização foram robustas e indicam que o fármaco foi encapsulado de maneira eficiente em uma nanoestrutura passível de ser utilizada em via endovenosa, dado seu diminuto tamanho e dispersão monomodal, passível assim de se beneficiar do efeito EPR para uma melhoria na eficácia terapêutica. Os estudos calorimétricos e a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier validam e corroboram com os dados de eficiência de encapsulação. A estabilidade do sistema foi assegurada por aproximadamente 1 mês, o que garantiu uma janela de trabalho satisfatória para o desenvolvimento dos experimentos subsequentes de citotoxicidade *in vitro* e eficácia *in vivo*.

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade evidenciaram que o sistema de liberação nanoestruturado possui capacidade de reduzir a viabilidade celular significativamente, apresentando valores superiores à formulação comercial nas maiores concentrações estudadas. A avaliação da captação celular permite afirmar que as nanopartículas de PCL-TPGS são extensivamente internalizadas, sendo assim passíveis de exercer seu efeito citotóxico nas células tumorais. O estudo de eficácia *in vivo* reafirma os achados nos testes anteriores, diminuindo substancialmente o valor dos volumes dos tumores de maneira superior à formulação comercial, sem uma considerável redução de peso dos animais envolvidos. A avaliação dos cortes histológicos indica maior redução da proliferação e densidade celular no grupo tratado com a formulação desenvolvida.

Deste modo, os efeitos antitumorais observados para o sistema desenvolvido sugerem potencialidade para aprimoramento da terapia citotóxica convencional em humanos, sendo necessários estudos posteriores para assegurar sua segurança clínica e comprovar os dados obtidos até o presente momento.

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.

AL EKISH, S. et al. The role of cryosurgery of the prostate for nonsurgical candidates. **JSLs: Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons / Society of Laparoendoscopic Surgeons**, v. 17, n. 3, p. 423–8, 2013.

ANVISA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 - GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 1–12, 2003.

APARICIO, A. M. et al. Platinum-Based Chemotherapy for Variant Castrate-Resistant Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 13, p. 3621–3630, 1 jul. 2013.

BAKER, J. et al. Docetaxel-related side effects and their management. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 13, n. 1, p. 49–59, 2009.

BARICHELO, J. M. et al. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 4, p. 471–476, 25 jan. 1999.

BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of poly(ε-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1–2, p. 271–279, 2012.

BERNABEU, E. et al. Paclitaxel-loaded PCL-TPGS nanoparticles: In vitro and in vivo performance compared with Abraxane®. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 43–50, 1 jan. 2014.

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

CHEN, Z. et al. Aptamer-mediated delivery of docetaxel to prostate cancer through polymeric nanoparticles for enhancement of antitumor efficacy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 130–131, 2016.

CHIN, S. N. et al. A review of the patterns of docetaxel use for hormone-resistant prostate cancer at the Princess Margaret Hospital. **Current oncology (Toronto, Ont.)**, v. 17, n. 2, p. 24–9, abr. 2010.

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, 30 ago. 2017.

CRAIG, D. Q. M.; READING, M. **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**. [s.l.] CRC Press, 2006.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505–522, 2012.

DOU, J. et al. Preparation and evaluation in vitro and in vivo of docetaxel loaded mixed micelles for oral administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 20–27, 2014.

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, 1 maio 2016.

ELOY, J. O. et al. Anti-HER2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, n. October, p. 159–167, 2017.

ESMAEILI, F.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Preparation of PLGA nanoparticles using TPGS in the spontaneous emulsification solvent diffusion method. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 2, n. 3, p. 183–192, set. 2007.

FERNÁNDEZ, O. et al. Metastatic castration-resistant prostate cancer. **Anti-Cancer Drugs**, v. 25, n. 3, p. 237–243, mar. 2014.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, out. 1989.

FILIPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking

analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.

FONSECA, C.; SIMOES, S.; GASPAR, R. P. aclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 273–286, 2002.

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

GIRON, D. Thermal Analysis, Microcalorimetry and Combined Techniques for the Study of Pharmaceuticals. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 56, p. 1285–1304, 1999.

GUO, Y. et al. The applications of Vitamin e TPGS in drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 175–186, 2013.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, n. 1, p. 57–64, 2008.

HOFFMEISTER, C. R. et al. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale research letters**, v. 7, n. 1, p. 251, 2012.

HUMPHREY, P. A. Histopathology of prostate cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 10, p. 1–22, 2017.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.].

JAIN, D. S. et al. Thermosensitive PLA based nanodispersion for targeting brain tumor via intranasal route. **Materials Science and Engineering C**, v. 63, p. 411–421, 2016.

JAYAKUMAR, S. et al. Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells

to ionizing radiation: Role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 1, p. 485–494, jan. 2014.

KAIGHN, M. E. et al. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Investigative urology**, v. 17, n. 1, p. 16–23, jul. 1979.

KAWASAKI, E. S.; PLAYER, A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 2, p. 101–109, jun. 2005.

KELLY, C.; ALKEN, C. M. Benefit risk assessment and update on the use of docetaxel in the management of breast cancer. **Cancer Management and Research**, v. 5, p. 357, 14 out. 2013.

KEUM, C.-G. et al. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 2225–34, 2011.

KOMURA, K. et al. Single session of high-intensity focused ultrasound for localized prostate cancer: treatment outcomes and potential effect as a primary therapy. **World Journal of Urology**, v. 32, n. 5, p. 1339–1345, 23 out. 2014.

KOZLOVA, D.; EPPLE, M. Biological targeting with nanoparticles: state of the art. **BioNanoMaterials**, v. 14, n. 3–4, p. 161–170, 1 jan. 2013.

LANGE, T. et al. Human prostate cancer in a clinically relevant xenograft mouse model: Identification of b(1,6)-branched oligosaccharides as a marker of tumor progression. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 5, p. 1364–1373, 2012.

LIANG, Z. et al. Targeting docetaxel-PLA nanoparticles simultaneously inhibit tumor growth and liver metastases of small cell lung cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 337–345, 15 out. 2015.

MA, Y. et al. Nanoparticles of poly(Lactide-Co-Glycolide)-d- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate random copolymer for cancer treatment. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, n. 7, p. 1161–1169, 2010.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agents Smancs. **Cancer research**, v. 46, n. December, p. 6387–6392, 1986.

MCKENNEY, J. K. The present and future of prostate cancer histopathology. **Current Opinion in Urology**, v. 27, n. 5, p. 464–468, set. 2017.

MEI, L. et al. A Novel Docetaxel-Loaded Poly (ϵ -Caprolactone)/Pluronic F68 Nanoparticle Overcoming Multidrug Resistance for Breast Cancer Treatment. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 12, p. 1530–1539, 16 dez. 2009.

MILADI, K. et al. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. In: **Polymer Nanoparticles for Nanomedicines**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 17–53.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Próstata. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2016.

MOEIN, M. M.; EL BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 3–11, 1 fev. 2017.

MONTERO, A. et al. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. **The Lancet Oncology**, v. 6, n. 4, p. 229–239, abr. 2005.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113–142, 2010.

NAMBISAN, P.; NAMBISAN, P. Patents in Biopharma. In: **An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 329–344.

OLIVEIRA, S. S. M. DE. **Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: preparação, caracterização e avaliação in vitro e in vivo**. [s.l.] University of Sao Paulo, 2014.

PRÄBST, K. et al. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin.

In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press, New York, NY, 2017. v. 1601p. 1–17.

PUENTE, J. et al. Docetaxel in prostate cancer: a familiar face as the new standard in a hormone-sensitive setting. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 9, n. 5, p. 307–318, maio 2017.

PULUKURI, S. M. et al. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 43, p. 36529–40, 28 out. 2005.

PYRZ, W. D.; BUTTREY, D. J. Particle Size Determination Using TEM: A Discussion of Image Acquisition and Analysis for the Novice Microscopist. **Langmuir**, v. 24, n. 20, p. 11350–11360, 21 out. 2008.

RAMBERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–60, 2012.

RAROKAR, N. R. et al. Nanostructured Cubosomes in a Thermoresponsive Depot System: An Alternative Approach for the Controlled Delivery of Docetaxel. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 2, p. 436–445, 25 abr. 2016.

REN, F. et al. Synthesis and Characterization of D- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate-Block-Poly (ϵ -caprolactone) Copolymer Used as Carriers for Microparticles. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 308, p. 1129–1134, 2009.

SAHU, P. K. et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 590–611, 5 jan. 2018.

SAMPAT, B. N.; SHADLEN, K. C. Secondary pharmaceutical patenting: A global perspective. **Research Policy**, v. 46, n. 3, p. 693–707, abr. 2017.

SANNA, V. et al. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on poly(lactide-co-

caprolactone) and poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment: formulation, characterization, and cytotoxicity studies. **Nanoscale research letters**, v. 6, n. 1, p. 260, 28 mar. 2011.

SARAIVA, J. et al. Nanocarriers for Nitric Oxide Delivery. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 1–16, 2011.

SELBY, L. I. et al. Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 5, p. e1452, set. 2017.

SHARMA, D. et al. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles for intranasal delivery of lorazepam using Box-Behnken design: In vitro and in vivo evaluation. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SHEN, M. M.; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & Development**, v. 24, n. 18, p. 1967–2000, 15 set. 2010.

SINGH, S.; SHARMA, A.; ROBERTSON, G. P. Realizing the Clinical Potential of Cancer Nanotechnology by Minimizing Toxicologic and Targeted Delivery Concerns. **Cancer Research**, v. 72, n. 22, p. 5663–5668, 15 nov. 2012.

SINGH, S.; SHARMA, A.; ROBERTSON P, G. Realizing the Clinical Potential of Cancer Nanotechnology by Minimizing Toxicological and Targeted Delivery Concerns. **Cancer Res.**, v. 72, n. 22, p. 5663–5668, 2012.

SINGH, Y. et al. Reinvestigating nanoprecipitation via Box-Behnken design: A systematic approach. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 1, p. 75–85, 2015.

SINHA, V. R. et al. Poly-??-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 2004.

SONG, G. et al. Prostate-specific antigen response rate of sequential chemotherapy in castration-resistant prostate cancer: the results of real life practice. **Prostate international**, v. 1, n. 3, p. 125–32, 2013.

SOPPIMATH, K. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SORENSEN, S. et al. Budgetary Impact on a U.S. Health Plan Adopting Abiraterone Acetate Plus Prednisone for the Treatment of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 19, n. 9, p. 799–808, nov. 2013.

VERWEIJ, J.; CLAVEL, M.; CHEVALIER, B. Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): not simply two of a kind. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 5, n. 6, p. 495–505, jul. 1994.

WANG, Y. et al. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. **Nanomaterials**, v. 6, n. 2, p. 26, 2016.

WHO. **WHO Model List of Essential Medicines**. Disponível em: <http://www.who.int/entity/medicines/publications/essentialmedicines/20th_EML2017_FINAL_amendedAug2017.pdf?ua=1>.

YOSHIZAWA, Y. et al. PEG liposomalization of paclitaxel improved its in vivo disposition and anti-tumor efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, n. 1–2, p. 132–141, 30 jun. 2011.

ZASKE, L.; PERRIN, M.-A.; LEVEILLER, F. Docetaxel: Solid state characterization by X-ray powder diffraction and thermogravimetry. **J. Phys. IVFrance**, v. 11, 2001.

ZHANG, H. et al. Fabrication of genistein-loaded biodegradable TPGS-b-PCL nanoparticles for improved therapeutic effects in cervical cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2461–2473, 2015.

ZHAO, M. et al. Evaluation of docetaxel-loaded intravenous lipid emulsion: Pharmacokinetics, tissue distribution, antitumor activity, safety and toxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 8, p. 1687–1702, 2010.

ZHU, H. et al. Co-delivery of chemotherapeutic drugs with vitamin E TPGS by porous PLGA nanoparticles for enhanced chemotherapy against multi-drug resistance. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2391–2400, fev. 2014.