UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

GIOVANNI LOUREIRO RASPANTINI

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PCL-TPGS contendo docetaxel visando terapia do câncer de próstata

Ribeirão Preto
2018

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

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.

Raspantini, Giovanni Loureiro
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PCL-TPGS contendo docetaxel visando terapia do câncer de próstata.
Ribeirão Preto, 2018.
84p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e cosméticos.
Orientador: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Câncer de próstata. 2. Docetaxel. 3. Nanotecnologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Giovanni Loureiro Raspantini
Título do trabalho: 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.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

À minha mãe, por me mostrar desde pequeno o impacto que a leitura, estudo e a busca pelo conhecimento podem gerar; da forma mais carinhosa e amável em todos os momentos – mesmo naqueles de maior dificuldade.

Ao meu pai, cuja maneira de viver a vida com alegria e leveza ensinou importantes lições sobre a simplicidade e a verdadeira felicidade.

Agradecimentos

Aos meus pais, por me apoiarem e aconselharem incondicionalmente a cada etapa de minha vida, comemorando cada conquista e dando suporte nos caminhos que escolhi trilhar. Às minhas irmãs, Juliana e Renata, que mesmo em vezes não estando presentes durante essa jornada, forneceram apoio emocional e compartilharam comigo cada uma das vitórias alcançadas. Ao Washington, que me apoiou nas horas difíceis e celebrou cada um dos triunfos com muito carinho, afeto e companheirismo.

À minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Juliana Maldonado Marchetti, que mais do que uma mentora nos caminhos científicos, foi uma verdadeira amiga, confidente e companheira.

Aos colegas acadêmicos e de laboratório Lívia Carvalho, Josimar Eloy, Margarete Moreno, Isabella Suzuki, Juliana Rosa, Larissa Bueno, Robson Amaral e Raquel Petrilli, que compartilharam as alegrias e tristezas da vida acadêmica, ajudando em diversos momentos durante a realização deste trabalho. Em especial, às amigas Juliana Abriata e Marcela Tavares pelas risadas, alegrias, choros e frustrações compartilhadas, bem como incansáveis horas de experimentos, discussões e parcerias em todas as etapas no desenvolvimento desta dissertação.

Aos funcionários técnico-administrativos da FCFRP/USP, em especial Henrique Diniz, José Orestes Del Ciampo, Fabíola Praça, Fabiana de Morais, Murilo de Paula, Eduardo Tozatto, Eleni Passos, Rafael Poggi e Rosana Florencio por toda a ajuda científica, intelectual, administrativa e técnica ao longo destes anos. Aos Profs. Drs. Flávio da Silva Emery e Kamilla Swiech Antonietto, pelo apoio científico na condução de etapas do projeto e de infraestrutura que forneceram ao longo do desenvolvimento do mesmo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio deste projeto com bolsa de mestrado no país (processo nº 2016/03013-4). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio deste projeto com bolsa de mestrado no país (processo nº 131113/2016-0).

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

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 ± 0,04 e ZP -30,1 ± 2,3 mV), alto rendimento, eficiência de encapsulação e capacidade de carga (98,7 ± 3,2%, 96,2 ± 1,1% e 5,01 ± 0,32%, respectivamente). Os estudos calorimétricos e espectroscópicos permitiram avaliar o estado físico do fármaco na nanopartícula e sugerir a encapsulação. Ensaios biológicos demonstraram elevada capacidade dos nanocarreadores contendo docetaxel em causar dano celular em linhagem de câncer de próstata (PC-3), atingindo EC_{50} de 0,4760 ± 0,092 nM. A avaliação da internalização celular resultou em 97,64 ± 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 a assegurar sua segurança clínica.

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

Abstract

RASPANTINI, G. L. **Development and characterization of PCL-TPGS nanoparticles carrying docetaxel aiming prostate cancer therapy.** 2018. 84f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Prostate cancer is the most common type of cancer in men, with an estimated 68,220 new cases in Brazil for each year of the 2018-2019 biennium. Although tremendous progress has been made in the treatment of prostate cancer in recent decades, this disease remains the second leading cause of cancer-related deaths in men. Among the drugs indicated for its treatment, docetaxel appears as a first-line choice given its great therapeutic efficacy. However, severe adverse effects are related to the use of this drug. To overcome these problems, the delivery of chemotherapy in nanostructured release systems has been widely studied in recent years, given the several benefits it offers. Thus, the present work aimed to develop, characterize and biologically asses polymeric nanoparticles based on a copolymer of polycaprolactone-DL-α-tocopherol-polyethylene glycol-1000 (PCL-TPGS) containing docetaxel for use in prostate cancer therapy. The nanoparticles were obtained by the nanoprecipitation technique and characterized by their physical-chemical, morphological and biological characteristics. The systems were successfully obtained and have suitable size distribution for the proposed objectives (PSD 130 ± 18 nm, PDI 0.10 ± 0.04 and ZP-30.1 ± 2.3 mV), high yield, encapsulation efficiency and loading capacity (98.7 ± 3.2%, 96.2 ± 1.1% and 5.01 ± 0.32%, respectively). Calorimetric and spectroscopic studies allowed the evaluation of drug physical state within the nanoparticle and suggest the encapsulation. Biological assays demonstrated a high ability of docetaxel-containing nanocarriers to cause cell damage in prostate cancer cell line (PC-3), reaching EC_{50} of 0.4760 ± 0.092 nM. The evaluation of the cellular internalization resulted in 97.64 ± 1.21%, consistent with the results of cytotoxicity. In vivo studies demonstrated efficacy of the system developed in an animal model, whose tumor reduction capacity was superior to the commercial formulation of docetaxel. The developed system has potential for the improvement of conventional cytotoxic therapy in humans, and further studies are needed to ensure its clinical safety.

Keywords: docetaxel, nanotechnology, nanocarrier, PCL-TPGS, polymeric nanoparticles, prostate cancer

Lista de figuras

Figura 1. Esquema geral do estadiamento de neoplasias de próstata. Adaptado de HealthCare Online®. 2
Figura 2. Estrutura química do docetaxel. 4
Figura 3. Representação esquemática do efeito EPR. Adaptado de KOZLOVA; EPPLE, 2013. 6
Figura 4. Perfil temporal de publicações de patentes no setor de medicamentos nanoestruturados voltados para a oncologia, entre os anos de 2006 e 2016. 7
Figura 5. Estrutura química da policaprolactona (PCL). 9
Figura 6. Estrutura química do DL-α-tocoferol polietilenoglicol-1000 (TPGS) 10
Figura 7. Rota reacional da síntese de PCL-TPGS a partir de caprolactona e TPGS, utilizando octanoato de estanho como catalisador. Reação conduzida em atmosfera de nitrogênio e à 140ºC por 12 horas. 16
Figura 8. Esquema das etapas procedimentais para síntese do copolímero PCL-TPGS. 17
Figura 9. Esquema da técnica de nanoprecipitação, utilizada para a obtenção de nanopartículas poliméricas. 18
Figura 10. Representação esquemática de um experimento de Box-Behnken com 3 fatores em 3 níveis. 18
Figura 11. Esquema do preparo das amostras para quantificação de docetaxel pelo método indireto. 22
Figura 12. Esquema da reação de oxirredução da resazurina em resorufina. 25
Figura 13. Espectros de RMN 1H obtidos em 300 MHz do TPGS (superior) e PCL-TPGS (inferior) em CDCl3. 30
Figura 14. Espectro de infravermelho por transformada de Fourier do TPGS e copolímero sintetizado, PCL-TPGS. 31
Figura 15. Curvas calorimétricas do PCL, TPGS e PCL-TPGS, obtidas pela técnica de TGA. 32
Figura 16. Gráfico de calorimetria diferencial exploratória (DSC) do PCL, TPGS e PCL-TPGS. 32
Figura 17. Representação esquemática de cromatograma obtido para proposta de formulação sem fármaco obtida pela técnica de CLAE. 34
Figura 18. Representação esquemática de cromatograma obtido para o docetaxel ($10 ug.mL^{-1}$) pela técnica de CLAE. 34

Figura 19. Curva analítica para quantificação de docetaxel pelo método desenvolvido. 35
Figura 20. Diagrama de Ishikawa indicando o processo de nanoprecipitação, com destaque às variáveis independentes escolhidas para otimização. 37
Figura 21. Gráficos de superfície das variáveis dependentes em função da distribuição de tamanhos de partículas. 40
Figura 22. Gráficos de superfície das variáveis dependentes em função do índice de polidispersão 41
Figura 23. Gráficos de superfície das variáveis dependentes em função do potencial zeta 42
Figura 24. Gráfico de otimização de resposta com predição dos parâmetros críticos de processo objetivando menor PSD e PDI no modelo gerado. 44
Figura 25. Distribuição de tamanho das nanopartículas desenvolvidas. Perfil similar foi obtido em todas as replicatas para todo o período analisado.....45
Figura 26. Porcentagem de fármaco encapsulado em função do tempo. a e b representam médias estatisticamente diferentes em $p < 0,05$) 46
Figura 27. Distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersão dos sistemas desenvolvidos em função do tempo. 46
Figura 28. Gráfico da concentração de partículas em relação ao tamanho, obtido por análise de rastreamento de nanopartículas.....48
Figura 29. Curvas calorimétricas do docetaxel, mistura física dos componentes da formulação, nanopartículas sem fármaco (PCL-TPGS NP) e contendo fármaco (PCL-TPGS-DTX NP). 49
Figura 30. Espectros de FTIR do docetaxel, mistura física dos componentes, nanopartículas sem fármaco (PCL-TPGS NP) e com fármaco (PCL-TPGS-DTX NP). 50
Figura 31. Imagem de uma nanopartícula de PCL-TPGS obtida em microscópio eletrônico de transmissão, em aumento de 2.10^6 vezes. 50
Figura 32. Resultados de viabilidade celular das nanopartículas poliméricas sem fármaco, testadas em diferentes diluições e distintos tempos de incubação (24 horas, 48 horas e 72 horas) (n=5). 51
Figura 33. Resultados de viabilidade celular da formulação comercial de docetaxel, testada em diferentes concentrações tempos de incubação (24 horas, 48 horas e 72 horas). 52

Figura 34. Resultados de viabilidade celular da formulação de nanopartículas poliméricas contendo, testada em diferentes concentrações tempos de incubação (24 horas, 48 horas e 72 horas). 53
Figura 35. Resultados de viabilidade celular das três formulações testadas, em concentrações crescentes no mesmo tempo de incubação (72 horas). A linha pontilhada indica viabilidade celular de 50%. 54
Figura 36. Microscopia de fluorescência da formulação após separação por ultrafiltração. À esquerda, fração contendo nanopartículas. À direita, fração contendo o restante dos componentes. 55
Figura 37. Imagens de microscopia confocal de fluorescência de linhagem celular PC-3 após incubação por 24 horas com formulação contendo docetaxel e controle. Escala de 20µm. 56
Figura 38. Imagem tridimensional gerada pela sobreposição dos excertos adquiridos pela microscopia confocal de fluorescência. Estruturas altamente fluorescentes indicadas pelas setas brancas. 57
Figura 39. Gráficos de citometria de fluxo gerando dados de internalização celular após 24 horas de incubação com a formulação contendo nanopartículas encapsulando BODIPY. A – controle negativo; B, C, D, E e F – replicatas.....58
Figura 40. Camundongo Swiss Nude com tumores de próstata desenvolvidos após 14 dias da injeção subcutânea de células PC-3 no flanco superior esquerdo. 59
Figura 41. Gráfico de acompanhamento de volume tumoral percentual (volume tumoral na medida em relação ao volume tumoral inicial de cada grupo. **** (p<0,0001 segundo ANOVA duas vias com correção de múltiplas comparações de Newman-Keuls) 60
Figura 42. Registro dos pesos dos animais xenotransplantados do estudo in vivo..61
Figura 43. Gráfico de sobrevivência dos camundongos ao longo do estudo in vivo.61
Figura 44. A - Camundongo com tumor em estadio avançado antes de ser sacrificado. B - Camundongo após processo de extração do tumor. C - Exemplo de medida do volume tumoral com o auxílio de um paquímetro. 62
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. 63

Lista de tabelas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do docetaxel.....3
Tabela 2. Repetibilidade e precisão intermediária do método analítico. 35
Tabela 3. Exatidão intra e inter-ensaio do método analítico. 36
Tabela 4. Variáveis independentes e seus respectivos níveis analisados.....37
Tabela 5. Desenho experimental sugerido pelo software e respectivas respostas de PSD, PDI e ZP em função da variação da razão fase aquosa/fase orgânica (RFA/FO), razão polímero/fármaco (RPolímero/Fármaco) e agitação (rpm). 38
Tabela 6. Dados de média, moda, desvio, span e concentração de partículas por mililitro 47
Tabela 7. Valores de EC_{50} determinados para nanopartículas sem fármaco, nanopartículas carreando docetaxel e docetaxel comercial. 54

Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BODIPY	Boro-dipirrometeno
$CDCl_3$	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPP	Parâmetro crítico de processo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DTX	Docetaxel
EC_{50}	Concentração efetiva máxima
EPR	Efeito de permeação e retenção aumentada
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HE	Hematoxicilina-eosina
HIFU	Ultrassom focalizado de alta intensidade
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
M_n	Peso molecular médio
NP	Nanopartícula
NP-DTX	Nanopartícula contendo docetaxel
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PCL-TPGS	Policaprolactona-DL-α-tocoferol polietilenoglicol-1000
PDI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
P-gp	Glicoproteína P
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	poliácido láctico
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PSA	Antígeno específico da próstata
PSD	Distribuição de tamanho de partícula
R	Índice de correlação
$R_{FA/FO}$	Razão fase aquosa/fase orgânica
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de prótons
rpm	Rotações por minuto
$R_{Polímero/Fármaco}$	Razão polímero/fármaco
SFB	Soro fetal bovino
SnOct	Octanoato de estanho
TGA	Análise termogravimétrica
TPGS	DL-α-tocoferol polietilenoglicol-1000
ZP	Potencial zeta

Sumário

Resumo i

Abstract ii

Lista de figuras iii

Lista de tabelas vi

Lista de abreviaturas e siglas vii

Sumário viii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Câncer de próstata 1

1.2. Docetaxel 2

1.3. Sistemas de liberação e nanotecnologia 4

1.4. Nanopartículas poliméricas 8

2. OBJETIVOS 12

2.1. Objetivos gerais 12

2.2. Objetivos específicos 12

3. MATERIAIS E MÉTODOS 14

3.1. Materiais 14

3.1.1. Substâncias químicas 14

3.1.2. Equipamentos e acessórios 14

3.1.3. Linhagem celular 15

3.2. Métodos 16

3.2.1. Síntese do copolímero PCL-TPGS 16

3.2.3. Preparo das nanopartículas 17

3.2.4. Validação do método analítico 19

3.2.4.1. Seletividade 19

3.2.4.2. Linearidade 19

3.2.4.3. Precisão 20

3.2.4.4. Exatidão 20

3.2.4.5. Limite de quantificação e detecção 20

3.2.5. Caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas 21

3.2.5.1. Determinação das distribuições de tamanhos de partículas 21

3.2.5.1.1. Espalhamento dinâmico de luz 21

3.2.5.1.2. Análise de rastreamento de nanopartículas 21
3.2.5.2. Determinação do potencial zeta das partículas.....22
3.2.5.3. Rendimento, eficiência de encapsulação e capacidade de carga 22
3.2.5.4. Estabilidade coloidal.....23
3.2.5.5. Calorimetria diferencial exploratória 23
3.2.5.6. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier 23
3.2.5.7. Microscopia eletrônica de transmissão.....24
3.2.6. Caracterização biológica *in vitro* dos sistemas 24
3.2.6.1. Avaliação da citotoxicidade celular.....24
3.2.6.2. Captação celular por microscopia confocal.....26
3.2.6.3. Captação celular por citometria de fluxo 26
3.2.7. Avaliação *in vivo* eficácia em modelo xenotransplantado.....27
3.2.7.1. Análise histopatológica.....28
3.2.8. Análise estatística.....29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....30
4.1. Caracterização físico-química do copolímero PCL-TGPS 30
4.2. Validação de método analítico para quantificação de docetaxel.....32
4.3. Caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas 36
4.3.1. Preparo e otimização em função de PSD e PDI 36
4.3.2. Rendimento, eficiência de encapsulação e capacidade de carga 44
4.3.3. Estabilidade coloidal 45
4.3.4. Análise de rastreamento de nanopartículas.....47
4.3.5. Calorimetria diferencial exploratória 48
4.3.6. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....49
4.3.7. Microscopia eletrônica de transmissão.....50
4.4. Caracterização biológica *in vitro* dos sistemas 51
4.4.1. Citotoxicidade celular em linhagem de câncer de próstata.....51
4.4.2. Captação celular por microscopia confocal e citometria de fluxo 54
4.5. Caracterização biológica *in vivo* dos sistemas.....58
4.5.1. Análise histopatológica 62

5. CONCLUSÃO.....63

REFERÊNCIAS.....65

ANEXOS 73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de próstata

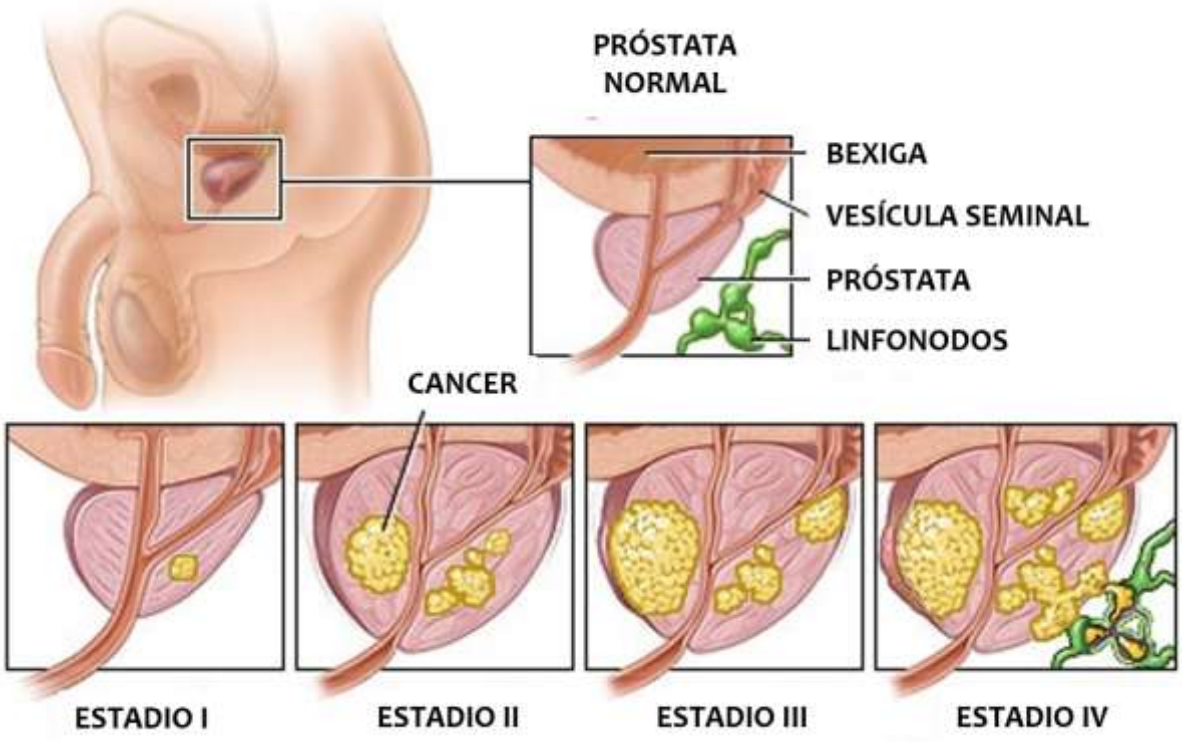
O câncer de próstata é o tipo de câncer mais incidente no sexo masculino, considerando todas as regiões do Brasil e excetuando-se os tumores de pele tipo não-melanoma. Segundo estimativa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer, estima-se 68.220 novos casos no Brasil para cada ano do biênio 2018-2019 - 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 estadios 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 estadio do câncer (Figura 1). No estadio 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/etoposidio (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

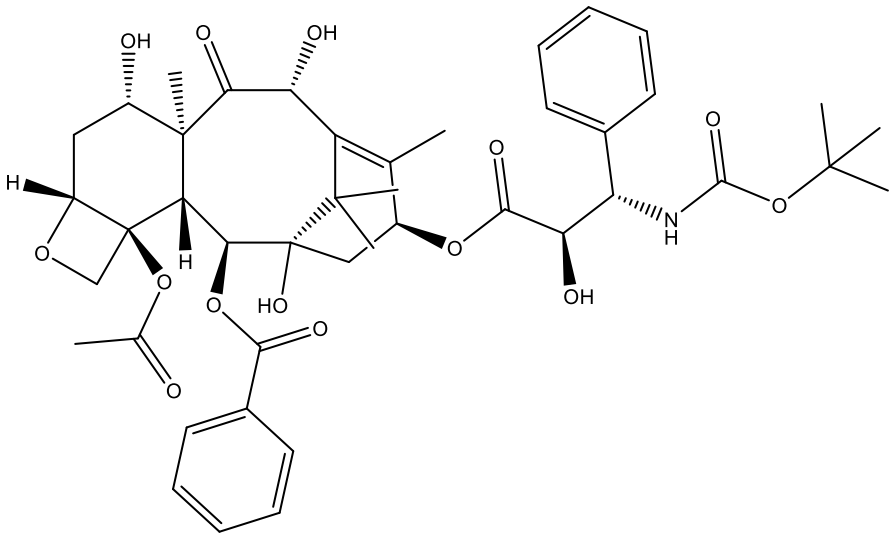
Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017) como um dos principais quimioterápicos necessários para manutenção da saúde pública. Embora seja eficaz e consideravelmente seguro, seu uso está relacionado a importantes efeitos colaterais como neutropenia febril e distúrbios neurosensoriais. Estes efeitos adversos 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

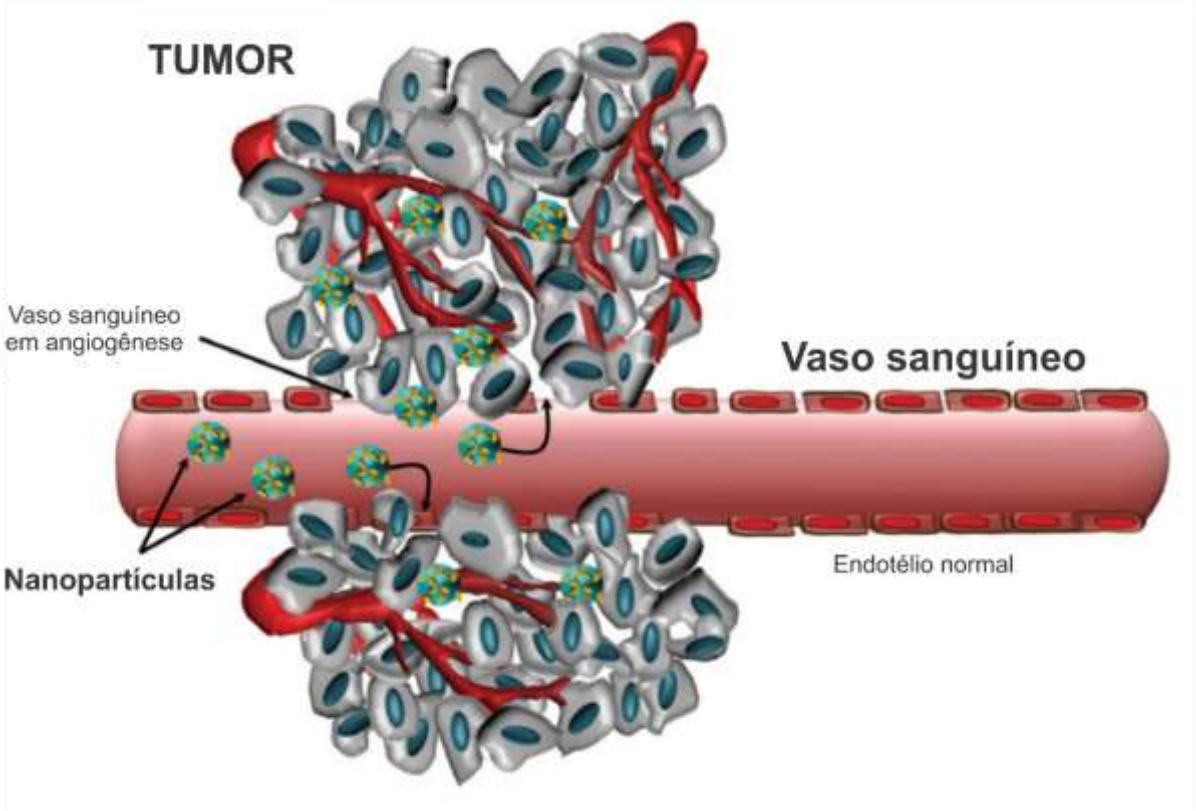
melhorar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos indesejados. Estes sistemas permitem alterar as características de farmacocinética dos fármacos, como absorção, distribuição e excreção, gerando a possibilidade de um melhor planejamento para a ação do fármaco veiculado. Dentre os diversos benefícios 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; EPPLE, 2013.

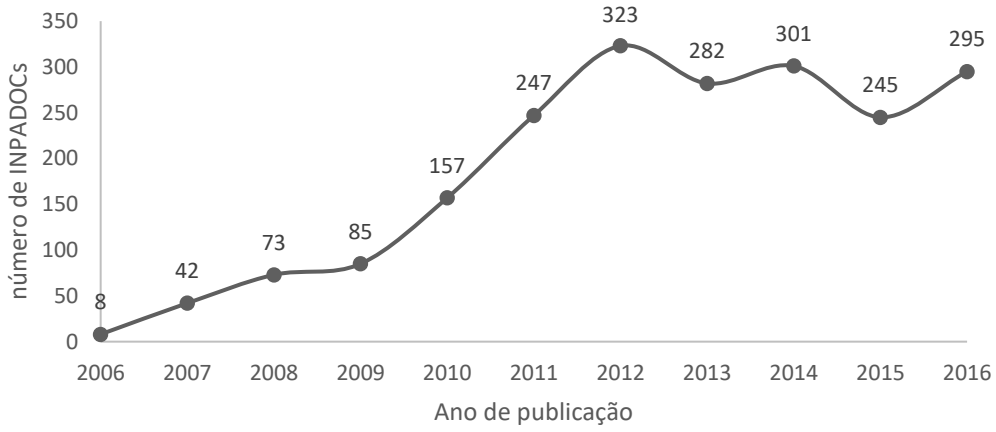


No atual cenário global, a utilização de nanoestruturas com finalidade terapêutica na oncologia ultrapassa a fase de desenvolvimento e encontra-se no mercado. Através de uma análise do mercado de sistemas de liberação nanoestruturados no setor oncológico por meio de abordagens de pesquisas de patentes 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

antecedentes. 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 EC_{50} 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.

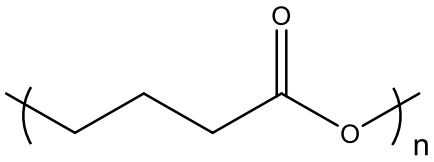
Desta forma, o desenvolvimento de novos agentes carreadores se faz necessário tanto para moléculas novas quanto para moléculas já existentes. Cabe mencionar a existência de diversas formulações nanoestruturadas no mercado de diferentes composições contendo fármacos antitumorais, tais como Doxil® (doxirrubicina), 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 lático (PLA), poli(ácido lático-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.

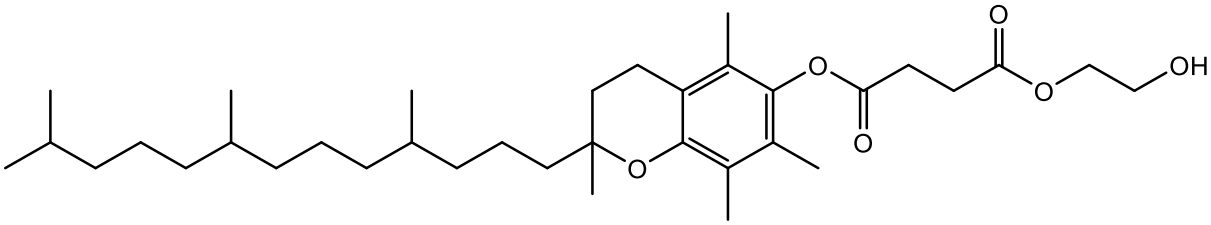
Figura 5. Estrutura química da policaprolactona (PCL).



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 hidrofilicidade 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 une vantagens inerentes 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 ± 0,8µg/mL, enquanto solução do fármaco apresentou EC_{50} de 13,6 ± 0,9 µg/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.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Os objetivos do presente estudo foram o desenvolvimento, caracterização físico-química, avaliação *in vitro* de uptake celular e eficácia e avaliação *in vivo*, em modelo animal, de nanopartículas poliméricas de PCL-TGPS contendo docetaxel, para a proposição de um potencial sistema de liberação aplicável ao tratamento do câncer de próstata.

2.2. Objetivos específicos

- Síntese de copolímero composto por policaprolactona (PCL) e DL-α-tocoferol poletilenoglicol-1000 (TGPS);
- Caracterização físico-química do copolímero obtido por meio de ressonância magnética nuclear de prótons, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, análise termogravimétrica e calorimetria diferencial exploratória;
- Preparo e otimização das nanopartículas poliméricas pela técnica de nanoprecipitação, através de uma abordagem de planejamento experimental utilizando técnicas de *quality-by-design*;
- Desenvolvimento e validação de método analítico para a quantificação de docetaxel utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE nº 899, de 23 de maio de 2003 e o tópico Q2(R1); da International Conference on Harmonization (ICH);
- Análise da eficiência de encapsulação por meio da utilização da metodologia analítica já previamente desenvolvida e validada, potencial zeta, distribuição de tamanhos de partículas e índice de polidispersão por espalhamento dinâmico de luz;
- Avaliação do diâmetro médio das nanopartículas e concentração de partículas por análise de rastreamento de partículas;
- Caracterização físico-química das nanopartículas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e calorimetria diferencial exploratória;

- Acompanhamento da estabilidade coloidal ao longo do tempo de armazenamento à 4ºC;
- Avaliação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliação da citotoxicidade em células de câncer de próstata (linhagem PC-3);
- Quantificação da internalização celular das nanopartículas por citometria de fluxo e microscopia confocal de fluorescência;
- Avaliação da eficácia das formulações através de estudos *in vivo* em animais imunossuprimidos xenotransplantados com células tumorais da linhagem PC-3.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Substâncias químicas

- Acetona P.A. – Dinâmica®, lote: 87286;
- Acetonitrila, grau HPLC – Panreac, lote: 0000423772;
- Água MilliQ (filtro Gradient – Millipore);
- Álcool isopropílico – Mallinckrodt, lote: 5351KXTGA;
- BODIPY (QHM-68) – QHTEM/FCFRP/USP;
- Caprolactona – Sigma Aldrich, lote: MKBP0052V;
- DAPI – Sigma-Aldrich, lote: 075M4010V;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma-Aldrich, lote: 29333989;
- DL-α-tocoferol-polietilenoglicol-1000 (TPGS) – BASF e Sigma-Aldrich, lote: BCBR0150V;
- Docetaxel (DTX) – APIchem, lote AC150901;
- Docetaxel injetável – Eurofarma, lote 487144A;
- Fluoromount® - Sigma-Aldrich, lote: SLBJ8975V;
- Fosfato de sódio bibásico heptahidratado P.A. – Synth, lote: 126886;
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A. – Synth, lote: 81107;
- Meio de cultura RPMI 1640 – Sigma-Aldrich, lote: SLBR4620V;
- Metanol – J.T. Baker, lote: T29C11;
- Octanoato de estanho – Sigma Aldrich, lote: SLBP5072V;
- Paraformaldeido – Sigma-Aldrich, lote: 010M1507;
- poli-L-lisina, Sigma-Aldrich, lote: 05SMK1665;
- Resazurina – Sigma-Aldrich, lote: MKBQ3226V;
- Solução de antibíotico contendo 10,000 unidades de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina – Sigma-Aldrich, lote: 106M4809V;
- Soro fetal bovino – Sigma-Aldrich, lote: SPBB2353V;
- Tripsina 2,5% (10x) – Gibco, lote: 01119L15;

3.1.2. Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético – Lab disk, IKA;

- Agitador magnético – MAG MULTI, Marte;
- Balança analítica – Adventurer™, Ohaus;
- Balança semi-analítica – AS 2000C, Marte;
- Banho ultrassônico – Quimis;
- Cabine de fluxo laminar – Cell Logic;
- Centrífuga – Eppendorf;
- Citômetro de fluxo - FACSCanto I;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência - Thermo Scientific® Dionex UltiMate 3000;
- Espectrometro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) IRPrestige-21 – Shimadzu;
- Espectrometro Drive Shield R modelo DRX300 – BRUKER®;
- Estufa de cultivo celular COM-170AICUVL-PA- Panasonic;
- Filtro Amicon® 10 kDa – Merck Millipore;
- Leitor de placa modelo Synergy - Biotek;
- Leitor de tamanho de partícula e potencial zeta Zetasizer 3000 HSa - Malvern Instruments;
- Leitor de tamanho de partícula NanoSight LM20 – NanoSight;
- Medidor de pH – DM 20, Digimed;
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 20 a 200 µL, 100 a 1000 µL e 1 a 5 mL – Eppendorf;
- Microscópio confocal SP8 – Leica;
- Microscópio de luz invertida TS100 – Nikon;
- NanoSight LM20 – NanoSight;
- Paquímetro digital – Vonder DIN 862.
- Zetasizer – Malvern;

3.1.3. Linhagem celular

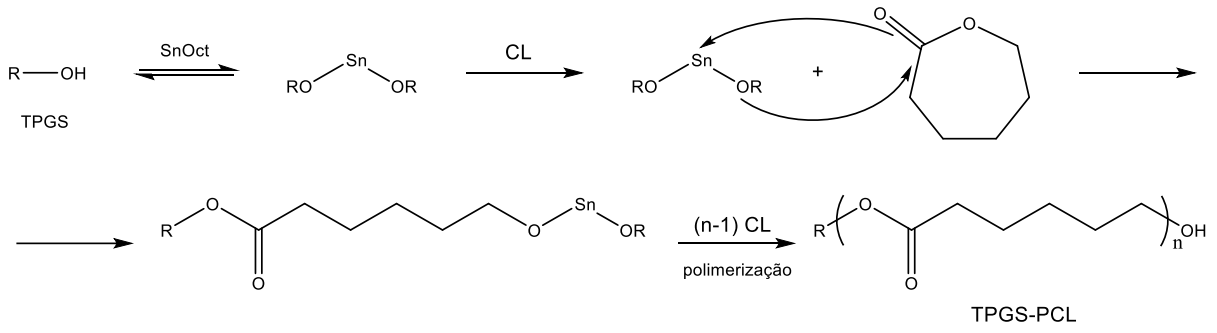
- PC-3 (ATCC® CRL-1435™).

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese do copolímero PCL-TPGS

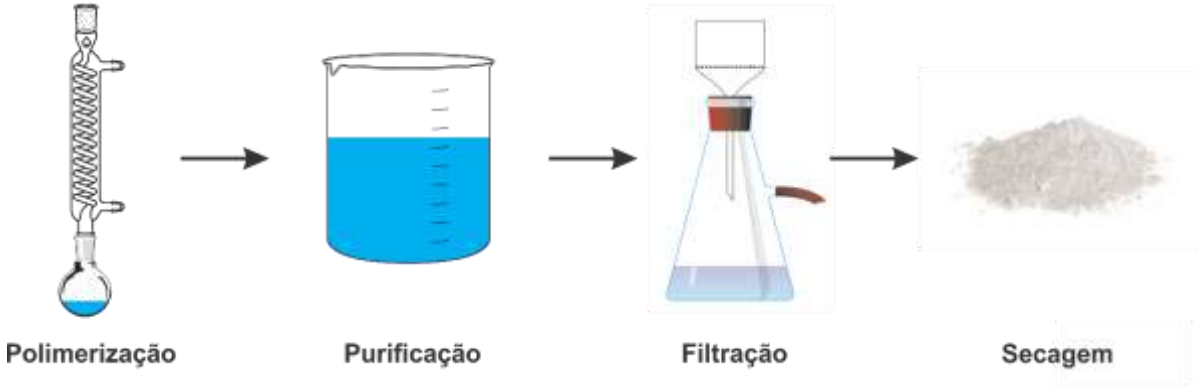
A síntese foi adaptada a partir do trabalho realizado por Bernabeu (2014) e colaboradores e Ren e colaboradores (2009). A copolimerização da caprolactona com TPGS, na presença de octanoato de estanho (SnOct), foi inicialmente realizada. Para tanto, 3,0 g de TGPS foram adicionados em um balão de ensaio, posteriormente secos em estufa até peso constante. A seguir, 30 g de ε-caprolactona e 0,04 g de SnOct foram acrescentados ao mesmo balão. A mistura foi mantida sob agitação magnética em atmosfera de N_2, à 140ºC por 12 horas, conforme Figura 7 (BERNABEU et al., 2014; REN et al., 2009).

Figura 7. Rota reacional da síntese de PCL-TPGS a partir de caprolactona e TPGS, utilizando octanoato de estanho como catalisador. Reação conduzida em atmosfera de nitrogênio e à 140ºC por 12 horas.



O produto obtido pela reação foi solubilizado em 50 mL de diclorometano e então precipitado em metanol (250 mL), de modo a garantir a extração adequada do composto de interesse. O precipitado foi filtrado em papel de filtro com diâmetro de poro de 1,0 µm e lavado com metanol a frio por três vezes. Então, o solvente residual foi removido através de secagem a alto vácuo até obtenção do copolímero na forma de um pó, conforme esquema representado na Figura 8. O copolímero foi mantido em geladeira (4ºC) e teve seus ensaios de caracterização conduzidos logo a seguir.

Figura 8. Esquema das etapas procedimentais para síntese do copolímero PCL-TPGS.



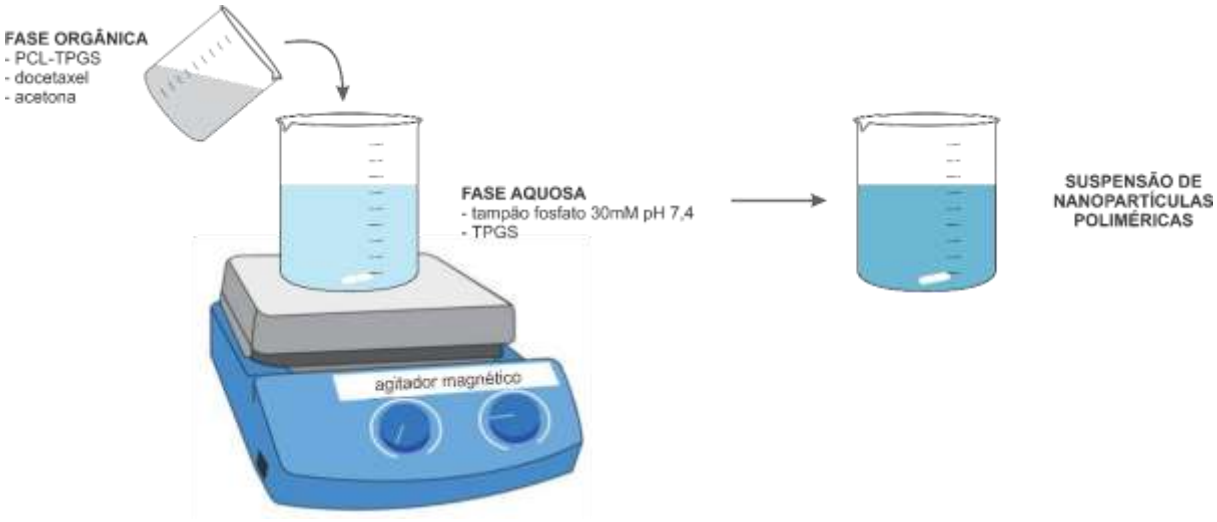
3.2.2. Caracterização físico-química do copolímero PCL-TGPS

Foram utilizadas técnicas de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^{1}H), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e análise termogravimétrica (TGA) para caracterização completa do copolímero formado.

3.2.3. Preparo das nanopartículas

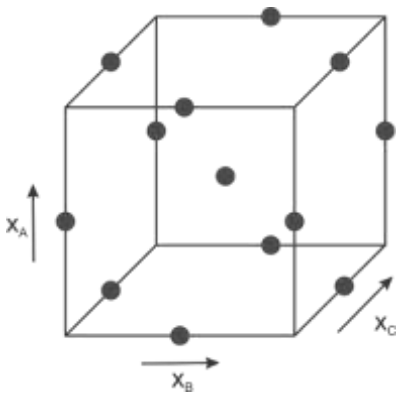
As nanopartículas foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação, que consiste em verter a fase orgânica – contendo fármaco e polímero – na fase aquosa contendo tensoativo (FESSI et al., 1989; FONSECA; SIMOES; GASPAR, 2002). Para preparação da fase orgânica, diferentes proporções de fármaco e copolímero foram solubilizadas em acetona e agitadas a 600 rpm (rotações por minuto) em mesa agitadora, em temperatura ambiente controlada. A fase aquosa foi composta por tampão fosfato 30 mM, pH 7,4, e TPGS a 0,5%, utilizado como estabilizante. A fase orgânica foi então vertida sobre a fase aquosa em diferentes valores de agitação e em com distintas proporções, objetivando a formação das nanopartículas, conforme esquematizado na Figura 9. Para eliminação da fase orgânica na formulação, os sistemas foram deixados em temperatura ambiente controlada de 25 ^{o}C por 24h, sob agitação magnética a 600 rpm.

Figura 9. Esquema da técnica de nanoprecipitação, utilizada para a obtenção de nanopartículas poliméricas.



Durante o desenvolvimento das formulações, foram utilizadas estratégias de planejamento experimental multivariado por meio da variação de parâmetros críticos do processo de nanoprecipitação para obtenção das nanopartículas sem fármaco. As variáveis independentes foram identificadas através de extensa busca na literatura e um modelo de planejamento Box-Behnken (Figura 10) de 3 fatores em 3 níveis então aplicado com a utilização dos softwares Minitab® 17.1.0 e Dell Statistica 13, de modo a gerar gráficos de superfície que permitam análise combinada em função das respostas adquiridas. Uma função de otimização de resposta foi então aplicada, visando partículas mais adequadas ao objetivo proposto. O fármaco a ser encapsulado foi adicionado posteriormente a otimização de resposta.

Figura 10. Representação esquemática de um experimento de Box-Behnken com 3 fatores em 3 níveis.



3.2.4. Validação do método analítico

As condições cromatográficas foram adaptadas a partir do proposto por Liang et al. (2015). Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Thermo Scientific® Dionex UltiMate 3000), coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) associada à uma pré-coluna de mesma composição, acoplada a um detector de arranjo de diodos e injetor automático. As condições cromatográficas foram adaptadas e otimizadas para maior performance nas análises, gerando um método instrumental cuja fase móvel é constituída por metanol:acetonitrila:água (60:25:15 v/v/v), volume de injeção de 20 µL, vazão de 0,8 $mL.min^{-1}$, comprimento de onda de 232nm e temperatura do forno da coluna em 25°C (LIANG et al., 2015). Os dados obtidos foram processados no software Chromeleon® 7.0 e curvas analíticas foram construídas a cada análise. O método foi validado de acordo com as diretrizes da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - RE n° 899, de 29 de maio de 2003 – "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos") e do documento Q2 (R1) da International Conference Harmonization (ICH), utilizando-se os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade na faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez

3.2.4.1. Seletividade

A seletividade do método analítico foi garantida por meio da comparação dos cromatogramas obtidos para amostras de docetaxel (10 µg/mL) e formulações de nanopartículas contendo e não contendo docetaxel encapsulado. O mesmo método de preparo foi utilizado para todas as amostras, contemplando os procedimentos desenvolvidos durante as quantificações de rotina. Foi considerado seletivo o método cujo sinal referente ao docetaxel não se encontrou sobreposto no mesmo tempo de retenção que demais componentes da formulação.

3.2.4.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada através da análise de concentrações crescentes de docetaxel (0,25; 0,50; 1,00; 5,00 e 10,00 µg/mL em acetonitrila), com posterior confecção de curva analítica relacionando a área da integral dos sinais obtidos com as concentrações teóricas injetadas, através do método dos mínimos quadrados. O

método que apresentou proporcionalidade linear entre os sinais e as concentrações, bem como coeficiente de correlação (r) da reta superior a 0,99, foi considerado linear.

3.2.4.3. Precisão

A precisão do método analítico foi determinada a partir da precisão intermediária e da repetibilidade. Tais parâmetros foram obtidos utilizando o ponto inferior (0,25 µg/mL em acetonitrila), um ponto mediano (0,50 µg/mL em acetonitrila) e o ponto superior da curva analítica (10,00 µg/mL em acetonitrila). A repetibilidade foi avaliada pela obtenção de dados referentes a 3 amostras de cada concentração, preparadas de forma independente, em um mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada da mesma maneira, mas com preparações e análises realizadas em dias diferentes e consecutivos. Os resultados foram expressos por coeficiente de variação (CV), obtido pela razão do desvio padrão pela média das concentrações obtidas, conforme $CV(\%) = \frac{s}{X} \times 100$ (equação 1), em que s representa o desvio padrão e x a média das concentrações obtidas. Foi considerado preciso o método cuja precisão intermediária e repetibilidade foram inferiores a 5% em todos os pontos analisados (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

3.2.4.4. Exatidão

As exatidões intra e interensaio foram determinadas pelos dados gerados pelas mesmas amostras descritas no item 3.2.4.3, com análises realizadas no mesmo dia e em dias consecutivos, respectivamente. Os resultados foram expressos em forma de recuperação ($R(\%) = \frac{concentração\ obtida}{concentração\ teórica} \times 100$) (equação 2). Foi considerado exato o método cujos recuperação intra e interensaio foi superior a 90% em todos os pontos analisados (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

3.2.4.5. Limite de quantificação e detecção

O limite de quantificação foi obtido através da menor concentração experimental testada pela qual o método se manteve preciso e exato. O limite de detecção foi calculado através da relação sinal-ruído.

3.2.5. Caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas

3.2.5.1. Determinação das distribuições de tamanhos de partículas

3.2.5.1.1. Espalhamento dinâmico de luz

A distribuição de tamanho das nanopartículas poliméricas e o índice de polidispersão foram determinados a 25ºC por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HSa (Malvern Instruments) usando laser de HeNe operando a 4mW e comprimento de onda de 633 nm. O equipamento realiza as medições não invasivas por "*backscatter optics*" (NIBS), feitas num ângulo de detecção de 173º e a posição da medição da cubeta é automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise. As dispersões foram diluídas 200 vezes em água ultrapura obtida por sistema Milli Q® e colocadas em celas de 1 cm de caminho óptico. Dada a diluição, a viscosidade do meio dispersante foi a água.

3.2.5.1.2. Análise de rastreamento de nanopartículas

A análise de rastreamento das nanopartículas (do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA) é uma técnica que se baseia na dispersão de luz ocasionada pelas partículas em suspensão, analisando individualmente o movimento browniano de cada nanopartícula presente na dispersão (tempo real usando câmara CCD, charge-coupled device) (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). Esta análise foi realizada no equipamento NanoSight NS300 (NanoSight, Reino Unido) com software NTA 3.0 Analytical (NanoSight, UK). Através desta técnica foi possível caracterizar o tamanho, distribuição de tamanhos e a concentração das nanopartículas. Além disso, como esta técnica fornece informações visuais das partículas, foi possível avaliar a agregação das partículas (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010; HOFFMEISTER et al., 2012). As medidas foram realizadas após diluição das amostras em água Milli-Q® em 1:200. Em seguida, a amostra foi introduzida no interior do porta-amostra por meio de uma seringa esterilizada, até seu total preenchimento (0,5 mL). A análise foi realizada utilizando um feixe de laser de diodo (l = 635 nm) (BENDER et al., 2012; HOFFMEISTER et al., 2012). As medidas de tamanho foram realizadas em triplicata com os dados expressos como a média ± desvio padrão.

3.2.5.2. Determinação do potencial zeta das partículas

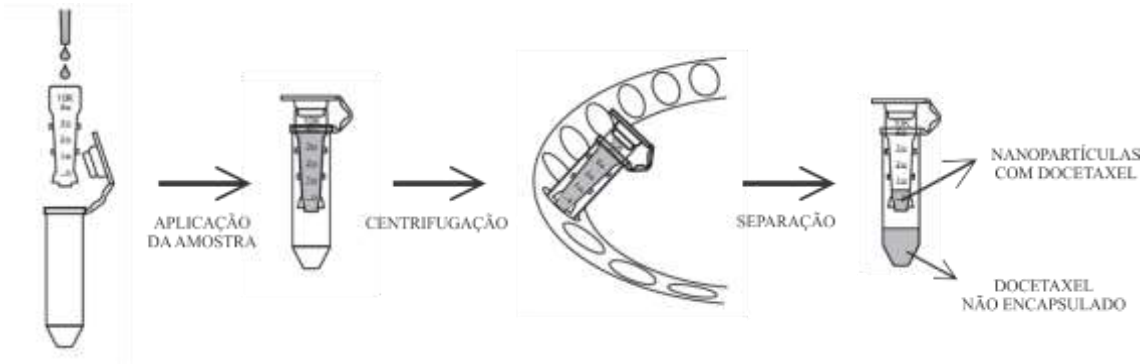
A carga superficial das dispersões foi medida como potencial zeta, determinado pela mobilidade eletroforética das partículas dispersas submetidas a um campo elétrico. Por já conter íons livres no meio gerados pelos componentes do tampão, a diluição foi realizada em água Milli-Q® em 1:200. As análises foram realizadas pelo equipamento Zetasizer 3000HS utilizando cela eletroforética.

3.2.5.3. Rendimento, eficiência de encapsulação e capacidade de carga

O rendimento da formulação foi avaliado através da razão entre a massa total de sólidos na formulação (recuperada após liofilização) e a massa pesada, de modo a evidenciar as possíveis perdas no processo de manipulação, de acordo com a equação $rendimento = \frac{massa\ total\ de\ formulação\ liofilizada}{soma\ das\ massas\ dos\ componentes\ da\ formulação} x\ 100$ (equação 3).

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada através do método indireto, esquematizado na Figura 11. Ele consiste na separação dos nanocarreadores do fármaco livre por ultrafiltração, dosando-se então o que não foi encapsulado e a concentração total de fármaco após o rompimento das nanopartículas (diluição em acetonitrila seguida de banho ultrassônico por 10 minutos). A suspensão foi colocada em tubos de ultrafiltração (Amicon®, MWCO 10 KDa) com uma membrana que gera pressão sob força centrífuga e permite a filtração do material, classificando-o de acordo com o tamanho dos poros. Foi utilizada uma força centrífuga de 3000G por 15 minutos para o processo de ultrafiltração.

Figura 11. Esquema do preparo das amostras para quantificação de docetaxel pelo método indireto.



A partir da diferença da concentração de fármaco total adicionado à formulação pela concentração de fármaco livre, temos a concentração de fármaco encapsulado dada pelas equações:

$$Eficiência\ de\ encapsulação\ (\%) = \frac{Fármaco_{total} - Fármaco_{livre}}{Fármaco_{total}} x\ 100 \text{ (equação 4)}$$

A capacidade de carga foi obtida a partir da relação entre a massa de fármaco encapsulada nos nanocarreadores e a massa total da formulação recuperada pelo processo de liofilização, de acordo com a equação:

$$Capacidade\ de\ carga\ (LC) = \frac{massa_{fármaco\ no\ carreador}}{massa_{recuperada}} x\ 100 \text{ (equação 5)}$$

3.2.5.4. Estabilidade coloidal

A estabilidade das nanopartículas preparadas foi determinada através do acompanhamento do tamanho de partícula, eficiência de encapsulação e índice de polidispersão pelas técnicas citadas anteriormente durante um mês em armazenamento a 4ºC.

3.2.5.5. Calorimetria diferencial exploratória

As temperaturas de transição vítrea e transição de fase dos componentes das nanopartículas e nanopartículas com e sem fármaco foram determinadas. As amostras foram liofilizadas e inseridas em recipiente de alumínio, com razão de aquecimento de 10ºC/minuto e fluxo de nitrogênio de 20 mL/minuto (MEI et al., 2009). Os dados foram adquiridos por um calorímetro modelo Jade DSC e analisados pelo Pyris - Instrument Managing Software, versão 11 (Perkin Elmer, EUA).

3.2.5.6. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Os componentes da formulação e as nanopartículas foram liofilizadas e comprimidas com KBr em prensa hidráulica. As pastilhas de amostra e KBr foram analisadas em um espectrômetro Shimadzu IR Prestige-21, com resolução de $2cm^{-1}$, de 4000 a $400cm^{-1}$ e analisadas pelo software do mesmo equipamento.

3.2.5.7. Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia das nanopartículas desenvolvidas, contendo e não contendo fármaco, foi avaliada em equipamento Joel JEM-100 CXII equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR. Para tal, 10 µL da suspensão de nanopartículas foi colocado em suporte metálico e mantido em repouso até adsorção das nanopartículas e remoção do excesso de solvente. Uma gota de uma solução a 1% (p/v) de acetato de uranila foi adicionado para gerar contraste negativo. Em seguida, a análise de microscopia foi executada com aceleração de 100 kV e aumento de 10^6 vezes.

3.2.6. Caracterização biológica *in vitro* dos sistemas

A linhagem celular tumoral PC-3, originalmente advinda de tumor de próstata humano, foi escolhida para a realização de todos os ensaios de caracterização biológica. A linhagem celular PC-3 é classicamente utilizada na avaliação de performance de agentes citotóxicos frente ao câncer de próstata. Além disso, possui agressividade e potencial metastático superior às linhagens DU145 e LNCaP, bem como não responde a agentes andrógenos ou glicocorticoides (JAYAKUMAR et al., 2014; KAIGHN et al., 1979; PULUKURI et al., 2005).

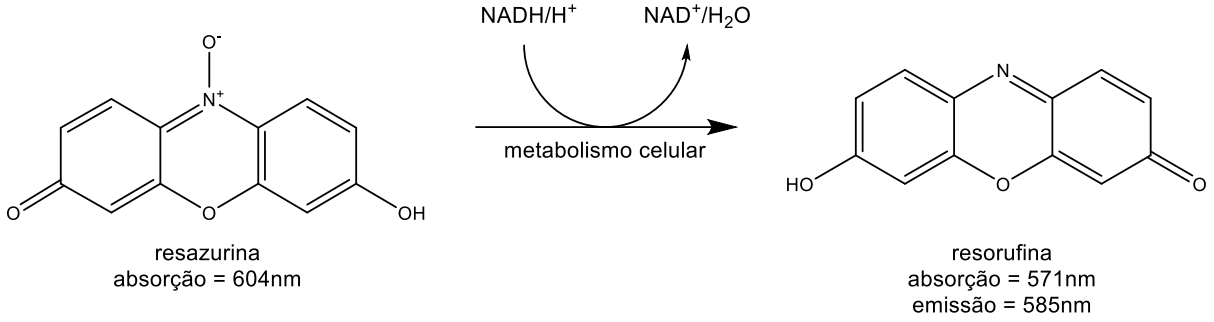
As células foram cultivadas em meio de cultivo RPMI-1640, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) de solução de antibiótico/antimicótico, contendo 10^4 unidades internacionais de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina. Após atingir entre 70-80% de confluência, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, e tripsinizadas com tripsina diluída 1x e posicionadas em diferentes placas de cultivo celular, objetivando a realização dos testes de captação celular e citotoxicidade. A linhagem foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa (UNESP) e possui certificado de origem da *American Type Culture Collection®*.

3.2.6.1. Avaliação da citotoxicidade celular

O cálculo para determinação de citotoxicidade celular foi realizado através da avaliação da viabilidade celular, por meio de quantificação da atividade mitocondrial relativa da linhagem celular supramencionada. O indicador utilizado foi a resazurina, substância azul com capacidade de redução a resorufina (Figura 12), uma substância

rosa que apresenta alta fluorescência por emissão na região do vermelho (RAMPERSAD, 2012). A resazurina foi escolhida em detrimento ao clássico ensaio de MTT dada sua alta reprodutibilidade, diminuição no número de etapas, reduzido custo e consequente alta confiabilidade (PRÄBST et al., 2017).

Figura 12. Esquema da reação de oxirredução da resazurina em resorufina.



Para realização do protocolo, 100µL de uma suspensão celular contendo $1x10^5$ células/mL foi inserido em cada poço, totalizando $1x10^4$ células por poço em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37ºC por 24h em atmosfera de 5% de CO_2 e umidade controlada, de modo a obter uma monocamada de células aderidas ao fundo das placas. Após remoção do meio de cultura e lavagem com PBS, formulações distintas contendo diferentes concentrações de docetaxel (0,1nM; 1nM; 10nM; 100nM e 1000nM) e nanopartículas sem fármaco foram aplicadas em cada poço (n=5), de acordo com os grupos:

- Grupo A: Controle negativo (células não tratadas);
- Grupo B: Controle positivo (DMSO 30%, v/v);
- Grupo C: Formulação comercial de docetaxel;
- Grupo D: Nanopartículas brancas;
- Grupo E: Nanopartículas contendo docetaxel.

Após 24,48 e 72 horas de permanência das formulações diluídas em meio de cultura com as células, o sobrenadante foi removido e os poços lavados com 200 µL de PBS. Posteriormente, 100µL de uma solução a 25 µg/mL de resazurina foi adicionada a cada poço e as placas levadas à incubadora por 4 horas, nas mesmas condições de incubação em cultivo. Por fim, a fluorescência na faixa do vermelho foi mensurada (excitação no comprimento de onda em 570 nm e emissão em 600 nm). Os resultados foram expressos por meio de viabilidade celular.

3.2.6.2. Captação celular por microscopia confocal

Para obter imagens da captação celular de nanopartículas pela linhagem celular PC-3, foram utilizadas as formulações de nanopartículas sem fármaco encapsulando o agente fluorescente BODIPY (QHM-68), sintetizado pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Flávio da Silva Emery (QHeteM - Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal, na FCFRP/USP). As formulações foram diluídas de acordo com a concentração superior testada no item 3.2.6.1, o que corresponde a cerca de $1x10^9$ nanopartículas/mL (dado obtido através dos ensaios de análise de rastreamento de nanopartículas). Para a execução do experimento, $1x10^6$ células/poço foram plaqueadas em placas de 6 poços, sobre lamínulas esterilizadas alocadas cuidadosamente ao fundo de cada poço, possibilitando assim o crescimento das células na parte superior da lamínula. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera contendo 5% CO_2 e umidade controlada. O meio de cultivo foi então removido e 2mL de uma suspensão de nanopartículas sem fármaco diluídas em meio de cultura foi adicionada aos poços, sendo mantida nas mesmas condições de incubação em cultura por 24 horas. Posteriormente, os tratamentos foram removidos e os poços lavados com 2 mL de PBS, de modo a remover completamente a formulação presente nos poços. As células foram fixadas por 10 minutos utilizando 1 mL de uma solução aquosa de paraformaldeído a 2% (m/v) e os poços foram lavados novamente com PBS, seguindo o mesmo protocolo de lavagem. A seguir, 30 µL de uma solução de DAPI (0,3 µg/mL) foi adicionada às lamínulas e mantida sem agitação por 10 minutos. Foi realizada uma última lavagem e as lamínulas foram posicionadas em uma lâmina histológica contendo Fluoromount®, um meio de montagem adequado para a manutenção da fluorescência, tendo as células em contato com a lâmina. A seguir, as lâminas foram analisadas em microscópio confocal de fluorescência Leica TCS SP8, utilizando um aumento de 40 vezes e comprimentos de onda de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm para o BODIPY e 405 e 413-472 nm para o DAPI, respectivamente.

3.2.6.3. Captação celular por citometria de fluxo

Para quantificar a captação celular de nanopartículas pela linhagem PC-3, foi utilizada a mesma formulação citada no item 3.2.6.1. Dois mL de uma suspensão celular a 5.10^5 células/mL foi colocado em cada poço, totalizando 10^6 células/por poço

(n=3) em placas de 6 poços que foram incubadas por 24 horas a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e umidade controlada, para que ocorresse a adesão das células ao fundo dos poços e formação da monocamada celular. Após a formação da monocamada, os meios de cultivo foram retirados e lavados conforme protocolos descritos anteriormente. A seguir, as formulações de nanopartículas BODIPY foram adicionadas e incubadas novamente por 24h, nas mesmas condições de incubação em cultura. As células foram então lavadas e tripsinizadas com o uso de 1 mL de tripsina diluída 1x por 10 minutos. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com 1 mL de meio de cultivo, as suspensões de células foram centrifugadas e ressuspendidas em 1 mL de PBS. Por fim, foi adicionado 2 µL de iodeto de propídio (50 µL/mL) às amostras, que foram analisadas em citômetro de fluxo utilizando os comprimentos de onda de excitação de 488 nm e emissão 530 nm para o BODIPY e, 488 e 670 nm para o iodeto de propídio.

3.2.7. Avaliação *in vivo* da eficácia em modelo xenotransplantado

Este estudo foi realizado com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA FCFRP/USP), sob protocolo nº 16.1.1108.60. 0 (Anexo 1).

Camundongos fêmea imunossuprimidos *Swiss nude* (6-8 semanas de idade, 20-25 gramas) foram empregados nos experimentos, de acordo com os princípios éticos de cuidado com animais de experimentação. Alimentação e água foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram acondicionados em 4 grupos de 6 indivíduos, a 25°C e com ciclos de 12h de claro/escuro. O tamanho da amostra foi definido em consonância com Resolução Normativa nº 25 de 29/09/2015 – CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), obtendo valor E aceitável (16 - entre 10 e 20), de acordo com a equação de recursos (E = N - T, equação 6, onde N = número total de sujeitos e T = número de combinações de tratamentos).

Foi realizado xenotransplante (grau de invasividade 3) com o objetivo de induzir a formação de um tumor sólido de próstata e subsequente avaliação da eficácia das formulações. Para realização do xenotransplante, foi inoculado em cada animal aproximadamente $1x10^7$ células (PC-3) suspensas em PBS (40 a 60µL) em via subcutânea na pata traseira. O tamanho dos tumores foi acompanhado através de

medidas realizadas por paquímetro. Quando os tumores atingiram cerca de 200 mm^3 (2-3 semanas), os animais começaram a ser tratados por via intraperitoneal (grau de invasividade 2) a cada 4 dias (q4d), com formulações distintas por grupo:

- Grupo I (controle): solução salina (40 µL);
- Grupo II: solução comercial de docetaxel (6 mg/kg);
- Grupo III: formulação contendo nanopartículas com fármaco (6 mg/kg);
- Grupo IV: formulação contendo nanopartículas sem fármaco (diluição igual ao grupo III);

Os animais foram monitorados em relação ao volume tumoral e peso corporal durante 4 semanas. A eutanásia dos camundongos ocorreu por sobredose anestésica através da administração de solução de 100 mg/kg de tiopental associado a lidocaína por via intraperitoneal. Os parâmetros utilizados para confirmar a morte dos animais foram a parada cardiorrespiratória, insensibilidade cutânea por período superior a 15 minutos e a temperatura corporal inferior a 25ºC. Os tumores foram isolados, medidos segundo a equação $volume\ tumoral = \frac{(comprimento\ tumoral \times largura\ tumoral^2)}{2}$ (equação 7) e encaminhados para análise histopatológica.

Foi estabelecido que caso algum animal apresentasse alto grau de desconforto, dor ou estresse durante o período do xenotransplante ou tratamento proposto, seriam adotadas intervenções precoces e o procedimento de morte humanitária do animal. Os critérios para a aplicação do ponto final humanitário foram a presença de ascite exacerbada, dificuldade de locomoção e de alimentação dos animais ou quaisquer outros sinais que indicassem as condições supracitadas.

3.2.7.1. Análise histopatológica

Os tumores extraídos foram fixados em formaldeído tamponado em pH 7.4 por 48 horas e posteriormente mantidos em etanol 70% (v/v) durante 24 horas, com trocas de solvente a cada 8 horas. As amostras foram transferidas para cassetes histológicos e inseridas em um processador automático de tecidos (Leica – TP1020), que realiza o processamento através da manutenção do tecido em períodos específicos com etanol 95%, etanol 100%, xilol e parafina, nesta sequência. Após o processamento descrito, as amostras foram corretamente posicionadas em moldes metálicos e

cobertas com mais parafina (Histosec® - MERCK) para formação dos blocos. Esse procedimento foi realizado em equipamento de inclusão (Leica EG1160). Foram obtidos cortes de 5 µm utilizando-se micrótomo (Leica RM2245). Os blocos foram ajustados no micrótomo para obtenção dos cortes do material. Com uma pinça, os cortes foram colocados em banho-maria com água a 45°C até que os mesmos fossem esticados. Os cortes foram aderidos com a própria lâmina (previamente limpa e tratada com poli-L-lisina, Sigma-Aldrich Brasil Ltda). As lâminas foram mantidas em estufa a 60°C durante uma hora até completo derretimento da parafina e adesão satisfatória dos cortes na lâmina. Em seguida, os cortes foram desparafinizados, hidratados e corados. Foi utilizado equipamento especifico (Leica ST5010) para desparafinização, hidratação, coloração e desidratação das lâminas. Por fim, a montagem foi feita pela colocação do meio de montagem e finalização com uma lamínula na face superior da lâmina.

3.2.8. Análise estatística

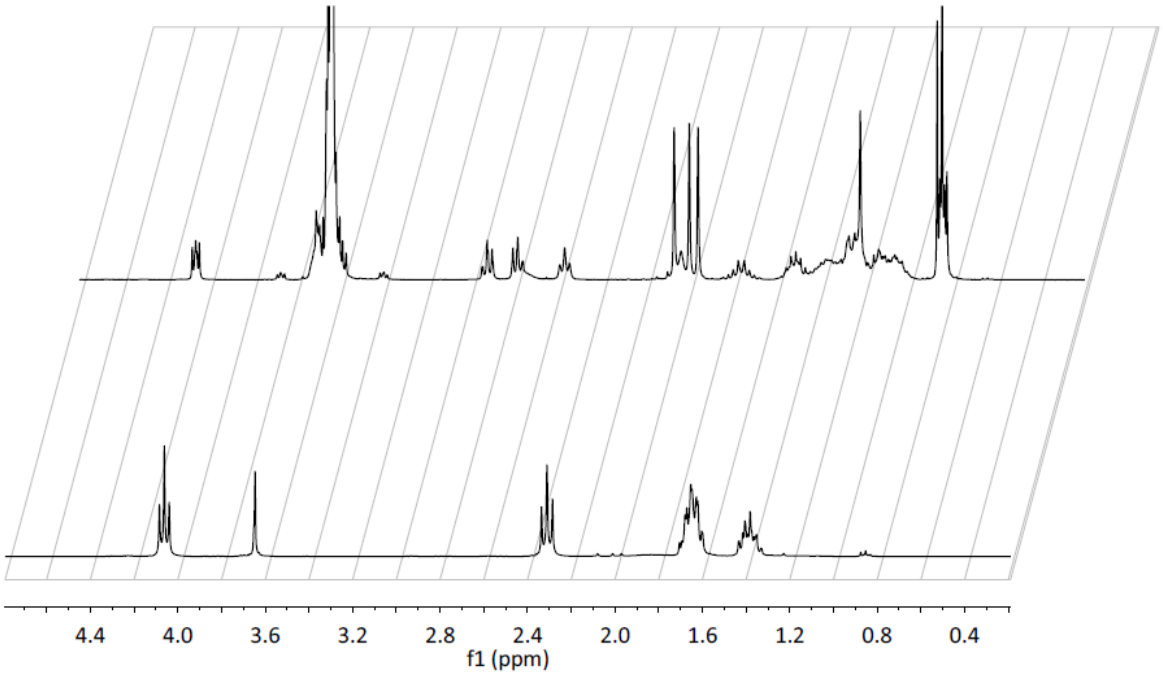
Os resultados obtidos nos ensaios de caracterização físico-química e biológica dos sistemas desenvolvidos foram submetidos a análise de T de Student ou análise de variância (ANOVA, uma via ou duas vias), dependendo do ensaio realizado, seguido da determinação do nível de significância das diferenças pelo teste de múltipla comparação Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ foram considerados estatisticamente significativos, dependendo do ensaio realizado. O s*oftware* GraphPad Prism® 5.0 foi utilizado para todas as análises e confecção dos gráficos. As barras de erro em cada gráfico indicam desvio padrão. Para otimização da formulação, foi aplicado um *design* de Box-Behnken contendo 3 fatores contínuos em 3 níveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química do copolímero PCL-TGPS

Após a síntese do copolímero de PCL-TPGS, realizou-se uma caracterização físico-química antes dos ensaios subsequentes. Inicialmente, ensaios de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^{1}H) em clorofórmio deuterado foram conduzidos para constatar que houve a reação e consequente polimerização. Foram obtidos espectros do TPGS e PCL-TPGS, conforme a Figura 13.

Figura 13. Espectros de RMN 1H obtidos em 300 MHz do TPGS (superior) e PCL-TPGS (inferior) em CDCl3.

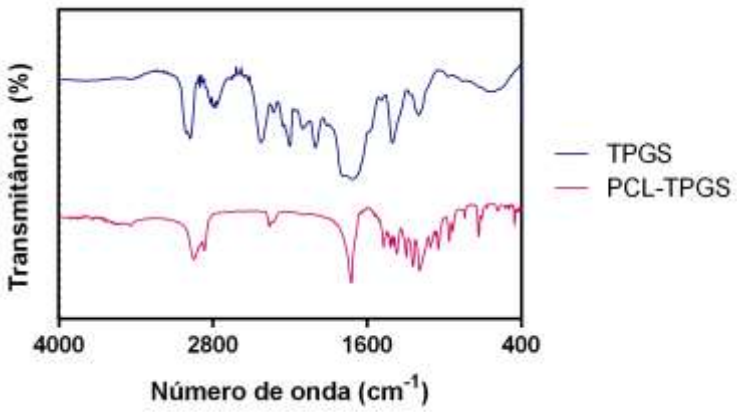


Os sinais tripletos nos deslocamentos de 4.1 e 2.3 ppm, presentes nos espectros do copolímero sintetizado (inferior na Figura 13) são referentes aos prótons metilênicos dos segmentos de policaprolactona. Os sinais em 3.6 ppm indicam os prótons $–CH_2$ da porção polietileno do TPGS, enquanto os diversos sinais em deslocamentos químicos menores são derivados das diversas caudas da porção contendo vitamina E que não puderam ser perfeitamente atribuídos. Dessa forma, foi possível sugerir a estrutura gerada a partir da síntese proposta ao correlacionar com a estrutura prevista. Os dados obtidos foram semelhantes aos obtidos por Bernabeu e colaboradores e Ren e colaboradores, incluindo os sinais de mesmo deslocamento,

indicando que o método adaptado para síntese do copolímero é capaz de produzir resultado apropriado para a condução dos estudos posteriores (BERNABEU et al., 2014; REN et al., 2009). O rendimento da reação foi calculado através da razão entre a massa de produto obtido e a massa de reagentes utilizados, totalizando 93,4%. O peso molecular médio (M_n) do copolímero obtido foi calculado através da razão entre as integrais dos sinais obtidos em 4.1 e 3.6, considerando a quantidade de prótons referentes a cada sinal e indicando M_n = 16.320 g/mol.

No espectro adquirido no infravermelho por transformada de Fourier (Figura 14), notou-se a presença de banda de estiramento -CH em 2880 cm^{-1} no TPGS, enquanto o mesmo sinal mostrou-se duplicado no PCL-TPGS em 2940 e 2870 cm^{-1}. A banda presente nas duas situações em 3400 cm^{-1} é atribuída às hidroxilas terminais. Os sinais em 1190 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} foram os mais significativos na diferenciação dos diferentes espectros, pois estão presentes apenas na amostra de copolímero PCL-TPGS e referem-se ao estiramento C-O, resultantes da reação de caprolactona e TPGS.

Figura 14. Espectro de infravermelho por transformada de Fourier do TPGS e copolímero sintetizado, PCL-TPGS.



Através da análise termogravimétrica (TGA) foi possível determinar as temperaturas de início de perda de massa do PCL, TPGS e PCL-TPGS, que foram respectivamente 392,71°C, 390,95°C e 335,55°C. As curvas calorimétricas obtidas indicaram maior fragilidade térmica e consequente susceptibilidade a alterações de estado físico do copolímero sintetizado, quando comparado aos materiais utilizados para sua síntese (Figura 15). Os dados obtidos com a calorimetria diferencial exploratória (DSC) corroboram com os dados de TGA, além de permitirem a

identificação de transições de fase de primeira ordem (fusão) com ligeiro estreitamento dos picos, permitindo concluir que o produto obtido pela síntese possui alto grau de pureza (Figura 16) (CRAIG; READING, 2006; GIRON, 1999).

Figura 15. Curvas calorimétricas do PCL, TPGS e PCL-TPGS, obtidas pela técnica de TGA.

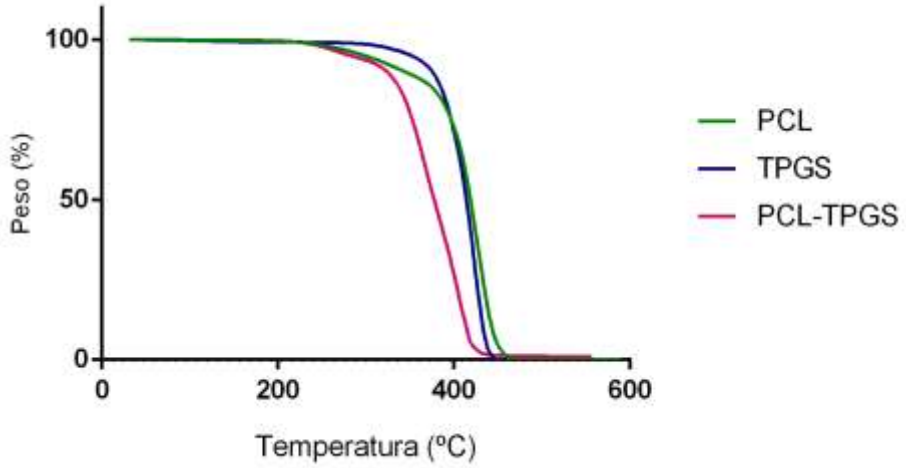
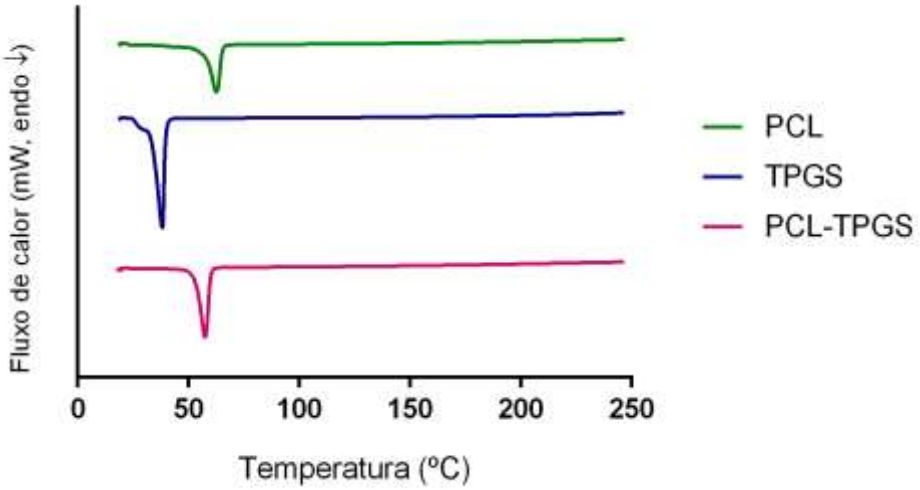


Figura 16. Gráfico de calorimetria diferencial exploratória (DSC) do PCL, TPGS e PCL-TPGS.



4.2. Validação de método analítico para quantificação de docetaxel

Para garantir a confiabilidade das quantificações realizadas durante as etapas seguintes do desenvolvimento do estudo, foi necessário desenvolver e validar um método cromatográfico para a análise de docetaxel nas formulações a serem desenvolvidas. Para tanto, parâmetros clássicos de validação de métodos analíticos,

como seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção foram utilizados (ANVISA, 2003; ICH, 2005; MOEIN; EL BEQQALI; ABDEL-REHIM, 2017; SAHU et al., 2018).

Nesta etapa foram realizadas diversas adaptações de condições encontradas na literatura, originando um método diferente dos relatados na literatura científica. Para a quantificação de docetaxel em nanopartículas poliméricas, foram testados diferentes solventes, como metanol, água e acetonitrila em diversas proporções e vazões de fase móvel (LIANG et al., 2015). O método escolhido consistiu na utilização de fase móvel constituída de metanol:acetonitrila:água, nas proporções de 60:25:15 coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm), fluxo de 0,8 $mL.min^{-1}$, comprimento de onda em 232 nm e volume de injeção de 20 µL. Nas condições mencionadas, o pico referente ao docetaxel se mostrou com alta resolução e com pureza de pico suficiente para a condução dos testes subsequentes, conforme demonstrado na Figura 18. A seletividade foi avaliada e garantida através da eluição de componentes das nanopartículas de PCL-TPGS sem o docetaxel, de modo a examinar visualmente se há algum sinal de coeluição no tempo de retenção do fármaco, conforme Figura 17. A amostra foi preparada da mesma maneira que o planejado para as quantificações posteriores (por meio de solubilização direta em acetonitrila e ultrafiltração em filtros AMICON®) e não houve coincidência nos tempos de retenção, evidenciando a seletividade.

Figura 17. Representação esquemática de cromatograma obtido para proposta de formulação sem fármaco obtida pela técnica de CLAE.

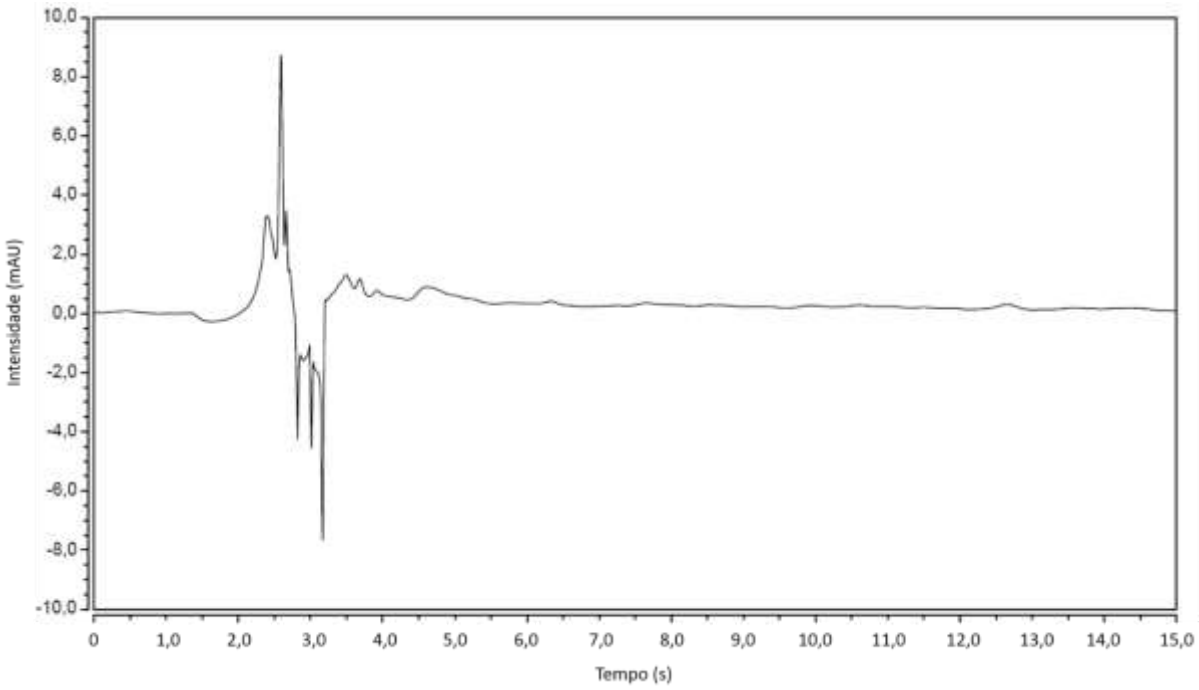
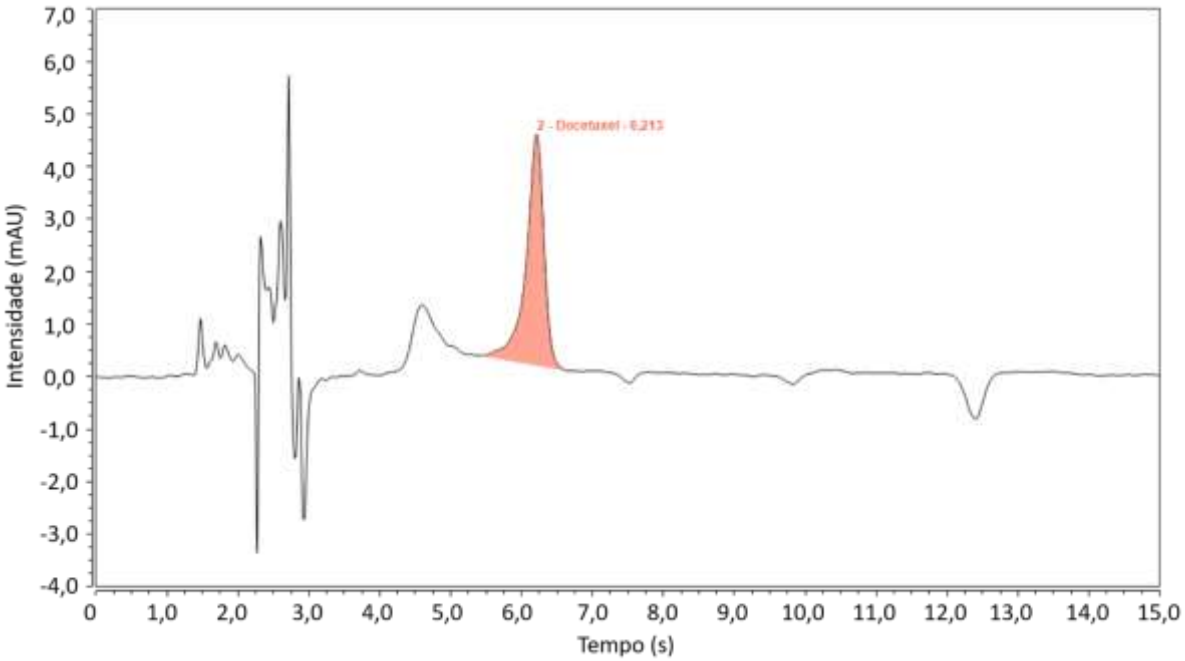


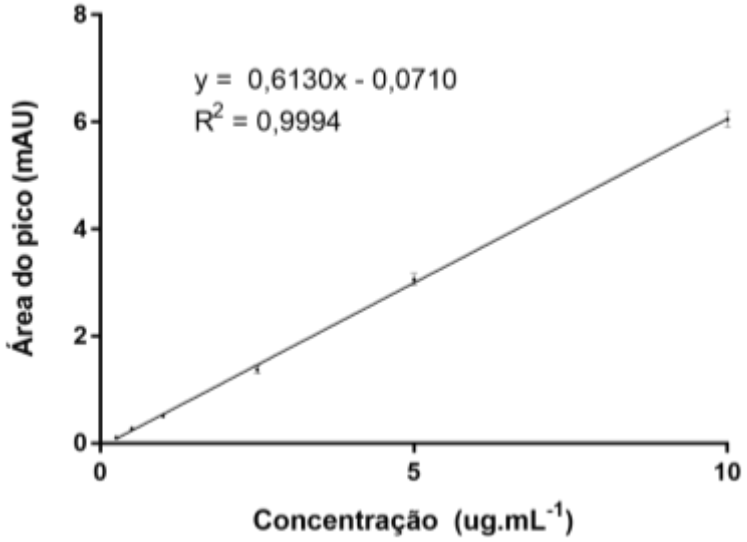
Figura 18. Representação esquemática de cromatograma obtido para o docetaxel (10ug.mL^{-1}) pela técnica de CLAE.



A linearidade foi estimada por ajuste dos dados através de regressão linear utilizando os métodos dos mínimos quadrados. A integral da área dos picos mostrou ser diretamente proporcional à concentração do fármaco em concentrações de 0,25

até 10,0 µg.mL^{-1}, com R^2 equivalente a 0,9994. De acordo com a Figura 19, pode-se observar que o método foi linear na faixa de trabalho estudada (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Figura 19. Curva analítica para quantificação de docetaxel pelo método desenvolvido.



Os resultados apresentados na Tabela 2 e Tabela 3 demonstraram que o método é preciso e exato, ou seja, apresentou uma pequena dispersão entre os resultados de leitura e um alto grau de concordância entre os resultados individuais em relação a um valor considerado como verdadeiro.

Tabela 2. Repetibilidade e precisão intermediária do método analítico.

Repetibilidade	0,25 µg.mL^{-1}	1,00 µg.mL^{-1}	10,00 µg.mL^{-1}
Número de replicatas	3	3	3
Coeficiente de variação (%)	1,41	1,72	1,24
Precisão Intermediária	0,25 µg.mL^{-1}	1,00 µg.mL^{-1}	10,00 µg.mL^{-1}
Número de replicatas	9	9	9
Coeficiente de variação (%)	1,68	2,39	2,37

Tabela 3. Exatidão intra e inter-ensaio do método analítico.

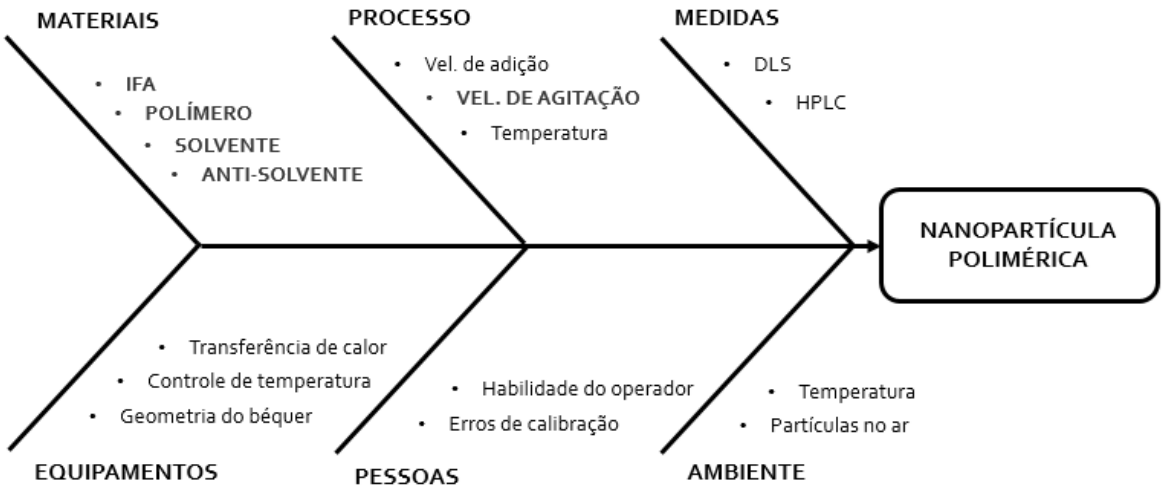
Exatidão intra-ensaio	0,25 µg.mL^{-1}	1,00 µg.mL^{-1}	10,00 µg.mL^{-1}
Número de replicatas	3	3	3
Recuperação (%)	94,19	94,22	99,68
Exatidão inter-ensaio	0,25 µg.mL^{-1}	1,00 µg.mL^{-1}	10,00 µg.mL^{-1}
Número de replicatas	9	9	9
Recuperação (%)	95,1	93,43	99,77

4.3. Caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas

4.3.1. Preparo e otimização em função de PSD e PDI.

Inicialmente, realizou-se uma avaliação dos parâmetros críticos de processo (CPP) pela confecção de um diagrama de Ishikawa, que permitiu melhor visualização dos fatores que influenciam o processo de formação das nanopartículas poliméricas através da técnica de nanoprecipitação, conforme indicado pela Figura 20. Wang e colaboradores (2016) discutem que alguns parâmetros podem influenciar as propriedades físico-químicas do sistema resultante, como a velocidade de agitação, viscosidade do meio, agitação, solubilidade e quantidade de fármaco e polímero, entre outros (WANG et al., 2016). Assim, os CPP escolhidos para os estudos subsequentes foram a quantidade de fármaco, quantidade de polímero, proporção de solventes e velocidade de agitação do béquer (BARICHELLO et al., 1999; ESMAEILI; ATYABI; DINARVAND, 2007; MILADI et al., 2016).

Figura 20. Diagrama de Ishikawa indicando o processo de nanoprecipitação, com destaque às variáveis independentes escolhidas para otimização.



Foi aplicada a ferramenta de planejamento de experimentos de superfície de resposta dos softwares Minitab® 17.1.0 e Dell Statistica 13. Para isso, criou-se um design de Box-Behnken contendo 3 fatores contínuos em 3 níveis, baseados na análise dos CPPs, revisão de literatura e experiência dos analistas para definição dos níveis, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Variáveis independentes e seus respectivos níveis analisados

Nível	Razão fase aquosa/orgânica ($RFA_{/FO}$)	Razão polímero/fármaco ($R_{Polímero/Fármaco}$)	Agitação (rpm)
Mínimo	1	4	300
Intermediário	2	10	600
Máximo	3	16	900

Os softwares geraram 15 situações experimentais que foram devidamente manipuladas em duplicata, de modo a aumentar a confiabilidade do modelo gerado, totalizando 30 ensaios (Tabela 5). A proposta de modelo foi alimentada com dados de resposta, como distribuição de tamanhos de partículas (PSD, do inglês *particle size distribution*), índice de polidispersão (PDI, do inglês *polydispersity index*) e potencial zeta (ZP, do inglês *zeta potential*).

Tabela 5. Desenho experimental sugerido pelo software e respectivas respostas de PSD, PDI e ZP em função da variação da razão fase aquosa/fase orgânica (RFA/FO), razão polímero/fármaco (RPolímero/Fármaco) e agitação (rpm).

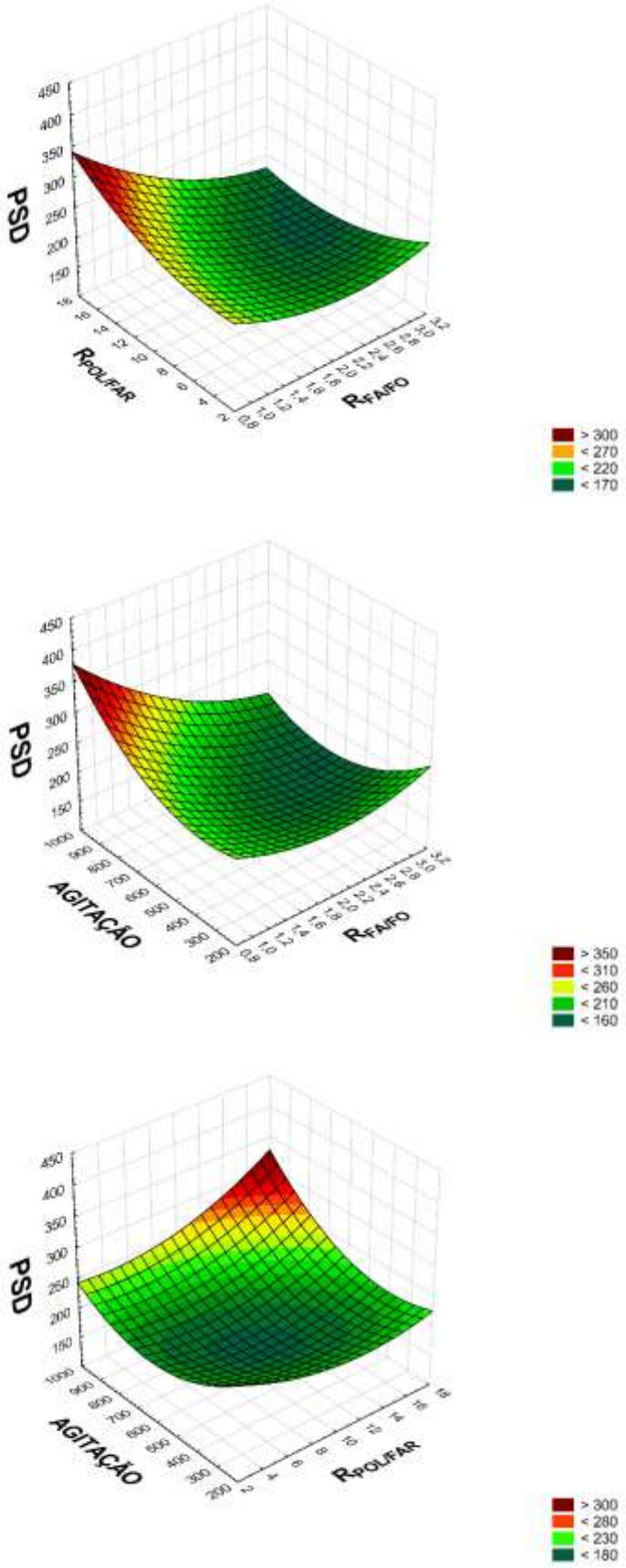
N	$RFA_{/FO}$	$RPolímero_{/Fármaco}$	Agitação (rpm)	PSD (nm)	PDI	ZP
1	1	4	600	208,90	0,191	-31,5
2	3	4	600	172,30	0,285	-28,7
3	1	16	600	365,00	0,378	-29,3
4	3	16	600	188,00	0,128	-33,0
5	1	10	300	195,00	0,250	-28,3
6	3	10	300	182,40	0,213	-27,1
7	1	10	900	414,40	0,185	-35,9
8	3	10	900	158,50	0,087	-28,1
9	2	4	300	414,40	0,185	-35,9
10	2	16	300	208,80	0,251	-29,8
11	2	4	900	261,20	0,240	-32,5
12	2	16	900	119,10	0,226	-19,8
13	2	10	600	173,40	0,182	-33,5
14	2	10	600	157,50	0,134	-32,6
15	2	10	600	155,30	0,069	-33,0
16	1	4	600	160,90	0,142	-21,5
17	3	4	600	119,60	0,108	-21,7
18	1	16	600	262,40	0,257	-30,4
19	3	16	600	185,20	0,172	-28,6
20	1	10	300	169,30	0,137	-27,2
21	3	10	300	147,80	0,093	-28,0
22	1	10	900	250,00	0,190	-29,6
23	3	10	900	246,20	0,180	-29,6
24	2	4	300	121,20	0,232	-19,3
25	2	16	300	169,90	0,118	-26,9
26	2	4	900	151,60	0,16	-31,9
27	2	16	900	270,40	0,22	-31,4
28	2	10	600	158,50	0,09	-28,4
29	2	10	600	172,80	0,19	-26,9
30	2	10	600	162,90	0,13	-32,3

As regressões de superfície de resposta se mostraram bem ajustadas e com pouco resíduo, evidenciando a adequação do modelo proposto ao planejamento experimental.

Ao interpretar os gráficos de superfície das variáveis dependentes em função da distribuição de tamanhos de partículas (Figura 21), é possível observar que a alteração da $R_{FA/FO}$ não influenciou o PSD de maneira estatisticamente significativa (t de Student, $p < 0,05$), gerando valores baixos por toda a faixa de trabalho, permitindo assim inferir que esse parâmetro de processo não é crítico para a distribuição de

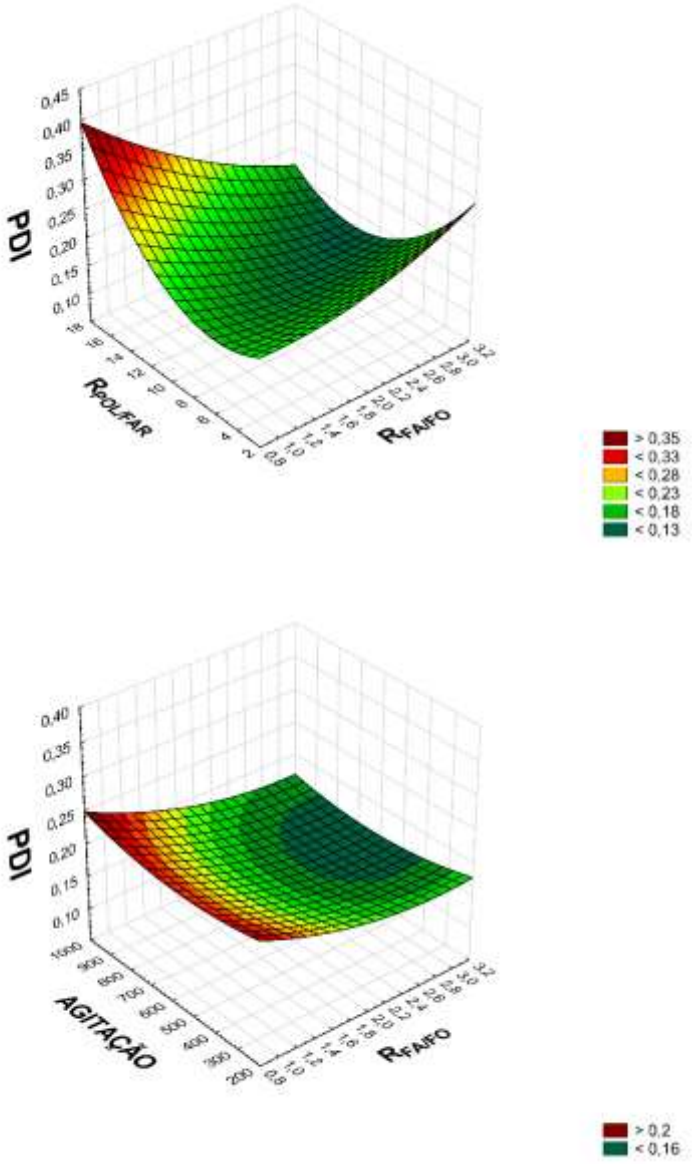
tamanho das nanopartículas obtidas na faixa estudada. O aumento da agitação mostrou-se prejudicial à resposta de PSD, gerando valores muito altos, o que pode ser explicado por uma maior energia conferida ao sistema durante o processo de agitação e conseguinte formação de aglomerados (MILADI et al., 2016). Esse efeito foi evidenciado nos casos em que a $R_{Polímero/Fármaco}$ foi muito elevada e $R_{FA/FO}$ próxima ao limite inferior proposto, o que pode ser explicado pelo aumento da viscosidade do meio, diminuindo a entropia do meio e gerando partículas maiores. Sharma e colaboradores (2014) obtiveram a mesma conclusão ao avaliar o mesmo parâmetro ($R_{FA/FO}$) em um planejamento experimental de Box-Behnken (SHARMA et al., 2014). A $R_{Polímero/Fármaco}$, quando analisada junto à $R_{FA/FO}$, mostrou distribuições de tamanhos de partícula adequadas (inferiores a 200 nm, conforme apresentado por SINGH; SHARMA; ROBERTSON, 2012) para a via de administração e objetivo alvo do sistema de liberação, nos valores extremos para as duas situações, superior e inferior. Resultados semelhantes foram encontrados por Singh e colaboradores (2015), que investigaram variações controladas de parâmetros no processo de nanoprecipitação para o desenvolvimento de uma nanopartícula polimérica encapsulando temozolomida, utilizando o planejamento experimental de Box-Behnken (SINGH et al., 2015). Entre os resultados encontrados por Singh e colaboradores, destaca-se o elevado impacto da razão entre quantidades de polímero e fármaco na distribuição de tamanho de partícula.

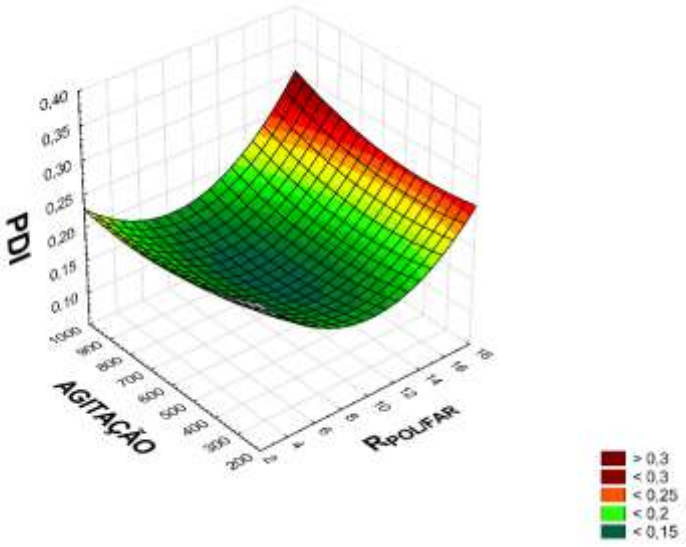
Figura 21. Gráficos de superfície das variáveis dependentes em função da distribuição de tamanhos de partículas.



Em relação às variáveis independentes em função do índice de polidispersão (Figura 22), foi observada discreta, não estatisticamente significativa influência da agitação no processo, indicando que este parâmetro não foi crítico na produção das nanopartículas poliméricas. A associação de baixos valores de $R_{Polímero/Fármaco}$ e $R_{FA/FO}$ mostraram influenciar positivamente o processo, gerando valores de PDI muito baixos e consequentemente apropriados para garantir maior homogeneidade interna do sistema.

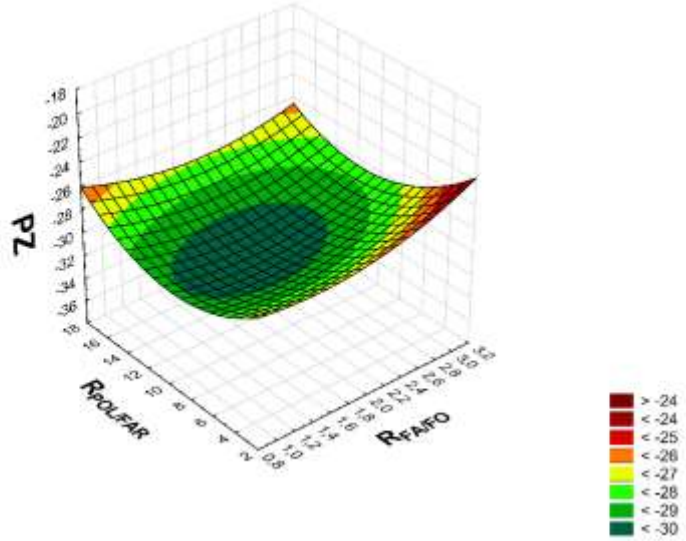
Figura 22. Gráficos de superfície das variáveis dependentes em função do índice de polidispersão

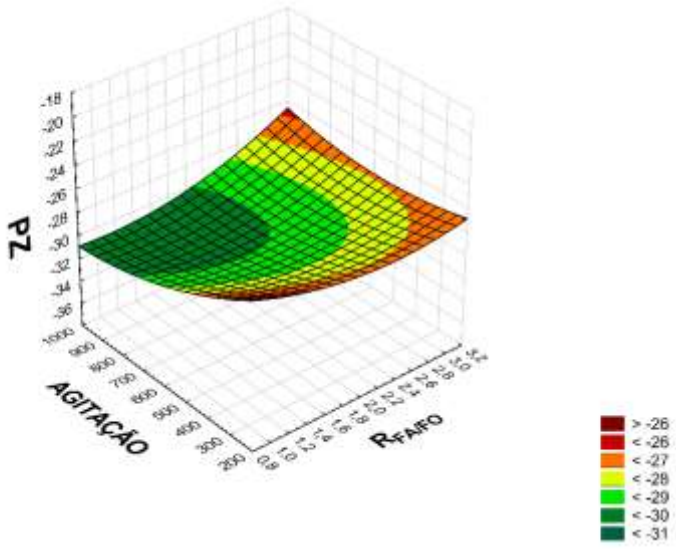


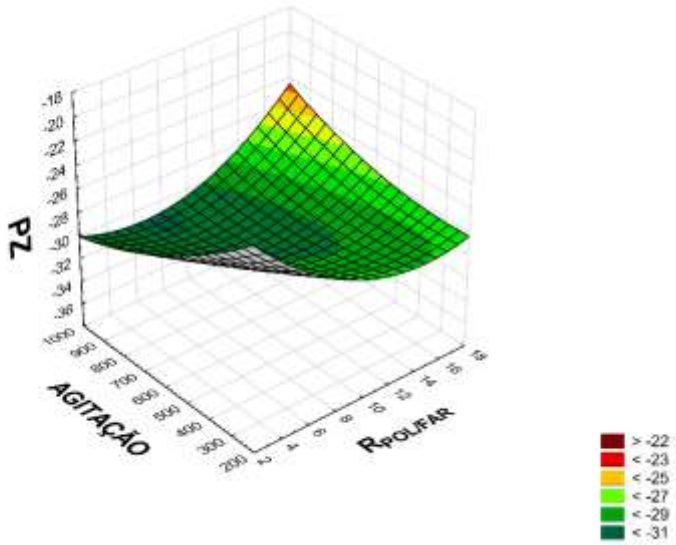


O potencial zeta atingiu valores apropriados (superiores a 20 mV, em módulo, para garantir a estabilidade elétrica das nanopartículas) em praticamente todas as situações, salvo em valores de agitação muito baixos associados à $R_{Polímero/Fármaco}$ elevados, conforme indicado nos gráficos da Figura 23.

Figura 23. Gráficos de superfície das variáveis dependentes em função do potencial zeta

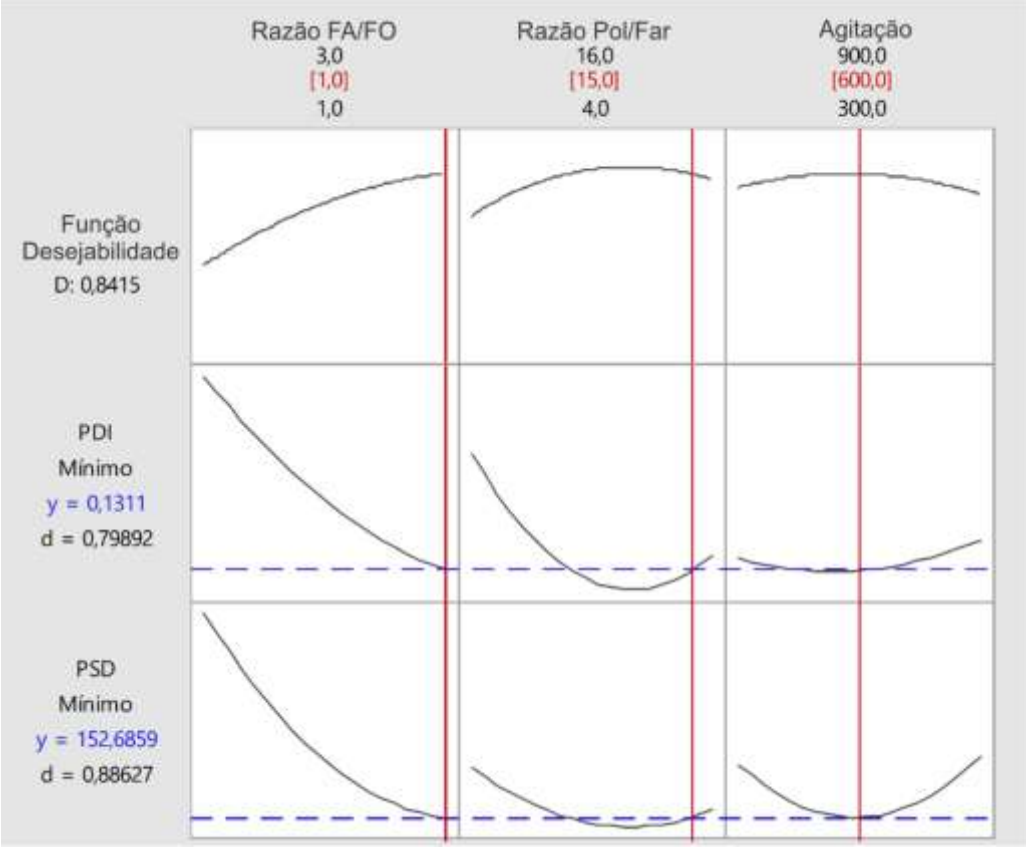






Depois da análise das superfícies de resposta, foi aplicada uma função de otimização de resposta, objetivando os menores valores de distribuição de tamanhos de partículas e índice de polidispersão. Segundo a otimização gerada, o modelo indicou que esta situação seria contemplada em uma formulação hipotética com agitação em 600 rpm, $R_{Polímero/Fármaco}$ equivalente a 15 e $R_{FA/FO}$ de 1,0, conforme Figura 24.

Figura 24. Gráfico de otimização de resposta com predição dos parâmetros críticos de processo objetivando menor PSD e PDI no modelo gerado.



A formulação sugerida foi então manipulada em triplicata e avaliada em função de distribuição de tamanhos de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta. Os valores encontrados foram coincidentes com o previsto pelo modelo em $p < 0,05$, obtendo PSD de 130 ± 18 nm, PDI de 0,10 ± 0,04 e ZP de -30,1 ± 2,3 mV, adequados para a estabilidade, via de administração pretendida, a via endovenosa, para os propósitos da doença-alvo e, portanto, para a condução dos estudos subsequentes.

4.3.2. Rendimento, eficiência de encapsulação e capacidade de carga

Após os resultados de otimização de resposta que geraram composições adequadas para o sistema na ausência de fármaco, este foi incorporado à formulação. Foram manipuladas formulações contendo 6 mg de docetaxel, 90 mg de PCL-TPGS e 30 mL de volume final, obtendo um sistema com concentração de fármaco é de 200 $\mu g.mL^{-1}$. A eficiência de encapsulação foi obtida pelo método indireto de quantificação e com análise por CLAE validada, em triplicata. De modo a garantir que o método de quantificação indireto por ultrafiltração em tubos AMICON® não gerou resultados

inadequados pela presença de cristais precipitados (o que poderia levar a uma encapsulação acima do real), a fração superior do tubo foi avaliada em microscópio de luz polarizada. Não foi possível observar a formação de cristais, evidenciando a adequabilidade do método.

Os nanocarreadores apresentaram alto rendimento, eficiência de encapsulação e capacidade de carga, atingindo valores médios de 98,7 ± 3,2%, 96,2 ± 1,1% e 5,01 ± 0,32%, respectivamente. Os valores observados foram consideravelmente superiores aos encontrados na literatura no que diz respeito a sistemas semelhantes carreando taxanos, com estrutura química e propriedades físico-químicas similares (BERNABEU et al., 2014; CHEN et al., 2016; ZHANG et al., 2015).

4.3.3. Estabilidade coloidal

Os parâmetros mencionados anteriormente foram avaliados em função do tempo para prever a estabilidade do sistema nanoestruturado em geladeira (4ºC). A formulação mostrou-se estável durante 1 mês, liberando 5,2 ± 0,3% de fármaco em 30 dias. A distribuição de tamanhos manteve-se monomodal (Figura 25) em todos os períodos analisados, evidenciando a ausência de agregação das nanopartículas. Nas primeiras 24 horas, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias de encapsulamento segundo o teste t de Student. No período subsequente, houve uma pequena liberação do fármaco ao longo dos 30 dias, não apresentando médias de encapsulação diferentes segundo o teste estatístico de análise de variância (ANOVA), conforme Figura 26.

Figura 25. Distribuição de tamanho das nanopartículas desenvolvidas. Perfil similar foi obtido em todas as replicatas para todo o período analisado.

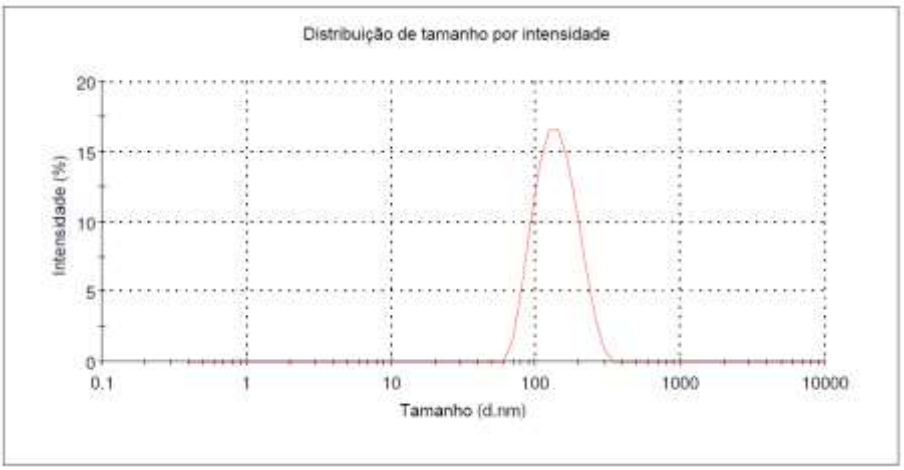
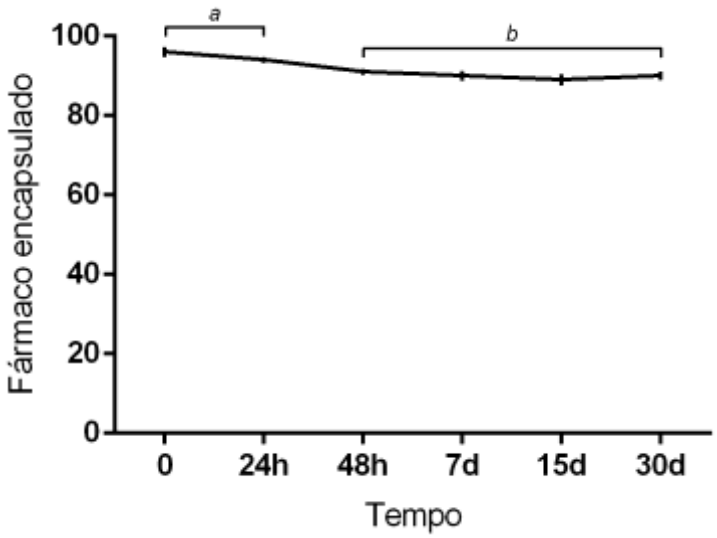
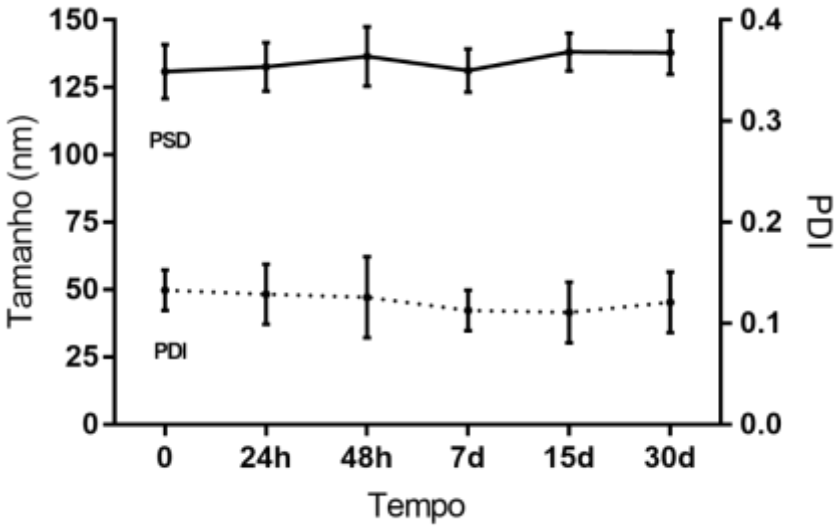


Figura 26. Porcentagem de fármaco encapsulado em função do tempo. a e b representam médias estatisticamente diferentes em p < 0,05)



A distribuição de tamanhos e o índice de polidispersão também não sofreram alterações estatisticamente significativas (Figura 27) (p < 0,05) segundo o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) em nenhum ponto, sugerindo a ocorrência de estabilidade do sistema no período avaliado e sugerindo estabilidade da partícula em função do tamanho (BHATTACHARJEE, 2016).

Figura 27. Distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersão dos sistemas desenvolvidos em função do tempo.



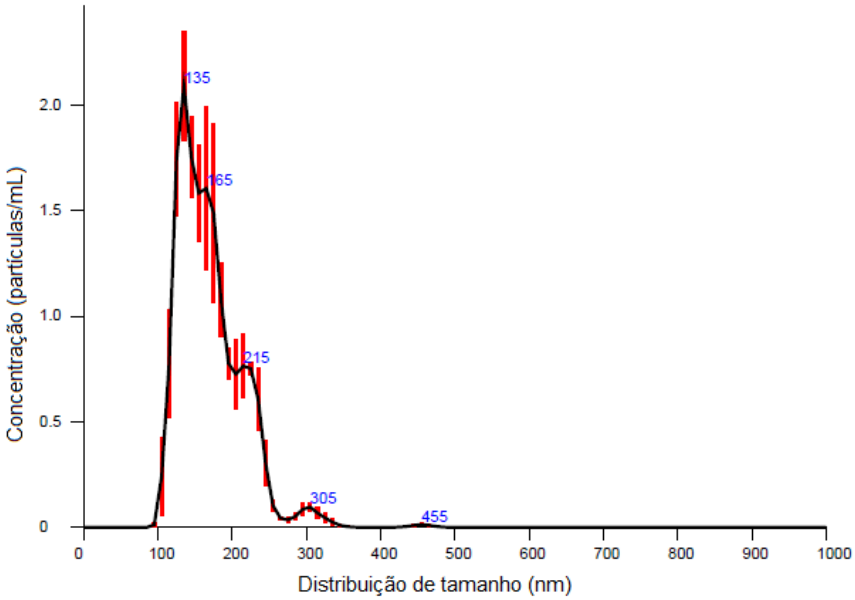
4.3.4. Análise de rastreamento de nanopartículas

Ensaios de NTA foram realizados com a mesma formulação utilizada para os estudos de estabilidade. Os resultados foram semelhantes aos adquiridos por espalhamento dinâmico de luz, com diferenças possivelmente resultantes da maneira de expressão de dados; enquanto o NTA gera os resultados por número de partículas, o DLS apresenta os mesmos em função da intensidade de luz espalhada. O ensaio apresentou pequenas populações com distribuições de tamanhos levemente superiores, mas a média de distribuição de tamanho permaneceu menor do que 200nm e com baixa polidispersão. Assim, os valores são apropriados para a via de interesse. Esta técnica gerou informações importantes para a consolidação dos parâmetros medidos anteriormente, como o índice de span, desvio, média e moda das distribuições de tamanho e concentração expressa em partículas por mililitro (Tabela 6, Figura 28), importante para a posterior condução dos estudos *in vitro* e *in vivo* de citotoxicidade. O índice de span de 0,68 ± 0,03 mostrou-se em consonância com os baixos valores de índice de polidispersão obtidos por espalhamento dinâmico de luz.

Tabela 6. Dados de média, moda, desvio, span e concentração de partículas por mililitro

Parâmetro	Valor
Média	170,1 ± 0,8 nm
Moda	145,5 ± 9,1 nm
Desvio	44,6 ± 2,4 nm
Span	0,68 ± 0,03
Concentração	$1{,}69.10^{12} \pm 1{,}08.10^{11}$ partículas.mL^{-1}

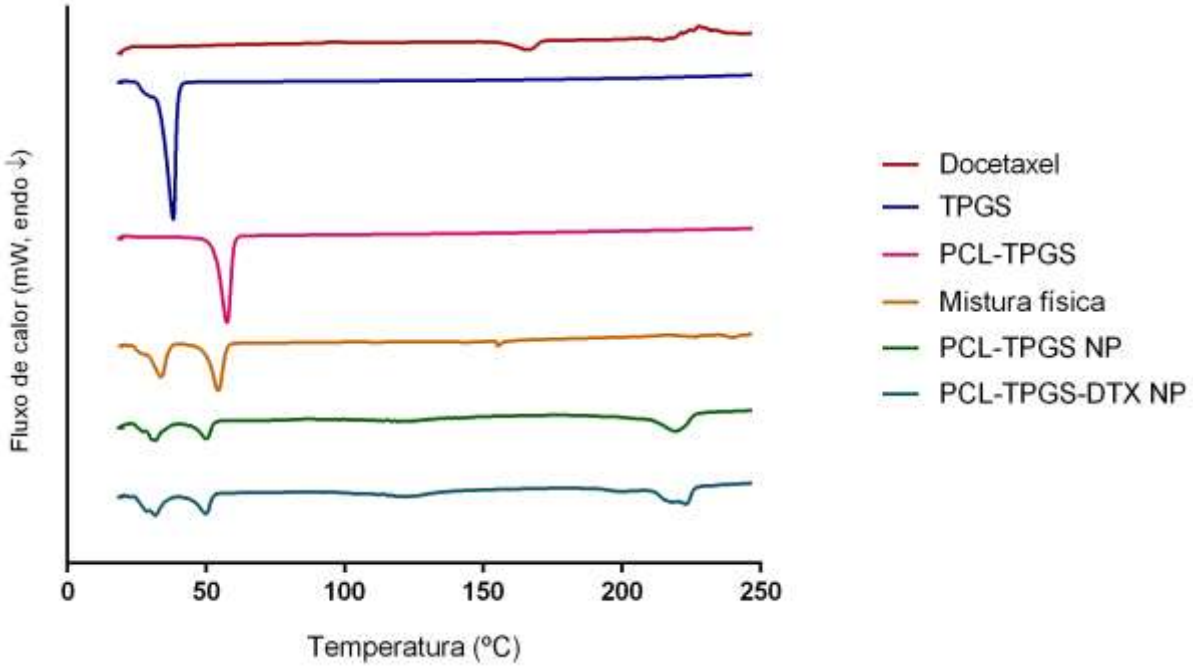
Figura 28. Gráfico da concentração de partículas em relação ao tamanho, obtido por análise de rastreamento de nanopartículas.



4.3.5. Calorimetria diferencial exploratória

De modo a compreender a comportamento térmico da formulação, foram realizadas curvas calorimétricas do fármaco, da formulação de nanopartículas ausentes de fármaco, da formulação com fármaco incorporado e da mistura física dos componentes. O fármaco apresentou um pico endotérmico em 165,74 °C, sinal este que também foi identificado na mistura física em 155,18 °C (Figura 29) (ZASKE; PERRIN; LEVEILLER, 2001)

Figura 29. Curvas calorimétricas do docetaxel, mistura física dos componentes da formulação, nanopartículas sem fármaco (PCL-TPGS NP) e contendo fármaco (PCL-TPGS-DTX NP).



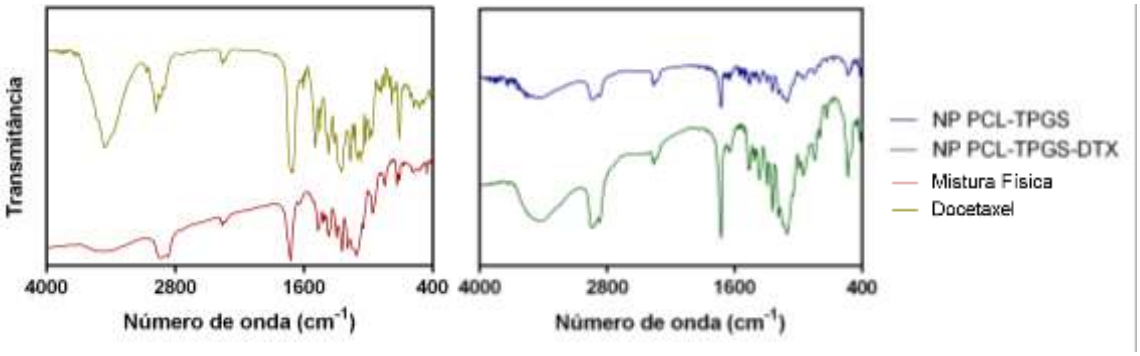
A redução na temperatura de transição vítrea pode estar relacionada às interações na mistura, tal como a solubilização do docetaxel no TPGS. O perfil calorimétrico das nanopartículas com e sem fármaco foi semelhante. A ausência do sinal endotérmico em PCL-TPGS-DTX NP, presente no docetaxel e na mistura física, sugere a presença de docetaxel em forma amorfa, cristalina desorganizada ou solução sólida na nanoestrutura (ZHU et al., 2014). O sinal endotérmico presente em ambas nanopartículas com início em 213.18ºC refere-se tampão fosfato adicionado às formulações com o objetivo de isotonização e ajuste de pH.

4.3.6. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Os espectros de FTIR adquiridos (Figura 30) confirmaram as propriedades evidenciadas pelos ensaios de calorimetria diferencial exploratória. A banda de estiramento -CH em 560 cm^{-1}, exclusiva e característica do espectro do docetaxel, mostrou-se ausente em PCL-TPGS-DTX NP, confirmando a encapsulação eficiente do fármaco (KEUM et al., 2011; RAROKAR et al., 2016). Na mistura física, entretanto, foram detectados sinais referentes à todos os componentes, em intensidades de

transmitância proporcional à quantidade dos mesmos na formulação. O intenso sinal em 3200 cm^{-1} foi atribuído às hidroxilas do docetaxel.

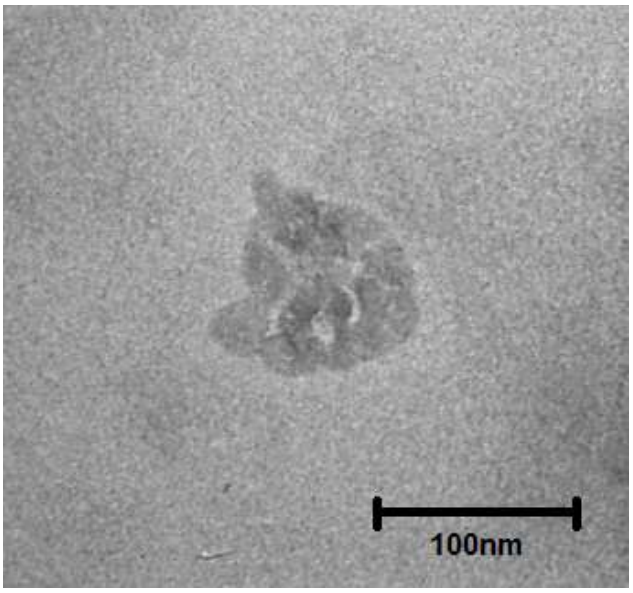
Figura 30. Espectros de FTIR do docetaxel, mistura física dos componentes, nanopartículas sem fármaco (PCL-TPGS NP) e com fármaco (PCL-TPGS-DTX NP).



4.3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram adquiridas de modo a compreender a morfologia e estrutura tridimensional das nanopartículas, permitindo o entendimento de possíveis comportamentos das mesmas em sistemas biológicos (PYRZ; BUTTREY, 2008). As imagens indicam que as partículas de PCL-TPGS possuem tamanho próximo ao adquirido por espalhamento dinâmico de luz e análise de rastreamento de nanopartículas, bem como têm formato globular e irregular, apresentando diversos poros em sua superfície (Figura 31).

Figura 31. Imagem de uma nanopartícula de PCL-TPGS obtida em microscópio eletrônico de transmissão, em aumento de 2.10^6 vezes.

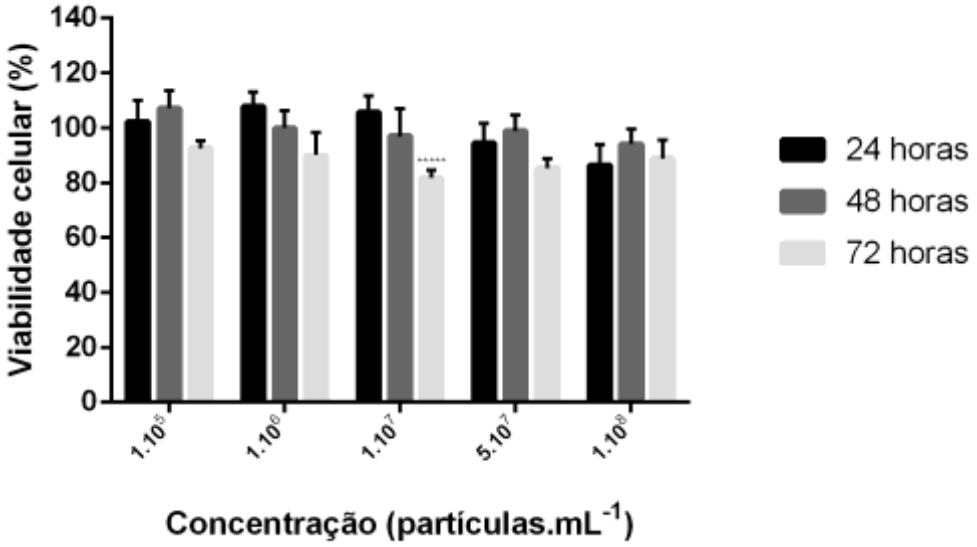


4.4. Caracterização biológica *in vitro* dos sistemas

4.4.1. Citotoxicidade celular em linhagem de câncer de próstata

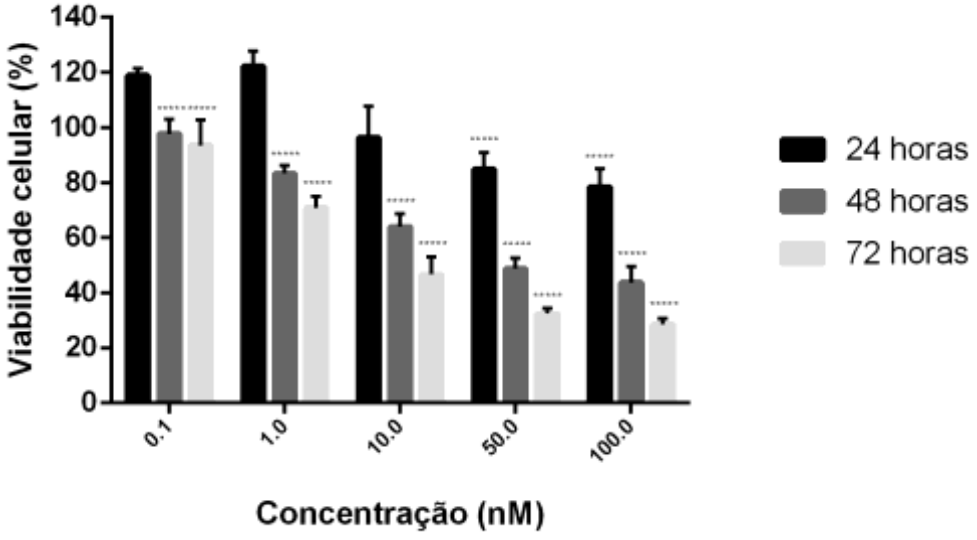
Formulações de nanopartículas sem fármaco, nanopartículas com docetaxel e uma formulação comercial genérica disponível no mercado brasileiro tiveram sua citotoxicidade frente à linhagem celular PC-3 avaliadas através da viabilidade celular indicada por resazurina como marcador. As viabilidades celulares foram avaliadas após 24, 48 e 72 horas de incubação das formulações diluídas em meio de cultura completo com as células tumorais. Para as nanopartículas com docetaxel e formulação comercial de docetaxel, as concentrações testadas foram de 0,1; 1,0; 10; 50 e 100 nM. Para as nanopartículas sem fármaco, as mesmas diluições das formulações com docetaxel foram realizadas. Ao avaliar o efeito citotóxico das formulações, foi possível observar que em não houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$) apenas em uma concentração da formulação de nanopartículas sem fármaco e em nenhum tempo de incubação avaliado, fato provavelmente devido a erros experimentais, evidenciando que o efeito deletério não está associado à nanoestrutura isoladamente (Figura 32). Este resultado é coerente com os relatados na literatura para outras linhagens celulares (BERNABEU et al., 2014).

Figura 32. Resultados de viabilidade celular das nanopartículas poliméricas sem fármaco, testadas em diferentes diluições e distintos tempos de incubação (24 horas, 48 horas e 72 horas) (n=5).



Por outro lado, os ensaios de citotoxicidade com a formulação comercial de docetaxel mostraram redução superior na viabilidade celular, sendo estatisticamente significativa em praticamente todos os tempos e concentrações, excetuando as 3 concentrações inferiores no menor tempo de incubação (24 horas). Nos demais tempos e concentrações, houve redução estatisticamente significativa ($p<0,0001$) da viabilidade celular frente aos controles (Figura 33), indicando juntamente com os resultados descritos anteriormente que os efeitos deletérios provocados pela formulação se devem à liberação de docetaxel no interior da célula, e não pela presença dos demais componentes da formulação. Tais resultados estão em conformidade com estudos prévios de citotoxicidade do docetaxel (CHIN et al., 2010; MONTERO et al., 2005), que apresentaram alta citotoxicidade (maior que 50% de redução da viabilidade celular) em concentrações superiores a 10 nM.

Figura 33. Resultados de viabilidade celular da formulação comercial de docetaxel, testada em diferentes concentrações tempos de incubação (24 horas, 48 horas e 72 horas).

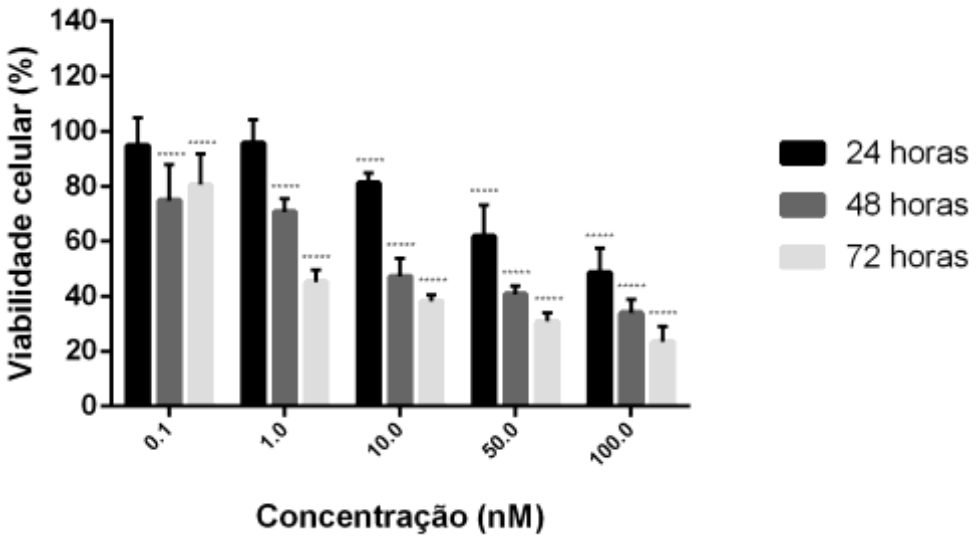


Nos ensaios de citotoxicidade envolvendo as nanopartículas poliméricas carreando docetaxel, os resultados se mostraram muito semelhantes à formulação comercial (Figura 34). Da mesma forma, a redução da viabilidade celular promovida pelas nanopartículas poliméricas contendo docetaxel foi estatisticamente significativa ($p<0,0001$) frente aos controles e estatisticamente significativa ($p<0,0001$) em comparação à própria formulação comercial de docetaxel, nas duas concentrações superiores (50nM e 100nM) nos maiores tempos de incubação (48 horas e 72 horas).

Sanna e colaboradores relataram uma ligeira diminuição na viabilidade celular ao comparar a citotoxicidade de nanopartículas poliméricas carreando docetaxel com soluções de docetaxel frente a linhagem PC-3 (SANNA et al., 2011), utilizando PLGA, PLA, PCL e misturas dos polímeros. Os resultados obtidos, entretanto, foram superiores ao obtido por Sanna e colaboradores, o que permite sugerir que a presença de TPGS na formulação aumente a citotoxicidade pela inibição de P-gp e sinergia com o docetaxel.

Entretanto, é importante ressaltar que mesmo possuindo resultados semelhantes nos ensaios de citotoxicidade entre os grupos NP e NP-DTX, este não é o único parâmetro a ser considerado na avaliação e predição da eficácia. Entre os benefícios que os sistemas de liberação nanoestruturados desenvolvidos por meio de tecnologia farmacêutica podem trazer, destacam-se a redução dos efeitos colaterais, liberação modificada, acúmulo nos sítios tumorais e promoção da permeação nos tumores; situações que não podem ser avaliadas por meio de um teste de citotoxicidade *in vitro*.

Figura 34. Resultados de viabilidade celular da formulação de nanopartículas poliméricas contendo, testada em diferentes concentrações tempos de incubação (24 horas, 48 horas e 72 horas).



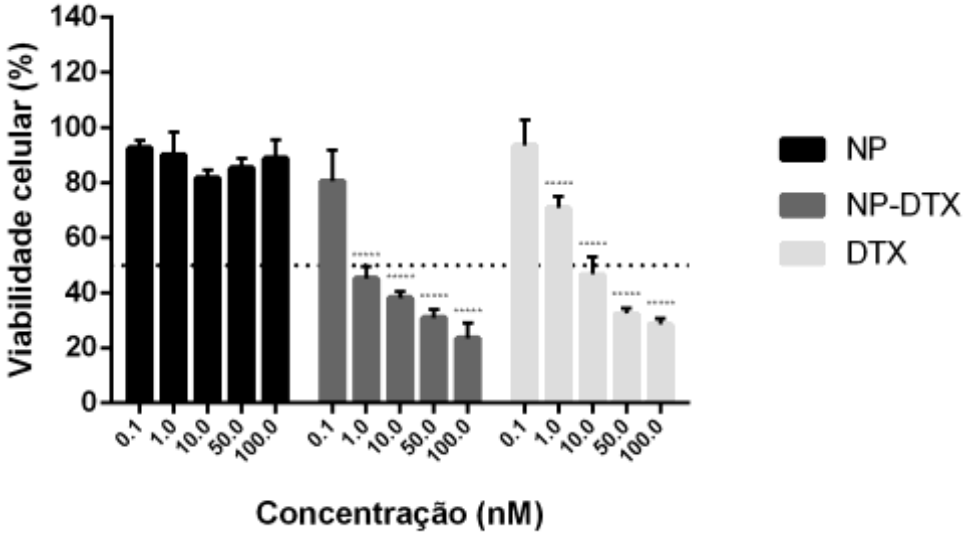
Como não houve redução da viabilidade celular em células PC-3 no caso das nanopartículas poliméricas que não carreiam fármaco, não foi possível determinar o EC_{50} - concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo – para esta nanoestrutura desenvolvida. Para a formulação comercial e a formulação

nanoestruturada desenvolvida, foi possível determinar o EC_{50}, conforme apresentado Tabela 7 e visualizado na Figura 35. Por refletirem melhor os objetivos de ambas as formulações *in vivo*, em que há necessidade de um intervalo dias pelo menos 3 dias entre a administração de cada dose, o tempo de incubação utilizado para o cálculo do EC_{50} foi o de 72 horas.

Tabela 7. Valores de EC_{50} determinados para nanopartículas sem fármaco, nanopartículas carreando docetaxel e docetaxel comercial.

EC_{50}	**Valor**
NP	não foi possível determinar
DTX	1,666 ± 0,225 nM
NP-DTX	0,4760 ± 0,092 nM

Figura 35. Resultados de viabilidade celular das três formulações testadas, em concentrações crescentes no mesmo tempo de incubação (72 horas). A linha pontilhada indica viabilidade celular de 50%.

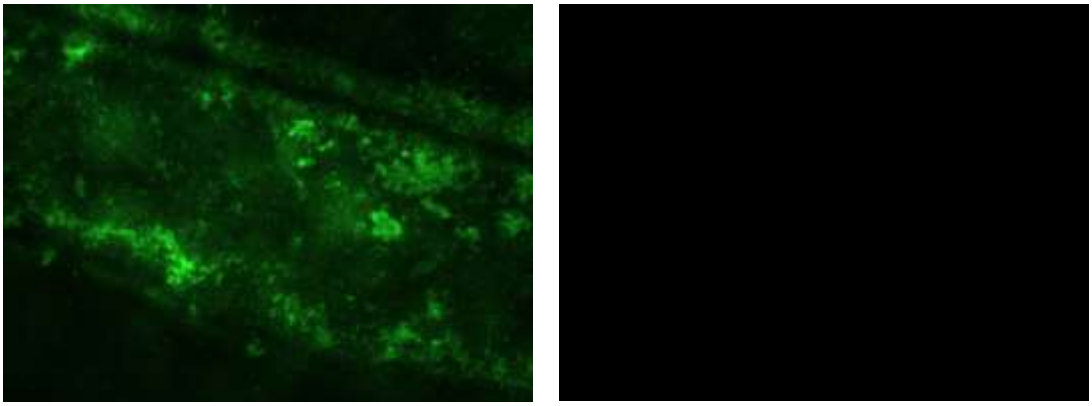


4.4.2. Captação celular por microscopia confocal e citometria de fluxo

A captação celular das nanopartículas foi avaliada por microscopia confocal de fluorescência e citometria de fluxo, de modo a fornecer dados qualitativos e quantitativos para a avaliação deste parâmetro. Como ambas as técnicas necessitam de um agente emissor de fluorescência, o agente fluorescente BODIPY (emissão em 530 nm, correspondente ao espectro visível na região do verde) foi incorporado às

nanopartículas sem fármaco para indicar a internalização celular pela técnica de nanoprecipitação, utilizando os mesmos procedimentos mencionados no item 3.2.3. O BODIPY foi escolhido por apresentar alta estabilidade em meio biológico, elevado rendimento quântico, fotoestabilidade e estrutura apolar, melhorando a incorporação no sistema desenvolvido. A avaliação da incorporação foi realizada apenas qualitativamente através da separação das nanopartículas do restante da formulação, utilizando a ultrafiltração por AMICON®. A fração contendo nanopartículas e a fração contendo o restante na formulação foi avaliada por microscopia de fluorescência e microscopia de luz polarizada, de modo a garantir a presença de fluorescência emitida pelo BODIPY e a ausência de cristais, respectivamente. Tal procedimento sugere que houve alta encapsulação do BODIPY na nanoestrutura, conforme visualizado na Figura 36. Como marcador de DNA, dois agentes distintos foram utilizados: DAPI e iodeto de propídio, para microscopia confocal de fluorescência e citometria de fluxo, respectivamente.

Figura 36. Microscopia de fluorescência da formulação após separação por ultrafiltração. À esquerda, fração contendo nanopartículas. À direita, fração contendo o restante dos componentes.



As imagens de microscopia confocal de fluorescência mostradas na Figura 37 apresentam as nanopartículas desenvolvidas após 24 horas de incubação com células PC-3. É possível visualizar altas intensidades de luz verde por todo o campo, mas a predominância de sinal no citoplasma das células sugere a ocorrência de endocitose e alta captação celular de nanopartículas, justificando a condução de estudos posteriores de citometria de fluxo para quantificar a internalização. Pela sobreposição das imagens obtidas pela microscopia confocal em diferentes profundidades, foi possível construir uma imagem tridimensional que facilitou a visualização de

estruturas apresentando alta intensidade de fluorescência, sugerindo um acúmulo de nanopartículas em certas regiões no citoplasma celular, conforme evidenciado na Figura 38. De acordo com o descrito por Selby e colaboradores (2017), sugere-se que tais estruturas sejam endossomos, estruturas citoplasmáticas pelas quais as nanopartículas são internalizadas pelas células. A alta quantidade de fluorescência espalhada por todo o citoplasma indica que além de ser captada efetivamente, há escape endossomal e consequente distribuição por esta região celular (SELBY et al., 2017). Zhang e colaboradores também observaram elevada internalização celular e abundância citoplasmática de nanopartículas poliméricas de PCL-TPGS encapsulando genisteína, por meio de microscopia confocal de fluorescência.

Figura 37. Imagens de microscopia confocal de fluorescência de linhagem celular PC-3 após incubação por 24 horas com formulação contendo docetaxel e controle. Escala de 20µm.

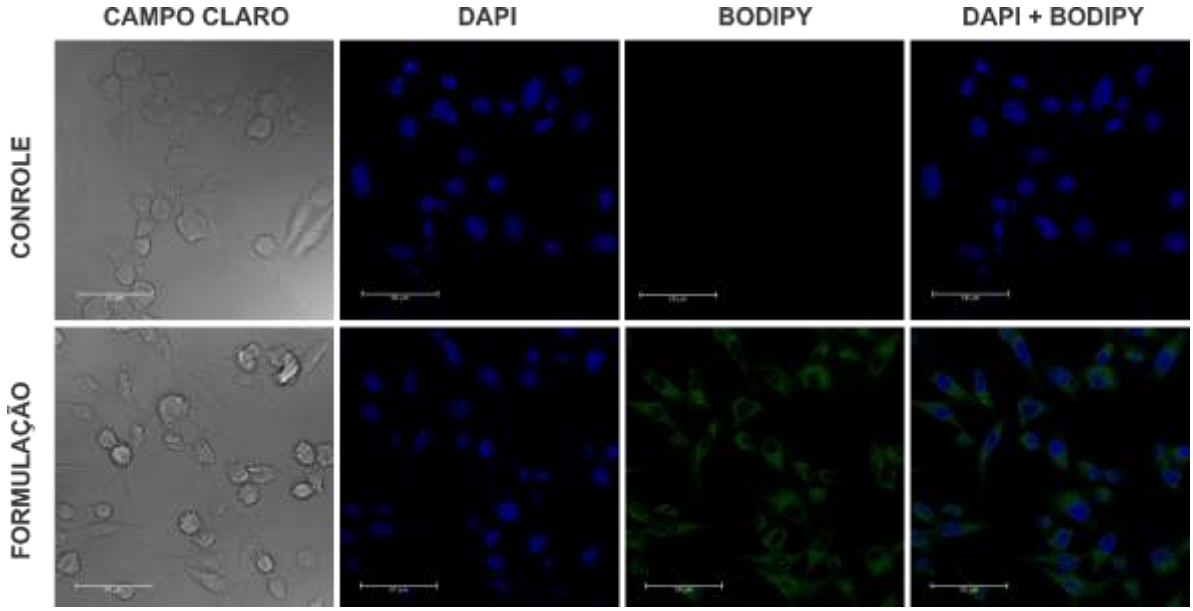
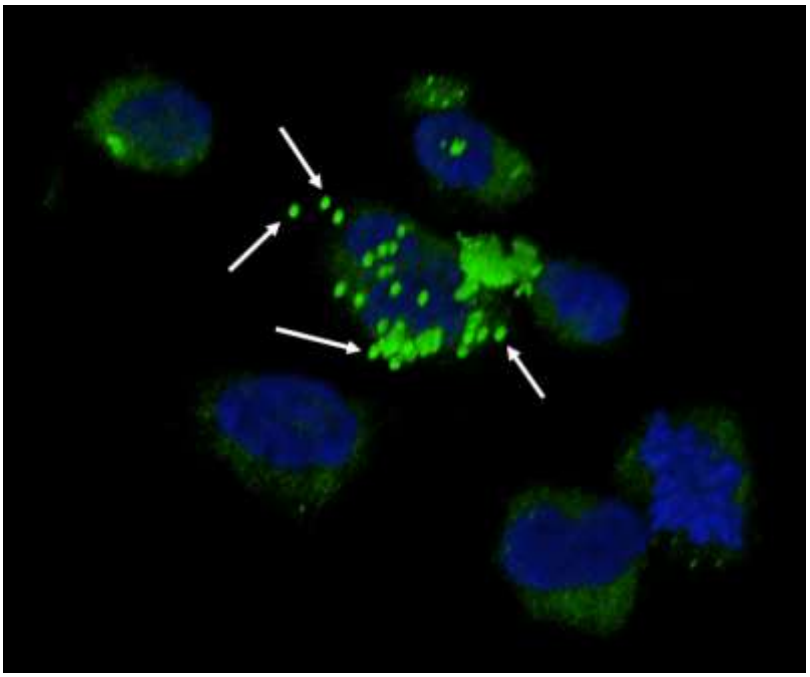
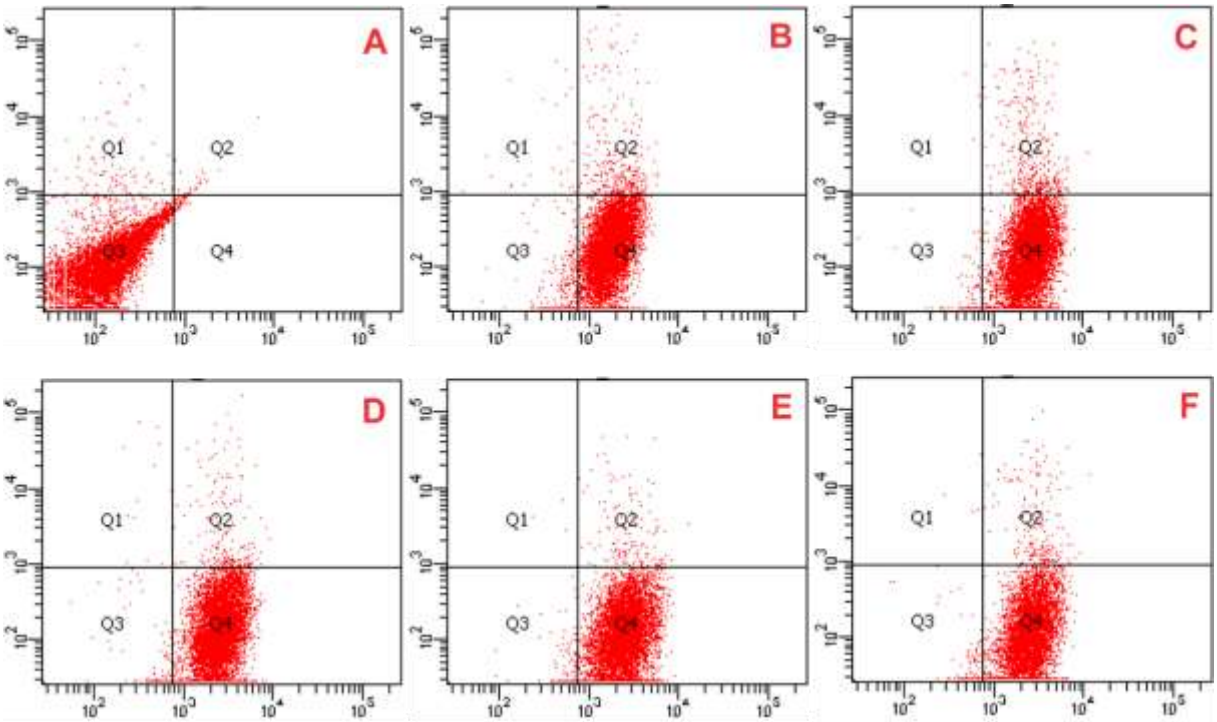


Figura 38. Imagem tridimensional gerada pela sobreposição dos excertos adquiridos pela microscopia confocal de fluorescência. Estruturas altamente fluorescentes indicadas pelas setas brancas.



Tal qual o ensaio de microscopia confocal, o ensaio de citometria de fluxo foi conduzido após 24 horas de incubação da formulação de nanopartículas encapsulando BODIPY. Conforme explícito na Figura 39, o grupo controle (composto por células sem contato com formulações) não apresentou fluorescência (representado pelos quadrantes Q2 e Q4) no comprimento de onda de emissão do BODIPY (530 nm), indicando que as células PC-3 não possuem fluorescência intrínseca nesta faixa e, portanto, são passíveis de serem analisadas junto ao agente fluorescente escolhido dada a ausência de interferência. O iodeto de propídio foi utilizado como sonda fluorescente pela sua capacidade de permear seletivamente a membrana de células apoptóticas, dado seu alto peso molecular, marcando-as. Foi possível constatar pelas células marcadas com iodeto de propídio (representado pelos quadrantes Q3 e Q4) que a viabilidade celular foi elevada (98,71 ± 0,12%), resultado coerente com as informações obtidas nos ensaios de citotoxicidade celular para nanopartículas sem fármaco. A elevada quantidade de células que passaram a apresentar fluorescência no comprimento de onda de emissão do BODIPY (Q2 e Q4) confirmam os resultados de microscopia confocal de fluorescência e a quantificação aponta internalização celular de 97,64 ± 1,21%, não havendo diferença estatisticamente significativa entre todas as replicatas ($p < 0,0001$).

Figura 39. Gráficos de citometria de fluxo gerando dados de internalização celular após 24 horas de incubação com a formulação contendo nanopartículas encapsulando BODIPY. A – controle negativo; B, C, D, E e F – replicatas.



Ma e colaboradores (2010) obtiveram resultados semelhantes com nanopartículas poliméricas de PLGA-TPGS, demonstrando que a adição de TPGS aumenta significativamente a internalização celular, quando comparada às partículas de PLGA (MA et al., 2010). Singh e colaboradores discutem que a redução racional de tamanho dos sistemas nanoestruturados é fundamental para um aumento da internalização celular em diversos tipos celulares, havendo uma internalização 4 vezes maior das partículas entre 100 e 200 nm do que as menores que 50 nm ou maiores que 300 nm (SINGH; SHARMA; ROBERTSON, 2012). Deste modo, a alta internalização celular apresentada pelas células PC-3 frente ao sistema desenvolvido pode ser explicada pelo diminuto tamanho de partícula (entre 100 e 200 nm) e a presença de TPGS na formulação – tanto como componente da matriz polimérica pela presença no copolímero como estabilizante da formulação – agindo como promotor de permeação.

4.5. Caracterização biológica *in vivo* dos sistemas

Para a condução dos estudos *in vivo*, camundongos imunossuprimidos Swiss Nude tiveram células tumorais de câncer de próstata (linhagem PC-3) injetadas por via subcutânea no flanco dorsal da pata traseira esquerda. O modelo de

xenotransplante subcutâneo com células PC-3 foi escolhido para a condução dos estudos *in vivo* por apresentarem alto perfil metastático, através do qual a inibição gerada pela terapia citotóxica juntamente à redução do tamanho do tumor, pode ser alcançada pelo atual sistema de liberação desenvolvido. Lange e colaboradores relataram que as células PC-3 são capazes produzirem metástases pulmonares em modelos xenotransplantados com alta incidência, quando comparadas às linhagens DU-145, LNCaP e LuCaP 23.1 (LANGE et al., 2012).

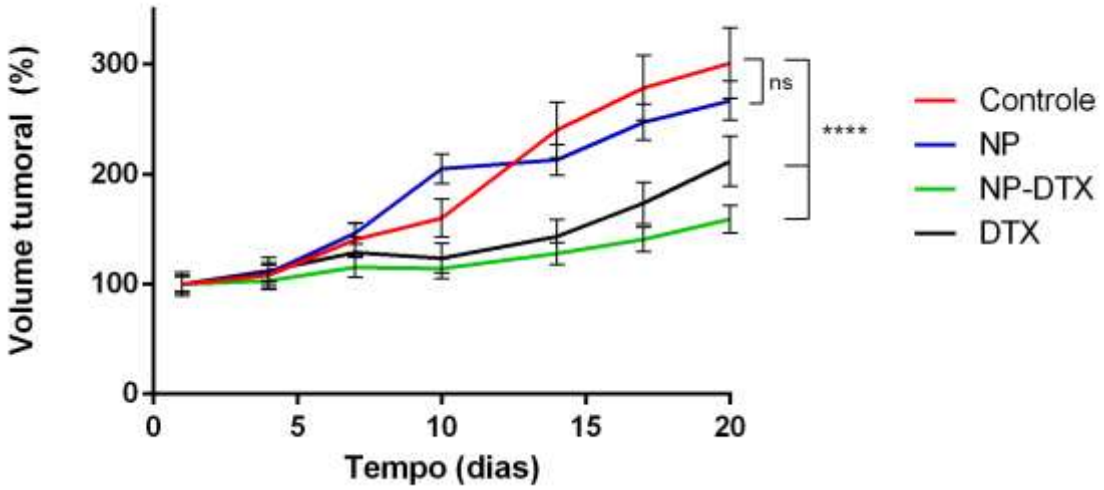
Todos os indivíduos apresentaram o desenvolvimento do tumor após aproximadamente 14 dias (Figura 40), momento a partir do qual a administração das diferentes formulações (suspensão de nanopartículas sem fármaco, suspensão de nanopartículas com docetaxel e formulação comercial) e solução salina (controle negativo) foi iniciada.

Figura 40. Camundongo Swiss Nude com tumores de próstata desenvolvidos após 14 dias da injeção subcutânea de células PC-3 no flanco superior esquerdo.

Os resultados de volume tumoral percentual apresentados na Figura 41 mostram que a formulação contendo nanopartículas poliméricas sem fármaco não apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo controle, permitindo inferir inércia da formulação frente a células tumorais, sustentando os dados obtidos pelos estudos *in vitro*. Em contrapartida, houve diferença estatisticamente significativa em $p < 0,0001$ entre o grupo controle e a formulação comercial, evidenciando a eficácia clínica já comprovada do docetaxel em diversos ensaios clínicos, como relatam os estudos

clínicos CHAARTED e STAMPEDE (PUENTE et al., 2017; VERWEIJ; CLAVEL; CHEVALIER, 1994). Entretanto, entre todas as formulações testadas, a que apresentou melhores resultados em termos de desaceleração do crescimento tumoral foi a contendo nanopartículas poliméricas encapsulando docetaxel. Esta formulação, por sua vez, apresentou diferença estatística ($p < 0,0001$) tanto entre o grupo controle quanto ao grupo em que a formulação comercial foi administrada, mostrando-se mais efetiva quando comparada às outras. Conforme mencionado por Choudhury e colaboradores, a atividade inibitória da glicoproteína-P conferida pelo TPGS pode agir em sinergia com o docetaxel, ao impedir a resistência a múltiplos medicamentos (CHOUDHURY et al., 2017).

Figura 41. Gráfico de acompanhamento de volume tumoral percentual (volume tumoral na medida em relação ao volume tumoral inicial de cada grupo. **** ($p<0,0001$ segundo ANOVA duas vias com correção de múltiplas comparações de Newman-Keuls)



Durante os mesmos períodos de administração e aferição dos volumes tumorais, a massa corporal dos animais foi avaliada e a sobrevivência monitorada ao longo do experimento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum grupo quanto à massa corpórea, conforme Figura 42. Um indivíduo do grupo controle foi sacrificado antes do término do experimento devido a presença de ascite e de crescimento exacerbado da massa tumoral, sendo critérios estabelecidos para o ponto final humanitário (Figura 43).

Figura 42. Registro dos pesos dos animais xenotransplantados do estudo *in vivo*.

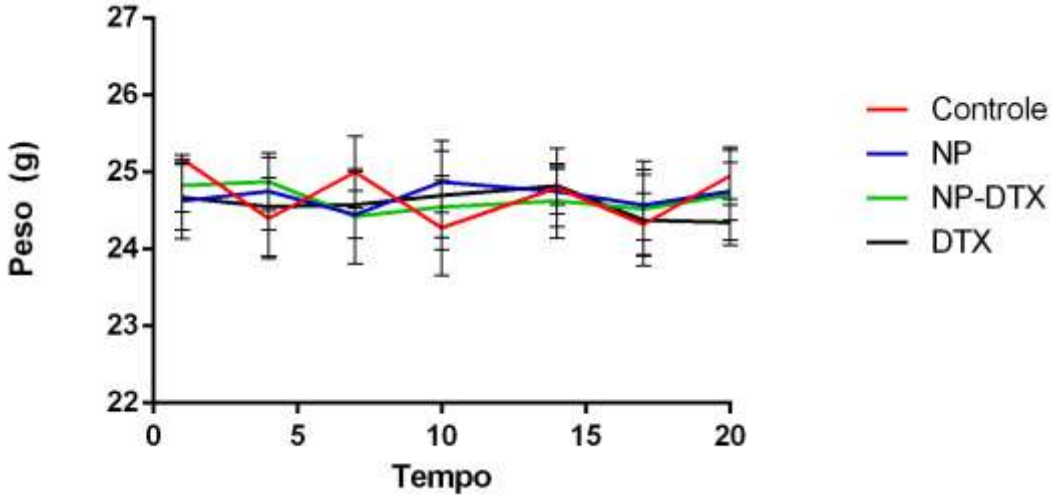
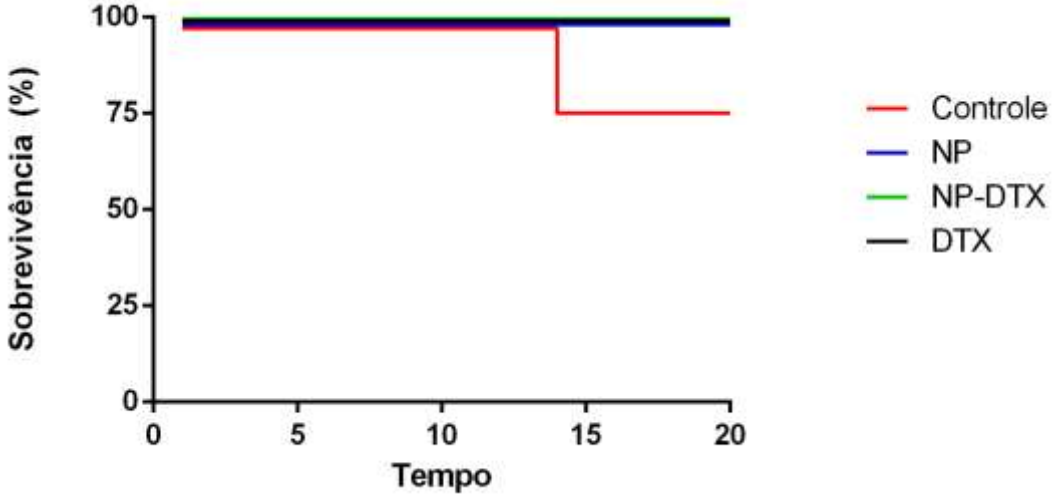


Figura 43. Gráfico de sobrevivência dos camundongos ao longo do estudo *in vivo*.



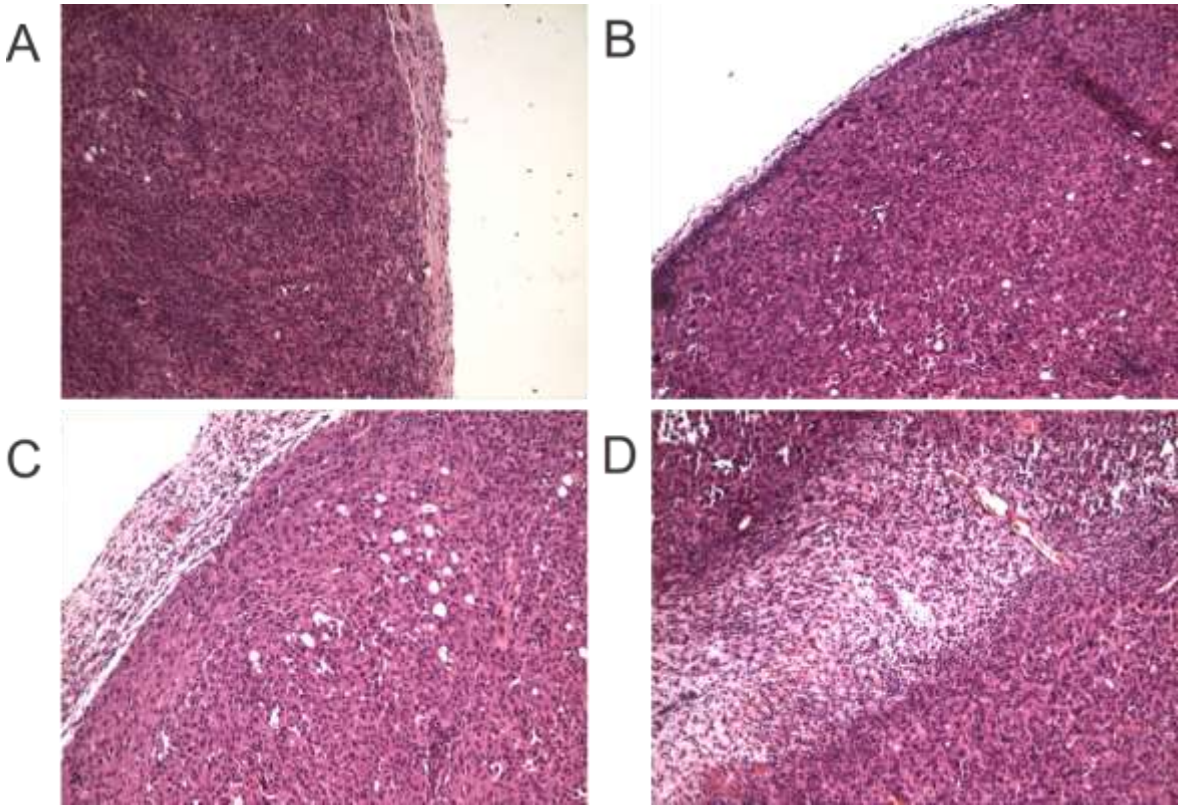
Após o término do tempo previsto para a execução dos experimentos, os animais foram sacrificados por meio de sobredose anestésica. Os tumores foram extraídos por uma pequena incisão na derme e foi realizado isolamento do tecido tumoral do restante dos tecidos, conforme Figura 44. Posteriormente, houve encaminhamento da massa tumoral extraída para análise histopatológica.

Figura 44. A - Camundongo com tumor em estadio avançado antes de ser sacrificado. B - Camundongo após processo de extração do tumor. C - Exemplo de medida do volume tumoral com o auxílio de um paquímetro.

4.5.1. Análise histopatológica

As imagens obtidas pela análise histopatológica (Figura 45) sugerem uma diminuição do volume celular e desestruturação individual das células nos grupos tratados com a formulação comercial de docetaxel e nanopartículas poliméricas contendo docetaxel. Nos grupos controle e tratado com nanopartículas poliméricas sem docetaxel, a densidade celular é visivelmente maior, indicando maior proliferação e elevada intensidade de metabolismo celular (HUMPHREY, 2017; MCKENNEY, 2017).

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 a 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 n° 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.

BARICHELLO, 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.; HAWE, 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-a-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 cnacer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulatio 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.

RAMPERSAD, 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 Nanotecnology 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.

ANEXOS

Anexo 1. Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da FCFRP/USP para condução dos estudos em animais neste trabalho.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Nanopartículas de ε-policaprolactona e DL-α-tocoferol polietilenoglicol-1000 contendo docetaxel visando terapia do câncer de próstata", registrada sob nº 16.1.1108.60.0, sob a responsabilidade de Giovanni Loureiro Raspantini e Juliana Maldonado Marchetti, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na reunião do dia 23/02/2017.

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	24/02/2017 a 24/12/2017
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo nude swiss
Nº de animais	24
Peso/Idade	20-25g/ 6-8 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério da genética da FMRP

Ribeirão Preto, 08 de março de 2017.

Ana Patrícia Yatsuda Matsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/N - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892