



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo cabazitaxel para
a terapia do câncer de próstata**

Aluna: Ana Helena Leonel Sampar
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Ribeirão Preto

2019

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo cabazitaxel para
a terapia do câncer de próstata**

Aluna: Ana Helena Leonel Sampar

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Ribeirão Preto

2019

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo cabazitaxel para a 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.

Orientada: Ana Helena Leonel Sampar
Orientadora: Prof^a. Dr^a Priscyla Daniely
Marcato Gaspari

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 30/08/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2019

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.

Sampar, Ana Helena Leonel

Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo cabazitaxel para a terapia do câncer de próstata. Ribeirão Preto, 2019.

81 p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Gaspari, Priscyla Daniely Marcato.

1. Nanocápsulas. 2. Cabazitaxel. 3. Terapia. 4. Câncer de próstata

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo apoio e incentivo durante todo este tempo de mestrado, e por sempre me ajudarem em todas as minhas escolhas!.

Ao meu namorado Luiz Gabriel, pelo carinho, incentivo e paciência, além de todas as contribuições científicas.

À prof. Priscyla Daniely Marcato Gaspari pela oportunidade de cursar mestrado no Nanobiolab.

As minhas queridas amigas Amanda, Bianca e Taís pelas muitas contribuições com meu aprendizado e amadurecimento, e pela amizade que me fez crescer muito além da universidade.

A todos os funcionários que se disponibilizaram em me auxiliar nos experimentos, em especial à Mariana e à Maíra que colaboraram muito para meu aprendizado em química analítica.

À Mariza, por toda disponibilidade e ajuda mesmo de longe.

À CNPQ (nº processo:133754/2017-0) pelo suporte para desenvolvimento deste projeto.

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

RESUMO

SAMPAR, A. H. L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo cabazitaxel para a terapia do câncer de próstata**. 2019. 81f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O câncer de próstata é a segunda doença maligna mais comum do sexo masculino, sendo o segundo tipo de câncer mais frequente no Brasil. As principais terapias para o câncer de próstata incluem o controle hormonal, cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Porém, apresentam alto índice de recorrência e graves efeitos adversos. Desta forma, há procura por novas estratégias terapêuticas para aumentar a sobrevivência dos pacientes e melhorar seu bem-estar. Um exemplo de um novo fármaco para terapia do câncer de próstata é o cabazitaxel (CBZ). No entanto, a aplicação deste fármaco pode acarretar efeitos adversos devido a sua baixa seletividade às células cancerosas, e sua lipofobicidade dificulta sua administração. Dessa forma, o encapsulamento do cabazitaxel em nanopartículas pode modificar sua liberação e direcioná-lo para células tumorais através do efeito de aumento de permeabilidade e retenção (*EPR effect*), aumentando a eficácia da terapia e diminuindo os efeitos adversos. Sendo assim, este projeto tem como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas poliméricas contendo CBZ para tratamento do câncer de próstata. As nanopartículas de PLA foram preparadas pelo método de nanoprecipitação e caracterizadas quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, TEM e DSC. Além disso, foi avaliada a eficiência de encapsulamento (EE) e o perfil de liberação do CBZ. As nanopartículas foram avaliadas por meio da citotoxicidade *in vitro* do CBZ livre e do encapsulado em células de câncer de próstata (PC-3 e LNCap). Também foram realizados o teste de opsonização e o ensaio de hemólise para verificação da compatibilidade das nanopartículas com o sistema circulatório humano. O tamanho das partículas contendo CBZ (NC-CBZ) foi de aproximadamente 200 nm, PDI abaixo de 0,2 e potencial zeta negativo. A EE foi de aproximadamente 97% e o perfil de liberação demonstrou a difusão do CBZ durante 120 horas. Com as análises de caracterização, foi possível observar que as NC-CBZ são esféricas, que o fármaco pode estar disperso molecularmente na nanoestrutura, e há interação entre o polímero e o estabilizante. As partículas se mantiveram estáveis em relação ao diâmetro e PDI por 240 dias quando armazenadas em geladeira ou temperatura ambiente. A EE diminuiu de 97% para 74% após 240 dias. No estudo de citotoxicidade foi verificado que o encapsulamento do CBZ diminuiu 5 vezes o IC₅₀ nas células PC-3 e 2,4 vezes na célula LNCap em relação ao fármaco livre. O ensaio de hemólise mostrou compatibilidade das NC-CBZ com a corrente sanguínea nas concentrações de 5 a 25 µg/mL. Já o teste de opsonização mostrou que o sistema complemento não interagiu com as nanopartículas nas concentrações mais altas. Dessa maneira, é possível concluir que as NC-CBZ tem grande potencial para a administração endovenosa para a terapia do câncer de próstata.

Palavras-chave: nanocápsulas, cabazitaxel, terapia, câncer de próstata.

ABSTRACT

SAMPAR, A. H. L. **Development of polymeric nanoparticles containing cabazitaxel for therapy against prostate cancer.** 2019. 81f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The prostate cancer is the second malignant disease more common on male and the second more frequent in Brazil. The mainly therapies for prostate cancer are hormonal control, surgery, radiotherapy and chemotherapy. But, they show high recurrence index and serious side effects. Thus, there is a search for new therapeutic strategies to enhance the lifetime of the patients and improve their well-being. An example of a new drug for prostate cancer therapy is the cabazitaxel (CBZ). However, the application of this drug can lead to side effects because of its low selectivity to cancer cells, and its lipophilicity interferes in the administration. The strategy purposed for this work to convert these challenges is the encapsulation of CBZ on the nanoparticles that can show a modified release and direct them to cancer cells through the enhanced permeability and retention effect (EPR). Thus, the purpose of this work is the development and characterization of polymeric nanoparticles containing CBZ for prostate cancer therapy, aiming the obtainment of a formulation with higher efficacy and less side effects. The PLA nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method and characterized by the mean diameter, polydispersity index (PDI), zeta potential, TEM and DSC. In addition, the encapsulation efficiency (EE) and the release behavior of CBZ were evaluated. The activity of the nanoparticles was analyzed by in vitro cytotoxicity assay of free and encapsulated CBZ on prostate cancer cells. Also, there were performed hemolytic and opsonization assays to verify the compatibility of the nanoparticles with the human blood stream. The size of the particles containing CBZ (NC-CBZ) was around 200 nm, PDI below 0,2 and negative zeta potential. The EE was around 97% and the release behavior showed a continuous release of CBZ for 100 hours. On the analysis of characterization, the nanoparticles showed spherical shape, the drug is probably dispersed into the nanocapsule and there is a interaction between the polymer and the surfactant. The cytotoxicity was made on LNCap and PC-3 cells line and the results indicate a IC_{50} lower for NC-CBZ than for free CBZ. The hemolytic assay showed compatibility with the human blood stream for the concentrations of 5 to 25 $\mu\text{g/mL}$ of NC-CBZ. The opsonization assay demonstrated that the complement system did not bind on the nanoparticles at higher concentrations. Lastly, the conclusion is that NC-CBZ has potential to intravenous administration to treat prostate cancer.

Key words: nanocapsules, cabazitaxel, therapy, prostate cancer.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o quarto tipo de câncer mais comum no mundo, representando 7,1% de todos os casos (1,3 milhões).¹ Os tratamentos contra o câncer de próstata acarretam vários efeitos adversos ao paciente, os quais atrapalham sua qualidade de vida e, muitas vezes, desestimulam sua adesão às terapias. Além disso, há a possibilidade de recorrência ou progressão da doença após o tratamento. Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias para o câncer de próstata que consigam melhorar a eficácia do tratamento, diminuir a reincidência do tumor, direcionar os fármacos para células tumorais e aumentar a sobrevida dos pacientes é muito importante.

Por estas razões, a utilização de nanotecnologia tem ganhado espaço em aplicações médicas, principalmente no desenvolvimento de formulações direcionadas ao tratamento de câncer. Atualmente, alguns medicamentos à base dessas nanoestruturas já estão disponíveis no mercado, como Doxil[®], Megace ES[®], Zinostatin/stimalmar[®], INGN-401[®], sendo estes para tratamento de câncer de ovário, câncer de mama, carcinoma hepatocelular e câncer de pulmão, respectivamente.²

Considerando os benefícios proporcionados por estas novas terapias e a inexistência de um medicamento nanoestruturado específico para o tratamento do câncer de próstata, o encapsulamento do cabazitaxel em nanopartículas poliméricas pode ser uma estratégia relevante para o desenvolvimento de um novo medicamento para esta doença. Este fármaco tem atividade comprovada contra câncer de próstata,³ e com seu encapsulamento pode haver melhora na sua biodisponibilidade, redução dos seus efeitos tóxicos, direcionamento às células tumorais, aumento da sua permanência no local de ação e, conseqüentemente, diminuição da dose e da frequência de administração, possibilitando assim uma sobrevida maior e uma melhor qualidade de vida ao paciente.

Para o desenvolvimento deste projeto, foi utilizada a nanoprecipitação como método de preparação das nanopartículas. Em seguida, foi realizada a caracterização por diferentes técnicas (ex. DLS, DSC, TEM), foram avaliadas de acordo com sua compatibilidade com a corrente sanguínea, visando uma administração endovenosa, e foi verificada sua atividade contra células de câncer de próstata, comparando-a com a atividade do fármaco livre.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer de próstata

De acordo com o INCA, o câncer de próstata é o segundo mais frequente em homens e também o segundo mais comum considerando ambos os sexos.⁴ No Brasil, entre 2018 e 2019, a estimativa foi 68.000 novos casos,⁵ enquanto que nos Estados Unidos, as estimativas para 2019 são de 174.650 novos casos e 31.620 mortes causadas pelo câncer de próstata.⁶ No mundo, o câncer de próstata é o quarto tipo de câncer mais comum, representando 7,1% de todos os casos (1,3 milhões).¹

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata são idade (acima de 65 anos), tipo de dieta, fatores genéticos, e histórico familiar.^{7,8}

O diagnóstico do câncer de próstata é realizado através dos exames do toque retal e dosagem de PSA (antígeno específico prostático) no sangue. O nível deste antígeno no organismo deve ser menor que 4 ng/mL, porém esse valor pode alterar devido a outros problemas, como infecção. Assim, há necessidade de realizar também outros exames complementares.⁴ Exame de ultrassom e biópsia são aplicados para se avaliar o estágio da doença, utilizando o sistema de Gleason.⁸ A partir disso, e avaliando-se as condições físicas do paciente, é escolhido o tratamento mais adequado.

Normalmente, o primeiro tratamento aplicado em pacientes com câncer de próstata é a privação de hormônio androgênico, também conhecido como terapia de supressão androgênica.^{9,10} O crescimento celular prostático é dependente da produção dos hormônios masculinos, sendo os principais a testosterona e a diidrotestosterona,¹¹ portanto sua inibição contribui para o retardamento do desenvolvimento do câncer e diminuição do tamanho do tumor.¹² Esta terapia pode ser aplicada através de castração cirúrgica ou castração química. A primeira envolve a remoção parcial ou total dos testículos (orquiectomia), enquanto que a segunda, a administração de medicamentos que reduzem os níveis de andrógenos no organismo, como a abiraterona, responsável por inibir a síntese de andrógenos nas glândulas suprarrenais.¹³⁻¹⁶ A terapia hormonal é um tratamento que ajuda no controle do desenvolvimento do câncer, porém não traz sua cura.¹⁷ Por isso, é recomendável a aplicação concomitante de outro tratamento. A radioterapia, por exemplo, pode ser realizada simultaneamente à terapia hormonal, melhorando os resultados do tratamento.¹⁸ Além disso, muitos tumores se tornam resistentes à terapia hormonal depois de até 3 anos, sendo necessário modificar o tratamento.¹⁹⁻²¹

O câncer de próstata resistente à castração (CPRC) pode variar entre assintomático e/ou sem metástase e os casos mais graves, em que há o surgimento de metástases. O principal local de metástase é o osso, representando cerca de 90% dos casos.^{22,23} O câncer de próstata metastático resistente à castração (mCPRC) pode ser tratado com quimioterápicos, como mitoxantrona, docetaxel e cabazitaxel.¹⁶ O tratamento com docetaxel associado à prednisona mostrou melhores resultados em relação à mitoxantrona associada à prednisona, tornando-se a terapia padrão para este estágio da doença.^{13,24}

Outro tratamento aplicado aos pacientes com CPRC assintomático é a imunoterapia, a qual utiliza como ativo o Sipuleucel-T com o intuito de promover atividade do sistema imunológico contra as células tumorais.^{25,26}

2.2. Cabazitaxel

O cabazitaxel (CBZ) é um fármaco semissintético de segunda geração da classe dos taxanos, aprovado em 2010 pelo FDA.²⁷ Ele é utilizado em casos de câncer de próstata metastático resistente à castração (mCPRC) quando o tratamento com docetaxel em combinação com prednisona não surte efeito.^{12,28,29} Seu mecanismo de ação é igual aos demais taxanos (docetaxel e paclitaxel): estabiliza a proteína tubulina, formada na fase M da divisão celular, impedindo que haja movimentação cromossômica durante a metáfase e proliferação das células cancerosas, levando-as à apoptose.³⁰ Este fármaco possui maior atividade do que seus precursores devido a sua baixa afinidade pela glicoproteína-P, um transportador transmembrana responsável pelo efluxo celular. Assim, o CBZ permanece por mais tempo no interior da célula e consegue gerar maiores danos.³¹⁻³³ Além disso, o CBZ age no bloqueio da translocação do receptor de andrógeno do citoplasma para o núcleo, impedindo-o de exercer sua função como fator de transcrição, o que é fundamental para o crescimento e o desenvolvimento das células cancerosas.^{19,34}

O CBZ possui fórmula estrutural semelhante ao seu precursor docetaxel, diferenciando-se apenas por 2 éteres metílicos ao invés de 2 grupos álcoois no anel nuclear da molécula, o que lhe confere maior lipossolubilidade (Figura 1).³⁵ A fórmula molecular do CBZ é $C_{45}H_{57}NO_{14}$, possui ponto de fusão de 157°C e massa molar de 835,93 g/mol. Deve ser protegido da luz e do calor, por ser foto e termossensível.³⁶

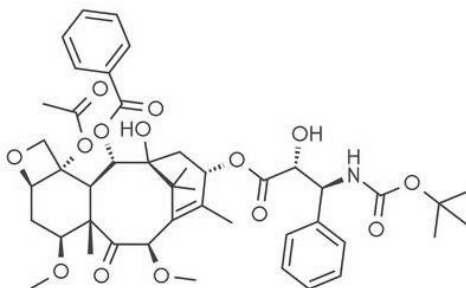


Figura 1 - Fórmula estrutural do cabazitaxel

Foi comprovado que o tratamento do mCPRC com CBZ combinado à prednisona aumenta a sobrevida dos pacientes em relação à terapia anteriormente utilizada com mitoxantrona e prednisona, de 12,7 para 15,1 meses.^{3,9} O CBZ é metabolizado no fígado majoritariamente pelas CYP3A4 e CYP3A5.^{37,38} Entre seus efeitos adversos, tem-se anemia, diarreia, fadiga e vômito e a dose máxima recomendada é de 25 mg/m² devido à neutropenia acentuada e, conseqüentemente, ao alto risco a infecções desenvolvidos com a administração de doses maiores.^{3,37,39-41}

O perfil de eliminação do CBZ administrado endovenosamente se divide em 3 fases (α , β e γ): o primeiro $t_{1/2}$ acontece nos primeiros minutos (1-4 minutos), o segundo após a primeira hora e o terceiro entre 80 a 95 horas, sendo que cerca de 80% da dose administrada são eliminados em 2 semanas.^{33,36} A frequência de administração da formulação do Jevtana[®], medicamento referência comercializado atualmente contendo este fármaco, é de 3 em 3 semanas, na forma de infusão endovenosa durante 1 hora acompanhada de uma dose de prednisona oral de 10 mg.^{37,42}

Apesar de o CBZ apresentar evoluções em relação aos outros tratamentos, existem problemas referentes à formulação do Jevtana[®]. Além de o fármaco causar os efeitos adversos já mencionados, 60 mg de CBZ são veiculados em 1,5 mL de Tween 80 e diluídos em 5,7 mL de etanol para ser administrado por via endovenosa por causa da sua alta lipofilicidade. Entretanto, o uso de grandes quantidades de estabilizantes como veículo é conhecido por causar toxicidade e reações de hipersensibilidade.^{35,43-45}

Para contornar os problemas encontrados na administração do CBZ, alguns estudos foram realizados para avaliar a atividade e a toxicidade de nanopartículas contendo este fármaco. Chen et al. (2016) desenvolveram nanopartículas de bombesina com PEG contendo cabazitaxel para tratamento do mCPRC. Os resultados para as nanopartículas demonstraram alta estabilidade frente às proteínas plasmáticas, eficácia antitumoral, com IC₅₀ de 0,6 ± 0,1 μ M enquanto que a injeção de CBZ apresentou IC₅₀ de 8,9 ± 0,9 μ M. Também foi observada

uma liberação prolongada do fármaco no sítio de ação, começando a ser eliminado do tecido alvo após 1 dia da administração, enquanto que a injeção de CBZ, após 2 horas.⁴⁶

Outro estudo foi realizado por Qu et al. (2016), em que foram avaliadas nanopartículas de albumina contendo CBZ quanto à farmacocinética, à distribuição nos tecidos e à eficácia contra o câncer de próstata. Comparou-se o CBZ encapsulado em nanopartículas de albumina (Cb-NPs) com o cabazitaxel solubilizado em polissorbato 80 (Cb-Tween). Os resultados demonstraram que a concentração plasmática das Cb-NPs após 5 minutos da administração foi duas vezes maior que a concentração de Cb-Tween, enquanto que 48h depois ainda havia 140 ng/mL das Cb-NPs e praticamente não havia mais Cb-Tween, evidenciando a liberação sustentada deste sistema e, conseqüentemente, a possibilidade de redução do número de administrações do fármaco. Quanto à distribuição nos tecidos, as concentrações nos órgãos analisados apresentaram variação, porém a concentração de Cb-NPs no tecido tumoral se manteve constante por horas após sua administração.⁴⁷

Estes estudos mostram as possibilidades na aplicação de nanopartículas para o carreamento do CBZ e como elas podem melhorar a eficácia e liberação deste fármaco assim como reduzir seus efeitos adversos.

2.3. Nanopartículas poliméricas

Na medicina, sistemas nanoparticulados auxiliam no diagnóstico de doenças e direcionamento de fármacos às células alvo, modulando sua liberação e suas características físico-químicas.^{2,31,48,49} Dentre estes sistemas, temos as nanopartículas poliméricas, que podem variar de 1 a 1000 nm.⁵⁰ Elas são classificadas como nanoesferas ou nanocápsulas, sendo as nanoesferas constituídas por um invólucro e uma matriz poliméricos, enquanto que as nanocápsulas possuem um núcleo oleoso envolvido por um invólucro polimérico. Em ambas, o fármaco pode estar no interior da nanopartícula e/ou adsorvido no seu envoltório.^{51,52} A Figura 2 exemplifica a constituição das nanopartículas poliméricas.

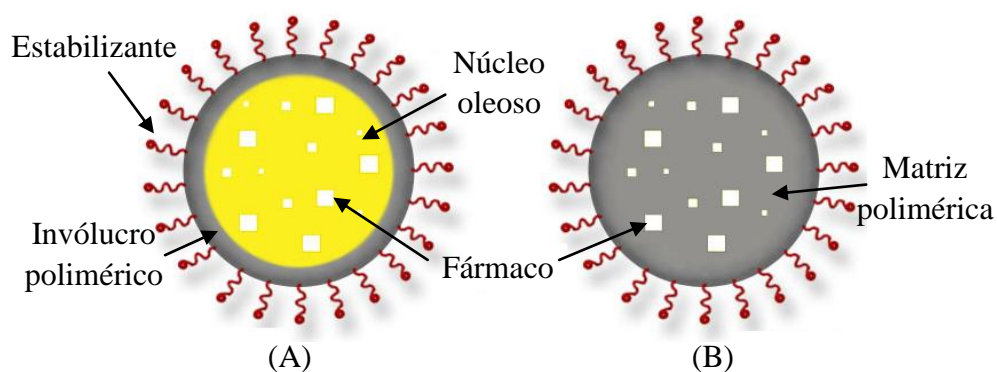


Figura 2 - Representação esquemática do corte transversal de (A) nanocápsulas e (B) nanoesferas

O uso de nanopartículas poliméricas no direcionamento de fármaco é bastante relevante considerando sua capacidade de melhorar a estabilidade e a farmacocinética de vários ativos. Essas partículas podem ser preparadas com polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, podem formar diversos tipos de estruturas e são fáceis de manusear.

O fármaco encapsulado em nanopartículas poliméricas permanece protegido por não estar disponível para degradação imediata por agentes do meio, podendo agir no local de interesse e tendo seus efeitos adversos reduzidos; e por ter uma liberação modificada, os intervalos entre as doses administradas podem ser maiores.^{50,53,54} Algumas características que influenciam a liberação do fármaco e sua biodistribuição são composição, tamanho e carga da nanopartícula, presença de ligantes em sua superfície e perfil de degradação no meio.⁵⁵

Os polímeros utilizados na preparação das nanopartículas poliméricas podem ser naturais ou sintéticos.⁵³ Alguns exemplos de polímeros sintéticos são o poli(ácido lático) (PLA), o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e o poli(ϵ -caprolactona) (PCL), e quitosana, alginato, albumina e gelatina são polímeros naturais.⁵⁶⁻⁵⁸

O poli(ácido lático) é um polímero de cadeia alifática hidrofóbica, composto pelo monômero quiral ácido lático, o qual possui os enantiômeros L- e D-ácido lático (Figura 3).⁵⁶ A proporção de isômeros e seu peso molecular influenciam diretamente suas características físico-químicas, como cristalinidade e ponto de fusão.^{59,60} O poli(L-ácido lático) é mais cristalino e possui maior resistência à hidrólise, enquanto que o poli(D-ácido lático) tem estrutura mais amorfa, sendo mais suscetível à degradação.⁶¹

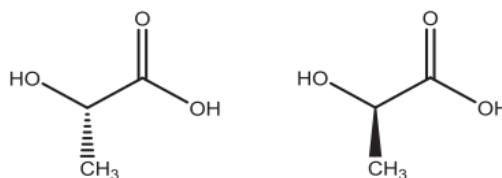


Figura 3 - Estruturas moleculares do L- e D-ácido láctico, respectivamente

A obtenção do ácido láctico ($pK_a = 3,84$)⁶³ se dá através da fermentação de açúcares, sendo estes produzidos por fontes renováveis como a cana-de-açúcar.⁶² O PLA também é um polímero biocompatível e biodegradável. Essas características o tornam adequado para aplicações médicas, como no preparo de nanopartículas poliméricas para carreamento de fármacos.^{61,64-68}

Fisher et al. (2014) desenvolveram nanoesferas de PLA contendo rutênio para melhorar sua atividade anticâncer e sua estabilidade. Foram utilizados 2 tipos de estabilizantes: Tween 80 e Pluronic F68[®]. O estudo concluiu que o encapsulamento deste metal em nanopartículas com Tween 80 foram mais promissoras: houve aumento da citotoxicidade em células de cólon e hepatocarcinoma, e da estabilidade da dispersão.⁶⁹

Feng et al. (2019) também utilizaram o polímero PLA para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo fisetina para tratamento de câncer. A fisetina é um flavonoide lipofílico, o que dificulta sua aplicação. As nanopartículas foram testadas em células humanas de câncer de colorretal e células murinas de câncer de mama, e mostraram maior atividade do que o ativo livre.⁷⁰

No mercado já existem alguns medicamentos com nanopartículas poliméricas, como o Abraxane[®]: nanopartículas de albumina contendo o fármaco paclitaxel para tratamento de câncer metastático de pâncreas.^{71,72}

2.4. Efeito EPR

Em tratamentos contra o câncer, o direcionamento de nanopartículas é um fator importante a ser considerado quando selecionada a via de administração endovenosa. É necessário garantir que haja o favorecimento da distribuição das nanopartículas para o local de ação, não atingindo células saudáveis e, conseqüentemente, aumentando a eficácia e reduzindo os efeitos adversos do tratamento.

Este direcionamento pode ocorrer de maneira ativa ou passiva. No direcionamento ativo, um ligante é adicionado na superfície da nanopartícula, devido a sua afinidade por

determinado receptor de membrana, o que facilita sua internalização nessa célula alvo.⁷³ Já o direcionamento passivo está relacionado com o efeito de aumento de permeabilidade e retenção (*Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect*), exemplificado na Figura 4. Este efeito está relacionado ao ambiente tumoral, que facilita o acesso das nanopartículas e sua permanência no tumor. Células tumorais tendem a se desenvolver de forma anormal, necessitando de mais nutrientes e oxigênio do que células normais. Por isso, ocorre o processo de angiogênese de maneira descontrolada, gerando novos vasos sanguíneos defeituosos, com espaçamentos entre suas células de 100 nm a 2 µm, dependendo do tumor, enquanto que nas regiões de células normais, este espaçamento é de 30 nm. No câncer de próstata, essas fenestrações variam de 300 a 780 nm.⁷ Além disso, o fluxo linfático na região tumoral é baixo, por causa do processo inflamatório envolvido nesta doença, acarretando na retenção da nanopartícula no tecido.⁷⁴⁻⁷⁷ Dessa forma, a nanopartícula atinge preferencialmente o local de interesse e permanece no tumor por mais tempo, podendo liberar o fármaco de maneira sustentada na região tumoral.

É descrito na literatura que nanopartículas com diâmetro entre 50-200 nm apresentam efeito EPR em diferentes cânceres.⁷⁸⁻⁸⁰ Maeda et al. (2013) analisaram fluoróforos ligados a nanosondas para demonstrar o efeito EPR *in vivo*. Algumas nanopartículas, como de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) conjugada com zinco (Zn) e protoporfirina (PP), foram avaliadas para verificar sua deposição na região tumoral. Foi observado que as HPMA-ZnPP (diâmetro ~80 nm) se acumularam mais no tumor do que o ZnPP livre, sendo atribuído este comportamento ao efeito EPR. Porém, apesar de o tamanho ser importante para direcionamento e acúmulo das nanopartículas no tumor, também foi visto que fatores como biocompatibilidade, período de circulação na corrente sanguínea e carga superficial também devem ser considerados para a ocorrência do efeito EPR.⁷⁴

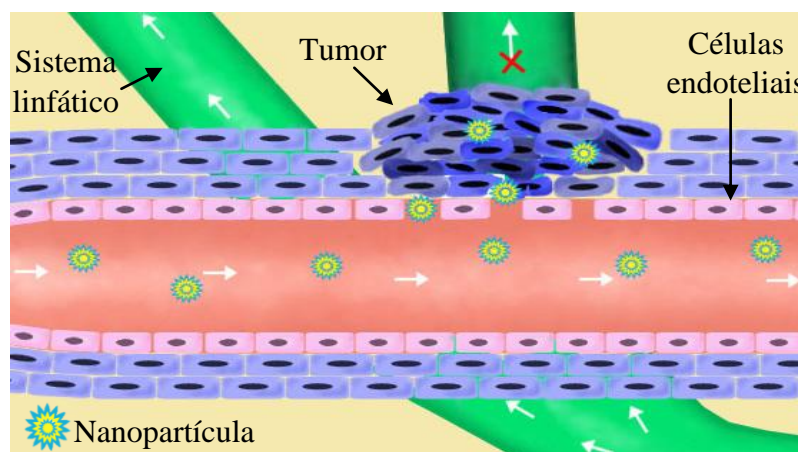


Figura 4 - Representação esquemática do direcionamento passivo das nanopartículas ao local de ação através do efeito EPR

CONCLUSÕES

3. CONCLUSÕES

Nanocápsulas contendo CBZ esféricas com 200 nm, PDI abaixo de 0,05, potencial zeta negativo (-25mV) foram desenvolvidas. Para aumentar a eficiência de encapsulamento do CBZ foi avaliado a solubilidade do fármaco no óleo tributirina por microscopia de luz polariza sendo observado a completa solubilização após a adição de etanol. Dessa forma, o etanol foi utilizado como co-solvente no método de nanoprecipitação.

As NC-CBZ e NC permaneceram com diâmetro médio próximo a 200 nm, PDI abaixo de 0,2, carga superficial negativa e pH próximo a 4 durante 240 dias, sendo este último parâmetro mais afetado pela condição de armazenamento.

Devido a característica lipofílica do CBZ e da tributirina, a eficiência de encapsulamento do CBZ foi alta (97%) e se manteve estável por 150 dias. Após 240 dias, a EE reduziu para 74,2% para as formulações armazenadas em geladeira e para 78,8% para as formulações armazenadas em temperatura ambiente.

O perfil de liberação revelou que o CBZ encapsulado possui uma liberação modificada em relação ao CBZ livre, sugerindo a possibilidade na redução na frequência de administração do fármaco.

As análises de biocompatibilidade demonstraram que a NC-CBZ tem potencial para uma administração endovenosa, já que não apresentou atividade hemolítica, nas concentrações de 5 a 25 µg/mL. Também não houve ativação do sistema complemento nas concentrações de 2,5 a 20 µg/mL, indicando que as NC-CBZ podem permanecer por mais tempo na corrente sanguínea com relação a sua opsonização pela via alternativa.

A NC-CBZ apresentou maior efeito citotóxico em relação ao CBZ livre frente às linhagens celulares da LNCap (redução de 2,4x no IC₅₀) e PC-3 (redução de 5x no IC₅₀). A NC sem fármaco apresentou menor citotoxicidade em relação à NC-CBZ. A maior citotoxicidade do CBZ encapsulado associado ao efeito EPR poderá aumentar a especificidade e eficácia do tratamento, reduzindo os efeitos adversos.

Portanto, com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a NC-CBZ tem propriedades físico-químicas e atividade biológica que a tornam um potencial tratamento para o câncer de próstata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Agency for Research on Cancer. *Latest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises to 18.1 Million New Cases and 9.6 Million Cancer Deaths in 2018*; 2018.
2. Siddiqui IA, Adhami VM, Chamcheu JC, Mukhtar H. Impact of nanotechnology in cancer: emphasis on nanochemoprevention. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:591-605.
3. Bouchet BP, Galmarini CM. Cabazitaxel, a new taxane with favorable properties. *Drugs of Today*. 2010;46(10):735-742. doi:10.1358/dot.2010.46.10.1519019
4. Instituto Nacional do Câncer. Próstata. www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata. Accessed March 24, 2017.
5. Santos MDO. Estimate 2018: Cancer Incidence in Brazil. *Rev Bras Cancerol*. 2018;64(1):119-120.
6. American Cancer Society. Key Statistics for Prostate Cancer.
7. Salvador-Morales C, Gao W, Ghatalia P, et al. Multifunctional nanoparticles for prostate cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009;9(2):211-221. doi:10.1586/14737140.9.2.211
8. Attard G, Parker C, Eeles RA, et al. Prostate cancer. *Lancet*. 2016;387(10013):70-82. doi:10.1016/S0140-6736(14)61947-4
9. De Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: A randomised open-label trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1147-1154. doi:10.1016/S0140-6736(10)61389-X
10. Hongo H, Kosaka T, Oya M. Analysis of cabazitaxel-resistant mechanism in human castration-resistant prostate cancer. *Cancer Sci*. 2018;109(9):2937-2945. doi:10.1111/cas.13729
11. Smith MR. Câncer Metastático da Próstata. In: *Manual de Oncologia de Harrison*. 2nd ed. Porto Alegre; 2015. <https://books.google.com.br/books?id=QqvECQAAQBAJ&pg=PA2012-IA26&dq=manual+de+oncologia+de+harrison+pdf&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjkwLGzkvfSAhXCkZAKHeqpCEUQ6AEIGjAA#v=onepage&q=câncer+de+próstata&f=false>.

12. Fong MK, Hare R, Jarkowski A. A new era for castrate resistant prostate cancer: A treatment review and update. *J Oncol Pharm Pract.* 2012;18(3):343-354. doi:10.1177/1078155212437599
13. Kapoor A, Wu C, Shayegan B, Rybak AP. Contemporary agents in the management of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Can Urol Assoc J.* 2016;10(11-12):414. doi:10.5489/cuaj.4112
14. Chi KN, Higano CS, Blumenstein B, et al. Custirsen in combination with docetaxel and prednisone for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (SYNERGY trial): a phase 3, multicentre, open-label, randomised trial. *Lancet Oncol.* 2017;2045(17):1-13. doi:10.1016/S1470-2045(17)30168-7
15. Holzbeierlein J, Lal P, Latulippe E, et al. Gene Expression Analysis of Human Prostate Carcinoma during Hormonal Therapy Identifies Androgen-Responsive Genes and Mechanisms of Therapy Resistance. *Am J Pathol.* 2004;164(1):217-227.
16. Jaworska D, Szliszka E. Targeting Apoptotic Activity Against Prostate Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2017:15-17. doi:10.3390/ijms18081648
17. Kuefer R, Hofer MD, Altug V, et al. Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. *Br J Cancer.* 2004;90(2):535-541. doi:10.1038/sj.bjc.6601510
18. Verhagen PCMS, Schroder FH, Collette L, Bangma CH. Does Local Treatment of the Prostate in Advanced and / or Lymph Node Metastatic Disease Improve Efficacy of Androgen-Deprivation Therapy ? A Systematic Review. *Eur Assoc Urol.* 2010;58:261-269. doi:10.1016/j.eururo.2010.05.027
19. Rottach A-M, Ahrend H, Martin B, et al. Cabazitaxel inhibits prostate cancer cell growth by inhibition of androgen receptor and heat shock protein expression. *World J Urol.* January 2019. doi:10.1007/s00345-018-2615-x
20. Scher HI, Fizazi K, Saad F, et al. Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2012;367(13):1187-1197.
21. Liu Q, Wu Y, Yoshizawa T, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 functions as an anti-apoptotic factor during paclitaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Int J Mol Med.* 2016;38:1727-1733. doi:10.3892/ijmm.2016.2798
22. Briganti A, Suardi N, Gallina A, et al. Predicting the risk of bone metastasis in prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(1):3-11. doi:10.1016/j.ctrv.2013.07.001
23. Tombal B, Lecouvet F. Modern Detection of Prostate Cancer ' s Bone Metastasis : Is the Bone Scan Era Over ? *Adv Urol.* 2012;2012. doi:10.1155/2012/893193

24. Davies AH, Wang Y, Zoubeidi A. Patient-derived xenografts: A platform for accelerating translational research in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2017. doi:10.1016/j.mce.2017.03.013
25. Engel T, Botrel A, Clark O, et al. Immunotherapy with Sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic castration-refractory prostate cancer (mCRPC): a systematic review and meta-analysis. *Int Brazilian J Urol*. 2012;38(6):717-727.
26. Einstein DJ, Arai S, Balk SP. Targeting the androgen receptor and overcoming resistance in prostate cancer. *Wolters Kluwer Heal*. 2019;31. doi:10.1097/CCO.0000000000000520
27. Yao Y, Lee RJ. Folic acid receptor-targeted human serum albumin nanoparticle formulation of cabazitaxel for tumor therapy. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:135-148.
28. Kort A, Hillebrand MJX, Cirkel GA, et al. Quantification of cabazitaxel, its metabolite docetaxel and the determination of the demethylated metabolites RPR112698 and RPR123142 as docetaxel equivalents in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2013;925:117-123. doi:10.1016/j.jchromb.2013.02.034
29. Sémiond D, Sidhu SS, Bissery MC, Vrignaud P. Can taxanes provide benefit in patients with CNS tumors and in pediatric patients with tumors? An update on the preclinical development of cabazitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(3):515-528. doi:10.1007/s00280-013-2214-x
30. Mahira S, Kommineni N, Husain GM, Khan W. Cabazitaxel and silibinin co-encapsulated cationic liposomes for CD44 targeted delivery: A new insight into nanomedicine based combinational chemotherapy for prostate cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:803-817. doi:10.1016/j.biopha.2018.11.145
31. Qu N, Sun Y, Xie J, Teng L. Preparation and Evaluation of in vitro Self-assembling HSA Nanoparticles for Cabazitaxel. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(2):294-300. doi:10.2174/1871520616666160526103102
32. Duran GE, Derdau V, Weitz D, et al. Cabazitaxel is more active than first-generation taxanes in ABCB1(+) cell lines due to its reduced affinity for P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;81(6):1095-1103. doi:10.1007/s00280-018-3572-1
33. Nightingale G, Ryu J. Cabazitaxel (Jevtana) A Novel Agent for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Drug Forecast*. 2012;37(8).
34. Darshan MS, Loftus MS, Thadani-Mulero M, et al. Taxane-Induced Blockade to Nuclear Accumulation of the Androgen Receptor Predicts Clinical Responses in

- Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2011;71(18):6019-6029. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1417
35. Lazzarini R, Salvadori S, Trapella C, et al. Physicochemical stability of cabazitaxel and docetaxel solutions. *Eur J Hosp Pharm.* 2015;22(3):150-155. doi:10.1136/ejpharm-2014-000558
 36. Abidi A. Cabazitaxel: A novel taxane for metastatic castration-resistant prostate cancer-current implications and future prospects. *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4):230. doi:10.4103/0976-500X.119704
 37. Pean E, Demolis P, Moreau A, et al. The European Medicines Agency Review of Cabazitaxel (Jevtana) for the Treatment of Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *Oncologist.* 2012;17(4):543-549. doi:10.1634/theoncologist.2011-0364
 38. Sarantopoulos J, Mita AC, He A, et al. Safety and pharmacokinetics of cabazitaxel in patients with hepatic impairment: a phase I dose - escalation study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79(2):339-351. doi:10.1007/s00280-016-3210-8
 39. Girard E, Ditzler S, Lee D, et al. Efficacy of cabazitaxel in mouse models of pediatric brain tumors. *Neuro Oncol.* 2015;17(1):107-115. doi:10.1093/neuonc/nou163
 40. Eisenberger M, Hardy-Bessard AC, Kim CS, et al. Phase III study comparing a reduced dose of cabazitaxel (20 mg/m²) and the currently approved dose (25 mg/m²) in postdocetaxel patients with metastatic castration-resistant prostate cancer - PROSELICA. *J Clin Oncol.* 2017;35(28):3198-3206. doi:10.1200/JCO.2016.72.1076
 41. Silverman R, Taylor S, Walker G, Sundar S. *Making It Less Taxing: Reduced Dose Cabazitaxel in Castration- Refractory Prostate Cancer.* *Clinical Oncology*, 2-3 (2017). doi:10.1016/j.clon.2017.01.003
 42. Song P, Mehrotra N, Team Leader O, Liu Q, Rahman NA. *Pharmacometric Review of NDA 201023 (Cabazitaxel).*; 2010.
 43. Zhou G, Jin X, Zhu P, et al. Human Serum Albumin Nanoparticles as a Novel Delivery System for Cabazitaxel. *Anticancer Res.* 2016;36(4):1649-1656. doi:10.1016/j.solener.2006.11.017
 44. Bteich J, Ernsting MJ, Mohammed MZ, et al. A Novel Nanoparticle Formulation Derived from Carboxymethyl-Cellulose, Polyethylene Glycol and Cabazitaxel for Chemotherapy Delivery to the Brain. *Bioconjug Chem.* 2018. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00220

45. Coors EA, Seybold H, Merk HF, Mahler V. Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2005;95(6):593-599. doi:10.1016/S1081-1206(10)61024-1
46. Chen W, Guo M, Wang S. Anti prostate cancer using PEGylated bombesin containing, cabazitaxel loading nano-sized drug delivery system. *Drug Dev Ind Pharm.* 2016;42(12):1968-1976. doi:10.1080/03639045.2016.1185438
47. Qu N, Wang D, Teng L, et al. Cabazitaxel-loaded human serum albumin nanoparticles as a therapeutic agent against prostate cancer. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:3451-3459. doi:10.2147/IJN.S105420
48. Sanna V, Singh CK, Jashari R, et al. Targeted nanoparticles encapsulating (-)-epigallocatechin-3-gallate for prostate cancer prevention and therapy. *Sci Rep.* 2017;1-15. doi:10.1038/srep41573
49. Boissenot T, Fattal E, Bordat A, et al. Paclitaxel-loaded PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as theranostic agents. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;108:136-144. doi:10.1016/j.ejpb.2016.08.017
50. Jawahar N, Sn M. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *Int J Heal Allied Sci.* 2012;1(4):217-223. doi:10.4103/2278-344X.107832
51. Schaffazick SR, Guterres SS, De Lucca Freitas L, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova.* 2003;26(5):726-737. doi:10.1590/S0100-40422003000500017
52. Crucho CIC, Teresa M. Polymeric nanoparticles : A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater Sci Eng C.* 2017;80:771-784. doi:10.1016/j.msec.2017.06.004
53. Bennet D, Kim S. Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. In: Sezer AD, ed. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery.* ; 2014:257-310. [https://www.intechopen.com/books/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery/polymer-nanoparticles-for-smart-drug-delivery.](https://www.intechopen.com/books/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery/polymer-nanoparticles-for-smart-drug-delivery)
54. Ahmed TA, Aljaeid BM. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:483-507.
55. Badri W, Miladi K, Robin S, et al. Polycaprolactone Based Nanoparticles Loaded with Indomethacin for Anti-Inflammatory Therapy: From Preparation to Ex Vivo Study.

- Pharm Res.* 2017. doi:10.1007/s11095-017-2166-7
56. Vroman I, Tighzert L. Biodegradable polymers. *Materials (Basel)*. 2009;2(2):307-344. doi:10.3390/ma2020307
 57. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28:5-24.
 58. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Reports.* 2012;64:1020-1037.
 59. Henton DE., Gruber P, Lunt J, Randall J. Polylactic Acid Technology. In: *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites.* ; 2005:527-578. doi:10.1201/9780203508206.ch16
 60. Corporation HHS. Thermal analysis of polylactic acid. 2007;(81):1-4.
 61. Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials (Basel)*. 2015;8(9):5744-5794. doi:10.3390/ma8095273
 62. Farah S, Anderson DG, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;107:367-392. doi:10.1016/j.addr.2016.06.012
 63. Elsayy MA, Kim K-H, Park J-W, Deep A. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renew Sustain Energy Rev.* 2017;79:1346-1352. doi:10.1016/j.rser.2017.05.143
 64. Armentano I, Bitinis N, Fortunati E, et al. Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. *Prog Polym Sci.* 2013;38(10-11):1720-1747. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.05.010
 65. Palacio J, Agudelo NA, Lopez BL. PLA/Pluronic ® nanoparticles as potential oral delivery systems: Preparation, colloidal and chemical stability, and loading capacity. *J Appl Polym Sci.* 2016;133(33). doi:10.1002/app.43828
 66. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;107:163-175. doi:10.1016/j.addr.2016.06.018
 67. Lee BK, Yun Y, Park K. PLA micro- and nano-particles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;107:176-191. doi:10.1016/j.addr.2016.05.020
 68. Peres C, Matos AI, Conniot J, et al. Poly(lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation. *Acta Biomater.* 2017;48:41-57. doi:10.1016/j.actbio.2016.11.012

69. Fischer B, Heffeter P, Kryeziu K, et al. Poly(lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. *Dalt Trans.* 2014;43(3):1096-1104. doi:10.1039/C3DT52388H
70. Feng C, Yuan X, Chu K, Zhang H, Ji W, Rui M. Preparation and optimization of poly (lactic acid) nanoparticles loaded with fisetin to improve anti-cancer therapy. *Int J Biol Macromol.* 2019;125:700-710. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.003
71. Zhao M, Lei C, Yang Y, et al. Abraxane, the Nanoparticle Formulation of Paclitaxel Can Induce Drug Resistance by Up-Regulation of P-gp. Leggas M, ed. *PLoS One.* 2015;10(7):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0131429
72. Desai N. Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel (Abraxane®). In: *Albumin in Medicine.* Singapore: Springer Singapore; 2016:101-119. doi:10.1007/978-981-10-2116-9_6
73. Muhamad N, Plengsuriyakarn T, Na-Bangchang K. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *Int J Nanomedicine.* 2018:3921-3935.
74. Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):71-79. doi:10.1016/j.addr.2012.10.002
75. Prabhu RH, Patravale VB, Joshi MD. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: Current insights. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:1001-1018. doi:10.2147/IJN.S56932
76. Vieira DB, Gamarra LF. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. *Einstein (São Paulo).* 2016;14(1):99-103. doi:10.1590/S1679-45082016RB3475
77. Kydd J, Jadia R, Velpurisiva P, Gad A, Paliwal S. Targeting Strategies for the Combination Treatment of Cancer Using Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics.* 2017;9(46):1-26. doi:10.3390/pharmaceutics9040046
78. Tang L, Gabrielson NP, Uckun FM, Fan TM, Cheng J. Size-Dependent Tumor Penetration and in Vivo Efficacy of Monodisperse Drug–Silica Nanoconjugates. *Mol Pharm.* 2013;10(3):883-892. doi:10.1021/mp300684a
79. Wang L, Huang J, Chen H, et al. Exerting Enhanced Permeability and Retention Effect Driven Delivery by Ultrafine Iron Oxide Nanoparticles with T 1 – T 2 Switchable

- Magnetic Resonance Imaging Contrast. *ACS Nano*. 2017;11(5):4582-4592. doi:10.1021/acsnano.7b00038
80. Nel A, Ruoslahti E, Meng H. New Insights into “Permeability” as in the Enhanced Permeability and Retention Effect of Cancer Nanotherapeutics. *ACS Nano*. 2017;11(10):9567-9569. doi:10.1021/acsnano.7b07214
81. Diou O, Greco S, Beltran T, Lairez D, Authelin JR, Bazile D. A method to Quantify the Affinity of Cabazitaxel for PLA-PEG Nanoparticles and Investigate the Influence of the Nano-Assembly Structure on the Drug/Particle Association. *Pharm Res*. 2015;32(10):3188-3200. doi:10.1007/s11095-015-1696-0
82. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Resolução N° 166, 2 de Julho de 2017*. Brasília (DF); 2017. http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401.
83. ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *Int Conf Harmon*. 2005;1994(November 1996):17. doi:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
84. Annapurna MM, Pramadvara K, Venkatesh B, Sowjanya G. Stability-Indicating RP-HPLC method for the determination of Cabazitaxel. *Indo Am J Pharm Res*. 2013;3(11):2962-2969.
85. Antoniraj MG, Ayyavu M, Henry LJK, et al. Chitosan-graft-mPEG based 5-Fluorouracil loaded polymeric nanoparticles for tumor targeted drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2017;44(3):365-376. doi:10.1080/03639045.2017.1371741
86. Landi-librandi AP, Chrysostomo TN, Elisa A, et al. Study of quercetin-loaded liposomes as potential drug carriers : in vitro evaluation of human complement activation Study of quercetin-loaded liposomes as potential drug carriers : in vitro evaluation of human complement activation. *J Liposome Res*. 2012;22(2):89-99. doi:10.3109/08982104.2011.615321
87. Dash BC, Réthoré G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials*. 2010;31(32):8188-8197. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.067
88. Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta*. 2007;597(2):179-186.

- doi:10.1016/j.aca.2007.07.011
89. Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm.* 1996;143(2):133-141. doi:10.1016/S0378-5173(96)04697-2
 90. Mosqueira VCF, Legrand P, Pinto-Alphandary H, Puisieux F, Barratt G. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J Pharm Sci.* 2000;89(5):614-626. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200005)89:5<614::AID-JPS7>3.0.CO;2-7
 91. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998;24(12):1113-1128. doi:10.3109/03639049809108571
 92. Perron MÈ, Plourde F, Guérard S, Huynh L, Allen C, Leroux JC. An investigation on the use of tributyrin nanoemulsions for docetaxel delivery. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2008;18(3):189-195. doi:10.1016/S1773-2247(08)50035-9
 93. Kan P, Chen ZB, Lee CJ, Chu IM. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. *J Control Release.* 1999;58(3):271-278. doi:10.1016/S0168-3659(98)00164-3
 94. Maier S, Reich E, Martin R, et al. Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2000;88(2):245-251.
 95. Heidor R, Festa Ortega J, de Conti A, Prates Ong T, Salvador Moreno F. Anticarcinogenic Actions of Tributyrin, A Butyric Acid Prodrug. *Curr Drug Targets.* 2012;13(14):1720-1729. doi:10.2174/138945012804545443
 96. Mannheimer WA. *Microscopia Dos Materiais: Uma Introdução.* Rio de Janeiro: Editora E-papers; 2002.
 97. Barros MR, Laranjeira P. Identificação de Cristais de Urato Monossódico no Líquido Sinovial. *Acta Farm Port.* 2016;5(1):57-67.
 98. Malvern Panalytical. Espalhamento de luz dinâmico (DLS). <https://www.malvernpanalytical.com/br/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>.
 99. Choi J, Reipa V, Hitchins VM, Goering PL, Malinauskas RA. Physicochemical Characterization and In Vitro Hemolysis Evaluation of Silver Nanoparticles. *Toxicol*

- Sci.* 2011;123(1):133-143. doi:10.1093/toxsci/kfr149
100. Pham CTN, Thomas DG, Beiser J, et al. Application of a hemolysis assay for analysis of complement activation by perfluorocarbon nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2014;10(3):651-660. doi:10.1016/j.nano.2013.10.012
 101. Guterres SS, Fessi H, Barratt G, Devissaguet J, Puisieux F. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac : I . Formulation and stability study. 1995;113:57-63.
 102. Schliecker G, Schmidt C, Fuchs S, Kissel T. Characterization of a homologous series of d,l -lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro. *Biomaterials.* 2003;24(21):3835-3844. doi:10.1016/S0142-9612(03)00243-6
 103. Lyu S, Untereker D. Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):4033-4065. doi:10.3390/ijms10094033
 104. Codari F, Lazzari S, Soos M, Storti G, Morbidelli M, Moscatelli D. Kinetics of the hydrolytic degradation of poly(lactic acid). *Polym Degrad Stab.* 2012;97(11):2460-2466. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2012.06.026
 105. *Purasorb® PDL 02.*; 2015.
 106. Hou J, Ci H, Wang P, et al. Nanoparticle tracking analysis versus dynamic light scattering: Case study on the effect of Ca²⁺ and alginate on the aggregation of cerium oxide nanoparticles. *J Hazard Mater.* 2018;360(July):319-328. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.08.010
 107. Gallego-urrea JA, Tuoriniemi J, Hassello M. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental , biological and food samples. *Trends Anal Chem.* 2011;30(3):473-483. doi:10.1016/j.trac.2011.01.005
 108. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm Res.* 2010;27(5):796-810. doi:10.1007/s11095-010-0073-2
 109. Bender EA, Cavalcante MF, Adorne MD, et al. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(-)-functionalized nanocapsules.pdf. *Pharm Res.* 2014:2975–2987. doi:10.1007/s11095-014-1392-5
 110. Renz P, Kokkinopoulou M, Landfester K, Lieberwirth I. Imaging of Polymeric Nanoparticles: Hard Challenge for Soft Objects. *Macromol Chem Phys.* 2016;217(17):1879-1885. doi:10.1002/macp.201600246

111. Mei L, Zhang Y, Zheng Y, et al. A novel docetaxel-loaded poly (ϵ -caprolactone)/Pluronic F68 nanoparticle overcoming multidrug resistance for breast cancer treatment. *Nanoscale Res Lett.* 2009;4(12):1530-1539. doi:10.1007/s11671-009-9431-6
112. Mainardes RM, Palmira M, Gremião D, Evangelista RC. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Rev Bras Ciências Farm.* 2006;42.
113. Liao K, Quan D, Lu Z. Effects of physical aging on glass transition behavior of poly(DL-lactide). *Eur Polym J.* 2002;38(1):157-162. doi:10.1016/S0014-3057(01)00166-5
114. Xiong XY, Tam KC, Gan LH. Release kinetics of hydrophobic and hydrophilic model drugs from pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles. *J Control Release.* 2005;103:73-82. doi:10.1016/j.jconrel.2004.11.018
115. Sandeep Kumar RJ, Neeti Nema S. Drug Nano-particle: A Release Kinetics. *J Nanomed Nanotechnol.* 2015;06(05). doi:10.4172/2157-7439.1000317
116. Mora-huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 2010;385:113-142. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
117. Valente I, del Valle LJ, Casas MT, et al. Nanospheres and nanocapsules of amphiphilic copolymers constituted by methoxypolyethylene glycol cyanoacrylate and hexadecyl cyanoacrylate units. *Express Polym Lett.* 2013;7(1):2-20. doi:10.3144/expresspolymlett.2013.2
118. Prashanth GK, Prashanth PA, Nagabhushana BM, et al. Comparison of anticancer activity of biocompatible ZnO nanoparticles prepared by solution combustion synthesis using aqueous leaf extracts of *Abutilon indicum*, *Melia azedarach* and *Indigofera tinctoria* as biofuels. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2017;0(0):1-12. doi:10.1080/21691401.2017.1351982
119. Amin K, Dannenfelser R. In Vitro Hemolysis: Guidance for the Pharmaceutical Scientist. *J Pharm Sci.* 2006;95(6):1173-1176. doi:10.1002/jps
120. ASTM E2524-08, Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles. 2013.
121. Neun BW, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles. 2016. <http://www.ncl.cancer.gov>.
122. Gamucci O, Bertero A, Gagliardi M, Bardi G. Biomedical Nanoparticles: Overview of Their Surface Immune-Compatibility. *Coatings.* 2014;4(1):139-159. doi:10.3390/coatings4010139

123. Torcello-Gómez A, Santander-Ortega MJ, Peula-García JM, et al. Adsorption of antibody onto Pluronic F68-covered nanoparticles: link with surface properties. *Soft Matter*. 2011;7(18):8450. doi:10.1039/c1sm05570d
124. Moghimi SM, Simbergb D. Complement activation turnover on surfaces of nanoparticles. *Nano Today*. 2017;15:8-10. doi:10.1016/j.nantod.2017.03.001
125. Wang G, Chen F, Banda NK, et al. Activation of Human Complement System by Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles Is Not Affected by Dextran/Fe Ratio, Hydroxyl Modifications, and Crosslinking. *Front Immunol*. 2016;7. doi:10.3389/fimmu.2016.00418
126. Moghimi SM, Hunter AC, Andresen TL. Factors Controlling Nanoparticle Pharmacokinetics: An Integrated Analysis and Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52(1):481-503. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623
127. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit JP. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res Part A*. 2006;78A(3):620-628. doi:10.1002/jbm.a.30711
128. Moghimi SM, Hunter AC, Dadswell CM, Savay S, Alving CR, Szebeni J. Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, FlocorTM)-induced complement activation in human sera. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2004;1689(2):103-113. doi:10.1016/j.bbadis.2004.02.005
129. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTech; 2018. doi:10.5772/intechopen.71923
130. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006;160(2):171-177. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001
131. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1125-1131. doi:10.1038/nprot.2008.75
132. Ortega JF, de Conti A, Tryndyak V, et al. Suppressing activity of tributyrin on hepatocarcinogenesis is associated with inhibiting the p53-CRM1 interaction and changing the cellular compartmentalization of p53 protein. *Oncotarget*. 2016;7(17). doi:10.18632/oncotarget.8248
133. Stecanella LA, Taveira SF, Marreto RN, et al. Development and characterization of PLGA nanocapsules of grandisin isolated from *Virola surinamensis*: in vitro release and cytotoxicity studies. *Rev Bras Farmacogn*. 2013;23(1):153-159.

doi:10.1590/S0102-695X2012005000128

134. Hoang B, Ernsting MJ, Tang WHS, et al. Cabazitaxel-conjugated nanoparticles for docetaxel-resistant and bone metastatic prostate cancer. *Cancer Lett.* 2017;410:169-179. doi:10.1016/j.canlet.2017.09.029
135. Zhang N, Said A, Wischke C, et al. Poly[acrylonitrile-co-(N-vinyl pyrrolidone)] nanoparticles – Composition-dependent skin penetration enhancement of a dye probe and biocompatibility. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;116:66-75. doi:10.1016/j.ejpb.2016.10.019

