



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA

ANA CAROLINA CRUZ DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
LIPOSSOMAS CONTENDO CABAZITAXEL

FORTALEZA

2022

ANA CAROLINA CRUZ DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LIPOSSOMAS
CONTENDO CABAZITAXEL

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
do Departamento de Farmácia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.

Coorientador: Elias da Silva Santos.

Aprovada em: ____/____/____

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S696d Sousa, Ana Carolina Cruz de.
Desenvolvimento e caracterização físico-química de lipossomas contendo cabazitaxel / Ana Carolina Cruz de Sousa. – 2022.
90 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.
Coorientação: Prof. Elias da Silva Santos.
1. Cabazitaxel. 2. Lipossomas. 3. Câncer de próstata. 4. Planejamento fatorial. 5. Caracterização físico-química. I. Título.

CDD 615

ANA CAROLINA CRUZ DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LIPOSSOMAS
CONTENDO CABAZITAXEL

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
do Departamento de Farmácia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.

Coorientador: Elias da Silva Santos.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Tamara Gonçalves de Araújo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Yara Santiago de Oliveira

Universidade da Integração Internacional da Luso Afro-Brasileira (UNILAB)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e por ser fruto de sua criação, por me permitir ultrapassar todos obstáculos, desafios e provas na minha caminhada.

Aos meus pais e irmão, parentes e amigos, pelo amor amparo, incentivo e conselhos ao longo da minha trajetória.

Aos meus amigos da faculdade, Gabi Cardoso, Carol Viana, Pamela e as demais cotadas do curso de farmácia que sempre estiveram presentes durante esses 5 anos, mostrando a significância da amizade e companheirismo e dando leveza a convivência, e que continuarão presentes em minha vida.

Ao laboratório CEDEFAR e grupo de pesquisa GPNANO juntamente de todos integrantes, servidores, professores, pós graduandos e bolsistas que o compõe: Professor Luis Carlos, Prof. Raquel, Prof. Josimar, Márcia, Karolina, Ana Paula e demais que me aceitaram de braços abertos desde o ano de 2018 como bolsista e sempre me ajudaram na minha formação e em todas necessidades, me possibilitaram adquirir muito conhecimento e experiência na realização dos experimentos. Em especial, a Alice, Thaís, Stephanie e Livia Marinho pelo companheirismo e amizade e pela convivência que tornaram os experimentos do dia a dia em laboratório mais produtivos.

Ao meu professor e orientador Josimar Eloy, que é um ser humano incrível, excepcional e respeitoso que me ensinou e ajudou muito desde a minha primeira experiência em laboratório, e agradeço a confiança, paciência e orientação nesse trabalho. Juntamente com a Prof. Dra. Raquel Petrilli, que é uma profissional incomparável e que contribuiu muito para realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Elias, pela paciência, confiança e por prontamente me ajudar sempre que precisei, pelo suporte com as correções, contribuições e incentivo.

Ao CNPq Decit pela oportunidade de bolsa e pesquisa correspondente ao processo 440755/2018-2 juntamente com a professora Dra. Cláudia do Ó Pessoa, por estar prontamente a disposição nas necessidades e demanda do projeto.

A banca examinadora composta pela Prof. Dra. Tamara Gonçalves de Araújo, Prof. Dra. Yara Santiago de Oliveira e Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy e suas futuras observações e contribuições no trabalho.

A Universidade Federal do Ceará por possibilitar esta oportunidade única e a todos funcionários e corpo docente do curso pelo apoio e compreensão nos último 5 anos, e que fizeram toda diferença na minha formação.

A todas pessoas que de alguma forma me ajudaram a acreditar em mim um agradecimento eterno.

RESUMO

O cabazitaxel é um fármaco aprovado clinicamente para o tratamento do câncer de próstata metastático resistente à castração. Contudo, a molécula do fármaco é lipofílica e apresenta farmacocinética desfavorável, limitando o sucesso clínico. Desse modo, a nanotecnologia farmacêutica emerge como alternativa viável para contornar as limitações do tratamento com o cabazitaxel, permitindo aumento da estabilidade, liberação sustentada do fármaco, melhora da farmacocinética e aumento passivo da captação tumoral, resultando em uma melhora da eficácia terapêutica com redução de efeitos colaterais. No presente trabalho, objetiva-se o desenvolvimento e caracterização físico-química de lipossomas de longo tempo de circulação contendo cabazitaxel. Para tanto, empregou-se a estratégia de desenvolvimento por *qualit by design*, com ferramenta de planejamento fatorial do tipo, *box-benhken*, com a determinação de variáveis independentes relevantes para a encapsulação de cabazitaxel como tipo de lipídio, razão fármaco/lipídeo e porcentagem molar de colesterol, adotando como variáveis dependentes tamanho de partícula, índice de polidispersão, avaliado por espalhamento dinâmico de luz e eficiência de encapsulação, quantificada por espectrofotometria-UV. As nanopartículas produzidas por hidratação do filme lipídico apresentaram tamanho de partícula de $136 \pm 2,21$ nm, índice de polidispersão $0,335 \pm 0,006$, potencial zeta $-10,9 \pm 0,49$ mV e eficiência de encapsulação de $93,78 \pm 0,51\%$. As caracterizações físico químicas de DSC e FTIR permitiram concluir que o cabazitaxel está no estado amorfo ou disperso molecularmente na matriz lipossomal e a microscopia de força atômica indicou a morfologia dos lipossomas como vesículas lipídicas sem rugosidades. Por fim, o estudo de dissolução mostrou a liberação lenta e sustentada do fármaco, o perfil de liberação encontrado foi confrontado a diferentes modelos cinéticos de liberação, sendo que o modelo de Weibull foi considerado mais adequado. Em conclusão, o sistema desenvolvido tem características físico-químicas apropriadas para veiculação de cabazitaxel, cuja potencial aplicação no tratamento do câncer de próstata será avaliada em estudos in vitro e in vivo.

Palavras-chave: Cabazitaxel; Lipossomas; Câncer de próstata; Planejamento fatorial; Caracterização físico-química.

ABSTRACT

Cabazitaxel is a clinically approved drug for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. However, the drug molecule is lipophilic and has unfavorable pharmacokinetics, limiting clinical success. Thus, pharmaceutical nanotechnology emerges as a viable alternative to circumvent the limitations of treatment with cabazitaxel, allowing increased stability, sustained drug release, improved pharmacokinetics and passive increase in tumor uptake, resulting in improved therapeutic efficacy with reduced Side effects. In the present work, the objective is the development and physicochemical characterization of liposomes with long circulation time containing cabazitaxel. For this purpose, a qualitative by design development strategy was used, with a box-benhken factorial planning tool, with the determination of relevant independent variables for the encapsulation of cabazitaxel, such as type of lipid, drug/lipid ratio and percentage molar concentration, adopting as dependent variables particle size, polydispersity index, evaluated by dynamic light scattering and encapsulation efficiency, quantified by UV-spectrophotometry. The nanoparticles produced by hydration of the lipid film had a particle size of 136 ± 2.21 nm, polydispersity index 0.335 ± 0.006 , zeta potential -10.9 ± 0.49 mV and encapsulation efficiency of 93.78 ± 0.51 %. The physicochemical characterizations of DSC and FTIR allowed to conclude that cabazitaxel is in the amorphous state or molecularly dispersed in the liposomal matrix and the atomic force microscopy indicated the morphology of the liposomes as lipid vesicles without roughness. Finally, the dissolution study showed the slow and sustained release of the drug, the release profile found was compared to different kinetic models of release, and the Weibull model was considered more adequate. In conclusion, the developed system has appropriate physicochemical characteristics for the delivery of cabazitaxel, whose potential application in the treatment of prostate cancer will be evaluated in in vitro and in vivo studies.

Keywords: Cabazitaxel; liposomes; Prostate cancer; Factorial planning; Physicochemical characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anatomia da próstata	20
Figura 2 - Estrutura química Cabazitaxel	27
Figura 3 - Principais nanocarreadores dispostos em ordem cronológica de descoberta.	29
Figura 4 - Estrutura dos lipídeos (A) SPC (B) DPPC (C) DSPC.	31
Figura 5 - Estrutura química do DSPC e DSPE-PEG	33
Figura 6 - Representação de um modelo Box-Behnken por três fatores.	35
Figura 7 - Preparo de Lipossomas	39
Figura 8 - Procedimento de análise de eficiência de encapsulação	42
Figura 9 - Gráfico de contorno de superfície e resposta para variáveis independentes e sua influência no tamanho de partícula.....	55
Figura 10 - Gráfico de contorno e superfície de resposta para variáveis independentes e sua influência no Índice de polidispersividade.	55
Figura 11 - Gráfico de contorno e superfície de resposta para variáveis independentes e sua influência em eficiência de encapsulação.....	56
Figura 12 - Gráfico de resíduo para resposta Y_2 (tamanho de partícula).....	57
Figura 13 - Gráficos de resíduos para a resposta Y_1 (eficiência de encapsulação).	57
Figura 14 - Gráficos de resíduo para a resposta Y_3 (índice de polidispersividade).....	58
Figura 15 - Espectros de FTIR de cabazitaxel, lipossoma branco e lipossoma contendo cabazitaxel.	63
Figura 16 - Curvas de DSC de cabazitaxel, lipossoma branco e lipossoma contendo cabazitaxel.	66
Figura 17 - Imagem da morfologia dos lipossomas contendo cabazitaxel. Em (A) imagem 3D - 10 x 10 μm e em (B) imagem 2D -Z-PHASE – 10 x 10 μm . Imagens com resolução de 512 pixels.....	68
Figura 18 - Gráfico de tamanho médio para lipossomas SPC: Col: DSPE-PEG: CTX. Barras expressam tamanho máximo e mínimo.	68
Figura 19 - Gráfico da curva de calibração do cabazitaxel.	69
Figura 20 - Gráfico da curva matizada de cabazitaxel em tampão fosfato com 1% de lauril sulfato de sódio.....	71
Figura 21 - Cromatograma do fármaco cabazitaxel, onde pico característico no tempo de 5 minutos é observado.	72

Figura 22 - Cromatograma do cabazitaxel juntamente com tampão fosfato e 1% de lauril sulfato de sódio.....	72
Figura 23 - Perfil de liberação in vitro comparando fármaco a lipossoma contendo cabazitaxel.	74
Figura 24 - Cinética de Weibull aplicada para fármaco cabazitaxel.	77
Figura 25 - Cinética de Weibull aplicada na formulação dos lipossomas contendo cabazitaxel.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação Tumor <i>Nódulo</i> Metástase.....	22
Tabela 2 - Esquema das variáveis independentes (-1,0,1).....	37
Tabela 3 - Variáveis fixas empregadas nos ensaios.	38
Tabela 4 - Planejamento fatorial com todas as combinações de variáveis em seus níveis.....	38
Tabela 5 - Relação entre fatores independentes X1, X2 e X3 com seus valores reais e respectivas respostas dependentes Y1, Y2 e Y3.....	47
Tabela 6 - Valores experimentais de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta com seus respectivos desvios padrão.	48
Tabela 7 - Valores de porcentagem de encapsulação e seus respectivos desvio padrão (DP) para as formulações desenvolvidas empregando planejamento fatorial.....	50
Tabela 8 - Coeficientes de Regressão Full Quadratic para Tamanho de partícula (Y ₂).	52
Tabela 9 - Coeficiente da Regressão Full Quadratic para Eficiência de encapsulação (Y ₁).	52
Tabela 10- Coeficiente de Regressão Full Quadratic para Índice de Polidispersão (Y ₃).	53
Tabela 11 - Valores de tamanho de partícula (Y ₂), obtidos experimentalmente de cada formulação, valores estimados, resíduos e erro relativos.	58
Tabela 12 - Valores de eficiência de encapsulação (Y ₁), obtido experimentalmente de cada formulação, valores estimados, resíduos e erro relativos.	59
Tabela 13 - Valores de índice de polidispersividade (Y ₃), obtidos experimentalmente de cada formulação, valores estimados, resíduos e erro relativos.	60
Tabela 14 - Caracterização físico-química da formulação 5, composta por SPC, colesterol (10%), contendo cabazitaxel (1:20 molar) e 5% de DSPE-PEG (2000).	62
Tabela 15 - Caracterizações das alíquotas de formulações com crioprotetor em diferentes proporções.	63
Tabela 16 - Valores da curva matrizada de cabazitaxel em tampão fosfato 1% de lauril sulfato de sódio.....	70
Tabela 17 - Valores do coeficiente de determinação obtidos de acordo com modelos dependentes para formulação e fármaco cabazitaxel.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HBP	Hiperplasia Prostática Benigna
CaP	Câncer de próstata
MDR	Multidrug resistance
P-gp	P - glicoproteína
MSR	Método de superfície de resposta
BBD	Design Box Behnken
PSA	Antígeno prostático
PR	Proctectomia radical
RT	Radioterapia
BT	Braditerapia
FDA	Food Drug Administration
EPR	Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentada
RES	Reticuloendothelial System
MPS	Mononuclear Phagocyte System
SPC	Fosfatidilcolina
DPPC	1,2- Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPC	1,2 - Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
PEG	Polietilenoglicol
DSPE-PEG	Distearoilfosfatidiletanolamina-PEG
PDI	Índice de Polidispersão
DOE	Design de Experimentos
DLS	Dynamic Light Scattering
CTX	Cabazitaxel

FTIR Infravermelho com transformada de Fourier

DSC Differential Scanning Calorimetry

MFA Microscopia de Força Atômica

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 Câncer de Próstata	19
3.2 Quimioterapia convencional	24
3.3 Resistência a múltiplas drogas (MDR)	25
3.4 Cabazitaxel	26
3.5 Sistemas de liberação de fármaco: Lipossomas	28
3.6 Planejamento fatorial na seleção de uma formulação	34
4 METODOLOGIA	37
4.1 Planejamento fatorial na seleção de uma formulação	37
4.2 Preparo de lipossomas	39
4.3 Caracterização físico-química dos lipossomas	39
4.3.1 Análise de tamanho de partícula e índice de polidispersividade	39
4.3.2 Determinação de potencial zeta	40
4.3.3 Determinação da eficiência de encapsulação	41
4.3.4 Liofilização	42
4.3.5 Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	43
4.3.6 Análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC)	43
4.3.7 Microscopia de força atômica (MFA)	43

4.4 Ensaio de liberação in vitro de lipossomas contendo cabazitaxel por método analítico com quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência	44
4.4.1 Condições analíticas	44
4.4.1.1 Linearidade	44
4.4.1.2 Avaliação do efeito matriz na curva de linearidade	44
4.4.2 Estudo de solubilidade do cabazitaxel	45
4.4.3 Estudo de liberação in vitro dos lipossomas contendo cabazitaxel	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Desenvolvimento de caracterização físico-químicas dos lipossomas	47
5.2 Liofilização.....	61
5.3 Caracterização de lipossomas:FTIR.....	63
5.4 Caracterização de lipossomas: análise calorimétrica	66
5.5 Microscopia de força atômica	67
5.6 Estudo de liberação in vitro de lipossomas contendo cabazitaxel	69
5.6.1 Método analítico: Linearidade	69
5.6.2 Avaliação da curva matrizada de cabazitaxel	70
5.6.3 Estudo de solubilidade	71
5.6.4 Ensaio de liberação in vitro	73
6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o quarto mais incidente no mundo, com uma predominância de 95% dos casos, alta mortalidade e que acomete em maior proporção os homens com idade superior a 40 anos. Dentre os homens mais afetados, estão os afro-americanos e os homens que possuem casos desse tipo de câncer na família. É a neoplasia mais comum no Brasil, compondo 70 novos casos para cada 100 mil homens (COSTA *et al.*, 2015). O perfil de crescimento tumoral torna a maioria absoluta dos casos assintomáticos, ou seja, ocorre apresentação tardia da doença, que resulta em ineficácia dos tratamentos vigentes (BRASIL, 2015). Apesar de ser uma neoplasia comum, sua etiologia é pouco elucidada. Os principais sintomas, quando aparecem são semelhantes ao crescimento benigno da próstata (dificuldade de urinar e necessidade de urinar várias vezes durante o dia ou noite) em casos mais avançados pode provocar dor óssea, sintomas urinários, e em casos mais graves infecção generalizada ou insuficiência renal (INCA, 2021).

O tratamento contra o câncer de próstata deve ser individualizado para cada paciente e leva em consideração o estágio do tumor. As principais opções de tratamento são: cirurgia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e quimioterapia. Os medicamentos que são utilizados são os antimitótico docetaxel e mitoxantrona associados a prednisona. No entanto, o tratamento pode apresentar eficácia limitada, possivelmente em decorrência do mecanismo adquirido de resistência a múltiplas drogas, resultando em indivíduos com câncer de próstata metastático resistente à castração com sobrevida inferior a 30% em cinco anos (MADEIRA; LEANDRO; ROQUE, 2017). Os fármacos comumente utilizados na terapia, como docetaxel, são agentes que funcionam como um substrato para a bomba de efluxo de resistência a múltiplas drogas (MDR) e glicoproteína associada à membrana (P-gp) o que acaba por resultar na refratariedade do tratamento devido a essas estratégias de modulação de resistência aos fármacos apresentadas pelas células tumorais (PALLER; ANTONARAKIS, 2011).

Até o ano de 2010, não havia opção terapêutica para pacientes com câncer de próstata metastático resistente à ressecção (CPMRR), logo, no mesmo ano, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou o cabazitaxel como nova opção terapêutica para o tratamento de câncer de próstata metastático resistente à ressecção e refratário a ação do docetaxel. O cabazitaxel é um antineoplásico taxano de segunda geração cuja função resulta na inibição das

funções celulares de interfase e mitose. Deste modo, o cabazitaxel é um antineoplásico com atividade promissora na terapia do câncer de próstata metastático resistente à castração, após falha do docetaxel. Adicionalmente, outros estudos verificaram no cabazitaxel a promoção da redução de morte e benefício de redução da dor e aumento da sobrevida, e baixa afinidade a P-gP, mas em contrapartida foram apresentados efeitos colaterais de neutropenia e trombocitopenia (MEIRELES *et al.*, 2015). Apesar de o cabazitaxel apresentar elevadas evoluções e relação aos outros tratamentos, existem problemas referentes à formulação Jevtana® devido ao tensoativo Tween 80, que pode acarretar efeitos de hipersensibilidade em pacientes. (LAZZARINI *et al.* 2015; ZHOUG *et al.*, 2016; COORS *et al.*, 2005).

Com isso, a aplicação de sistemas de liberação nanoestruturados de fármacos torna-se uma possível solução para este desafio. Na área da saúde, a *European Medicines Agency* define a nanotecnologia como o uso de pequenas estruturas menores de 1.000 nanômetros de diâmetro que são projetadas para apresentar propriedades específicas. Em uma situação ideal as nanopartículas, atuando como nanocarreadores, são capazes de transportar o fármaco para um local de destino específico (receptor, sítio ativo) para exercer a sua atividade terapêutica com o máximo de segurança. Dentre esses nanocarreadores têm-se os lipossomas (EMA, 2012).

Os lipossomas são vesículas lipídicas de caráter anfifílico que podem ser sintetizadas, em escalas nanométricas, com o intuito de encapsular fármacos, lipofílicos ou hidrofílicos, melhorando a biodisponibilidade, aumentando o tempo de meia-vida e minimizando ou até eliminando os efeitos colaterais (ELOY *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016). As vesículas lipídicas são uma estratégia cuja sua estrutura oferece benefícios em diversos aspectos: aumento da biodisponibilidade, redução da toxicidade, visto que possibilita maior eficácia no transporte dos quimioterápicos para os tumores malignos e permite o controle da liberação resultando em seletividade ao sítio patológico. Esses benefícios são muito bem vistos na oncologia, visto que podem reverter efeitos negativos que existem na quimioterapia tradicional, como exemplo, existem fármacos de baixo peso molecular, como o próprio cabazitaxel que podem atravessar regiões e se difundir pela parede endotelial e alcançar tecidos sadios provocando efeitos de toxicidade. (YARED e TKACZUK, 2012; WARCSH *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013).

A 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®, Magace ES®, Zonstatin/stimalmar®, INGN - 401®, sendo estes para tratamento de câncer de

ovário, câncer de mama, carcinoma hepatocelular e câncer de pulmão, respectivamente (SIDDIQUI *et al.*, 2012).

Portanto, considerando a inexistência de medicamento nanoestruturado específico para o tratamento do câncer de próstata, associado aos benefícios proporcionados pelas novas terapias com nanocarreadores, o encapsulamento do fármaco cabazitaxel em lipossomas pode ser uma estratégia relevante visto que são estruturas que apresentam boa compatibilidade, permitem encapsular e transportar substâncias hidrofílicas ou lipofílicas, melhoram a biodisponibilidade, reduzem dos efeitos colaterais, aumentam duração do fármaco nas células alvo, reduzem dose e frequência de administração e permitem direcionamento ao local de ação, possibilitando uma maior sobrevida do paciente através da eficácia do tratamento.

Para o desenvolvimento das formulações foi utilizado o Box Behnken, ferramenta de planejamento experimental cuja múltiplas variáveis são modificadas ao mesmo tempo a fim de analisar a resposta estatisticamente. O método da superfície de resposta (MSR) é uma abordagem estatística que gera relações matemáticas polinomiais e é comumente aplicada em pesquisas extensas que envolvem muitos testes, cujo objetivo é obter o melhor resultado, considerando variáveis que afetam o estudo, acelerando o desenvolvimento por permitir a redução do número de experimentos relacionados ao estudo proposto, além de avaliar a proporção de cada variável na resposta (PEREIRA *et al.*, 2019; SATHYAMOORTHY *et al.*, 2017). Dentre os modelos existentes que pertencem ao MSR, o Box-Behnken Design (BBD) é um dos mais eficientes para análise multifatorial, e pode ser aplicado no desenvolvimento de formulações farmacêuticas (PEREIRA *et al.*, 2019; SARKAR; BHATTACHARVA; PAL, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver lipossomas contendo cabazitaxel, empregando planejamento fatorial por Box-Behnken e caracterizá-los por ensaios físico-químicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar lipossomas contendo cabazitaxel, empregando planejamento fatorial com estudo das seguintes variáveis: tipo de lipídeos, razão fármaco/lipídeos e colesterol;
- Caracterizar tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta dos lipossomas contendo cabazitaxel por *dynamic light scattering*;
- Caracterizar eficácia de encapsulação dos lipossomas por espectroscopia na região do ultravioleta;
- Caracterizar a formulação por calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier;
- Investigar a morfologia dos lipossomas por microscopia de força atômica;
- Avaliar o perfil *in vitro* de liberação do cabazitaxel em lipossomas;
- Comparar o perfil de liberação do fármaco em lipossomas e do fármaco livre;

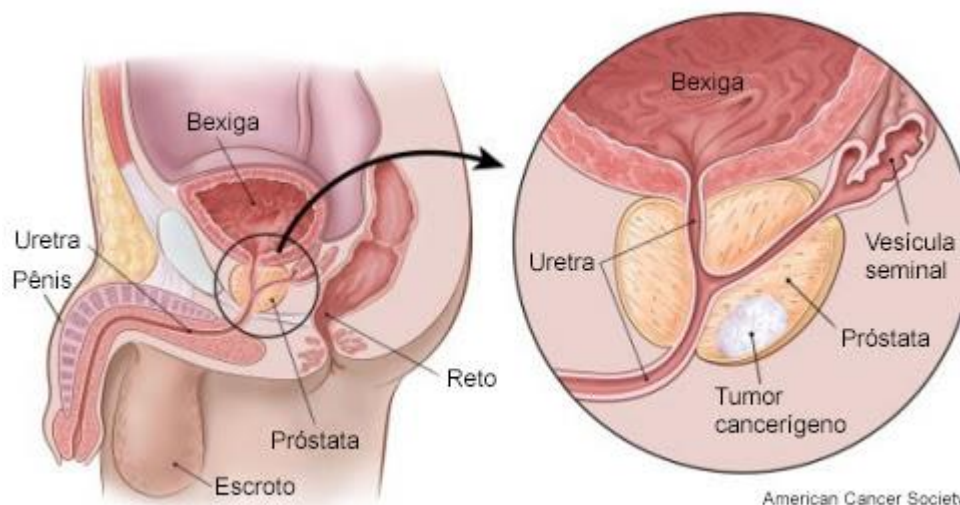
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer de Próstata

O câncer é um termo genérico para o grupo de doenças, nas quais é característico o crescimento de células anormais além de seus limites habituais podendo invadir regiões adjacentes do corpo e se espalhar por órgãos, fenômeno chamado de metástase (WHO, 2018). Excetuando o câncer de pele não melanoma, o câncer de próstata é o segundo mais frequente em homens (13,5%), independente do IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) do país, e a segunda com maior mortalidade depois do câncer de pulmão, sendo responsável pelo total de 15.983 mortes no ano de 2019. A estimativa é que surjam 65.840 novos casos para cada ano do triênio de 2020-2022 (INCA, 2020).

A próstata é uma glândula do organismo masculino, posicionada no baixo abdome, abaixo da bexiga e anterior ao reto ela circunda a porção inicial da uretra (Figura 01). (INCA, 2021). A glândula está posicionada na parte baixa do abdômen, em posição imediatamente anterior ao reto. O tamanho médio aos 20 anos de idade da próstata é de 20g e há um crescimento de 0,4g/ano a partir dos 30 anos (BERMAN *et al.*, 2012). Condições de aumento normal da próstata, associado a alguns outros fatores, podem desencadear uma série de doenças como hiperplasia prostática benigna (HPB), a prostatite e o câncer de próstata (CaP) (LEE *et al.*, 2001).

Figura 1- Anatomia da próstata



Fonte: AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019.

O período da adolescência é o que apresenta maior taxa de crescimento da próstata, estabelecido em cerca de 1,6 grama ao ano, atingindo seu peso fisiológico máximo na idade adulta, de aproximadamente 20 gramas. O crescimento da próstata é regulado por uma complexa interação entre o epitélio e estroma prostáticos (LEE *et al.*, 2001). De acordo com o envelhecimento do homem a tendência é que a próstata aumente de tamanho, dessa forma, o fluxo urinário se torna mais lento e mais difícil a partir dos 50 anos de idade; devido à compressão da uretra que dificulta a passagem da urina, o jato urinário se torna gradativamente fino e fraco (TONON, 2009).

A próstata é o órgão masculino mais comumente afetado por neoplasias malignas e benignas. Existem duas doenças que afetam a próstata, a hiperplasia prostática benigna que ocorre no centro da próstata ao redor da uretra e o câncer de próstata que é maligno e ocorre na periferia (TOLEDO, 2020).

O CaP é também conhecido como doença do envelhecimento masculino ou câncer da terceira idade, a idade aumenta a incidência e mortalidade, principalmente após os 50 anos. Após os 50 anos, um em cada 6 homens apresentará a doença e essa frequência aumenta com o avanço da idade (TOLEDO, 2020). Cerca de 75% dos casos acometem indivíduos com idade a partir de 65 anos (INCA, 2019).

A idade é conhecida como um fator de risco bem estabelecido, no entanto, existem outros para predisposição do CaP, como fatores hereditários, fatores hormonais, tabagismo,

excesso de gordura corporal, exposição a aminas aromáticas, arsênio e produtos do petróleo, fuligem e dioxinas (INCA, 2020). Há uma relação com etnia, onde negros apresentam maior risco que asiáticos, no entanto, essa informação pode estar relacionada a fatores hormonais, dietéticos, socioeconômicos e perfis genéticos das populações (MORBECK; GARDIA, 2017).

Em sua fase inicial, o câncer da próstata tem evolução silenciosa. Muitos pacientes não apresentam nenhum sintoma ou, quando apresentam, são semelhantes aos do crescimento benigno da próstata (dificuldade de urinar, necessidade de urinar mais vezes durante o dia ou à noite). Na fase avançada, o tumor se desenvolve tornando-se suficientemente grande, avançando sobre a bexiga, causando obstrução urinária. Dessa forma, ocorrem as manifestações de sinais e sintomas, tais como dificuldade e aumento da frequência urinária, retenção e diminuição da força urinária, quando mais grave, sintomas ósseos, infecção generalizada ou insuficiência renal (INCA, 2020).

Quando o CaP desenvolve para metástase, o tumor primário estabelece sua própria vasculatura e produz novos vasos linfáticos a partir do suprimento sanguíneo preexistente, através da liberação de fatores pró-angiogênicos. Em seguida, ocorre a perda da adesão celular, alterações na imunidade e degradação do estroma local para que as células tumorais possam extravasar em direção às vias hematogênicas e linfáticas com a finalidade de se fixarem em locais distantes (NICHOLSON; VELA; WILLIANS, 2017; NELSON, 2020).

Importante mencionar que o câncer de próstata não é uma doença uniforme. Existem diversos tipos, com diversas apresentações, diferentes índices de gravidade e diversos padrões de agressividade, desde os qualificados como “indolentes”, até os mais agressivos, que por serem muito diferentes do tecido prostático, não produzem o PSA, dificultando o diagnóstico pelo exame de sangue, portanto, uma doença complexa, cuja classificação, diagnóstico e tratamento vêm sofrendo modificações e atualizações muito frequentes (TOLEDO, 2020).

A detecção precoce por meios de método de triagem e diagnóstico são as únicas maneiras de evitar e reduzir a mortalidade. O CaP, assim como de qualquer outro tipo, quanto mais cedo diagnosticado, maiores serão as chances de cura. Além de permitir um tratamento menos agressivo e mutilante, a detecção precoce do câncer da próstata poderia reduzir os altos custos decorrentes do tratamento do câncer em estádios avançados e suas metástases. (INCA, 2002; BRASIL, 2008). O rastreio precoce deve ser realizado para populações de risco que inclui homens maiores de 50 anos, afrodescendentes, homens maiores de 45 anos com histórico

familiar de CaP, exame de PSA > 1ng/mL em pacientes aos 40 anos e PSA > 2ng/mL aos 60 anos de idade. O rastreio precoce avaliando os níveis séricos de PSA devem ser realizados a cada dois anos ou postergado até oito anos para pacientes sem risco (WOLLIN; MAKAROV, 2015).

O diagnóstico da doença pode ser realizado por meio de exame clínico com o toque retal juntamente a averiguação dos resultados do exame de sangue com a dosagem do antígeno prostático específico (PSA). Outros exames também podem auxiliar na detecção, como a ultrassonografia pélvica, por exemplo. No entanto, para a obtenção do diagnóstico conclusivo é necessário a realização do exame de biópsia, procedimento realizado para análise de tecidos e órgãos (DORNAS *et al.*, 2008).

O tratamento da neoplasia de próstata depende de fatores como: o estágio da doença, a idade, e o estado geral do indivíduo. Para avaliar o estadiamento e heterogeneidade morfológica do adenocarcinoma da próstata a 7ª edição da “Union for Internationale Cancer Control” (UICC), em 2009, utiliza como base para dimensão do tumor a classificação TNM, na avaliação da extensão dos linfonodos e na presença ou não da disseminação da doença para outros órgãos do corpo, podendo variar de I a IV graus crescentes, conforme a gravidade da doença. A condução do estadiamento é necessária para ajudar na indicação da conduta terapêutica mais adequada (INCA, 2019). O estadiamento classificou-o em TNM (Tumor, Nódulo e Metástase), que está baseado em 5 critérios (Tabela 01): T é referente a extensão do tumor primário (variando de T0 a T4), N indica se há metástase para os linfonodos (variando de N0 a N1) e M que indica se há metástase a distância (variando de M0 a M1c). Juntamente do estadiamento, utiliza-se também o Escore de Gleason, que indica a graduação histopatológica, que separa os tumores em 5 padrões, entre eles o padrão 1, sendo o tumor bem diferenciado, e o padrão 5, como indiferenciado e por último, os níveis do antígeno prostático específico (PSA) para classificar a progressão do câncer. O diagnóstico inicial em homens tem como os principais fatores de prognóstico: estadiamento, escore de Gleason e nível sérico de PSA (MORBECK; GARDIA, 2017).

Tabela 1- Classificação Tumor *Nódulo* Metástase.

T – Tumor primário
Tx – O tumor primário não pode ser avaliado
T0 – Sem evidência do tumor primário

T1 – Tumor clinicamente não palpável ou visível por método de imagem
T1a – Tumor incidental: achado histopatológico em $\leq 5\%$ do tecido de ressecção
T1b – Tumor incidental: achado histopatológico em $> 5\%$ do tecido de ressecção
T1c – Tumor identificado por biópsia por agulha (PSA elevado)
T2 – Tumor confinado à próstata
T2a – Tumor engloba metade de um dos lobos ou menos
T2b – Tumor engloba mais da metade de um lobo, mas não os dois lobos
T2c – Tumor engloba ambos os lobos
T3 – Tumor além da cápsula prostática
T3a – Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
T3b – Tumor envolve a vesícula seminal (uma ou ambas)
T4 – Tumor fixo ou que invade estruturas adjacentes, além das vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores ou parede pélvica
N – Envolvimento linfonodal regional
Nx – Linfonodos regionais não avaliados
N0 – Sem metástases para linfonodos regionais
N1 – Metástases linfonodais regionais
M – Metástases a distância
Mx – Metástases a distância não avaliadas
M0 – Ausência de metástase a distância
M1 – Metástase a distância
M1a – Linfonodos não regionais
M1b – Ossos
M1c – Outros órgãos

Fonte: EAU, 2011.

3.2 Quimioterapia convencional

De acordo com as diretrizes diagnósticas e terapêuticas do adenocarcinoma de próstata (DDTAP), o tratamento varia em função do grau de risco avaliado para o tumor, considerando o estadiamento pela escala de Gleason e níveis do antígeno prostático específico. Existem inúmeras formas de tratamento do carcinoma prostático. Para doença localizada, a recomendação de tratamento é prostatectomia radical (PR), radioterapia (RT) externa, braquiterapia (BT) e ou terapia hormonal (BRASIL, 2015; NILCHOLSON; VELA; WILLIANS, 2017).

O tratamento recomendado para neoplasias prostáticas avançadas é a manipulação hormonal com o bloqueio da testosterona a níveis de castração associado ou não com bloqueio hormonal cirúrgico, cujo tratamento é fundamentado no princípio de que o câncer de próstata metastático, semelhante ao tecido prostático benigno, é composto principalmente de células dependentes de andrógenos como a testosterona para sobrevivência e crescimento (BRASIL, 2015; NILCHOLSON; VELA; WILLIANS, 2017). Entretanto, essa resposta a hormônios persiste apenas por um período variável e limitado, pois podem ocorrer mutações seletivas que resultam em progressão para o câncer de próstata metastático resistente à castração (mCRPC). Em últimos casos, quando ocorre esse processo a opção terapêutica disponível é a quimioterapia, sendo o tratamento de primeira linha o docetaxel administrado a cada 3 semanas em associação com a prednisona. Assim, caso o paciente progrida com o uso do docetaxel, é indicado a segunda linha de tratamento, o cabazitaxel associado a prednisona (BRASIL, 2015; NELSON, 2020).

A quimioterapia é utilizada no tratamento da neoplasia prostática quando a enfermidade se encontra dispersa e a terapia hormonal não desenvolve os resultados esperados. São utilizadas drogas que possibilitam atingir células tumorais em diferentes estágios do ciclo celular. A quimioterapia possibilita a destruição de células tumorais, impossibilitando, dessa forma, seu desenvolvimento, entretanto atingem células circunvizinhas, visto que não é uma terapia direcionada. Portanto, pode provocar diversos efeitos colaterais no indivíduo, entre eles o aumento ou diminuição do peso, náuseas, vômitos, queda de cabelo, fraqueza e tontura (SORRATO *et al*, 2016).

De acordo com Pereira *et al.* (2015), o docetaxel provoca efeitos adversos, como o aumento do risco de insuficiência cardíaca, artralgia e mialgia, lacrimejamento exagerado dos olhos, eritema, náuseas, vômitos, inflamação da mucosa oral, fadiga.

Os taxanos paclitaxel e docetaxel tem sua eficácia limitada graças a alta afinidade pela glicoproteína-P (P-gp), uma estrutura que funciona como uma bomba de efluxo, reduzindo a concentração intracelular do fármaco e a sua expressão promove resistência a múltiplas drogas (PALLER; ANTONARAKIS, 2011).

3.3 Resistência a múltiplas drogas (MDR)

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um caso de resistência adquirida, observada em células tumorais, in vivo e in vitro, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos. Uma das características mais intrigantes da MDR é que os quimioterápicos envolvidos não têm analogia estrutural nem farmacológica como, por exemplo, a vimblastina, que é um alcaloide bisindólico, a doxorrubicina, que é uma antraciclina e o próprio paclitaxel e docetaxel, que são taxanos (DEWICK, 2009).

As células cancerígenas derivadas de tecidos que normalmente expressam P-gp (rins, intestino, fígado e pâncreas) têm elevado potencial para desenvolver intrinsecamente resistência a fármacos, mesmo antes das células serem expostas à quimioterapia. Por outro lado, em tecidos com baixos níveis de expressão da P-gp, as células cancerígenas vão apresentar os mesmos níveis de expressão até ao início da quimioterapia, momento a partir do qual ocorre o desenvolvimento de resistência aos fármacos administrados, devido ao aumento excessivo da expressão e/ou atividade da P-gp (SUN *et al.*, 2004).

Este fenômeno de resistência a múltiplas drogas pode estar relacionado a uma série de fatores que não são plenamente compreendidos. Os principais fatores envolvidos são o transporte da droga através da membrana plasmática, alteração nas enzimas-alvo, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e incapacidade para sofrer apoptose. Dentre estes, o primeiro é a principal forma de resistência e está relacionado com a presença de, no mínimo, três bombas que transportam ativamente o quimioterápico para fora da célula (bombas de efluxo) (SZAKACS *et al.*, 2006).

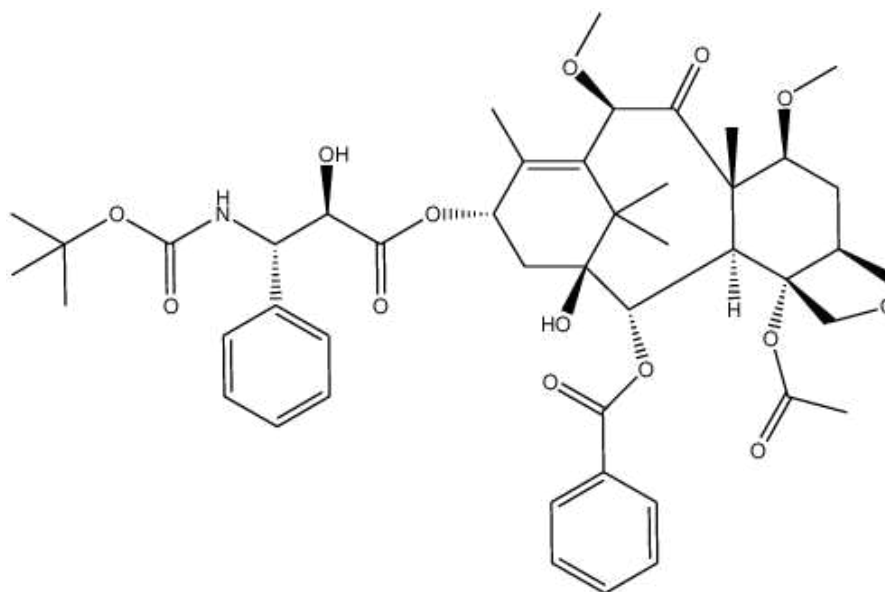
Muitos dos compostos utilizados na quimioterapia do câncer de próstata, docetaxel e paclitaxel, são substratos da P-gp. Assim, apesar dos tratamentos de quimioterapia, as células não vão responder positivamente, pois a P-gp vai impedir a acumulação intracelular dos compostos administrados, levando a que os tratamentos tenham uma eficácia abaixo da esperada (PRACHAYASITTIKUL; PRACHAYASITTIKUL, 2016).

3.4 Cabazitaxel

As opções terapêuticas nos doentes refratários ao docetaxel eram até recentemente limitadas até a aprovação do cabazitaxel (Jevtana®, Sanofi-Aventis, Paris, França), em 2010, pela Food and Drug Administration (FDA) em associação com a prednisona para tratamento de pacientes com câncer de próstata metastático resistente à castração que já foram previamente tratados com docetaxel. Esse fármaco (Figura 02) é obtido via semi-sintética do taxóide natural 10-desacetilbacatina III, da nova geração aprovado após o estudo TROPIC, que demonstrou, associado à prednisona, melhorar a sobrevivência global dos doentes relativamente a mitoxantrona e prednisona (YARED e TKACZUK, 2012).

Assim como outros taxanos, paclitaxel e docetaxel, o mecanismo de ação do cabazitaxel consiste em se ligar e estabilizar a tubulina, resultando na inibição da despolimerização e divisão celular dos microtúbulos, na interrupção do ciclo celular nas fases G2/M e na inibição da proliferação de células tumorais, porém não são específicos, o que acaba não garantindo a seletividade e direcionamento para o campo específico de ação (MAHIDA *et al.*, 2019).

Figura 2 - Estrutura química Cabazitaxel



Fonte: MUKTHINUTHALAPATI, 2013.

O cabazitaxel é empregado em alternativa ao docetaxel, visto que esse taxano semissintético é utilizado no tratamento do câncer de próstata e apresenta fraca interação pela glicoproteína P (P-gp). Este pode ser considerado o principal mecanismo de redução da ocorrência de efeitos de resistência a antimitóticos e exprime o melhor resultado em comparação ao docetaxel (MEIRELES *et al.*, 2015). Portanto, oferecendo mais vantagens clínicas e farmacocinéticas que o docetaxel. Essas vantagens incluem a fraca afinidade pela P-gp (contribui para a resistência constitutiva e adquirida de células cancerosas aos taxanos) e a presença de atividade em estudos *in vitro*, como também em modelos tumorais *in vivo* que expressam esta proteína, mostrando-se ativo contra tumores refratários e resistentes (YARED e TKACZUK, 2012).

O cabazitaxel em associação com prednisona foi aprovado num estudo realizado em doentes (previamente tratados com docetaxel) no tratamento do câncer de próstata hormônio refratário apresentando metástase (TROPIC, do inglês, Treatment of Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer Previously Treated with a Docetaxel-Containing Regimen), de fase III. Os resultados indicaram que os pacientes com câncer da próstata metastático hormônio refratário tratados com Jevtana® associado à prednisona tiveram um tempo médio de sobrevivência de 15,1 meses contra os 12,7 meses nos pacientes tratados com mitoxantrona e prednisona (YARED e TKACZUK, 2012).

No entanto, o cabazitaxel apresenta efeitos adversos em pacientes sob seu uso, dentre os principais, são: neutropenia, leucopenia e diarreia, seus efeitos podem ser contrariados com medicamentos. No mesmo estudo anterior o medicamento apresentou acentuado grau de toxicidade, causando neutropenia em 94% dos pacientes, sendo que, 8% apresentaram neutropenia febril, deixando-os susceptíveis a infecções. Além disso, 47% dos participantes do estudo apresentaram diarreia, 37% fadiga, 34% náusea e 14% neuropatia periférica, entre outros efeitos colaterais (NIGHTINGALE; RYU, 2012). Esses efeitos são decorrentes principalmente pela terapia não direcionada, uma desvantagem em muitos tratamentos de cânceres videntes.

Além de o fármaco apresentar os efeitos adversos já mencionados, 60 mg de cabazitaxel 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 lipofilicidade. Entretanto, o uso de grandes quantidades de estabilizantes como veículo é conhecido por causar toxicidade e reações de hipersensibilidade. (LAZZARINI *et al.*, 2015; ZHOUG *et al.*, 2016; COORS *et al.*, 2005).

3.5 Sistemas de liberação de fármaco: Lipossomas

A nanotecnologia é um campo relativamente novo da ciência e tecnologia cujo objetivo é o estudo de materiais em escalas nanométricas. Dentre os materiais nanoestruturados com aplicações na oncologia têm-se lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e outros (Figura 03), que servem como sistemas de liberação dos fármacos. Esses materiais destacam-se por suas aplicações biomédicas devido ao grande potencial que apresentam para aumento da eficácia terapêutica no tratamento de diversas doenças (ANGELI *et al.*, 2008; PRASAD *et al.*, 2016).

No presente estudo destacaremos os lipossomas, que são uma estrutura vesicular constituída por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas com forma esférica envolvendo espaços aquosos, sendo nanocarreadores biodegradáveis e biocompatíveis (TORCHILIN 2005; HUA e WU 2013; TRAN *et al.*, 2017). Os lipossomas apresentam capacidade de encapsular tanto substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas, conferindo-lhes estabilidade no meio (TORCHILIN 2005; TRAN *et al.*, 2017).

Figura 3 - Principais nanocarreadores dispostos em ordem cronológica de descoberta.



Fonte: APOLINÁRIO et al., 2020.

Essas estruturas foram inicialmente descritas por Bangham e colaboradores em 1965 para encapsular aminoglicosidade e ^{131}I -albumina (BANGHAM; STANDISH; WAFKINS, 1965). Os lipossomas são formulações nanoestruturadas desenvolvidas em busca da melhora da farmacocinética e para a liberação sustentada de fármacos. Com isso, busca-se melhorar a eficácia, reduzir a dose necessária para o efeito terapêutico e reduzir os efeitos colaterais particulares dos tratamentos antineoplásicos atuais. Além disso, os nanocarreadores permitem a funcionalização, que envolve a modificação de superfície com diferentes ligantes, por meio de ligações covalentes e não-covalentes com anticorpos, por exemplo, permitindo a capacidade de ligação seletiva do fármaco a célula alvo, aumentando a captação e viabilidade do tratamento e terapia alvo específica (ELOY *et al.*, 2014).

A penetração dessas vesículas no ambiente tumoral e o sucesso da entrega seletiva do fármaco é possível graças ao efeito EPR (do inglês enhanced permeability and retention effect). O efeito EPR foi proposto pela primeira vez por Matsumura e Maeda em 1986 como um novo conceito para entrega de fármacos a tumores (MATSUMURA; MAEDA, 1986). Os vasos sanguíneos nos tumores são diferentes comparados aos vasos sanguíneos normais devido à arquitetura anormal e descontínua. Isso ocorre pois a angiogênese acelerada no ambiente tumoral produz espaçamentos entre as células, gerando grandes poros na vasculatura do tumor (FIGUEIREDO, 2019). Como consequência, as nanopartículas podem acumular-se passivamente no sítio tumoral e assim liberar o fármaco no local.

O endotélio vascular normal é composto por fenestrações de tamanho entre 5 e 10 nm. Enquanto que, nos tumores sólidos os neovasos têm fenestrações bem maiores que variam de 100 a 780 nm (SHUBIK, 1982; HOBBS *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Portanto, a distribuição de fármacos induzidas pelo efeito EPR não ocorre em tecidos saudáveis. Desta forma,

em comparação com fármacos anticâncer convencionais, nanopartículas acabam apresentando perfil farmacocinético superior por exibir maior seletividade tumoral, de modo que produzem efeitos antitumorais melhorados sem ou com menos reações adversas. Esse fenômeno único em tumores sólidos é, portanto, considerado um marco na quimioterapia para direcionamento tumoral e tornou-se uma tecnologia muito atrativa no desenvolvimento de fármacos anticâncer (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; MAEDA, 2001a, 2001b; MAEDA; GREISH; FANG, 2006; MATSUMURA; MAEDA, 1986, 1986).

Os carreadores nanoestruturados de fármacos podem atingir o tecido tumoral por meio de mecanismo de direcionamento ativo ou passivo. O direcionamento ativo é a estratégia utilizada quando se faz uso de anticorpos, peptídeos, aptâmeros de RNA e outros para ligação específica em receptores super-expressos no microambiente tumoral. O mecanismo para direcionamento passivo é um dos princípios farmacocinéticos mais importantes para o planejamento de medicamentos macromoleculares e nanoestruturados é baseado no efeito de permeabilidade e retenção aumentada (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; MAEDA, 2001a, 2001b; MAEDA; GREISH; FANG, 2006).

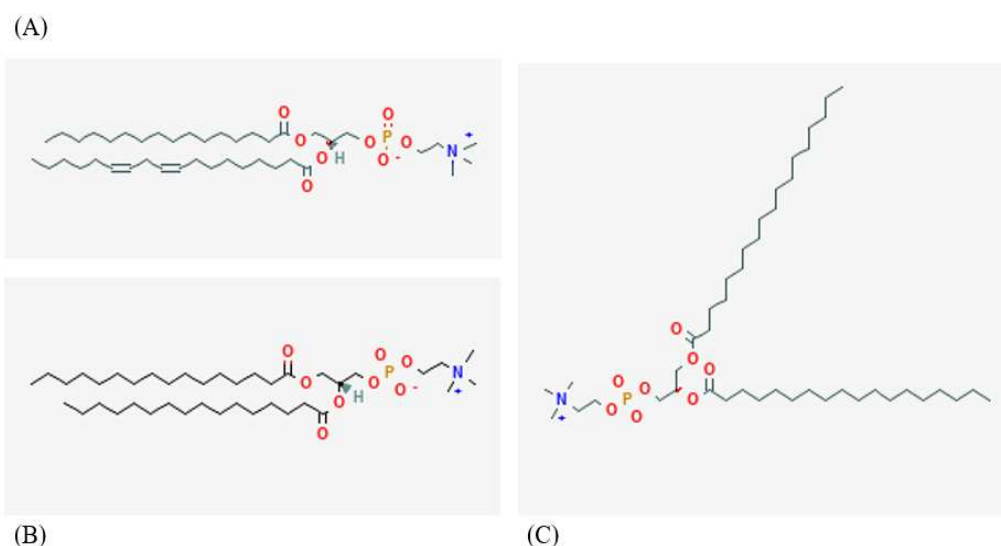
Os lipossomas apresentam uma estrutura semelhante às membranas celulares, o que permite muitas vantagens: boa compatibilidade, baixa imunogenicidade, redução dos efeitos colaterais, aumenta o tempo da formulação no sangue, redução da dose de administração, fácil administração, melhorar solubilidade, capacidade de transportar grandes quantidades de fármacos e protegê-las da degradação, além de encapsular substâncias de caráter tanto lipofílicas quanto hidrofílicas e principalmente, reduzir a toxicidade dessas substâncias juntamente com a capacidade de direcionamento específico do local, melhorando a penetração nos tecidos (VAHED *et al.*, 2017).

Os efeitos colaterais são os principais problemas relacionados aos fármacos antineoplásicos empregados no tratamento de câncer de próstata convencional, como docetaxel e cabazitaxel. Sendo assim, os lipossomas são uma alternativa de evitar os efeitos tóxicos relacionados com os solventes das formulações convencionais, Tween 80, a ultrapassar a resistência atribuída à expressão da P-gp e aumentar eficácia em relação aos taxanos convencionais (HENNENFENT; GOVINDAN, 2006). A entrega de drogas à base de nanopartículas para tumores sólidos é uma abordagem promissora para superar a falta de especificidade de tecido da quimioterapia convencional contra o câncer (ZHU L.; TORCHILIN VP, 2013).

Os lipídeos utilizados nas formulações de lipossomas comumente apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidilglicerol e esfingomielina, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio e elas foram as selecionadas para as formulações neste estudo (KEPCZYNSKI *et al.*, 2008).

Os fosfolipídios do grupo das fosfatidilcolinas diferenciam apenas em suas cadeias hidrofóbicas de ácido graxo (Figura 04), sendo o SPC, fosfatidilcolina da soja, a mais simples, enquanto a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) apresenta uma estrutura mais complexa e longa que a SPC devido às cadeias de ácidos graxos, porém a diesteroilfosfatidilcolina (DSPC) apresenta a cadeia ainda maior que a DPPC (ANDERSON e OMRI A., 2004).

Figura 4 - Estrutura dos lipídeos (A) SPC (B) DPPC (C) DSPC.



Fonte: PubChem, 2021.

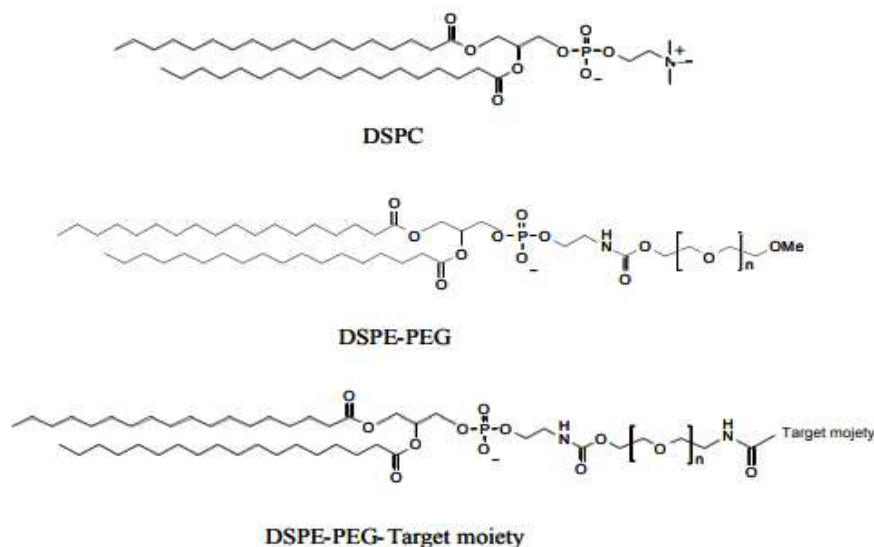
Os fosfolipídeos são caracterizados por uma temperatura de transição de fase (T_c), na qual a membrana passa de uma fase gel, onde a cadeia hidrocarbonada do lipídeo está em estado ordenado, para uma fase de cristal-líquido, onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e os radicais hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados. O comprimento e a saturação da cadeia lipídica influenciam o valor da T_c . Portanto, diferentes membranas compostas por lipídeos distintos podem exibir diferentes níveis de fluidez na mesma temperatura, com importantes consequências para o lipossoma, influenciando seu tamanho e capacidade de encapsulação (ELOY *et al.*, 2014).

Uma vez que os lipossomas convencionais são reconhecidos pelos sistemas imunológicos do hospedeiro, como o sistema de fagócitos mononucleares (MPS) e rapidamente eliminados pelo sistema reticuloendotelial (RES), as propriedades furtivas são necessárias para proteger os lipossomas da degradação no fígado e baço para otimizar a farmacocinética de drogas encapsuladas (PERCHE F.; TORCHILIN V. P., 2013).

Os lipídeos são responsáveis pela constituição dos lipossomas, no entanto, também podem constituir sua superfície, os polímeros inertes e hidrofílicos, que aumentam a sua biocompatibilidade e seletividade (LILA e ISHIDA, 2017). Um exemplo destes é o polietilenoglicol (PEG), que confere estabilidade à superfície do lipossoma ao formar uma camada protetora, além de realizar o mascaramento da fagocitose por macrófagos, os lipossomas muitas vezes são rapidamente eliminados pelo sistema retículo endotelial. Esta diminui a sua opsonização, reconhecimento e consequente fagocitose pelo sistema mononuclear fagocitário, essa alternativa permite aumento do tempo do lipossoma na circulação (ALLEN *et al.*, 2002; MARKMAN *et al.*, 2013; LILA e ISHIDA, 2017).

O PEG é utilizado como estabilizador estérico polimérico, um poliéter biocompatível, solúvel em meio aquoso e orgânico, atóxico e tem baixa imunogenicidade, podendo ser incorporado nos lipossomas, no entanto, o distearoilfosfatidiletanolamina pegulado (DSPE-PEG) é o mais amplamente empregado nas formulações lipossômicas (Figura 05). O conceito básico é que um polímero hidrofílico ou um glicolípídeo, como PEG ou GM1, possui uma cadeia flexível que ocupa o espaço imediatamente adjacente à superfície do lipossoma, que tende a excluir outras macromoléculas desse espaço. Consequentemente, a ligação do plasma sanguíneo na superfície da vesícula é prejudicada visto que a peguilação dificulta o reconhecimento das vesículas pelo sistema mononuclear fagocitário, permitindo que os lipossomas permaneçam na circulação por mais tempo e acumulem-se passivamente dentro de tecidos e órgãos (GABIZON *et al.*, 1994; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2016).

Figura 5 - Estrutura química do DSPC e DSPE-PEG



Fonte: IMMORDINO; DOSIO; LUIGUI, 2006.

Lipossomas já foram previamente relatados para a encapsulação de cabazitaxel. O sistema foi composto por fosfolípideo de ovo (E80), colesterol e DSPE-PEG (2000). A formulação que apresentou o melhor tamanho de partícula, em torno de 100nm, e eficiência de encapsulação em torno de 80% foi obtida com a razão de E80: colesterol de 8:1, e razão lipídeo:fármaco de 20:1, com índice de polidispersão ao redor de 0,25. Todavia, outros tipos de lipídeos não foram testados e não foi aplicado a ferramenta de planejamento fatorial para o desenvolvimento do lipossoma, o que é alvo do presente trabalho (YIN; LIHUA; WEI *et al.*, 2018).

A eficácia dos lipossomas depende de alguns fatores como: o pH e a temperatura do meio, a sua composição lipídica e suas características físico-químicas como, tamanho de partícula, eficácia de encapsulação e a carga elétrica (ROY *et al.*, 2016; TORCHILIN, 2005). Mas são uma grande forma de melhorar a eficácia terapêutica dos quimioterápicos, reduzir a dose necessária e diminuir os efeitos colaterais particulares dos tratamentos atuais.

De acordo com estudos anteriores de LI *et al.* (2013), formulações que apresentam tamanho de partícula com diâmetro entre 100 e 200nm apresentam um aumento 4 vezes maior da taxa de captação do tumor em comparação com os lipossomas de tamanho superior a 300nm ou inferior a 50nm, enquanto partículas com diâmetro entre 50-100nm favorecem a penetração em fenestrações vasculares hepáticas e aquelas que apresentam maior que 400nm atravessam os seios esplênicos. O Índice de polidispersividade (PDI) reflete ao perfil de distribuição de

populações das partículas, onde valores de PDI menores indicam maior homogeneidade da distribuição de tamanho de partícula. Outro aspecto da caracterização físico-química importante corresponde ao potencial zeta que está atrelado a estabilidade da formulação, visto que a presença de cargas causa repulsão eletrostática, portanto, impede a agregação das vesículas. Segundo estudos de LI *et al.* (2013), células fagocíticas favorecem a captação de partículas carregadas negativamente, enquanto, partículas carregadas positivamente formam agregados na presença de proteínas do soro carregadas negativamente.

3.6 Planejamento fatorial na seleção de uma formulação

O Método da Superfície de Resposta (MSR) é uma abordagem estatística que gera relações matemáticas polinomiais e é comumente aplicada em pesquisas extensas que envolvem muitos testes, com o objetivo de obter o melhor resultado, considerando as diversas variáveis que poderão afetar, acelerando o desenvolvimento por permitir a redução do número de experimentos necessários para que seja alcançado determinado objetivo (PEREIRA *et al.*, 2019; SANTHYAMOORTHY *et al.*, 2017). Dentre os modelos existentes que pertencem ao MSR, o Box-Behnken Design (BBD) é um dos mais eficientes para análise multifatorial, e pode ser aplicado no desenvolvimento de formulações farmacêuticas (PEREIRA *et al.*, 2019; SARKAR; BHATTACHARYA; PAL, 2019).

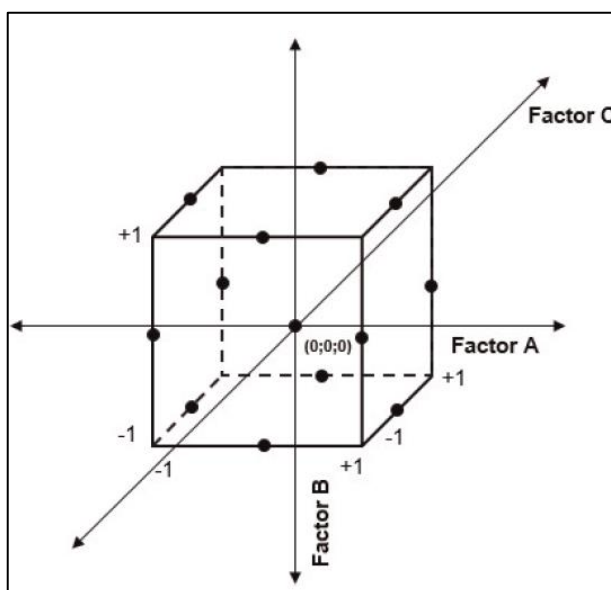
A metodologia de superfície de resposta demonstrou ser uma ferramenta estatística eficaz por estabelecer uma relação entre os parâmetros de cada formulação e os efeitos ou respostas sobre esta, proporcionando melhor compreensão das condições ideais. Dentro dessa metodologia, o Box-Behnken (Figura 06) é aplicado para obter essa otimização, pois, possui como vantagens: detectar falta de ajuste do modelo, estimar fatores do modelo quadrático e evitar combinações extremas, ou seja, com pontos no ponto médio ou centro do processo (SOEMA *et al.*, 2015; SOLANKI; PARIKH; PARIKH, 2007; DAS; MISHRA, 2017).

Ao realizar um procedimento experimental, podemos alterar uma ou mais variáveis (ou fatores) e observar os efeitos das alterações em uma ou mais variáveis de resposta. O delineamento estatístico de experimentos (DOE, do inglês *design of experiments*) é processo estatístico eficiente para produção de conclusões válidas e objetivas. Essa ferramenta matemática define a importância de procedimentos específicos e/ou variáveis de produto e como controlá-los para uma melhora do desempenho do sistema, enquanto maximiza as

propriedades. O DOE utiliza uma metodologia estatística com finalidade de análise de dados e informações fundamentais para prever produtos baseados nos desempenhos das propriedades sob todas as condições possíveis dentro dos limites selecionados para delinear o experimento ideal, além de identificar os fatores interferentes nos experimentos (SOLANKI; PARIKH; PARIKH, 2007).

Além do entendimento de como determinada variável afeta as variáveis de resposta do produto, analisa também as interações entre diferentes variáveis de processo e produto, permitindo gerar informações necessárias como a quantidade mínima de experimentação necessária usando os dados de limites experimentais, condições experimentais específicas é possível gerar uma análise matemática para prever a resposta em qualquer ponto dentro dos limites experimentais. O delineamento experimental é mais utilizado quando o objetivo do estudo é determinar quais são as variáveis ou fatores e interações mais importantes para contribuir para a resposta que está sendo avaliada (WAGNER; MOUNT; GILES, 2014).

Figura 6 - Representação de um modelo Box-Behnken por três fatores.



Fonte: PEIXOTO *et al.*, 2018.

Aplicando ao planejamento de experimentos de encapsulação de fármacos por nanossistemas pode ser realizado em três níveis e três variáveis empregados para otimizar estatisticamente as variáveis de formulação a fim de obter altos percentuais de encapsulação, tamanho pequeno de partícula e baixa polidispersividade. Essa análise é gerada por softwares estatísticos, como Expert®, Minitab® em que o número de experimentos necessários é definido pela equação (1):

$$N = 2k(k-1) + C_0 \quad (1)$$

Onde k representa o número de fatores e C_0 é o número de pontos centrais. Uma equação modelo de regressão polinomial de segunda ordem usada para expressar a resposta prevista (Y) em função de variáveis independentes que são expressas pela equação (2):

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (2)$$

Quinze experimentos são necessários, dos quais doze representam o ponto médio de cada aresta do cubo multidimensional e os três restantes são as réplicas do ponto central do cubo. As variáveis independentes apresentam níveis baixo, médio e alto que são codificados por normalmente por -1, 0 e 1, enquanto as três variáveis são representadas por X_1 , X_2 e X_3 (ABDELBARY *et al.*, 2015; WAGNER; MOUNT; GILES, 2014).

Esta estratégia tem sido estudada para taxanos. Rane e Prabhakar (2013) desenvolveram lipossomas pH-sensíveis contendo paclitaxel, utilizando como ferramenta o design experimental Box-Behnken com 3 variáveis independentes para 3 níveis diferentes. No estudo em questão, as variáveis independentes avaliadas foram a razão molar fosfatidilcolina:DOPE, concentração molar de hemissuccinato de colesterol (CHEMS) e a quantidade de fármaco para atingir as seguintes respostas: melhores resultados para eficiência de encapsulação, sensibilidade ao pH (alto teor de liberação no meio) e tamanho de partícula. A análise estatística determinou as proporções ideais das variáveis independentes e após o experimento com a formulação escolhida pelo software, na qual obtiveram-se os seguintes resultados: eficiência de encapsulação de 94,37%, liberação de 89,6% do ativo e tamanho de partícula de 3,24 μm , em concordância com os valores teóricos estimados após análise estatística. Em resumo, o presente trabalho almeja a nanoencapsulação de cabazitaxel em lipossomas empregando planejamento fatorial para otimização da composição, um estudo inovador. (RANE; PRAHAKAR, 2013).

4 METODOLOGIA

4.1 Planejamento fatorial na seleção de uma formulação

O método de design experimental foi utilizado através do Software Minitab®. O planejamento de experimentos de encapsulação de fármacos por nanossistemas foi realizado em três níveis e três variáveis independentes: tipo de lipídio (X1), razão fármaco: lipídeo (X2) e percentual molar de colesterol (X3). Estas variáveis, representadas pelos códigos X1, X2 e X3, foram estudadas em três níveis, -1, 0 e +1 (Tabela 02). Esse modelo gera combinações estatisticamente funcionais para reduzir a quantidade de experimentos e permite um processo de otimização menos trabalhoso e demorado para a pesquisa (OLAWALE *et al.*, 2020). Os tipos de lipídeos testados foram Fosfatidilcolina da soja (SPC), Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e Diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), as proporções de fármaco/lipídeo (1:10; 1:20; 1:30) e as concentração de colesterol (10, 20 ou 30%).

Tabela 2 - Esquema das variáveis independentes (-1,0,1).

Variáveis independentes			
	X1	X2	X3
Níveis	Tipo de lipídio	Razão fármaco:lipídio	% molar colesterol
-1	SPC	Cabazitaxel 1:30	10%
0	DSPC	Cabazitaxel 1:20	20%
1	DPPC	Cabazitaxel 1:10	30%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram definidas também as variáveis fixas, como a quantidade do lipídio 20mg e a quantidade de DSPE-PEG-2000, de 5% em relação aos lipídios e as condições de sonicação (Tabela 03). Portanto, a distribuição dessas variáveis resultou em 15 ensaios (Tabela 04), de tal forma que os três últimos representam uma triplicata das condições centrais do estudo, uma condição padrão em estudo do tipo box-benken empregados para otimizar estatisticamente as variáveis de formulação. A partir de combinações das variáveis independentes buscou-se nesse estudo obter altos percentuais de encapsulação, tamanho pequeno de partícula e baixa polidispersividade.

Tabela 3 - Variáveis fixas empregadas nos ensaios.

Variáveis fixas		
DSPE-PEG 5% molar	Quantidade lipídio: 20mg	Condições de sonicação
5%	0,02g	Sonicação em 10mL de tampão, com amplitude contínua de 20%, por 5 min.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Portanto, foram necessários quinze experimentos, dos quais doze representam o ponto médio de cada aresta do cubo multidimensional e os três restantes são as réplicas do ponto central do cubo. As variáveis independentes apresentam níveis baixo, médio e alto que são codificados por -1, 0 e 1, enquanto as três variáveis são representadas por X1, X2 e X3 (ABDELBARY *et al.*, 2015; WAGNER; MOUNT; GILES, 2014).

Tabela 4 - Planejamento fatorial com todas as combinações de variáveis em seus níveis.

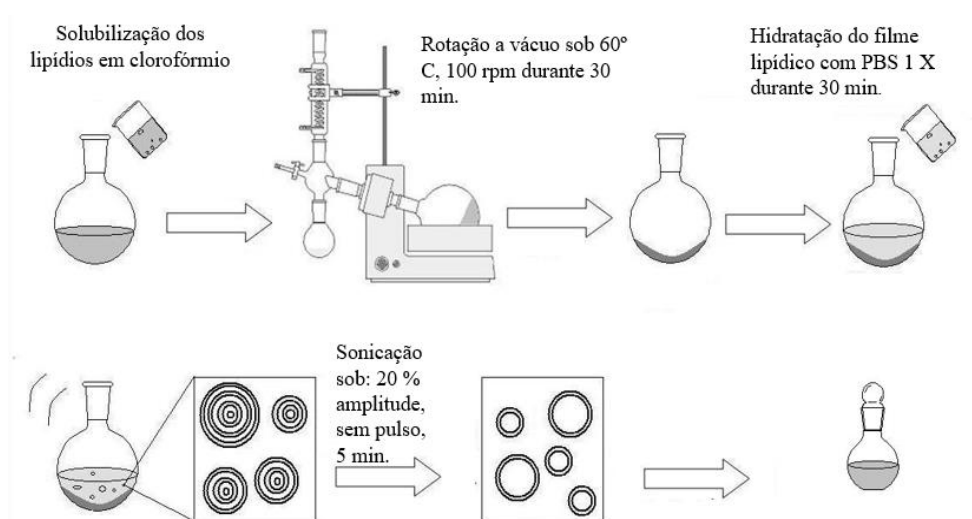
Ensaio	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Preparo de lipossomas

O preparo de lipossomas seguiu o método de hidratação do filme lipídico descrito por Eloy *et al.* (2016) ilustrado na Figura 07. Em resumo, os lipídios e o fármaco foram dissolvidos em 2mL de clorofórmio, em seguida este solvente orgânico foi evaporado por pressão reduzida em rotaevaporador IKA – Modelo RV8, sob as seguintes condições: 100 rpm, 60°C durante 30 minutos. Posteriormente a formulação foi submetida a hidratação com 10 mL de tampão fosfato pH 7,4, e colocada novamente em rotaevaporador com rotação de 100 rpm, e sob temperatura de 60°C durante 30 minutos. Em seguida a formulação foi submetida à sonicação em ultrassom de ponta (Sonicador Qsonica – Modelo: Q500) para redução dos tamanhos das partículas, sob condições: 20% de amplitude, sem pulso, durante 5 minutos.

Figura 7 - Preparo de Lipossomas



Fonte: Adaptado de Eloy, *et. al.* 2016.

4.3 Caracterização físico-química dos lipossomas

4.3.1 Análise de tamanho de partícula e índice de polidispersividade

O tamanho de partícula das formulações e índice de polidispersividade foram determinadas por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz sob temperatura controlada de 25°C (DLS, *dynamic light scattering*). Para tanto, foi empregado um feixe de

laser de HeNe operando a 4mW e comprimento de onda de 633 nm que incide como uma fonte de luz para iluminar as partículas. Na técnica de análise por DLS, as partículas dispersas em um fluido têm suas posições relativas, pois mudam o tempo todo em solução devido ao movimento browniano e quando uma partícula é iluminada por uma fonte de luz, como um feixe de laser, ela irá espalhar luz em todas as direções devido a esse movimento. Portanto, essa análise fornece informações sobre o movimento das partículas, movimento este que é a causa das flutuações da intensidade (NOMOURA *et al.*, 2013). A intensidade da luz espalhada pelas partículas depende do tamanho das mesmas e, portanto, as maiores se dispersam intensamente em menores ângulos e partículas menores se espalham com menor intensidade em ângulos mais amplos (BHATTACHARJEE, 2016). O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise. As formulações foram diluídas em água ultrapura (1:10) e colocadas em cubetas próprias do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

4.3.2 Determinação do potencial zeta

Para determinação das cargas residuais superficiais, utilizamos o equipamento Zetasizer Nano, com cubetas apropriadas com eletrodos. Foi avaliado a mobilidade eletroforética das partículas submetidas a um campo elétrico, onde, as partículas com carga irão migrar para o eletrodo de carga oposta, com uma velocidade proporcional à magnitude da sua carga. A carga superficial da partícula afeta a distribuição de íons próximos, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície. A amostra utilizada para esta análise foi a mesma empregada na determinação do tamanho de partícula.

4.3.3 Determinação da eficiência de encapsulação

Para determinação da eficiência de encapsulação do cabazitaxel primeiramente foi preparada uma curva analítica para quantificação do fármaco em lipossomas por espectrofotometria, para posterior aplicação e quantificação do método de espectrofotometria-UV. Para tanto, preparam-se uma solução mãe e curvas de calibração do fármaco em triplicata. A curva foi preparada a partir de uma solução estoque de cabazitaxel 1mg/mL onde pesou-se 1 mg de fármaco e completou com 10 mL de acetonitrila em um balão volumétrico de 10 mL,

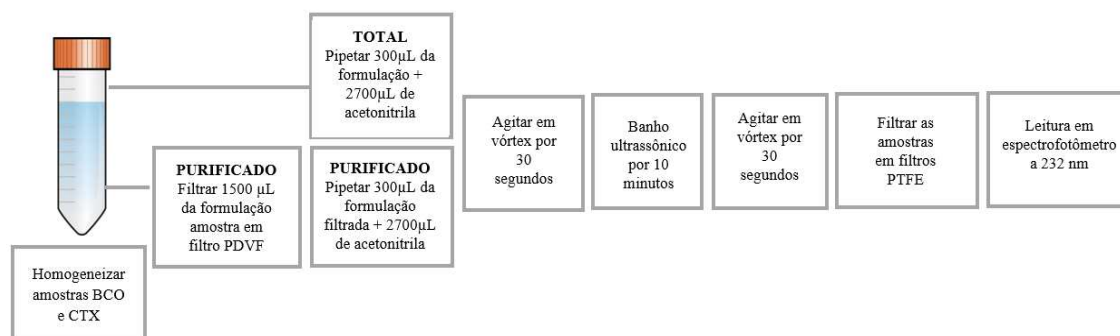
que posteriormente foi filtrada em PTFE 0,45 µm. Em seguida, foram preparadas triplicatas de soluções a partir da solução estoque de cabazitaxel nas respectivas concentrações: 0,5µg/mL, 1,0µg/mL, 2,0µg/mL, 5,0µg/mL, 10µg/mL, 15µg/mL e 30 µg/mL. Após a esse processo as amostras foram analisadas por espectrofotômetro UV em comprimento de onda de 230 nm. Os resultados obtidos foram plotados em software Excel® gerando um gráfico de dispersão, linearidade da curva (R^2) e equação da reta. Esses dados foram utilizados posteriormente para correlacionar com a absorbâncias com as respectivas concentrações.

Para análise da eficiência de encapsulação, utilizou-se protocolo para obtenção de amostras totais contendo o fármaco encapsulado e não encapsulado e a amostra purificada por filtração (0,45 µm), para remoção do fármaco livre, precipitado. As formulações branco e contendo cabazitaxel foram inicialmente homogeneizadas em vórtex, em seguida, para amostras ditas totais, 300µL da formulação foram transferidos para falcons em triplicata e completado o volume para 2700µL de acetonitrila, em seguida as duas triplicatas foram submetidas a agitação em vórtex por 30 segundos, por seguinte as amostras permaneceram sob banho ultrassônico por 10 minutos, em seguida as mesmas foram novamente agitadas com auxílio do vórtex por 30 segundos, filtradas em filtros PTFE e realizadas as respectivas leituras em espectrofotômetro a 230nm. Para as amostras purificadas, as formulações branco e com CTX foram inicialmente homogeneizadas em vórtex, em seguida, 1500 µL de cada uma das formulações foram filtrados em filtro PVDF 0,45 µm, em seguida 300 uL foram diluídos com 2700 µL de acetonitrila, em seguida as amostras purificadas passaram pelo mesmo processo final que as amostras totais (Figura 08). Por fim, a leitura de ambas amostras foram coletadas e seus resultados foram plotados na equação obtida da curva de calibração.

A eficiência de encapsulação foi calculada pela porcentagem da concentração de CTX no lipossoma purificado em relação ao total, conforme a equação (3):

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{Concentração de cabazitaxel purificado}}{\text{Concentração de cabazitaxel total}} \times 100 \quad (3)$$

Figura 8 - Procedimento de análise de eficiência de encapsulação



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.3.4 Liofilização

A liofilização é um processo de remoção de água, amplamente usado para aumentar a estabilidade de vários produtos farmacêuticos, como vacinas e carreadores coloidais (lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões) (VEMURI; RHODES, 1995). O processo consiste de duas etapas: solidificação e sublimação. Na primeira etapa a formulação líquida é congelada juntamente com um excipiente especial chamado de crioprotetor, comumente açúcares: trealose, sacarose, glicose e manitol, formando uma suspensão líquida e que quando congelados formam cristais de gelo da água (ABDELWAHED *et al.*, 2006). Na segunda etapa, ocorre a sublimação do gelo no produto congelado e gera um produto poroso, cujos espaços correspondem aos cristais de gelo que foram liofilizados.

A liofilização é uma etapa importante para realização de análises como espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), que devem ocorrer com amostra em estado sólido. Para isso, foi selecionado a sacarose como crioprotetor, ou seja, substância que protege a estrutura lipossomal de possíveis danos provenientes do congelamento da amostra (ELOY *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019). Logo, foram testadas as respectivas proporções de lipídeo/sacarose (1:2,5; 1:5; 1:10) e selecionada aquela que garantir após o processo de liofilização menores modificações nas características das nanopartículas.

Após adição da sacarose, as alíquotas foram congeladas a -80°C por um período de duas horas e posteriormente foram inseridas em um liofilizador FreeZone 4.5 Liter que manteve

temperatura das amostras a -40°C e em condições de pressão entre 0,45 e 0,12 mBar, durante 48 horas. Depois de terminado o processo de liofilização, o material obtido foi ressuspense em água ultrapurificada para avaliação das características físico-químicas no aparelho Zetasizer nano.

4.3.5 Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de lipossomas previamente liofilizados com sacarose foram misturadas com brometo de potássio (KBr) e comprimidos em prensa hidráulica. A varredura foi obtida em resolução de 2 cm^{-1} , de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , em equipamento Shimadzu modelo IRTracer-100.

4.3.6 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As formulações previamente liofilizadas com sacarose foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidas de 15°C a 250°C em razão de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob pressão de nitrogênio de $3\text{ kgf}/\text{cm}^2$. A calibração foi realizada utilizando índio e n-octadecano como materiais de referência. As curvas de DSC foram obtidas em atmosfera de nitrogênio (N_2) em equipamento DSC-50 Shimadzu.

4.3.7 Microscopia de força atômica (MFA)

As amostras foram diluídas em uma proporção de 1:10, em água deionizada e deixadas em banho ultrassônico por 15 minutos. Posteriormente foi retirada uma alíquota de $10\text{ }\mu\text{L}$ de cada amostra é depositada em uma superfície de mica, em seguida foi deixada por 15 minutos em uma estufa a uma temperatura de 36°C , para a secagem e realização da análise. O equipamento utilizado para a análise foi o TT-AFM (AFM Workshop - EUA) no modo contato intermitente, utilizando as pontas de Silício da TED PELLA (TAP300-G10) em uma frequência de amplitude de aproximadamente 237 kHz . O programa Gwyddion 2.45, foi utilizado para tratar as imagens e obter o tamanho (nanômetros) das nanopartículas. A análise estatística dos

resultados obtidos foi realizada com o uso do programa GraphPad Prism 6, bem como obter histogramas de tamanho das nanopartículas.

4.4 Ensaio de liberação in vitro de lipossomas contendo cabazitaxel por método analítico com quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência

4.4.1 Condições analíticas

O método analítico para quantificação cabazitaxel (CTX) foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dessa forma, foi realizada uma adaptação do método descrito por Yin *et al.* (2019), no qual utilizou-se acetonitrila:água (65:35, v:v) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min e coluna SunFire® C18 3,5 μ m, nas dimensões de 150 x 4,6 mm. O comprimento de onda utilizado foi de 230 nm, volume de injeção de 20 μ L, temperatura do forno ajustada para 37 °C \pm 1°C e tempo de corrida de 10 min. Para demonstrar adequabilidade do método nas condições laboratoriais deste estudo, avaliou-se os seguintes parâmetros: linearidade e efeito matriz na curva de linearidade (BRASIL, 2017). O equipamento utilizado para análises foi o Hitachi LabChrom Ultra HPLC.

4.4.1.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de curvas analíticas, determinada pela análise de nove níveis de concentração (0,25; 0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 30 μ g/mL). Para tanto, foi preparada uma solução estoque CTX SQR (1000 μ g/mL), em um balão volumétrico de 10 mL. Para total solubilização do fármaco, a solução foi colocada em banho ultrassônico por 10 minutos com posterior filtração em membrana filtrante de 0,45 μ m (PTFE). A partir da solução estoque, foram preparadas 3 curvas analíticas, nas 9 concentrações já citadas anteriormente, utilizando-se acetonitrila como diluente.

4.4.1.2 Avaliação do efeito matriz na curva de linearidade

Foram preparados nove níveis de concentração (0,25; 0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 30 µg/mL). preparadas a partir de uma solução estoque cabazitaxel SQR (1000 µg/mL). Essas soluções foram contaminadas com solução de lauril sulfato de sódio 1% (p/v), tensoativo empregado nos estudos de liberação.

4.4.2 Estudo de solubilidade do cabazitaxel

A solubilidade do cabazitaxel foi avaliada utilizando o tampão fosfato pH 7.4 com 1 % de lauril sulfato de sódio. Para realização do teste, 3 alíquotas de 5 mL de tampão fosfato pH 7.4 com 1 % de lauril sulfato de sódio foram separadas e armazenadas em frascos de vidro com tampa, cerca de 5 mg do fármaco foram quantitativamente pesados, transferidos para os frasco de vidro e homogeneizados durante 24 horas em placa de agitação de multipontos. Após as 24 horas as amostras foram centrifugadas em falcons (3000 rpm por 15 minutos). Por fim, o sobrenadante foi recuperado, filtrado em PVDF 0,45 micras e diluídos na proporção 1:10 com acetonitrila e quantificada por HPLC.

4.4.3. Estudo de liberação in vitro dos lipossomas contendo cabazitaxel

A liberação de cabazitaxel das vesículas lipídicas foi investigada por método de diálise, através da adaptação da técnica descrita por Fernandes *et al.* (2020), com a finalidade de avaliação das formulações de SPC: Col: DSPE-PEG:DTX, constituição muito semelhantes a do presente estudo. Foi preparado uma solução concentrada (20 mg/0,5 mL) com 0,5 mL de polissorbato 80 como excipiente e uma preparação com diluente contendo 1,5 mL de volume, conforme constituição de solução comercial (TAXOTERE®, 2015). Para preparo do diluente foram utilizados 13% (p/p) de etanol a 95% v/v em água ultrapura (932 mg de etanol 95% v/v). A solução diluente foi vertida na solução concentrada para obtenção de um solução de cabazitaxel 20 mg/mL, conforme a preparação do Taxotere (Solução comercial de docetaxel) (TAXOTERE®, 2015). A solução de cabazitaxel e lipossomas liofilizados contendo cabazitaxel, foram dispersas em 2 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 1% de lauril sulfato de sódio e colocados dentro de tubos de PVC envolvidos com membranas de diálise de acetato celulose (12 a 14 kDa), sendo este denominado como compartimento doador, que foi conectado

aos eixos de dissolução do aparelho dissolutor Erweka DT 80. O compartimento doador foi composto por 50 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 1% de lauril sulfato de sódio. Assim, durante o ensaio, o compartimento doador foi colocado em contato com o líquido do compartimento receptor e as hastes do dissolutor permaneceram sob agitação de 150 rpm. Foram realizadas coletas de 1 mL do compartimento receptor em intervalos de tempo predefinidos (1, 2, 4, 6, 8, 24, 32, 48 e 72 horas). As amostras coletadas foram filtradas em filtro PVDF, posteriormente foram diluídas em acetonitrila e filtradas em filtro PTFE. Após diluição das soluções, o fármaco foi quantificado usando o método analítico previamente descrito. Posteriormente, os dados obtidos foram aplicados a ferramenta DDSolver para análise estatística, matemática e de ordem cinética de liberação através dos modelos: ordem zero, primeira ordem, Peppas, Higuchi e Weibull.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e caracterização físico-químicas dos lipossomas

O estudo sobre a influência de variáveis independentes pode ser bastante complexo. Para isso podem ser utilizados diferentes de métodos planejamento fatorial. O planejamento fatorial de Box-Behnken é uma ferramenta pertencente *Design of Experiments* (DOE) analisando três fatores e três variáveis diferentes tem a vantagem de requerer apenas 15 ensaios (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019; SOLANKI; PARIKH; PARIKH, 2007). Com intuito de estudar as variáveis independentes preparadas por planejamento fatorial por Box-Behnken: tipo de lipídio (X1), razão fármaco lipídeo (X2) e percentual de colesterol (X3) com as respostas nas variáveis dependentes: eficiência de encapsulação (Y1), tamanho de partícula (Y2) e índice de polidispersão (Y3), as formulações preparadas seguem sumarizadas com os respectivos resultados na Tabela 05.

Tabela 5 - Relação entre fatores independentes X1, X2 e X3 com seus valores reais e respectivas respostas dependentes Y1, Y2 e Y3.

Nº	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3
Formulações	Tipo de lipídeo	Razão fármaco/lipídeo	% Colesterol	Eficiência de encapsulação (%)	Tamanho (nm)	PDI
1	SPC	1:30	20%	34,3	137,37	0,283
2	DPPC	1:30	20%	21,75	252,63	0,387
3	SPC	1:10	20%	27,81	83,62	0,238
4	DPPC	1:10	20%	9,75	351,27	0,539
5	SPC	1:20	10%	93,78	136,70	0,335
6	DPPC	1:20	10%	26,63	245,60	0,580
7	SPC	1:20	30%	78,12	109,77	0,230
8	DPPC	1:20	30%	8,34	127,27	0,304
9	DSPC	1:30	10%	65,59	117,80	0,324
10	DSPC	1:10	10%	49,98	257,53	0,554
11	DSPC	1:30	30%	40,03	184,00	0,397

12		1:10	30%	18,99	255,20	0,380
DSPC						
13	DSPC	1:20	20%	8,2	308,70	0,407
14	DSPC	1:20	20%	7,78	387,70	0,520
15	DSPC	1:20	20%	11,17	188,70	0,452

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Os valores de eficiência de encapsulação variam de 8,2 a 93,78%, enquanto o tamanho de partícula variou de 83,62 a 387,70 nm, e PDI de 0,230 a 0,580. Portanto, observou-se que há uma elevada variação de parâmetros físico-químicos, dependendo de variáveis como tipo de lipídio, razão fármaco/lipídio e porcentagem molar de colesterol. Possivelmente essas variações mais significativas são atribuídas a uma interação complexa dos fatores independentes entre si (DAS; MISHRA, 2017).

Tabela 6 - Valores experimentais de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta com seus respectivos desvios padrão.

Ensaio	Tamanho \pm DP (nm)		PDI \pm DP		Potencial zeta \pm DP (mV)	
	BCO	CTX	BCO	CTX	BCO	CTX
1	101,93 \pm 0,75	137,37 \pm 2,01	0,192 \pm 0,011	0,283 \pm 0,024	-12,6 \pm 0,5	-13,2 \pm 0,2
2	120,23 \pm 1,12	252,63 \pm 2,14	0,263 \pm 0,027	0,387 \pm 0,069	-8,9 \pm 0,8	-10,4 \pm 0,8
3	98,92 \pm 1,49	83,62 \pm 0,99	0,184 \pm 0,009	0,238 \pm 0,008	-16,2 \pm 5,6	-22,6 \pm 0,2
4	231,77 \pm 4,57	351,27 \pm 4,66	0,535 \pm 0,033	0,539 \pm 0,066	-8,8 \pm 0,5	-9 \pm 0,5
5	201,57 \pm 9,57	136,7 \pm 2,21	0,631 \pm 0,118	0,335 \pm 0,006	-4,8 \pm 0,4	-10,9 \pm 0,4
6	165,03 \pm 1,29	245,6 \pm 11,69	0,312 \pm 0,021	0,58 \pm 0,056	-11,1 \pm 0,3	-11,1 \pm 0,5
7	112,67 \pm 0,64	109,77 \pm 0,93	0,251 \pm 0,005	0,23 \pm 0,007	-11,9 \pm 0,6	-11,1 \pm 1,0
8	119,83 \pm 2,18	127,27 \pm 0,93	0,282 \pm 0,03	0,304 \pm 0,026	-10,4 \pm 0,9	-9,5 \pm 0,9
9	208,2 \pm 2,06	117,8 \pm 1,64	0,427 \pm 0,014	0,324 \pm 0,043	-10,5 \pm 0,8	-9,52 \pm 0,4
10	144,3 \pm 3,25	257,53 \pm 86,19	0,497 \pm 0,018	0,554 \pm 0,153	-12 \pm 0,7	-10,5 \pm 0,3
11	167,93 \pm 0,81	184 \pm 4,1	0,316 \pm 0,01	0,397 \pm 0,019	-11,2 \pm 0,5	-9,6 \pm 0,9
12	167,97 \pm 1,62	255,2 \pm 4,7	0,299 \pm 0,006	0,38 \pm 0,159	-9,4 \pm 0,8	-8,1 \pm 0,0
13	189,3 \pm 1,47	308,67 \pm 8,33	0,328 \pm 0,033	0,407 \pm 0,078	-8,3 \pm 0,5	-5,9 \pm 0,4
14	158,1 \pm 2,62	387,7 \pm 30,63	0,472 \pm 0,022	0,52 \pm 0,08	-11,2 \pm 0,5	-6,1 \pm 0,5
15	157,37 \pm 0,76	188,7 \pm 1,83	0,265 \pm 0,021	0,452 \pm 0,043	-9,3 \pm 0,8	-7,8 \pm 0,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os tamanhos de partícula alcançados no estudo são adequados à aplicação pretendida. De acordo com estudos anteriores de LI *et al.*, 2013 formulações que apresentam tamanho de partícula com diâmetro entre 100 e 200 nm apresentam um aumento 4 vezes maior

da taxa de captação do tumor em comparação com os lipossomas de tamanho superior a 300 nm ou inferior a 50 nm, enquanto que partículas com diâmetro entre 50-100 nm favorecem a penetração em fenestrações vasculares hepáticas e aquelas que apresentam maior que 400 nm atravessam os seios esplênicos. Observa-se que pelos resultados obtidos de caracterização o diâmetro de grande parte das formulações manteve-se dentro do valor adequado para captação tumoral e é perceptível que há interferência do diâmetro quando há fármaco na formulação, muitas das vezes excedendo a dimensão desejada, mas isso ocorre devido a encapsulação do fármaco. Diferentemente de estudos reportados com outros fármacos, o aumento da concentração molar de colesterol causou redução do tamanho de partícula, o que sugere que a interação do colesterol em lipossomas com diferentes fármacos é capaz de modificar o tamanho de partícula (XU; LONDON, 2000; SEUNG-CHEOL *et al.*, 2005). Seguindo esses critérios, as formulações 1, 5, 7 e 9 estão em acordo com a faixa de tamanho descrita em trabalhos prévios e observa-se um aumento no tamanho das partículas quando compara-se os lipossomas brancos e contendo cabazitaxel, que se justifica ao fato de que fármacos lipofílicos tendem a localizar-se na bicamada lipídica, podendo alterar o tamanho do lipossoma com influência na quantidade de fármaco (CHUGH *et al.*, 2018; GAUMET *et al.*, 2008).

Outro aspecto da caracterização físico-química importante é o índice de polidispersividade (PDI) que reflete o perfil de distribuição de populações das partículas, no qual, refere-se a uma representação da distribuição de populações de tamanho de partícula em uma amostra. Valores de PDI menores, próximo a 0,0 indicam maior homogeneidade da distribuição de tamanho de partícula enquanto valores próximos de 1,0 representam uma amostra heterogênea e altamente dispersa. Pelas análises feitas é possível verificar que existem ensaios que apresentam tanto distribuição heterogênea quanto homogênea, isso pode ser decorrente de fatores relacionados à composição das formulações. Neste sentido, Yin *et al.*, 2018 prepararam lipossomas de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e DSPE-PEG para a encapsulação de cabazitaxel e observaram valores de PDI entre 0,2 e 0,3. Diversos outros trabalhos na literatura apontam para esta faixa de polidispersividade (BADRAN, 2014). Ao analisar os valores de PDI dos quinze experimentos as formulações que obtiveram os melhores tamanhos de partícula também mantiveram o valor de PDI dentro do esperado, comparado ao estudo anterior.

Por fim, a caracterização do potencial zeta está atrelado à estabilidade da formulação, visto que a presença de cargas causa repulsão eletrostática, e, portanto, impede a agregação das vesículas. Segundo estudos de LI *et al.*, 2013, células fagocíticas favorecem a

captação de partículas carregadas negativamente. É perceptível que as cargas das partículas se mantiveram carregadas negativamente em todas as formulações. De acordo com Delgado em 2013, cujo estudo preparou e caracterizou lipossomas contendo fosfatidilcolinas, obtendo resultados de potencial zeta negativos e acrescentou também, visto que são fosfolípidos zwitteriônicos, ou seja, com carga igual a zero, apresentando um grupo positivo (colina) e um grupo negativo (fosfato) e podem apresentar ambos resultados dependendo da conformação que adquirir na membrana lipídica. Neste caso, o valor negativo do potencial zeta está atribuído à presença do grupamento PO_3^- nas fosfatidilcolinas utilizadas nas preparações dos lipossomas. Portanto, os valores médios de potencial zeta dos lipossomas podem variar de acordo com a natureza dos seus componentes, bem como com as mudanças na orientação dos grupos de cabeça dos lipídios, contribuindo para carga na interface do nanocarreador (DELGADO, 2013).

Tabela 7 - Valores de porcentagem de encapsulação e seus respectivos desvio padrão (DP) para as formulações desenvolvidas empregando planejamento fatorial

Nº formulação	Eficiência de encapsulação (%)
1	34,30 ± 8,65
2	21,75 ± 7,42
3	27,81 ± 3,62
4	9,75 ± 0,40
5	93,78 ± 0,51
6	26,73 ± 4,50
7	78,12 ± 2,96
8	8,34 ± 1,40
9	65,59 ± 6,67
10	49,88 ± 6,71
11	40,03 ± 3,33
12	18,99 ± 2,31
13	8,20 ± 4,64
14	7,78 ± 1,08
15	11,1 ± 6,00

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se na Tabela 8 que a eficiência de encapsulação de cabazitaxel foi fortemente influenciada pela composição das formulações. Pode-se notar que as formulações 5

e 7 possuem fosfatidilcolina de soja em sua composição e apresentaram os maiores valores de eficiência de encapsulação, respectivamente $93,78 \pm 0,51\%$ e $78,12 \pm 2,96\%$. Trabalhos prévios relacionaram este lipídio a valores elevados de eficiência de encapsulação de taxanos. Por exemplo, Eloy *et al.*, 2017 reportaram eficiência de encapsulação correspondente a 52,76% do taxano paclitaxel, em lipossomas compostos por SPC, colesterol e DSPE-PEG (2000).

Para melhor observação e compreensão dos efeitos nas variáveis dependentes atribuídos aos fatores independentes (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019). O presente estudo utilizou o método quality by design, onde Y1 (Eficiência de encapsulação), Y2 (Tamanho de partícula) e Y3 (PDI) foram submetidos a regressão múltipla regressão múltipla para produzir uma equação polinomial de segunda ordem utilizando o modelo full quadratic, sendo este escolhido devido os valores melhores de desvio padrão e r^2 mais altos se comparado com equações lineares de interação. As equações finais em termos de fatores codificados para Y1 (Eficiência de encapsulação)) e Y2 (Tamanho de partícula)) e Y3 (PDI) são:

$$Y_1 = 251,07 - 61,265X_1 - 1,098X_2 - 13,844X_3 + 0,138X_1X_2 - 0,068X_1X_3 + 0,013X_2X_3 + 11,236X_1^2 + 0,031X_2^2 + 0,315X_3^2$$

Com o seguinte parâmetro de ajuste: R-Sq = 85,36%

$$Y_2 = -563,998 + 460,752X_1 + 8,994X_2 + 28,681X_3 - 3,809X_1X_2 - 2,285X_1X_3 + 0,171X_2X_3 - 68,8X_1^2 - 0,200X_2^2 - 0,714X_3^2$$

Com o seguinte parâmetro de ajuste: R-Sq = 69,44%.

$$Y_3 = -0,126222 + 0,573097X_1 + 0,00290139X_2 - 0,000636111X_3 - 0,00494167X_1X_2 - 0,00428333X_1X_3 + 0,000616667X_2X_3 - 0,0745139X_1^2 - 0,000233472X_2^2 - 0,000229306X_3^2$$

Com o seguinte parâmetro de ajuste: R-Sq = 89,68%.

As equações polinomiais permitem estudar a influência de cada fator e sua interação sobre as respostas selecionadas. Elas foram utilizadas objetivando desenhar conclusões após considerar a magnitude dos coeficientes e o sinal matemático que elas carregam, onde um sinal negativo significa efeito antagônico e o sinal positivo significa um efeito sinérgico. Baseados nos valores do coeficiente de correlação, R-Sq houve uma adequação satisfatória da regressão ao modelo de resposta de índice de polidispersividade (Y_3) com valor de 89, 68% e eficiência de encapsulação (Y_1), já o modelo de resposta para tamanho de partícula apresentou um baixo valor de correlação, de 69,44%.

Considerando os coeficientes apresentados nas equações polinomiais e detalhados nas tabelas 8, 9 e 10 com o nível de significância $\alpha = 0,10$ temos que o termo relativo a interação entre colesterol X_3X_3 tem significância estatística para a resposta de eficiência de encapsulação, para o tamanho de partícula, o termo isolado tipo de lipídio X_1 apresenta significância estatística e para índice de polidispersividade, o termo isolado tipo de lipídeo X_1 e a interação entre cabazitaxel e colesterol X_2X_3 produzem resposta significativa para índice de polidispersividade. Este resultado pode se dar pois a quantidade de colesterol quando baixa permite captação de água no compartimento aquoso das vesículas lipossômicas permitindo que o fármaco se distribui por toda a vesícula, aumentando assim sua encapsulação, no entanto, quantidades elevadas de colesterol podem ter o efeito contrário, competindo com o fármaco por encapsulação na bicamada lipídica (SUDHAKAR; KRISHNA; MURTHY, 2016).

Tabela 8 - Coeficientes de Regressão Full Quadratic para Tamanho de partícula (Y_2).

Coeficiente de regressão estimados para tamanho de partícula				
Termo	Coeficiente	SE Coeficiente	T	P
Constante	-563,998	429,940	-1,312	0,247
Lipídeo (X_1)	460,752	219,256	2,101	0,090
CTX (X_2)	8,994	21,926	0,410	0,699
Colesterol (X_3)	28,681	21,926	1,308	0,248
Lipídeo (X_1) * Lipídeo (X_1)	-68,800	44,900	-1,532	0,186
CTX (X_2) * CTX (X_2)	-0,200	0,449	-0,445	0,675
Colesterol (X_3) * Colesterol(X_3)	-0,714	0,499	-1,590	0,173
Lipídeo (X_1) * CTX (X_2)	-3,809	4,314	-0,883	0,418
Lipídeo (X_1) * Colesterol (X_3)	-2,285	4,314	-0,530	0,619
CTX (X_2) * Colesterol (X_3)	0,171	0,431	0,397	0,708

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9 - Coeficiente da Regressão Full Quadratic para Eficiência de encapsulação (Y_1).

Coeficiente de regressão estimados para eficiência de encapsulação				
Termo	Coeficiente	SE Coeficiente	T	P
Constante	251,070	86,932	2,888	0,034
Lipídeo (X_1)	-67,265	44,330	-1,517	0,190
CTX (X_2)	-1,098	4,433	-0,248	0,814

Colesterol (X₃)	-13,844	4,433	-3,123	0,026
Lipídeo (X₁) * Lipídeo (X₁)	11,236	9,078	1,238	0,271
CTX (X₂) * CTX (X₂)	0,031	0,091	0,343	0,745
Colesterol (X₃) * Colesterol(X₃)	0,315	0,091	3,465	0,018
Lipídeo (X₁) * CTX (X₂)	0,138	0,872	0,158	0,882
Lipídeo (X₁) * Colesterol (X₃)	-0,068	0,872	-0,078	0,941
CTX (X₂) * Colesterol (X₃)	0,013	0,087	0,153	0,885

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10- Coeficiente de Regressão Full Quadratic para Índice de Polidispersão (Y₃).

Coeficiente de regressão estimados para resposta PDI				
Termo	Coeficiente	SE Coeficiente	T	P
Constante	-0,012622	0,304670	-0,414	0,696
Lipídeo (X₁)	0,573097	0,155372	3,689	0,014
CTX (X₂)	0,002901	0,015537	0,187	0,859
Colesterol (X₃)	-0,000636	0,015537	-0,041	0,969
Lipídeo (X₁) * Lipídeo (X₁)	-0,074514	0,031817	-2,342	0,066
CTX (X₂) * CTX (X₂)	-0,000233	0,000318	-0,734	0,496
Colesterol (X₃) * Colesterol(X₃)	-0,000229	0,000318	-0,721	0,503
Lipídeo (X₁) * CTX (X₂)	-0,004942	0,003057	-1,617	0,167
Lipídeo (X₁) * Colesterol (X₃)	-0,004283	0,003057	-1,401	0,220
CTX (X₂) * Colesterol (X₃)	0,000617	0,000306	2,017	0,100

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráficos de superfície de resposta e contorno de superfície são ferramentas adequadas para o entendimento da relação entre diferentes variáveis independentes e seu efeito em variáveis dependentes, auxiliando na interpretação de dados obtidos pela otimização por quality by design (JAIN *et al.*, 2019). Os gráficos de contorno e superfície 3-D para as respostas eficiência de encapsulação, tamanho de partícula e PDI são apresentados nas figuras a seguir, com a relação entre as variáveis independentes avaliadas.

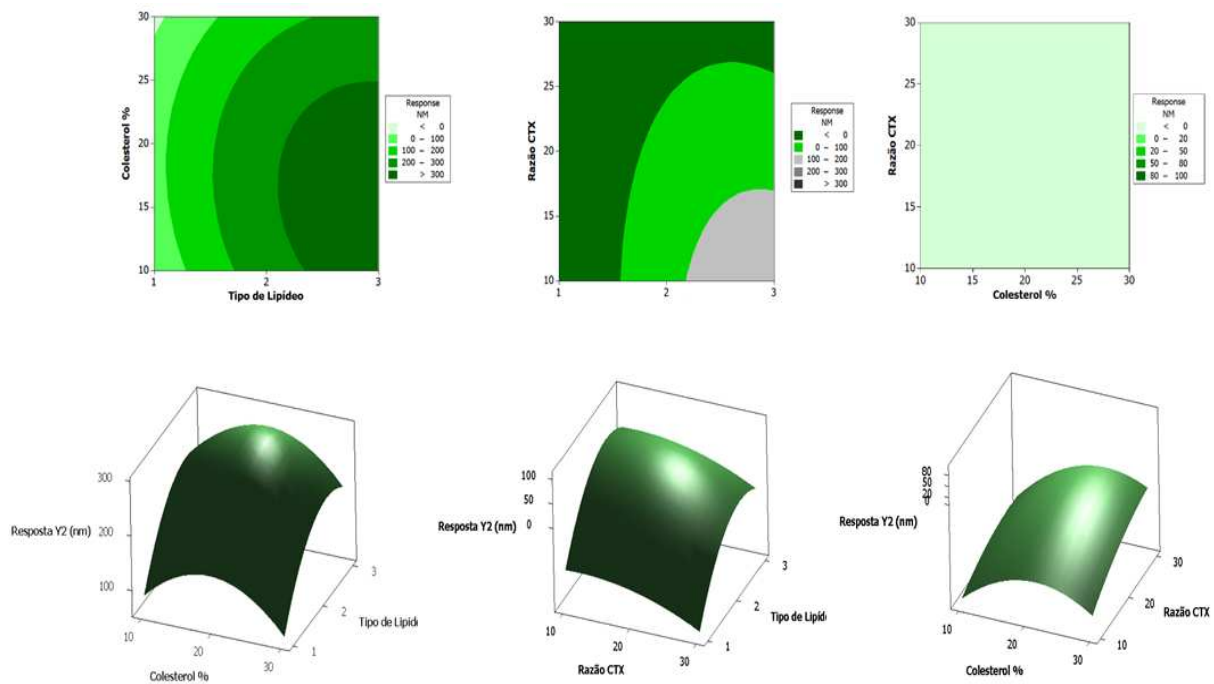
No gráfico de superfície de resposta, na Figura 9 são elucidadas as relações das variáveis independentes em função do tamanho de partícula (Y₂). Comparando a associação entre tipo de lipídeo (X₁) e porcentagem de colesterol (X₃), a utilização do tipo de lipídeo 1 (SPC) em associação de valores de colesterol reduzidos entre 10 e 30% atendem melhor a faixa

ideal de tamanho > 100 nm. Já a associação entre razão fármaco/lipídeo (X_2) e tipo de lipídeo (X_1) a proporção de fármaco até a proporção 1:25 utilizando o tipo de lipídeo 2 (DSPC) atendem os requisitos de tamanho de partícula adequado. A comparação entre razão fármaco lipídeo e percentual de colesterol não foi bem elucidada visto que não é perceptível graficamente a distinção e interferência dos valores na resposta.

A resposta em função do índice de polidispersividade (Y_3), na Figura 10, inicialmente relaciona o tipo de lipídeo (X_1) e razão de fármaco/lipídeo (X_2) onde a utilização do tipo de lipídeo 1 (SPC) associado a proporção de fármaco 1:30 resultam em índices de polidispersividade adequados. A comparação entre tipo de lipídeo (X_1) e percentual de colesterol (X_3) sugerem que percentuais de colesterol na faixa de 25 a 30% utilizando o tipo de lipídeo 1 (SPC), favorecem a resposta. Por fim, a comparação da associação entre percentual de colesterol (X_3) e razão fármaco/lipídeo (X_2) a quantidade percentual de colesterol entre 25 a 30 % e proporção de fármaco/lipídeo (X_2) entre 1:10 resultam em índices de polidispersividade apropriados.

Com relação a resposta de eficiência de encapsulação, na Figura 11, a comparação entre Tipo de lipídio (X_1) e Percentual de colesterol (X_3), resulta na resposta cuja eficiência de encapsulação (Y_1) aumenta com o percentual reduzido de colesterol, em torno de 10%, utilizando o lipídio 1 (SPC). A comparação do teor de colesterol (X_3) e razão fármaco/lipídeo (X_1) sugere que percentuais reduzidos de colesterol 10% permitem uma elevada eficiência de encapsulação quando uma ampla faixa de razão de fármaco é utilizada. A comparação da relação razão fármaco/lipídeo e tipo de lipídeo não foi bem elucidada visto que não foi verificado interferência no parâmetro de eficiência.

Figura 9 - Gráfico de contorno de superfície e resposta para variáveis independentes e sua influência no tamanho de partícula.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Gráfico de contorno e superfície de resposta para variáveis independentes e sua influência no Índice de polidispersividade.

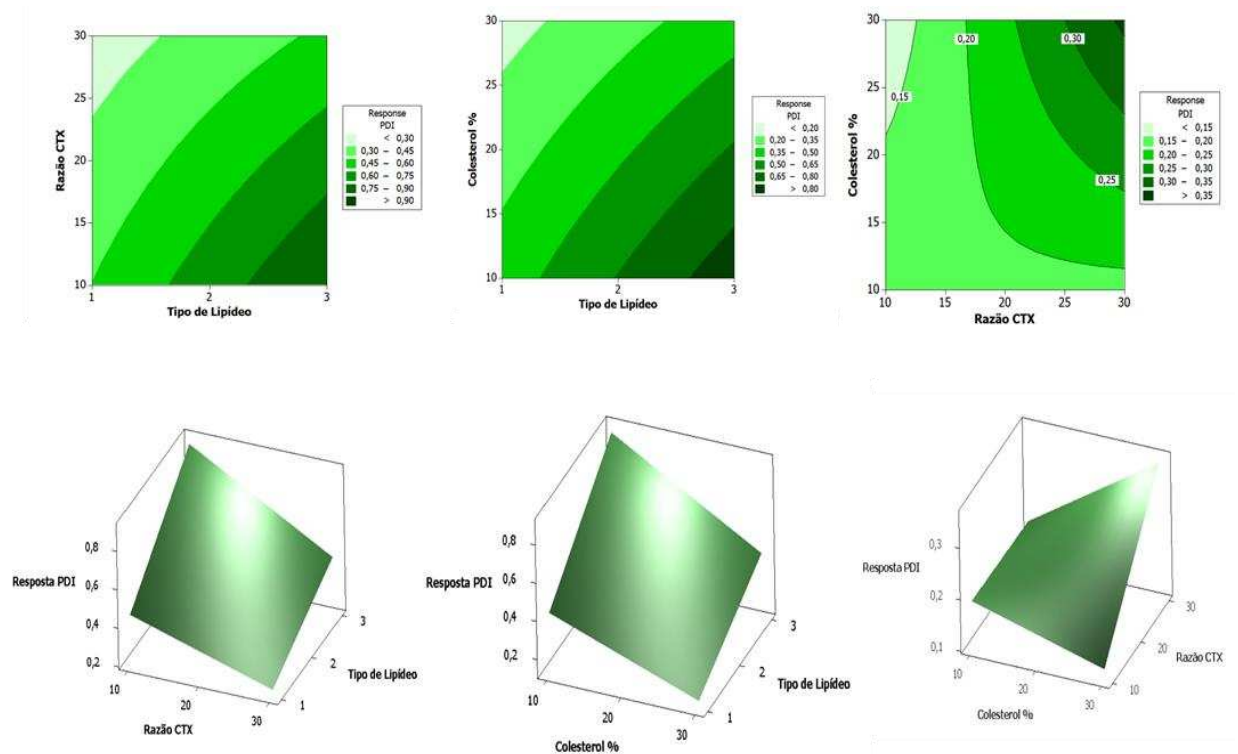
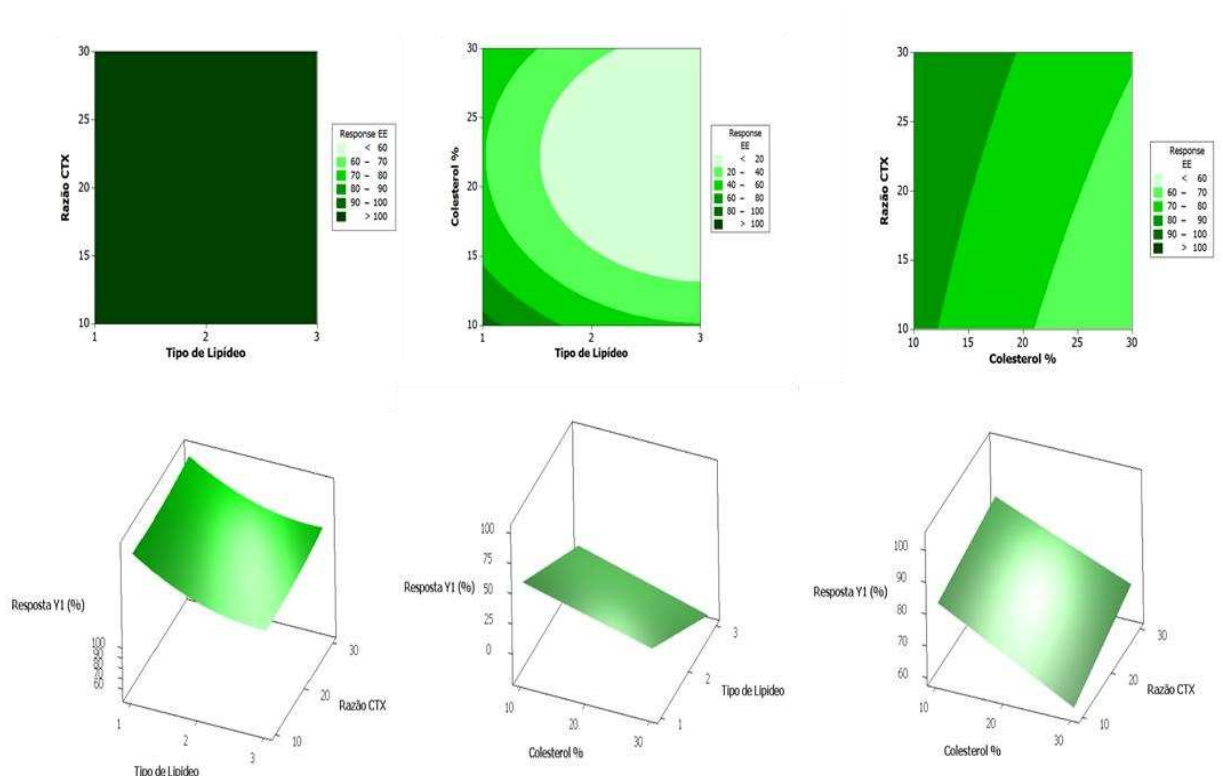


Figura 11 - Gráfico de contorno e superfície de resposta para variáveis independentes e sua influência em eficiência de encapsulação

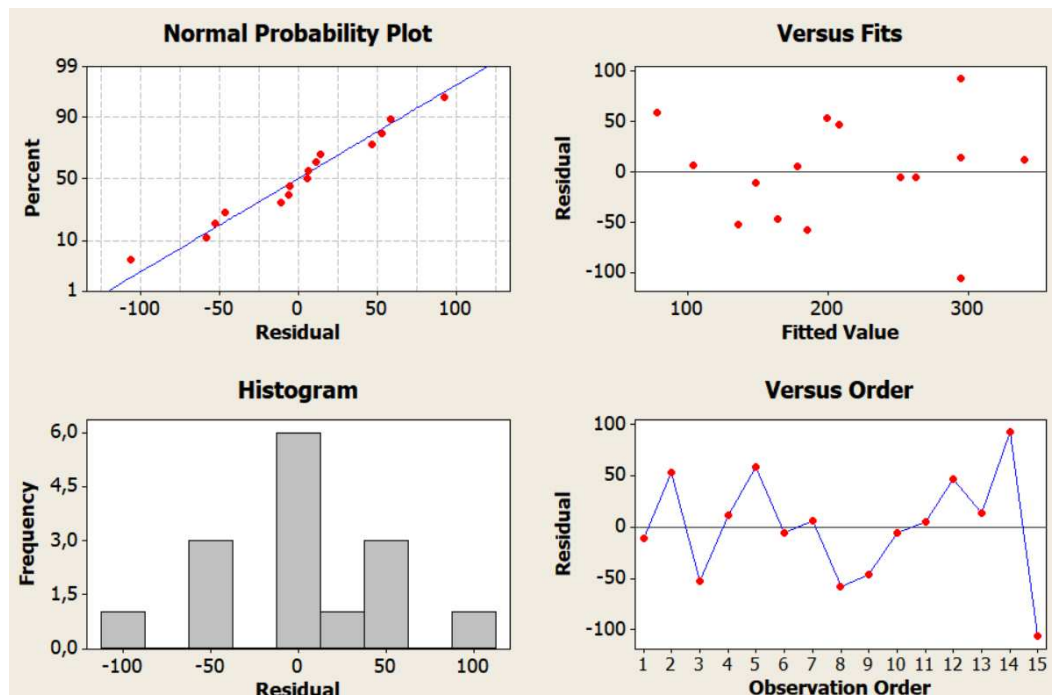


Fonte: Elaborado pelo autor.

Modelos preditivos determinados por regressão são testados por ANOVA, podendo se dar pela análise dos resíduos que é a diferença entre o que foi mensurado experimentalmente e o que foi calculado pelo modelo. As Figuras 12 -14 mostram a relação do gráfico de probabilidade normal (porcentagem vs residual), histograma (residual e frequência), resíduo versus gráfico (valores ajustados aos resíduos), gráfico de ordem versus (ordem de observação ao residual). Os valores de probabilidade normal foram quase próximos da linha média no gráfico de probabilidade normal significando a distribuição normal dos dados. O histograma também produziu resultados consideráveis, porém os mesmos não são na forma de sino, característica de processos estáveis, onde aproximadamente 95% dos valores estão dentro da faixa média. (PALANIAPPAN *et al.*, 2019).

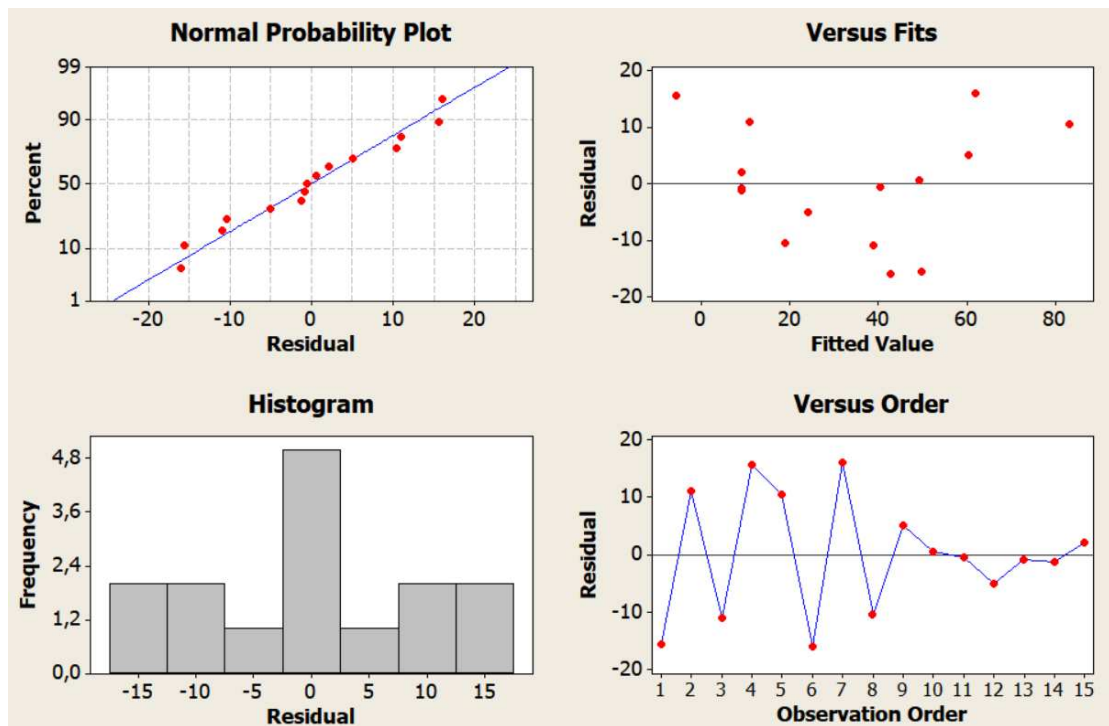
Por fim, a análise do gráfico de resíduos versus valores ajustados permite observar que estes ficam distribuídos sistemicamente em ambos os lados da linha central. Essa dispersão pode ser descrita como um desvio padrão do erro experimental aleatório (LEWIS, MATHIEU, and PHAN-TAN-LUU, 1998). No gráfico de resíduo versus ordem, a aleatoriedade entre os pontos permite concluir relação de independência entre eles (PALANIAPPAN *et al.*, 2020).

Figura 12 - Gráfico de resíduo para resposta Y_2 (tamanho de partícula).



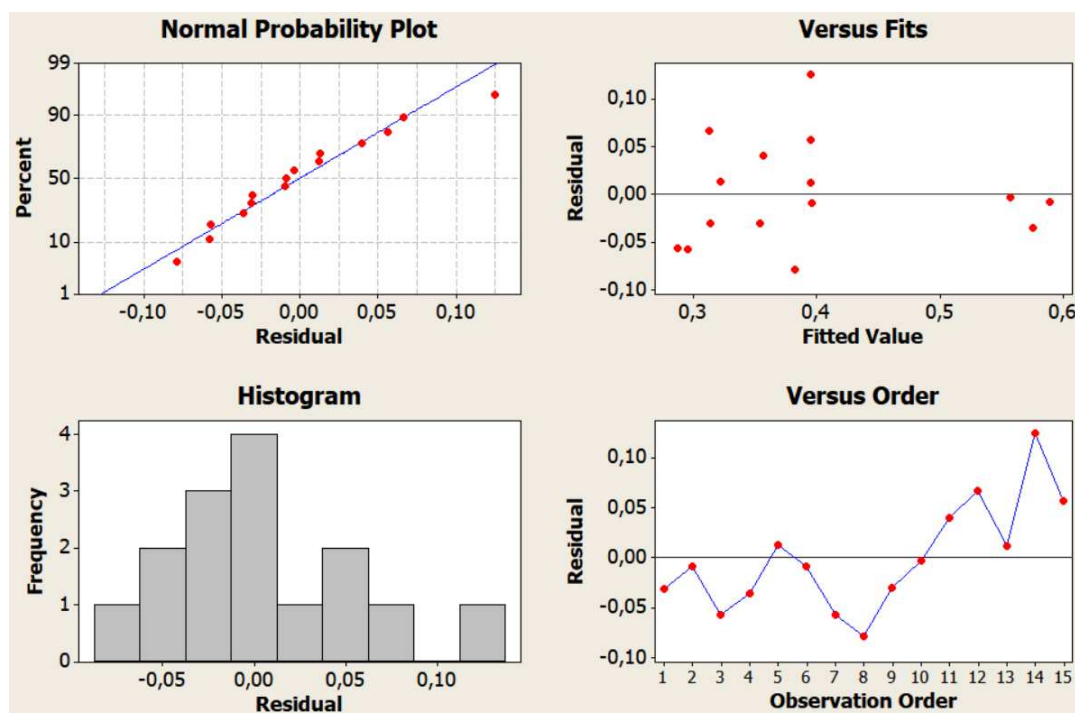
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 - Gráficos de resíduos para a resposta Y_1 (eficiência de encapsulação).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Gráficos de resíduo para a resposta Y_3 (índice de polidispersividade).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas tabelas a seguir, 11-13, são mostrados para o conjunto de formulações testadas a comparação entre os valores experimentais de tamanho de partícula, eficiência de encapsulação e PDI, em relação os valores estimados pela modelagem, com seus respectivos valores de erros relativos, em porcentagem, indicando desvios pontuais em relação às equações polinomiais. Em alguns casos, como por exemplo para a formulação 5 nota-se baixo erro para EE% e PDI, porém maior erro para tamanho de partícula.

Tabela 11 - Valores de tamanho de partícula (Y_2), obtidos experimentalmente de cada formulação, valores estimados, resíduos e erro relativos.

Nº da Formulação	Valores Experimentais (nm)	Valores Estimados (nm)	Resíduo	Erro Relativo%
1	137,37	148,68	-11,31	8,23
2	252,63	199,81	52,82	20,91
3	83,62	136,44	-52,82	63,16
4	351,27	339,96	11,31	3,22
5	136,70	78,49	58,21	42,58
6	245,60	251,52	-5,92	2,41
7	109,77	103,84	5,92	5,40
8	127,27	185,47	-58,21	45,74
9	117,80	164,70	-46,90	39,81
10	257,53	262,92	-5,39	2,09
11	184,00	178,61	5,39	2,93
12	255,20	208,30	46,90	18,38
13	308,67	295,02	13,64	4,42
14	387,70	295,02	92,68	23,90
15	188,70	295,02	-106,32	56,34

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 12 - Valores de eficiência de encapsulação (Y_1), obtido experimentalmente de cada formulação, valores estimados, resíduos e erro relativos.

Nº da Formulação	Valores Experimentais EE%	Valores Estimados EE%	Resíduo	Erro Relativo %
1	34,3	49,86	-15,56	45,36
2	21,75	10,76	11,00	50,55
3	27,81	38,81	-11,00	39,54
4	9,75	-5,81	15,56	159,59
5	93,78	83,30	10,48	11,17
6	26,73	42,81	-16,08	60,15
7	78,12	62,04	16,08	20,58
8	8,34	18,82	-10,48	125,63
9	65,59	60,51	5,08	7,75
10	49,88	49,36	0,52	1,04
11	40,03	40,55	-0,52	1,29
12	18,99	24,07	-5,08	26,76
13	8,2	9,05	-0,85	10,37
14	7,78	9,05	-1,27	16,32
15	11,17	9,05	2,12	18,98

Fonte: Elaborada pelo auto

Tabela 13 - Valores de índice de polidispersividade (Y_3), obtidos experimentalmente de cada formulação, valores estimados, resíduos e erro relativos.

Nº da Formulação	Valores Experimentais PDI	Valores Estimados PDI	Resíduo	Erro Relativo %
1	0,283	0,314	-0,031	10,95
2	0,387	0,397	-0,009	2,39
3	0,238	0,295	-0,058	24,24
4	0,539	0,575	-0,036	6,65
5	0,335	0,322	0,013	3,86
6	0,580	0,589	-0,009	1,52
7	0,230	0,287	-0,057	24,88
8	0,304	0,383	-0,079	26,01
9	0,324	0,354	-0,030	9,33
10	0,554	0,557	-0,004	0,66
11	0,397	0,357	0,040	10,07
12	0,380	0,313	0,067	17,52
13	0,407	0,395	0,012	2,94
14	0,520	0,395	0,125	24,02
15	0,452	0,395	0,056	12,47

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na preparação do lipossoma, é desejado uma alta eficiência de encapsulação do fármaco e uma faixa adequada de tamanho de partícula, uma vez que uma alta eficiência de encapsulação ajuda a aumentar a disponibilidade do mesmo no organismo e a faixa adequada de tamanho de partícula favorece o acúmulo nos tumores por extravasamento, devido ao efeito EPR (ELOY *et al.*, 2014). Portanto, utilizando as respostas de caracterização obtidas experimentalmente, foi escolhida uma formulação com base na análise dos resultados experimentais obtidos. Os parâmetros analisados para escolha da melhor formulação, foram definidos como máximo para valores de eficiência de encapsulação, mínimos para o tamanho de partícula e também para índice de polidispersão.

Desse modo, observando-se a caracterização de todas as formulações preparadas no presente estudo, nota-se que a formulação 5, equivalente aos códigos X1, -1, X2, 0 e X3 -1, ou seja, composta por SPC, com razão fármaco: lipídeo 1:20 e 10% razão molar de colesterol, preparada e caracterizada em triplicata, resultou em valores de eficiência de encapsulação, tamanho de partícula e PDI adequados, de acordo aos valores apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Caracterização físico-química da formulação 5, composta por SPC, colesterol (10%), contendo cabazitaxel (1:20 molar) e 5% de DSPE-PEG (2000).

Código Formulação	CTX 5.1	CTX 5.2	CTX 5.3	CTX MÉDIA	ESTIMADO	%ERRO
Tamanho (nm)	136,7	103,93	81,1	107,24	47,47	55,74
PDI	0,335	0,27	0,203	0,269	0,214	20,54
EE %	93,78	104,17	96,06	98	90,61	7,54

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme observado a eficiência de encapsulação foi máxima, enquanto o tamanho de partícula situou-se entorno de 100 nm, valor considerado ideal para a aplicação parenteral, com baixa polidispersão. Assim, comprovou-se o efeito benéfico de aumento da fração molar de cabazitaxel em relação aos lipídeos na razão 1:20, utilizando o lipídio 1 e no reduzido percentual de colesterol, correspondente à formulação 5. Portanto, essa formulação foi selecionada para os estudos futuros. Esta formulação está de acordo a estudos prévios, que empregaram um lipídeo contendo 80% de fosfatidilcolina, colesterol e DSPE-PEG (2000), também para encapsulação de cabazitaxel na mesma proporção em relação aos lipídeos, apresentando parâmetros físico-químicos semelhantes (YIN *et al.*, 2018).

5.2 Liofilização

As formulações selecionadas liofilizadas com crioprotetor sacarose, foram submetidas a congelamento com diferentes proporções do crioprotetor. A partir do número de mols total utilizados para preparo da formulação 5, foi planejado o teste de diferentes proporções de sacarose para avaliar qual concentração reduziria de maneira eficaz os possíveis danos do congelamento. Levando em consideração a metodologia proposta por Eloy *et al.* (2016), foram testadas 3 proporções lipídeos: sacarose (1:2,5; 1:5; 1:10). A Tabela 15, a seguir, apresentam os resultados de tamanho, PDI e potencial zeta após liofilização.

Tabela 15 - Caracterizações das alíquotas de formulações com crioprotetor em diferentes proporções.

	Tamanho (Média)	PDI (Média)	Zeta (Média)
Branco	78,83 ± 3,77	0,27 ± 0,23	-14,6 ± 0,87
CTX	92,22 ± 10,76	0,24 ± 0,44	-13,76 ± 1,04
Branco 1:2,5	135,53 ± 1,18	0,38 ± 0,016	-35,266 ± 5,54
CTX 1:2,5	189,56 ± 1,60	0,51 ± 0,010	-25,06 ± 1,09
Branco 1:5	168,76 ± 36,07	0,52 ± 0,068	-12,6 ± 1,11
CTX 1:5	128,4 ± 2,90	0,39 ± 0,030	-26,13 ± 1,72
Branco 1:10	128,2 ± 0,62	0,36 ± 0,006	-16,26 ± 0,66
CTX 1:10	173,96 ± 3,15	0,50 ± 0,022	-17,96 ± 1,20

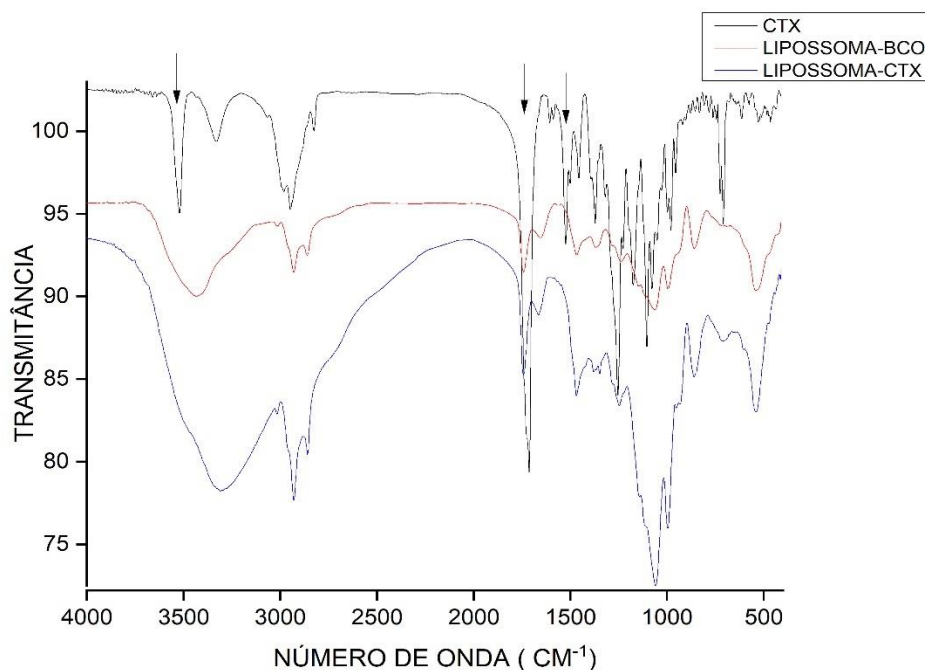
Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando se comparam os dados dos lipossomas liofilizados, com as caracterizações das formulações líquidas, nota-se que quando se utilizou a proporção 1:5 (lipídeo: sacarose), houve menor aumento de tamanho de partícula para o lipossoma CTX, assim como menor aumento do PDI, sendo a opção mais adequada para escolha de quantidade do crioprotetor. Assim, como exposto por Abdelwahed *et al.* (2006), a imobilização de nanopartículas dentro de uma matriz vítrea de crioprotetor pode impedir sua agregação e protegê-los contra o estresse mecânico dos cristais de gelo e o nível de estabilização proporcionado pelos açúcares geralmente depende de suas concentrações. Além disso, Chen *et al.* (2010), afirmam que a sacarose foi um ótimo lioprotetor para estabilização de lipossomas peguilhados contendo paclitaxel.

5.3 Caracterização de lipossomas: FTIR

A análise de FTIR é importante para a identificação dos grupamentos químicos presentes do fármaco e carreador, podendo ser útil para evidenciar interações intermoleculares, como pontes de hidrogênio, através de mudanças nos picos dos espectros (ELOY *et al.*, 2016).

Figura 15 - Espectros de FTIR de cabazitaxel, lipossoma branco e lipossoma contendo cabazitaxel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os picos característicos do cabazitaxel corresponde ao estiramento N-H de amida em 3518 cm^{-1} ; dobramento N-H em 1519 cm^{-1} e vibração da ligação éster em torno 1710 cm^{-1} (ZHUANG B. *et al.*, 2016). De acordo com Zhuang *et al.* (2016) que incorporou o cabazitaxel na matriz de uma micela polimérica, não foi perceptível o aparecimento dos picos em torno de 3510 cm^{-1} e 1520 cm^{-1} atribuídos a banda de absorção da ligação amida de cabazitaxel, característicos do fármaco, indicando que o cabazitaxel foi incorporado molecularmente nas micelas. Com base no espectro do lipossoma contendo cabazitaxel (Figura 15), os picos característicos do fármaco não estão em evidência, sendo observado um sutil alargamento do pico em $3150\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ no espectro do lipossoma contendo fármaco, sugerindo que o fármaco encapsulado esteja disperso no estado molecular na matriz do lipossoma, em conformidade ao estudo ao estudo previamente relatado.

Segundo estudo realizado por Shao *et al.* (2013), onde uma formulação contendo colesterol e outra sem colesterol foram preparadas para investigar a influência protetora do colesterol em emulsões lipídicas intravenosas contendo cabazitaxel, a banda de absorção C=O de ligação éster do cabazitaxel puro apareceu em torno de 1722 cm^{-1} , no entanto para cabazitaxel associado ao colesterol, a mesma banda carbonila do cabazitaxel apareceu em 1717 cm^{-1} devido à ligação de hidrogênio. Em acordo como estudo relatado foi observado um comportamento muito semelhante entre o cabazitaxel e do lipossoma contendo cabazitaxel,

possivelmente pelo mesmo fundamento que a interação de ligação de hidrogênio interfira no espectro.

O perfil dos espectros dos lipossomas foi analisado conforme os espectros dos lipídeos constituintes na formulação. No lipossoma branco, podemos um estiramento largo de O-H entorno de 3429cm^{-1} e a absorção em 2939 cm^{-1} devido à vibração de estiramento C-H do colesterol foi evidenciado em ambos lipossomas, em conformidade a estudos prévios de Poovesh e Mihir (2013), que realizou a análise espectral do colesterol cristalino obtendo os valores semelhantes ao do presente estudo. De tal forma, o espectro do lipossoma carregado com o fármaco é similar ao lipossoma. Já o espectro do SPC puro evidenciado no estudo de Menna *et al.* (2017) onde nanovesículas encapsuladas com nitrato de sertaconazol cuja composição (fosfatidilcolina de soja e desoxiclorato de sódio) mostrou um pico aparente em 3424 cm^{-1} (estiramento C-H), 2913 cm^{-1} e 2856 cm^{-1} (alongamento CH_2) 1734 cm^{-1} (alongamento C=O), 1232 cm^{-1} (alongamento PO_2) e 1064cm^{-1} (alongamento C-O) A vibração de estiramento do grupo P=O no do fosfolípídeo SPC no presente estudo foi evidenciada pelo pico em torno de 1236cm^{-1} para o lipossoma branco e lipossoma com cabazitaxel, em concordância com o estudo (RUDRA *et al.*, 2010; MENNA *et al.*, 2017; FREAG; ELNAGGAR; ABDALLAH, 2013; POOVESH *et al.*, 2013; SHAO *et al.*, 2013; ZHUANG *et al.*, 2016).

Os lipídeos sólidos podem interagir com grupos funcionais do cabazitaxel. Os espectros das nanopartículas mostram picos similares característicos dos grupos funcionais, comprovado pelos recentes estudos de Chand *et al.* (2021), que concluíram a não existência de ligações químicas adicionais com os grupos funcionais durante a interação fármaco e excipiente nos sistemas nanoestruturados contendo cabazitaxel. Os lipídeos sólidos podem interagir com os grupos funcionais do cabazitaxel e alterar os espectros das formulações, no entanto, como observado na Figura 15 o perfil dos espectros dos lipossomas estão muito semelhantes, aparentemente a presença de uma interação química fraca entre fármaco e lipídeos que não interfira significativamente no espectro ou pela inexistência dessas interações químicas, o resultado do presente estudo está em concordância com as análises feita por Chand *et al.* (2021). Assim, os resultados da análise de FTIR indicaram que nenhuma ligação química adicional significativa fora a interação por ligação de hidrogênio entre C-H e cabazitaxel e colesterol foram geradas durante a interação do fármaco e seus excipientes e os picos de fármaco não evidenciados, pode estar relacionado à dispersão do fármaco encapsulado como solução molecular (CHAND *et al.*, 2021).

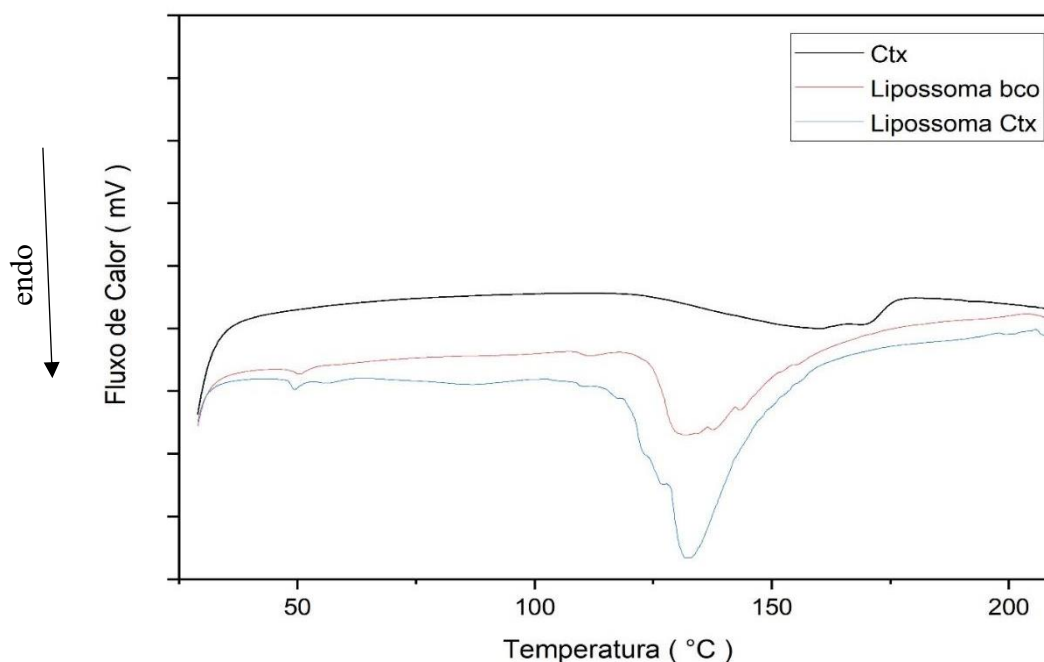
5.4 Caracterização de lipossomas: análise calorimétrica

A análise calorimétrica permite elucidar o estado de dispersão do fármaco no carreador nanoestruturado, seja molecular, cristalino ou amorfo. Como observada na Figura 16, no termograma do fármaco puro, se observa a temperatura de transição de fase em torno de 169°C com uma entalpia de -26,60 J/g. De acordo com estudo de Chand *et al.* (2021) sobre nanopartículas encapsuladas com cabazitaxel, apresentaram no termograma a temperatura de transição de fase a 186,79 °C com um pico endotérmico agudo característico, já as nanopartículas encapsuladas com cabazitaxel apresentaram uma temperatura de fusão mais baixa, demonstrando claramente a redução da cristalinidade do fármaco puro. O estudo também realizou a confirmação dos resultados do DSC por raio-x, cujo resultado dos espectros mostraram picos nítidos da natureza cristalina do cabazitaxel puro e para as nanopartículas indicaram picos difundidos que confirmaram a natureza amorfa do fármaco nos nanocarreadores. Diferentemente do observado no estudo relatado anteriormente, o espectro do fármaco apresentou apenas uma banda endotérmica alargada e achatada, possivelmente correspondendo à uma transição de fase, não havendo evidência de um pico agudo endotérmico, aparentemente porque o fármaco pode se apresentar no estado amorfo. O espectro do lipossoma branco é evidenciado em 132°C com entalpia de -56,57 J/g. O pico do lipossoma contendo fármaco evidencia que a uma redução na temperatura de fusão com entalpia de -101,86 J/g, o desaparecimento do fármaco no espectro do lipossoma em comparação ao fármaco livre, no entanto, o pico característico agudo do fármaco cristalino não é evidenciado, o que pode ser atribuído à total encapsulação do fármaco.

Conforme os dados obtidos e analisados, é perceptível a divergência com estudos recentes referente ao fármaco livre, sendo a proposta de utilização de difratometria de raios-x para melhor elucidar os resultados dos espectros do DSC, se o cabazitaxel encontra-se no estado amorfo ou cristalino, ou eventualmente em um estado polimórfico.

Portanto, os resultados de FTIR e DSC juntos, parecem revelar que o fármaco se encontra encapsulado, ou molecularmente disperso, ou como precipitado amorfo (CHAND *et al.*, 2021).

Figura 16 - Curvas de DSC de cabazitaxel, lipossoma branco e lipossoma contendo cabazitaxel.



Fonte: Elaborada pelo autor.

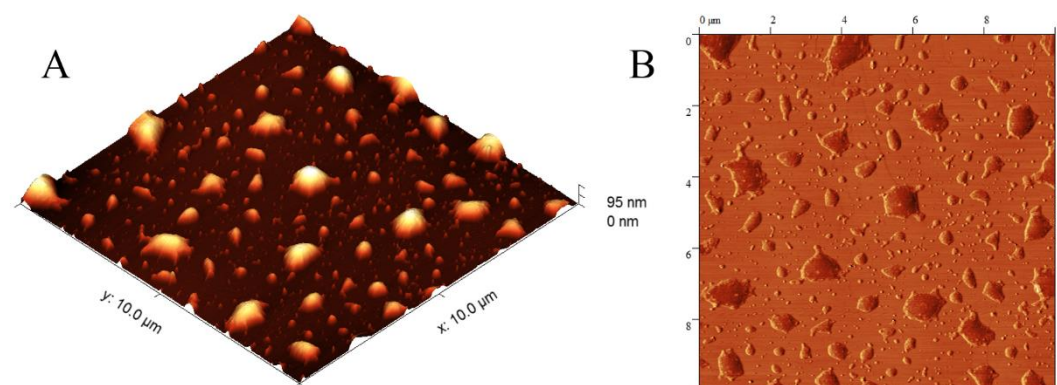
5.5 Microscopia de força atômica

A MFA é uma das técnicas empregadas para a visualização da morfologia de nanopartículas e outros materiais. É muito versátil, uma vez que tem a capacidade de analisar amostras nas mais variadas condições ambientais, possui uma rápida e fácil preparo de substância e permite que o mesmo seja preservado no seu estado nativo (RUOZI *et al.*, 2007).

A MFA tem vantagens sobre a microscopia eletrônica porque pode gerar imagens de superfície tridimensionais, enquanto microscopia eletrônica fornece uma projeção bidimensional amostra (SPYRATOU *et al.*, 2009). De acordo com as Figuras 17, é possível visualizar a disposição espacial e morfologia esférica característica de lipossomas, em acordo com o estudo de caracterizações de lipossomas por MFA proposto por Vorselen *et al.* (2020). Além disso, a Figura 18, mostra a distribuição de tamanhos das nanopartículas, os lipossomas apresentaram valores de tamanho de partícula equivalentes a $136 \pm 2,21$ nm por DLS. Por outro lado, os valores de tamanho de partícula para lipossoma foram 20 - 40 nm pela técnica de MFA. Os resultados divergentes se justificam porque a técnica de DLS avalia o espalhamento dinâmico de luz com a medição do raio diâmetro hidrodinâmico das vesículas medidas, ou seja, incorporando na medida as moléculas de água aderidas à superfície. Enquanto, a microscopia

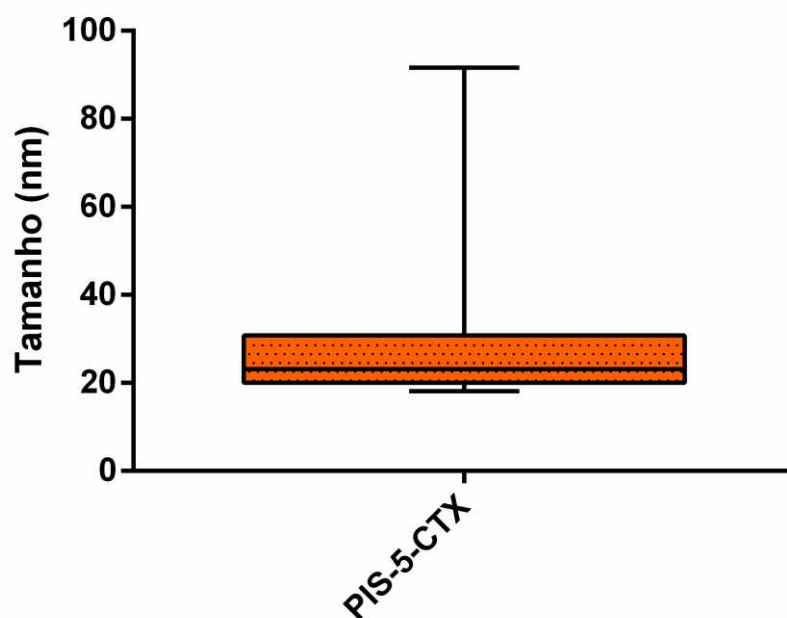
em questão, mediu as nanopartículas de acordo com a imagem das vesículas (VORSELEN *et al*, 2020).

Figura 17 - Imagem da morfologia dos lipossomas contendo cabazitaxel. Em (A) imagem 3D -10 x 10 μm e em (B) imagem 2D -Z-PHASE – 10 x 10 μm . Imagens com resolução de 512 pixels.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 - Gráfico de tamanho médio para lipossomas SPC: Col: DSPE-PEG: CTX. Barras expressam tamanho máximo e mínimo.



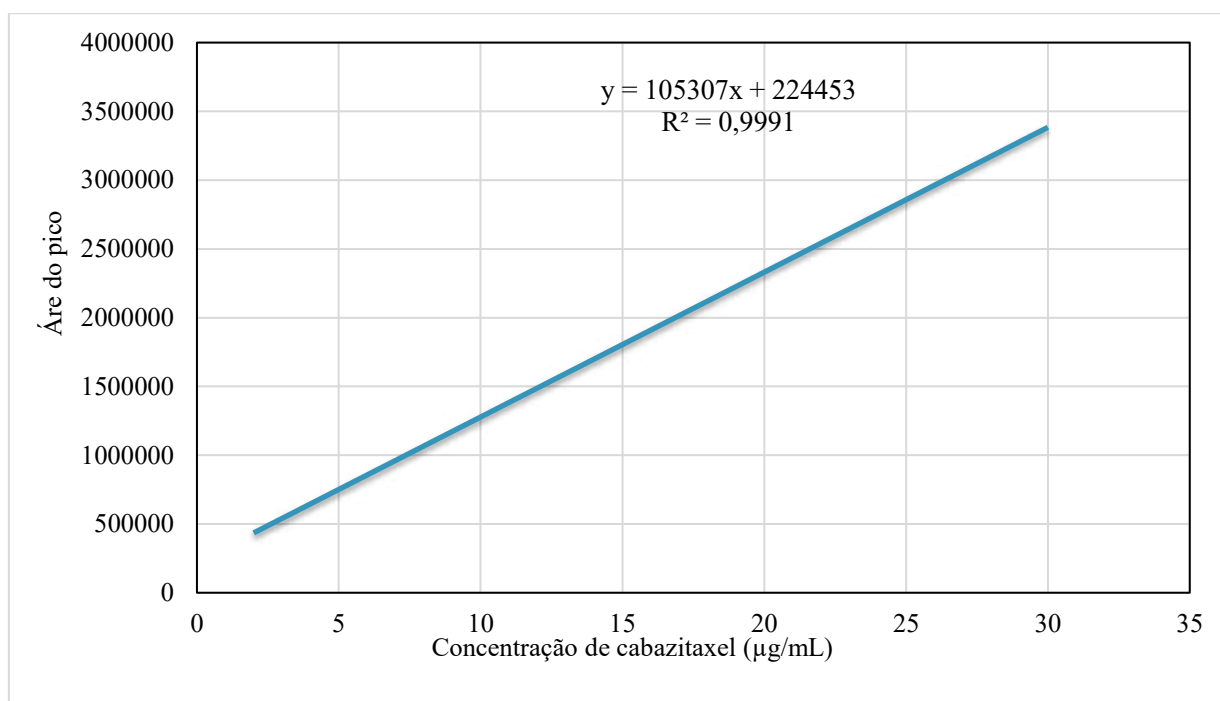
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Estudo de liberação in vitro de lipossomas contendo cabazitaxel

5.6.1 Método analítico: Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância (BRITO *et al.*, 2003, RIBANI *et al.*, 2004). Na Figura 19 observa-se os valores da curva de calibração quantificada para as análises, na qual é perceptível o parâmetro do coeficiente R^2 , próximo de 1, considerado ideal, conforme descrito por Brasil (2017).

Figura 19 - Gráfico da curva de calibração do cabazitaxel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Através do coeficiente de correlação do gráfico analítico, observou-se uma resposta proporcional de aumento da área obtida com a elevação das concentrações de cabazitaxel ao longo da curva de calibração. Assim, nota-se que o coeficiente de correlação está conforme o valor de referência especificado na RDC 166 de 2017 com um valor maior que 0,990 (BRASIL, 2017).

5.6.2 Avaliação da curva matrizada de cabazitaxel

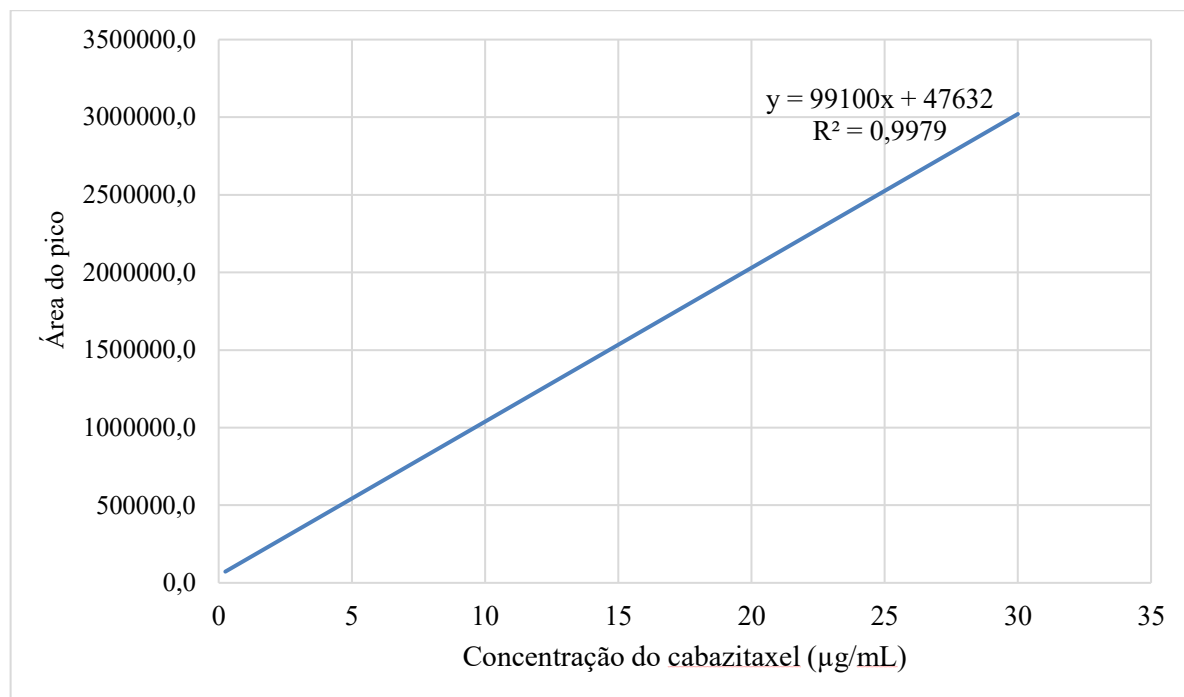
Este ensaio objetivou analisar se a matriz de lauril sulfato de sódio em tampão fosfato pH 7,4 (matriz esta que seria empregada nos meios receptor e doador do ensaio de liberação *in vitro*) alterou a linearidade da curva. Como observado na Figura 20, o gráfico da curva matrizada demonstrou que mesmo após adição de compostos nas soluções contendo concentrações crescentes de cabazitaxel, a linearidade do método foi mantida, visto que o valor do coeficiente de relação (R^2) se manteve dentro dos parâmetros adequados, o coeficiente de relação próximo a 1, $R^2 = 0,9979$, como já elucidado no estudo de linearidade no tópico anterior. A Tabela 16 apenas demonstra o quantitativo de cada concentração para construção da curva e valores de recuperação.

Tabela 16 - Valores da curva matrizada de cabazitaxel em tampão fosfato 1% de lauril sulfato de sódio.

Concentração (µg/mL)	Área do pico	Valor real (µg/mL)	Recuperação (%)
0,25	69549,3	0,221163808	88
0,5	97054,7	0,498715103	99
1	144311,0	0,975570131	97
2	196118,0	1,498345106	74
2,5	270409,3	2,248005382	89
5	536162,7	4,92967373	98
10	1101665,0	10,63605449	106
15	1610906,7	15,77471914	105
30	2967913,7	29,46802893	98

Fonte: Elaborado pelo autor .

Figura 20 - Gráfico da curva matrizada de cabazitaxel em tampão fosfato com 1% de lauril sulfato de sódio.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os parâmetros de linearidade e avaliação do efeito matriz na curva de calibração de cabazitaxel, demonstram que o método é adequado para quantificação de cabazitaxel no estudo de solubilidade e liberação *in vitro*.

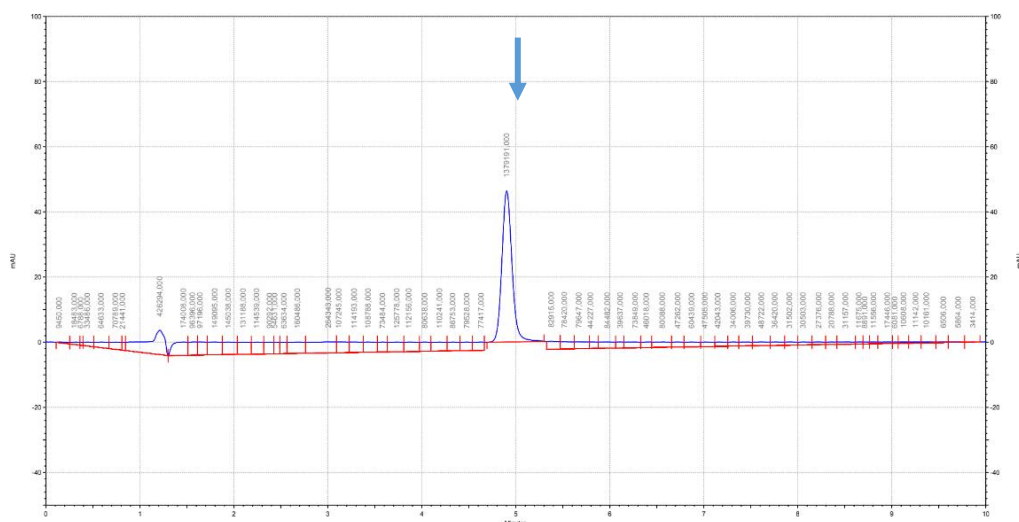
5.6.3 Estudo de solubilidade

A solubilidade do cabazitaxel após 24 horas foi de 0,836 mg/mL. Uma das exigências na determinação do perfil de dissolução *in vitro* de um fármaco é a manutenção das condições sink. Segundo Brown *et al.* (2004), o termo condições sink é definido como sendo o volume do meio três vezes superior ao necessário para criar uma solução saturada do fármaco. As condições sink são tidas em consideração para evitar a saturação do fármaco no meio envolvente, melhorando a velocidade de dissolução das partículas do fármaco.

Para o estudo de dissolução as condições sink permitem que o experimento tenha mais robustez e relevância para o ensaio. O estudo de solubilidade respeitou a regra de condições sink visto que a solubilidade do fármaco foi de 0,836 mg/mL e considerando a concentração final de fármaco no meio receptor o percentual ideal de 10 % da quantidade total

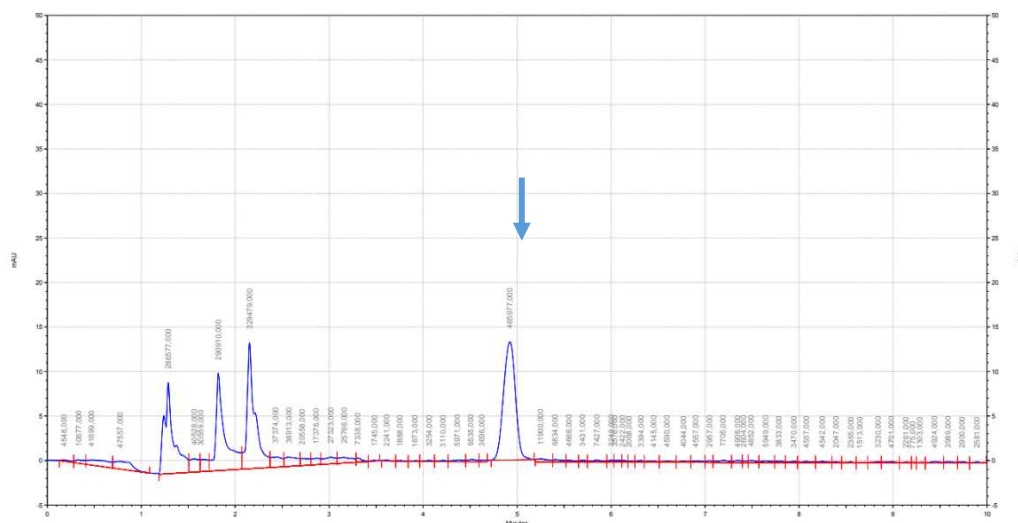
que se consegue solubilizar do cabazitaxel, é fundamental visto que a quantidade dissolvida não deve impactar na taxa de dissolução à medida que a corrida progride evitando a saturação do meio.

Figura 21 - Cromatograma do fármaco cabazitaxel, onde pico característico no tempo de 5 minutos é observado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Cromatograma do cabazitaxel juntamente com tampão fosfato e 1% de lauril sulfato de sódio.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas Figuras 21 e 22 é possível analisar os cromatogramas e identificar os picos do fármaco do cabazitaxel que aparecem no tempo de retenção de 5 minutos na cromatografia líquida de alta eficiência. Já na Figura 22 é possível visualizar o pico do fármaco separado das pequenos picos no início do cromatograma, que possivelmente indicam a presença do lauril sulfato de sódio. Portanto, as análises em HPLC não mostraram interferência do lauril sulfato

de sódio no fármaco, caracterizando uma excelente resolução entre os picos do fármaco e do tensoativo.

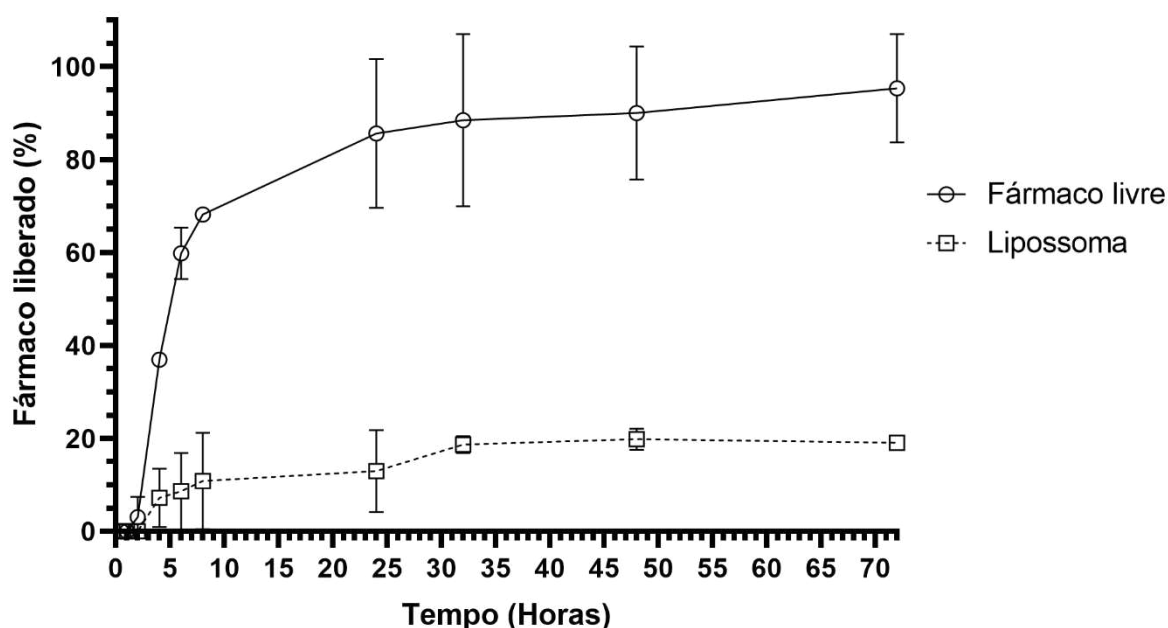
5.6.4 Ensaio de liberação *in vitro*

Observou-se que não houve diferença estatística ($p=1$) entre a liberação do lipossoma com cabazitaxel e fármaco livre entre 1 e 2 horas de ensaio visto que não houve quantificação fármaco liberado, porém existe diferença estatística ($p<0,05$) entre a liberação do lipossoma e fármaco livre nos horários 4, 6, 8, 24, 32, 48 e 72 horas.

O perfil de liberação do fármaco livre empregando membrana de diálise, observado na Figura 22, mostra que 37 % do cabazitaxel foi liberado após as primeiras 4 horas de estudo, 60 %, após 6 horas, 68% após 4 horas, atingindo um platô de 86% após 24 horas, mantendo com poucas variações de liberação até o final do estudo, onde 95 % do fármaco cabazitaxel foi liberado. Diferentemente, nos lipossomas, como é possível observar na Figura 23, há uma liberação inicial do fármaco somente após as 4 horas de início do ensaio, seguida por taxas mais lentas de liberação do medicamento. É possível observar que nas 4 horas iniciais do ensaio foi liberado um percentual de 7 % do fármaco, não variando muito entre os intervalos de 6 e 11 horas onde 9% e 11% de cabazitaxel foram liberados respectivamente, após 24 horas do ensaio houve liberação de 13% de cabazitaxel e ao final do estudo, 19 % do fármaco foi liberado. Comparando com estudo de Fernandes *et al.*, 2020, no qual o lipossoma (SPC: Col: DSPE-PEG-2000) funcionalizado com transferrina, apresentou uma liberação de 16,93% de docetaxel após 24 horas de ensaio, em tampão fosfato pH 7,4 e 31,97% do fármaco foi liberado ao final do estudo. Fernandes *et al.*, 2020 acrescentou que o resultado indicou um tempo maior para o liberação de docetaxel de lipossomas, possivelmente devido à presença de colesterol na bicamada e o revestimento com PEG hidrofílico, funcionando como barreira para o docetaxel e a rápida liberação inicial de fármaco está relacionada ao deslocamento de fármaco na superfície do lipossoma, ou seja, na borda externa da bicamada lipídica. Os taxanos, cabazitaxel e docetaxel, são fármacos com estrutura semelhantes, altamente hidrofóbicos que normalmente se acomodam no meio da bicamada lipídica, suas características, estruturas e propriedades podem justificar a semelhança de resposta em estudos como esse. É possível observar uma concordância entre os resultados, visto que é notável uma redução significativa da liberação do fármaco encapsulado em comparação ao fármaco livre possivelmente pelo mesmo efeito de

barreira que o PEG e colesterol estão exercendo na liberação do fármaco, resultando em uma liberação sustentada e lenta, assim como o pico inicial seguido da redução da liberação está relacionada ao deslocamento do fármaco na superfície lipossomal, no qual o fármaco situado na porção mais interna da bicamada lipídica possui dificuldade em atravessar a barreira hidrofílica criada pelos próprios lipídeos da formulação.

Figura 23 - Perfil de liberação in vitro comparando fármaco a lipossoma contendo cabazitaxel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Já no estudo de Eloy *et al.*, 2020, imunolipossomas contendo docetaxel com constituição lipídica semelhante ao do presente estudo, o perfil de liberação só obteve valores após 12 horas iniciais do estudo, somente após 24 iniciais de ensaio a concentração máxima liberada de docetaxel em tampão fosfato pH 7,4 foi em torno 15 %, não sendo identificado variação significativa desse valor até o final do ensaio, em conformidade com o presente estudo.

A análise de perfil de liberação do fármaco foi realizada pelo DDSolver, extensão e ferramenta do Excel que permite comparação do perfil de dissolução de fármacos e nanopartículas e compreensão desse perfil através de modelagem matemática. O estudo da cinética e da eficiência de dissolução tem aplicação fundamental na avaliação do comportamento de dissolução dos fármacos a partir de um determinado produto farmacêutico.

Estas ferramentas permitem obter dados como, por exemplo, velocidade de dissolução e tempo necessário para dissolução de uma determinada concentração de fármaco. Além disso, permitem comparação entre perfis de dissolução (SERRA; STORPIRTS, 2007). Dentre os métodos utilizados para comparação de perfis de dissolução, destacam-se os modelos que empregam ANOVA (onde se avalia a variância), os modelos independentes, que permitem a determinação dos fatores de diferença (F_1) e de semelhança (F_2) e os modelos dependentes, ou cinéticos. Estes últimos baseiam-se em funções matemáticas que relacionam o percentual dissolvido do fármaco com um determinado intervalo de tempo, com a finalidade de calcular parâmetros que possibilitem a comparação dos perfis, como: constante de velocidade de dissolução (k); meia vida e dissolução ($T_{50\%}$) e quantidade de fármaco dissolvido em um determinado intervalo de tempo (Q) (FLANNER, 1996; YUKSEL, 2000; SERRA, STORPIRTIS, 2007; RAJALAHTI, 2011). Os métodos mais usuais para explorar e prever o perfil de liberação da droga em nanocarreadores são: Peppas, Higuchi, Weibull, Ordem zero e Primeira Ordem, visto que a maioria desses modelos conta com equações de difusão baseadas na composição dos lipossomas e condições de liberação (JAIN *et al.*, 2016).

No presente estudo a avaliação das cinéticas de dissolução das formulações foram realizadas com emprego dos modelos matemáticos de Primeira Ordem, Ordem Zero, Peppas, Higuchi e Weibull. O DDSolver fornece uma série de critérios estatísticos para avaliar a qualidade do ajuste de um modelo, incluindo o coeficiente de correlação ($R_{\text{obs-pre}}$), o coeficiente de determinação (R_{sqr} , R^2 ou COD), o coeficiente ajustado de determinação ($R_{\text{sqr_adj}}$ ou R^2 ajustado), o erro quadrado médio (MSE), o desvio padrão dos resíduos (MSE_root ou $Sy.x$), SS, WSS, o Critério de Informação Akaike (AIC) e o Critério de Seleção de Modelo (MSC). Entre esses critérios, os mais populares no campo da identificação do modelo de dissolução são os R^2 ajustado, o AIC, e o MSC. Para modelos de liberação com o mesmo número de parâmetros, o coeficiente de determinação (R^2) pode ser usado para discriminar o modelo mais adequado, enquanto ao comparar modelos diferentes, o modelo mais adequado será o do maior MSC. É, portanto, muito fácil desenvolver um valor para o que o MSC significa em termos de quão bem o modelo se encaixa nos dados. Geralmente, um valor MSC de mais de dois a três indica um bom ajuste. (AKAIKE H., 1974; MICROMATH, 1995; MAYER *et al.*, 1999). Conforme mostrado na Tabela 17, é evidenciado o coeficiente de determinação e critério de seleção de modelo da formulação e fármaco livre para cada modelo cinético, a cinética de liberação que melhor se aplicou ao fármaco livre e formulação com cabazitaxel encapsulado foi o de Weibull, visto que os parâmetros analisados foram coeficiente

de determinação (R^2) mais próximo de 1, considerado o ideal e MSC com valores positivos, analisando o parâmetro de adequabilidade do método.

Tabela 17 - Valores do coeficiente de determinação obtidos de acordo com modelos dependentes para formulação e fármaco cabazitaxel.

FORMULAÇÃO			FÁRMACO	
Modelo	R^2	MCS	R^2	MSC
Zero Order	0,8	0,18	0,77	-1,15
Firts Order	0,82	0,35	0,92	1,38
Peppas	0,92	0,45	0,89	-0,27
Higuchi	0,88	0,59	0,88	0,57
Weibull	0,96	0,35	0,93	1,37

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como podemos observar na Figura 24 e 25, o gráfico ilustra a condição esperada em um modelo de Weibull para fármaco livre e formulação, respectivamente, juntamente com a condição experimental determinada pelo coeficiente de determinação (R^2) e critério de seleção de modelo (MSC), na Tabela 17, estes resultados se complementam concluindo ser Weibull o modelo cinético com melhor ajuste no método. O modelo cinético de liberação Weibull é um modelo empírico amplamente utilizado para perfis de liberação prolongada de drogas, cuja fundamentação matemática que corresponde ao modelo é demonstrada na equação 4, onde M é a quantidade de fármaco dissolvida em função do tempo t , M_0 é a quantidade total de fármaco no início da liberação. T é o tempo de atraso do início da dissolução. Na maioria das vezes esse valor é igual a zero, α (alfa) denota um parâmetro de escala que descreve a dependência do tempo, enquanto β (beta) descreve a forma de progressão da curva de dissolução, quando $\beta=1$ a curva corresponde com perfil exponencial, e quando β maior que 1 a curva se assemelha a uma sigmoide e quando β menor que 1, a curva mostra um aumento mais acentuado quando $\beta=1$ (JAIN *et al.*, 2016).

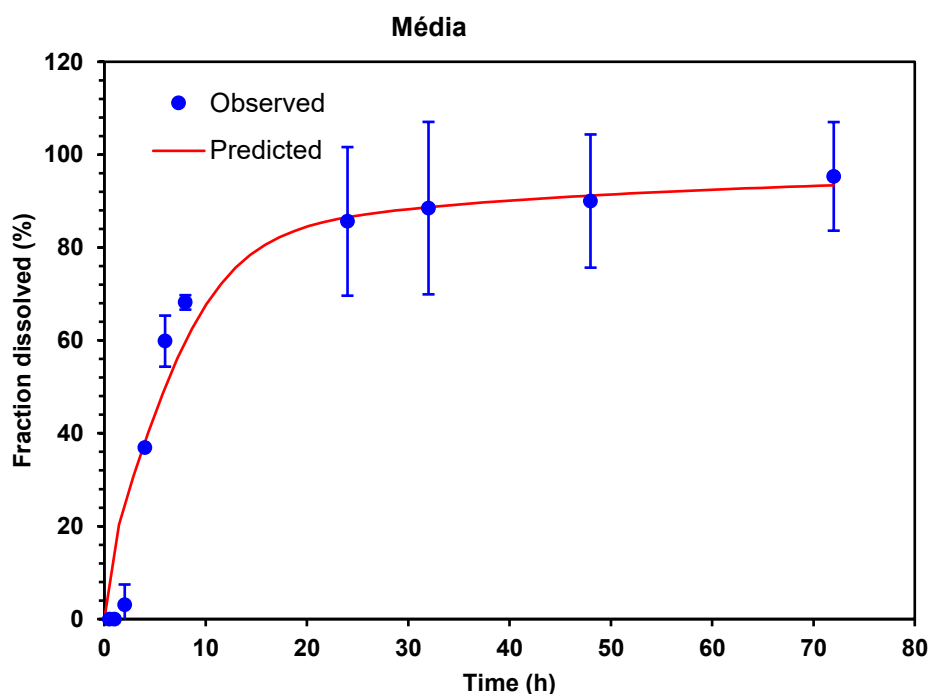
$$M = M_0 \left[1 - e^{-\frac{(t-T)^\beta}{\alpha}} \right] \quad (4)$$

Este modelo cinético já foi avaliado e testado em outros sistemas com constituições diferentes. Wei *et al.* (2014) desenvolveram lipossomas contendo Baicalina para melhorar a biodisponibilidade e os lipossomas mostraram uma liberação sustentada da droga após

liberação de modelo cinético Weibull, e a biodisponibilidade oral foi confirmada no estudo *in vivo* visto que foi aumentada três vezes. Em outro estudo, Chen (2015) preparou lipossomas carregados com oxaliplatina e ácido glicirrético (GA) usando o método de dispersão em filme e resultaram na liberação da oxaliplatina por um longo período de tempo seguindo o modelo Weibull, que foi consistente com os estudos *in vivo*.

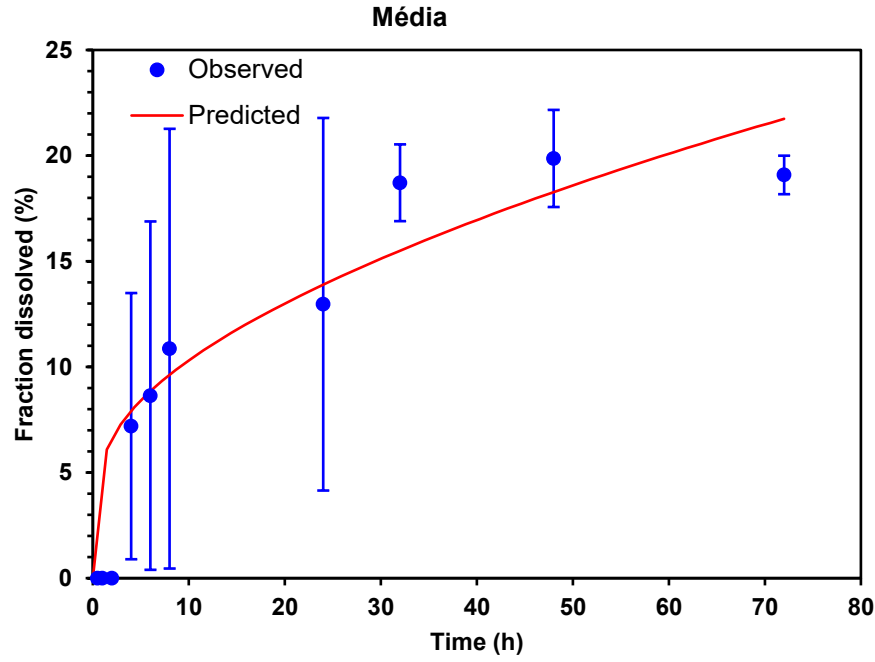
Portanto, compilando as análises é perceptível que houve diferença estatística na liberação entre formulação e fármaco livre a partir da quarta hora do ensaio, significando que o lipossoma apresentou uma liberação muito menor que comparada a do fármaco livre, assegurando que nas condições de pH 7,4 em tampão fosfato com 1 % de lauril sulfato de sódio não houve liberação significativa, confirmando que o lipossoma terá um perfil de liberação sustentada e constante em pH 7,4, conforme já citado no estudo de Fernandes *et al.* (2020), no qual lipossomas encapsulados com docetaxel apresentaram uma redução significativa na liberação em relação ao fármaco livre. Adicionalmente o estudo cinético permitiu concluir que o modelo de Weibull melhor se ajustou ao ensaio, indicando uma melhor correlação dos resultados experimentais com o modelo aplicado.

Figura 24 - Cinética de Weibull aplicada para fármaco cabazitaxel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 - Cinética de Weibull aplicada na formulação dos lipossomas contendo cabazitaxel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo teve êxito na aplicação da estratégia de planejamento fatorial de *Box Behnken* para desenvolvimento de lipossomas encapsulados com cabazitaxel e se mostrou eficiente, visto que foram produzidas nanopartículas com tamanho de partícula, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação satisfatórios conforme o objetivo. Particularmente, no presente trabalho foi demonstrado com a aplicação de modelos estatísticos e definição de equações polinomiais de resposta, onde as melhores condições para preparo do lipossoma foram: o tipo de lipídeo SPC, razão percentual de fármaco/lipídeos 1:20 e razão percentual de colesterol de 10%. A liofilização na proporção de 1:5 de lipossoma e açúcar conservou as características físico-químicas, preservando os lipossomas. Os resultados das caracterizações em estado sólido (DSC e FTIR) evidenciando a encapsulação do fármaco no estado amorfo ou disperso molecularmente nos lipossomas. O estudo morfológico (MFA) comprovou a formação das estruturas vesiculares lipídicas. Por fim, o ensaio de liberação *in vitro* com membrana de celulose e o estudo cinético permitiram concluir que o modelo com melhor ajuste para a liberação de cabazitaxel foi o Weibull. A baixa e lenta liberação de fármaco a partir de lipossomas, lenta, em pH 7,4, simulando as condições do pH sanguíneo, é interessante pois pode significar baixa liberação do fármaco em circulação sanguínea, podendo ser liberado no alvo após a captação tumoral.

REFERÊNCIAS

- ABDELBARY, A. A. et al. Design and optimization of topical methotrexate loaded niosomes for enhanced management of psoriasis: Application of Box–Behnken design, in-vitro evaluation and in-vivo skin deposition study, **International Journal of Pharmaceutics**, Volume 485, Issues 1–2, 2015, Pages 235-243, ISSN 0378-5173. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.020>.
- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freezedrying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations, **Advanced Drug Delivery**. Ver., v.58, p. 1688-1713, 2006.
- ABIDI A. Cabazitaxel: A novel taxane for metastatic castration-resistant prostate cancer-current implications and future prospects. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**. Oct-Dec; 4 (4):230-237, 2013.
- AKAIKE H. Um novo olhar para a identificação do modelo estatístico. **IEEE Trans Automat Control**. 1974; 19:716-23. Doi: 10.1109/TAC.1974.1100705.
- ALLEN C., DOS SANTOS N., GALLAGHER R., CHIU G. N. C, SHU Y., LI W. M, JOHNSTONE S. A., JANOFF A. S., MAYER L.D., WEBB M. S, et al. 2002. Controlling the Physical Behavior and Biological Performance of Liposome Formulations through Use of Surface Grafted Poly (ethylene Glycol). **Bioscience Reports**. 22(2).
- ANDRADE SMS; PEREIRA FL. Câncer Colorretal Sincrônico - Relato de Caso e Revisão de Literatura. **Revista Bras. Coloproct.**, 2007;27(1): 069-079.
- ANDERSON, M.; ABDELWAHAB O. The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations, **DrugDelivery**, 11:1, 33-39, 2004. Disponível em: 10.1080/10717540490265243. Acesso em: 20 outubro de 2020.
- ANGELI, E. et al. Nanotechnology applications in medicine. **Tumori**, v. 94, n. 2, p. 206–215, 2008.
- APOLINÁRIO, A. C.; SALATA, G. C.; BIANCO, A. F. R.; FUKUMORI, C.; LOPES, L. B. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais ‘espaço lá embaixo’. **Química Nova**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 212-225, 2020 .20170481. Doi: 10.21577/0100-4042.20170481.
- BADRAN, M. Formulation and in vitro evaluation of flufenamic acid loaded deformable liposome for improved skin delivery. **Digest J. Nanomater. Biostruct**. 9, 83–91. 84, 2014.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, 2007.
- BANGHAM, A.D., STANDISH, M.M., WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, **J. Mol. Biol**, v. 13, p. 238–252, 1965.

BERMAN, D. M.; RODRIGUEZ, R.; VELTRI, R. Development, Molecular Biology and Physiology of the Prostate. In: KAVOUSSI, L.R.; PARTIN, A.W.; NOVICK, A.; et al. Campbell-Walsh Urology. Filadélfia: **Elsevier**, 2012. 10^aed. P.2533-2570.

BONO J. S. OUDARD S., OZGUR I. M. et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a 81andomized open-label trial. **Lancet**, 376: 1147–1154, 2010.

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

BRASIL, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Câncer da próstata: documento de consenso. Rio de Janeiro; 2015. P. 20.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Política Nacional de Atenção Integral à Saúde do Homem (Princípios e Diretrizes). Brasília; 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC no 166, de 24 de julho de 2017, v. 2017, 2017.

BRITO N. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. Pesticidas (2003): R. Ecotox. Meio Ambiente. 13. 129-146.

BROWN, C. K., CHOKSHI, H. P., NICKERSON B. (2004). Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**, pp. 56-65.

COORS, E. A., SEYBOLD H., MERK H. F., MAHLER V. Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. **Ann Allergy Asthma Immunol**. 2005 Dec; 95(6):593-9. Doi: 10.1016/S1081-1206(10)61024-1. PMID: 16400901.

COSTA, R. J. et al. Biomarcadores em câncer de pulmão, próstata e mama. **Disciplinarum Scientia, Naturais e Tecnológicas**, v. 16, n. 2, p. 169-176, 2015.

CHAND P., KUMAR H., BADDURI N., GUPTA N. V., BETTADA V. G., MADHUNAPANTULA S. V., KESHARWANI S. S., DEY S., JAIN V. Design and evaluation of cabazitaxel loaded NLCs against breast cancer cell lines. **Colloids Surf B Biointerfaces**. 2021 Mar; 199: 111535. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111535.

CHEN, M.; LIU, X.; FAHR, A. Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. **Int. J. Pharm.** Doi: 408, 223–234, 2010.

CHEN J., H. JIANG, Y. WU, LI Y., GAO Y. Drug design, development and therapy 9 (2015) 2265.

CHUNGH H., SOOD D., CHANDRA I., TOMAR V., DHAWAN G. & CHANDRA R. Papel das nanopartículas de ouro e prata na nanomedicina do câncer, células artificiais. **Nanomedicina e biotecnologia**, 2018 46: sup1, 1210-1220 Doi: 10.1080 / 21691401.2018.1449118.

DAS, S.; MISHRA, S. Box-Behnken statistical design to optimize preparation of activated carbon from *Limonia acidissima* shell with desirability approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2017 v. 5, n. 1, p. 588–600. Acesso em 3 de fevereiro 2021.

DEWICK, P. M.; Medicinal Natural Products, a Biosynthetic. **Journal Medicinal Chemistry**. Approach, 3rd ed., Wiley: United Kingdom, 2009.

DELGADO, J. M. F. Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa. 2013. Instituto Politécnico Bragança. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10198/9219>. Acesso: 25 de novembro de 2021.

DORNAS, M. C. Câncer de próstata. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. V. 7, nº 1, 2008. Disponível em: <<https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/9286/7192>>. Acesso em 22 de abr. 2020.

EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY. Guideline Prostate Cancer of European Association of Urology, 2013.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Nanotecnologia. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_0003_45.jsp&mid=WC0b01ac05800baed9. Acesso em 22 de setembro 2021.

ELOY, J.O., DE SOUSA, M.C., PETRILLI, R., BARCELLOS, J.P.A., LEE, R.J., MARCHETTI, J.M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 2014.

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, 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.

ELOY, L. O. et al. EGFR – targeted immunoliposomes efficiently deliver docetaxel to prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111185, 2020.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2011.

FERNANDES A., MARIZA et al. Transferrin-functionalized liposomes for docetaxel delivery to prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2020 v. 611. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/208128>>. Acesso em: 24 out. 2021.

FLANNER, H. H. MOORE, J. W. 1996. Mathematical comparasion of dissolution profiles. **Pharm. Technol.** June, 64-74.

GABIZON A., CATANE R., UZIELY B., KAUFMAN B., SAFRA T., COHEN R., MARTIN F., HUANG A., BARENHOLZ Y. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. **Cancer Res.** 1994 Feb 15;54(4):987-92. PMID: 8313389.

GAUMET M., VARGAS A., GURNY R., DELIE F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Volume 69, Issue 1, 2008, Pages 1-9, ISSN 0939-6411.

HALL, J. E. Funções Reprodutivas e Hormonais Masculinas (e Função da Glândula Pineal). Visão Acadêmica, Curitiba, v.19, n.1, Jan.-Mar./2018-ISSN 1518-8361In: HALL, J. E. Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia Médica. Filadélfia: **Elsevier**, 2011. 12ªed. P.1025-1039.

HENNENFENT, K., GOVINDAN, R. (2006). Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle? **Annals of Oncology**, 17(5), pp.735–749.

HIGGINS C. F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. **Nature**, 446:749-757, 2007.

HOBBS, S. K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of American**, v.95, p.4607-4612, 1998.

HUA, S.; WU, S. Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 143, nov. 2013.

HU C-MJ, ZHANG L. 2009. Therapeutic nanoparticles to combat cancer drug resistance. **Current Drug Metabolism**.:836–841.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, p. 297–315, 2006.

INCA. Insituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Estimativa de 2020: incidência do câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introdução>. Acesso: 14 de setembro de 2021.

INCA. Insituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Detecção precoce do câncer – Rio de Janeiro 2002.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Câncer de próstata – Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/assuntos/cancer-de-prostata>. Acesso: 13 de março de 2021.

JAIN, A.; HURKAT, P.; JAIN, S. K. Development of liposomes using formulation by design: Basics to recent advances. **Chemistry and Physics of Lipids**, [s. l.], v. 224, n. March, p. 104764, 2019. Disponível em: . Acesso em: 28 out. 2021.

JAIN A., JAIN S. K. In vitro release kinetics model fitting of liposomes: an insight, 2016. **Chemistry and Physics of Lipids** Disponível em: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.10.005>. Acesso em : 22 de dezembro de 2021.

JAIN, R. K.; STYLIANOPOULOS, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 653–664, 2010.

KEPCZYNSKI M.; NAWALANY K.; KUMOREK M.; KOBIERSKA A.; JACHIMSKA B.; NOWAKOWSKA M. Which physical and structural factors of liposome carriers control their drug-loading efficiency? **Chemistry Physics of Lipids** 155 (2008) 7–15.

LEE S., LEE K.; KIM J.; LIM S. The Effect of Cholesterol in the Liposome Bilayer on the Stabilization of Incorporated Retinol. **Journal of liposome research**. 15. 157-66, 2005. Disponível em: 10.1080/08982100500364131. Acesso em: 14 nov. 2021.

LAZZARINI R. et al. “Physicochemical stability of cabazitaxel and docetaxel solutions.” **European Journal of Hospital Pharmacy** 22 (2014): 150 - 155.

LEE C., COCKETT A., CUSSENOT O., GRIFFITHS K., ISAACS W., SCHALKEN J. Regulation of prostate growth. In: Chatelain C, Denis L, Foo JKT, editors, et al. Fifth International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia. Plymouth, United Kingdom: **Health Publications**; 2001. p. 81–106.

LEE K.L., PEEHL D. M. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **The Journal of Urology**, 2004;172:1784–9.

LI, S. D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. **Molecular pharmaceutics**, vol. 5, p. 496–504, 2008.

LI, S. D. Factors Controlling the Pharmacokinetics, Biodistribution and Intratumoral Penetration of Nanoparticles. **Journal of Control Release**, 2013.

LILA A.; ISHIDA T.; 2017. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. **Biol Pharm Bull**. 40(1).

LIU, Y.; HUI, Y.; RAN, R.; YANG, G-Z.; WIBOIO, D.; WANG, H-F.; ZHAO C-X. 2018. Synergetic Combinations of DualTargeting Ligands for Enhanced In Vitro and In Vivo Tumor Targeting. **Advanced Healthcare Materials**. 7(15) (1800106).

LEWIS, GARETH A.; DIDIER M.; PHAN-TAN-LUU R. **Pharmaceutical Experimental design**, 1998. New York: Marcel Dekker.

MAEDA, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2015.

MAEDA, H.; GREISH, K.; FANG, J. The EPR effect and polymeric drugs: A paradigm shift for cancer chemotherapy in the 21st century. **Advances in Polymer Science**, 2006.

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. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2013.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. **Advances in Enzyme Regulation**, 2001a.

MAEDA, H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: Advantages in cancer chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001b.

MADEIRA, L. R. Revisão sistemática entre abiraterona e enzalutamida no tratamento de pacientes com câncer de próstata metastático resistente à castração. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17157/tde-23042018-105932/publico/LEANDROROQUEMADEIRACorrig.pdf>. Acesso em: 14 de outubro de 2021.

MARKMAN, J. L., REKECHENETSKIY, A.; HOLLER, E.; LJUBIMOVA, J. Y. 2013. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**.

MAZZARELLA, L.; GUIDA, A.; CURIGLIANO, G. Cetuximab for treating non-small cell lung cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 18, p. 483–493, 2019.

MAHIRA S., KOMMINEM N., HUSAINN G. M., 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 Feb; 110:803-817. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.145. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30554119.

MAYER B. X., MENSİK C., KRISHASWAMI S., HARTMUT D., EICHLER H. G., SCHMTTERER L., WOLZT M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic profile of systemic nitric oxide-synthase inhibition with L-NMMA in humans. **Frei Clin Pharmacol**. 1999; 47:539-44. doi: 10.1046/j.1365-2125.1999.00930.

MATSUDA N., LIM B., WANG X., UENO N.T., 2017. Early clinical development of epidermal growth factor receptor targeted therapy in breast cancer. **Expert Opin. Investig. Drugs** 26, 463–479. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1299707>. Acesso em: 25 de maio de 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: **Incidência do câncer no Brasil**. INCA, Rio de Janeiro, 2019.

MICROMATH. Manual do Usuário Cientista. Lago Salgado: MicroMath; 1995.

MENNA A..M.; KHALIL I. A.; MAHMOUD A. F. Sertaconazole nitrate loaded nanovesicular systems for targeting skin fungal infection: in-vitro, ex-vivo and in-vivo

evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.029>.

MEIRELES, S. et al. Cabazitaxel no tratamento do câncer de próstata metastático resistente à castração. **Arquivo Medicina** [online] vol.29, n.1, pp.02-05, 2015.

MORBECK, I. A. P.; GADIA, R.. Diretrizes Oncológicas: Câncer de Próstata. In: Marcos Santos, Tatiana Strava, Luiza Faria. (Org.). Diretrizes Oncológicas. 1ed. São Paulo: **Elsevier**, 2017, v. 1, p. 293-310.

MUKTHINUTHALAPATI, M. A. & BUKKAPATNAM, V. & PRAMADVARA, K. & GUMMADI S. Stability-indicating RP-HPLC method the determination of cabazitaxel. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research** 3. 9262-9269 (2013).

NAGHIBI BEIDOKHTI, H. R. Preparation, Characterization, and Optimization of Folic Acid-Chitosan-Methotrexate Core-Shell Nanoparticles by Box-Behnken Design for Tumor-Targeted Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 1, p. 115–129, 2017.

NELSON, W. G. et al. Prostate câncer. In: NIEDERHUBER, John E. et al. Abeloff's Clinical Oncology. USA: **Elsevier**, 2020.

NICHOLSON, C.; VELA, I.; WILLIAMS, E.D. Prostate Cancer Metastasis. In: AHMAD, Aamir. Introduction to câncer metastasis. USA: **Academic Press**, 2017.

NIGHTINGALE, G.; RYU, J. Cabazitaxel (Jevtana) A Novel Agent for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **P&T**, v. 37, 2012.

NOMURA D. A., ENOKI T. A., GOLDMAN C., LAMY M. T., Espalhamento Dinâmico de Luz. Instituto de Física, Universidade de São Paulo, 2013.

OLAWALE O. Bamboo leaves as an alternative source for silica in ceramics using Box Behnken design, **Scientific African**, Volume 8, 2020, e00418, ISSN 2468-2276. Disponível em: <http://eprints.lmu.edu.ng/2962/1/Jr%206%20silica%20from%20Bamboo.pdf>. Acesso em 12 de outubro de 2021.

OLIVEIRA A. M. Produção de Nanopartículas Poliméricas com Tamanho Controlado com Pontencial Aplicação na Liberação controlada de agentes antitumorais. 2012. Disponível em: https://propg.ufabc.edu.br/biotecnociencia/Dissert_Defendidas/2014/Anderson%20Marques%20de%20Oliveira.pdf . Acesso em: 28 de nov. 2021.

PRACHAYASITTIKUL V. and PRACHAYASITTIKUL V. P-glycoprotein transporter in drug development. **Excli Journal**, 15:113-118 (2016).

PALANIAPPAN, S. P. K.; MUTHUKUMAR, R.V.; SABARIRA, S.; DINESH, K.; SATHISH, T., 2019. Materials today: Proceedings CNC Turning Process Parameters Optimization on Aluminium 6082 Alloy by Using Taguchi na ANOVA. **Materials today: Proceedings**, Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/337135095_CNC_turning_process_parameters_optimization_on_Aluminium_6082_alloy_by_using_Taguchi_and_ANOVA. Acesso em 02 de novembro de 2020.

PEREIRA, L. C. et al. Adverse reactions to docetaxel: an active survey. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 3, p. 551-559, 2015.

POOVESH M. V.; MIHIR J. J. Surface micro topographical and Dielectric studies of Cholesterol Crystals. **Advanced Materials Research** Vol. 665 (2013) pp 289-296. Doi: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.665.289>. 2013.

PUTRI, D.C.; DWIASTUTI, R.; MARCHABAN, M.; NUGROHO, A.K. Optimization of mixing temperature and sonication duration in liposome preparation. **J. Pharm. Sci. Commun** 14, 79–85, 2017.

PRASAD, R. et al. Bioresponsive carbon nano-gated multifunctional mesoporous silica for cancer theranostics. **Nanoscale**, 2016.

RANE, S.; PRAHAKAR, B. Optimization of paclitaxel containing pH-sensitive liposomes by 3 factor, 3 level box-behnken design. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 4, p 420-426, jul, 2013.

ROEHRNORN C. G., MCCONNELL J. D. Etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. **Campbell's urology**. Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins; 1297–1336.

ROY, B.; GUHA, P.; BHATTARAI, R.; NAHAK, P.; KARMAKAR, G.; CHETTRI, P.; PANDA, A. K. Influence of lipid composition, pH, and temperature on physicochemical properties of liposomes with curcumin as model drug. **Journal of Oleo Science**, v. 65, n. 5, p. 399–411, Dec. 2016.

RUDRA A., DEEPA R. M., GHOSH M. M., MUKHERJEE B. Doxorubicin-loaded phosphatidylethanolamine-conjugated nanoliposomes: in vitro characterization and their accumulation in live, kidneys, and lungs in rats. **International Journal of Nanomedicine** 2010.

RUOZI, B. et al. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. **Talanta**, v. 73, n. 1, p. 12–22, 2007.

SARKAR, P.; BHATTACHARYA, S.; PAL, T. K. Application of statistical design to evaluate critical process parameters and optimize formulation technique of polymeric nanoparticles. **Royal Society Open Science**. 2019 Jul 24;6(7):190896. doi: 10.1098/rsos.190896.

SANTHYAMOORTHY, V.; DEEPAN, S.; SANTHYA PRASANTH S. P.; PRABHU, L. Optimization of Machining Parameters for Surface Roughness in End Milling of Magnesium AM60 Alloy, **Indian Journal of Science and Technology**, v. 10 (32), p. 1-7, 2017. doi: 10.17485/ijst/2017/v10i32/104651.

SUN J., HE Z. G., CHENG G., WANG S. J., HAO X. H. and ZOU M.J. Multidrug resistance Pglycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. Medical science monitor: **International Medical Journal of Experimental and Clinical Research** 10: 5- 14 (2004).

SERRA, C. H. R., STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 79-88, 2007.

SIDDIQUI A., GUPTA V., LIU YY, NAZZAL S. Doxorubicin and MBO -asGCS oligonucleotide loaded lipid nanoparticles overcome multidrug resistance in Adriamycin resistant ovarian cancer cells (NCI/ADR-RES). **Int J Pharm.** 2012 Jul 15;431 (1-2) : 222 -9. Doi: 10.1016/j.ijpharma.2012.04.050. Epub 2012 Apr 25.

SOEMA, PETER C., GEERT J. W., WIM J., JEAN P. A., GIDEON F. K. "Predicting the Influence of Liposomal Lipid Composition on Liposome Size, Zeta Potential and Liposome-Induced Dendritic Cell Maturation Using a Design of Experiments Approach." **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 94: 427–35, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.026>. Acesso em: 02 de novembro de 2019.

SOLANKI, A. B.; PARIKH, J. R.; PARIKH, R. H. Formulation and optimization of piroxicam proniosomes by 3-factor, 3-level Box-Behnken design. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2007.

SONG, Y., TIAN, Q., HUANG, Z., FAN, D., ZHENNAN, S. L., XINRONG, C, XIABO, Y., BIN, D., YIHUI (2014). Self-assembled micelles of novel amphiphilic copolymer cholesterol-coupled F68 containing cabazitaxel as a drug delivery system. **International journal of nanomedicine**. 9. 2307-17. 10.2147/IJN.S61220.

SORRATO, M. T. et al. Espiritualidade e Resiliência em Pacientes Oncológicos. *Saúde e Pesquisa*, v. 9, n. 1, p. 53-63, 2016.

SUDHAKAR; BEERAVELLI; KRISHNA M. C.; MURTHY K. V. R. "Factorial Design Studies of Antiretroviral Drug-Loaded Stealth Liposomal Injectable: PEGylation, Lyophilization and Pharmacokinetic Studies." **Applied Nanoscience** (Switzerland) 6 (1): 43–60, 2016. Disponível em: Acesso em: 14 de novembro de 2020.

SHUBIK, P. Vascularization of tumors: a review. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.103, p.211- 226, 1982.

SHAO Y., ZHAG C., YAO Q., WANG Y., TIAN B., TANG X., WANG Y. Improving cabazitaxel chemical stability in parenteral lipid emulsions using. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, 103 Wenhua Road, Shenyang 110016, China. **Elsevier**, 2013, 52: 1-11.

TAXOTERE®. Sanofi-Aventis. Alemanha: Parque industrial de Höchst, Frankfurt. 2005.

TONON T., SCHOFFEN J. Câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**. 2009; 2(3). Disponível em: cesumar.br/pesquisa/periodicos/index.php/saudepesq/article/viewFile/1189/900. Acesso em: 5 de setembro de 2021.

TOLEDO, L. G. M. Câncer de próstata. Fundação Arnaldo de Vieira de Carvalho. 2020. Disponível em: <https://femsantacasasp.edu.br/artigo-cancer-de-prostata/> . Acessado em: 25 de fevereiro de 2021.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews (Drug Discovery)**, v. 4; p. 145-160, 2005.

TRAN, S. et al. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, n. 44, p. 1–21, 2017.

VAHED, S.Z.; SALEHI, R.; DAVARAN, S.; SHARIFI, S. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 71, p. 1327-1341, 2017.

VERUMI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm. Acta Helvetica**, v. 70, p. 95 – 111, 1995.

VIJAYAKUMAR M. R, KOSURU R., PARAMESWARA R. V., SINGH S. K., SINGH S. Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Volume 33, 2016, Pages 125-135, ISSN 1773-2247, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.02.009> Acesso em: 28 de setembro de 2021.

VORSELEN D, LAIBITIGAN R. D., THERIOT J. A. A mechanical perspective on phagocytic cup formation. **Curr Opin Cell Biol** 2020; 66:112-22. Doi: 10.1016/j.ceb.2020.05.011.

WAGNER, J. R., MOUNT, E. M., & GILES, H. F. Video 25 Design of Factorial Experiments. [s. l.], p. 291–308, 2014.

WARCSH, S.; MONTERO, A. J.; GLUCK, S. (2012). Novel cytotoxic agents in the treatment of metastatic breast cancer. **Current Breast Cancer Reports**, 4, pp. 75-82.

WANG Y., GRAINGER D. W. Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory environments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2019.

WEI Y. J.; GUO, X.; ZHENG, J.; WU Y. Zhou, Y. Yu, Y.; ZHANG L. **International journal of nanomedicine**, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan, 2018.

WOLLIN, D. A; MAKAROV, D. V. Guideline of Guidelines: Prostate Cancer Imaging. **BJU International**, [s.l.], p.n/a-n/a, 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/bju.13104>. Acesso em 25 de novembro de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer: Key facts. 2018.

XU, X.; LONDON, E. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. **Biochem**, v.39, n.5, p.843-849, 2000.

YARED, J. A.; TKACZUK, K. H. R. (2012). Update on taxane development: new analogs and new formulations. **Drug Design, Development and Therapy**, 6, pp. 371-384.3623

YIN X.; LUO L.; LI W. et al. A cabazitaxel liposome for increased solubility, enhanced antitumor effect and reduced systemic toxicity, 2018. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Disponível em: . 10.004 Acesso em: 12 de novembro de 2020.

YUKSEL, N. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA based, model dependent and independent methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 209, n. 1, p.57-67, Beijin, China, 2014.

ZHOUG G., JIN X., ZHU P., YAO J., ZHANG Y., TENG L., LEE R. J., ZHANG X., HONG W. Human Serum Albumin Nanoparticles as a Novel Delivery System for Cabazitaxel. *Anticancer Res.* 2016 Apr;36(4):1649-56. PMID: 27069142.

ZHUANG B., DU L., XU H., XU X., WANG C., FAN Y., CONGA M., YIN J., LI H., GUAN H. Self-assembled Micelle Loading Cabazitaxel for therapy of Lung Cancer. 2016, **International Journal Pharmaceutis**. Feb 29;499(1-2):146-155. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.12.073.

ZHU L., TORCHILIN V. P. Nanopreparações responsivas a estímulos para o direcionamento de tumores. **Integrative Biology**; 5: 96–107, 2013.