



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ELIAS DA SILVA SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOLIPOSSOMAS ANTI-EGFR CONTENDO  
CABAZITAXEL: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE *IN VITRO* CONTRA CÂNCER DE PRÓSTATA**

**FORTALEZA**

**2023**

ELIAS DA SILVA SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOLIPOSSOMAS ANTI-EGFR CONTENDO  
CABAZITAXEL: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE *IN VITRO* CONTRA CÂNCER DE PRÓSTATA

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
título de mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Biologia para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

Coorientador: Profa. Dra. Raquel Petrilli Eloy

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a)

---

S234 Santos, Elias da Silva.

Desenvolvimento de imunolipossomas anti-EFGR contendo cabazitaxel: caracterização físico-química e avaliação da atividade in vitro contra câncer de próstata / Elias da Silva Santos. – 2023. 120 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.

Coorientação: Prof. Dr. Raquel Petrilli Eloy.

1. Anticorpos monoclonais. 2. Câncer de Próstata. 3. Receptor de Crescimento Epidérmico. 4. Formulação. I. Título.

CDD 615

---

ELIAS DA SILVA SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOLIPOSSOMAS ANTI-EGFR CONTENDO  
CABAZITAXEL: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE *IN VITRO* CONTRA CÂNCER DE PRÓSTATA

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
título de mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Biologia para Saúde.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Josimar de Oliveria Eloy (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes  
Universidade Estadual do Ceará (UFC)

A Deus,  
os meus pais, José e Mita, meus pilares centrais

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) de acordo com o projeto: CNPq nº 12/2018 – Pesquisas de Inovação em Saúde – Processo: 440755/2018-2. Durante meu primeiro ano de mestrado obtive bolsa por meio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por isso, meus sinceros agradecimentos a estas duas instituições.

Aos meus orientadores Professor Dr. Josimar Eloy e Professora Dra. Raquel Petrilli Eloy por terem confiado a mim a execução deste projeto e por serem tão pacientes, dedicados e atenciosos em todos os momentos.

A todos os integrantes do laboratório CEDEFAR/GPNANO que contribuíram imensamente na execução deste trabalho tanto na parte experimental quanto na escrita.

À minha prima Emanuelle Kelly e meu irmão Salomão que sempre me incentivaram a continuar mesmo quando houveram muitas barreiras a serem enfrentadas.

Aos meus pais José e Mita, pelo incentivo aos estudos e apoio incondicional durante toda minha trajetória, sem eles nada disso seria possível.

Ao meu companheiro Thiago, por toda a assistência em todas as decisões que tomei e por compreender minha ausência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará e todo seu quadro docente do curso de farmácia que me incentivaram a percorrer o caminho da pesquisa científica.

## RESUMO

Os lipossomas funcionalizados com anticorpos monoclonais surgem como um tratamento alvo específico contra o câncer, apresentando liberação sustentada, acumulação passiva no ambiente tumoral, proteção do fármaco, além de permitir interação com ligação de alta afinidade com um receptor superexpresso nas células tumorais. Assim, objetivou-se nesse trabalho desenvolver imunolipossomas com alta especificidade para o Receptor de Crescimento Epidérmico (EGFR) contendo o fármaco cabazitaxel, realizar sua caracterização físico-química e avaliar eficácia *in vitro* em linhagens de câncer de próstata. A formulação que apresentou os melhores resultados foi aquela contendo Fosfatidilcolina de soja (SPC), colesterol (10% molar), proporção fármaco:lipídio de 1:20, para obtenção de tamanho de partícula adequado ( $136,7 \pm 2,21$  nm), índice de polidispersividade (PDI) baixo ( $0,335 \pm 0,01$ ) e alta eficiência de encapsulação (EE) ( $93,78 \pm 0,71\%$ ). Selecionou-se a proporção 10% molar de DSPE-PEG-Maleimida e 2 mg de anticorpo para o processo de conjugação, evidenciando uma eficiência de funcionalização de 40%. Verificou-se nas análises em estado sólido (DSC, FTIR e Difração de Raios-X) que o fármaco está em estado amorfo e que os grupamentos químicos do fármaco e do anticorpo estavam presentes na estrutura da nanopartícula. O estudo de liberação mostrou que 19% do fármaco foi liberado do lipossoma após 72 horas de ensaio e que o modelo cinético de Weibull melhor se aplicou para esta formulação, enquanto o imunolipossoma liberou apenas 5% e teve uma cinética de primeira ordem. Com relação a atividade biológica *in vitro*, foram avaliadas as IC<sub>50</sub> das linhagens PC3 (baixa expressão de EGFR) e DU145 (alta expressão de EGFR). Os resultados de IC<sub>50</sub> foram:  $2,34 \pm 1,34$  nM para imunolipossomas;  $3,48 \pm 0,06$  nM para o fármaco livre e  $2,98 \pm 0,77$  nM para o lipossoma na linhagem DU145. Já para PC3, o fármaco livre apresentou uma IC<sub>50</sub> de  $23,20 \pm 1,62$  nM; os lipossomas  $35,79 \pm 14,70$  nM e os imunolipossomas  $29,72 \pm 7,72$  nM. A análise em citometria de fluxo, permitiu observar que com 4 horas, nas duas linhagens houve baixo *uptake*, porém, o imunolipossoma foi mais internalizado ( $15,5 \pm 2,6\%$  na DU145 e  $6,2 \pm 0,4\%$  na PC3). Já com 24 horas, a PC3 internalizou mais o lipossoma ( $93,0 \pm 0,7\%$ ) e na DU145 o imunolipossoma foi mais internalizado ( $81,8 \pm 0,4\%$ ). Assim, foi possível desenvolver lipossomas e imunolipossomas com liberação controlada, atividade biológica *in vitro* pronunciada em baixas concentrações e altos graus de internalização celular após 24 horas.

**Palavras-chave:** Imunolipossomas; Cetuximabe; Cabazitaxel

## ABSTRACT

Liposomes functionalized with monoclonal antibodies appear as a specific target treatment against cancer, with sustained release, passive accumulation in the tumor environment, drug protection, in addition to allowing interaction with high affinity binding with a receptor overexpressed in tumor cells. Thus, the objective of this work was to develop immunoliposomes with high specificity for the Epidermal Growth Receptor (EGFR) containing the drug cabazitaxel, perform their physicochemical characterization and evaluate in vitro efficacy in prostate cancer cell lines. The formulation that showed the best results was the one containing soy phosphatidylcholine (SPC), cholesterol (10% molar), drug:lipid ratio of 1:20, to obtain adequate particle size ( $136.7 \pm 2.21$  nm), low polydispersity index (PDI) ( $0.335 \pm 0.01$ ) and high encapsulation efficiency (EE) ( $93.78 \pm 0.71\%$ ). A 10% mole ratio of DSPE-PEG-Maleimide and 2 mg of antibody was selected for the conjugation process, showing a functionalization efficiency of 40%. It was verified in the solid state analyzes (DSC, FTIR and X-Ray Diffraction) that the drug is in an amorphous state and that the chemical groups of the drug and the antibody were present in the structure of the nanoparticle. The release study showed that 19% of the drug was released from the liposome after 72 hours of testing and that the Weibull kinetic model best applied to this formulation, while the immunoliposome released only 5% and had first-order kinetics. Regarding the in vitro biological activity, the IC<sub>50</sub> of the PC3 (low EGFR expression) and DU145 (high EGFR expression) strains were evaluated. IC<sub>50</sub> results were:  $2.34 \pm 1.34$  nM for immunoliposomes;  $3.48 \pm 0.06$  nM for the free drug and  $2.98 \pm 0.77$  nM for the liposome in the DU145 lineage. As for PC3, the free drug showed an IC<sub>50</sub> of  $23.20 \pm 1.62$  nM;  $35.79 \pm 14.70$  nM liposomes and  $29.72 \pm 7.72$  nM immunoliposomes. Flow cytometry analysis showed that at 4 hours, both strains had low uptake, however, the immunoliposome was more internalized ( $15.5 \pm 2.6\%$  in DU145 and  $6.2 \pm 0.4\%$  in PC3). At 24 hours, PC3 internalized the liposome more ( $93.0 \pm 0.7\%$ ) and in DU145 the immunoliposome was more internalized ( $81.8 \pm 0.4\%$ ). Thus, it was possible to develop liposomes and immunoliposomes with controlled release, pronounced in vitro biological activity at low concentrations and high degrees of cellular internalization after 24 hours.

**Keywords:** Immunoliposomes; Cetuximab; Cabazitaxel



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma no Brasil.....	21
Figura 2: Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da próstata).....	22
Figura 3: Células tumorais extravasando para circulação sistêmica.....	23
Figura 4: Invasão do tecido ósseo por células tumorais prostáticas.....	24
Figura 5: Estrutura do cabazitaxel [(1S, 2S, 3R, 4S, 7R, 9S, 10S, 12R, 15S) -4-acetiloxi-1-hidroxi-15-[(2R,3S)-2-hidroxi-3-[(2-metilpropano-2-il)oxicarbonilamino]-3-fenilpropanoil]oxi-9,12-dimetoxi-10,14,17,17-tetrametil-11-oxo-6-oxatetracicloheptadec-13-en-2il]benzoato. C <sub>45</sub> H <sub>57</sub> NO <sub>14</sub> . Massa molecular: 894,01 unidades. Os círculos vermelhos evidenciam os grupamentos metóxi que substituíram as hidroxilas presentes na molécula do docetaxel.....	25
Figura 6: Estrutura geral dos lipossomas.....	29
Figura 7: Classificações dos lipossomas. (A) Unilamelares pequenos. (B) Unilamelares grandes. (C) Vesículas Multilamelares. (D) Lipossomas multivesiculares.....	30
Figura 8: Mecanismo de internalização do imunolipossoma.....	32
Figura 9: Funcionalização do lipossoma com anticorpo monoclonal.....	33
Figura 10: Representação de um modelo Box-Behnken por três fatores.....	41
Figura 11: Esquema da reação de funcionalização do lipossoma com anticorpo monoclonal....	44
Figura 12: Esquema da metodologia de liberação in vitro para os lipossomas e imunolipossomas.....	53
Figura 13: Gráficos de contorno para variáveis independentes e sua influência em eficiência de encapsulação.....	63
Figura 14: Gráficos de superfície 3D para variáveis independentes e sua influência em eficiência de encapsulação.....	64
Figura 15: Gráficos de contorno para variáveis independentes e sua influência em tamanho de partícula.....	64
Figura 16: Gráfico de superfície 3D para variáveis indepentes e sua influência em tamanho de partícula.....	65
Figura 17: Gráficos de contorno para variáveis independentes e sua influência em PDI.....	65
Figura 18: Gráficos de superfície 3D para variáveis independentes e sua influência em PDI..	65
Figura 19: Gráfico de distribuição de partículas para os lipossomas da formulação 5.	

Composição da formulação 5: SPC; Cabazitaxel; colesterol; DSPE-PEG-200 (razões molares de 80;5;10;5, respectivamente).....	67
Figura 20: Cromatograma do Lipossoma contendo Dio eluído na coluna de Sepharosa CL-4B.....	70
Figura 21: Cromatograma do Imunolipossoma contendo 3,6 mg de DSPE-PEG-Maleimida para 1 mg de anticorpo.....	70
Figura 22: Cromatograma do Imunolipossoma contendo 7,2 mg de DSPE-PEG-Maleimida para 2 mg de anticorpo.....	71
Figura 23: Gráfico de distribuição de partículas para imunolipossomas produzidos com 2 mg de anticorpo e 7,2 mg de DSPE-PEG-Maleimida.....	72
Figura 24: Resultado da Eletroforese em Gel sob condições redutoras para avaliação da estrutura primária do anticorpo após o processo de funcionalização dos lipossomas. A – Marcador de peso molecular. B - Cetuximabe. C – Imunolipossoma com fármaco.....	74
Figura 25: Curvas de DSC de 25 a 400°C com picos endotérmicos voltados para a parte inferior no gráfico. (A) Fármaco livre. (B) Lipossoma Branco. (C) Lipossoma com fármaco. (D) Imunolipossoma Branco. (E) Imunolipossoma com fármaco.....	76
Figura 26: Curvas da análise termogravimétrica. (A) Fármaco livre. (B) Lipossoma Branco. (C) Lipossoma com fármaco. (D) Imunolipossoma Branco. (E) Imunolipossoma com fármaco.....	77
Figura 27: Padrões de difração de raios-x. (A) Fármaco livre. (B) Lipossoma Branco. (C) Lipossoma com fármaco. (D) Imunolipossoma Branco. (E) Imunolipossoma com fármaco....	79
Figura 28: Espectro de FTIR de 4000 a 600 cm <sup>-1</sup> para o fármaco cabazitaxel, lipossoma branco e lipossoma com fármaco. (A) Fármaco livre. (B) Lipossoma Branco. (C) Lipossoma com fármaco. No espectro foram indicados com as setas pretas os picos do estiramento N-H de amida em 3518 cm <sup>-1</sup> e 1520 cm <sup>-1</sup> e vibração da ligação éster próximo a 725 cm <sup>-1</sup> (no cabazitaxel livre) e próximo a 1650 cm <sup>-1</sup> (no lipossoma com fármaco) e com a seta azul o estiramento do grupo P=O em 1055 cm <sup>-1</sup> .....	81
Figura 29: Espectro de FTIR de 4000 a 600 cm <sup>-1</sup> para o anticorpo cetuximabe, lipossoma branco e imunolipossoma branco. (A) Cetuximabe. (B) Lipossoma Branco. (C) Imunolipossoma branco. No espectro foram indicados com as setas azuis os picos da vibração de estiramen devido aos grupos O-H em 3290 cm <sup>-1</sup> , a vibração atribuída ao estiramento assimétrico de C-H em 2930 cm <sup>-1</sup> , o pico correspondente ao grupamento N-H em 1640 cm <sup>-1</sup> , estiramento C=O em 1728 cm <sup>-1</sup> e a ligação N-O em 1370 cm <sup>-1</sup> .....	81
Figura 30: Avaliação da estabilidade coloidal de lipossomas e imunolipossomas com e sem fármaco	

de 0 a 30 dias de armazenamento em geladeira.....	84
Figura 31: Ensaio de determinação da linearidade para cabazitaxel.....	85
Figura 32: Ensaio de determinação da linearidade para cabazitaxel a partir da curva matrizada.....	86
Figura 33: Cromatograma da análise do lipossoma em HPLC evidenciando os componentes da matriz saindo no início da corrida e o fármaco sendo detectado em torno de 5 minutos.....	87
Figura 34: Cromatograma da análise do imunolipossoma em HPLC evidenciando os componentes da matriz saindo no início da corrida e o fármaco sendo detectado em torno de 5 minutos.....	87
Figura 35: Perfil de liberação in vitro comparando fármaco, lipossoma e imunolipossoma contendo cabazitaxel.....	89
Figura 36: Perfil cinético de Weibull aplicado a curva de liberação do lipossoma.....	93
Figura 37: Perfil cinético de Primeira Ordem aplicado a curva de liberação do Imunolipossoma.....	94
Figura 38: Perfil de liberação in vitro utilizando a porcentagem de fármaco remanescente vs o tempo de ensaio para lipossoma e imunolipossoma contendo cabazitaxel.....	95
Figura 39: Viabilidade celular das formulações (fármaco livre, lipossomas e imunolipossomas) para as linhagens celulares. (A) DU145. (B) PC3. Teste Two-Way Anova com pós teste de tukey. * $p < 0,05$ .....	96
Figura 40: Viabilidade celular das formulações (Lipossoma branco e imunolipossoma branco) para as linhagens celulares. (A) DU145. (B) PC3.....	97
Figura 41: Imagens obtidas por citometria usando lipossoma branco com fluoróforo Dio para linhagem DU145. (A) 4 horas de ensaio. (B) 24 horas de ensaio. (I) Lipossoma. (II) Imunolipossoma.....	100
Figura 42: Imagens obtidas por citometria de fluxo usando lipossoma branco com fluoróforo Dio para linhagem PC3. (A) 4 horas de ensaio. (B) 24 horas de ensaio. (I) Lipossoma. (II) Imunolipossoma.....	101
Figura 43: Resultados do Uptake celular avaliado por citometria de fluxo para lipossomas e imunolipossomas nas linhagens DU145 e PC3. **** correspondente a $p < 0,0001$ .....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de variáveis independentes: tipo de lipídio, razão fármaco:lipídeo e percentual molar de colesterol.....	41
Tabela 2: Variáveis fixas empregadas nos ensaios: a quantidade do lipídio de 20mg e a quantidade de DSPE-PEG-2000, de 5% em relação aos lipídios.....	42
Tabela 3: Matriz dos experimentos baseada na combinação das variáveis.....	42
Tabela 4: Planejamento dos ensaios após associação das variáveis não-fixas .....	43
Tabela 5: Resultados da caracterização físico-química (eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta) de lipossomas contendo cabazitaxel. ....	589
Tabela 7: Valores de p obtidos para análise de regressão linear múltipla (*p<0,05).....	61
Tabela 8: Teste de correlação de Pearson para tamanho de partícula, PDI e eficiência de encapsulação (*p<0,05).....	62
Tabela 9: Caracterizações físico-químicas dos imunolipossomas funcionalizados com 1 mg e 2 mg de anticorpo. ....	722
Tabela 10: Caracterização da formulação com crioprotetor em diferentes proporções após a liofilização .....	755
Tabela 11: Curva de calibração, áreas encontradas para o pico do cabazitaxel, cálculo do valor encontrado para cada ponto da curva a partir da equação da reta e recuperação encontrada para cada ponto.....	86
Tabela 12: Avaliação da recuperação de cabazitaxel em diferentes pontos da curva de calibração de curva com adição de lauril sulfato de sódio.....	87
Tabela 13: Análise do teste de variância (ANOVA One-Way) para os perfis de liberação in vitro das formulações. * Valores de p < 0,005.....	911
Tabela 14: Valores do coeficiente de determinação e MSC obtidos de acordo com modelos matemáticos para formulações e fármaco cabazitaxel.....	933
Tabela 15: IC50 das formulações testadas nas duas linhagens celulares (PC3 e DU145) com seus respectivos desvios padrões.....	999

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	<i>Antibody Drug Conjugate</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BBD	<i>Box-Behnken Design</i>
BCA	Ácido Bicinconínico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DIO	3,3'-Dioctadeciloxacarbocianina perclorato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOE	<i>Design of Experiments</i>
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPC	Dipalmitoilposfatidilcolina
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG	1,2-diestearoil-rac-glicero-3-metilpolioxietileno – Polietilenoglicol
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EE	Eficiência de Encapsulação
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EPR	Efeito de Permeabilidade e Retenção Aprimorados
FBS	Soro Bovino Fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FR	Receptor de Folato
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSPC	Fosfatidilcolina Colina de soja Hidrogenada
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
LHRH	Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
mAbs	Anticorpos monoclonais

mCRPC	Câncer de Próstata Metastático Resistente à Castração
MDR-1	Gene de Resistência a Múltiplas Drogas
MSC	<i>Model Selection Criterion</i>
MTT	(Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
PDI	Índice de Polidispersividade
P-gp	Glicoproteína-P
PSA	Antígeno Prostático Específico
QbD	<i>Quality by Design</i>
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SPC	Fosfatidilcolina de Soja
SQR	Substância Química de Referência
TfR	Receptor de Transferrina
TGA	Termogravimetria
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\xi$	Carga Superficial
$\mu\text{L}$	Microlitros
kV	Quilovolt
mA	Miliampére
mV	Milivolt
kHz	Quilohertz
kDa	Quilodalton
nM	Nanômetro
®	Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Panorama epidemiológico do câncer de próstata.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Progressão do câncer de próstata .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Diagnóstico e tratamentos disponíveis.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Cabazitaxel.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>Lipossomas e Imunolipossomas como sistema de liberação de fármacos antineoplásicos .....</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>Anticorpo monoclonal anti-EGFR (cetuximabe) na terapia antineoplásica.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.1</b>	<b><i>Substâncias químicas.....</i></b>	<b>39</b>
<b>4.1.2</b>	<b><i>Equipamentos e acessórios.....</i></b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Desenvolvimento das formulações por planejamento fatorial.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo de lipossomas.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4</b>	<b>Conjugação dos lipossomas com o anticorpo monoclonal anti-EGFR.....</b>	<b>44</b>



4.4.1	<i>Método de quantificação das proteínas com ácido bicinconínico (BCA)</i> .....	45
4.4.2	<i>Avaliação da presença do anticorpo por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i> .....	46
4.5	<b>Caracterização físico-química dos lipossomas e imunolipossomas</b> .....	47
4.5.1	<i>Análise de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta</i> .....	47
4.5.2	<i>Eficiência de encapsulação</i> .....	47
4.5.3	<i>Liofilização das formulações</i> .....	49
4.5.4	<i>Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	49
4.5.5	<i>Análises térmicas: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e termogravimetria</i> .....	49
4.5.6	<i>Difração de Raio-x</i> .....	49
4.5.7	<i>Estabilidade Coloidal</i> .....	50
4.6	<b>Método analítico para quantificação de cabazitaxel (CTX) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> . ....	50
4.7	<b>Estudo de liberação <i>in vitro</i> dos lipossomas e imunolipossomas contendo cabazitaxel</b> .....	51
4.7.1	<i>Avaliação da solubilidade do cabazitaxel</i> .....	51
4.7.2	<i>Metodologia de avaliação da liberação <i>in vitro</i> pelo método da bolsa de diálise</i> . ....	51
4.8	<b>Cultivo Celular</b> .....	54
4.8.1	<i>Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i></i> .....	54
4.8.2	<i>Avaliação do uptake celular por citometria de fluxo</i> .....	55
4.9	<b>Análises estatísticas</b> .....	56
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57

5.1	Desenvolvimento dos lipossomas contendo cabazitaxel.....	57
5.2	Funcionalização dos lipossomas com o anticorpo monoclonal anti-EGFR...	67
5.3	Avaliação da presença do anticorpo por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	73
5.4	Liofilização das nanopartículas.....	74
5.5	Análises térmicas: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) .....	76
5.6	Análise de Difração de Raios-X.....	78
5.7	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)....	79
5.8	Estabilidade Coloidal.....	82
5.9	Quantificação do cabazitaxel em ensaio de liberação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) .....	84
5.10	Estudo de liberação <i>in vitro</i> dos lipossomas e imunolipossomas contendo cabazitaxel.....	88
5.11	Avaliação de lipossomas e imunolipossomas em cultura celular.....	95
5.11.1	<i>Avaliação da citotoxicidade in vitro</i> .....	95
5.11.2	<i>Avaliação da uptake celular de lipossomas e imunolipossomas por citometria de fluxo</i> .....	99
6	CONCLUSÃO.....	105
7	REFERÊNCIAS.....	106

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grande problema de saúde pública a nível internacional e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países do mundo. Para o Brasil, estimou-se para cada ano do triênio 2020-2022, 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) e foi estimado um valor de 65 840 novos casos de câncer de próstata em cada ano do triênio 2020-2022, o que o tornou, o mais incidente do país nesse período, ocupando a 1ª colocação em todas as regiões (sem considerar os tumores de pele não-melanoma) (INCA, 2019).

No caso dos tumores de próstata localizados, pode ser realizada a prostatectomia radical, radioterapia externa, braquiterapia e/ou terapia hormonal. Já o tratamento das neoplasias prostáticas avançadas baseia-se na manipulação hormonal, com o bloqueio da testosterona a níveis de castração (agonistas LHRH, anti-androgênicos, estrógenos) associado ou não com bloqueio hormonal cirúrgico. Quando ocorre resistência do tumor ao tratamento hormonal, 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 não responda ao uso do docetaxel, é indicada a segunda linha de tratamento, o cabazitaxel associado a prednisona (BRASIL, 2015; NELSON, 2020; NICHOLSON; VELA; WILLIAMS, 2017).

Considerando a quimioterapia, o cabazitaxel é um fármaco aprovado pela FDA em 2010, para uso em câncer de próstata refratário ao tratamento com docetaxel. O cabazitaxel faz parte da classe do taxanos e difere da molécula do docetaxel por apresentar dois grupamentos metoxi nos carbonos 7 e 10 da estrutura, o que confere a ele duas vantagens: falta de afinidade pela glicoproteína-P envolvida com o mecanismo de resistência a múltiplos fármacos e melhora a penetração através da barreira hematoencefálica (PALLER, ANTONARAKIS, 2011)

Nesse contexto, a nanotecnologia surge como uma opção vantajosa para o desenvolvimento de novas formulações para quimioterápicos, como o cabazitaxel. Nanocarreadores de fármacos são sistemas coloidais com partícula em tamanho nanométrico que podem transportar fármacos antineoplásicos de baixa massa molar, genes ou proteínas, de maneira que com uma abordagem de terapia alvo direcionada, com a vantagem de baixa interação com tecidos saudáveis e acumulação aumentada em tumores. Além disso, os nanocarreadores protegem o fármaco da degradação, aumentam a carga útil de fármacos

citotóxicos, permitem o controle da cinética de liberação e melhoram a solubilidade (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MERDADE, 2015).

Levando em consideração o uso potencial de nanopartículas no tratamento de tumores sólidos, lipossomas são uma alternativa viável para o tratamento de câncer, visto que, são vesículas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, podendo encapsular substâncias lipofílicas e hidrofílicas, além de serem biodegradáveis e não-imunogênicos. Além disso, os lipossomas protegem o fármaco da degradação e são estáveis na corrente sanguínea, permitindo uma liberação controlada do fármaco no ambiente tumoral, já que ele pode se acumular passivamente no tumor graças ao efeito de permeabilidade e retenção aumentados (efeito EPR), característico de tumores sólidos (NSAIRAT et al., 2022). Diversos lipossomas já estão disponíveis no mercado, tais como o Doxil®/Caelyx®, constituído de lipossomas peguilados injetáveis encapsulando doxorubicina (DOX) para câncer de mama, sarcoma de kaposi e câncer ovariano, aprovado em 1995 e o Depocit®, lipossomas contendo citarabina para uso contra meningite neoplástica e meningite linfomatosa (LI et al, 2019).

Além da acumulação passiva dos lipossomas em tumores sólidos, é possível conjugar uma molécula de direcionamento ativo na superfície deste nanocarreador. No caso, para este estudo, buscou-se funcionalizar os lipossomas com anticorpos monoclonais anti-EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico), cetuximabe, e assim obter imunolipossomas. Dessa forma, com os imunolipossomas é possível aumentar as taxas de internalização celular do nanocarreador, já que o anticorpo monoclonal inserido na superfície irá formar um complexo ligante-receptor com uma molécula superexpressa nas células tumorais e permitirá um processo de endocitose mediada por ligante. Diante do exposto, os imunolipossomas permitiriam a proteção do fármaco na corrente sanguínea, evitando a liberação do ativo em tecidos saudáveis e garantiria a liberação direcionada do fármaco à célula tumoral (MERINO; ZALBA; GARRIDO, 2018).

Visando a entrega seletiva do cabazitaxel a tumores de próstata, o alvo molecular EGFR possui grande potencial, visto que está superexpresso em um terço dos cânceres de origem epitelial, como, colorretal, mama, próstata, bexiga, pulmão, e também próstata. A ativação desse receptor estimula a proliferação de células tumorais, angiogênese, invasão e metástase através da ativação de várias vias de sinalização, como MAPK, Vias PI3K / Akt, NF- $\kappa$ B e PLC- $\gamma$ . A expressão do EGFR aumenta durante a história natural do câncer de próstata, e ocorre superexpressão do mesmo quando o tumor passa a ser independente a andrógenos (REZAIEMANESH, 2010; MALMBERG; TOLMACHEV; ORLOVA, 2011). Além disso, o

EGFR pode promover a disseminação tumoral e induzir a metástase e, portanto, pode ser considerado como um marcador de alto potencial metastático. No caso do tumor de próstata, o EGFR tem um papel primordial na tumorigênese e progressão (NASTALY et al, 2020).

Dessa forma, o cetuximabe (anti-EGFR) é uma imunoglobulina quimérica humano-murina do tipo IgG1 monoclonal que se liga competitivamente ao domínio extracelular do EGFR impedindo a ativação do receptor por ligantes endógenos e atualmente é utilizado para tratamento do câncer colorretal metastático, câncer de cabeça e pescoço e de pulmão de células não-pequenas. Cathomas et al (2012), avaliou o uso de cetuximabe associado ao docetaxel para câncer de próstata resistente à castração em estudo clínico fase 2, de forma que, a combinação do anticorpo monoclonal com o fármaco, apresentou uma eficácia muito maior nos pacientes que apresentavam expressão elevada de EGFR. Com isso, levando em consideração a alta afinidade do anticorpo monoclonal cetuximabe pelo alvo EGFR, hipoteticamente um imunolipossoma funcionalizado com cetuximabe poderia ter liberação seletiva de cabazitaxel em câncer de próstata (DEQUANTER *et al*, 2010; BRASIL, 2018; MAZZARELLA; GUIDA; CURIGLIANO, 2019).

Diante do exposto, a quimioterapia tradicional apresenta vários efeitos colaterais por conta da sua falta de especificidade terapêutica, afetando células saudáveis e gerando toxicidade em diversos tecidos, de maneira que as nanopartículas surgem como alternativa para garantir a entrega seletiva de fármaco antitumorais. Nesse ínterim, os imunolipossomas apresentam a vantagem de se acumular passivamente no tumor e por conta dos anticorpos presentes em sua superfície, conseguem atuar se ligando a receptores específicos nas células de câncer, promovendo alta taxa de internalização celular, garantindo grande quantidade de fármaco no meio intracelular. E assim, selecionou-se um fármaco antineoplásico de elevada eficácia, o cabazitaxel, para ser encapsulado e atingir altas concentrações nos tumores de próstata, já que o mesmo, foi desenvolvido com uma vantagem em relação a outros de sua classe, de não sofrer ação da bomba de efluxo (mecanismo de resistência a múltiplos fármacos). Conjugando o anticorpo cetuximabe no lipossoma contendo cabazitaxel, seria possível promover uma ligação com alta afinidade anticorpo-receptor na superfície da célula e induzir internalização deste complexo, em adição, será captado também o nanocarreador com fármaco em seu interior, impedindo tanto o mecanismo de resistência associado ao tratamento com somente o anticorpo monoclonal quanto com apenas o fármaco.

Tendo em vista os fatos apresentados, o trabalho visa desenvolver lipossomas contendo cabazitaxel funcionalizados com anticorpos anti-EGFR com o propósito de alcançar

elevada atividade antitumoral contra o câncer de próstata metastático, avaliado tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* em modelo animal. Espera-se que o presente trabalho possa contribuir para futuros estudos clínicos de um medicamento aplicável ao câncer de próstata, de modo a melhorar a terapêutica atual para a neoplasia em questão e aumentar as chances de cura dos pacientes

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Panorama epidemiológico do câncer de próstata

Câncer é um termo genérico associado a um grupo de doenças que pode afetar diversas partes do corpo e é atualmente uma das principais causa de mortes no mundo. A organização mundial da saúde estima que, em 2020, o câncer ocasionou 10 milhões de óbitos no mundo. Dentre os diversos tipos de tumores, o carcinoma de próstata está na 4ª colocação quanto a taxa de incidência, sendo estimados 1 414 259 novos casos para o ano de 2020 e 1 610 370 para 2025, o que resulta em um aumento de 13,9% (FERLAY et al, 2020<sup>a</sup>; FERLAY et al, 2020b).

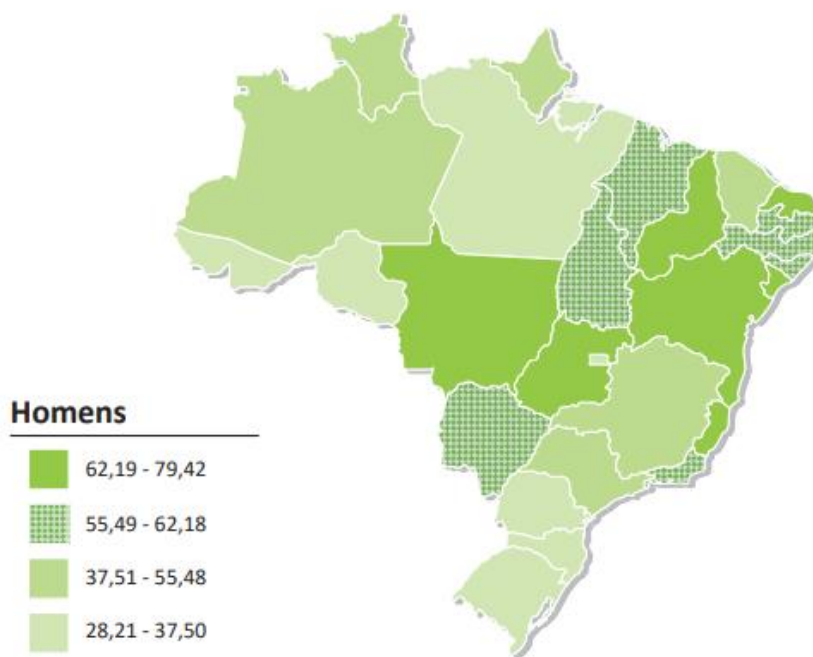
De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, foram estimados para o Brasil 71 730 novos casos de câncer de próstata para o triênio 2023-2025, o que o torna, o mais incidente em homens no país, ocupando a 1ª colocação em todas as regiões (sem considerar os tumores de pele não-melanoma). Os dados citados anteriormente podem ser melhor visualizados nas figuras 1 e 2. Além das informações citadas, no Brasil, ocorreram, em 2020, 15.841 óbitos por câncer de próstata, o equivalente ao risco de 15,30/100 mil homens (INCA, 2019).

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma no Brasil.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: INCA, 2022

Figura 2: Representação espacial das taxas ajustadas a de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da próstata)



Fonte: INCA, 2022

## 2.2 Progressão do câncer de próstata

O tumor de próstata se forma a partir de um processo intraepitelial, no qual há uma combinação de elementos inflamatórios, como células T e macrófagos e células não inflamatórias, como os fibroblastos estromais, que geram um microambiente propício para o crescimento epitelial prostático e posterior avanço para um adenocarcinoma de próstata (SHIAO; CHU; CHUNG, 2016; WANG et al., 2018). No câncer de próstata, o receptor de hormônios androgênicos se torna um fator de regulação importante para diferenciação e proliferação das células tumorais, assegurando crescimento e sobrevivência do tumor (NELSON et al., 2020; SHIAO; CHU; CHUNG, 2016)

Com a progressão da neoplasia, ocorre a liberação de fatores pró-angiogênicos que contribuem para que o tumor estabeleça uma vasculatura própria, a partir dos vasos preexistentes no tecido prostático, assim como, permite a geração de novos vasos linfáticos. Esse processo de angiogênese, associada a perda da adesão celular e degradação do estroma

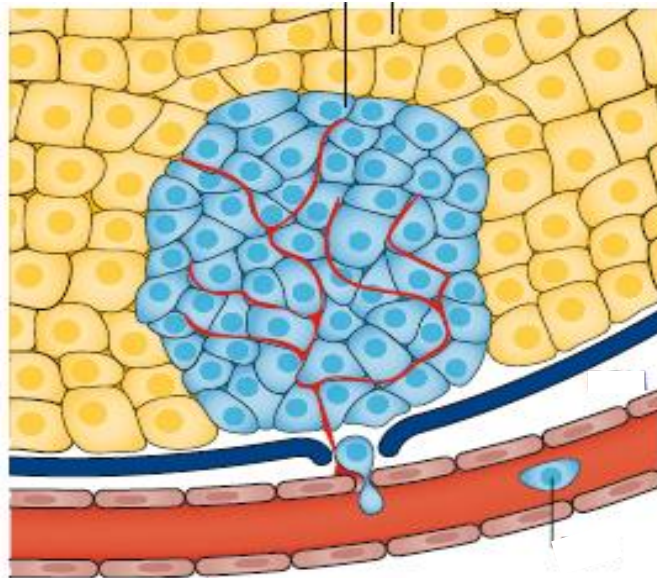


local, contribuem para que as células tumorais possam extravasar em direção às vias hematogênicas e linfáticas com a finalidade de se fixarem em locais distantes, processo denominado de metástase (NICHOLSON; VELA; WILLIAMS, 2017; NELSON et al., 2020).

O primeiro local de metástase do adenocarcinoma de próstata normalmente são os linfonodos regionais, adjacentes ao tumor, seguindo, posteriormente, para fígado, pulmões e ossos (WANG et al., 2018). Nelson (2020) afirma que a invasão do tecido ósseo é um evento comum, ocorrendo em 75% dos indivíduos que possuem doença metastática.

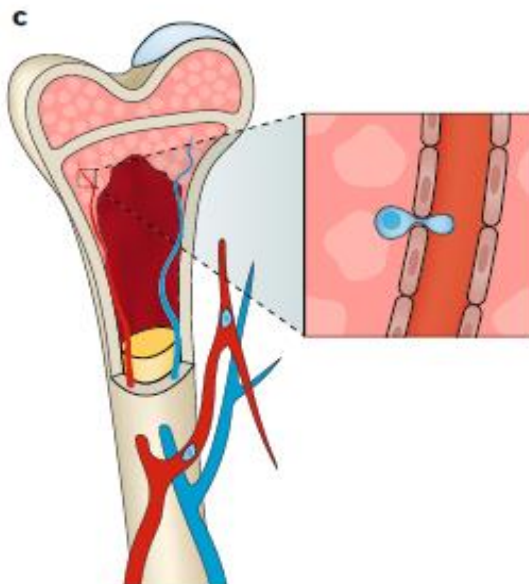
Dessa forma, pode-se relacionar a metástase óssea do câncer de próstata a um processo conhecido como transição epitelial-mesenquimal, ocasionada pela expressão inadequada de proteínas do citoesqueleto, que gera perda da adesividade celular, disseminação desordenada das células tumorais que penetram na medula óssea através de sinusóides. Todo o processo citado gera uma remodelação da estrutura óssea e conseqüentemente uma dor intensa nos ossos atingidos, assim como hipercalcemia associada (BERISH et al., 2018; WANG et al., 2018). As figuras 3 e 4, a seguir, expressam, respectivamente, o processo de deslocamento das células tumorais prostáticas e o processo de invasão do tecido ósseo.

Figura 3: Células tumorais extravasando para circulação sistêmica.



Fonte: BERISH et al., 2018

Figura 4: Invasão do tecido ósseo por células tumorais prostáticas.



Fonte: BERISH et al., 2018

### 2.3 Diagnóstico e tratamentos disponíveis

Dessa forma, para avaliar o estágio da doença é utilizado o critério TNM, no qual o T é a classificação conforme o volume tumoral (variando de T0 a T4), N indica presença ou ausência de metástase em linfonodos regionais (variando de N0 a N1) e M se há metástases a distância (variando de M0 a M1c). Utiliza-se também a graduação histopatológica segundo o escore de Gleason e os níveis do antígeno prostático específico (PSA) para classificar os pacientes em alto, médio ou baixo risco de progressão da doença. Assim, caso o indivíduo possua um tumor localizado, pode ser feito prostatectomia radical, radioterapia externa, braquiterapia e/ou terapia hormonal. Já o tratamento das neoplasias prostáticas avançadas baseia-se na manipulação hormonal, com o bloqueio da testosterona a níveis de castração: agonistas LHRH, como a leuprolida, a goserrelina e a triptorrelina; anti-androgênicos, como a flutamida e estrogênio associado ou não com bloqueio hormonal cirúrgico (BRASIL, 2015; NICHOLSON; VELA; WILLIAMS, 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

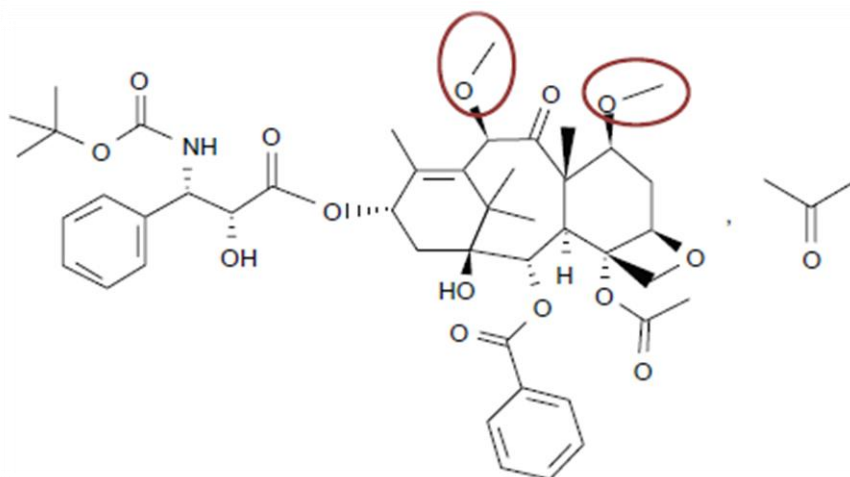
próstata metastático resistente à castração (mCRPC). Essa resistência é comprovada quando o paciente apresenta 3 medidas consecutivas de PSA acima de 2 ng/mL mesmo estando com testosterona a níveis de castração (< 50 ng/mL), quando ocorre o aparecimento de duas ou mais lesões ósseas na cintilografia ou aumento de lesões em tecidos moles utilizado o método RECIST de avaliação, conforme a Diretriz Diagnóstica e Terapêutica do Adenocarcinoma de Próstata do Ministério da Saúde brasileiro. 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 não apresente evolução com o uso do docetaxel, é indicado a segunda linha de tratamento, o cabazitaxel associado a prednisona (BRASIL, 2015; NELSON, 2020).

## 2.4 Cabazitaxel

O cabazitaxel é um derivado semissintético da 10-deacetilbacatina III (substância extraída dos galhos da *Taxus Baccata*) e faz parte da classe farmacológica dos taxanos, junto com seus antecessores paclitaxel e docetaxel. Ele foi desenvolvido como um análogo 7,10-dimetóxi do docetaxel, ou seja, apresenta dois grupamentos metoxi nas posições C-7 e C-10 substituindo os grupos hidroxila presentes na molécula do docetaxel. Tal modificação estrutural em relação ao seu antecessor, garantiu duas vantagens, um maior caráter lipofílico à molécula, sendo demonstrado em modelos pré-clínicos uma superior penetração na barreira hematoencefálica quando comparado com os outros taxanos, o que garante citotoxicidade associada a metástases cerebrais e uma menor afinidade pela glicoproteína-P (P-gp), que é uma bomba de efluxo de fármacos dependente de adenosina trifosfato (ATP). Dessa maneira, é importante enfatizar que há uma limitação da eficácia do paclitaxel e do docetaxel por conta da alta afinidade pela P-glicoproteína (P-gp) e esse fato é conferido pela superexpressão do gene de resistência a múltiplas drogas (MDR1) que codifica a P-gp, assim, ressalta-se que o cabazitaxel surge como estratégia para escapar desse mecanismo de resistência do tumor e isso foi demonstrado em estudos *in vitro* nos quais o cabazitaxel apresentou mais eficácia que o docetaxel nas linhagens celulares resistentes aos taxanos (INGROSSO et al., 2018; PALLER; ANTONARAKIS, 2011; PEAN et al., 2012).

Figura 5: Estrutura do cabazitaxel [(1S, 2S, 3R, 4S, 7R, 9S, 10S, 12R, 15S) -4-acetiloxi-1-hidroxi-15-[(2R,3S)-2-hidroxi-3-[(2-metilpropano-2-il)oxicarbonilamino]-

3fenilpropanoil] oxi-9,12-dimetoxi-10,14,17,17-tetrametil-11-oxo-6-oxatetracicloheptadec-13-en -2-il] benzoato.  $C_{45}H_{57}NO_{14}$ . Massa molecular: 894,01 unidades. Os círculos vermelhos evidenciam os grupamentos metóxi que substituíram as hidroxilas presentes na molécula do docetaxel



Fonte: Adaptado de Paller e Antonarakis (2011)

Assim, em junho de 2010 a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso do cabazitaxel (Jevtana®, Sanofi-Aventis, Paris, França) em associação com a prednisona para tratamento de pacientes com câncer de próstata metastático resistente a castração que já foram previamente tratados com docetaxel (DE BONO et al., 2010; PEAN et al., 2012). O mecanismo de ação dos taxanos está relacionado a dinâmica dos microtúbulos, elementos do citoesqueleto que sofrem polimerização durante a mitose e são direcionados para o fuso mitótico no intuito de separar e distribuir os cromossomos entre as células filhas. Assim, os fármacos dessa classe, se ligam a extremidade N-terminal dos aminoácidos da  $\beta$ -tubulina, estimulam a polimerização dos microtúbulos, porém, impedem a desmontagem dos mesmos, interrompendo a divisão celular na etapa da interfase e atuando diretamente na inibição da proliferação tumoral (INGROSSO et al., 2018; PALLER; ANTONARAKIS, 2011; PEAN et al., 2012).

Com relação a eficácia clínica, foi realizado um estudo randomizado, multicêntrico, multinacional, fase 3 (TROPIC) com o objetivo de avaliar se cabazitaxel mais prednisona gerava melhora na sobrevida em comparação com mitoxantrona mais prednisona. No estudo, foram avaliados 755 homens com mCRPC que haviam sido previamente tratados com docetaxel, entre eles, 378 receberam cabazitaxel e 377 foram tratados com mitoxantrona. Como resultados do estudo, mostrou-se que o tratamento com cabazitaxel melhorou a sobrevida livre

média (2,8 meses) em relação a mitoxantrona (1,4 mês), além disso, ocorreu redução dos níveis de PSA em 39,2% dos pacientes e diminuição do volume tumoral em 14,4%. Os dados citados, foram bem mais acentuados nos pacientes tratados com cabazitaxel, demonstrando maior eficácia do fármaco em relação a mitoxantrona, isso foi confirmado já que houve redução de 30% no risco de morte no grupo que recebeu o taxano em relação ao outro fármaco testado. Em contrapartida, o cabazitaxel gerou efeitos tóxicos de neutropenia em 94% dos pacientes, além de leucopenia (96%) e anemia (97%) (DE BONO et al., 2010).

Paller e Antonarakis (2011) compararam a toxicidade hematológica do cabazitaxel e do docetaxel, de acordo com seus ensaios clínicos fase 3, TROPIC e TAX 327, respectivamente e apresentaram apenas resultados de pacientes que foram acometidos com reações de grau 3 e 4. Eles obtiveram a ocorrência de anemia em 10% dos tratados com cabazitaxel em oposição a 5% dos tratados com docetaxel, enquanto a neutropenia foi observada em 82% e 32%, respectivamente. Portanto, o cabazitaxel apresentou maior toxicidade que seu antecessor.

No que diz respeito à formulação comercial, para preparo do medicamento Jevtana é necessário empregar o tensoativo polissorbato 80 para solubilizar o cabazitaxel que tem baixa solubilidade aquosa. Como é difícil obter homogeneidade pela mistura direta de uma solução de polissorbato com água, um concentrado é fornecido sendo formado por um solvente aquoso contendo 13% p/p etanol para permitir a preparação de uma pré-mistura a 10 mg/ml que pode então ser diluída em meio de infusão antes da administração. Dessa forma, o emprego de tensoativo e etanol na forma farmacêutica pode estar atrelado a toxicidade do medicamento, além de aumentar as chances de ocorrer uma reação de hipersensibilidade (CHMP, 2011; SCHWARTZBERG; NAVARI, 2018).

## **2.5 Lipossomas e Imunolipossomas como sistema de liberação de fármacos antineoplásicos**

A nanotecnologia está associada à manipulação da matéria em escala nanométrica (correspondente a um bilionésimo do metro). As nanopartículas apresentam uma série de vantagens no diz respeito a terapia antineoplásica; permitem a encapsulação de moléculas citotóxicas dentro ou na superfície de um nanocarreador, possibilitando a liberação controlada, que oferece vários benefícios em comparação com a quimioterapia atual. É possível, proteger o fármaco da degradação ou eliminação fisiológica, reduzir a toxicidade para os tecidos e órgãos

saudáveis, aumentar a adesão e conveniência do paciente, alcançar um sistema com liberação sustentada que permite redução nas administrações. Grandes avanços foram feitos no desenvolvimento de sistemas baseados em nanopartículas para liberação controlada, as quais, podem ser preparadas a partir de várias bases, como metais, polímeros, proteínas ou lipídios. Levando em consideração os benefícios de produção de nanopartículas no âmbito da terapia antineoplásica, têm-se o Abraxane®, nanopartículas de albuminas ligadas ao paclitaxel em solução salina, que evita o uso de Cremophor, que é comumente empregado na formulação comercial de paclitaxel e também elimina a toxicidade dos solventes, evitando a necessidade do uso de anti-histamínicos no tratamento. Além dos benefícios citados para o Abraxane®, pode-se citar que a albumina tem o potencial de aumentar a entrega de fármacos no tecido alvo por causa do receptor de albumina com transcitose mediada por gp60 (GREEN et al, 2006; PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MERDADE, 2015).

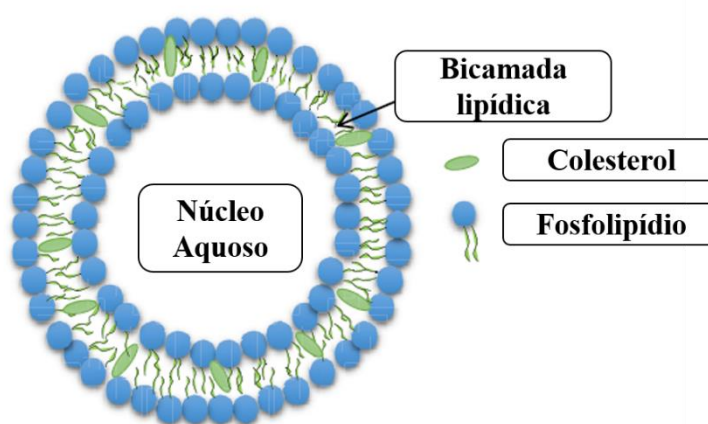
Dentre os diferentes tipos de nanossistemas, destacam-se os lipossomas, que são estruturas esféricas coloidais formadas de moléculas lipídicas anfífilicas, como fosfolipídios, de maneira que, esses componentes anfífilicos formam uma ou mais bicamadas lipídicas situadas em torno de um núcleo aquoso interno. Dessa forma, os grupos de cabeças polares dos fosfolipídios são orientados para a fase aquosa interna e externa, e as cadeias hidrofóbicas ficam direcionadas para a parte interna da bicamada, o que permite a essas nanoestruturas carrear moléculas lipossolúveis no interior da bicamada e hidrossolúveis no núcleo aquoso (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021).

Os lipossomas se tornam um ótimo sistema para entrega de fármacos pois são compostos de materiais biocompatíveis, biodegradáveis, não-tóxicos e com baixa imunogenicidade, visto que, os fosfolipídios utilizados na preparação assemelham-se aos componentes naturais das membranas das células humanas, sendo os principais utilizados: ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina. Além disso, para evitar o reconhecimento e depuração destas nanopartículas por opsoninas e elementos do sistema retículo-endotelial, é possível inserir na superfície dos nanocarreadores polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG) ou polímeros anfífilicos como polioxietileno. Assim, quando os polímeros citados são inseridos nos lipossomas, pode-se obter nanocarreadores de longo tempo de circulação (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MERDADE, 2015; GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021).

Li e Huang (2008), em seu estudo de farmacocinética de fármacos encapsulados, mostra que a área sob a curva (AUC) do perfil farmacocinético de lipossomas peguilados foi 6

vezes maior que o lipossoma não pegulado e 36 vezes maior que o fármaco livre. Em relação a composição química dos lipossomas, uma estratégia de melhoria é a adição de colesterol, influenciando diretamente na rigidez e fluidez da bicamada lipídica, reduzindo a permeabilidade e aumentando estabilidade físico-química da estrutura (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021).

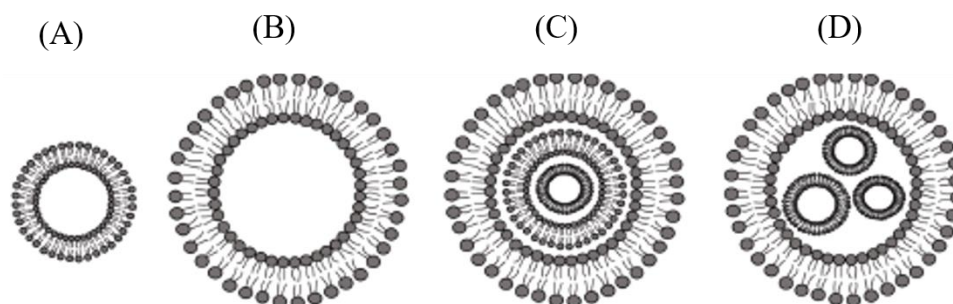
Figura 6: Estrutura geral dos lipossomas



Fonte: Adaptado de Nsairat et al., 2022

Após a formação dos lipossomas, eles podem ser classificados em unilamelares pequenos (SUV, 20 – 100 nm), unilamelares grandes (> 100 nm), vesículas multilamelares que são organizadas duas ou mais bicamadas concêntricas favoráveis para encapsulação de fármacos lipofílicos e a última seria o grupo dos lipossomas multivesiculares, que se caracterizam pela presença de vesículas não-concêntricas aprisionadas dentro de uma bicamada lipídica, conforme pode ser visualizado na figura 7, a seguir (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021).

Figura 7: Classificações dos lipossomas. (A) Unilamelares pequenos. (B) Unilamelares grandes. (C) Vesículas Multilamelares. (D) Lipossomas multivesiculares.



Fonte: Adaptado de Guimarães; Cavaco-Paulo; Nogueira (2021).

Diante disso, é importante salientar que a terapia antineoplásica atualmente é composta por agentes de pequeno tamanho molecular, com farmacocinética desfavorável e ação sem especificidade tecidual, ou seja, eles podem se distribuir no organismo e gerar seu efeito citotóxico em tecidos saudáveis, gerando efeitos colaterais graves, como mielossupressão, mucosite, neurotoxicidade, náuseas, vômitos e alopecia. Dessa forma, os lipossomas surgem como estratégia para encapsulação de fármacos antineoplásicos, visando, a proteção desses ativos quando estão no sangue, assim, seria possível impedir a degradação e evitar que o mesmo esteja disponível para exercer seu efeito nos tecidos saudáveis (LI et al., 2019).

Além disso, o mecanismo de liberação controlada dessas nanopartículas asseguraria que o fármaco seja liberado em sua totalidade apenas no ambiente tumoral. Associado a estes fatos, os lipossomas podem ser acumulados em tumores via efeito de permeabilidade e retenção aumentados (EPR), que foi descrito pela primeira vez por Matsumura e Maeda (1986). O efeito EPR ocorre devido a arquitetura defeituosa dos vasos tumorais, visto que, a produção exagerada de fatores de crescimento e angiogênese acelerada, além da presença de metaloproteinases da matriz geram lacunas aumentadas entre as células endoteliais (100 nm a 2  $\mu$ m, dependendo do tipo de tumor) e uma drenagem linfática comprometida, isto leva a um acúmulo eficaz e seletivo de lipossomas em tumores sólidos (LI et al., 2019; SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017).

Diante do exposto, é importante mostrar algumas formulações contendo lipossomas que apresentaram grande eficácia em testes clínicos e até aprovação pela FDA para terapêutica atual. O primeiro lipossoma aprovado para o tratamento do câncer foi Doxil®/Caelyx®, constituído de lipossomas peguilados injetáveis encapsulando doxorubicina (DOX) para câncer de mama, sarcoma de kaposi e câncer ovariano, sua aprovação ocorreu em 1995. Em



1999, foi aprovado o Depocit®, sendo lipossomas contendo citarabina para uso contra meningite neoplástica e meningite linfomatosa, dentre diversos outros lipossomas aprovados. Mais recentemente, ocorreu a aprovação do Onivyde®, lipossomas contendo irinotecano para tratamento do câncer pancreático (LI et al., 2019).

No âmbito de lipossomas produzidos para encapsular o fármaco cabazitaxel, Yin et al, 2019, produziram lipossomas contendo cabazitaxel e testaram em linhagem celular de câncer colorretal (CT-26) e câncer de mama (4T1), sendo o estudo in vivo realizado com a linhagem de câncer colorretal. Yang et al (2020), também encapsularam cabazitaxel em lipossomas e avaliaram a eficácia in vitro e in vivo contra câncer de mama. Por fim, Mahira et al (2018), co-encapsularam cabazitaxel e silibinina em lipossomas catiônicos funcionalizados com ácido hialurônico que é direcionado para o receptor CD44, superexpresso em câncer de próstata.

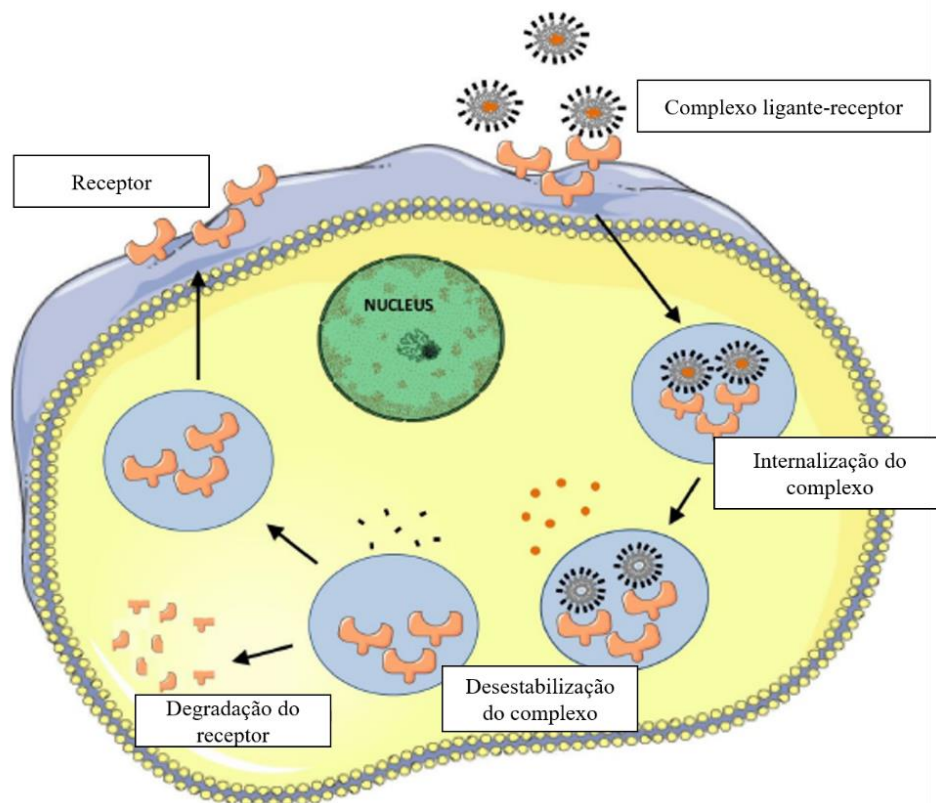
Além do direcionamento passivo de lipossomas ao tumor pelo efeito EPR, é possível o direcionamento ativo das nanopartículas, incorporando moléculas de reconhecimento na superfície, como peptídeos, anticorpos, fragmentos de proteínas, carboidratos ou ácidos nucleicos. Dessa forma, pode-se aumentar a seletividade da interação dos lipossomas com o tumor, desencadeando endocitose mediada por receptor. Isto pode ser alcançado por meio da conjugação covalente de ligantes de direcionamento na superfície do nanocarreador (NSAIRAT et al., 2022).

Quando o lipossoma é funcionalizado com anticorpos (mAbs), pode ser denominado imunolipossoma, sendo muito importante selecionar uma imunoglobulina que tenha elevada afinidade por alguma molécula superexpressa na célula tumoral, como receptores de fator de crescimento regulados positivamente em resposta ao metabolismo aumentado e associados a um mau prognóstico no câncer, por exemplo, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor de folato (FR) ou receptores de transferrina (TfR), etc. Assim, a interação de alta afinidade entre a região Fab do anticorpo e seu alvo molecular, permite internalização aumentada das nanopartículas, entrega seletiva no ambiente tumoral e maior eficácia do tratamento, além de reduzir efeitos colaterais em tecidos saudáveis e variações na concentração do fármaco na corrente sanguínea (MERINO; ZALBA; GARRIDO, 2018; NSAIRAT et al., 2022).

O mecanismo de internalização de imunolipossomas envolve o reconhecimento da molécula superexpressa nas células tumorais pelos ligantes acoplados e a formação de um complexo alvo-receptor. A interação ligante-receptor gera o processo de *uptake* mediada por receptor e posterior endocitose dependente de clatrina, levando a formação de lisossomo,

degradando, translocando ou desestabilizando o complexo, liberando o fármaco antineoplásico no citoplasma (MERINO; ZALBA; GARRIDO, 2018).

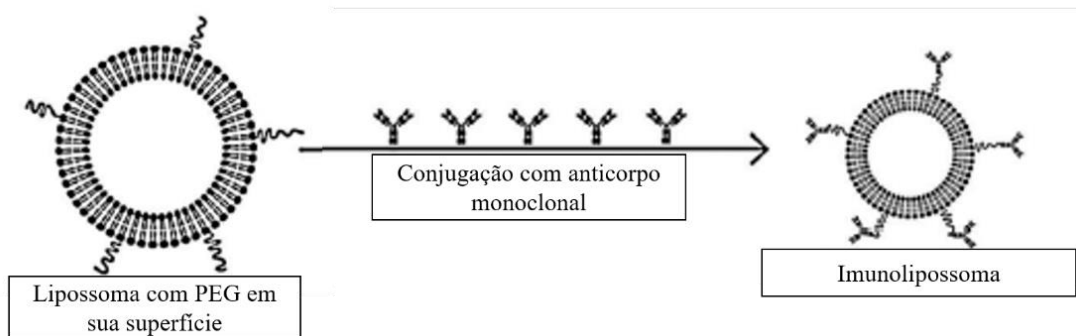
Figura 8: Mecanismo de internalização do imunolipossoma



Fonte: Adaptado de Merino; Zalba; Garrido (2018)

É importante citar que o PEG além de componente estrutural do lipossoma, pode ser utilizado para conjugar o anticorpo em sua extremidade. Inicialmente, o PEG é ancorado no lipossoma por meio de um lipídio no qual ele está conjugado, posteriormente, modifica-se o grupo químico da extremidade distal do polímero para que ele adquira uma reatividade com o anticorpo, o anticorpo passa por um processo de derivatização para se tornar reativo ao PEG e assim é possível funcionalizar o lipossoma, tornando-o uma nanopartícula de longa duração alvo direcionada (ELOY et al., 2017a). A estrutura geral do imunolipossoma conforme reação descrita acima está esquematizada na figura 9.

Figura 9: Funcionalização do lipossoma com anticorpo monoclonal



Fonte: Adaptado de Wang et al (2018)

Assim, alguns autores desenvolveram imunolipossomas para diferentes alvos encapsulando taxanos, um exemplo, é Yang et al (2007), que produziu lipossomas contendo paclitaxel funcionalizados com anticorpo anti-HER2 (trastuzumabe) para teste em linhagens celulares de câncer de mama. Já Eloy et al (2017b) desenvolveram imunolipossomas anti-HER2 (trastuzumabe), contendo paclitaxel e rapamicina e realizaram ensaios *in vitro* e *in vivo* contra câncer de mama. No mesmo contexto, Jain et al (2021), produziram lipossomas pH-sensíveis contendo docetaxel funcionalizados com anticorpos anti-VEGF e testaram contra linhagem celular de câncer de próstata. Em todos os exemplos citados, os autores funcionalizaram lipossomas contendo fármacos taxanos, com anticorpos e assim obtiveram aumento da eficácia contra câncer de mama.

## 2.6 Anticorpo monoclonal anti-EGFR (cetuximabe) na terapia antineoplásica

Fatores de crescimento são proteínas especializadas ou hormônios esteroides que estimulam a proliferação celular. Por meio desses fatores ocorrem sinalizações intercelulares, já que eles se ligam a receptores específicos na superfície das células. A superexpressão de fatores de crescimento e receptores contribui para a sinalização exacerbada no câncer e conseqüente progressão da doença. Um exemplo é o fator de crescimento epidermal (EGF) (JOSHI *et al*, 2015).

O receptor do fator de crescimento epidermal humano (EGFR ou ERB-1), é um receptor transmembrânico com atividade tirosina quinase e faz parte de uma subfamília de

quatro membros receptores, EGFR (ErbB-1); Her 2 (ErbB-2); Her 3 (ErbB-3) e Her 4 (ErbB-4). Ele desempenha um papel fundamental em diversos processos celulares, como sobrevivência e proliferação. A ativação deste receptor necessita de fatores de crescimento como EGF, TGF $\alpha$ , anfiregulina, EGF de ligação à heparina e betacelulina (embora EGF e TGF $\alpha$  sejam os ligantes mais comuns) (JOSHI et al, 2015; GUÉRIN et al, 2010). Esses fatores de crescimento citados ligam-se aos receptores de membrana, que desencadeiam, grandes alterações conformacionais e permitem a homo ou heterodimerização do receptor. A dimerização, estimula a atividade catalítica citoplasmática, resultando na fosforilação de resíduos de tirosina que servem como locais de acoplamento para proteínas envolvidas na proliferação celular, migração, e vias de diferenciação (JOSHI *et al*, 2015; GUARDIOLA *et al*, 2019).

O EGFR é superexpresso em um terço dos cânceres de origem epitelial, incluindo, colorretal, mama, ovário, próstata, bexiga e pulmão. Sendo que a ativação desse receptor estimula a proliferação de células tumorais, angiogênese, invasão e metástase através da ativação de várias vias de sinalização algumas delas incluem a via RAS-RAF/MEK/ERK, os eixos PI3K/AKT/mTOR, as quinases da família SRC, as vias PLC $\gamma$ -PKC e Jak/STATs. As várias respostas à ativação do EGFR dependem principalmente das interações específicas do ligante (REZAIEMANESH, 2010; MALMBERG; TOLMACHEV; ORLOVA, 2011; London e Gallo, 2020).

A superexpressão do EGFR em tumores de próstata está correlacionada com fenótipo pró-metastático e estudos recentes demonstram que tumores prostáticos com maior expressão do EGFR tem maior concentração de fibras de colágeno que podem influenciar na migração, invasão e proliferação celular, além de estarem relacionados com maior número de vasos sanguíneos e linfáticos que poderiam facilitar a disseminação hematogênica. Ademais, a expressão de EGFR é aumentada em metástases ósseas de carcinomas prostáticos, sugerindo que o microambiente do tumor pode resultar na regulação e deposição de células tumorais positivas para EGFR (NASTALY et al, 2020).

O cetuximabe (anti-EGFR) é uma imunoglobulina quimérica humano-murina do tipo IgG1 monoclonal que se liga competitivamente ao domínio extracelular do EGFR impedindo a ativação do receptor por ligantes endógenos. Conhecido como IMC-C225, Erbitux®, é o anticorpo anti-EGFR amplamente descrito na literatura, tem alta afinidade para o receptor ( $K_d = 0,1-0,2$  nM), por isso que é mais ávido para se ligar ao domínio extracelular de EGFR do que os próprios ligantes endógenos. Esta ligação inibe a ativação do receptor de

tirosina quinase e sua sinalização a jusante associada (MAPK, PI3K/Akt, Jak/Stat) (SANTOS et al, 2021). Em seguida, o acoplamento ligante-receptor induz citotoxicidade celular dependente de anticorpos, desencadeia a internalização e degradação de receptores, tornando-se uma excelente estratégia para o desenvolvimento de terapias direcionadas. Pelos motivos citados este anticorpo tem sido utilizado para tratamento do câncer colorretal metastático, câncer de cabeça e pescoço e de pulmão de células não-pequenas (DEQUANTER *et al*, 2010; BRASIL, 2018; MAZZARELLA; GUIDA; CURIGLIANO, 2019).

Nesse contexto da citotoxicidade associada ao cetuximabe, Dhupkar et al (2010) avaliaram a expressão de EGFR após tratamento com o anticorpo monoclonal em duas linhagens celulares humanas de carcinoma prostático independente a andrógenos, a PC3 (metástase óssea) e a DU145 (metástase cerebral, super expressão de EGFR). Somente após 72 horas de incubação houve uma inibição significativa da proliferação celular nas duas linhagens, sendo que, nas primeiras 48 horas houve redução no crescimento apenas em células DU145, que expressam quantidades muito maiores do receptor em relação as células PC3. Os autores acrescentam que o cetuximabe conseguiu causar uma regulação negativa na expressão dos receptores, ou seja, promoveu internalização da proteína nas duas linhagens, porém, ele não inibiu a fosforilação de alguns resíduos de tirosina específicos nas células PC3, evitando o bloqueio da sinalização (REZAIEMANESH, 2010; MALMBERG; TOLMACHEV; ORLOVA, 2011). Os dados de Dhupkar et al (2010) demonstram que a atividade antitumoral do cetuximabe em células de câncer de próstata metastático independente a hormônios é limitada, de maneira que, mesmo após sua internalização, pode não ocorrer a inibição das vias de sinalização celular.

Cathomas et al (2012) confirmam a ideia de que expressão do EGFR pode mudar com a progressão da doença e o risco de recidiva se torna significativamente aumentado em pacientes com alta expressão de receptor. Assim, eles avaliaram em um estudo clínico de fase 2, a combinação do medicamento padrão para quimioterapia, docetaxel, com o anticorpo monoclonal cetuximabe em pacientes com câncer de próstata avançado resistente a docetaxel e observaram um declínio  $\geq 50\%$  no PSA em 20% dos pacientes e  $\geq 30\%$  em 31% dos pacientes. Diante disso, Cathomas et al (2012) associaram esses resultados a um aumento da eficácia da quimioterapia associada ao cetuximabe. Slovin et al (2009) demonstraram que a combinação de cetuximabe com doxorrubicina foi relacionada a um declínio mínimo do PSA. Sendo possível perceber a partir dos estudos citados que há uma elevação da eficácia de um taxano, no caso, o docetaxel, quando associado a um anticorpo monoclonal, como inibidor do

crescimento celular tumoral para câncer de próstata metastático como foi mostrado no estudo de Cathomas et al (2012). Entretanto outra observação de Cathomas et al (2012) foi que 47% dos pacientes apresentaram efeitos adversos sérios, ou seja, mesmo com a eficácia aumentada utilizando o anticorpo monoclonal em associação ao docetaxel, por isso seria necessária uma estratégia que evitasse o efeito sistêmico do antineoplásico, por meio de uma terapia alvo específica.

Dentro deste contexto, existem os conjugados anticorpo-fármaco (ADC), que combinam a especificidade antigênica de um anticorpo com a potência de efeitos citotóxicos de compostos antineoplásicos. ADC é composto de um anticorpo monoclonal (mAb), um ligante químico e um fármaco. O ligante químico deve ser estável para evitar liberação prematura do ativo e danos à saúde dos tecidos saudáveis. Outra estrutura que combinam especificidade antigênica com entrega do fármaco são os imunolipossomas, desenvolvidos para longa circulação como nanopartículas contendo fármaco para terapia de câncer com alta afinidade para o EGFR (SANTOS et al, 2021). Mamot et al (2012) destacaram algumas vantagens da imunolipossomas sobre outras estratégias baseadas em anticorpos monoclonais, incluindo ADCs. Os imunolipossomas podem carrear  $10^4$  moléculas de fármaco por nanopartícula, ou seja, a capacidade de carga é bem maior do que os ADCs que normalmente carregam duas a seis moléculas de droga por anticorpo monoclonal. Os lipossomas também evitam a necessidade de ligação direta do fármaco a resíduos no anticorpo monoclonal, evitando problemas de estabilidade e imunogenicidade, assim como, protegem o fármaco do contato com enzimas e elementos celulares do sangue. Nesse contexto, a literatura apresenta alguns estudos e avanços na área de desenvolvimento de imunolipossomas para tratamento de cânceres EGFR positivos. Petrilli et al (2019) desenvolveram imunolipossomas anti-EGFR contendo 5-fluorouracil avaliando eficácia contra câncer de células escamosas; assim como, Lu et al (2019), produziram imunolipossomas anti-EGFR contendo afatinibe e avaliaram seu efeito contra câncer de pulmão de células não-pequenas. Por fim, Eloy et al (2020) e Moreira et al (2023) produziram imunolipossomas anti-EGFR contendo docetaxel. No âmbito dos estudos clínicos, Belfiore et al (2018), mostram que há lipossomas contendo doxorrubicina funcionalizados com anticorpos anti-EGFR para câncer de mama que estão em estudo clínico fase 2 (NCT02833766) o que denota sua importância na especificidade relacionado a terapia antineoplásica.

Tendo em vista todas as vantagens associadas s imunolipossomas, busca-se neste trabalho, funcionalizar lipossomas contendo cabazitaxel com anticorpo monoclonal anti-EGFR (cetuximabe) com o propósito de alcançar elevada atividade antitumoral contra o câncer de

próstata, avaliada tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*. Espera-se que os nanocarradores alvo direcionados permitam uma terapia com alta seletividade tecidual, atingindo um grau elevado de internalização celular no tecido tumoral e uma cinética de liberação controlada para assegurar eficácia terapêutica acentuada em relação aos tratamentos disponíveis atualmente.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolver lipossomas contendo cabazitaxel funcionalizados com anticorpos monoclonais anti-EGFR, realizar a caracterização físico-química e avaliar sua eficácia *in vitro* para liberação sítio específica na terapia do câncer de próstata.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver lipossomas empregando estratégia de *design* de experimentos (DOE)
- Caracterizar físico-quimicamente um sistema lipossomal contendo cabazitaxel;
- Conjugar anticorpos anti-EGFR nos lipossomas e avaliar a eficiência de funcionalização;
- Caracterizar físico-quimicamente os lipossomas funcionalizados e
- Avaliar o perfil de liberação dos lipossomas e imunolipossomas contendo o fármaco
- Determinar a citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) do fármaco livre e encapsulado (lipossomas e imunolipossomas) através de ensaios *in vitro* em células com diferentes níveis de expressão de EGFR;
- Avaliar os níveis de internalização celular dos lipossomas e imunolipossomas em linhagens de câncer de próstata com diferentes níveis de expressão de EGFR.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Substâncias químicas

Acetonitrila, grau HPLC – J.T.Baker;

Ácido bicinconínico, BCA (kit) – Thermo Scientific;

Água MilliQ (filtro Gradient) – Millipore;

Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) – Sigma;

Cabazitaxel P.A – Sigma

Cetuximabe 5mg/ml (Erbix) - Merck

Clorofórmio –Fisher;

Colesterol (Col) – Sigma;

Coluna dessalinizadora PD-10 - Life;

Coluna Luna C-18, 3 $\mu$ m, 150 x 4,6 mm – Merck;

Coomassie blue – Biorad;

Diocadeciloacarbocianina perclorato (DiO) – Sigma;

Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma;

Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) – Lipoid;

1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenoglicol)-2000] (DSPE-PEG 2000) – Avanti;

1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[maleimida(polietileno glicol)-2000] (sal de amônio) (DSPE-PEG-Mal) – LaySan Bio;

1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) – Lipoid;

Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. – Synth;

Fosfatidilcolina de óleo de soja (SPC) – Lipoid;

Hidróxido de sódio P.A. – Synth;

Lauril sulfato de sódio (LSNa) – Êxodo Científica;

2-mercaptoetanol – Biorad;

Padrão Precision Plus Protein Dual Color – Biorad;

Reagente de Traut – Fisher;

Meio de cultura RPMI 1640 – Sigma;  
Sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético dihidratado (EDTA) - Merck  
Sefarose CL-4B - GE Healthcare;  
Solução de antibiótico/antimicótico contendo 10,000 unidades/mL de penicillina, 10,000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B. – Sigma;  
Soro bovino fetal – Sigma;  
Tampão Laemmli 4X – Biorad;  
Tampão Tris/ Glicina/ SDS 10X – Biorad;  
Tripsina 0,25% - Sigma;

#### ***4.1.2 Equipamentos e acessórios***

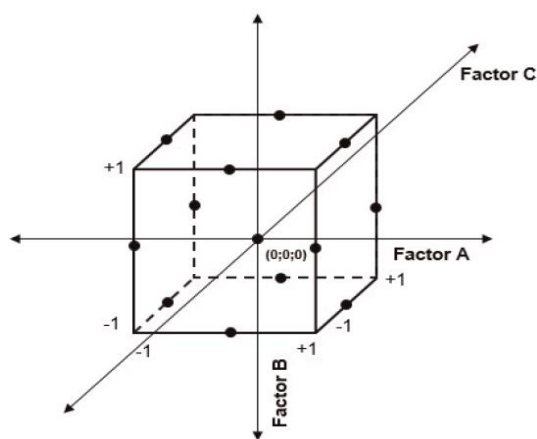
Agitador magnético digital – SolidSteel  
Aparelho Dissolutor - Erweka  
Balança Analítica CPA 225 D – Sartorius  
Balança Analítica XT 220 A – Precisa  
Banho ultrassônico – Quimis  
Centrífuga - Hermle  
Citômetro de fluxo FACSCalibur – BD  
Equipamento de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria STA 449 F3 - Netzsch  
Espectômetro de infravermelho equipamento Shimadzu modelo IRTracer-100.  
Espectrofotômetro UV/VIS – Hitachi  
Instrumento de difração de raios -X convencional D8 Advanced - Bruker AXS  
Leitor de placa de Elisa – Thermo  
Liofilizador (Marca: LabConco®; Modelo: FreeZone 4.5 Liter Freeze Dry Systems  
Micropipetas automáticas ajustáveis de 20 a 200 µL, 100 a 1000 µL e 1 a 5 mL – Finnpiptette;  
Placa de agitação multipontos SSAGDa - SolidSteel  
Rotaevaporador Modelo: RV8 - IKA;  
ultrassom de ponta (Marca: QSonica; Modelo: Q5000  
UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)\_ L-2455U – Hitachi  
Zetasizer Nano - Malvern Instruments

#### **4.2 Desenvolvimento das formulações por planejamento fatorial**

O delineamento do desenvolvimento dos ensaios de formulação de lipossomas seguiu três variáveis independentes: tipo de lipídio, razão fármaco:lipídeo e percentual molar de colesterol. Estas variáveis, representadas pelos códigos  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ , foram estudadas em três níveis, -1, 0 e +1 (tabela 01). Foram definidas também as variáveis fixas, como a quantidade do lipídio de 20mg e a quantidade de DSPE-PEG-2000, de 5% em relação aos lipídios (tabela 02). Portanto, a distribuição dessas variáveis resultou em 15 ensaios (tabela 03).

Necessitando apenas de 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 normalmente por -1, 0 e 1, enquanto as três variáveis são representadas por  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  (WAGNER, J. R., MOUNT, E. M.; GILES, 2014). O esquema do cubo multidimensional no qual foram baseados os ensaios está representado na figura 10.

Figura 10: Representação de um modelo Box-Behnken por três fatores.



Fonte: De Castro Peixoto et al (2017)

Tabela 1: Esquema de variáveis independentes: tipo de lipídio, razão fármaco:lipídeo e percentual molar de colesterol.

Variáveis não-fixas			
Símbolo	Tipo de lipídio (x1)	Razão fármaco:lipídeo (x2)	% molar colesterol (x3)

-1	SPC	Cabazitaxel 1:30	10%
0	DSPC	Cabazitaxel 1:20	20%
1	DPPC	Cabazitaxel 1:10	30%

Tabela 2: Variáveis fixas empregadas nos ensaios: a quantidade do lipídio de 20mg e a quantidade de DSPE-PEG-2000, de 5% em relação aos lipídios.

Variáveis fixas		
DSPE-PEG (% molar)	Quantidade de fosfolipídio	Condições de sonicação
5%	0,02g	Sonicação em 10 mL de tampão, com amplitude de 30%, por 2,5 min e pulso 2/5

Tabela 3: Matriz dos experimentos baseada na combinação das variáveis

Ensaios	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
----	---	---	---

No intuito de escolher a melhor composição para os lipossomas, foram testados os seguintes lipídios: fosfatidilcolina da soja (SPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e diestearoilfosfatidilcolina (DSPC). Houve também diferentes proporções fármaco/lipídeo (1:10; 1:20; 1:30) e variadas concentrações de colesterol (10, 20 e 30%), dessa forma, foi possível elaborar 15 ensaios variando os parâmetros listados anteriormente, fazendo diferentes combinações entre as variáveis, como pode ser visualizado na tabela 4.

Tabela 4: Planejamento dos ensaios após associação das variáveis não-fixas. DSPC: 1,2-distesteroil-sn-glicero-3-fosfocolina. DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina. SPC: Fosfatidilcolina de Soja.

Ensaio	Tipo de lipídeo	Proporção fármaco/lipídeo	Quantidade de colesterol
1	SPC	Cabazitaxel 1:30	20%
2	DPPC	Cabazitaxel 1:30	20%
3	SPC	Cabazitaxel 1:10	20%
4	DPPC	Cabazitaxel 1:10	20%
5	SPC	Cabazitaxel 1:20	10%
6	DPPC	Cabazitaxel 1:20	10%
7	SPC	Cabazitaxel 1:20	30%
8	DPPC	Cabazitaxel 1:20	30%
9	DSPC	Cabazitaxel 1:30	10%
10	DSPC	Cabazitaxel 1:10	10%
11	DSPC	Cabazitaxel 1:30	30%
12	DSPC	Cabazitaxel 1:10	30%
13	DSPC	Cabazitaxel 1:20	20%
14	DSPC	Cabazitaxel 1:20	20%
15	DSPC	Cabazitaxel 1:20	20%

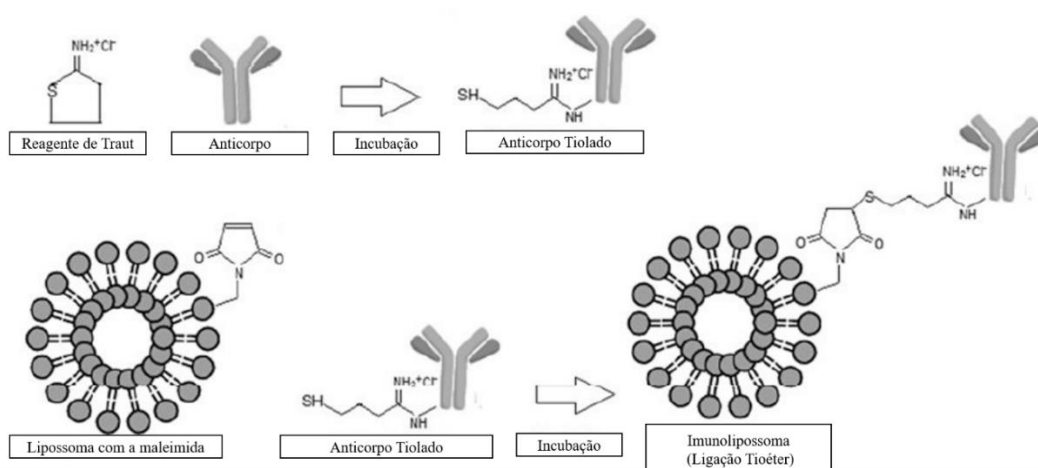
### 4.3 Preparo de lipossomas

O preparo de lipossomas seguiu o método de hidratação do filme lipídico descrito por Eloy et al (2016). Em resumo, os lipídios e o fármaco foram dissolvidos em 2 mL de clorofórmio, em seguida este solvente orgânico foi evaporado por pressão reduzida em rotaevaporador (Marca: IKA; Modelo: RV8), sob condições: 100 rpm, 60°C durante 30 minutos, posteriormente a formulação foi submetida a hidratação com 10 mL de tampão fosfato pH 7,4, sob condições: 100 rpm, 60°C durante 30 minutos. Em seguida, a formulação foi submetida à sonicação em ultrassom de haste (Marca: QSonica; Modelo: Q5000) para redução dos tamanhos das partículas, sob as seguintes condições: 30% de amplitude, com pulso 2/5, durante 2,5 minutos.

#### 4.4 Conjugação dos lipossomas com o anticorpo monoclonal anti-EGFR

A figura 11 a seguir apresenta um esquema resumido da reação de conjugação do anticorpo na superfície dos lipossomas pelo método direto de formação da ligação tioéter. Sendo a reação descrita, a base para obtenção dos imunolipossomas anti-EGFR que serão desenvolvidos neste estudo.

Figura 11: Esquema da reação de funcionalização do lipossoma com anticorpo monoclonal.



Fonte: Adaptado de Petrilli et al (2018b)

Inicialmente, para realizar a reação de tiolação, entre o anticorpo e o reagente de Traut, preparou-se uma solução de anticorpo (Cetuximabe) (1 mg/mL e 2 mg/mL), com Tampão

PBS/EDTA 5mM pH 8,0, Tampão PBS/EDTA 50 mM e foi feito ajuste de pH para 8,0, com uma solução NaOH 0,1M. Separadamente, sob proteção da luz, preparou-se uma solução com reagente de traut 2 mg/mL e em seguida, gota a gota e sob contínua agitação, adicionou 37,6 uL do reagente de Traut's à solução de Cetuximabe, permanecendo sob agitação por 3 minutos (razão Traut:anticorpo de 40:1). Em seguida, a mistura foi colocada em incubação durante 1h a 37°C em estufa.

Posteriormente, a solução obtida foi passada numa coluna de dessalinização PD-10, na qual, realizou-se a coleta de 30 frações com 1 mL cada, as coletadas foram realizadas com tampão PBS/EDTA 5mM pH 8, como eluente. Empregou-se o método de quantificação de proteínas com ácido bicinonínico (BCA), para detectar em quais coletas o anticorpo tiolado saiu. Após passagem da solução de anticorpo pela coluna, detectou-se a presença de proteínas nas frações 4,5 e 6 coletadas. Como cada coleta feita corresponde a 1 mL de solução, a junção das 3 frações corresponde a 3 mL da solução de anticorpo. Preparou-se o lipossoma pelo método de hidratação do filme lipídico descrito anteriormente, porém, para obtenção do imunolipossoma, empregou-se 3,6 (5% molar) e 7,2 mg (10% molar) de DSPE-PEG-Maleimida e produziu-se também um lipossoma controle com constituição simples (sem maleimida, com 3,6 mg de DSPE-PEG-2000 correspondente a 5% molar dos lipídios empregados), hidratando o filme lipídico com apenas 7 mL de tampão fosfato pH 7,4. Uma vez pronta a formulação lipossomal, juntaram-se 7 mL da formulação de lipossomas com a maleimida em sua superfície com as frações de anticorpo recolhidas anteriormente (3 mL). A mistura foi mantida em temperatura ambiente “*overnight*”. Ao lipossoma controle foram acrescentados 3 mL de tampão PBS pH 7,4, perfazendo igual volume do imunolipossoma. Após incubação *overnight* (ambas formulações, com e sem anticorpo mantida nas mesmas condições), submeteu-se 1ml do lipossoma controle e depois 1mL do imunolipossoma a passagem por uma coluna Sepharose CL-4B para remoção do anticorpo livre por gel filtração, eluindo com PBS diluído pH 7,4 e coletando 30 frações de 1 ml. Para esta etapa, realizou-se um teste utilizando quantidades diferentes de maleimida e e anticorpo:

Uma formulação foi produzida empregando 3,6 mg de DSPE-PEG-Maleimida correspondente a 5% molar do total de lipídios empregados e para funcionalização destes lipossomas utilizou-se uma solução de cetuximabe com a concentração de 1 mg/mL.

A segunda formulação foi preparada com 7,2 mg de DSPE-PEG-Maleimida correspondente a 10 % molar do total de lipídios e para conjugação utilizou-se uma solução com 2 mg/mL de anticorpo.

#### 4.4.1 Método de quantificação das proteínas com ácido bicinconínico (BCA)

Utilizou-se o kit de BCA QuantiPro™ BCA Assay Kit da Merck®. Preparou-se uma curva de calibração a partir de uma solução-mãe de albumina e em uma placa de 96 poços, adicionaram-se 25 µL dos padrões de albumina nas concentrações 0, 5, 12.4, 25, 62.5, 125, 250 µg/mL em duplicata e 25uL de cada amostra coletada das colunas de dessalinização PD-10 e a de gel filtração Sepharose CL-4B (Lipossoma controle e Imunolipossoma) em cada poço. Adicionou-se 200 uL de reagente de trabalho aos respectivos poços preenchidos anteriormente. O reagente de trabalho foi preparado misturando a solução A e a solução B disponibilizadas no kit de doseamento, numa proporção 50:1. Homogeneizou-se levemente a placa e manteve-se a 60°C por 30 min. A leitura foi realizada em leitor de placas a 562nm.

Utilizou-se a curva de calibração de albumina para determinar uma equação da reta (aceitou-se somente valores de  $R^2 > 0,99$ ). A partir da equação da reta, determinou-se a concentração de proteínas em cada coleta. É importante ressaltar que, levando em consideração que é um método colorimétrico, as absorbâncias do lipossoma controle foram descontadas das absorbâncias do imunolipossoma, para retirar interferências do reagente de trabalho ou dos lipídios utilizados nas preparações.

Por este método de quantificação, é possível obter a concentração de proteínas em cada coleta de amostra passada pela coluna Sepharose CL-4B, e assim gerar um cromatograma de detecção do imunolipossoma, com a separação das nanopartículas funcionalizadas e o anticorpo livre não conjugado aos lipossomas. Com isso, pode-se obter a proporção de anticorpo que se ligou à nanopartícula e posteriormente a eficiência de funcionalização do método, conforme cálculo da equação 1.

$$\text{Eficiência de conjugação: } \frac{\text{Concentração de proteínas no imunolipossoma}}{\text{Concentração de proteínas totais do ensaio}} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.4.2 Avaliação da presença do anticorpo por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)



As formulações foram incubadas com 2-mercaptoetanol e tampão de amostra Laemmli a 60°C por 10 min. Uma câmara de eletroforese Mini-PROTEAN, gel SDS-Page 4-20% e O tampão de corrida tris/glicina/SDS foi usado para esta avaliação. A eletroforese foi feita a 175 V por 30 min e Precision Plus Dual Color A proteína foi usada como um padrão de proteína. Para coloração do gel foram utilizados 25 mL do corante Azul de Coomassie. Para retirada do corante azul de Coomassie, foram realizadas sucessivas lavagens utilizando água destilada e agitação manual. Esse processo foi repetido até que a água das lavagens não apresentasse mais a coloração azulada e após isso, colocou-se o gel sobre uma folha branca para fotografia do mesmo.

#### **4.5 Caracterização físico-química dos lipossomas e imunolipossomas**

##### ***4.5.1 Análise de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta***

Para análise do tamanho de partícula e índice de polidispersividade utilizou-se o método de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*). As amostras contendo lipossomas e imunolipossomas foram diluídas na proporção 1:10, empregando 100 µL da formulação preparada e 900 µL de água ultrapurificada e as mesmas foram homogeneizadas em vórtex.

Para a análise, foi empregado um feixe de laser de HeNe que incide sobre as partículas e observa-se as flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo, pelas nanopartículas. Essa análise fornece informações sobre o movimento da partícula, movimento este que é a causa das flutuações da intensidade. Os dados detectados são analisados pelo software do equipamento Zetasizer Nano (Marca: Malvern Instruments®; Modelo: Nano ZS) e estas flutuações de intensidade são correlacionadas com o tamanho da partícula usando a relação de Stokes-Einstein, visto que o movimento Browniano é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula. Já o índice de polidispersividade é um parâmetro que indica a distribuição do tamanho das gotículas que compõem o sistema (ENOKI, 2010)

Para determinação do potencial zeta das cargas residuais superficiais, utilizamos o mesmo equipamento da caracterização anterior, no entanto, 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 (ALMEIDA, 2018).

#### ***4.5.2 Eficiência de encapsulação***

Primeiramente foi preparada uma curva analítica para quantificação de cabazitaxel. Inicialmente, foi preparado uma solução estoque de cabazitaxel (1mg/mL) em acetonitrila que posteriormente foi filtrada em filtro PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ . Em seguida, foram preparadas triplicatas de soluções a partir da solução estoque de cabazitaxel nas respectivas concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10; 15 e 30  $\mu\text{g/mL}$ . A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV a 230 nm, a linearidade da curva ( $R^2$ ) foi avaliada em todos os ensaios, utilizada como padrão e a equação da reta obtida foi necessária para quantificar o fármaco.

Para análise da eficiência de encapsulação, utilizou-se protocolo de determinação direta, no qual, avalia-se amostras totais (fármaco encapsulado e não encapsulado em suspensão) e a amostras purificadas por filtração (0,45  $\mu\text{m}$ ), para remoção do fármaco livre, precipitado.

As formulações branco e contendo cabazitaxel foram inicialmente homogeneizadas em vórtex. Em seguida, para amostras totais, 300 $\mu\text{L}$  da formulação foram transferidas para falcons em triplicata e completado o volume com 2700 $\mu\text{L}$  de acetonitrila. As mesmas foram submetidas a agitação em vórtex por 30 segundos, permaneceram sob banho ultrassônico por 10 minutos e foram novamente agitadas com por 30 segundos. Após isso, as amostras totais foram filtradas em filtros PTFE e realizadas as respectivas leituras em espectrofotômetro a 232 nm. Para as amostras purificadas, as formulações branco e com fármaco foram inicialmente homogeneizadas em vórtex, posteriormente, 1500  $\mu\text{L}$  de cada uma das formulações foram filtradas em filtro PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  (com o objetivo de retirar o fármaco não encapsulado que fica precipitado em solução aquosa), em seguida 300  $\mu\text{L}$  da amostras foram diluídos com 2700  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. Assim, as amostras purificadas passaram pelo mesmo processo final que as amostras totais, a leitura de ambas amostras foi 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.

$$EE: \frac{(\text{Concentração do fármaco na amostra purificada})}{(\text{Concentração do fármaco na amostra total})} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

#### **4.5.3 Liofilização das formulações**

A liofilização é amplamente utilizada para obtenção de formulações sólidas no intuito de oferecer estabilidade de armazenamento suficiente para proteínas instáveis e outros produtos farmacêuticos estruturalmente complexos. Neste estudo, foi selecionada a sacarose como crioprotetor, a qual é um açúcar polar hidratado com extensas capacidades de ligação de hidrogênio (WANG, GRAINGER, 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 (Marca: LabConco®; Modelo: FreeZone 4.5 Liter Freeze Dry Systems) 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 ressuspenso em água ultrapurificada para avaliação das características físico-químicas no aparelho Zetasizer nano.

#### **4.5.4 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<sup>-1</sup>, de 4000 cm<sup>-1</sup> a 400 cm<sup>-1</sup>, em equipamento Shimadzu modelo IRTracer-100.

#### **4.5.5 Análises térmicas: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e termogravimetria**

As análises de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial foram realizadas simultaneamente em um sistema STA 449 F3 Júpiter (Netzsch). As medidas foram obtidas de 25 a 400°C, utilizando-se uma taxa de 10 K.min<sup>-1</sup>, em atmosfera de nitrogênio, usando um cadinho de alumínio contendo 10 mg de amostra.

#### **4.5.6 Difração de Raio-x**

Os difratogramas foram obtidos utilizando-se um instrumento convencional D8 Advanced da Bruker AXS, equipado com um goniômetro theta/theta e fonte de radiação  $\text{CuK}\alpha$  (0,15419 nm). As medidas foram realizadas sob uma tensão de aceleração de 40 kV e corrente de 40 mA, na geometria de Bragg Brentano, de 5 a 40°.

#### **4.5.7 Estabilidade Coloidal**

A estabilidade das formulações (lipossomas em branco, lipossomas CBZ, imunolipossomas em branco e imunolipossomas CBZ) foi avaliada quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta por 30 dias de armazenamento a 4°C.

#### **4.6 Método analítico para quantificação de cabazitaxel (CTX) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).**

O método analítico para quantificação cabazitaxel (CTX) em ensaio de liberação foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi realizada uma adaptação do método descrito com Yin et al (2019), utilizando acetonitrila:água (65:35, v:v) como fase móvel em fluxo de 1 mL/min, coluna SunFire® C18 3,5  $\mu\text{m}$ , nas dimensões de 150 x 4,6 mm. O comprimento de onda utilizado foi de 230 nm com volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura do forno ajustada para 37 °C  $\pm$  1°C e tempo de corrida de 10 min. Para demonstrar adequabilidade do método às condições de análise deste projeto avaliou-se o parâmetro de linearidade, conforme descrito pela resolução da RDC 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

Realizou-se a construção de curvas analíticas, determinada pela análise de nove níveis de concentração (0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 30  $\mu\text{g/mL}$ ). Para tanto, foi preparada uma solução estoque CTX SQR (1000  $\mu\text{g/mL}$ ), em um balão volumétrico de 10 mL. A partir da solução estoque foi preparada em triplicata uma curva de calibração, nas 9 concentrações já citadas anteriormente, utilizando-se acetonitrila como diluente. Além disso, elaborou-se uma curva analítica composta de solução de lauril sulfato de sódio 1% contaminada com o fármaco

nas 9 concentrações propostas anteriormente (0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 30) ou seja, foi construída uma curva matrizada (fármaco na presença da matriz).

As amostras foram injetadas no equipamento e processadas de acordo às condições já citadas. A partir da média dos valores das áreas encontradas e das concentrações testadas para as três curvas a equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados (representação gráfica das respostas em função da concentração do analito). Também foram avaliados o gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística e a equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos, de acordo à RDC 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

#### **4.7 Estudo de liberação *in vitro* dos lipossomas e imunolipossomas contendo cabazitaxel**

##### **4.7.1 Avaliação da solubilidade do cabazitaxel**

Solubilizou-se 1% de lauril sulfato de sódio sob agitação (1g em 100mL de tampão fosfato pH 7,4) e dividiu em 3 alíquotas de 5mL em frascos de vidro, acrescidas com excesso de 5mg de fármaco. As misturas foram mantidas sob agitação magnética na placa de agitação multipontos (Marca: SolidSteel®, Modelo: SSAGDa) por 24 horas. Após esse período de 24 horas, centrifugou-se a suspensão a 3000rpm por 15 min (Marca de centrífuga: Hermle®; Modelo: Z206A). Recuperou-se o sobrenadante dos fálcons; filtrou em filtro de 0,45 micras (PVDF) e diluiu em proporção 1:10 com acetonitrila (100 µL de amostra e 900 acetonitrila). As amostras foram quantificadas em HPLC.

##### **4.7.2 Metodologia de avaliação da liberação *in vitro* pelo método da bolsa de diálise**

A liberação do fármaco cabazitaxel a partir das vesículas lipídicas foi investigada pelo método da bolsa de diálise, através da adaptação da técnica descrita por Aires Fernandes et al. (2021), como pode ser visualizado na figura 12. Foi preparado uma solução concentrada de cabazitaxel (20 mg/0,5 mL) com 0,5 mL de polissorbato 80 como excipiente e uma preparação diluente contendo 1,5 mL de volume, conforme constituição de solução comercial de cabazitaxel (JEVTANA®) (CHMP, 2011). Para preparo do diluente foram utilizados 13%

(p/p) de etanol a 95% v/v em água ultrapura (252 mg de etanol 95% v/v). O diluente foi vertido na solução concentrada para obtenção de uma solução de cabazitaxel 10 mg/mL, conforme a preparação do JEVTANA® (CHMP, 2011).

A solução de cabazitaxel, lipossomas e imunolipossomas 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. Utilizou-se 3 mg do fármaco no compartimento doador, para que ao final do estudo as “Sink conditions” fossem obedecidas e caso todo o ativo fosse liberado no meio receptor houvesse uma concentração máxima de 60 µg/mL, baseado em ensaio de solubilidade. O compartimento receptor 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 por HPLC, previamente descrito. Posteriormente, os dados obtidos foram aplicados à ferramenta DDSolver (Extensão da Microsoft Excel®) para análise estatística, matemática e de ordem cinética de liberação através dos modelos: ordem zero (equação 3), primeira ordem (equação 4), Peppas (equação 5), Higuchi (equação 6) e Weibull (equação 7). As equações dos modelos matemáticos seguem descritas a seguir (JAIN; JAIN, 2016 ; JAHROMI et al, 2020)

$$D_t = D_0 + Kt \quad (\text{Equação 3})$$

$D_t$  = Quantidade de fármaco dissolvido no tempo  $t$ ,  $D_0$  = Quantidade inicial de fármaco na solução e  $K_0$  = constante de liberação de ordem zero

$$\log C = \log C_0 - \frac{Kt}{2,303} \quad (\text{Equação 4})$$

$C_0$  = Concentração inicial do fármaco,  $K$  = constante de velocidade de primeira ordem e  $t$  = tempo

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (\text{Equação 5})$$

$M_t/M_\infty$  = Uma fração do fármaco liberado no tempo  $t$ ,  $k$  = constante de taxa de liberação e  $n$  = expoente de liberação.

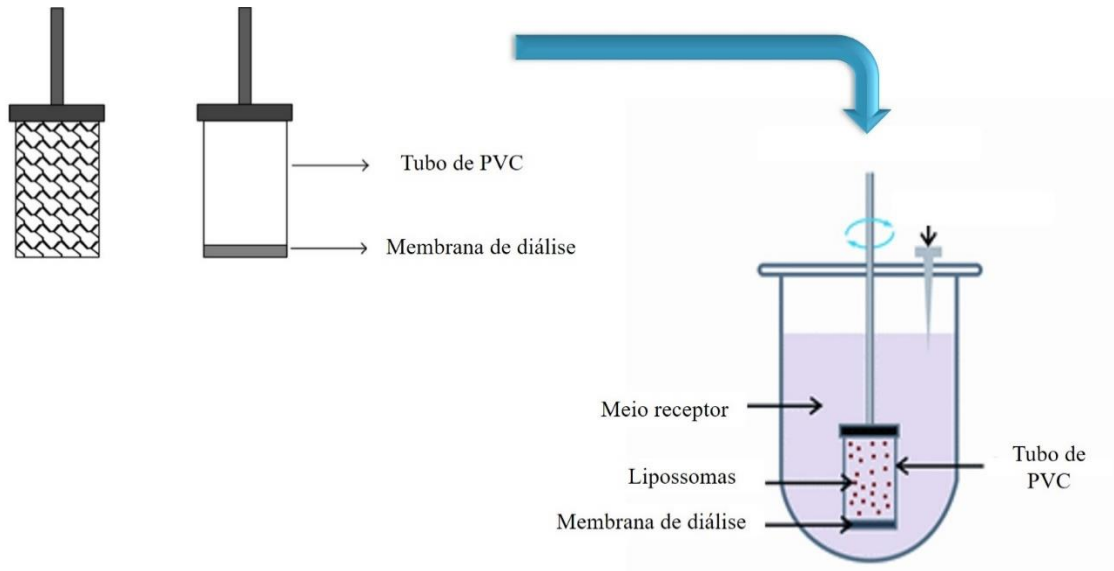
$$Q_t = \sqrt{D(2C - C_s)} C_t \quad (\text{Equação 6})$$

$Q_t$  = Concentração de fármaco liberado por unidade de área no tempo  $t$ ,  $C$  = concentração inicial do fármaco,  $C_s$  = a solubilidade do fármaco,  $C_t$  = Concentração final do fármaco e  $D$  = constante de difusão

$$M = M_0 \left\{ 1 - e^{-\frac{(t-T)^b}{a}} \right\} \quad (\text{Equação 7})$$

$M$  = Concentração de fármaco dissolvido em função do tempo  $t$ ,  $M_0$  = Concentração total de fármaco total sendo liberada,  $T$  = o tempo de atraso medido como resultado do processo de dissolução,  $a$  = parâmetro de escala que descreve o tempo dependência,  $b$  = forma da progressão da curva de dissolução.

Figura 12: Esquema da metodologia de liberação *in vitro* para os lipossomas e imunolipossomas.



Fonte: Adaptado de Marfatia e Sayed (2017)

#### 4.8 Cultivo Celular

No presente trabalho, utilizaram-se duas linhagens celulares de câncer de próstata humano: DU145 e PC3, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem celular PC3 (ATCC® CRL-1435) é composta por células de metástase óssea do câncer de próstata e a linhagem celular DU145 (ATCC® HTB-81) são células de metástase cerebral, com superexpressão de EGFR. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640M, suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e 1% de solução de antibiótico/antimicótico, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, de acordo com as recomendações da ATCC. As células foram mantidas em garrafas de cultura estéreis e o crescimento foi acompanhado diariamente por meio da observação por microscópio invertido, para verificação da densidade celular. Após atingirem confluência, o meio foi removido, as células foram lavadas com 5 mL de PBS estéril e desaderidas com 5 mL de tripsina/salina (1:10) por 10 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado 10 mL de meio RPMI completo para inativação da tripsina, seguido de centrifugação (1500 rpm por 10 minutos) em tubo falcon, ressuspensão do pellet com 1 mL de meio completo e foram devolvidos, em média, 100 µL da suspensão de células para a garrafa contendo meio RPMI.



Para a preparação dos experimentos, após a ressuspensão do pellet citado anteriormente, adicionou-se, em um eppendorf estéril, 20  $\mu\text{L}$  da suspensão de células e 180  $\mu\text{L}$  de meio, para assim, permitir a contagem das células contidas no pellet em câmara de Neubauer. Após a contagem dos 4 quadrantes em câmara de Neubauer, ajustou-se a densidade de células visando atingir a concentração de células necessária para cada experimento, padronizando 25.000 células/poço para placas de 96 poços e  $5 \times 10^5$  células/poço para placas de 6 poços.

Para estocagem, após a ressuspensão do pellet citado anteriormente, adicionou-se 900  $\mu\text{L}$  da suspensão de células e 100  $\mu\text{L}$  de DMSO em criotubo. As células foram congeladas por 4 horas em freezer  $-80^\circ\text{C}$ , seguido de congelamento em nitrogênio líquido.

#### **4.8.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro***

Para avaliação da citotoxicidade, foi utilizado o método MTT, que consiste na quantificação da atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais, por meio da redução do MTT (coloração amarela) à cristais de sal de formazan (coloração púrpura) (STOCKERT et al, 2018). Com as devidas condições de cultivo, uma vez atingida 90% de confluência, as células foram tripsinizadas com tripsina de 1:10 e transferidas (25.000 células por poço) para placas de fundo chato com 96 poços e incubadas por 24h a  $37^\circ\text{C}$  nas condições recomendadas para cada célula. Após a remoção do meio de cultura completo, os grupos experimentais (lipossoma, imunolipossoma, além dos controles sem fármaco e controle positivo, composto por cabazitaxel) foram diluídos em meio completo e aplicados nas placas, que foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 72h, foram testadas as seguintes concentrações de cabazitaxel: 0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25,00 e 50,00 nM. Após o período de incubação, os poços foram lavados com solução salina e aplicado meio completo com solução de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio - MTT (0,375 mg/mL), seguido por incubação por 4h a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, o meio contendo MTT foi descartado e adicionado DMSO nos poços para dissolver os sais de formazam. A absorbância foi lida a 570nm. A concentração resultante em 50% de morte celular (IC50) foi calculada pelas curvas de concentração-efeito, considerando a densidade óptica do controle negativo (células não tratadas) como 100% (ELOY et al, 2016, com modificações).

#### **4.8.2 Avaliação do uptake celular por citometria de fluxo**

Para a avaliação do uptake por citometria de fluxo dos lipossomas e imunolipossomas (sem fármaco, contendo o agente fluorescente DIO, 3,3'-Dioctadeciloxacarbocianina perclorato, marcador de bicamadas lipídicas, encapsulado a 0,5 mol%) pelas células DU145 e PC3 foi empregado o protocolo descrito por Eloy et al., (2017b) e Petrilli et al., (2018a), com modificações. Foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  células/poço em microplacas de 6 poços e incubadas por 24h a 37°C em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com as amostras diluídas em meio incompleto por 4 e 24h a 37°C. As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em solução salina e então foram acrescentadas de iodeto de propídio (5 µL de solução 50 µg/mL) e submetidas à análise em citômetro de fluxo (BD – Modelo: FACSCalibur), usando  $\lambda_{exc} = 488$  nm,  $\lambda_{em} = 530/30$  nm, para DIO, e  $\lambda_{exc} = 488$  nm e  $\lambda_{em} = 670$  nm para iodeto de propídio.

#### **4.9 Análises estatísticas**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Realizaram-se os testes t de student, two way ANOVA com pós teste de tukey, One Way Anova, regressão linear múltipla e correlação de Pearson através do programa GraphPad Prism versão 8.0.1. Para todos os testes foram considerados dados com importância estatística aqueles com  $p < 0,05$  (\*).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento dos lipossomas contendo cabazitaxel

Para desenvolvimento da formulação utilizaram-se os princípios de *Quality by Design* (QbD). Assim, para que haja um estudo de acordo com os critérios de QbD é necessário: definir o perfil de qualidade do produto, projetar os processos necessários para atingir este perfil, identificar atributos críticos de qualidade e fazer o controle de fabricação, executando os processos ao longo do tempo dentro do espaço de design estabelecido e assim assegurando a qualidade do produto a ser obtido (XU; KHAN,; BURGESS, 2012).

Como estratégia de QbD, tem-se o princípio de *Design of Experiments* (DoE), no qual são identificadas as variáveis significativas e planeja-se a execução de um projeto com menor quantidade de ensaios, sendo este um método fundamental para economia de tempo e materiais. Esta doutrina de QbD baseada em DoE está sendo continuamente explorada por cientistas para pesquisas sistemáticas e no campo farmacêutico já está sendo incorporado em agências reguladoras internacionais como ICH e USFDA (Q8 – Q11) (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019).

Dentro deste contexto, Eloy et al (2021) elaboraram um desenho estatístico Box-Behnken (BBD) com três fatores e três níveis, no qual avaliou-se a influência de variáveis independentes (razão molar lipídio:fármaco, razão colesterol:lipídio e razão molar DSPE-PEG:lipídio) nas características físico-químicas dos lipossomas. Dessa forma, ao fim dos ensaios foi possível determinar uma formulação adequada com tamanho de partícula, eficiência de encapsulação e índice de polidispersividade dentro dos parâmetros estabelecidos.

Assim, destaca-se que, BBD são designs de superfície de resposta, feitos especialmente para exigir apenas 3 níveis, codificados como -1, 0 e +1. Eles são formados pela combinação de experimentos fatoriais e cria desenhos com propriedades estatísticas desejáveis, mas, com apenas uma fração dos experimentos necessários para um fatorial de três níveis (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019). Neste estudo, buscou-se avaliar como o tipo de lipídio, a razão molar fármaco: lipídio e a concentração molar de colesterol influenciou as características físico-químicas dos lipossomas, para isso, utilizou-se ferramentas estatísticas que demonstrassem as relações entre as variáveis selecionadas e os resultados obtidos.

A Tabela 5 mostra as formulações preparadas de acordo com o planejamento de ensaios mostrados na tabela 4 e seus respectivos valores de eficiência de encapsulação, tamanho

de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Observa-se que os valores de eficiência de encapsulação variaram de 8,20 a 93,78%, enquanto o tamanho de partícula variou de 83,62 a 387,70 nm, PDI de 0,230 a 0,580 e, por fim, potencial zeta de -0,9 a -22,6 mV. Portanto, observou-se elevada variação de parâmetros físico-químicos, dependendo de variáveis tipo de lipídio, razão fármaco/lipídio e porcentagem molar de colesterol.

Tabela 5: Resultados da caracterização físico-química (eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta) de lipossomas contendo cabazitaxel.

Ensaio	Tamanho de partícula ± DP (nm)	PDI ± DP	Eficiência de encapsulação ± DP (%)	Potencial zeta ± DP (mV)
1	137,37 ± 2,01	0,283 ± 0,02	34,30 ± 8,65	-13,2 ± 0,21
2	252,63 ± 2,14	0,387 ± 0,07	21,75 ± 7,42	-10,4 ± 0,80
3	83,62 ± 0,99	0,184 ± 0,01	27,81 ± 3,62	-22,6 ± 0,21
4	351,27 ± 4,66	0,539 ± 0,07	9,75 ± 0,04	-9,00 ± 0,53
5	136,7 ± 2,21	0,335 ± 0,01	93,78 ± 0,71	-10,9 ± 0,49
6	245,6 ± 4,50	0,580 ± 0,06	26,73 ± 4,49	-11,1 ± 0,51
7	109,77 ± 0,93	0,230 ± 0,01	78,12 ± 2,96	-11,1 ± 1,05
8	127,27 ± 0,93	0,304 ± 0,03	8,34 ± 1,40	-9,50 ± 0,90
9	65,59 ± 6,67	0,324 ± 0,04	65,59 ± 6,67	-9,42 ± 0,52
10	257,53 ± 86,19	0,554 ± 0,15	49,88 ± 6,72	-10,50 ± 0,31
11	184,00 ± 4,10	0,397 ± 0,02	40,03 ± 3,32	-9,60 ± 0,99
12	255,20 ± 4,70	0,380 ± 0,16	18,99 ± 2,31	-8,10 ± 0,08
13	308,67 ± 8,33	0,407 ± 0,08	8,20 ± 4,64	-5,9 ± 0,48
14	387,70 ± 30,63	0,520 ± 0,08	7,78 ± 1,08	-6,1 ± 0,50
15	388,95 ± 1,83	0,452 ± 0,04	11,17 ± 6,00	-7,8 ± 0,79

A tabela 6, apresenta os resultados de tamanho, PDI e potencial zeta para as 15 formulações testadas, mas fazendo um comparativo do que foi obtido para as formulações branco, ou seja, somente os lipídios sem o fármaco, e o que foi obtido para as formulações com encapsulação do cabazitaxel.

Tabela 6: Valores experimentais de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta de lipossomas contendo fármaco e lipossomas brancos com seus respectivos valores de desvio padrão (DP).

Ensaio	Tamanho $\pm$ DP (nm)		PDI $\pm$ DP		Potencial zeta $\pm$ DP (mV)	
	Branco	Com fármaco	Branco	Com fármaco	Branco	Com fármaco
1	101,93 $\pm$ 0,75	137,37 $\pm$ 2,01	0,192 $\pm$ 0,01	0,283 $\pm$ 0,02	-12,6 $\pm$ 0,52	-13,2 $\pm$ 0,21
2	120,23 $\pm$ 1,12	252,63 $\pm$ 2,14	0,263 $\pm$ 0,03	0,387 $\pm$ 0,07	-8,9 $\pm$ 0,84	-10,4 $\pm$ 0,80
3	98,92 $\pm$ 1,49	83,62 $\pm$ 0,99	0,184 $\pm$ 0,01	0,238 $\pm$ 0,01	-16,2 $\pm$ 5,62	-22,6 $\pm$ 0,21
4	231,77 $\pm$ 4,57	351,27 $\pm$ 4,66	0,535 $\pm$ 0,03	0,539 $\pm$ 0,07	-8,8 $\pm$ 0,57	-9,00 $\pm$ 0,53
5	201,57 $\pm$ 9,57	136,7 $\pm$ 2,21	0,631 $\pm$ 0,12	0,335 $\pm$ 0,01	-4,8 $\pm$ 0,46	-10,9 $\pm$ 0,49
6	165,03 $\pm$ 1,29	245,6 $\pm$ 11,69	0,312 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,06	-11,1 $\pm$ 0,30	-11,1 $\pm$ 0,51
7	112,67 $\pm$ 0,64	109,77 $\pm$ 0,93	0,251 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	-11,9 $\pm$ 0,60	-11,1 $\pm$ 1,05
8	119,83 $\pm$ 2,18	127,27 $\pm$ 0,93	0,282 $\pm$ 0,03	0,304 $\pm$ 0,03	-10,4 $\pm$ 0,98	-9,5 $\pm$ 0,90
9	208,2 $\pm$ 2,06	117,8 $\pm$ 1,64	0,427 $\pm$ 0,01	0,324 $\pm$ 0,04	-10,5 $\pm$ 0,84	-9,52 $\pm$ 0,42
10	144,3 $\pm$ 3,25	257,53 $\pm$ 86,19	0,497 $\pm$ 0,01	0,554 $\pm$ 0,15	-12 $\pm$ 0,79	-10,5 $\pm$ 0,31
11	167,93 $\pm$ 0,81	184 $\pm$ 4,10	0,316 $\pm$ 0,01	0,397 $\pm$ 0,02	-11,2 $\pm$ 0,56	-9,6 $\pm$ 0,99
12	167,97 $\pm$ 1,62	255,2 $\pm$ 4,70	0,299 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,16	-9,4 $\pm$ 0,89	-8,1 $\pm$ 0,08
13	189,3 $\pm$ 1,47	308,67 $\pm$ 8,33	0,328 $\pm$ 0,03	0,407 $\pm$ 0,08	-8,3 $\pm$ 0,55	-5,9 $\pm$ 0,48
14	158,10 $\pm$ 2,62	387,70 $\pm$ 30,63	0,472 $\pm$ 0,02	0,520 $\pm$ 0,08	-11,20 $\pm$ 0,55	-6,1 $\pm$ 0,50
15	157,37 $\pm$ 0,76	388,95 $\pm$ 1,83	0,265 $\pm$ 0,05	0,452 $\pm$ 0,04	-9,30 $\pm$ 0,84	-7,8 $\pm$ 0,79

Observa-se na tabela 6, que as formulações 3,5,7 e 9 apresentaram uma redução no tamanho de partícula com a incorporação do fármaco, enquanto o restante das formulações apresentou um efeito oposto. É importante ressaltar que, esses 4 ensaios citados têm em comum o lipídio SPC em sua composição. Eloy et al (2016), em seu estudo, obtiveram um resultado semelhante, no qual, o lipossoma branco composto por SPC, colesterol e DSPE-PEG-2000 apresentou tamanho de partícula de 127,59 nm e com a encapsulação do fármaco paclitaxel, ocorreu uma redução do tamanho para 124,10 nm.

O tamanho de partícula é um fator fundamental para a eficácia terapêutica das nanopartículas, principalmente no que diz respeito ao efeito EPR, entrega seletiva do fármaco e a farmacocinética. Dessa forma, Ernesting et al (2013), demonstraram que partículas menores que 5 nm, tem rápida depuração renal, enquanto as com tamanho menor que 50 nm interagem com hepatócitos e sofrem captação, sendo estes os limites inferiores. Com relação aos limites superiores, Ernesting et al (2013), afirmam que partículas com tamanho de 300-400 nm sofrem depuração esplênica, tudo isto foi avaliado com base em um estudo prévio de biodistribuição, no qual lipossomas de 30 – 400 nm, foram avaliados e concluiu-se que após 4 horas da administração, lipossomas com tamanho de 100-200 nm foram 4 vezes mais retidos no tecido tumoral do que os com tamanho menor que 50 nm e maior que 300 nm. Por este motivo, buscou-se para este trabalho, a obtenção de lipossomas com tamanho entre 100 e 200 nm, com o propósito de alcançar o tecido tumoral com maior porcentagem possível da dose administrada e reduzir a depuração por outros tecidos.

Já o índice de polidispersividade (PDI), diz respeito a homogeneidade da distribuição de tamanhos das nanopartículas, de maneira que, valores mais próximos de zero indicam uma distribuição homogênea e baixas variações de tamanho entre os nanocarreadores produzidos. É bem estabelecido na literatura, que o PDI ideal é abaixo de 0,2 e isso garantiria uma boa distribuição da dose de fármaco encapsulado (ELOY et al, 2016; SAWTARIE; CAI; LAPITSKY, 2017; MANDAL et al, 2022). Trabalhos anteriores já relataram valores de PDI próximos a 0,3, o que foi obtido para as formulações 1,3,5,7, 8 e 9 neste estudo. Segundo Guimarães et al (2021), PDI em torno de 0,3 apresenta homogeneidade aceitável para lipossomas. Em associação com os dados apresentados, é importante observar que, com exceção da formulação 9, todas as formulações que apresentaram PDI próximo a 0,3 também apresentaram tamanhos de partículas menores que 150 nm.

Outro parâmetro avaliado nos lipossomas produzidos foi o potencial zeta que corresponde a carga líquida na superfície da nanopartícula, geralmente, carreadores com cargas negativas ( $\xi \leq 10$  mV), são rapidamente depurados pelo sistema retículo-endotelial, enquanto os com carga positiva ( $\xi \geq 10$  mV) podem induzir agregação com proteínas do plasma sanguíneo como a albumina. Além disso, nanopartículas neutras ( $\pm 10$  mV) viajam até três vezes mais distância do que os análogos carregados e distribuídos de forma mais homogênea dentro dos tecidos, já que materiais catiônicos podem se ligar a matriz, como ácido hialurônico e materiais aniônicos, podem interagir com matriz carregada positivamente, como colágeno, o que dificulta o transporte (ERNESTING et al, 2013).

Neste estudo, as formulações 2, 4 e 8 a 15 obtiveram valores de potencial zeta próximos a -10 mV, e todas foram preparadas com os lipídeos DPPC e DSPC. Assim, a interação entre o tipo de lipídeo utilizado e o DSPE-PEG influenciou na determinação do potencial zeta. Pereira et al (2016) encapsularam docetaxel usando diferentes lipídios, e descobriram que quando os lipossomas foram preparados com DSPC ou DPPC associado a 5% DSPE-PEG, valores de ZP próximos a zero foram obtidos. As formulações 1,3,5 e 7 (lipossomas preparados com SPC) obtiveram valores de potencial zeta inferiores a -10 mV, assim como Eloy et al (2020), encapsularam docetaxel em lipossomas preparados com SPC e obtiveram potencial de -16 mV e Aires Fernandes et al (2021) que também prepararam lipossomas com SPC e obtiveram um valor de -26 mV.

Diante do exposto, é importante ressaltar que se busca também alcançar altos valores de eficiência de encapsulação, próximos de 100%, no intuito de obter a maior dose possível do fármaco na administração, sem perda do mesmo na etapa de produção dos lipossomas.

Assim, realizou-se uma análise estatística de regressão linear múltipla, na qual o resultado está expresso na tabela 7 e avaliou-se a influência das variáveis lipídio, proporção fármaco/lipídio e colesterol, nos parâmetros físico-químicos medidos e observou-se que apenas o tipo de lipídio utilizado exerceu efeito significativo no tamanho de partícula, PDI e eficiência de encapsulação.

Tabela 7: Valores de p obtidos para análise de regressão linear múltipla (\*p<0,05)

Variáveis	Valores de p para regressão linear múltipla		
	Tamanho de partícula	PDI	Eficiência de encapsulação
Lipídio	0,045*	0,010*	0,022*
Proporção Fármaco/lipídio	0,194	0,294	0,387
Colesterol	0,897	0,074	0,17

Foi feito também o teste de correlação de Pearson, conforme pode ser verificado na tabela 8, na qual, apresenta-se o valor de p e o coeficiente de correlação de Pearson ( R ) para associar o grau de correlação entre o parâmetro físico-químico avaliado e as variáveis descritas no estudo, de modo que, o tipo de lipídio apresentou correlação positiva com tamanho de partícula e PDI e correlação negativa com eficiência de encapsulação. Para melhor, tratamento

dos dados, utilizou-se os códigos -1, 0 e +1, para expressar os lipídios utilizados (dados expressos tabela 1), ou seja, o resultado de teste de correlação demonstra que menores tamanhos de partícula e PDI e altos valores de eficiência de encapsulação, estariam correlacionados com o lipídio de código -1 (SPC).

Tabela 8: Teste de correlação de Pearson para tamanho de partícula, PDI e eficiência de encapsulação (\* $p < 0,05$ )

Variáveis	Tamanho de partícula		PDI		Eficiência de encapsulação	
	Valor de $p$	Valor de R	Valor de $p$	Valor de R	Valor de $p$	Valor de R
Lipídio	0,0404*	0,5735	0,0157*	0,6524	0,0232*	-0,6221
Proporção Fármaco/lipídio	0,2456	-0,3469	0,4639	-0,223	0,5011	0,2052
Colesterol	0,9151	-0,03286	0,1708	-0,4042	0,2613	-0,3363

Assim, pode-se claramente notar que o SPC foi o que resultou em lipossomas com melhores características físico-químicas para a finalidade pretendida, conforme avaliado nas tabelas 7 e 8. O SPC é uma mistura natural de fosfolipídeos isolados da soja, ricos em fosfatidilcolinas, sendo um excipiente de origem natural, mais acessível que os lipídios sintéticos, bem aceito pelos órgãos reguladores e mais barato. O SPC contém lecitina com cadeias acila de tamanhos e saturações entre 16:0 e 18:3 (HOSAETER et al, 2022). Assim, Hosaeter et al (2022) em seu estudo, produziram lipossomas com diferentes lipídios e a composição que obteve melhores parâmetros físico-químicos foi utilizando o SPC (EE de 97,3%; tamanho de partícula de 82 nm e PDI de 0,240).

Pode-se apontar também que empregando fosfolipídios de cadeias acil longas aumenta-se a eficiência de encapsulação de fármaco hidrofóbicos assim como a melhor retenção do mesmo dentro da bicamada, permitindo uma liberação mais sustentada. Assim como, quando aumenta-se os graus de insaturação das cadeias acil, obtém-se maior liberação do fármaco, ou seja, levando em consideração que o SPC apresenta uma mistura de fosfolídeos saturados e insaturados, pode-se otimizar um sistema com elevada eficiência de encasupsulação conforme pôde ser observado nos estudos citados anteriormente e espera-se uma liberação gradual e sustentada de fármacos hidrofóbicos (LARGE et al, 2021).



Além disso, os outros lipídios testados neste estudo, DPPC (16 carbonos) e DSPC (18 carbonos) são caracterizados como fosfolipídios neutros de cadeia saturada e mesmo sendo testados com diferentes proporções de colesterol e razão fármaco:lipídio, foram obtidos baixos valores de eficiência de encapsulação (< 50%), em todos os ensaios. Pereira et al (2016), obteve resultados semelhantes, no qual, encapsularam docetaxel e quando utilizado DOPC com colesterol, obteve-se eficiência de encapsulação próximo a 100%, enquanto os lipídios DPPC e DSPC não conseguiram gerar bons resultados. Além dos testes realizados, gráficos de superfície de resposta e contorno de superfície foram ferramentas adequadas para o entendimento da relação entre as variáveis independentes e seu efeito nas variáveis dependentes, auxiliando na interpretação de dados obtidos, correspondendo a um processo de seleção da melhor formulação por *quality by design* (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019).

Assim, nas figuras 13 e 14, estão representados os gráficos de contorno e superfície 3-D para a resposta eficiência de encapsulação, 15 e 16, os gráficos para a resposta tamanho de partícula e 17 e 18, correspondentes a resposta PDI, respectivamente. Os gráficos foram gerados no Minitab variando 2 parâmetros e os níveis -1,0 e +1 utilizados como codificação para os gráficos estão descritos na tabela 1.

Figura 13: Gráficos de contorno para variáveis independentes e sua influência em eficiência de encapsulação.

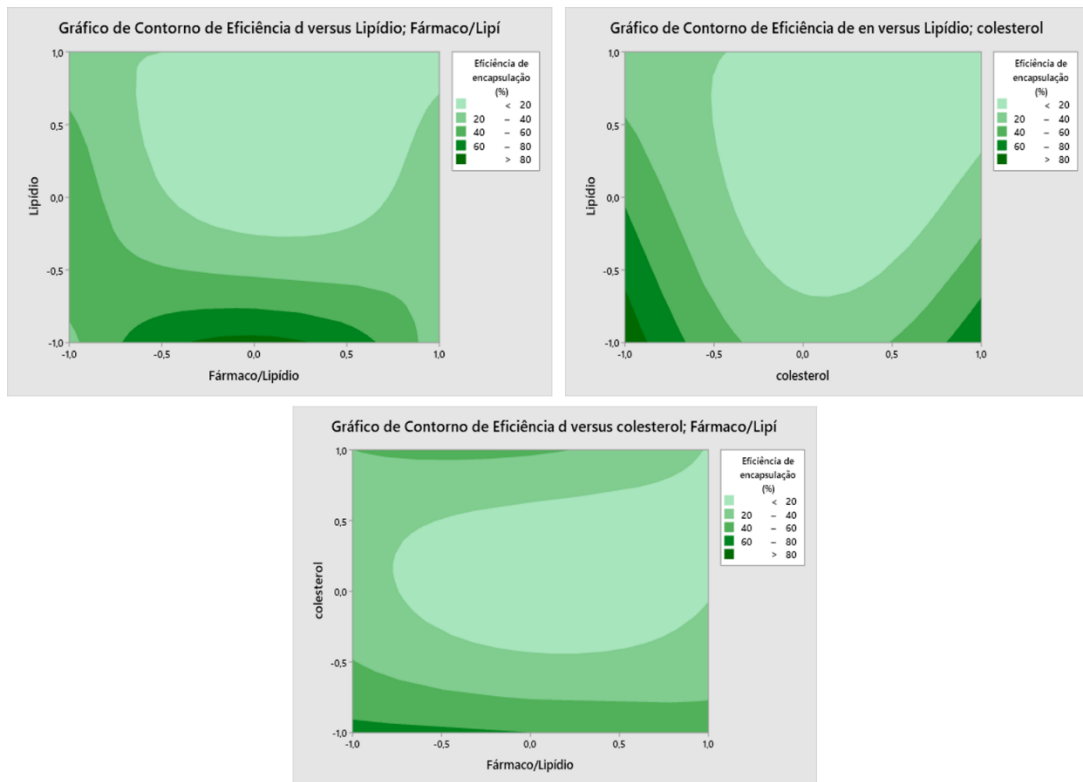


Figura 14: Gráficos de superfície 3D para variáveis independentes e sua influência em eficiência de encapsulação.

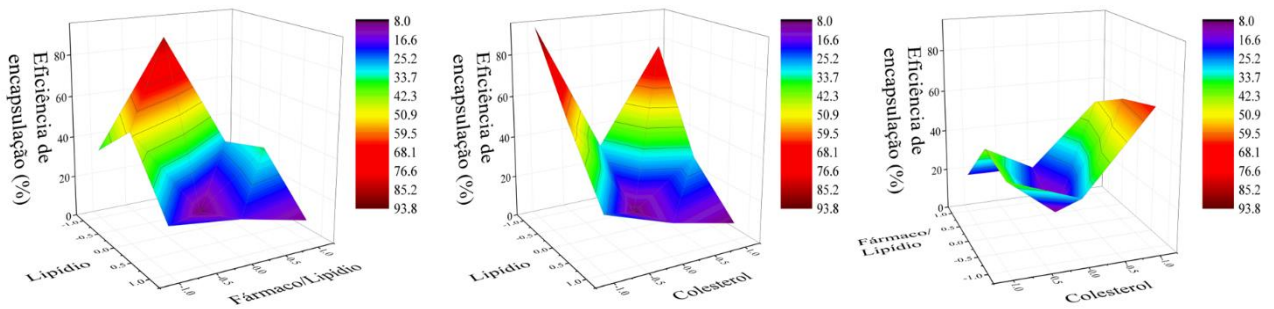


Figura 15: Gráficos de contorno para variáveis independentes e sua influência em tamanho de partícula

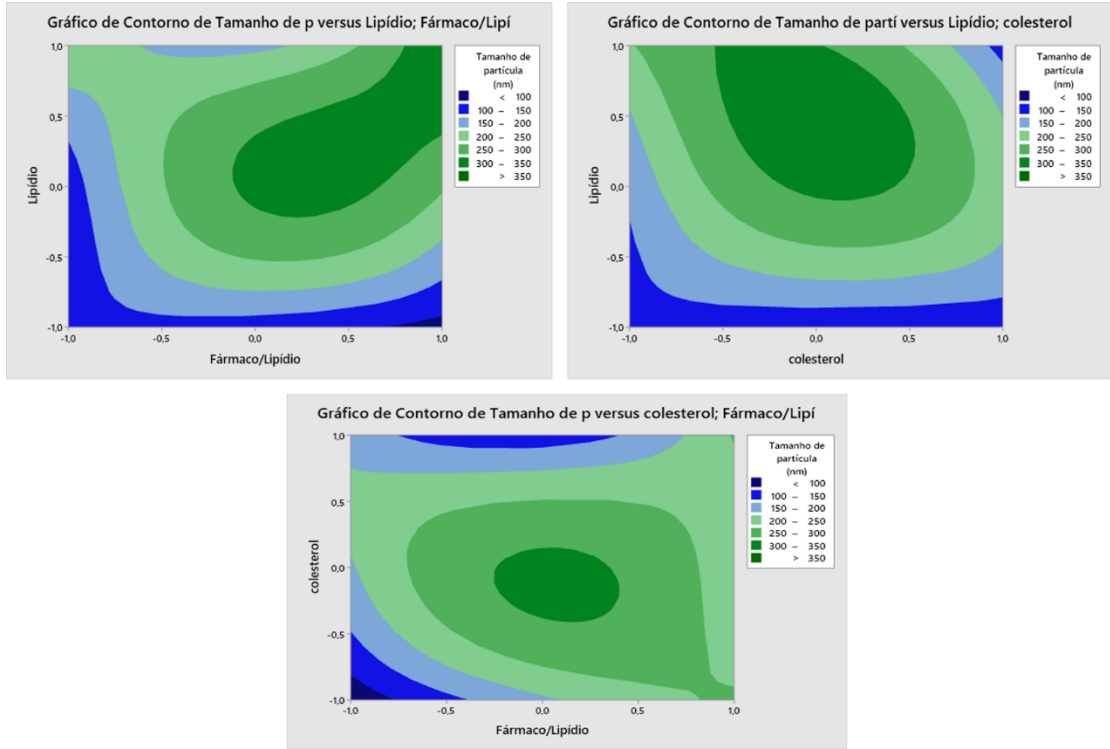


Figura 16: Gráficos de superfície 3D para variáveis independentes e sua influência em tamanho de partícula

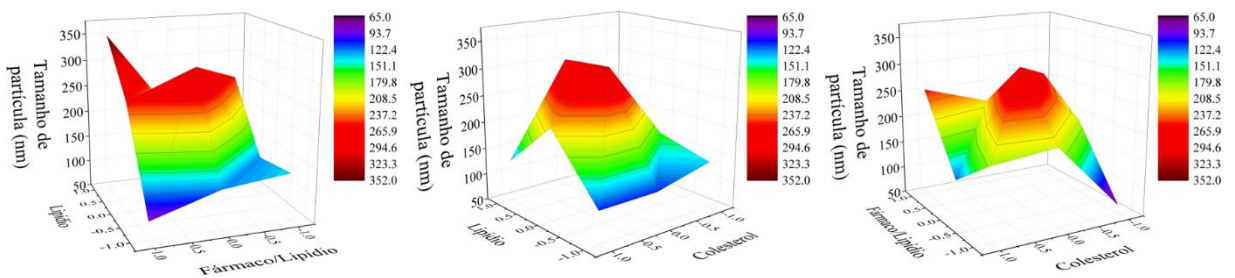


Figura 17: Gráficos de contorno para variáveis independentes e sua influência em PDI

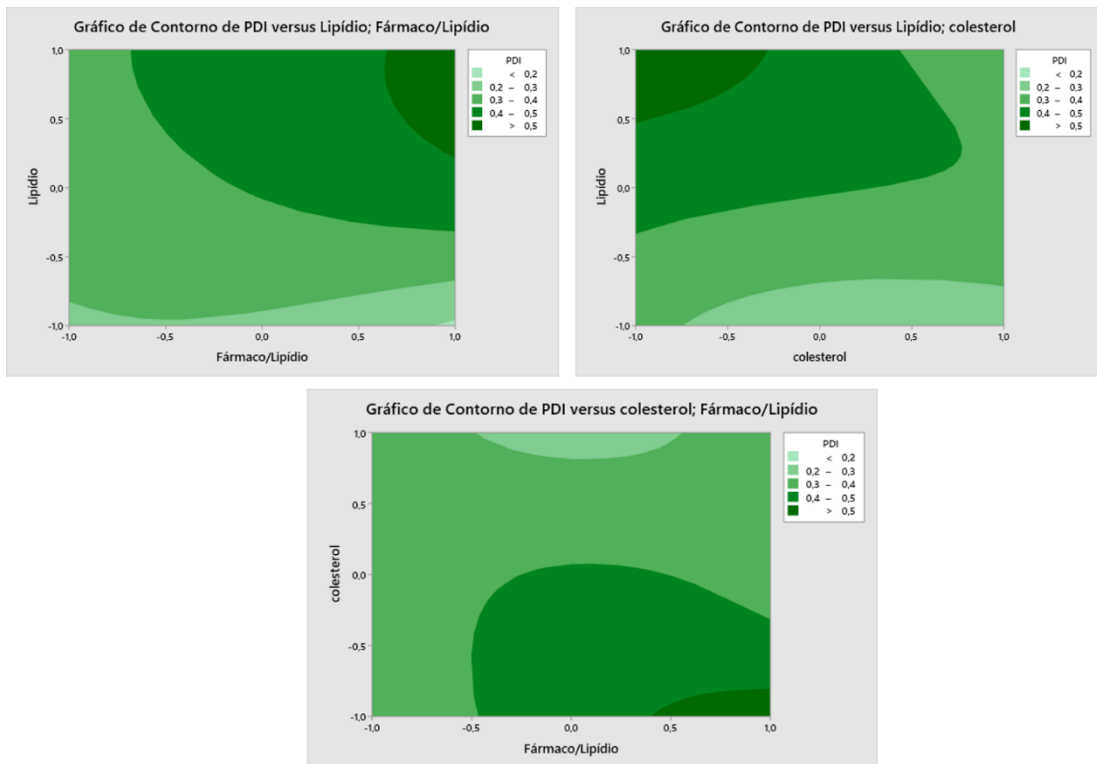
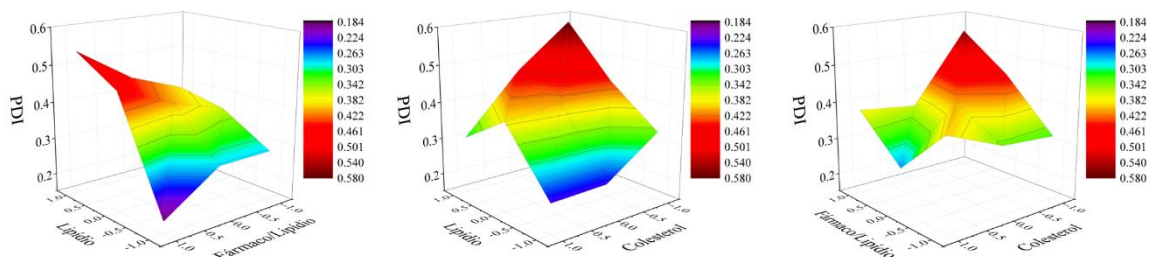


Figura 18: Gráficos de superfície 3D para variáveis independentes e sua influência em PDI.



A partir dos dados mostrados nos gráficos, observa-se que, uma eficiência de encapsulação alta ( $> 80\%$ ) está relacionada com a utilização do lipídio -1 (SPC), associado a uma proporção fármaco/lipídio 1:20, e obtiveram-se altas eficiências com duas proporções de colesterol (10% e 30%), porém, foi obtida um valor mais acentuado quando utilizado 10% de colesterol. Já para a resposta tamanho de partícula, a obtenção de um valor entre 100 e 200 nm, relacionou-se com a utilização do lipídeo SPC, associado a proporção fármaco/lipídio de 1:30 ou 1:20, enquanto a proporção de colesterol, verificou-se um tamanho adequado utilizando qualquer uma das 3 quantidades. Por fim, a resposta PDI, variou um pouco em relação ao que

foi citado anteriormente, visto que, menores valores de PDI ( $< 0,2$ ), estão relacionados a utilização do lipídio SPC, associado a proporção fármaco/lipídio 1:10 e 30% de colesterol.

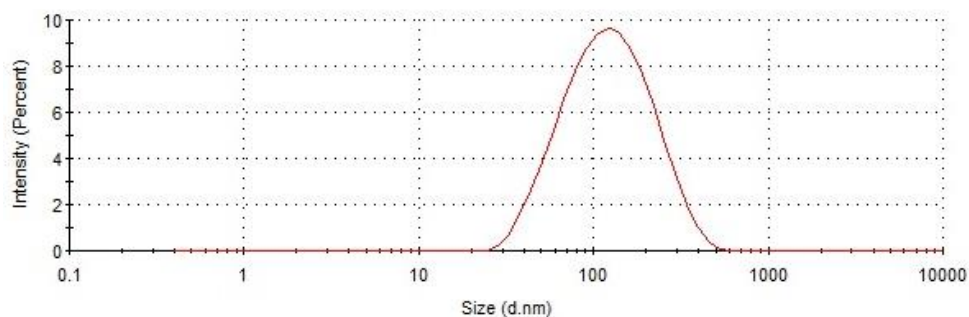
Dessa forma, nota-se que, quando associado o lipídio SPC com 10% de colesterol e uma proporção fármaco/lipídio de 1:20 foi obtido uma eficiência de encapsulação de 93,78%, tamanho de partícula de 136,70 nm e PDI de 0,335 correspondente ao ensaio 5 do planejamento. Assim, confrontando com o que está descrito na literatura, Nsairat et al (2022) afirmam que o colesterol utilizado numa proporção menor que 30% do total de lipídios da formulação melhora rigidez e estabilidade dos lipossomas enquanto Sudhakar; Krishna; Murthy (2016) expressam que elevadas quantidades de colesterol aumentam a rigidez da bicamada lipídica e por este motivo reduzem a eficiência de encapsulação, o que justifica o melhor desempenho da formulação 5 em relação as outras.

Corroborando com os resultados citados, Eloy et al (2020) produziram lipossomas composto por SPC:colesterol:DSPE-PEG-2000 e encapsularam o fármaco docetaxel com proporções molares muito próximas com as da formulação 5 deste estudo, sendo a proporção fármaco:lipídio de 1:23 e Colesterol:lipídio de 1,1:10; de modo que os autores, obtiveram uma eficiência de encapsulação de 99,95% e tamanho de partícula de 67,47 nm.

Com relação ao impacto da razão fármaco:lipídio, Eloy et al (2020), acrescentam que a eficiência de encapsulação aumenta em concentrações molares mais baixas de docetaxel e que para o paclitaxel, por exemplo, já foi demonstrado que altas proporções de fármaco podem resultar em sua cristalização, devido à saturação da bicamada lipídica, prejudicando a encapsulação do fármaco. Pereira et al (2016), demonstraram ao encapsular docetaxel em lipossomas que maior conteúdo do taxano na bicamada lipídica pode levar a precipitação do mesmo e conseqüentemente a perda do fármaco.

Por este motivo, levando em consideração que a classe do taxanos apresenta essa característica, a proporção fármaco:lipídio de 1:20 se mostrou mais adequada para o cabazitaxel, confirmando uma eficiência de encapsulação alta do ensaio 5. Por fim, a formulação 5 do planejamento teve um PDI de 0,335; sendo este um valor encontrado em estudos anteriores, conforme mostrado por Eloy et al (2020) e a maioria das formulações testadas neste trabalho apresentaram valor de PDI próximos a 0,300. A figura 19, apresenta o gráfico de distribuição de tamanho de partícula para a formulação 5, no qual é possível visualizar a homogeneidade das vesículas formadas em acréscimo à informação apresenta pelo PDI.

Figura 19: Gráfico de distribuição de partículas para os lipossomas da formulação 5. Composição da formulação 5: SPC; Cabazitaxel; colesterol; DSPE-PEG-200 (razões molares de 80;5;10;5, respectivamente).



Em adição às informações discutidas, Yin et al (2019), produziram lipossomas contendo cabazitaxel, utilizando a fosfatidilcolina derivada do ovo (Lipoid E80), sendo obtido uma eficiência de encapsulação mais elevada com proporção fármaco:lipídio de 1:20 (83,4%) e que na proporção lipídio:colesterol de 1:6, foram obtidos tamanho de partícula de 99,5 nm com eficiência de encapsulação de 94,9%.

## 5.2 Funcionalização dos lipossomas com o anticorpo monoclonal anti-EGFR

Para realizar a conjugação de anticorpos na superfície de lipossomas, existem várias estratégias. Primeiramente, há os métodos de conjugação direta, nos quais, insere-se um grupamento químico que funciona como âncora na superfície do lipossoma e a derivatização dos anticorpos para que os mesmos tenham grupos químicos reativos com tais âncoras. A maioria das técnicas de conjugação direta utilizam as cadeias de PEG que estão externamente, no lipossoma, nos quais os grupamentos metoxi podem ser substituídos por outros. Já nos anticorpos há presença de aminas e carboxilatos que podem ser modificados para fins de direcionamento (ELOY et al, 2017c).

Os métodos diretos com ligações covantes podem ser feitos de diferentes maneiras, a seguir tem-se alguns exemplos de reação de derivatização do anticorpo: a conjugação de dois grupos sulfetos para formação de pontes dissulfeto, a ligação de ácido carboxílico com aminas primárias do anticorpo (formação de amida), a ligação de carboidratos do anticorpo com hidrazidas (ligação hidrazona), e, por último, a inserção de grupos tióis no anticorpo para posterior ligação com a maleimida na superfície do lipossoma (formação de uma ligação tio éter) (GOLKAR; TAMADDON; SAMANI, 2016).

É importante ressaltar que há também métodos de conjugação indireta, também chamados de métodos pós-insercionais. Nesses casos, inicialmente, prepara-se uma micela contendo o grupamento que futuramente funcionará como âncora (por exemplo, o polímero DSPE-PEG-maleimida) e o anticorpo derivatizado (por exemplo, com grupos tióis), posteriormente, prepara-se o lipossoma e realiza-se a incubação das micelas com a nanopartícula sob determinadas condições de temperatura que permitam a inserção da âncora ligada ao anticorpo na bicamada lipídica. Entretanto, o efeito da composição do lipossoma sobre a incorporação de imunomicela na estrutura de bicamada e o efeito no alvo celular ainda precisam ser mais profundamente estudados (GOLKAR; TAMADDON; SAMANI, 2016).

Para este estudo, selecionou-se o método de conjugação direta, baseado na ligação tioéter entre o grupo tiol do anticorpo e a maleimida presente na superfície do lipossoma, já que forma uma ligação estável e altamente eficiente. Além disso, diversos autores descrevem esta reação como bastante descrita na literatura e apresentou bons resultados (MANJAPPA et al, 2010; GOLKAR; TAMADDON; SAMANI, 2016; ELOY et al, 2017; MERINO; ZALBA; GARRIDO, 2018). Em acréscimo a estas informações, o lipossoma contendo cabazitaxel foi desenvolvido com base no planejamento fatorial e a formulação selecionada foi investigada conforme seus aspectos físico-químicos e visou-se alterar o mínimo possível as condições estudadas para esta formulação, sendo o método direto mais adequado para este fim.

Dentro deste contexto, há alguns autores que desenvolveram imunolipossomas anti-EGFR a partir do método direto de formação da ligação tioéter. Limasale et al (2015), desenvolveram lipossomas compostos de DSPC, Colesterol e DSPE-PEG-2000 contendo celecoxibe para funcionalização com IgG anti-EGFR, e acrescentaram a maleimida no processo de formação do filme lipídico. Petrilli et al (2018), prepararam lipossomas a base de DSPC, colesterol e DSPE-PEG-Maleimida contendo 5-fluorouracil para funcionalização com anticorpos cetuximabe, da maneira muito semelhante ao presente estudo.

Lu et al (2019), desenvolveram lipossomas compostos de HSPC, Colesterol e DSPE-PEG-Maleimida para inserção do anticorpo cetuximabe em sua superfície, assim como, Eloy et al (2020), preparam lipossomas com SPC, Colesterol e DSPE-PEG-Maleimida contendo docetaxel para posterior conjugação com cetuximabe, sendo este último caso, a composição mais semelhante ao que está sendo desenvolvido neste estudo.

Assim, no método direto de formação da ligação tioéter para a ligação covalente ocorrer, deve-se proporcionar tiolação dos grupos terminais de cisteína do anticorpo e inserir uma molécula quimicamente reativa, como uma maleimida na superfície do lipossoma, de

maneira que a maleimida funcione como um âncora para conexão com o anticorpo. A tiolação de anticorpos empregando o reagente de Traut (2-iminotiolano) envolve o grupo cíclico 2-imidotioéster que reage a minas primárias, abrindo assim a estrutura do anel e gerando uma sulfidrina livre. Para inserção do grupamento maleimida no lipossoma, emprega-se o polímero DSPE-PEG-Maleimida durante o preparo da nanopartícula, sendo o DSPE o fosfolipídio que fica dentro da bicamada lipídica e o complexo PEG-Maleimida o restante do polímero que se localiza na parte externa do lipossoma (Eloy et al, 2017a). É importante ressaltar que, os grupos sulfidrina podem sofrer oxidação com consequente formação de ligações cruzadas de dissulfeto, para prevenir tal fato, adiciona-se o etilenodiamina ácido tetraacético (EDTA) para quelar os íons metálicos que são capazes de catalisar essas reações (Eloy et al, 2017a).

Desta forma, conforme mostrado anteriormente, a formulação 5 do planejamento experimental foi selecionada e a mesma foi utilizada para o processo de funcionalização. Assim, a preparação contendo imunolipossomas foi purificada utilizando a coluna de gel filtração de Sepharose CL-4B e as 30 coletas realizadas foram utilizadas para quantificar as proteínas presentes pelo método do BCA. Inicialmente, lipossomas contendo o marcador fluorescente Dio foram eluídos na coluna de Sepharose CL-4B, e a partir das 30 frações coletadas, foram obtidas as absorbâncias no leitor de placas. Fez-se esse ensaio inicial no intuito de mapear em quais coletas o lipossoma elui com o processo de gel filtração. A figura 20 mostra o cromatograma formado a partir das absorbâncias obtidas para lipossoma com Dio eluídos na coluna, nas frações de 5-10. Como pode ser observado nas figuras 21 e 22, o anticorpo livre elui a partir da fração 13, portanto há uma boa resolução.

Posteriormente, os imunolipossomas preparados com 1 mg de anticorpo e 2 mg de anticorpo foram eluídos na coluna seguindo o mesmo procedimento e posterior quantificação das 30 frações com o método de BCA. As concentrações de proteínas encontradas foram utilizadas para elaboração de cromatogramas que estão expressos nas figuras, a seguir. A figura 19, apresenta o cromatograma obtido para formulação que empregou 3,6 mg de DSPE-PEG-Maleimida para 1 mg de anticorpo e a figura 20 corresponde ao cromatograma da formulação contendo 7,2 mg de DSPE-PEG-Maleimida para 2 mg de anticorpo.

Figura 20: Cromatograma do Lipossoma contendo Dio eluído na coluna de Sepharosa CL-4B



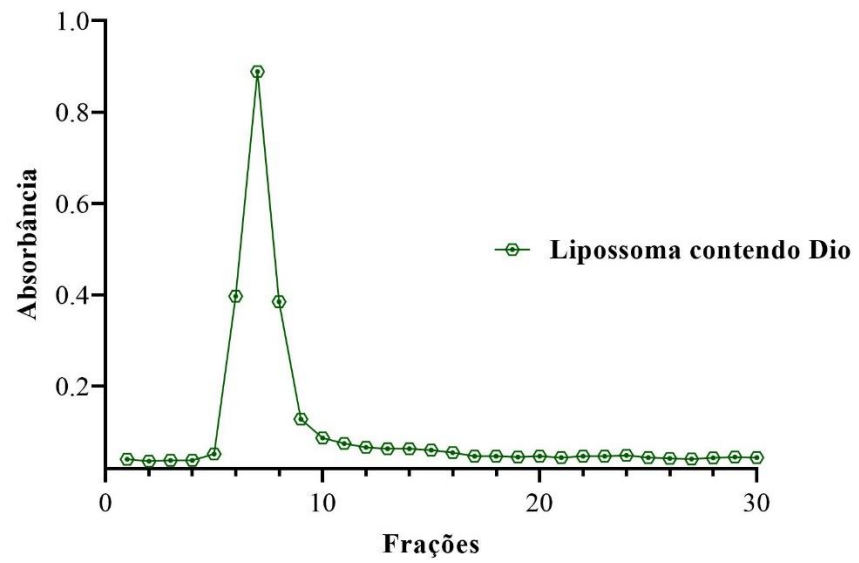


Figura 21: Cromatograma do Imunolipossoma contendo 3,6 mg de DSPE-PEG-Maleimida para 1 mg de anticorpo.

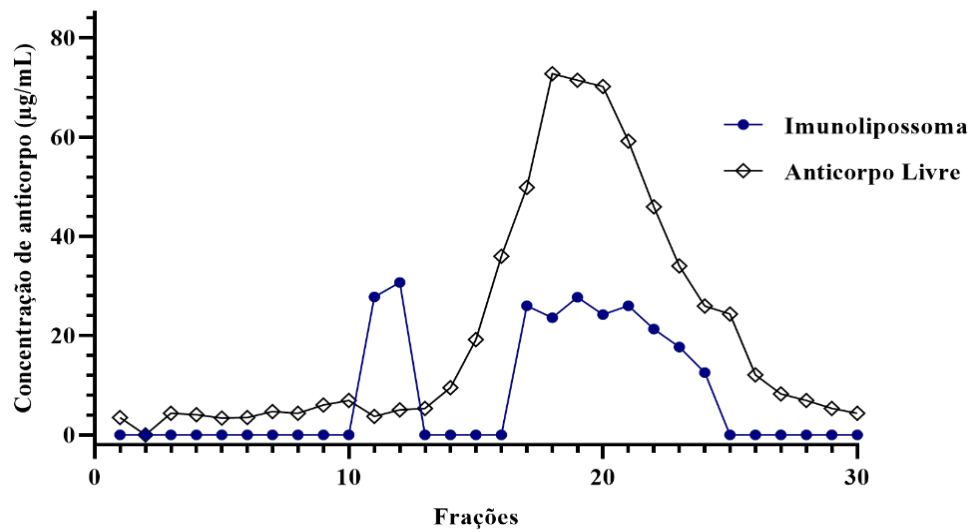
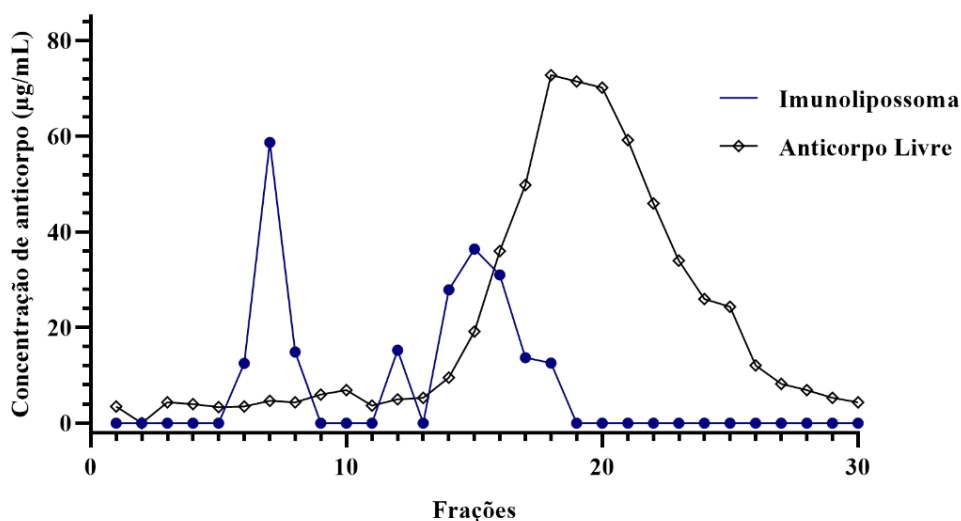


Figura 22: Cromatograma do Imunolipossoma contendo 7,2 mg de DSPE-PEG-Maleimida para 2 mg de anticorpo.



De acordo com a figura 22, nota-se que o lipossoma foi eluído nas coletas 6,7,8 e 9. No cromatograma correspondente ao anticorpo livre, podemos verificar que foi detectada a presença de proteínas a partir da 14<sup>a</sup> coleta, para comparação com os picos formados na eluição do imunolipossoma. No cromatograma correspondente ao imunolipossoma, pode-se verificar a separação de dois picos, o primeiro referente ao imunolipossoma, composto de maior peso molecular que seria eluído primeiro na gel filtração e o segundo pico corresponde aos anticorpos que não foram conjugados. Dessa forma, para definir a eficiência de conjugação, utilizou-se as concentrações de proteínas detectadas no primeiro pico, correspondente ao imunolipossoma, dividido pela concentração total de proteínas obtidas na eluição (todos os picos aparentes).

Com isso, obteve-se uma eficiência de conjugação de 26,0% para o imunolipossoma preparado com 1 mg de anticorpo e 40,9% para o lipossoma funcionalizado com 2 mg de anticorpo. Após tais conclusões, realizou-se a caracterização físico-química das duas preparações e os dados obtidos estão descritos na tabela 9.

Tabela 9: Caracterizações físico-químicas dos lipossomas funcionalizados com 1 mg e 2 mg de anticorpo.

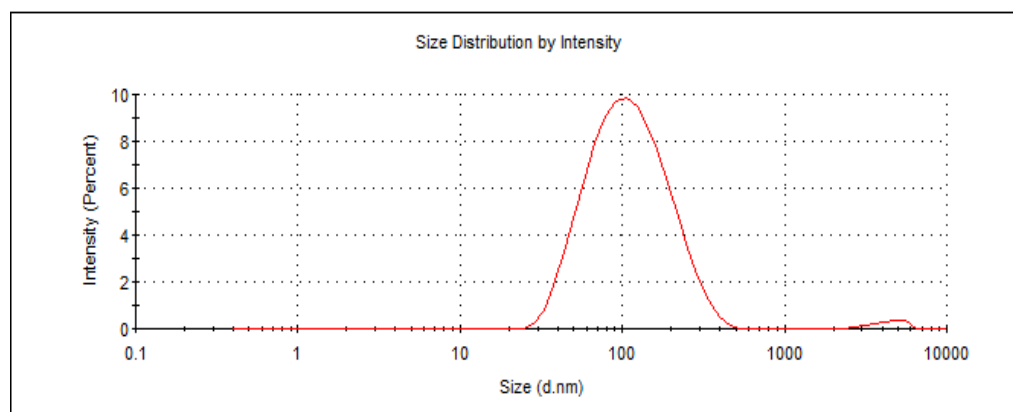
Formulação (Propoção Anticorpo:Maleimida)	Tamanho $\pm$ DP (nm)	PDI $\pm$ DP	Potencial Zeta $\pm$ DP (mV)	Eficiência de encapsulação $\pm$ DP (%)

Lipossoma	136,7 ± 2,21	0,335 ± 0,01	-10,9 ± 0,49	93,78 ± 0,71
Imunolipossoma (1 mg:3,6 mg)	89,53 ± 0,57	0,25 ± 0,01	-12,00 ± 0,78	62,64 ± 12,9
Imunolipossoma (2 mg:7,2 mg)	95,04 ± 3,97	0,27 ± 0,00	-16,4 ± 1,20	89,20 ± 9,80

A partir dos dados apresentados, é possível observar que os todos os parâmetros físico-químicos se mantiveram, após o processo de funcionalização das nanopartículas, além disso os dois imunolipossomas obtiveram valores próximos entre si, de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta (Tabela 9)

Entretanto, ressalta-se que a segunda formulação apresentou um maior valor de eficiência de encapsulação (89,20%), estando bem próximo do lipossoma (93,78%), demonstrando, portanto, que na proporção em que foi realizado, o processo de funcionalização não comprometeu a encapsulação do fármaco. Além disso, a segunda formulação de imunolipossomas produzida apresentou maior taxa de conjugação (40,9%), ou seja, cerca de 818 µg de anticorpo foram efetivamente conjugados aos lipossomas. Assim, a formulação com proporção anticorpo: maleimida de 2 mg: 7,2 mg foi selecionada para os testes subsequentes deste trabalho. Segue na figura 23, o gráfico de distribuição de tamanhos dos imunolipossomas produzidos com a quantidade 2 mg de anticorpo e 7,2 mg de DSPE-PEG-Maleimida.

Figura 23: Gráfico de distribuição de partículas para imunolipossomas produzidos com 2 mg de anticorpo e 7,2 mg de DSPE-PEG-Maleimida.



Dessa forma, alguns autores realizaram o processo de conjugação direta, por meio da tioação do anticorpo e inserção da maleimida na superfície do lipossoma. Lu et al (2019),

conjugaram o anticorpo cetuximabe, preparando o lipossoma com fosfatidilcolina hidrogenada da soja (HSPC), utilizando 1% mol de DSPE-PEG-Maleimida e 200  $\mu\text{g}$  de anticorpo / $\mu\text{mol}$  de lipídio e obtiveram uma eficiência de conjugação em torno de 50%. Petrilli et al (2017), conjugaram cetuximabe em lipossomas compostos pelo lipídio DSPC e DSPE-PEG-Maleimida 2,5% mol e obtiveram uma eficiência de funcionalização de 94,5%, sendo utilizado no ensaio uma solução de 1 mg/mL de anticorpo. Nota-se que nas duas situações os lipossomas foram preparados com lipídeos derivados de fosfatidilcolinas, mas foram utilizadas baixas proporções de maleimida quando comparado com este trabalho. Entretanto, os lipídios HSPC e DSPC são componentes que permitem a produção de lipossomas com a estrutura mais rígida em relação a lipossomas compostos por fosfatidilcolinas da soja ou do ovo (NSAIRAT et al, 2022), o que é uma vantagem para os dois estudos citados, pois Lu et al (2019), encapsularam afatinibe e Petrilli et al (2017), 5-Fluouracil, que são fármacos hidrofílicos e exigem uma estrutura mais impermeável nos lipossomas para garantir uma eficiência de encapsulação mais alta.

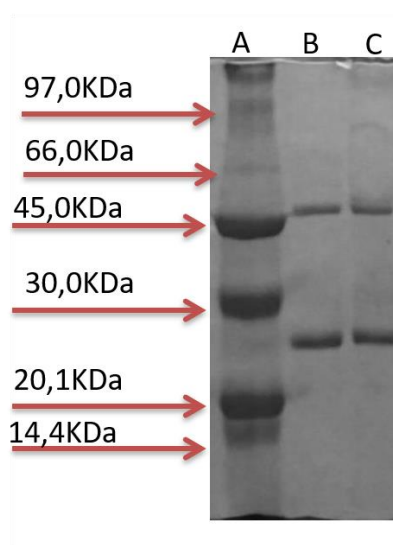
Todavia, Eloy et al (2020), prepararam lipossomas com SPC e 7,5% mol de DSPE-PEG-Maleimida, sendo utilizada uma solução contendo 1 mg de cetuximabe para o processo de funcionalização e obtiveram 53,3% de eficiência de conjugação, sendo possível observar que os autores utilizaram o mesmo lipídio e uma proporção de maleimida próxima ao que foi proposto neste trabalho.

### **5.3 Avaliação da presença do anticorpo por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes, com SDS (dodecilsulfato de sódio). O SDS se liga às proteínas, conferindo cargas negativas proporcionais ao tamanho das mesmas. No caso, os anticorpos são reduzidos e as subunidades são separadas pela massa molecular (CASAS-TERRADELLAS et al, 2006). A presença do anticorpo no imunolipossoma foi confirmada por eletroforese em gel em condições redutoras e foram observadas as cadeias leves (25 kDa) e pesadas (50 kDa) da IgG, indicando sucesso na funcionalização do sistema nanocarreador, ou seja, a presença do anticorpo na superfície do lipossoma, sendo necessário ensaios de dicroísmo circular para avaliação da manutenção da estrutura secundária protéica e de fluorescência para a estrutura terciária. Petrilli et al (2017), obtiveram resultado semelhante em seu estudo, no qual, funcionalizaram lipossomas contendo 5-Fluoruaçil com anticorpo cetuximabe. Assim como, Eloy et al (2020), que conjugaram cetuximabe a lipossomas contendo

docetaxel, afirmaram em seu estudo que o perfil eletroforético do imunolipossoma estando idêntico ao do anticorpo, revela que não houve danos à proteína, da mesma forma, como pôde ser observado nestes estudo.

Figura 24: Resultado da eletroforese em gel sob condições redutoras para avaliação da estrutura primária do anticorpo após o processo de funcionalização dos lipossomas. A – Marcador de peso molecular. B - Cetuximabe. C – Imunolipossoma com fármaco.



#### 5.4 Liofilização das nanopartículas

A partir do número de mols total utilizado para preparo do ensaio 5 (formulação selecionada), foi planejado o teste de diferentes proporções de sacarose para avaliar qual concentração permitiria que as características físico-químicas dos lipossomas fossem mantidas após o processo de liofilização. Levando em consideração a metodologia proposta por Eloy *et al.* (2016), foram testadas 3 proporções lipídeo:sacarose (1:2,5; 1:5; 1:10).

Depois de terminado o processo de liofilização, o material obtido foi ressuspensão em água ultrapurificada para avaliação das características físico-química. A tabela 11, apresenta os resultados de tamanho, PDI e potencial zeta após a liofilização.

Tabela 10: Caracterização da formulação com crioprotetor em diferentes proporções após a liofilização

Amostras de lipossomas	Tamanho $\pm$ DP (nm)	PDI $\pm$ DP	Potencial Zeta $\pm$ DP (mV)
Branco (Líquido)	78,83 $\pm$ 3,78	0,27 $\pm$ 0,02	-14,60 $\pm$ 0,87
Com fármaco (Líquido)	92,23 $\pm$ 10,75	0,24 $\pm$ 0,04	-13,76 $\pm$ 1,04
Branco 1:2,5	135,53 $\pm$ 1,18	0,38 $\pm$ 0,02	-35,27 $\pm$ 5,54
Com fármaco 1:2,5	189,57 $\pm$ 1,61	0,51 $\pm$ 0,01	-25,07 $\pm$ 1,09
Branco 1:5	168,77 $\pm$ 36,07	0,52 $\pm$ 0,07	-12,6 $\pm$ 1,11
Com fármaco 1:5	128,40 $\pm$ 2,91	0,39 $\pm$ 0,03	-26,13 $\pm$ 1,72
Branco 1:10	128,21 $\pm$ 0,62	0,36 $\pm$ 0,01	-16,27 $\pm$ 0,67
Com fármaco 1:10	173,97 $\pm$ 3,15	0,50 $\pm$ 0,02	-17,97 $\pm$ 1,20

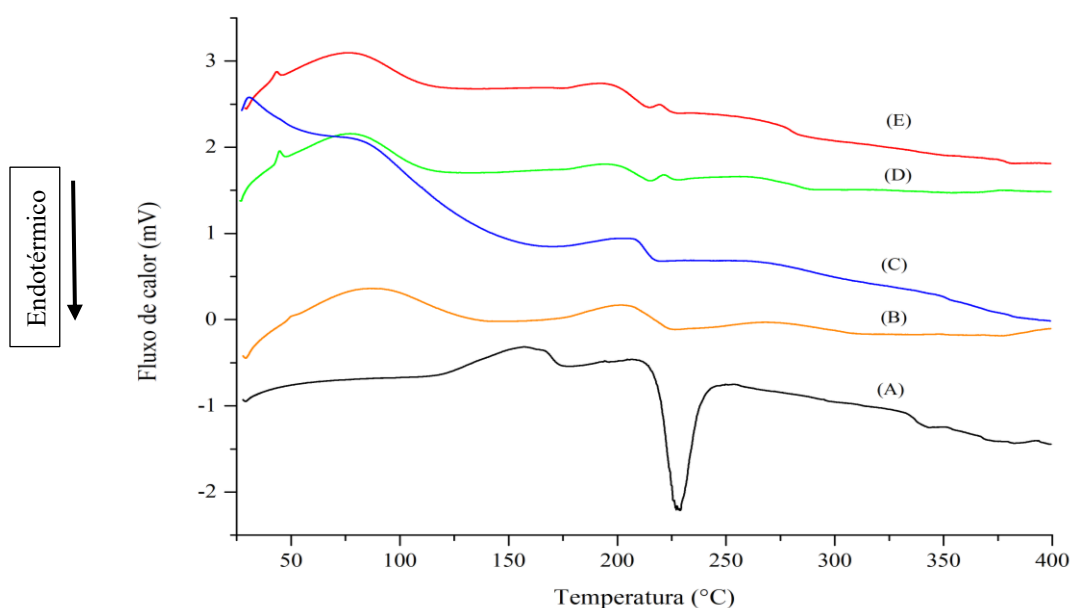
Quando se comparam os dados dos lipossomas liofilizados, com as caracterizações da formulação líquida, nota-se que, a proporção 1:5 (lipídeo: sacarose), teve um menor aumento de tamanho de partícula para o lipossoma com fármaco (39% de aumento em relação ao lipossoma da formulação líquida), assim como menor aumento do PDI (aumento de 62%), sendo a opção mais adequada para escolha de quantidade do crioprotetor. Em relação ao mecanismo de proteção de dissacarídeos em lipossomas, no caso, a sacarose, há uma hipótese de reposição de água na qual os crioprotetores substituem a água ligada ao redor da bicamada através da interação com grupamentos das cabeças polares (P = O e/ou C = O) de lipídios e o grupo metil da colina para manter o arranjo espacial (JIA et al, 2021). Além disso, Chen et al (2010) afirmam que a sacarose foi um bom estabilizador para liofilização de lipossomas peguizados contendo paclitaxel. Os crioprotetores, tipicamente açúcares e polióis, adicionados na formulação permitem o espaçamento entre as cabeças hidrofóbicas e mantêm as interações hidrofóbicas entre cadeias acil reduzidas durante as etapas de secagem para reter as estruturas de membrana seladas durante a liofilização. Para este projeto, foi selecionada a sacarose como crioprotetor, a qual é um açúcar polar hidratado com extensas capacidades de ligação de hidrogênio (WANG, GRAINGER, 2019).

Dessa forma, selecionou-se a proporção lipídeo:sacarose de 1:5, para liofilização das nanopartículas e posterior realização das caracterizações em estado sólido (DSC, TGA, FITR e difração de raio-x).

## 5.5 Análises térmicas: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

A análise calorimétrica exploratória diferencial permite avaliar como o fármaco está disposto dentro da nanopartícula, seja no estado cristalino ou amorfo, assim como é possível verificar as interações entre componentes da formulação e o ativo. Além disso, por meio da termogravimetria, pode-se acompanhar a perda de massa do material analisado em função da temperatura empregada. Dessa forma, a figura 25, apresenta os dados obtidos na análise de DSC, para fármaco livre, lipossoma branco, lipossoma com fármaco, imunolipossoma branco e imunolipossoma com fármaco.

Figura 25: Curvas de DSC de 25 a 400°C com picos endotérmicos voltados para a parte inferior no gráfico. (A) Fármaco livre. (B) Lipossoma Branco. (C) Lipossoma com fármaco. (D) Imunolipossoma Branco. (E) Imunolipossoma com fármaco.



No termograma do fármaco puro, observa-se um evento endotérmico em 176,1 °C com entalpia de  $-2,97$  J/g, assim como, um evento endotérmico em 227,1°C com uma entalpia de  $-21,99$  J/g. Ashok et al (2020) encontrou em seu estudo, um evento endotérmico em 178,0 °C correspondente ao ponto de fusão do cabazitaxel, corroborando com o que foi encontrado neste estudo. Em adição aos dados apresentados, Song et al (2014), preparou micelas poliméricas contendo cabazitaxel, sendo detectado na avaliação do fármaco livre, a presença de um evento endotérmico em 167,2° C.

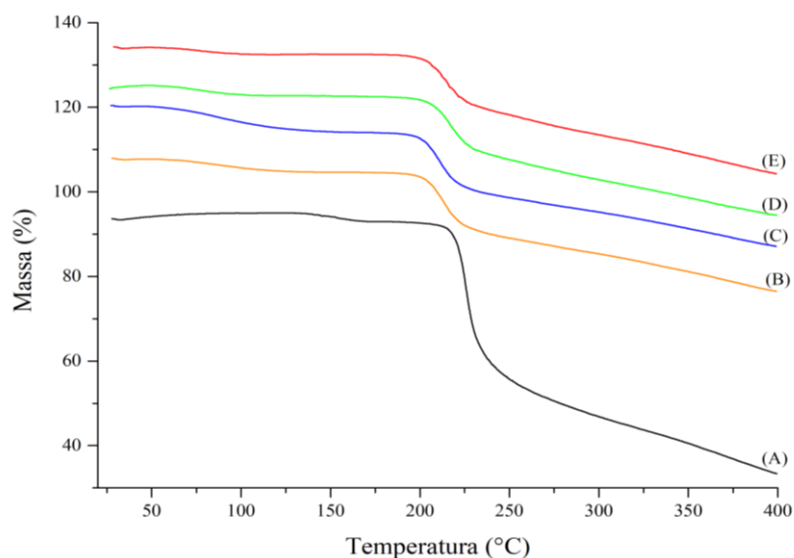
Estas duas bandas desapareceram nos espectros do lipossoma e do imunolipossoma contendo fármaco, o que poderia indicar que ocorreu redução da cristalinidade do fármaco com o processo de encapsulação, ou seja, o mesmo estaria com a natureza amorfa, conforme foi encontrado também por Chand et al (2021), que produziu carreadores lipídicos nanoestruturados contendo cabazitaxel. Assim como, Song et al (2014) mostrou em seu estudo que o desaparecimento do pico endotérmico característico do cabazitaxel no espectro das micelas poliméricas demonstram a presença do fármaco no estado amorfo quando encapsulado. Ao avaliar os termogramas do lipossoma branco e do imunolipossoma branco, percebe-se que são idênticos aos termogramas das suas formulações com fármaco correspondente, assim como foi encontrado por Eloy et al (2020), que produziram imunolipossomas anti-EGFR contendo docetaxel. Em adição às informações apresentadas, Yousefi et al (2009) encapsularam docetaxel em lipossomas e levaram a hipótese de que o processo de produção dos lipossomas inibiu a cristalização do fármaco durante a formação das vesículas, sendo importante ressaltar.

Com relação a análise termogravimétrica evidenciada na figura 26, até a temperatura de 200 °C, ocorre uma sutil perda de massa, correspondente ao processo de evaporação da água. No caso, lipossoma com fármaco e o cabazitaxel livre obtiveram uma perda de 8%, lipossoma branco 5% e os imunolipossomas branco e com fármaco, 3% (CAVALCANTI, 2010). Além disso, o lipossoma branco apresenta uma perda de massa de cerca de 5% na faixa entre 200 e 250°C, enquanto o lipossoma com fármaco e os imunolipossomas branco e com fármaco, apresentam uma perda em torno de 14% nessa faixa de temperatura.

O cabazitaxel, apresenta estabilidade térmica até 220°C, posteriormente ocorre uma degradação rápida, o que justifica o aparecimento do pico de degradação em 227,12 °C, correspondente ao pico endotérmico observado no DSC. As formulações de lipossoma e imunolipossoma, após 250°C, apresentam uma degradação lenta e menos pronunciada em relação ao cabazitaxel livre. Eloy et al (2016), encontraram resultados semelhantes nos quais seu lipossoma apresentaram estabilidade térmica até 400 °C, enquanto os fármacos livres paclitaxel e rapamicina começaram seu processo de degradação térmica após 200 °C, assim como, a formulação lipossomal apresentou degradação menos pronunciada que os fármacos livres.

Figura 26: Curvas da análise termogravimétrica. (A) Fármaco livre. (B) Lipossoma Branco. (C) Lipossoma com fármaco. (D) Imunolipossoma Branco. (E) Imunolipossoma com fármaco.

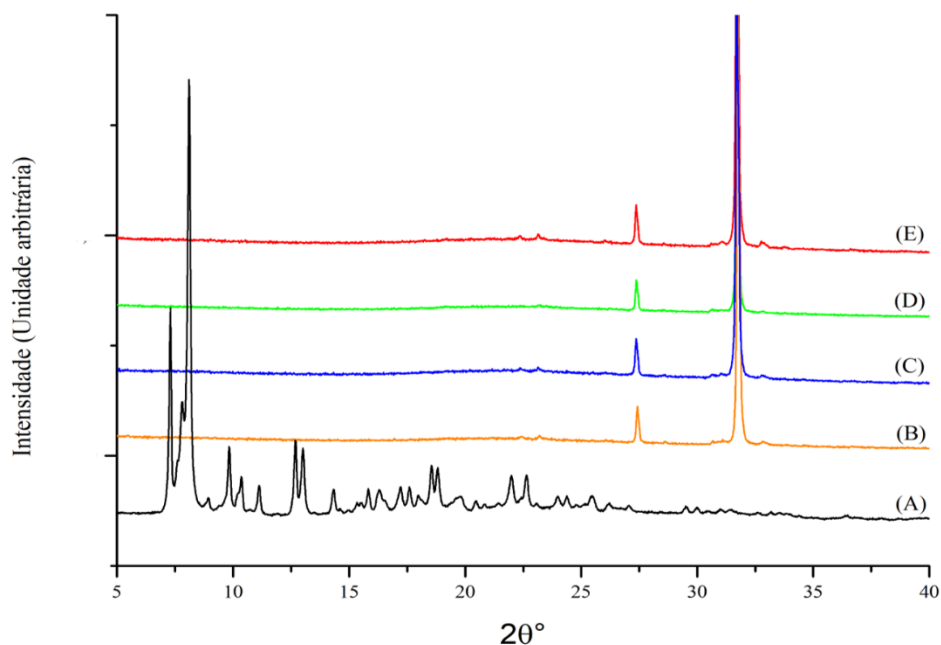




## 5.6 Análise de Difração de Raios-X

A difração de raios-x é uma técnica que pode ser utilizada para identificar as fases cristalinas das nanopartículas e realização de uma caracterização estrutural. Neste estudo, realizou-se a metodologia em questão para confirmar a informação encontrada no ensaio de DSC, que nas nanopartículas produzidas o cabazitaxel encontra-se no estado amorfo, na matriz lipossomal. Assim, na figura 27, é possível avaliar o espectro de difração de raio-x do cabazitaxel, demonstrando a natureza cristalina do fármaco puro nos ângulos de  $2\theta$  de  $7,3^\circ$ ;  $8,1^\circ$ ;  $8,9^\circ$ ;  $9,8^\circ$ ;  $10,3^\circ$ ;  $12,6^\circ$ ;  $13,0^\circ$ ;  $14,4^\circ$ ;  $15,9^\circ$ ;  $17,2^\circ$ ;  $19,8^\circ$ ;  $20,3^\circ$ ;  $21,8^\circ$ ;  $22,6^\circ$ ;  $23,9^\circ$ ;  $24,3^\circ$ ;  $25,5^\circ$ ;  $26,2^\circ$  e  $27,1^\circ$ , conforme encontrado por Ahok et al (2020). No entanto, os picos indicados, não aparecem nos espectros do lipossoma e do imunolipossoma, confirmando que o fármaco se encontra no estado amorfo encapsulado nas nanopartículas. Ashok et al (2020) produziram nanomicelas contendo cabazitaxel e confirmaram a natureza amorfa do fármaco após a análise de difração de raios-x, no qual ocorreu a ausência dos picos característicos do fármaco no espectro da nanoformulação. Assim como, Chand et al (2021) desenvolveram carreadores lipídicos nanoestruturados contendo cabazitaxel e obtiveram o mesmo resultado e Nanda et al (2019) obtiveram lipossomas contendo paclitaxel, ocorrendo o mesmo padrão detectado neste estudo e a confirmação do estado amorfo do fármaco após a encapsulação.

Figura 27: Padrões de difração de raios-x. (A) Fármaco livre. (B) Lipossoma Branco. (C) Lipossoma com fármaco. (D) Imunolipossoma Branco. (E) Imunolipossoma com fármaco.



Diante do exposto, verificou-se a partir dos dados do DSC que o cabazitaxel ficou disperso na matriz lipossomal, assim como foi confirmado pela difração de raios-x que o mesmo se apresenta no estado amorfo dentro das nanopartículas. De maneira que, o fármaco em estado amorfo apresenta maior solubilidade do que no estado cristalino e conseqüentemente é mais biodisponível, o que se torna, uma vantagem para liberação alvo específica no tecido tumoral (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

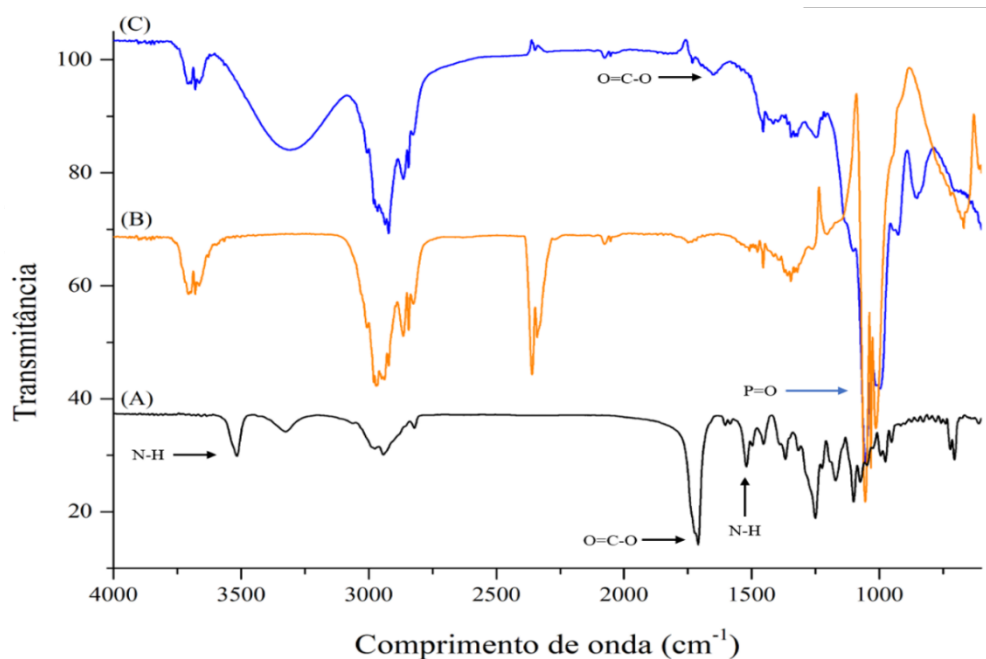
### 5.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR é uma análise que evidencia a presença de grupos funcionais na estrutura química dos nanocarreadores, além de mostrar interações moleculares através das bandas do espectro (ELOY et al, 2016). Dessa forma, a figura 24 mostra os espectros de infravermelho do fármaco livre, lipossoma branco e lipossoma com fármaco. Assim, o cabazitaxel exibe os seguintes picos característicos: estiramento N-H de amida em  $3518\text{ cm}^{-1}$  e  $1520\text{ cm}^{-1}$  e vibração da ligação éster próximo a  $1725\text{ cm}^{-1}$  (ZHUANG et al, 2016; ELOY et al, 2020). Nos espectros do lipossoma branco e lipossoma com fármaco, nota-se a presença do estiramento do grupo

P=O característico da fosfatidilcolina de soja em  $1055\text{ cm}^{-1}$  (HELMI; ELSHISHINY; MAMDOUH, 2021). Com relação ao lipossoma com fármaco, apenas um pico do cabazitaxel fica evidente quando comparado com o espectro do lipossoma branco e ele está em  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Provavelmente, o pico em  $1650\text{ cm}^{-1}$  esteja relacionado aos grupamentos ésteres da molécula, visto que o cabazitaxel apresenta um número elevado deste grupamento em sua estrutura e que ele aparece mais sutilmente no espectro do lipossoma, pois o fármaco apresenta-se diluído na formulação. Assim como, o pico está em comprimento de onda diferente quando comparado com o espectro do fármaco livre pois pode ter ocorrido alguma interação com os as cadeias que estão presentes na bicamada lipídica. Dessa forma, pressupõe-se que o aparecimento do pico em  $1650\text{ cm}^{-1}$  no espectro do lipossoma com fármaco demonstra a incorporação do fármaco na matriz lipossomal, assim como foi encontrado por Chand et al (2021) em seu estudo, no qual os autores constataram a incorporação do cabazitaxel em nanopartículas poliméricas. Song et al (2014) prepararam micelas poliméricas contendo cabazitaxel e demonstraram a partir da análise de FTIR a presença do fármaco estabilizado nas micelas.

Além disso, a figura 28, mostra picos característicos que podem ser atribuídos ao fármaco e os lipídeos empregados, simultaneamente, confirmando que nenhuma ligação química adicional foi gerada durante a interação do cabazitaxel e a formulação de lipossomas, assim como foi encontrado também por Chand et al (2021) em seu estudo. Ressalta-se que em  $2357\text{ cm}^{-1}$  está localizado o pico correspondente ao composto  $\text{CO}_2$  no lipossoma branco que é apenas um interferente que apareceu durante a execução da análise (COLATI et al, 2011).

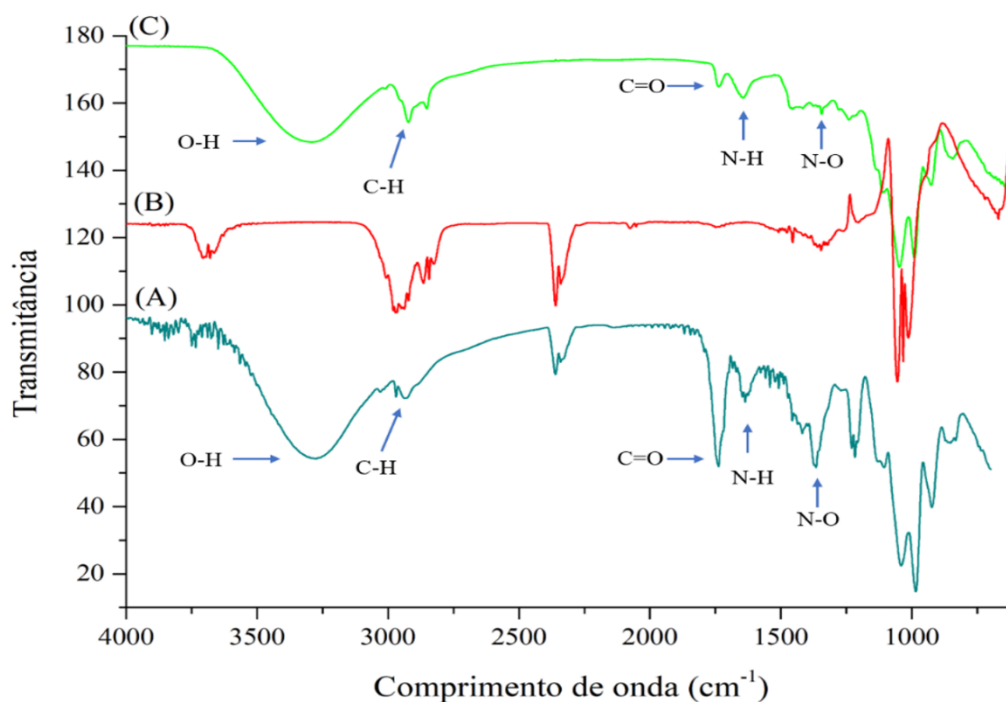
Figura 28: Espectro de FTIR de  $4000$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  para o fármaco cabazitaxel, lipossoma branco e lipossoma com fármaco. (A) Fármaco livre. (B) Lipossoma Branco. (C) Lipossoma com fármaco. No espectro foram indicados com as setas pretas os picos do estiramento N-H de amida em  $3518\text{ cm}^{-1}$  e  $1520\text{ cm}^{-1}$  e vibração da ligação éster próximo a  $725\text{ cm}^{-1}$  (no cabazitaxel livre) e próximo a  $1650\text{ cm}^{-1}$  (no lipossoma com fármaco) e com a seta azul o estiramento do grupo P=O em  $1055\text{ cm}^{-1}$ .



Na figura 29, têm-se os espectros de FTIR do lipossoma branco, imunolipossoma branco e o cetuximabe livre, no intuito de avaliar os grupos funcionais do anticorpo e a presença dos mesmos na estrutura do imunolipossoma após funcionalização. No caso, o cetuximabe exibe um pico característico identificado em  $3290 \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde à vibração de estiramento devido aos grupos O-H, em  $2930 \text{ cm}^{-1}$  tem-se a vibração atribuída ao estiramento assimétrico de C-H. Além disso, é evidenciado em  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , o pico correspondente ao grupamento N-H e em  $1728 \text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento C=O (MAYA et al, 2013; ABDELLATIF et al, 2020; ABDELLATIF et al, 2022). Outro pico característico do cetuximabe é o correspondente a ligação N-O em  $1370 \text{ cm}^{-1}$  (HELMI; ELSHISHINY; MAMDOUH, 2021). Os picos característicos do anticorpo foram encontrados também no espectro do Imunolipossoma branco, sinalizando que o cetuximabe foi anexado a nanopartícula com aparecimentos dos grupamentos químicos característicos, sendo estes picos mais sutis, devido às baixas concentrações de anticorpo na formulação. É importante enfatizar, conforme citado anteriormente que em  $2357 \text{ cm}^{-1}$  está localizado o pico correspondente ao composto  $\text{CO}_2$  no espectro do lipossoma branco e do anticorpo livre, que é apenas um interferente durante a execução da análise (COLATI et al, 2011).

Figura 29: Espectro de FTIR de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  para o anticorpo cetuximabe, lipossoma branco e imunolipossoma branco. (A) Cetuximabe. (B) Lipossoma Branco. (C)

Imunolipossoma branco. No espectro foram indicados com as setas azuis os picos da vibração de estiramen devido aos grupos O-H em  $3290\text{ cm}^{-1}$ , a vibração atribuída ao estiramento assimétrico de C-H em  $2930\text{ cm}^{-1}$ , o pico correspondente ao grupamento N-H em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C=O em  $1728\text{ cm}^{-1}$  e a ligação N-O em  $1370\text{ cm}^{-1}$ .



## 5.8 Estabilidade Coloidal

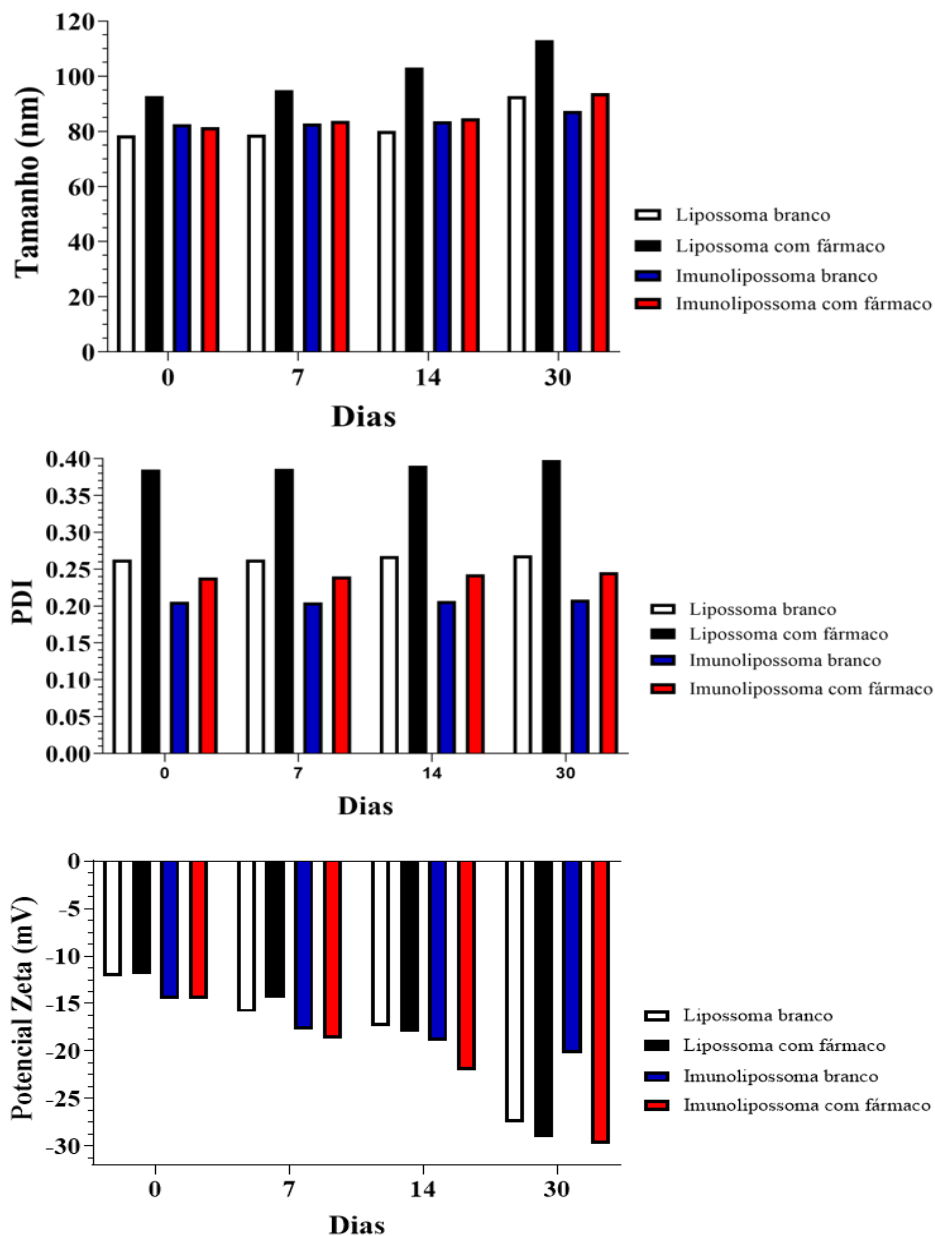
Quanto à estabilidade coloidal das formulações, a figura 30 mostra a variação do tamanho de partícula com 30 dias de observação, e foi demonstrado que até 14 dias uma variação de 0%, 10%, 1% e 4% foi mantida para lipossomas branco, lipossomas com fármaco, imunolipossomas branco e imunolipossomas com fármaco, respectivamente, porém, após 30 dias esses valores passaram a ser 18%, 22%, 6% e 15%. Para PDI, os valores permaneceram constantes com uma variação de 2%, 3%, 1% e 3%, % para lipossomas branco, lipossomas com fármaco, imunolipossomas branco e imunolipossomas com fármaco, respectivamente, ao comparar o trigésimo dia com o início das análises. Em relação ao potencial zeta, o estudo demonstrou uma redução de 127% para o lipossoma branco, 144% para o lipossoma com fármaco, 39% para o imunolipossoma em branco e 105% para o imunolipossoma CBZ, demonstrando uma redução drástica do potencial zeta com 30 dias de observação. Assim, pode-

se afirmar que as formulações preparadas mantêm uma estabilidade confiável até 14 em armazenamento a 4°C, porém aos 30 dias de teste houve mudanças significativas nos parâmetros avaliados. Isso pode ser explicado pela constituição lipídica das formulações, visto que, lipídeos insaturados são mais propensos à oxidação, diminuindo ainda a estabilidade e lipídios saturados, como DPPC e DSPC são mais estáveis (PEREIRA et al, 2016).

Eloy et al (2016) prepararam lipossomas contendo paclitaxel e rapamicina, obtiveram uma boa estabilidade com 30 dias de avaliação, entretanto, dos parâmetros aqui examinados só verificaram tamanho de partícula. Assim como, Yin et al (2019) que produziram lipossomas contendo cabazitaxel e tiveram um bom resultado de estabilidade quando observado apenas o tamanho de partícula. Os trabalhos citados apresentaram resultados semelhantes ao deste estudo. Entretanto, observou-se uma acentuada carga negativa nas formulações após os 30 dias de avaliação e isto tem um impacto direto na utilização destas formulações, visto que, os lipossomas aniônicos são menos estáveis na corrente sanguínea do que os neutros e lipossomas catiônicos; pois demonstram uma taxa de depuração mais alta (NSAIRAT et al, 2022).

Assim, a liofilização, que é amplamente utilizada para obtenção de formulações sólidas a fim de proporcionar estabilidade de armazenamento suficiente para proteínas instáveis funcionaria como um recurso para aumentar a estabilidade da formulação neste estudo (WANG, GRAINGER, 2019).

Figura 30: Avaliação da estabilidade coloidal de lipossomas e imunolipossomas com e sem fármaco de 0 a 30 dias de armazenamento em geladeira.

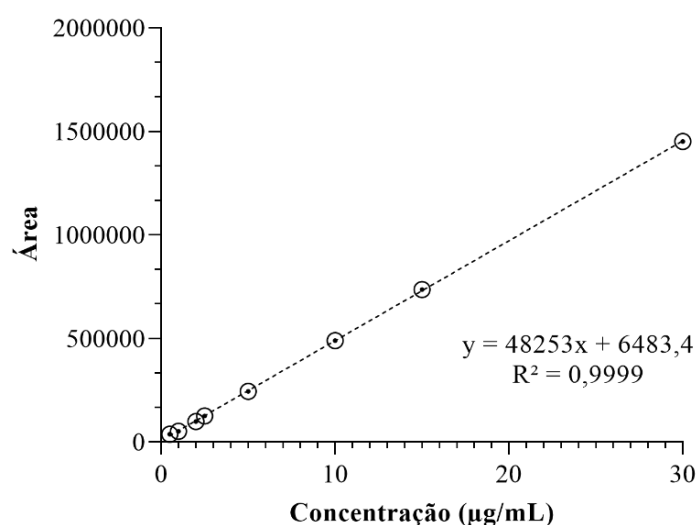


### 5.9 Quantificação do cabazitaxel em ensaio de liberação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Inicialmente foram feitos testes com a curva de calibração para determinar a melhor proporção da fase móvel, sendo determinado que a mesma teria composição acetonitrila : água (65:35) modificando apenas as quantidades de componentes da fase móvel

propostas por Yin et al (2019), visando uma duração de corrida de 10 minutos com tempo de retenção do fármaco em aproximadamente 5,6 minutos. A figura 31 apresenta a representação gráfica das respostas em função da concentração do analito para a curva de calibração de cabazitaxel e foi obtido um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,999, o que está acima do preconizado pela RDC 166 de 2017 ( $R^2 > 0,990$ ).

Figura 31: Ensaio de determinação da linearidade para cabazitaxel



A tabela 11, apresenta os dados brutos do ensaio de linearidade (concentrações e áreas obtidas), o valor real obtido para cada ponto do ensaio, a partir da equação da reta que está expressa na figura 31. Assim, nota-se que os valores de recuperação ficaram a maioria  $\pm 6\%$  do valor ideal, porém, o ponto de 0,5 µg/mL apresentou uma recuperação 30% acima do valor teórico.

Tabela 11: Curva de calibração, áreas encontradas para o pico do cabazitaxel, cálculo do valor encontrado para cada ponto da curva a partir da equação da reta e recuperação encontrada para cada ponto.

Concentração (µg/mL)	Área do pico	Valor real (µg/mL)	Recuperação (%)
0,5	37958	0,652	130,46
1	52069	0,945	94,47
2,5	125448	2,465	98,62
5	244110	4,925	98,49



10	489573	10,012	100,12
15	735914	15,117	100,78
30	1452029	29,958	99,86

Foi proposto a elaboração de uma nova curva de calibração composta de solução de lauril sulfato de sódio 1% contaminada com o fármaco nas 8 concentrações propostas no método (0,5; 1; 2; 2,5; 5; 10; 15; 30), ou seja, foi construída uma curva matrizada (fármaco na presença da matriz), para verificar se o tensoativo escolhido iria afetar a linearidade do método ou causar interferência na detecção do fármaco. Sendo importante mencionar que o tensoativo foi empregado para permitir a solubilização do cabazitaxel em meio aquoso no ensaio de liberação.

A figura 32 e a tabela 12, mostram respectivamente o resultado da linearidade após análise da nova curva e os dados do valor real obtido com a análise e recuperação.

Figura 32: Ensaio de determinação da linearidade para cabazitaxel a partir da curva matrizada

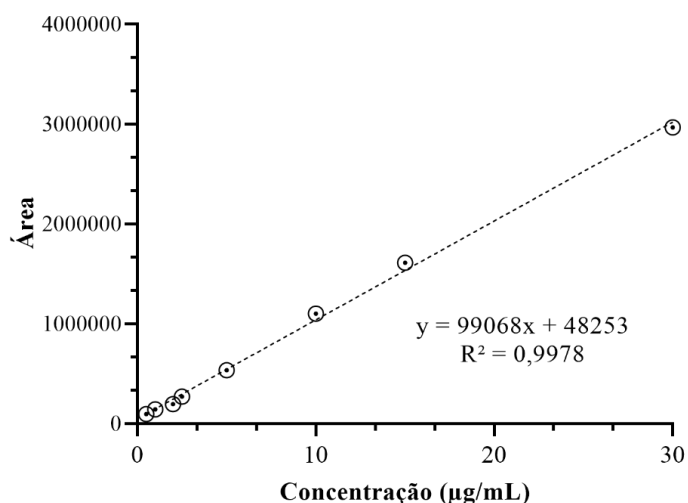


Tabela 12: Avaliação da recuperação de cabazitaxel em diferentes pontos da curva de calibração de curva com adição de lauril sulfato de sódio

Concentração (µg/mL)	Área do pico	Valor real (µg/mL)	Recuperação (%)
0,5	97054	0,499	99,74
1	144311	0,976	97,56
2,5	270409	2,248	89,92

5	536162	4,930	98,59
10	1101665	10,636	106,36
15	1610906	15,775	105,16
30	2967913	29,468	98,23

Dessa forma, é possível observar um  $R^2$  satisfatório de 0,998 que está de acordo com o preconizado pela RDC 166/17 e o resultado da recuperação mostrou-se aceitável. A recuperação das diferentes concentrações da curva foi adequada. Isto demonstra que a matriz do ensaio de liberação (lauril sulfato de sódio, mistura de lipídios da formulação e tampão fosfato pH 7,4) não afetou a linearidade do método e tem uma boa correlação com entre os valores de concentração testados e a resposta de área obtida, com boa exatidão, assegurando que o método poderá ser utilizado para quantificação do fármaco cabazitaxel no ensaio de liberação *in vitro*.

As figuras 33 e 34, a seguir, apresentam os cromatogramas da análise de lipossomas e imunolipossomas, respectivamente, em HPLC, para demonstrar que o fármaco cabazitaxel foi detectado com alta resolução, sendo os elementos da matriz detectados nos primeiros 2 minutos de análise e o tempo de retenção do cabazitaxel em torno de 5 minutos, o que confirma a boa seletividade do método utilizado.

Figura 33: Cromatograma da análise do lipossoma em HPLC evidenciando os componentes da matriz saindo no início da corrida e o fármaco sendo detectado em torno de 5 minutos.

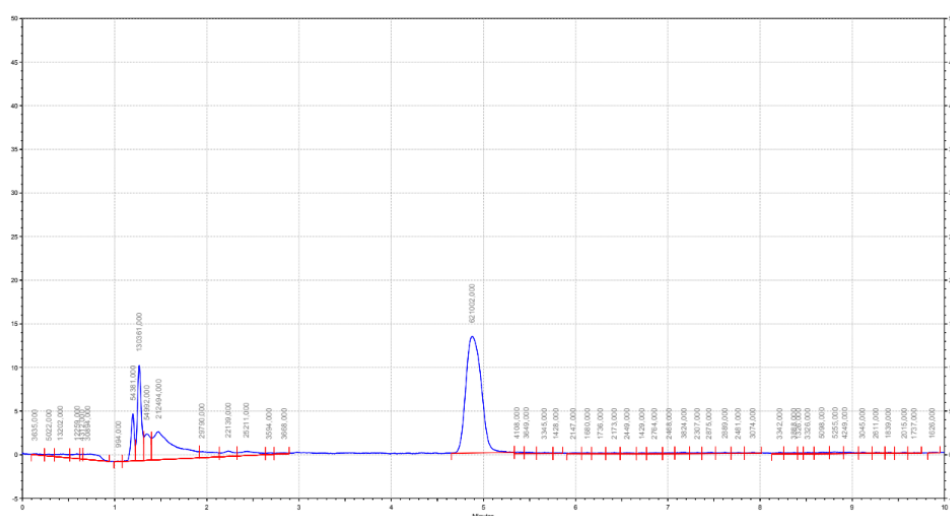
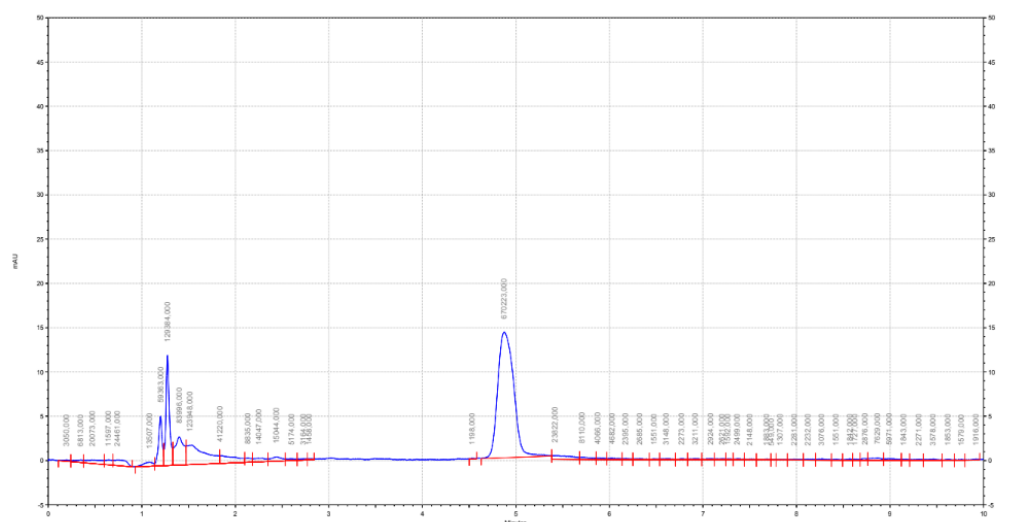


Figura 34: Cromatograma da análise do imunolipossoma em HPLC evidenciando os componentes da matriz saindo no início da corrida e o fármaco sendo detectado em torno de 5 minutos.



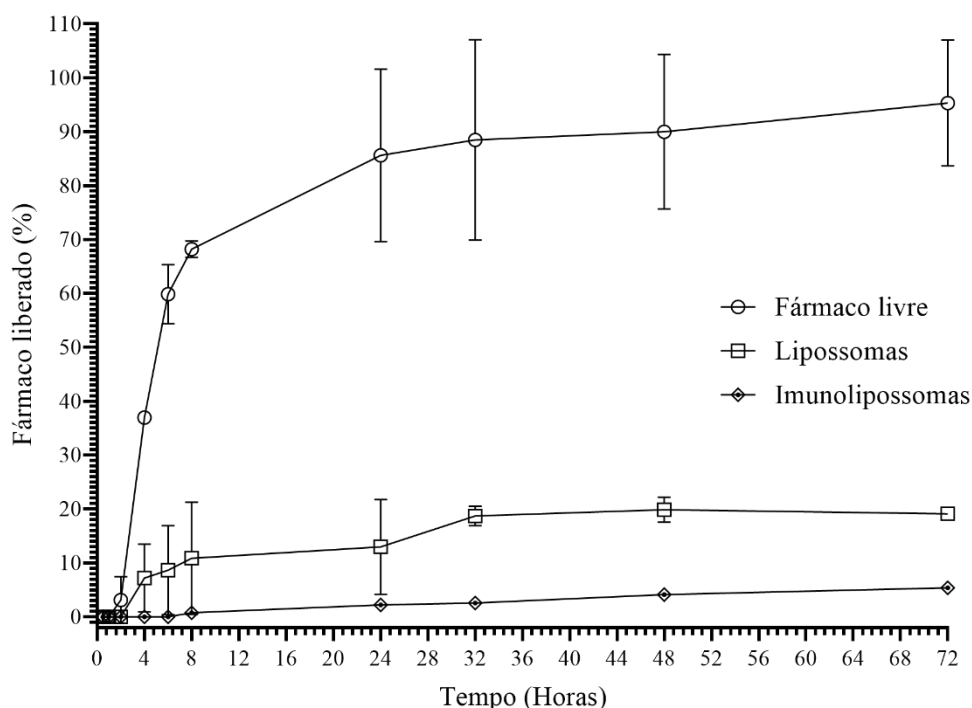
### 5.10 Estudo de liberação *in vitro* dos lipossomas e imunolipossomas contendo cabazitaxel

Inicialmente, no estudo de solubilidade, foi encontrada uma concentração de 1 mg/mL de cabazitaxel nas 3 alíquotas, ou seja, o fármaco foi 100% solubilizado na solução de tampão fosfato pH 7,4 com 1% de lauril sulfato de sódio. Assim, na Farmacopeia Europeia, as “*Sink conditions*” são definidas como um volume de meio de dissolução que é pelo menos três a dez vezes o volume de saturação, ou seja, pode-se trabalhar com uma solução diluída até 10 vezes para garantir que não haverá uma supersaturação do meio durante o ensaio de liberação (LIU et al, 2013). Nesse caso, optou-se para este estudo trabalhar com uma solução de cabazitaxel com concentração de cabazitaxel de 60 µg/mL (concentração final no meio receptor após liberação de 100% do fármaco), uma concentração que está abaixo de 100 µg/mL (concentração limite conforme *sink conditions*) e que mesmo liberando pequenas proporções pode ser detectado pelo método de quantificação em HPLC.

O perfil de liberação do fármaco livre empregando membrana de diálise, pode ser observado na Figura 35 e mostra que 6 % do cabazitaxel foi liberado após as primeiras 2 horas de estudo, 37% com 4 horas de estudo, 60 %, após 6 horas, 68% após 8 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. Já nos lipossomas, há uma liberação inicial do fármaco somente após as 4 horas de início do ensaio, seguida por taxas mais lentas de liberação. 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 8 horas nos quais 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. O perfil do imunolipossoma, apresentou liberação do fármaco acima do limite de detecção do método a partir de 8 horas de ensaio (0,7%), de maneira que após 24 horas de ensaio foram liberados apenas 2%, com 48 horas 4% e ao final das 72 horas de estudo, apenas 5 % do cabazitaxel foi liberado no meio receptor, demonstrando que a inserção do anticorpo na superfície do lipossoma retardou a liberação do fármaco

Figura 35: Perfil de liberação in vitro comparando fármaco, lipossoma e imunolipossoma contendo cabazitaxel.



A partir dos dados obtidos foi realizado o teste de variância (ANOVA One-way) para verificar diferença estatística entre os ensaios do lipossoma e imunolipossoma em relação ao fármaco livre. Assim, não houve diferença estatística ( $p=1$ ) entre a liberação do lipossoma e fármaco livre entre 1 e 2 horas de ensaio visto que não houve quantificação fármaco liberado,

assim como não houve diferença estatística entre liberação do imunolipossoma e o fármaco entre 1, 2 e 4 horas de ensaio ( $p=1$ ). 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 e para imunolipossoma, a partir das 6 horas em diante. A tabela 13, apresenta os dados da análise estatística realizada para o ensaio de liberação.

Tabela 13: Análise do teste de variância (ANOVA One-Way) para os perfis de liberação *in vitro* das formulações. \* Valores de  $p < 0,005$

Tempo (horas)	Valor de $p$	
	Lipossoma	Imunolipossoma
0,5	1,000	1,000
1	1,000	1,000
2	0,423	0,272
4	0,022*	0,000*
6	0,018*	0,000*
8	0,016*	0,000*
24	0,030*	0,002*
32	0,034*	0,003*
48	0,021*	0,001*
72	0,012*	0,001*

Resultado semelhante ao deste estudo foi encontrado por Eloy et al (2016), no qual os autores produziram lipossomas compostos de SPC, colesterol e DSPE-PEG-2000 e encapsularam paclitaxel e rapamicina simultaneamente, com isso, o ensaio de liberação *in vitro* determinou que após 72 horas de estudo, menos de 20% do paclitaxel foi liberado, o que demonstra uma liberação sustentada de lipossomas com a composição descrita anteriormente. Os lipossomas produzidos para este estudo liberaram 19% do cabazitaxel após as 72 horas de ensaio e a com os mesmos componentes que os lipossomas descritos por Eloy et al (2016).

Yang et al (2020), produziram lipossomas contendo cabazitaxel, compostos de DSPC, colesterol e DSPE-PEG-2000 e em seu ensaio de liberação, após 48 horas para o pH 7,4, obtiveram 7% do fármaco no meio receptor, enquanto neste estudo foi obtido uma liberação de 19% com 48 horas de estudo. Assim, observa-se que lipossomas contendo taxanos, tem

apresentado uma liberação sustentada em pH 7,4, que simula o pH sanguíneo, evitando que o fármaco seja liberado em tecidos saudáveis e por meio do efeito EPR, atinja o ambiente tumoral e realize a liberação do fármaco nas células cancerosas. Ou seja, a baixa liberação do ativo mesmo com 48 horas e até 72 de ensaio é uma vantagem no tratamento do câncer, pois, o fármaco fica retido dentro da nanopartícula e somente terá altas taxas de liberação dentro do ambiente tumoral após o processo de internalização.

Eloy et al (2020), produziram lipossomas contendo docetaxel, compostos por SPC, colesterol e DSPE-PEG-2000 e funcionalizaram com o anticorpo cetuximabe, semelhante ao que está sendo proposto neste estudo e os autores encontraram que após 48 horas de ensaio de liberação, o imunolipossoma liberou menos em relação ao lipossoma, da mesma maneira como ocorreu neste estudo. Dessa forma, pode-se associar a ancoragem do anticorpo na superfície do lipossoma a uma redução nas taxas de liberação do fármaco por unidade de tempo.

Em associação aos dados citados para o imunolipossoma, Aires Fernandes et al (2021) produziram lipossomas contendo docetaxel compostos por SPC, colesterol e DSPE-PEG-2000 e funcionalizaram os mesmos com transferrina e chegaram a mesma conclusão, pois o lipossoma liberou 52% do fármaco ao final das 72 horas de ensaio e quando funcionalizado com transferrina o mesmo liberou 32%. Diante do exposto, Aires Fernandes et al (2021), explicam que a presença do PEG na superfície do lipossoma funciona como uma barreira para a liberação do docetaxel que é um fármaco lipofílico, além disso, a funcionalização com transferrina aumenta essa resistência e dificulta a difusão do taxano para o meio.

No caso dos lipossomas contendo cabazitaxel deste estudo, há uma proporção de 5% molar de DSPE-PEG-2000 que geram uma barreira hidrofílica e dificultam a liberação do fármaco no meio estudado. Com a funcionalização, duplicou-se a proporção de DSPE-PEG utilizado, colocando 10% molar de DSPE-PEG-Maleimida e ainda se associa a presença do anticorpo na superfície das nanopartículas, gerando uma barreira hidrofílica mais acentuada na parte externa da vesícula o que aumenta a retenção do fármaco dentro da bicamada lipídica mesmo após 72 horas de ensaio. No caso, ressalta-se que os lipossomas liberaram 19% ao fim do estudo enquanto os imunolipossomas liberaram apenas 5%.

A retenção do cabazitaxel no interior dos imunolipossomas produzidos é uma vantagem, visto que, o fármaco não será liberado na corrente sanguínea até que o mesmo fique preso no tecido tumoral por conta do efeito EPR, além disso, a especificidade do anticorpo pelo EGFR, permitiria a liberação sítio específica após conexão entre as duas proteínas e

internalização celular das nanoestruturas (MERINO; ZALBA; GARRIDO, 2018; BELFIORE et al, 2018).

Assim, para tentar prever o comportamento do fármaco no organismo, uma grande variedade de modelos matemáticos tem sido desenvolvida para associar aos dados da liberação *in vitro* (ZHANG et al, 2010). Dos parâmetros fornecidos, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) pode ser utilizado para demonstrar o modelo matemático que mais se adequa, enquanto ao comparar modelos diferentes, o modelo mais indicado será o de maior valor numérico para Critério de Seleção do Modelo (MSC) (ZHANG et al, 2010). Neste estudo, avaliou-se o perfil cinético das empregando os modelos matemáticos de Primeira Ordem, Ordem Zero, Korsmeyer-Peppas, Higuchi e Weibull e os resultados encontrados de  $R^2$  e MSC para cada modelo estão expressos na tabela 14.

Tabela 14: Valores do coeficiente de determinação e MSC obtidos de acordo com modelos matemáticos para formulações e fármaco cabazitaxel.

Modelo	Imunolipossoma		Lipossoma	
	$R^2$	MSC	$R^2$	MSC
Zero Order	0,98	2,73	0,80	0,18
Firt Order	0,98	2,76	0,82	0,31
Korsmeyer- Peppas	0,96	1,01	0,92	0,45
Higuchi	0,97	1,14	0,88	0,59
Weibull	0,96	1,42	0,93	0,49

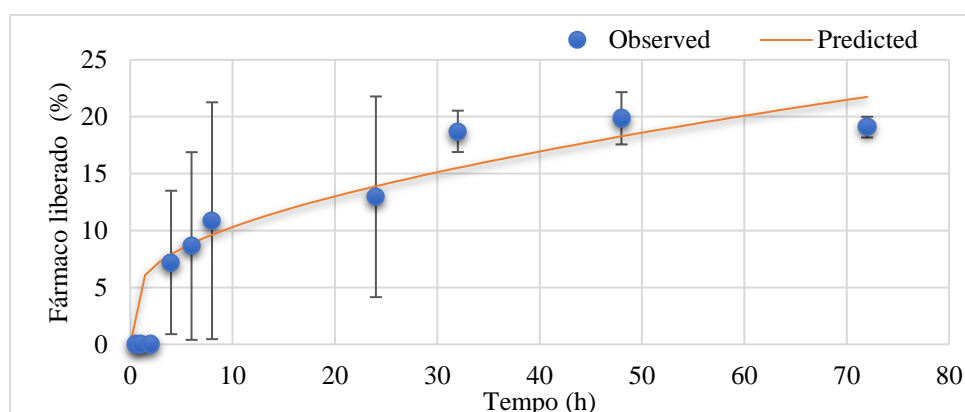
A cinética de liberação que melhor se aplicou para a formulação com cabazitaxel encapsulado em lipossomas foi a de Weibull, visto que os parâmetros analisados foram em primeiro lugar o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) mais próximo de 1, considerado o ideal e em segundo o MSC com valores positivos, analisando a adequabilidade do método. Já o imunolipossoma apresentou o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual para dois modelos e foi utilizado o valor de MSC para demonstrar o método mais adequado, que foi a cinética de liberação de primeira ordem.

O Modelo de Weibull pode ser demonstrado como uma relação linear entre o logaritmo do fármaco liberado e o logaritmo do tempo de ensaio, sendo que, pequenas

alterações na liberação entre fases consecutivas de um mesmo perfil cinético são neutralizadas calculando o logaritmo. Na equação de Weibull,  $t_d$  é um parâmetro de localização que está relacionado ao tempo de atraso antes do início da liberação, enquanto  $\beta$ , é um parâmetro de forma da curva de liberação e pode ser relacionado com os efeitos fisiológicos. De fato, para equações com  $\beta = 1$ , a forma da curva é um perfil exponencial,  $\beta > 1$  demonstra uma forma sigmoideal e  $\beta < 1$  delinea um gráfico parabólico (JAHROMI et al, 2020). Assim, foram obtidos valores de  $\beta$  menores que 1 para o perfil cinético do lipossoma ( $\beta=0,49$ ), demonstrando a forma da curva de liberação como parabólica, que pode ser observada, na figura 36. Segundo o cálculo do tempo de atraso para o início da liberação, foi obtido 18 minutos para o lipossoma.

Segundo o estudo de Aires Fernandes et al (2020), que produziram lipossomas contendo docetaxel funcionalizados com transferrina, o melhor modelo para seu perfil cinético foi o de Weibull e o mesmo esteve associado a um mecanismo de difusão do solvente na bicamada lipídica formando um gradiente de penetração deste solvente e com o decorrer do ensaio, a concentração do solvente dentro da nanopartícula vai diminuindo exponencialmente. Assim, o emprego do PEG nos lipossomas, permitiu uma estrutura organizada e com liberação gradativa do fármaco.

Figura 36: Perfil cinético de Weibull aplicado a curva de liberação do Lipossoma.



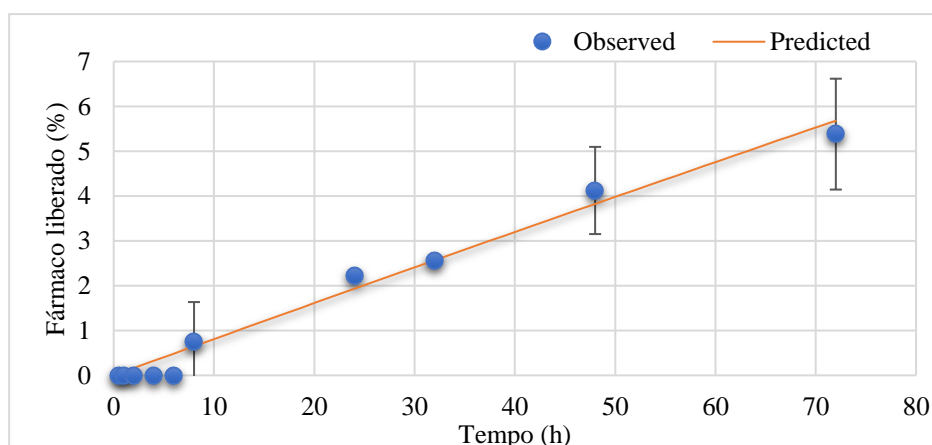
Como foi observado anteriormente, o imunolipossoma apresentou um perfil de liberação que está mais relacionado a cinética de ordem 1, que segundo Jahromi et al (2020), refere-se a sistema cuja taxa de liberação é apenas uma função da concentração restante do fármaco. De acordo com Jain e Jain (2016), a liberação do fármaco seguindo a cinética de primeira ordem é expressa pela equação:  $\log C = \log C_0 - Kt/2,303$  onde  $C_0$  é a concentração inicial do fármaco,  $K$  é a constante de velocidade de primeira ordem e  $t$  é o tempo, de maneira



que, os dados de liberação são plotados como porcentagem cumulativa de log do fármaco restante versus o tempo para alcançar uma linha reta com uma inclinação de  $-K/2,303$ .

É importante ressaltar que o modelo descrito para para o imunolipossoma (Ordem 1), difere do modelo cinético de ordem zero, visto que, o modelo de ordem zero descreve a liberação do fármaco de um sistema que libera seu conteúdo com uma taxa constante, independentemente de sua concentração e a liberação é apenas uma função do tempo. O modelo de ordem zero pode ser expresso pela equação:  $D_t = D_0 + K_0t$ , onde  $D_t$  é a quantidade de fármaco dissolvido no tempo  $t$ ,  $D_0$  é a quantidade inicial de fármaco na solução e  $K_0$  é a constante de liberação de ordem zero (JAHROMI et al, 2020; JAIN;JAIN, 2016). A figura 37, mostra a curva de liberação do imunolipossoma, conforme a cinética de primeira ordem, com aspecto linear.

Figura 37: Perfil cinético de Primeira Ordem aplicado a curva de liberação do Imunolipossoma.

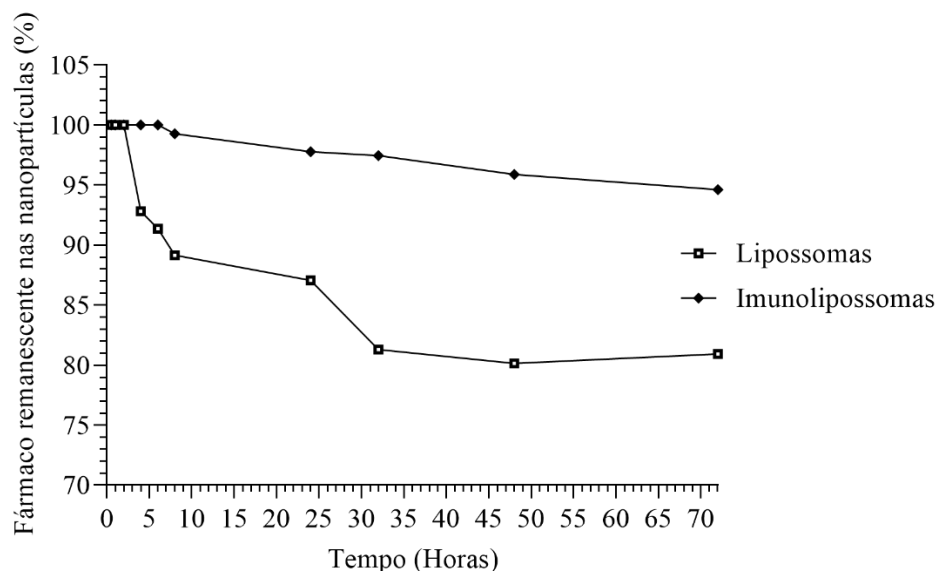


Diante do exposto, o estudo de Mordi e Anderson (2013) demonstraram um comparativo muito relevante, no qual, os mesmos encapsularam AR-67 (7-t-butildimetilsilil-10-hidroxicamptotecina) em lipossomas compostos de DSPC e fizeram o ensaio de liberação in vitro em dois pHs; 4,2 e 9,5. Em pH 9,5, AR-67 existe principalmente na forma de carboxilato (impermeável à membrana) que diminui a taxa de liberação, enquanto a liberação em pH 4,2 foi mais rápida, porque o AR-67 existe principalmente na forma de lactona (permeável à membrana) que é lixiviada dos lipossomas em velocidade mais rápida, sendo que as duas liberações apresentaram cinética de primeira ordem mas em pH 9,5 houve um perfil mais sustentado. No caso deste estudo, nota-se que o imunolipossoma apresentou uma barreira maior para a saída do fármaco de dentro da bicamada e como foi explicado anteriormente, utilizou-se

o dobro do PEG em sua composição, assim como o anticorpo também foi ancorado na superfície, ou seja, o processo de funcionalização dificultou a passagem do cabazitaxel para o meio externo. Tal fato, pode ser melhor visualizado na figura 38, na qual, é feito um comparativo entre a quantidade fármaco remanescente (%) para as duas formulações, seguindo a lógica da cinética de primeira ordem.

Como é possível observar, a quantidade de fármaco remanescente no imunolipossoma ao final do estudo é superior ao lipossoma (95% vs 81%, respectivamente) e um perfil de liberação mais sustentado com pequena variação na taxa de liberação entre os horários medidos. Em concordância com tais achados, Tai et al (2019), produziram lipossomas contendo curcumina compostos por lecitina de soja e  $\beta$ -sitosterol, em seu estudo, perceberam um mecanismo controlado por difusão dominando o comportamento de liberação da curcumina, o que se deve à falta de fenômeno de liberação de explosão e isso caracterizou uma cinética de liberação de ordem 1.

Figura 38: Perfil de liberação *in vitro* utilizando a porcentagem de fármaco remanescente vs o tempo de ensaio para lipossoma e imunolipossoma contendo cabazitaxel.



## 5.11 Avaliação de lipossomas e imunolipossomas em cultura celular

### 5.11.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Observa-se na figura 39, a viabilidade celular para as linhagens DU145 e PC3 frente a três diferentes grupos (fármaco livre, lipossomas e imunolipossomas) em 8 concentrações cada. Na figura 40, é possível observar a viabilidade celular para as formulações branco (lipossomas e imunolipossomas sem a presença do fármaco), para as linhagens DU145 e PC3.

Figura 39: Viabilidade celular das formulações (fármaco livre, lipossomas e imunolipossomas) para as linhagens celulares. (A) DU145. (B) PC3. Teste Two-Way Anova com pós teste de tukey. \* $p < 0,05$ .

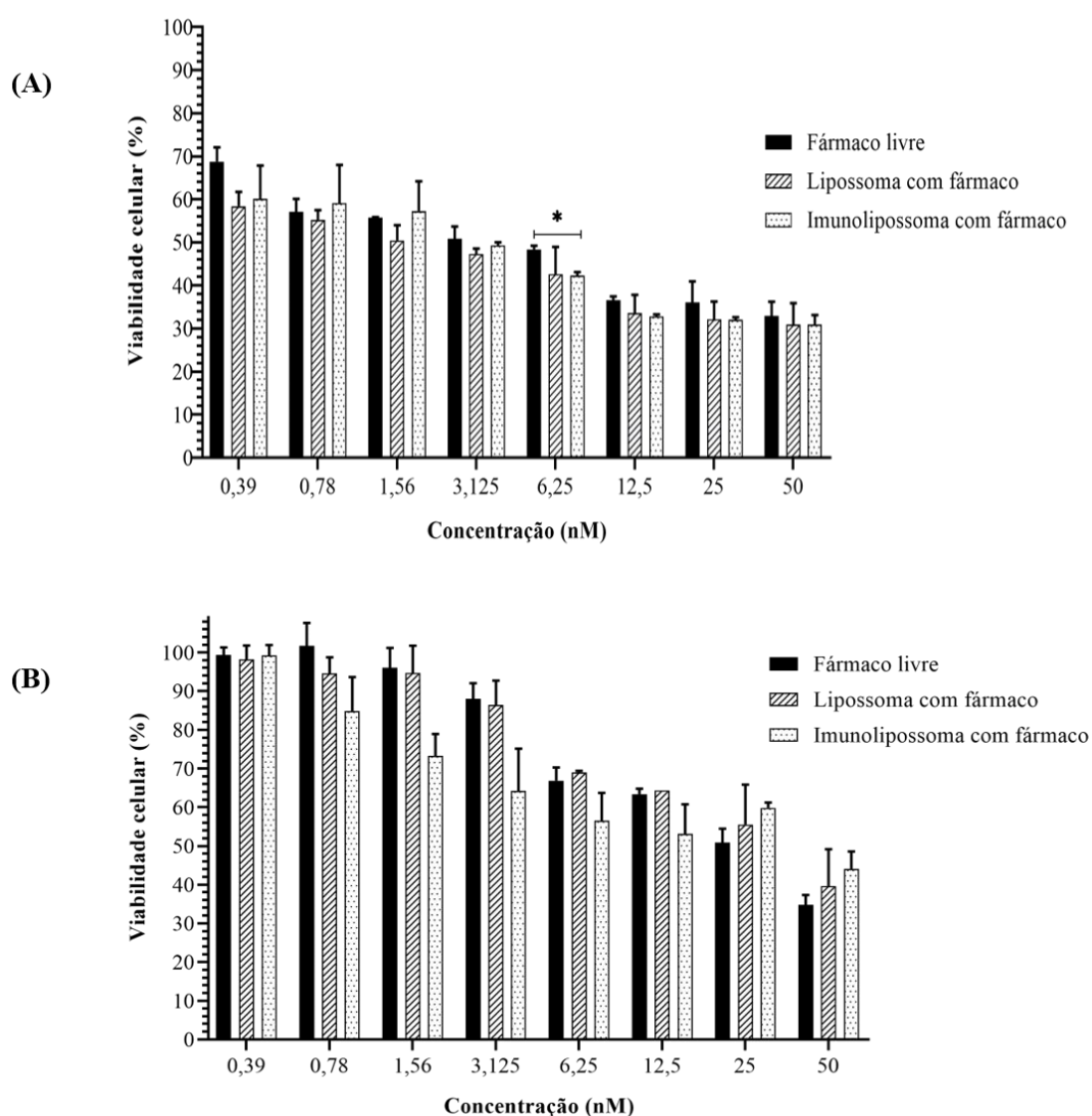
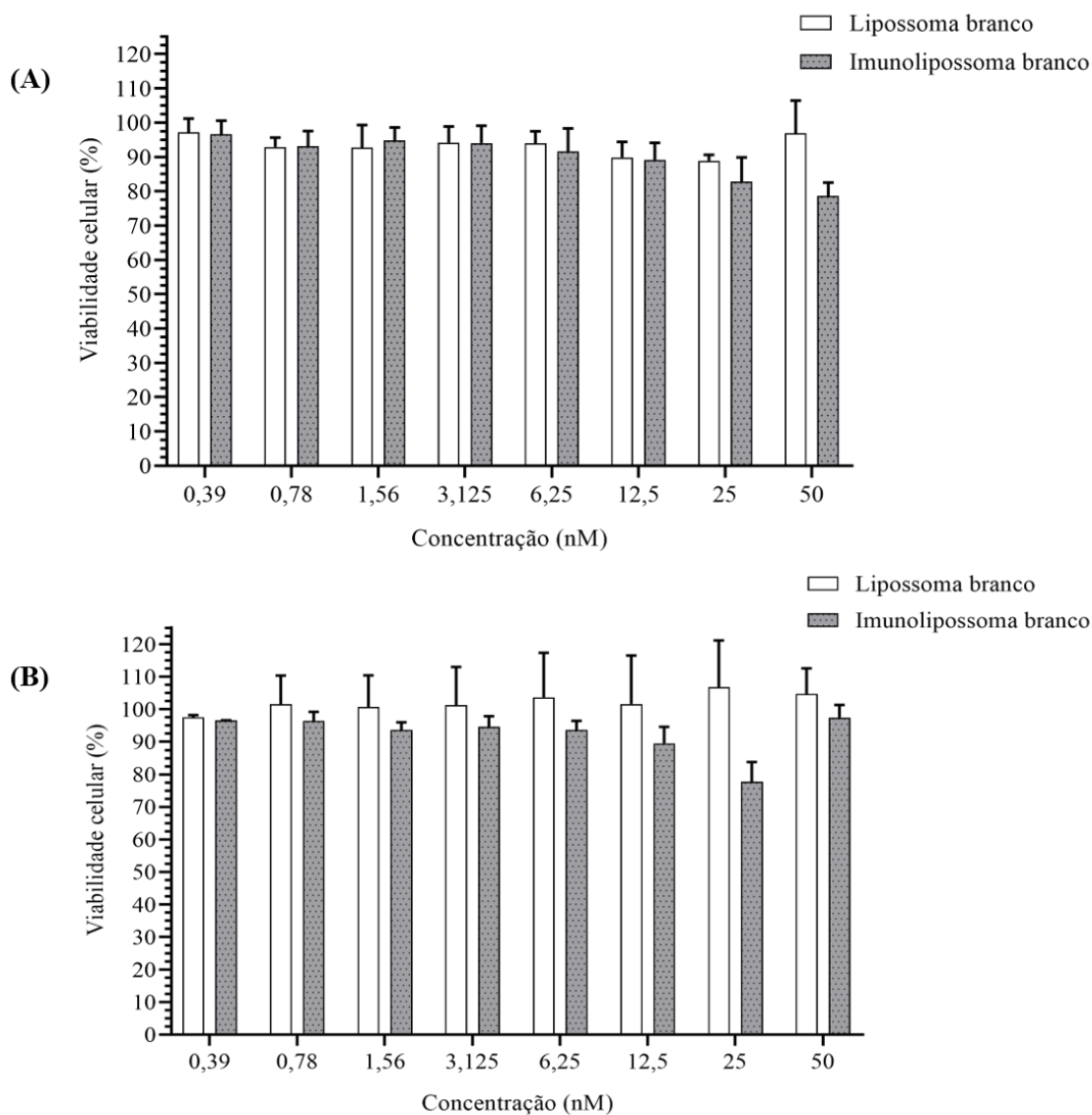


Figura 40: Viabilidade celular das formulações controle (lipossoma branco e imunolipossoma branco) para as linhagens celulares. (A) DU145. (B) PC3.



De acordo com a figura 39, nota-se que para a linhagem celular DU145, a partir da concentração de 3,13 nM atingiu-se em torno de 50% da viabilidade celular (Fármaco livre: 50,87%; Lipossoma: 47,31%; Imunolipossoma: 49,31%). Entretanto, quando se observa a linhagem PC3, a partir da concentração de 25 nM foi possível obter uma viabilidade em torno de 50% para o fármaco livre (50,83%), e somente a partir de 50 nM para as outras duas formulações (Lipossoma: 39,66%; Imunolipossoma: 44,01%). Dessa forma, é possível inferir que o cabazitaxel foi mais citotóxico para a linhagem DU145 quando comparado com a PC3, tanto em solução quanto encapsulado. Na figura 34, nota-se que tanto lipossoma quanto

imunolipossoma branco não atingiram 50% da viabilidade celular para todas as concentrações testadas, demonstrando que a formulação lipídica empregada não apresenta efeito citotóxico nas linhagens tumorais.

É importante ressaltar que o Imunolipossoma branco apresentou um pequeno grau de morte celular nas duas linhagens a partir de 25 nM, porém isso pode ser explicado pela presença do anticorpo cetuximabe livre na formulação, considerando que uma parte dele não foi conjugado à nanopartícula e assim como descrito por London e Gallo (2020) que o cetuximabe é um anticorpo de alta afinidade para o receptor com uma constante de dissociação de 0,1-0,2 nM, que mostrou uma alta taxa de inibição do crescimento celular. Na tabela 15, seguem são descritos os valores de IC50 para grupo testado nas diferentes linhagens celulares.

Tabela 15: IC50 de fármaco livre e das formulações testadas nas duas linhagens celulares (PC3 e DU145) com seus respectivos desvios padrões.

Grupo	IC50 (nM)	
	DU145	PC3
<b>Fármaco Livre</b>	3,48 ± 0,06	23,20 ± 1,62
<b>Lipossoma com fármaco</b>	2,98 ± 0,77	35,79 ± 14,70
<b>Imunolipossoma com fármaco</b>	2,34 ± 1,34	29,72 ± 7,72

De acordo com os dados da tabela 15, pode-se afirmar que as 3 formulações testadas foram mais citotóxicas para a linhagem DU145, com ênfase para o imunolipossoma que apresentou menor valor de IC50 (2,34 ± 1,34 nM). Já na linhagem PC3, o fármaco livre exerceu maior poder de inibição do crescimento celular evidenciado pelo seu menor valor de IC50 (23,20 ± 1,62 nM) comparado ao lipossoma e ao imunolipossoma (35,79 ± 14,70 nM; 29,72 ± 7,72 nM, respectivamente). De todo modo, nas duas linhagens celulares o imunolipossoma apresentou mais citotoxicidade quando comparado com o lipossoma, embora não estatisticamente significativo, visto que a funcionalização com o anticorpo pode melhorar a captação celular, farmacocinética e entrega tumoral, mas não necessariamente potencializar a citotoxicidade do fármaco. Eloy et al (2020) testaram docetaxel encapsulado em lipossomas e imunolipossomas funcionalizados com cetuximabe nas linhagens PC3 e DU145. No estudo de Eloy et al (2020), o imunolipossoma apresentou maior efeito citotóxico em relação ao lipossoma e ao fármaco livre na linhagem DU145, sendo este fato explicado pela alta expressão

do EGFR na linhagem celular em questão. Além disso, Zhang et al (2022) prepararam lipossomas contendo docetaxel e foi notado que os lipossomas foram mais citotóxicos na linhagem DU145 do que na PC3.

Maya et al (2013), produziram nanopartículas poliméricas de quitosana contendo paclitaxel, funcionalizaram com o anticorpo cetuximabe e testaram em linhagens celulares com alta expressão de EGFR: A431 (câncer epidermóide), A549 (câncer pulmonar), SKBR3 (câncer de mama) e MIAPaCa-2 (câncer pancreático). Dessa forma, os autores obtiveram que para as linhagens A431, A549 e SKBR3, a nanopartícula funcionalizada foi mais citotóxica e concluíram que isso foi alcançado graças a maior taxa de internalização. Apenas na linhagem MIAPaCa-2 o paclitaxel foi mais tóxico que as nanopartículas, assim como ocorreu com a linhagem PC3 neste estudo, em que o cabazitaxel foi mais tóxico que as formulações lipossomais.

Sabra; Billa e Roberts (2019), produziram nanopartículas de quitosana contendo curcumina, funcionalizaram com o anticorpo cetuximabe e testaram em duas linhagens celulares de câncer colorretal: Caco-2 (alta expressão de EGFR) e HCT-116 (baixa expressão de EGFR). Os resultados evidenciaram que após 72 horas de ensaio em cultura celular, a formulação funcionalizada foi mais citotóxica para a linhagem Caco-2, enquanto para HCT-116, houve a mesma IC50, tanto para a nanopartícula não funcionalizada quanto para a que houve inserção do anticorpo.

Com relação ao resultado encontrado para a linhagem com menor expressão de EGFR, o estudo de Aires Fernandes et al (2021), testou lipossomas contendo docetaxel funcionalizados com transferrina na linhagem PC3 e os mesmos notaram que o lipossoma controle foi muito mais tóxico ( $IC_{50} = 0,19$  nM) que o lipossoma funcionalizado com transferrina ( $IC_{50} = 26,88$ ) e o fármaco livre ( $IC_{50} = 34,98$ ). O lipossoma produzido por Aires Fernandes et al (2021) é composto por SPC, Colesterol e DSPE-PEG-2000, assim como a formulação deste estudo e o resultado foi o semelhante, visto que o processo de funcionalização não causou aumento da citotoxicidade frente a linhagem PC3.

### ***5.11.2 Avaliação da uptake celular de lipossomas e imunolipossomas por citometria de fluxo***

Nas figuras 41 e 42, são mostrados os estudos de citometria de fluxo nas duas linhagens celulares (DU145 e PC3) e com dois grupos de formulações testadas (lipossoma e imunolipossoma). Os tempos de 4h e 24h de tratamento foram escolhidos para análise. Para

revelação de morte celular foi usado o fluoróforo iodeto de propídio, marcador de ácidos nucleicos; já para a visualização da captação celular foi utilizado o fluoróforo Dio, marcador de bicamadas lipídicas, encapsulado nos lipossomas e imunolipossomas. Nos gráficos obtidos, os quadrantes superior direito e inferior direito representam células mortas marcadas com solução de iodeto de propídio, com e sem o fluoróforo DIO, respectivamente. Os quadrantes superior esquerdo e inferior esquerdo representam células vivas com e sem o fluoróforo DIO, respectivamente, sem a marcação com iodeto de propídio.

Figura 41: Imagens obtidas por citometria usando lipossoma branco com fluoróforo Dio para linhagem DU145. (A) 4 horas de ensaio. (B) 24 horas de ensaio. (I) Lipossoma. (II) Imunolipossoma.

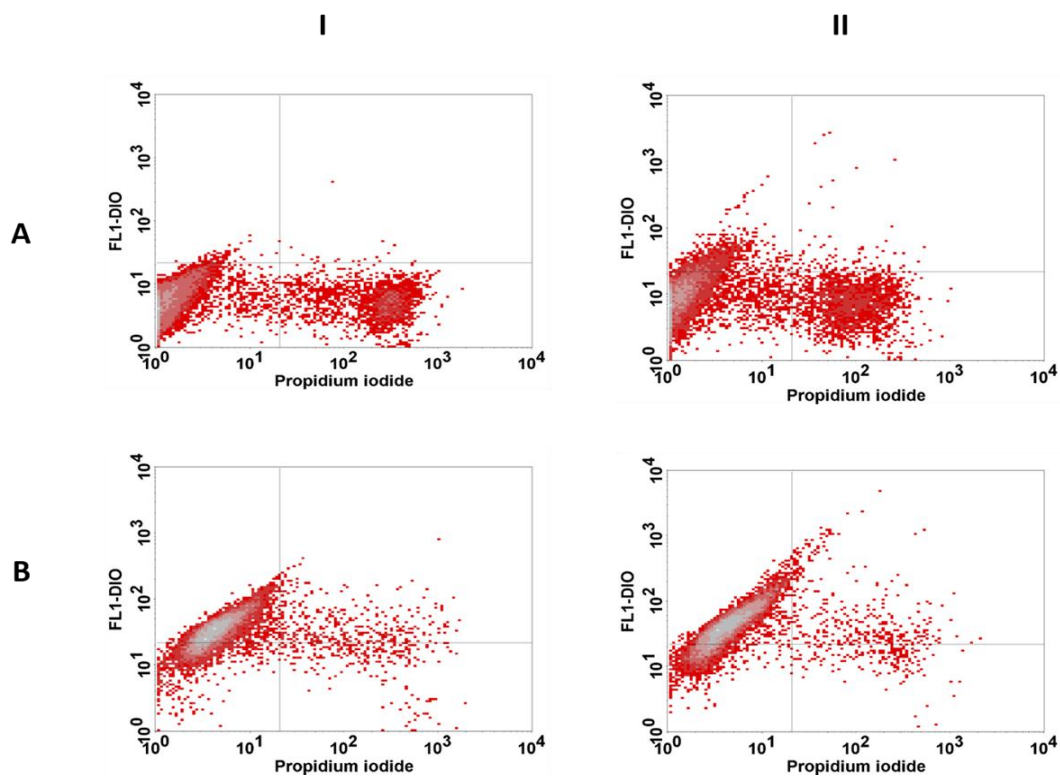
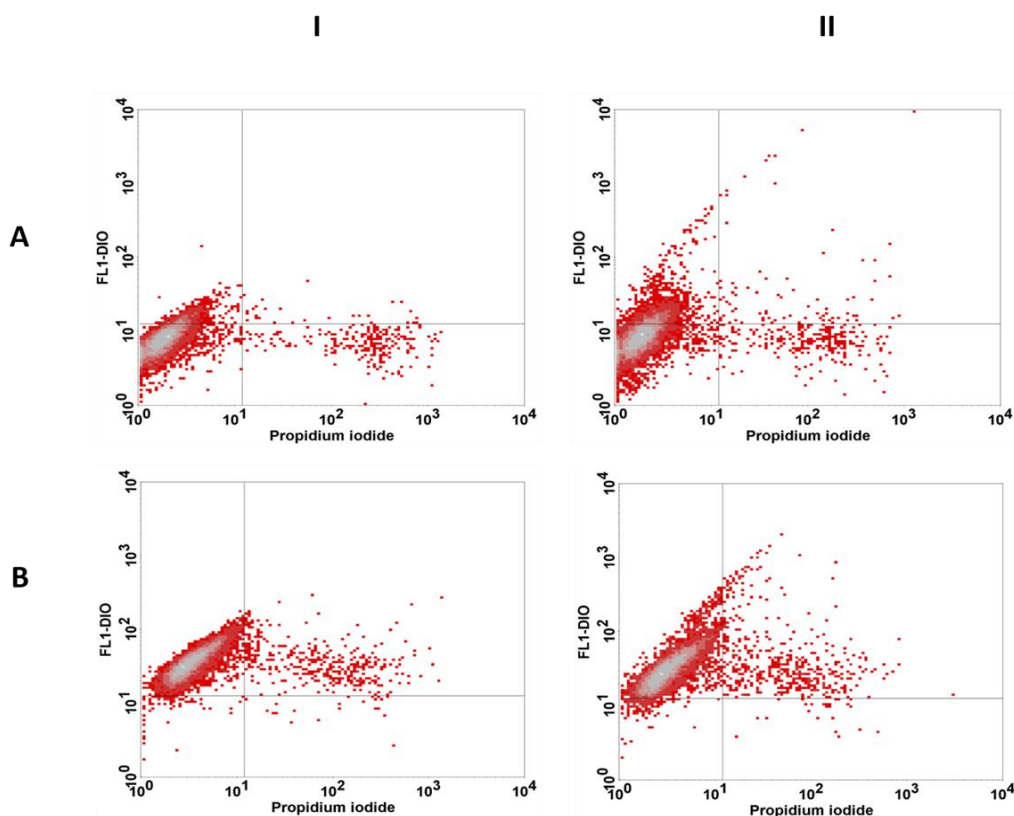


Figura 42: Imagens obtidas por citometria de fluxo usando lipossoma branco com fluoróforo Dio para linhagem PC3. (A) 4 horas de ensaio. (B) 24 horas de ensaio. (I) Lipossoma. (II) Imunolipossoma.



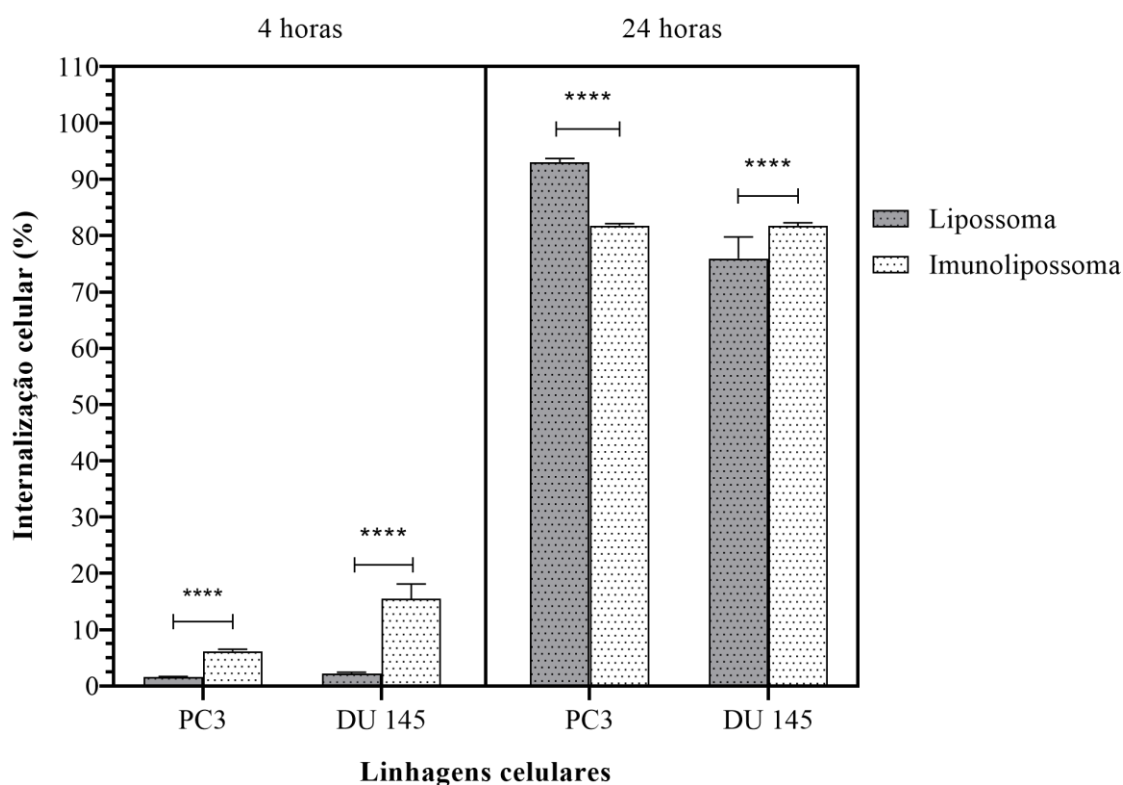
Para as duas linhagens, notou-se que com 4 horas de ensaio há uma maior densidade de células no quadrante inferior esquerdo, correspondente a células viáveis sem a presença do Dio, demonstrando baixa internalização nesse período, tanto para lipossomas quanto para os imunolipossomas. Já após 24 horas de ensaio, há prevalência de células no quadrante superior esquerdo, que indica células viáveis e marcação com Dio, demonstrando altas de taxas de internalização tanto de lipossomas quanto de imunolipossomas nesse momento do ensaio.

A figura 43, apresenta os dados percentuais de internalização celular nas duas linhagens para os dois grupos testados (após 4 e 24 horas de ensaio). Nota-se que para a linhagem DU145, após 4 horas de ensaio, houve internalização de 2,2% e 15,5%, do lipossoma e imunolipossoma, respectivamente, enquanto, após 24 horas, ocorreu 75,9% e 81,7%. Para a linhagem PC3, após 4 horas do experimento, ocorreu 1,6% e 6,2% de internalização do lipossoma e imunolipossoma, respectivamente e após 24 horas, 93,0% e 81,8%. Dessa forma, observa-se que a DU145 internalizou mais o imunolipossoma tanto com 4 horas quanto com 24 horas de ensaio, sendo este fato já comentado anteriormente, por conta da alta expressão de



EGFR nas células. Na linhagem PC3, o imunolipossoma foi mais internalizado com 4 horas de ensaio, entretanto, o lipossoma se destacou em relação ao imunolipossoma após as 24 horas de experimento. Em adição aos dados citados, a partir da análise estatística realizada com teste de Two-way Anova com pós-teste de Tukey, obteve-se diferença estatística entre lipossomas e imunolipossomas, nas duas linhagens e em tanto com 4 horas de ensaio quanto 24 horas, sendo o  $p < 0,0001$  para todos os grupos avaliados.

Figura 43: Resultados do Uptake celular avaliado por citometria de fluxo para lipossomas e imunolipossomas nas linhagens DU145 e PC3. \*\*\*\* correspondente a  $p < 0,0001$ .



Com isso, destaca-se o fato de que na linhagem PC3, com 24 horas o lipossoma foi mais internalizado e o contrário ocorreu na linhagem DU145, o que confirma, que a expressão do EGFR nas linhagens determinou o grau de *uptake* celular e que no caso da PC3, a composição lipídica dos lipossomas com SPC e colesterol nas proporções utilizadas foram favoráveis para uma internalização de 93,0%. Além disso, quando se compara os imunolipossomas nas duas linhagens em 24 horas de ensaio, verifica-se que os mesmos foram quase igualmente internalizados (81,7% na DU145 e 81,8% na PC3). Quando se realiza este

comparativo para os lipossomas, nota-se uma diferença pronunciada, já que 75,9% dos lipossomas foram internalizados na linhagem DU145, enquanto na PC3 foi 93,0%.

Petrilli et al. (2018a), avaliaram a internalização celular de imunolipossomas anti-EGFR por citometria de fluxo em células de câncer de pele A431 (EGFR positivas) e B16F10 (EGFR negativas). Na linhagem A431 foi observada aumento de aproximadamente 3 vezes na internalização quando as células foram tratadas com o imunolipossoma. Já para a linhagem B16F10 o uptake foi semelhante entre lipossomas e imunolipossomas, uma vez que não há expressão de EGFR para ligação do cetuximabe presente na superfície do imunolipossoma.

Eloy et al (2020) que produziram imunolipossomas anti-EGFR contendo docetaxel, perceberam em seu ensaio de citometria de fluxo que a captação de imunolipossomas foi superior a de lipossomas e foi perceptível mesmo após 30 minutos de ensaio, aumentando ao longo do tempo, resultando em uma absorção quase 2 vezes maior de imunolipossomas do que lipossomas após 180 minutos na linhagem DU 145.

Maya et al (2013) em seu estudo, desenvolveram nanopartículas de quitosana funcionalizadas com anticorpo cetuximabe e comparando a absorção celular de nanopartículas direcionadas e não direcionadas pelas linhagens de células superexpressando EGFR (A431, A549 e SKBR3), pode-se observar que enquanto 75–90% das células absorvem a nanopartícula funcionalizadas, apenas cerca de 20–50% das células internalizam a nanoestrutura não funcionalizada. Além disso, a linhagem MIAPaCa- 2 (EGFR negativa) absorve bem menos nanopartículas, tanto funcionalizadas (32%) quanto não funcionalizadas (22%).

Diante do exposto, avaliou-se que os lipossomas e imunolipossomas apresentaram atividade citotóxica nas duas linhagens celulares testadas, ressaltando que apresentaram valores de IC<sub>50</sub> muito mais baixas nas células DU145 (Lipossoma:  $2,98 \pm 0,77$  nM; Imunolipossoma:  $2,34 \pm 1,34$  nM) que na linhagem PC3 (Lipossoma:  $35,79 \pm 14,70$  nM; Imunolipossoma:  $29,72 \pm 7,72$  nM). É importante enfatizar que nas duas linhagens o imunolipossoma apresentou maior citotoxicidade quando comparado ao lipossoma e que nas células PC3, o fármaco livre foi mais citotóxico que os lipossomas e os imunolipossomas. Com relação ao grau de internalização celular, houve uma porcentagem considerável apenas após 24 horas de ensaio, sendo que para a linhagem DU145, lipossomas e imunolipossomas, respectivamente, sofreram 75,9% e 81,7% de internalização, enquanto na linhagem PC3, ocorreu 93,0% e 81,8%. Foi evidenciado que o lipossoma foi mais internalizado nas células PC3 e que o imunolipossoma sofreu maior uptake celular na linhagem DU145.. Além disso, levando em consideração que a linhagem DU145 apresentou um resultado mais promissor no estudo de citotoxicidade, a mesma será utilizada no

ensaio *in vivo*, sendo inoculada em camundongos BALB/c imunossuprimidos para estabelecimento de um modelo xenográfico de tumores de próstata humano com altas taxas de expressão de EGFR e avaliar o efeito dos lipossomas e imunolipossomas anti-EGFR na redução do volume tumoral.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, foi possível obter lipossomas com tamanho de partícula, PDI e EE adequados a partir de fosfatidilcolina de soja (SPC), colesterol e DSPE-PEG-2000. Com esta formulação, inseriu-se o DSPE-PEG-Maleimida na superfície do lipossoma, realizou-se a tiolação do anticorpo cetuximabe e assim obteve-se um imunolipossoma com tamanho de partícula, PDI e EE próximos ao que foi obtido para o lipossoma. A eficácia de conjugação de 40%, e presença de anticorpo foi confirmada por eletroforese. As análises das formulações em estado sólido, permitiram avaliar que o fármaco foi encapsulado na forma amorfa na matriz lipossomal, sendo uma característica que deixa o fármaco mais biodisponível no ambiente tumoral. O anticorpo cetuximabe foi efetivamente inserido na superfície dos lipossomas de maneira que seus grupamentos químicos foram evidenciados. Foi possível também demonstrar o perfil de liberação *in vitro*, no qual os lipossomas apresentaram liberação sustentada, com pequena porcentagem do fármaco sendo liberado ao final do ensaio (19%) e o imunolipossoma apresentou uma liberação ainda menor (5%). Com relação a atividade antineoplásica *in vitro* das formulações testadas, na linhagem DU145 (alta expressão de EGFR), observou-se-se que o imunolipossoma foi mais citotóxico que o fármaco livre e o lipossoma e que todos os grupos apresentaram menor toxicidade na linhagem PC3, ou seja, o cabazitaxel, encapsulado ou não, conseguiu inibir o crescimento celular na linhagem DU145 em baixas concentrações (2 – 3 nM). Na linhagem PC3, o fármaco livre foi mais citotóxico que os lipossomas e os imunolipossomas. É importante ressaltar que nas duas linhagens o imunolipossoma teve uma IC50 menor que o lipossoma e que a expressão elevada de EGFR nas células DU145 garantiram uma morte celular mais acentuada. A análise em citometria de fluxo permitiu observar que com 4 horas, nas duas linhagens houve baixo *uptake*, porém, o imunolipossoma foi mais internalizado. Já com 24 horas, a PC3 internalizou mais o lipossoma e na DU145 o imunolipossoma foi mais internalizado. Diante deste panorama, foi possível obter lipossomas e imunolipossomas anti-EGFR com elevada atividade citotóxica nas duas linhagens celulares de câncer de próstata e as formulações preparadas apresentaram liberação sustentada do fármaco. Futuramente será estudada a atividade antitumoral *in vivo*, serão feitos testes com modelo xenográfico de tumor de próstata metastático humano em camundongos imunossuprimidos.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, A.A.H. *et al.* Cetuximab Conjugated with Octreotide and Entrapped Calcium Alginate-beads for Targeting Somatostatin Receptors. *Sci Rep*, v. 10, 2020.

ABDELLATIF, A.A.H. *et al.* PEG-4000 formed polymeric nanoparticles loaded with cetuximab downregulate p21 & stathmin-1 gene expression in cancer cell lines. *Life Sciences*, v. 295, 2022.

AIRES FERNANDES, MARIZA *et al.* Transferrin-functionalized liposomes for docetaxel delivery to prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 611, 2021.

ALMEIDA, MARCELO RUBENS BRAGA DE. Estudo termodinâmico do processo de carregamento elétrico da interface superfície-dispersão em nanocoloides magnéticos à base de nanopartículas coreshell do tipo  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) - Universidade de Brasília, Planaltina, Brasília, 2018.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., Jr. ALLEN, L. V. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 9a edição, Artmed, 719p, 2013.

ASHOK, Jangid *et al.* Nanoscale, Biocompatible and Amphiphilic Prodrug of Cabazitaxel with Improved Anticancer Efficacy Against 3D Spheroids of Prostate Cancer Cells. *Materials Advances*, v.1, p. 738 – 748, 2020.

BELFIORE, Lisa *et al.* Towards clinical translation of ligand-functionalized liposomes in targeted cancer therapy: Challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, v. 277, p. 1-13, 2018.

BERISH, R. B. *et al.* Translational models of prostate cancer bone metastasis. *Nature Reviews Urology* Nature Publishing Group, , 1 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cetuximabe para o tratamento do câncer colorretal metastático RAS selvagem com doença limitada ao fígado em primeira linha. Brasília: Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC), 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Próstata. Brasília: Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC), 2015.

CASAS-TERRADELLAS, E. et al. Simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular weights using low-percentage acrylamide gel and a gradient SDS-PAGE gel. *Electrophoresis*, v. 27, p. 3935 – 3938, 2006.

CATHOMAS R. et al. Efficacy of cetuximab in metastatic castration-resistant prostate cancer might depend on EGFR and PTEN expression: results from a phase II trial (SAKK 08/07). *Clin Cancer Res*, v. 18, p. 6049 – 6057, 2012.

CAVALCANTI, ISABELLA MACÁRIO FERRO. Preparação, caracterização e cinética de liberação in vitro de lipossomas contendo  $\beta$ -lapachona e complexos de inclusão  $\beta$ -lapachona: 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. 2010. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2010.

CHAND, Pallavi et al. Design and evaluation of cabazitaxel loaded NLCs against breast cancer cell lines. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021.

CHEN, Chengjun et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 157, p. 110 – 117, 2017.

COLATI, KEROLY ALAÍDE PASCOAL et al. Construção de uma célula de gás de baixo custo para análise no infravermelho. *Química Nova*, v. 34, p. 864-867, 2011. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 157, p. 110 – 117, 2017.

DE BONO, J. S. et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: A randomised open-label trial. *The Lancet*, v. 376, n. 9747, p. 1147–1154, 2010.

DE CASTRO PEIXOTO, ANDRÉ et al. Design of Experiments Applied to Antibiotics Degradation by Fenton's Reagent. In: Silva, V., editor. *Statistical Approaches With*

Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes London: IntechOpen; 2017.

DEQUANTER, Didier et al. Cetuximab in the treatment of head and neck cancer: preliminary results outside clinical trials. *Cancer Management and Research*, v.2, p. 165-168, 2010.

ELOY J.O. et al. EGFR-targeted immunoliposomes efficiently deliver docetaxel to prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Elsevier*, 2020.

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, p. 159 – 167, 2017b.

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 Elsevier B.V.*, v. 141, p. 74 – 82, 2016.

ELOY, J. O. et al. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Elsevier B.V.*, 2017a.

ELOY, J.O. et al. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.159, p. 454 – 467, 2017c.

ELOY, J.O., MARCHETTI, J.M. Solid dispersions containing ursolic acid in Poloxamer 407 and PEG 6000: A comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology**, v. 253, p. 98-106, 2014.

ENOKI, Thais Azevedo. Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física, USP, São Paulo, 2010

ERNSTING, Mark J. et al. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *Journal of Controlled Release* v. 172, p. 782 – 794, 2013.

FERLAY, J. et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>. Acesso em: 28 de janeiro de 2022.

FERLAY, J. et al. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2020b. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?types=0&sexes=0&mode=cancer&group\\_populations=1&multiple\\_populations=1&multiple\\_cancers=1&cancers=27\\_39&populations=903\\_904\\_905\\_908\\_909\\_935&years=2025&group\\_cancers=0&single\\_unit=5000&bar\\_mode=grouped&key=total&show\\_bar\\_mode\\_prop=0](https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?types=0&sexes=0&mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=27_39&populations=903_904_905_908_909_935&years=2025&group_cancers=0&single_unit=5000&bar_mode=grouped&key=total&show_bar_mode_prop=0). Acesso em: 28 de janeiro de 2022.

FRANKS, Felix. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 45, p. 221 – 229, 2002.

GOLKAR, N; TAMADDON, A.M.; SAMANI, S.M. Effect of lipid composition on incorporation of trastuzumab-PEG-lipid into nanoliposomes by post-insertion method: physicochemical and cellular characterization. *J Liposome Res*, v. 26, p. 113 – 125, 2016.

GREEN, M.R. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, v.17, p. 1263 – 1268, 2006.

GUIMARÃES, D.; CAVACO-PAULO, A.; NOGUEIRA, E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics Elsevier B.V.*, 2021.

HELMI, OMAR; ELSHISHINY, FATIMA; MAMDOUH, WAEL. Targeted doxorubicin delivery and release within breast cancer environment using PEGylated chitosan nanoparticles labeled with monoclonal antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 184, p. 325 – 338, 2021.

HELMI, OMAR; ELSHISHINY, FATMA; MAMDOUH, WAEL. Targeted doxorubicin delivery and release within breast cancer environment using PEGylated chitosan nanoparticles labeled with monoclonal antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.184, p. 325 – 338, 2021.

HOLSÆTER, ANN MARI et al. How docetaxel entrapment, vesicle size, zeta potential and stability change with liposome composition—A formulation screening study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.177, 2022.



INGROSSO, G. et al. Current therapeutic options in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Seminars in Oncology* W.B. Saunders, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro : INCA, 2022.

IZUTSU, Ken-Ichi. Applications of Freezing and Freeze-Drying in Pharmaceutical Formulations. In: M. Iwaya-Inoue et al., *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Nature Singapore, 2018.

JAHROMI, LEILA POURTALEBI et al. A comparison of models for the analysis of the kinetics of drug release from PLGA-based nanoparticles. *Heliyon*, v. 6, 2020.

JAIN, Ankit; HURKAT, Pooja; JAIN, Sanjay K. Development of liposomes using formulation by design: Basics to recent advances. *Chem Phys Lipids*, 2019.

JAIN, ANKIT; JAIN , SAJAY, K. In vitro release kinetics model fitting of liposomes: an insight. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2016.

JAIN, SANYOG et al. Tumor microenvironment responsive VEGF-antibody functionalized pH sensitive liposomes of docetaxel for augmented breast cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*, v. 121, 2021.

JASS, JANA; TJÄRNHAGE, TORBJÖRN; PUU, GERTRUD. Atomic Force Microscopy Imaging of Liposomes. *Methods in Enzymology*, Academic Press, v. 367, p. 199 – 213, 2003.

JIA, Lirui et al. Characterization techniques: The stepping stone to liposome lyophilized product development. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 601, 2021.

JOSHI, Gaurav et al. Growth factors mediated cell signalling in prostate cancer progression: Implications in discovery of anti-prostate cancer agentes. *Chemico-Biological Interactions*, v. 240, p. 120-133, 2015 *Journal of Controlled Release*, v. 142, p. 299 – 311, 2010.

JUN, Zhao et al. Cabazitaxel polymorphic forms and preparation method thereof. Depositante: Jiangsu Aosaikang Pharmaceutical Co Ltd. Número da patente: CN103058960A. Publicação em 24 de abril de 2013.

LARGE, E. DANIELLE et al. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 176, 2021.

LI, M. et al. Composition design and medical application of liposomes. *European Journal of Medicinal Chemistry Elsevier Masson s.r.l.*, 2019.

LI, Shyh-dar; HUANG, Leaf. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, p. 496-504, 2008.

LIMASALE, Y.D. et al. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes for delivery of celecoxib to cancer cells. *Int J Pharm*, v. 479, p. 364-373, 2015.

LIU, P. et al. Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *AAPS PharmSciTech*, v. 14, p. 748-756, 2013.

LONDON, M., GALLO, E. Epidermal growth factor receptor (EGFR) involvement in epithelial derived cancers and its current antibody-based immunotherapies. *Cell Biol*, v. 44, 1267 – 1282, 2020. <https://doi.org/10.1002/cbin.11340>.

LU, Xiaoyan et al. Afatinib-loaded immunoliposomes functionalized with cetuximab: A novel strategy targeting the epidermal growth factor receptor for treatment of non-small-cell lung cancer. *Int J Pharm*, v. 560, p. 126-135, 2019.

MAHIRA, SHAHEEN et al. Cabazitaxel and silibinin co-encapsulated cationic liposomes for CD44 targeted delivery: A new insight into nanomedicine based combinational chemotherapy for prostate cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 110, p. 803-817, 2019.

MALMBERG, jennie; TOLMACHEV, vladimir; ORLOVA, anna. Imaging agents for in vivo molecular profiling of disseminated prostate cancer - targeting EGFR receptors in prostate cancer: Comparison of cellular processing of [111In]-labeled affibody molecule ZEGFR:2377 and cetuximab. *International Journal of Oncology*, v. 38, p. 1137-1143, 2011.

MAMOT, Christoph et al. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: A phase 1 dose-

escalation study. *Lancet Oncol.*, v. 13, p. 1234–1241. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70476-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70476-X)

MANDAL, Manas Kumar et al. Investigations on the role of ionic liquid on the physicochemical characteristics and toxicological consequences of liposomes. *JCIS Open*, v. 6, 2022.

MANJAPPA, A.S. et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor. *J Control Release*, v.150, p. 2 -22, 2011.

MARFATIA, ADITYA; SAYED, NEELAM. In-vitro drug release methods for liposomal drug delivery systems. EP News Bureau, 2017. Disponível em: <https://www.expresspharma.in/ipc/in-vitro-drug-release-methods-for-liposomal-drug-delivery-systems/>. Acesso em: 20 de jan. 2020.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Res*, v. 46. 1986.

MAYA S. et al . Cetuximab conjugated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for targeting EGFR overexpressing cancer cells. *Carbohydr Polym*, v. 93, p. 661 – 669, 2013.

MERINO, M.; ZALBA, S.; GARRIDO, M. J. Immunoliposomes in clinical oncology: State of the art and future perspectives *Journal of Controlled Release Elsevier B.V.*, 2018.

MODI, SWETA; ANDERSON, BRADLEY D. Determination of drug release kinetics from nanoparticles: Overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. *Mol. Pharmaceutics*, v. 10, 2013.

MOREIRA, Thais da Silva et al. DOPE/CHEMS-Based EGFR-Targeted Immunoliposomes for Docetaxel Delivery: Formulation Development, Physicochemical Characterization and Biological Evaluation on Prostate Cancer Cells. *Pharmaceutics*, v. 15, 2023.

NANDA, BISWARUP et al. Acylated chitosan anchored paclitaxel loaded liposomes: Pharmacokinetic and biodistribution study in Ehrlich ascites tumor bearing mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 122, p. 367-379, 2019.

NASTAŁY, P. et al. EGFR as a stable marker of prostate cancer dissemination to bones. *British journal of cancer*, v. 123, p. 1767–1774, 2021.

NELSON, William G. et al. Prostate câncer. *In: NIEDERHUBER, John E. et al. Abeloff's Clinical Oncology (Sixth Edition)*, p. 1401 – 1432. USA: Elsevier, 2020.

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

NSAIRAT, H. et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, v. 8, n. 5, 2022.

PALLER, C. J.; ANTONARAKIS, E. S. Cabazitaxel: A novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate câncer. *Drug Design, Development and Therapy*, 2011.

PEAN, E. et al. The European Medicines Agency Review of Cabazitaxel (Jevtana®) for the Treatment of Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *The Oncologist*, v. 17, n. 4, p. 543–549, 1 abr. 2012.

PEREIRA, SARA et al. Docetaxel-loaded liposomes: The effect of lipid composition and purification on drug encapsulation and in vitro toxicity. *Int J Pharm*, v. 514, p. 150 – 159, 2016.

PÉREZ-HERRERO, Edgar; FERNANDEZ-MEDARDE, Alberto. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of Chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018>

PETRILLI et al. Cetuximab Immunoliposomes enhance Delivery of 5-FU to Skin Squamous Carcinoma Cells. *Anticancer Agents Med Chem*, v.17, p. 301-308, 2017.

PETRILLI R. et al. Preparation of Immunoliposomes by Direct Coupling of Antibodies Based on a Thioether Bond. In: Recombinant Glycoprotein Production: Methods e Protocols. Methods in Molecular Biology, 2018b.

PETRILLI, R. *et al.* Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. *Journal of Controlled Release*, v. 283, p. 151–162, 2018a.

Resolução da Diretoria Colegiada – RDC no 166, de 24 de julho de 2017, v. 2017, 2017.

REZAIEMANESH, Alierza et al. Impacts of anti-EGFR monoclonal antibody in prostate cancer PC3 cells. *Human Antibodies*, v. 19, p. 63–70, 2010.

RUOZI, BÁRBARA et al. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 25, p. 81 – 89, 2005.

SABRA, RAYAN; BILLA, NASHIRU; ROBERTS, CLIVE J. Cetuximab-conjugated chitosan-pectinate (modified) composite nanoparticles for targeting colon câncer. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 572, 2019

SANTOS JÚNIOR, JOSÉ GERALDO DE ALENCAR et al. Intrinsic modifying-antibiotic activity of a liposomal structure against MRSA and other MDR bactéria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 31, 2021.

SANTOS, Elias da Silva et al. EGFR targeting for cancer therapy: Pharmacology and immunoconjugates with drugs and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 592, 2021

SAWTARIE, Nader; CAI, Yuhang; LAPITSKY, Yakov. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity.

SCHWARTZBERG, L. S.; NAVARI, R. M. Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Advances in therapy*, V. 35, p. 754–767, 2018.  
<https://doi.org/10.1007/s12325-018-0707-z>

SHAH, M. R.; IMRAN, M.; ULLAH, S. Liposomes for targeted drug delivery in cancer therapy. *Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis*. Elsevier, p. 219–238, 2017.

SHIAO, S. L.; CHU, G. C. Y.; CHUNG, L. W. K. Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment. *Cancer Letters* Elsevier, v. 380, p. 340 – 348, 2016.

SLOVIN, S.F. et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab plus Doxorubicin in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*, v.7, 2009.

SONG, Y. et al Y. Self-assembled micelles of novel amphiphilic copolymer cholesterol-coupled F68 containing cabazitaxel as a drug delivery system. *Int J Nanomedicine*, v. 9, p. 2307 – 2317, 2014.

STOCKERT, JUAN C. et al. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, v. 120, p. 159 – 167, 2018.

SUDHAKAR, B.; KRISHNA, M.C.; MURTHY, K.V.R. Factorial design studies of antiretroviral drug-loaded stealth liposomal injectable: PEGylation, lyophilization and pharmacokinetic studies. *Appl Nanosci*, v. 6, p. 43–60, 2016.

SUN, T. et al. Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014.

TAI, KEDONG et al .Effect of  $\beta$ -sitosterol on the curcumin-loaded liposomes: Vesicle characteristics, physicochemical stability, in vitro release and bioavailability. *Food Chemistry*, v. 293, p. 92 – 102, 2019.

TAKECHI-HARAYA, YUKI et al. Detection of material-derived differences in the stiffness of egg yolk phosphatidylcholine-containing liposomes using atomic force microscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 233, 2020.

TAXOTERE. Alemanha: Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 2020. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/taxotere>.

UNITED KINGDOM COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP) Assessment Report For Jevtana (cabazitaxel). European Medicines Agency, 2011. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/jevtana-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/jevtana-epar-public-assessment-report_en.pdf).

WAGNER, J. R., MOUNT, E. M.; GILES, H. F. Design of Experiments. Extrusion, p. 291–308, 2014.

WANG, D. et al. Clinical translation of immunoliposomes for cancer therapy: recent perspectives. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 15, p. 893 – 903, 2018.

WANG, Yuwei; GRAINGER, David W. Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory environments. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 151-152, p. 56 – 71, 2019.

XU, XIAOMING et al. Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. *Int J Pharm*, v. 434, p. 349- 359, 2012.

XU, XIAOMING; KHAN, MANSOOR A; BURGESS, DIANE J. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale. *Int J Pharm*, v. 423, p. 543 – 553, 2012.

YANG, TAO et al. Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome. *Journal of Controlled Release*, v. 120, p. 169-177, 2007.

YANG, ZIMENG et al. Improved antitumor activity and tolerability of cabazitaxel derived remote-loading liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.589, 2020.

YIN, Xiaoyi et al. A cabazitaxel liposome for increased solubility, enhanced antitumor effect and reduced systemic toxicity. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 14, p. 658 – 667, 2019.

YOUSEFI A. et al. Preparation and In Vitro Evaluation of a Pegylated Nano-Liposomal Formulation Containing Docetaxel. *Scientia Pharmaceutica*, v. 77, p. 453-464, 2009.

ZHANG Y. et al . DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J*, v.12, p. 263-271, 2010.

ZHUANG, Bo et al. Self-assembled Micelle Loading Cabazitaxel for therapy of Lung Cancer. 2016, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 499, p. 146 – 155, 2016.