



UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara



Avaliação do potencial de nanopartículas de sílica mesoporosas funcionalizadas com cetuximabe para veiculação de docetaxel no tratamento do câncer de próstata

Relatório final de pesquisa (Processo 2018/25377-3) apresentado à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo pós-doutorando Rafael Miguel Sábio.

Aluno: Rafael Miguel Sábio

Supervisor: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara, 2024

RESUMO

O câncer de próstata (CP) é uma das doenças não contagiosas que mais atinge a população masculina no mundo. O tratamento com o quimioterápico docetaxel (DTX), embora apresente eficácia clínica, está associado ao desenvolvimento de resistência em estágios mais avançados da doença, além do fármaco apresentar baixa solubilidade aquosa e problemas relacionados à sua farmacocinética. Nanopartículas de sílica mesoporosas (NSMs) têm atraído grande interesse por apresentar alta estabilidade química, grande área superficial e poros de diâmetros e volumes ajustáveis, possibilitando a incorporação de grande quantidade de fármacos, protegendo-os de processos de desativação, degradação e liberação prematura atuando como um excelente nanocarreador. Além disso, a disponibilidade de hidroxilas em sua superfície permite a conjugação de moléculas como o anticorpo monoclonal cetuximabe (CTX) o qual se liga ao receptor EGFR (*Enhanced Growth Factor Receptor*) superexpresso em muitos tumores de próstata, representando uma estratégia em potencial para o tratamento do câncer de próstata em combinação ao DTX. Diante ao exposto, este projeto de pesquisa objetivou o desenvolvimento de nanoplateformas inteligentes baseadas em nanopartículas de sílica mesoporosas funcionalizadas com CTX para veiculação de DTX no tratamento do CP, visando contornar problemas como baixa internalização, ausência de controle da liberação do antineoplásico na região de interesse, diversos efeitos colaterais ao paciente e baixa eficácia dos tratamentos atuais. Para avaliação desses parâmetros, a caracterização dos materiais e validação das metodologias foram realizadas assim como os ensaios *in vitro* utilizando modelos de linhagens celulares PC3 e DU145, com o intuito de comprovar a eficácia dos novos nanocarreadores propostos. Os resultados evidenciaram a citotoxicidade dos nanossistemas NSM@DTX-CTX frente a linhagem DU145, com IC₅₀ igual a 69,99 nM. Além disso, os valores calculados de internalização obtidos por citometria de fluxo para as NSM-FITC e NSM-FITC-CTX foram de $0,5 \pm 0,1$ % e $44,2 \pm 5,2$ %, respectivamente. Os resultados obtidos corroboram parte das análises de citotoxicidade realizadas além de destacar a importância do anticorpo CTX para promover rápida internalização nas células DU145 considerando 6 h de incubação. Portanto, as NSM@DTX-CTX compreendem nanoplateformas promissoras para continuação e otimização dos estudos *in vitro* visando a avaliação *in vivo* e, conseqüentemente, o tratamento do câncer de próstata.

Palavras-chave: Nanopartículas de sílica mesoporosas; docetaxel; cetuximabe; nanoplateformas inteligentes; câncer de próstata

1. ATIVIDADES CIENTÍFICAS REALIZADAS NO PERÍODO A QUE SE REFERE O PRESENTE RELATÓRIO

- Desenvolvimento das atividades laboratoriais referentes à parte metodológica do presente trabalho;
- Coorientação de alunos de mestrado (3), doutorado (1) e iniciação científica (1);
- Produção técnica e científica;
- Estágio BEPE-FAPESP.

1.1. Artigos Publicados:

1.1.1. SÁBIO, R. M.; MENEGUIN, A. B.; RIBEIRO, T. C.; SILVA, R. R.; CHORILLI, M. New Insights Towards Mesoporous Silica Nanoparticles as a Technological Platform for Chemotherapeutic Drugs Delivery. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, v. 564, p. 379-409, 2019. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.8).**

1.1.2. SÁBIO, R. M.; SANTAGNELI, S. H.; GRESSIER, M.; CAIUT, J. M. A.; PAZIN, W. M.; RIBEIRO, S. J. L.; MENU, M.-J. Near-infrared/visible-emitting nanosilica modified with silylated Ru(II) and Ln(III) complexes. NANOTECHNOLOGY, v. 31, p. 035602, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 3.5).**

1.1.3. SÁBIO, R. M.; SANTAGNELI, S. H.; GRESSIER, M.; CAIUT, J. M. A.; PAZIN, W. M.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; DA SILVA, R. R.; RIBEIRO, S. J. L.; MENU, M.-J. Luminescent nanohybrids based on silica and silylated Ru(II)-Yb(III) heterobinuclear complex: new tools for biological media analysis. NANOTECHNOLOGY, v. 31, p. 085709, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 3.5).**

1.1.4. SOUSA, R. B.; DAMETTO, A. C.; **SÁBIO, R. M.;** CARVALHO, R. A.; VIEIRA, E. G.; OLIVEIRA, A. F. A.; RIBEIRO, L. K.; BARUD, H. S.; SILVA-FILHO, E. C. Cerium-doped calcium phosphates precipitated on bacterial cellulose platform by mineralization. CERAMICS INTERNATIONAL, v. 46, p. 26985-26990, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.2).**

1.1.5. LARA-CERON, J. A.; JIMENEZ-PEREZ, V. M.; MOLINA-PAREDES, A. A.; OCHOA, M. E.; **SÁBIO, R. M.;** AMARAL, A. C.; SILVA, R. R.; RIBEIRO, S. J. L.; BARUD, H. S.; MUNOZ-FLORES, B. M. Ultrasound-assisted synthesis of organotin compounds and their application as luminescent dye in silk fibroin scaffolds. INORGANICA CHIMICA ACTA, p. 119490, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 2.8).**

1.1.6. CARVALHO, G. C.; **SÁBIO, R. M.**; CHORILLI, M. An Overview of Properties and Analytical Methods for Lycopene in Organic Nanocarriers. *CRITICAL REVIEWS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*, v. 50, p. 1-13, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.0).**

1.1.7. SANTOS, A. M.; MENEGUIN, A. B.; FONSECA-SANTOS, B.; DE SOUZA, M. P. C.; FERREIRA, L. M. B.; **SÁBIO, R. M.**; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. The role of stabilizers and mechanical processes on physico-chemical and anti-inflammatory properties of methotrexate nanosuspensions. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, v. 57, p. 101638, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.0).**

1.1.8. SANTOS, K.; REIS, L. R.; RODERO, C. F.; **SÁBIO, R. M.**; TAVARES JUNIOR, A. G.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Bioproperties, Nanostructured System and Analytical and Bioanalytical Methods for Determination of Rapamycin: A Review. *CRITICAL REVIEWS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*, p. 1-9, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.0).**

1.1.9. MENEGUIN, A. B.; BARUD, H. S.; **SÁBIO, R. M.**; DE SOUSA, P. Z.; MANIERI, K. F.; DE FREITAS, L. A. P.; PACHECO, G.; ALONSO, J. D.; CHORILLI, M. Spray-dried bacterial cellulose nanofibers: A new generation of pharmaceutical excipient intended for intestinal drug delivery. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, v. 249, p. 116838, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 11.2).**

1.1.10. CARVALHO, G. C.; **SÁBIO, R. M.**; RIBEIRO, T. C.; MONTEIRO, A. S; PEREIRA, D. V.; RIBEIRO, S. J. L.; CHORILLI, M. Highlights in Mesoporous Silica Nanoparticles as a Multifunctional Controlled Drug Delivery Nanoplatfrom for Infectious Diseases Treatment. *PHARMACEUTICAL RESEARCH*, v. 37, p. 191, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 3.7).**

1.1.11. DE SOUZA, M. P. C.; **SÁBIO, R. M.**; RIBEIRO, T. C.; DOS SANTOS, A. M.; MENEGUIN, A. B.; CHORILLI, M. Highlighting the impact of chitosan on the development of gastroretentive drug delivery systems. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, v. 159, p. 804-822, 2020. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 8.2). Citações Segundo Scopus: 38**

1.1.12. MENEGUIN, A. B.; SILVESTRE, A. L. P.; SPOSITO, L.; DE SOUZA, M. P. C.; **SÁBIO, R. M.**; ARAÚJO, V. H. S.; CURY, B. S. F.; CHORILLI, M. The role of polysaccharides from natural resources to design oral insulin micro- and nanoparticles intended for the treatment of Diabetes mellitus: A review. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, v. 256, p. 117504, 2021. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 11.2).**

1.1.13. SÁBIO, R. M.; MENEGUIN, A. B.; DOS SANTOS, A. M.; MONTEIRO, A. S.; CHORILLI, M. Exploiting mesoporous silica nanoparticles as versatile drug carriers for several routes of administration. *MICROPOROUS AND MESOPOROUS MATERIALS*, v. 311, p. 110774, 2021. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.2).**

1.1.14. FARACO, T. A.; YOSHIOKA, N. A.; **SÁBIO, R. M.;** BARUD, H.; MACIEL, I. O.; QUIRINO, W. G.; FRAGNEAUD, B.; AGUIAR, A. M.; RIBEIRO, S. J. L.; CREMONA, M.; LEGNANI, C. Monolayer of silica nanospheres assembled onto ITO-coated glass substrates by spin-coating. *NANOTECHNOLOGY*, v. 32, p. 205603, 2021. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 3.5).**

1.1.15. MENEGUIN, A. B.; SÁBIO, R. M.; CHAVES DE SOUZA, MAURÍCIO PALMEIRA; FERNANDES, R. P.; OLIVEIRA, A. G.; CHORILLI, M. Cellulose Nanofibers Improve the Performance of Retrograded Starch/Pectin Microparticles for Colon Specific Delivery of 5-ASA. *PHARMACEUTICS*, v. 13, p. 1515, 2021. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.4).**

1.1.16. DOS SANTOS, A. M.; CARVALHO, S. G.; MENEGUIN, A. B.; **SÁBIO, R. M.;** GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Oral delivery of micro/nanoparticulate systems based on natural polysaccharides for intestinal diseases therapy: Challenges, advances and future perspectives. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, v. 334, p. 353-366, 2021. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 10.8).**

1.1.17. CARVALHO, G. C.; DE OLIVEIRA, R. A. P.; ARAUJO, V. H. S.; **SÁBIO, R. M.;** CARVALHO, L. R.; BAUAB, T. M.; CORRÊA, I.; CHORILLI, M. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in Brazil: A systematic review. *MEDICAL MYCOLOGY*, v. 59, p. 946-957, 2021. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 2.9).**

1.1.18. CARVALHO, G. C.; **SÁBIO, R. M.;** SPÓSITO, L.; PINTO, T. J. A.; CHORILLI, M. An overview of the use of central venous catheters impregnated with drugs or with inorganic nanoparticles as a strategy in preventing infections. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, v. 615, p. 121518, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.8).**

1.1.19. DI FILIPPO, L. D.; DUARTE, J. L.; AZAMBUJA, J. H.; MANCUSO, R. I.; LUIZ, M. T.; ARAÚJO, V. H. S.; FIGUEIREDO, I. D.; BARRETTO-DE-SOUZA, L.; **SÁBIO, R. M.;** SASSO-CERRI, E.; BAVIERA, A. M.; CRESTANI, C. C.; SAAD, S. T. O.; CHORILLI, M. Glioblastoma multiforme targeted delivery of docetaxel using bevacizumab-modified nanostructured lipid carriers impair in vitro

cell growth and in vivo tumor progression. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, v. 618, p. 121682, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.8).**

1.1.20. LUIZ, M. T.; DUTRA, J. A. P.; RIBEIRO, T. C.; CARVALHO, G. C.; **SÁBIO, R. M.**; MARCHETTI, J. M.; CHORILLI, M. Folic acid-modified curcumin-loaded liposomes for breast cancer therapy. *COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS*, v. 645, p. 128935, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.2).**

1.1.21. LIMA, L. R.; CONTE, G. V.; BRANDÃO, L. R.; **SÁBIO, R. M.**; DE MENEZES, A. S.; RESENDE, F. A.; CAIUT, J. M. A.; RIBEIRO, S. J. L.; OTONI, C. G.; ALCÂNTARA, A. C. S.; BARUD, H. S. Fabrication of Noncytotoxic Functional Siloxane-Coated Bacterial Cellulose Nanocrystals. *ACS APPLIED POLYMER MATERIALS*, v. 4, p. 2306-2313, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.0).**

1.1.22. RICCIO, B.; NASCIMENTO, A.; MENEGUIN, A. B.; RODERO, C. F.; SANTOS, K.; **SÁBIO, R. M.**; ANNUNZIO, S.; FONTANA, C. R.; BARUD, H. S.; FERRARI, P.; CHORILLI, M. Solid Dispersions Incorporated into PVP Films for the Controlled Release of Trans-Resveratrol: Development, Physico-chemical and in vitro Characterizations and in vivo Cutaneous Anti-Inflammatory Evaluation. *PHARMACEUTICS*, v. 14, p. 1149, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.4).**

1.1.23. RIBEIRO, T. C.; **SÁBIO, R. M.**; CARVALHO, G. C.; FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. Exploiting Mesoporous Silica, Silver And Gold Nanoparticles For Neurodegenerative Diseases Treatment. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, v. 624, p. 121978, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.8).**

1.1.24. MARENA, G. D.; RAMOS, M. A. S.; CARVALHO, G. C.; LIMA, L. C.; NASCIMENTO, A. L. C. S.; **SÁBIO, R. M.**; RODERO, C. F.; SPÓSITO, L.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Development and characterization of an amphotericin B - loaded nanoemulsion applied to Candida auris biofilms control. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, v. 74, p. 103566, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.0).**

1.1.25. CARVALHO, G. C.; MARENA, G. D.; KARNOPP, J. C. F.; JORGE, J.; **SÁBIO, R. M.**; MARTINES, M. A. U.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Cetyltrimethylammonium bromide in the synthesis of mesoporous silica nanoparticles: General aspects and in vitro toxicity. *ADVANCES IN COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, v. 307, p. 102746, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 15.6).**

1.1.26. QUIJIA, C. R.; LUIZ, M. T.; FERNANDES, R. P.; **SÁBIO, R. M.**; FREM, R.; CHORILLI, M. In situ synthesis of piperine-loaded MIL-100 (Fe) in microwave for breast cancer treatment. JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY, v. 75, p. 103718, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.0).**

1.1.27. RIBEIRO, T. C.; **SÁBIO, R. M.**; LUIZ, M. T.; SOUZA, L. C.; FONSECA-SANTOS, B.; SILVA, L. C. C.; FANTINI, M. C. A.; PLANETA, C. S.; CHORILLI, M. Curcumin-loaded mesoporous silica nanoparticles dispersed in thermo-responsive hydrogel as potential Alzheimer disease therapy. PHARMACEUTICS, v. 14, p. 1976, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.4).**

1.1.28. CARVALHO, G. C.; MARENA, G. D.; LEONARDI, G. R.; **SÁBIO, R. M.**; CORRÊA, I.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Lycopene, Mesoporous Silica Nanoparticles and Their Association: A Possible Alternative against Vulvovaginal Candidiasis. MOLECULES, v. 27, p. 8558, 2022. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 4.6).**

1.1.29. QUIJIA, C. R.; NAVEGANTE, G.; **SÁBIO, R. M.**; VALENTE, V.; OCAÑA, A.; ALONSO-MORENO, C.; FREM, R. C. G.; CHORILLI, M. Macrophage Cell Membrane Coating on Piperine-Loaded MIL-100(Fe) Nanoparticles for Breast Cancer Treatment. JOURNAL OF FUNCTIONAL BIOMATERIALS, v. 14, p. 319, 2023. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 4.8).**

1.1.30. DOS REIS, L. R.; LUIZ, M. T.; **SÁBIO, R. M.**; MARENA, G. D.; DI FILIPPO, L. D.; DUARTE, J. L.; SOUZA FERNANDES, L. D.; ARAÚJO, V. H. S.; OLIVEIRA SILVA, V. A.; CHORILLI, M. Design of rapamycin and resveratrol coloaded liposomal formulation for breast cancer therapy. NANOMEDICINE, v. 01, p. 002, 2023. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.5).**

1.1.31. NICOLETI, L. R.; DI FILIPPO, L. D.; DUARTE, J. L.; LUIZ, M. T.; **SÁBIO, R. M.**; CHORILLI, M. Development, characterization and in vitro cytotoxicity of kaempferol-loaded nanostructured lipid carriers in glioblastoma multiforme cells. COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES, v. 226, p. 113309, 2023. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 5.8).**

1.1.32. MUNHOZ, L. L. S.; ALVES, M. T. O.; ALVES, B. C.; NASCIMENTO, M. G. F.; **SÁBIO, R. M.**; MANIERI, K. F.; BARUD, H. S.; ESQUISATTO, M. A. M.; ARO, A. A.; CASAGRANDE, L. R.; SILVEIRA, P. C. L.; SANTOS, G. M. T.; ANDRADE, T. A.; CAETANO, G. F. Bacterial cellulose membrane incorporated with silver nanoparticles for wound healing in animal model. BIOCHEMICAL

AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, v. 654, p. 47-54, 2023. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 3.1).**

1.1.33. OLIVEIRA, K. C. B. F.; FARIAS, E. A. D. O.; TEIXEIRA, P. R. S.; BRANDÃO, V. S.; **SÁBIO, R. M.**; DE ARAÚJO, A. R.; EATON, P.; BERTOLINO, L. C.; BEMQUERER, M. P.; BARUD, H. S.; LEITE, J. R. S. A; EIRAS, C. Development of a Nanostructured Film Containing Palygorskite and Dermaseptin 01 Peptide for Biotechnological Applications. CLAYS AND CLAY MINERALS, v. 71, p. 600-615, 2023. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 2.2).**

1.1.34. VITOR, L. C.; DI FILIPPO, L. D.; DUARTE, J. L.; BRITO, L. D.; LUIZ, M. T.; DUTRA, J. A. P.; **SÁBIO, R. M.**; HADDAD, F. F.; SCARIM, C. B.; COSTA, P. I.; CHORILLI, M. Characterization and in vitro cytotoxicity of piperine-loaded nanoemulsion in breast cancer cells. CHEMICAL PAPERS, 2023. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 2.2).**

1.1.35. **SÁBIO, R. M.**; CARVALHO, G. C.; LI, J.; CHORILLI, M.; SANTOS, H. A. Advanced porous materials for antimicrobial treatment. NANOSELECT, p. 1-20, 2023.

1.1.36. PRIMO, L. M. D. G.; ROQUE-BORDA, C. A.; CANALES, C. S. C.; CARUSO, I. P.; LOURENÇO, I. O.; COLTURATO, V. M. M.; **SÁBIO, R. M.**; DE MELO, F. A.; VICENTE, E. F.; CHORILLI, M.; BARUD, H. S.; BARBUGLI, P. A.; FRANZYK, H.; HANSEN, P. R.; PAVAN, F. R. Antimicrobial peptides grafted onto the surface of N-acetylcysteine-chitosan nanoparticles can revitalize drugs against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. CARBOHYDRATE POLYMERS, v. 323, p. 121449, 2024. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 11.2).**

1.1.37. DUARTE, J. L.; DI FILIPPO, L. D.; DE FARIA MOTA OLIVEIRA, A. E. M.; **SÁBIO, R. M.**; MARENA, G. D.; BAUAB, T. M.; DUQUE, C.; CORBEL, V.; CHORILLI, M. Development and characterization of potential larvicidal nanoemulsions against *Aedes aegypti*. BEILSTEIN JOURNAL OF NANOTECHNOLOGY, v. 15, p 104-114, 2024. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 3.1).**

1.1.38. CARVALHO, G. C.; MARENA, G. D.; NASCIMENTO, A. L. C. S.; CAMARGO, B. A. F.; **SÁBIO, R. M.**; LOURENCO, F. R.; SANTOS, H. A.; CHORILLI, M. Physicochemical characterization of a lycopene-loaded mesoporous silica nanoparticle formulation. NANOSELECT, v. 1, p. 1, 2024.

1.1.39. SPÓSITO, L.; FONSECA, D.; CARVALHO, S. G.; **SÁBIO, R. M.**; MARENA, G. D.; BAUAB, T. M.; MENEGUIN, A. B.; PARREIRA, P.; MARTINS, M. C. L.; CHORILLI, M. Engineering

resveratrol-loaded chitosan nanoparticles for potential use against *Helicobacter pylori* infection. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, v. 199, p. 114280, 2024. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 4.9).**

1.1.40. OZELIN, S. D.; ESPERANDIM, T. R.; DIAS, F. G. G.; PEREIRA, L. F.; GARCIA, C. B.; DE SOUZA, T. O.; MAGALHÃES, L. F.; BARUD, H. S.; **SÁBIO, R. M.**; TAVARES, D. C. Nanocomposite based on bacterial cellulose and silver nanoparticles improve wound healing without exhibiting toxic effect. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2024 **(Fator de Impacto, JCR 2022: 3.8).**

1.1.41. CANALES, C. S. C.; CAZORLA, J. I. M.; CAZORLA, R. M. M.; ROQUE-BORDA, C. A.; POLINÁRIO, G.; BANDA, R. A. F.; **SÁBIO, R. M.**; CHORILLI, M.; SANTOS, H. A.; PAVAN, F. R. Breaking barriers: The potential of nanosystems in antituberculosis therapy. BIOACTIVE MATERIALS, v. 39, p. 106-134, 2024. **(Fator de Impacto, JCR 2022: 18.9).**

1.2. PATENTES DEPOSITADAS

1.2.1. SEVEN INDÚSTRIA DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS LTDA. BARUD, H. S.; CARBINATTO, F. M.; MENEGUIN, A. B.; MARCONDES, G. A. S.; **SÁBIO, R. M.**; MANIERI, K. F.; et al. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROGÉIS BASEADOS EM BIOCELULOSE E ALGINATO PARA TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS E PRODUTOS OBTIDOS. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190218487, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 17/10/2019.

1.2.2. SEVEN INDÚSTRIA DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS LTDA. BARUD, H. S.; **SÁBIO, R. M.**; MANIERI, K. F.; MENEGUIN, A. B.; MARCONDES, G. A. S.; CARBINATTO, F. M.; et al. CURATIVOS ANTIMICROBIANOS DE CELULOSE BACTERIANA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÃO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS E QUEIMADURAS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E PRODUTOS OBTIDOS. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190275332, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/12/2019.

1.3. PROJETOS DE PESQUISA EM ANDAMENTO

1.3.1. Tipo de Auxílio: Chamada CNPq/MCTI Nº 10/2023 - Faixa A - Grupos Emergentes – Universal 2023 (colaborador).

Título do Projeto: Entrega Direcionada ao Cólon de 5-ASA e Probióticos: Uma Abordagem

Inovadora para o Tratamento da Doença Inflamatória Intestinal.

Agência Financiadora: CNPq

Número do Processo: 402105/2023-0

Vigência: 23/11/2023 a 22/11/2026

Total de Recursos: R\$ 82.500,00

1.4. RESUMOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1.4.1. BAVELONI, F. G.; MENEGUIN, A. B.; **SÁBIO, R. M.**; BARUD, H. S.; CHORILLI, M. Synthesis of silver nanoparticles and incorporation in liquid crystals for complex wound treatment. 22nd International Symposium on Microencapsulation, 2019, Bahia.

1.4.2. CARVALHO, G. C.; DE OLIVEIRA, R. A. P.; ARAUJO, V. H. S.; **SÁBIO, R. M.**; DE CARVALHO, L. R.; BAUAB, T. M.; CORRÊA, I.; CHORILLI, M. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in Brazil: a systematic review. 2021 XXI Congresso Farmacêutico de São Paulo, XIII Seminário Internacional de Ciências Farmacêuticas e Expofar.

1.4.3. MARENA, G.; RUIZ, A.; CORRÊA, G.; **SÁBIO, R.**; CHORILLI, M.; BAUAB, T. Co-encapsulation of Micafungin and Amphotericin B in nanoemulsion against *Candida auris* Infection. 33rd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen, Denmark, 2023.

1.5. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS, SIMPÓSIOS E OUTROS EVENTOS CIENTÍFICOS

1.5.1. NO BRASIL

1.5.1.1. Curso de Comunicação e Escrita Científica da American Chemical Society (ACS), 2021.

1.5.1.2. Curso teórico e demonstrativo de técnicas avançadas de caracterização de nanomateriais, 2021.

1.5.1.3. Apresentação de Poster / Painel no XXI Congresso Farmacêutico de São Paulo, XIII Seminário Internacional de Ciências Farmacêuticas e Expofar 2021, 2021.

1.5.2. NO EXTERIOR

1.5.2.1. Health Technology Research and Innovation Cluster (HTRIC) Annual Event on June 26, 2023, from 9:00 to 17:00, held in Martiniplaza, Leonard Springerlaan 2, Groningen, The Netherlands, 2023.

1.5.2.2. Biomedical Engineering Winter Symposium 2023 on December 12, 2023, from 8:30 to 21:30, held in De Coendersborg, Coendershaag 1, Helpman, Groningen, The Netherlands, 2023.

1.6. COMISSÕES EXAMINADORAS E JULGADORAS

1.6.1. TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

1.6.1.1. SÁBIO, R. M.; MENEGUIN, A. B.; SANTOS, A. M. Participação em banca de Jéssica Ferraz. Avaliação de uma pectina de alto grau de esterificação na retrogradação do amido e Desenvolvimento de filmes para liberação cólon-específica, 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

1.6.1.2. CHORILLI, M.; FILIPPO, L. D.; **SÁBIO, R. M.** Participação em banca de Daniela Pelizario Fiorelli. Avaliação do potencial de nanodispersões líquido-cristalinas mucoadesivas para a administração vaginal de curcumina no tratamento do câncer cervical, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

1.7. PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE COMISSÕES JULGADORAS

1.7.1. XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - FCF/Araraquara, 2021

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Áreas do conhecimento: Farmacotécnica e tecnologia farmacêutica

Participou na qualidade de Avaliador, do evento XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - FCF/Araraquara, avaliando nas Modalidade(s) Ciências da Saúde, Ciências Exatas e da Terra e Engenharias e Área Temática Ciências da Saúde - Farmácia, no período de 03-11-2021.

1.7.2. XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - FCF/Araraquara, 2020

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Áreas do conhecimento: Farmacotécnica e tecnologia farmacêutica

Participou do XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, realizado nos dias 20, 21 e 22 de outubro e 24 e 25 de novembro de 2020, na qualidade de Avaliador dos trabalhos apresentados.

1.8. ATIVIDADES FORMADORAS E DE ORIENTAÇÃO DE ALUNOS

1.8.1. INICIAÇÃO CIENTÍFICA (IC)

1.8.1.1. Aluno: Larissa dos Santos Pessoa.

Projeto: Avaliação do potencial do trans-resveratrol incorporado em nanopartículas de sílica mesoporosas no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas.

Ano de conclusão: 2021.

Bolsa: sem bolsa

1.8.2. CO-ORIENTAÇÃO DE MESTRADO

1.8.2.1. Aluno: Tais de Cassia Ribeiro.

Projeto: Avaliação do potencial de curcumina incorporada em nanopartículas de sílica mesoporosas dispersas em hidrogéis termo responsivos no tratamento da doença de Alzheimer.

Ano de conclusão: 2021.

Bolsa: FAPESP

1.8.2.2. Aluno: Christian Shleider Carnero Canales.

Projeto: Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosas conjugadas com R8 e carregadas com peptídeos antimicrobianos análogos da plectasina e a avaliação de seu efeito intramacrofágico infectados com *Mycobacterium tuberculosis*.

Ano de conclusão: 2024.

Bolsa: CAPES

1.8.3. CO-ORIENTAÇÃO DE DOUTORADO

1.8.3.1. Aluno: Gabriela Corrêa Carvalho.

Projeto: Avaliação do potencial do licopeno incorporado em nanopartículas de sílica mesoporosas dispersas em hidrogéis termorresponsivos no tratamento da candidíase vulvovaginal.

Ano de conclusão: Em andamento.

Bolsa: FAPESP

1.9. ESTÁGIO BEPE-FAPESP

Estágio de pós-doutorado realizado junto a University Medical Center Groningen (UMCG)/University of Groningen - Department of Biomaterials & Biomedical Technology, Groningen, The Netherlands, no período de 2023 a 2024.

Título do Trabalho: Evaluation of cetuximab-modified porous silicon nanoparticles as docetaxel carrier to prostate cancer treatment.

Supervisor: Prof. Dr. Hélder Almeida Santos.

Agência Financiadora: Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BEPE-FAPESP, processo: 2022/02661-3).

2. INTRODUÇÃO

2.1. Câncer de Próstata

O câncer é responsável pelo maior número de mortes no mundo constituindo a mais importante barreira contra o aumento da expectativa de vida populacional no século 21. [1] O grande crescimento da incidência e mortalidade provocada pelo câncer pode ser atribuído a um conjunto de fatores como o

envelhecimento e crescimento populacional e aos problemas associados ao desenvolvimento socioeconômico no mundo. Sung e colaboradores [1] e a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency of Reserch on Cancer*, IARC) [2] relatam que o câncer atinge aproximadamente 20 milhões de pessoas no mundo provocando em torno de 10 milhões de mortes em 2022.

Segundo a IARC, no Brasil são esperados mais de 627 mil novos casos de câncer em 2022 com uma mortalidade de aproximadamente 279 mil para ambos os sexos. Sem considerar o câncer de pele não melanoma, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), tanto o câncer de mama como o de próstata são os mais incidentes em mulheres e homens, respectivamente. Especificamente, o câncer de próstata (CP) corresponde a mais de 32 % de incidência atingindo aproximadamente 102 mil e 519 homens no Brasil em 2022 [1, 3, 4], de acordo com os dados apresentados pelo IARC na Figura 1.

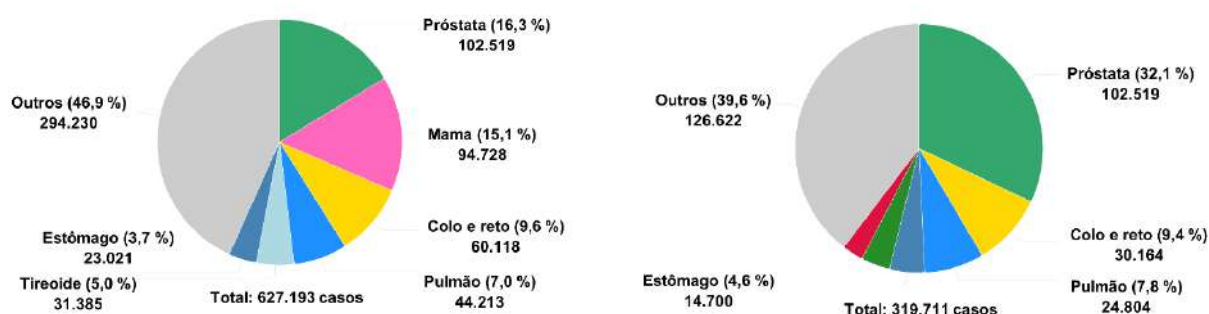


Figura 1. Número de novos casos em 2022 no Brasil para ambos os sexos (à esquerda) e para o sexo masculino (à direita) referentes à todas as idades. Adaptado de [3].

O CP acometerá 1 a cada 8 homens durante sua vida com maior incidência após os 65 anos. O CP inicia-se quando células da glândula prostática crescem descontroladamente, o que altera o tamanho da próstata e consequentemente diminui o calibre e intensidade do jato urinário. [5] Pesquisadores [6, 7] atribuem o aumento da idade, origem étnica e predisposição genética como três principais fatores de riscos endógenos para o aumento da incidência do câncer de próstata. Alguns estudos clínicos sugerem outros fatores de riscos (exógenos) com papel importante para o desenvolvimento da patologia tais como dieta, padrão de comportamento sexual, consumo de álcool, exposição à radiação solar (ultravioleta) e exposição ocupacional. O diagnóstico precoce da doença aumenta consideravelmente a expectativa de vida do indivíduo, sendo comumente realizado através do toque retal, o qual permite a investigação das possíveis alterações físicas na glândula prostática assim como o teste sanguíneo do antígeno prostático específico (PSA), o qual permite avaliar a agressividade e grau de complexidade do tumor. [7, 8] Considerando estes fatores alterados, recomenda-se que o paciente seja submetido à ultrassonografia transretal seguida de biópsia da próstata. [9] Outras formas de diagnóstico como a ressonância magnética (RM) multiparamétrica, tomografia de emissão de pósitrons (PET-Scan) e o uso de marcadores como PCA3 e 4Kscore também podem ser destacados atualmente. [5, 7, 8]

Desta forma, após diagnóstico do câncer de próstata, as estratégias de tratamento devem ser definidas de acordo com o estágio da doença, além do histórico, estilo e expectativa de vida do paciente.

2.2. Tratamentos do câncer de próstata

Existem distintas formas de tratamento do CP; no entanto, a escolha é baseada no método menos impactante e mais efetivo para o indivíduo, considerando os valores de PSA encontrados e a escala de Gleason. [7,8] A escala de Gleason considera o padrão glandular e a relação entre glândulas e o estroma prostático. Pode ser classificado em 5 graus histológicos, onde o grau 1 corresponde a lesão em estágio inicial enquanto o grau 5 corresponde a lesão mais agressiva. Considerando produtos de cirurgias e biópsias, a escala pode ser obtida pela soma de padrões, onde os valores mais altos como 8, 9 e 10 são considerados tumores de alto grau. [7,8]

Dentre as possíveis terapias para os tumores localizados considerados de risco baixo e intermediário, a prostatectomia (cirurgia) radical, radioterapia externa, braquiterapia (radioterapia interna) e a vigilância ativa são consideradas como opções de tratamento segundo a American Urological Association. [10] Para os pacientes com expectativa de vida superiores a 10 anos e que almejam um tratamento com cura imediata, tanto a prostatectomia radical quanto a radioterapia externa exibem taxas de cura superiores a 95 e 75 % em 10 anos, respectivamente. A braquiterapia apresenta taxas de cura de aproximadamente 65 % em 12 anos. [8] No entanto, todas estas vias de tratamento apresentam efeitos colaterais como incontinência urinária, disfunção erétil tardia, estenose da uretra, cistites, colites, retites, entre outros. Quando a doença já está em estágio avançado e metastático, métodos para controle local se tornam inviáveis, direcionando o tratamento ou para a remoção da próstata ou para a terapia de bloqueio hormonal, também conhecida como terapia de privação androgênica (TPA). A TPA é a hormonioterapia mais ativa e geralmente utilizada para o tratamento de tumores sólidos agressivos, com taxas de controle superiores a 90 % por um período médio de até 11 anos. [11, 12] Embora a doença possa ser controlada com TPA, os pacientes que possuem câncer metastático podem ver o mesmo evoluir independente do controle dos níveis de testosterona. A supressão da testosterona oferece um controle por curto período de tempo antes que a doença alcance o estágio de resistência à TPA. Mutações, outras alterações dos receptores androgênicos (RA) e a presença de outros co-ativadores podem ser responsáveis pela resistência à TPA. [13, 14] Além disso, o controle via TPA gera efeitos adversos como osteoporose, disfunção erétil, ginecomastia, anemia, entre outros. [15-17]

A partir da compreensão sobre os RA, é possível buscar outras alternativas a resistência ao tratamento utilizando TPA ou mesmo a associação de terapias, que promovam o aumento da eficácia no tratamento do câncer metastático de próstata. Neste sentido, o uso da quimioterapia se mostra efetivo comparado ou associado a TPA utilizando compostos como docetaxel, paclitaxel, acetato de abiraterona, mitoxantrona, enzalutamida, radio-223, Sipuleucel-T, cabazitaxel e outros. [14, 18]

2.3. Quimioterapia: Docetaxel

A quimioterapia compreende uma efetiva forma de tratamento do CP apresentando altas taxas de resposta, aumento na expectativa de vida quando detectado precocemente, redução da dor em pacientes além de outros sintomas atribuídos à doença. Especificamente, a quimioterapia no tratamento do câncer metastático de próstata tem ação em pacientes que apresentam resistência a TPA ou câncer de próstata hormônio refratário (CPHR). [19] Em particular, o uso do antineoplásico docetaxel é reconhecido como o primeiro tratamento eficaz e com sinais de evolução dos pacientes contra CPHR. [12, 14, 20]

Docetaxel (DTX) é um fármaco antitumoral lipofílico pertencente à família dos taxóides extraído da planta *Taxus baccata* com estrutura química exibida na Figura 2. O mecanismo de ação do DTX envolve citotoxicidade pela ligação de β -tubulina a qual provoca a inibição da proliferação celular e progressão mitótica devido à inibição da dinâmica dos microtúbulos resultando na morte da célula tumoral. [21] DTX foi aprovado em 2004 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e pela Agência Europeia de Medicina como tratamento para câncer de próstata avançado. [20] DTX tem sido aplicado como monoterapia ou associado a outras terapias em vários tipos de neoplasias tais como câncer de mama, pulmão, ovário, cabeça, pescoço, pâncreas, gástrico e próstata. [22-26] Apesar da utilização no tratamento de diversas neoplasias, a formulação comercial do DTX (Taxotere®) composta pelo tensoativo não iônico Tween® 80 (polissorbato 80, associado ao etanol) apresenta diversos efeitos colaterais relatados por pacientes devido à alta toxicidade e baixa biodisponibilidade tais como náuseas, vômitos, neutropenia, toxicidade musculoesquelética e reações de hipersensibilidade, o que restringe seu uso clínico. [21, 27, 28]

Portanto, com intuito de minimizar os efeitos adversos do DTX e aumentar sua biodisponibilidade, novas formulações nanotecnológicas têm sido desenvolvidas baseadas em lipídeos, polímeros, lipossomas e matrizes inorgânicas que conduzam o antineoplásico especificamente até as células ou tecidos tumorais de interesse. [29-32]

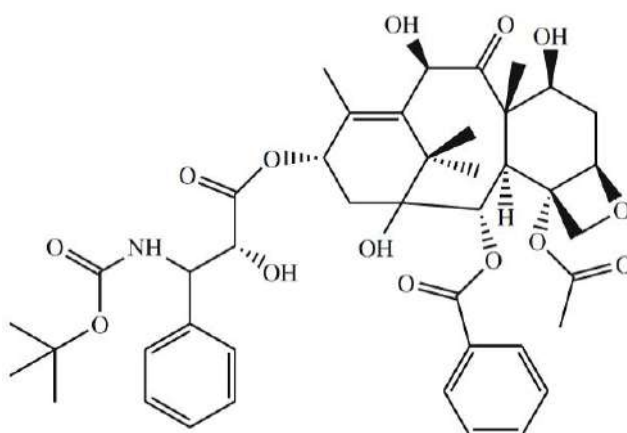


Figura 2. Estrutura química do Docetaxel (Taxotere®). [27]

2.4. Nanotecnologia no tratamento do câncer - nanopartículas de sílica mesoporosas

Atualmente, os tratamentos convencionais utilizados para o câncer de próstata são ineficazes, devido principalmente as características biológicas, hormonais e moleculares desta neoplasia possibilitando o processo de resistência e progressão tumoral causando diversos danos aos pacientes. Além disso, a formulação comercial do DTX (Taxotere®) apresenta limitações quanto ao seu uso clínico e, consequentemente, tem sua eficiência terapêutica comprometida. Diante do pressuposto, espera-se desenvolver nanossistemas de liberação de fármacos inteligentes baseados em nanopartículas de sílica mesoporosas (NSMs) funcionalizadas com cetuximabe (CTE) para a veiculação de DTX. Devido à sua alta estabilidade química, grande área superficial e poros de diâmetros e volumes ajustáveis, as NSMs podem incorporar grande quantidade de fármacos como o DTX, protegendo-o de processos de desativação, degradação e liberação prematura. Além disso, a disponibilidade de hidroxilas em sua superfície permite a conjugação de moléculas como o anticorpo monoclonal CTE, o qual promove especificidade e direcionamento ao nanocarreador para atingir a patologia de interesse. Desta forma, esta abordagem constitui uma metodologia inovadora no tratamento do câncer de próstata, com perspectiva de maior internalização do nanocarreador, controle da liberação na região da patologia de interesse conduzindo a maior eficácia do tratamento além de reduzir efeitos colaterais nos pacientes.

O uso da nanotecnologia no campo da medicina para diagnóstico, monitoramento e controle de doenças tem recebido grande atenção ultimamente. Nanomateriais têm sido aplicados como carreadores de moléculas e antitumorais em sistemas de liberação visando tratamento, marcação e imageamento de sistemas biológicos. [32-39] Particularmente, nanomateriais inorgânicos têm sido extremamente estudados devido às suas versáteis propriedades físico-químicas tais como ampla funcionalidade, disponibilidade de superfície assim como boa biocompatibilidade. [34, 40, 41] Entre os nanomateriais inorgânicos, NSMs apresentam características únicas como grande área superficial, alta densidade de hidroxilas disponíveis na superfície, tamanho e volume de poros ajustáveis, controle de forma e tamanho das partículas e superfície bifuncional com interior e exterior dos poros disponíveis para modificações, sendo interessantes para aplicações como nanossensores, nanomarcadores e nanoplataformas para liberação de fármacos. [40, 42-45] A incorporação de corantes, luminóforos e fármacos no interior dos mesoporos previne efeitos de desativação, liberação prematura e degradação dos compostos antes que alcancem seu determinado objetivo. [40, 42-45] Desta forma, estas matrizes podem ser utilizadas como veículos na liberação controlada de fármacos, sensores luminescentes, marcadores celulares, fotocatalizadores, em terapia fotodinâmica entre outras possibilidades. [34, 42-47] Em geral, NSMs podem ser fabricadas controlando diversos parâmetros de sínteses tais como concentração de reagentes, tipos de agentes direcionadores de estruturas (*template*), temperatura, fonte de sílica além do pH da mistura reacional. [43, 48, 49]

Considerando a ampla funcionalidade química das NSMs, boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e fácil eliminação em urina e fezes, diversos esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de novas NSMs multifuncionais. [48-53] Atualmente, estas nanoplataformas têm sido

consideradas muito promissoras em nanobiotecnologia devido ao seu potencial como veículos para liberação de fármacos no tratamento do câncer, de acordo com a Figura 3.

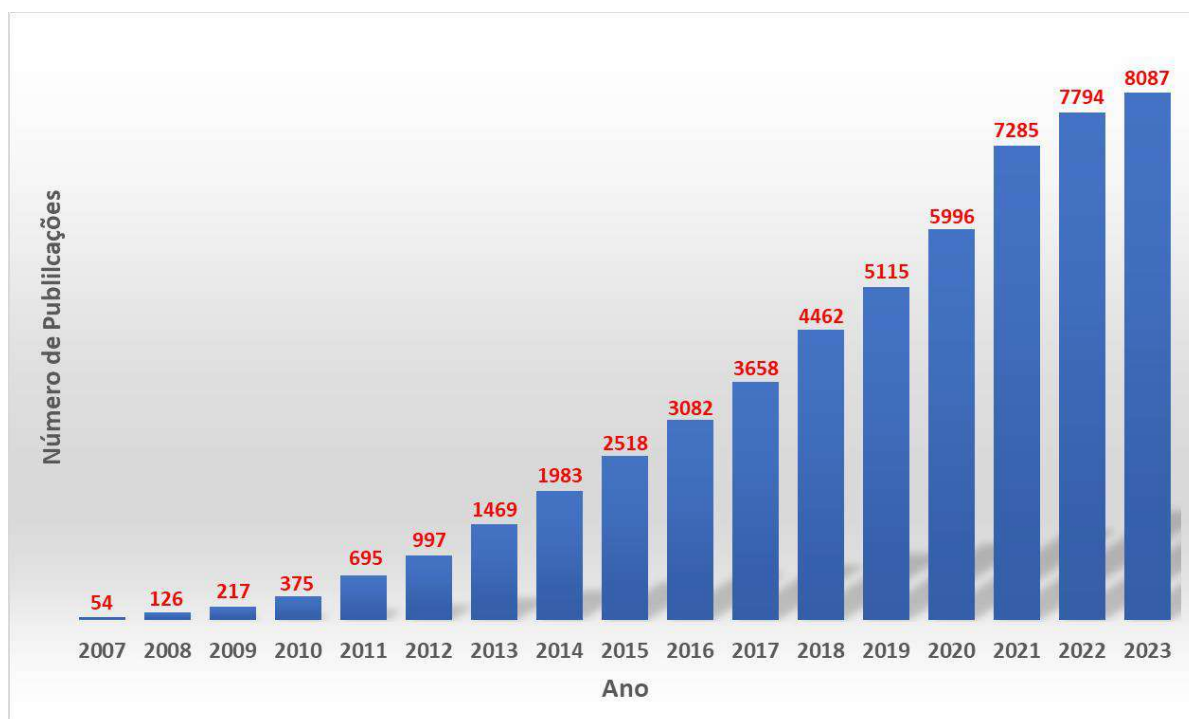


Figura 3. Número de publicações por ano na base de dados SCOPUS® (todos tipos de publicações como cartas, notas, artigos de conferência, capítulos de livros, livros, revisões e artigos), todas as áreas de conhecimento englobando as palavras-chave “mesoporous silica nanoparticles”, “drug delivery”, e “cancer therapy” em artigos, artigos de revisão, livros, capítulos de livros e artigos de conferência.

Geralmente, grande parte dos antineoplásicos aptos para uso apresentam efetiva ação contra células tumorais tais como docetaxel, paclitaxel, doxorubicina, captothecina, acetato de abiraterona, mitoxantrona, enzalutamida, entre outros. [14, 18, 52] No entanto, testes *in vivo* têm mostrado que a maioria destes fármacos devido à alta hidrofobicidade e, conseqüentemente baixa solubilidade em meio aquoso, apresentam administração intravenosa comprometida além de efeitos adversos. [53] Visando contornar estes problemas, os quimioterápicos podem ser incorporados no interior dos canais mesoporosos das NSMs substituindo o uso de solventes orgânicos muitas vezes tóxicos aos tecidos saudáveis. [53] Antineoplásicos hidrofóbicos, hidrofílicos e a mistura deles podem ser incorporados nas NSMs. Liu e colaboradores [54] descrevem a preparação de NSMs magnéticas como nanoveículos para antineoplásicos hidrofílicos (doxorubicina, DOX) e hidrofóbicos (rapamicina, RAPA). Os autores relatam que o uso destes sistemas multi-fármacos apresentou alta internalização em células tumorais A549 além de maior eficácia na morte celular quando comparado com a administração dos antineoplásicos livres. Entretanto, para o tratamento das neoplasias necessita-se de carreadores capazes de alcançar de forma específica um tecido tumoral, diminuindo a dose administrada e, conseqüentemente, aumentando a dose efetiva na região do tumor, minimizando danos às células normais. [33-36] Desta forma, o aumento da seletividade e permeabilidade

em células tumorais a partir de carreadores baseados em NSMs podem ser obtidos com a funcionalização de sua superfície (interior e exterior dos mesoporos ou ambos) com ligantes específicos direcionadores tais como anticorpos, proteínas, peptídeos, polissacarídeos, aptâmeros e pequenas moléculas [43, 57, 58], de acordo com a representação na Figura 4.

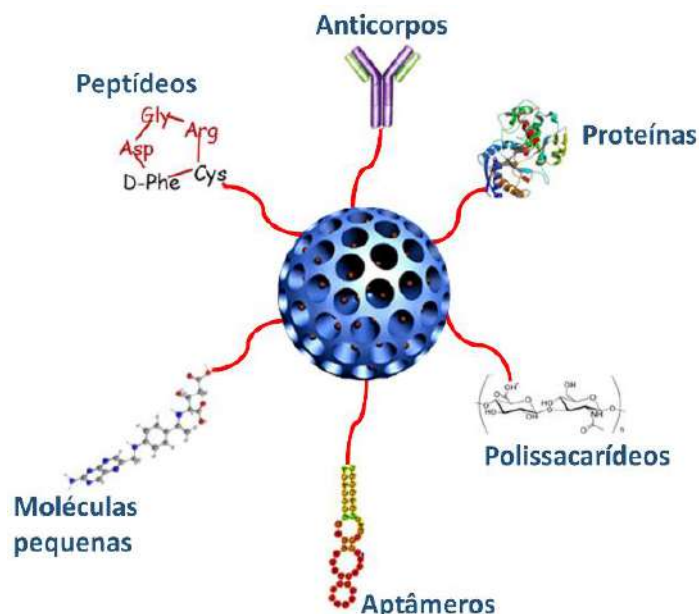


Figura 4. Representação esquemática das NSMs multifuncionais contendo os fármacos antitumorais no interior dos poros e a maioria dos ligantes específicos direcionadores como anticorpos, proteínas, peptídeos, polissacarídeos, aptâmeros, pequenas moléculas. Adaptado de [57].

2.5. Anticorpo monoclonal – cetuximabe

Uma das estratégias para contornar os efeitos colaterais causados por fármacos antitumorais em nanocarreadores consiste no uso de anticorpos monoclonais que promovam especificidade ao nanocarreador através da ligação com antígenos seletivamente expressos ou superexpressos na superfície das células tumorais. [59] Em particular, cetuximabe (CTX, Erbitux®) é um anticorpo monoclonal quimérico do tipo IgG1 aprovado pelo FDA em 2004 para o tratamento de tumores, especificamente para pacientes com câncer em estado avançado ou metastático. O mecanismo de ação do CTE compreende a ligação seletiva com alta afinidade aos domínios extracelulares do receptor EGF (*Epidermal Growth Factor receptor*, EGFR) resultando na inibição da proliferação celular, angiogênese, metástase e consequentemente morte celular. O receptor GRF é um polipeptídeo do tipo tirosina quinase crucial na sinalização para proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Até 100000 receptores deste tipo são expressos em células normais, enquanto células tumorais expressam até 2000000 de receptores por célula. O EGFR é superexpresso em vários tipos de neoplasias, em particular, no câncer de próstata resistente a castração (*castration-resistant prostate cancers*, mCRPC), que corresponde a uma faixa de 40-80 % dos tumores, devido a reincidência ou metástase. [60, 61] Neste sentido, o uso do CTX é essencial para o

controle da proliferação de células tumorais e, associado à quimioterapia, pode apresentar resultados ainda mais promissores. O aumento significativo na sobrevida dos pacientes com cânceres metastáticos colorretal e pulmão de células não pequenas tem sido atribuído ao uso de CTX. [62, 63] Canthomas e colaboradores [64] avaliaram a associação de CTX e DTX no tratamento de câncer de próstata resistente à cirurgia. Os autores relataram que em pacientes com superexpressão de EGFR, sinais de eficácia podem ser observados com a presença do CTX, embora estudos ainda precisem ser realizados para melhor entendimento dos mecanismos. [31, 65, 66]

2.6. Nanopartículas de sílica mesoporosas conjugadas com cetuximabe

A ação do anticorpo monoclonal CTX no controle do crescimento tumoral pode ser evidenciada principalmente combinada a outras formas de terapias. Neste contexto, aliar o CTX com nanocarreadores baseados em NSMs favorece a obtenção de nanoplateformas multifuncionais inteligentes, as quais podem apresentar alta especificidade, internalização e liberação efetiva em células tumorais. Cho e colaboradores [67] prepararam NSMs magneto-fluorescentes conjugadas com cetuximabe (MFSN-CTX) para marcação seletiva e imageamento de células tumorais do colo. Os autores relataram, a partir de estudos *in vivo*, a especificidade da nanoplateforma devido à expressão de EGFR nas membranas das células tumorais. O imageamento no local específico via ressonância magnética (MRI) foi observado demonstrando o potencial deste nanossistema para marcação e detecção de células tumorais que expressam EGFR. Er e colaboradores [68] descreveram o uso de CTX conjugado à nanoplateforma baseada em NSMs impregnadas com ftalocianinas de zinco (ZnPcOBP-NSMs) no tratamento de células tumorais pancreáticas via terapia fotodinâmica (*photodynamic therapy*, PDT). As ftalocianinas são compostos hidrofóbicos e portanto sua aplicação direta em meio biológico se torna ineficaz. Desta forma, as ftalocianinas foram incorporadas nos mesoporos das NSMs para posterior aplicação. Estudos *in vitro* mostraram que quando incorporadas nos mesoporos as ftalocianinas de zinco apresentaram maior eficácia fotodinâmica, a qual foi potencializada com a conjugação de CTX nas nanoplateformas. Além disso, foi observada uma dependência entre a fotoaniquilação e os níveis de expressão de EGFR nas células tumorais. Assim, este novo nanoveículo multifuncional promove a liberação de ftalocianinas de zinco e posterior PDT quando expostos a luz com alta especificidade as células tumorais pancreáticas promovidas pela presença do CTX.

Em outro trabalho, Wang e colaboradores [69] desenvolveram um eficiente tratamento para câncer de pulmão mutante baseados em nanocarreadores inteligentes capazes de serem específicos à expressão de EGFR, favorecerem a endocitose e promoverem liberação de antineoplásicos estimulada pela presença de glutathione (*glutathione*, GSH) no interior das células tumorais pulmonares. Estes nanocarreadores foram obtidos a partir das NSMs impregnadas com gefitinibe (GEF) e doxorubicina (DOX) recobertos com CTX (DOX ou GEF@NSMs-CTE). Estudos *in vitro* e *in vivo* exibiram alta afinidade, endocitose facilitada e melhor eficácia inibitória usando GEF@NSMs-CTX no tratamento de células PC9 resistentes à GEF

comparados as células Beas2B saudáveis. Todas estas nanoplateformas multifuncionais abordadas apresentaram resultados promissores em relação a tratamentos convencionais como o uso direto de monoterapias como CTX e quimioterápicos.

Neste contexto, este projeto objetivou o desenvolvimento de nanoplateformas inteligentes baseadas em NSMs aptas para incorporação do antineoplásico DTX com posterior modificação com o anticorpo monoclonal CTX. Além de poder atuar como bloqueador dos mesoporos impedindo a liberação prematura do fármaco antitumoral, o CTX pode promover a internalização das nanoplateformas em linhagem de câncer de próstata PC3 e DU145, que superexpressam ou não EGFR, respectivamente, potencializando a liberação de DTX à célula tumoral alvo. Esta abordagem se configura como método em potencial e ainda não explorado para o tratamento do câncer de próstata.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver nanocarreadores inteligentes baseados em nanopartículas de sílica mesoporosas funcionalizadas com cetuximabe para veiculação de docetaxel no tratamento do câncer de próstata.

3.2. Objetivos específicos

- Validar metodologia analítica para quantificação do DTX por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Sintetizar nanopartículas de sílica mesoporosas (NSM) obtidas via duas metodologias
- Funcionalizar as NSMs com MPTMS (NSM-S);
- Modificar o marcador isotiocianato de fluoresceína (FITC) com o alcoxisilano 3-aminopropil trimetoxissilano (APTES)
- Modificar as NSMs com o marcador FITC-APTES (NSM-FITC);
- Impregnar as NSM e NSM-S e com DTX (NSM@DTX e NSM-S@DTX);
- Derivatizar o Anticorpo CTX via reagente de Traut (CTE-S);
- Funcionalizar o CTX-S nas NSM-S@DTX e obter nanossistemas NSM1@DTX-CTX e NSM2@DTX-CTX;
- Caracterizar físico-quimicamente os nanossistemas;
- Avaliar a disponibilidade e quantificar os grupos SHs presentes no CTX-S e NSM1-FITC-S;
- Avaliar a citotoxicidade em linhagens de câncer de próstata DU145 e PC3;
- Estudar a internalização celular de NSM-FITC e NSM-FITC-CTX em linhagens DU145.

4. MATERIAL & MÉTODOS

4.1. Validação de método analítico para quantificação do docetaxel (DTX) por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a quantificação do DTX em formulações, foi validado método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com fase móvel composta por acetonitrila:água ultrapura, 65:35 (v/v), sob o fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm) com injeção de 10 μL a 45 °C e comprimento de onda de 230 nm. [70] Para a validação do método foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), seguindo as especificações da ANVISA (2017) e recomendações do Harmonised Tripartite Guideline (ICH). [71] O equipamento utilizado foi o HPLC AGILENT modelo 1220 Infinity LC, com detector UV-Visível. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 1.

3.

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas para validação da metodologia analítica.

Parâmetros	
Fase estacionária	Coluna HPLC 250X4,6 mm; 5 μm ZORBAX C18
Fase móvel	Acetonitrila:Água ultrapura (65:35)
Fluxo	$0,8 \text{ mL min}^{-1}$
λ de detecção	230 nm
Temperatura do forno	45 °C
Volume de injeção	10 μL
Tempo de corrida	8 min

As soluções-teste foram preparadas a partir de diluições de uma solução estoque do fármaco DTX, em acetonitrila grau HPLC, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram filtradas em filtro PTFE 0,45 μm antes do início das análises.

4.1.2. Conformidade do sistema cromatográfico

Para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados são aptos a fornecer resultados aceitáveis e confiáveis, realizou-se a análise de cinco injeções da solução de DTX ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em fase móvel, a partir da solução estoque. O espectro de absorção do fármaco bem como o comprimento de onda de máxima absorção foi verificado e, a partir dos picos cromatográficos de cada injeção, avaliou-se o desvio padrão relativo percentual (DPR%) das áreas, dos tempos de retenção (tR), dos números de pratos teóricos (N), do fator de cauda (FC) e da assimetria do pico, fornecidos pelo software do equipamento utilizado.

4.1.3. Especificidade/Seletividade

Neste ensaio avaliou-se a interferência da matriz de sílica, no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco. A especificidade/seletividade foi determinada verificando-se o resultado da injeção das nanopartículas em suspensão e do filtrado das nanopartículas sem fármaco. Todas as análises foram realizadas em triplicata com solução do fármaco e dos polímeros na concentração $25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.1.4. Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas analíticas do DTX, a partir da solução estoque. Foram preparadas 8 diluições com concentrações variando de 1 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1; 5; 10; 20; 25; 30; 35 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). A linearidade foi avaliada a partir da média dos valores das áreas encontradas e a equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

4.1.5. Precisão

A repetibilidade ou precisão intradia foi realizada a partir da injeção de três diluições da solução estoque de DTX, nas concentrações 1, 10 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ representantes, respectivamente, das concentrações baixa, média e alta, para análise na região do UV. As injeções foram realizadas no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do D.P.R.% entre as determinações foi analisado. Para a precisão intermediária, realizou-se a análise das diluições da solução estoque de DTX em dois dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores de D.P.R.% calculados.

4.1.6. Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir da solução estoque de DTX, diluída em fase móvel para as concentrações 1, 10 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (baixa, média e alta, respectivamente). Realizou-se cinco injeções de cada concentração e a exatidão foi calculada por meio da Equação 1.

$$\text{Exatidão (\%)} = \left(\frac{C}{C_0} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Em que: C é a concentração média determinada experimentalmente e C_0 é a concentração teórica.

4.1.7. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados a partir de três curvas analíticas construídas e calculados utilizando as Equações 2 e 3, respectivamente:

$$LD = \frac{3 \times D_{PA}}{IC} \quad \text{Eq. 2}$$

$$LQ = \frac{10 \times D_{PA}}{IC} \quad \text{Eq. 3}$$

Em que: D_{PA} é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da curva de calibração.

4.2. Preparação de nanopartículas de sílica mesoporosas (NSM1 e NSM2)

Dois tipos de nanopartículas de sílica mesoporosas foram preparadas, as NSM1 que apresentam poros distribuídos aleatoriamente pela estrutura e as NSM2, que apresentam poros organizados hexagonalmente pela estrutura. Os dois tipos de NSMs foram desenvolvidos com intuito de comparar se a ação da mesoporosidade e a distinta concentração de silanois livres na estrutura irão influenciar nos ensaios *in vitro*.

4.2.1. Preparação de nanopartículas de sílica mesoporosas (NSM1) obtidas via microemulsão direta

Nanopartículas esféricas de sílica mesoporosas (NSM1) com diâmetro de poros e também de partícula ajustáveis em escala nanométrica foram preparadas usando a metodologia de microemulsão direta (water/oil) de acordo com o procedimento adaptado da literatura. [72-75] As NSMs foram sintetizadas utilizando TEOS (tetraetilortosilicato, 99%, Aldrich) como fonte de sílica; L-lisina (98%, Aldrich) como catalizador; monômero estireno como agente formador de poros (template); CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio, 98%, Aldrich) também como template e surfactante; e o dihidrocloreto de 2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) (AIBA, 97%, Aldrich) como iniciador da polimerização do estireno. A L-lisina foi usada como catalisador responsável pelo controle da rede de sílica em escala manométrica. A Figura 5 apresenta a rota sintética das NSM1.

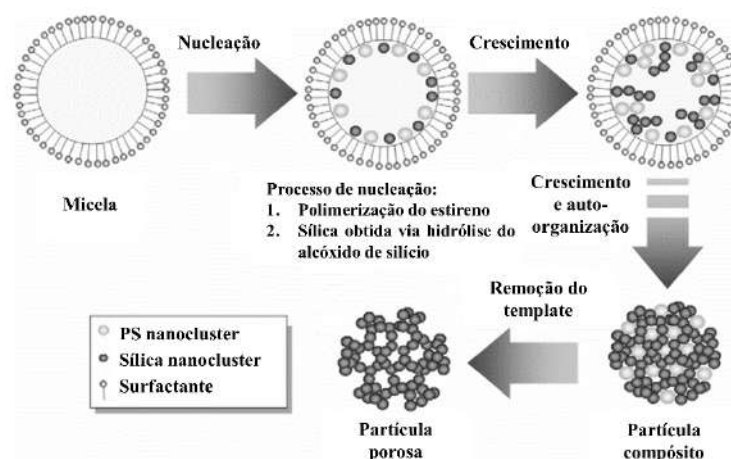


Figura 5. Representação da rota sintética das nanopartículas de sílica mesoporosas (NSM1). Adaptado de [72].

A síntese foi realizada a partir da adição de 0,606 g de CTAB em 180 mL de água deionizada permanecendo sob agitação magnética à 60 °C em balão volumétrico de 250 mL por 30 min sob atmosfera de N₂, até completa homogeneização da solução. Em seguida, foram adicionados 55,8 mL de octano, seguido da adição de 105 µL de estireno pré lavado com NaOH 2,5 M para retirar o estabilizante e iniciar a polimerização. Na sequência, foram adicionados 0,1381 g de L-Lisina e 6,42 mL de TEOS lentamente com posterior adição de 0,2017 g de AIBA foram adicionados ao meio reacional. A reação foi mantida sob agitação constante e magnética por 3 h em atmosfera de N₂ à 60 °C. Ao término da síntese, a suspensão obtida foi vertida em funil de decantação, ficando em repouso até ocorrer a separação de fases. Em seguida, a fração azul clara correspondente às NSM foram separadas e centrifugadas a 15.000 rpm por 15 min. As NSMs foram lavadas 5 vezes com etanol e água para remoção das impurezas e resíduos dos reagentes que não reagiram. Para remoção dos surfactantes/agentes formadores de poros, utilizou-se metodologia adaptada de Lugare et al. [76], que consistiu em dispersas as NSM1 em 60 mL de metanol, 1,5 mL de ácido clorídrico concentrado (37%) e 15 mL de clorofórmio, sob agitação magnética e refluxo à 58 °C por 6 h. Ao final, a suspensão foi centrifugada a 15000 rpm por 10 min, seguida de lavagens com etanol e água (2 vezes cada), posteriormente secas em estufa à 60 °C por 12 h.

4.2.2. Preparação de nanopartículas de sílica mesoporosas (NSM2) com poros organizados

Com a finalidade de também avaliar a hidroxilação do nanocarreador assim como a disposição de poros, neste caso, sem comunicação entre eles e distribuídos de forma organizada, foram preparadas NSM2 via precipitação de acordo com adaptação da metodologia descrita por Cheng et al. [77] Primeiramente, 250 mg de CTAB foram solubilizados em 120 mL de água ultrapura com adição de 833,4 µL de NaOH (2 M) em balão de fundo redondo de 250 mL, sob agitação vigorosa e constante à 80 °C por 30 min, seguida da adição lenta de 1,25 mL de TEOS. O meio reacional foi mantido à 80 °C por mais 2 h para a obtenção das NSM2. A suspensão foi centrifugada à 15000 rpm por 10 min e secas a temperatura ambiente. Para remoção do surfactante, as NSM2 foram dispersas em 100 mL de etanol contendo 2 g de nitrato de amônio (NH₄NO₃) sob refluxo à 75 °C por 1 h. As NSM2 foram centrifugadas e lavadas 2 vezes com etanol e 1 vez com água. O procedimento de refluxo foi repetido novamente, seguido da centrifugação, lavagem e secagem das NSM2 à 60 °C em estufa.

4.3. Modificação do FITC com APTES (FITC-APTES)

A modificação do FITC foi conduzida de acordo com metodologia adaptada de Wang et al. [69]. Primeiramente, 6,1 µL de APTES foram adicionados em 1 mL de etanol anidro em balão de 100 mL sob agitação magnética e atmosfera de N₂ à temperatura ambiente. Em seguida, 11,11 mg de FITC foram adicionados sob agitação magnética, ao abrigo de luz, atmosfera de N₂ e temperatura ambiente por 12 h.

4.4. Modificação das NSM com FITC-APTES (NSM-FITC)

A rota sintética das NSM1 e NSM2 (descritas nos itens 4.2.1. e 4.2.2.) foi adaptada para a adição do marcador modificado com o grupo alcóxissilano (FITC-APTES). A metodologia de síntese das NSM-FITC compreende a hidrólise e condensação do TEOS e FITC-APTES simultaneamente, adaptado de metodologia previamente descrita. [69, 77] Os nanossistemas marcados com FITC foram preparados com a finalidade de realizar ensaios de citometria de fluxo.

4.5. Funcionalização das NSM1 e NSM2 com 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTMS)

A modificação das NSMs foi primeiramente avaliada de acordo com metodologias adaptadas de [78-79]. Quinhentos mg de NSM1 e NSM2 foram deixadas sob vácuo para posterior adição à 50 mL de tolueno anidro, seguidos da adição de 0,5 mL de 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTMS) sob atmosfera de N₂, refluxo a 80 °C sob agitação por 24 h. As NSM1 e NSM2 modificadas (NSM1-S e NSM2-S) foram separadas por centrifugação a 15.000 rpm por 10 min e posteriormente lavadas com tolueno, etanol e água destilada. Na sequência, as NSM-S e NSM2-S foram secas em forno à 65 °C por 12 h.

4.6. Impregnação dos nanossistemas (NSM e NSM-S) com docetaxel (DTX)

Primeiramente, as NSM e NSM-S foram mantidas sob vácuo por no mínimo 4 h para evitar a presença de moléculas de água na superfície da matriz que impediria uma melhor incorporação do fármaco. Na sequência, DTX (30 mg) foi solubilizado em 12 mL de acetonitrila com posterior adição de 30 mg seja das NSMs ou NSMs-S (1:1, m/m), mantidas sob agitação orbital à temperatura ambiente por 24 h. As suspensões foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 min. Desta vez, o sobrenadante foi separado para quantificação de DTX por CLAE enquanto os nanossistemas contendo o DTX (NSMs@DTX e NSMs-S@DTX) foram secos em estufa à 40 °C por 12 h.

4.7. Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) e capacidade de carga (CC%) de DTX nos nanossistemas

Para análise da EE e CC, os nanossistemas em pós foram dispersos em acetonitrila e submetidos a banho de ultrassom por 2 h. Posterior agitação orbital foi realizada com o intuito de extrair todo fármaco presente nos nanossistemas. A suspensão foi centrifugada a 15000 rpm por 15 min e o sobrenadante (fração orgânica) foi recuperado. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi diluído para 5 mL de fase móvel acetonitrila:água ultrapura (65:35, v/v), e analisado por CLAE. A EE do fármaco e a CC dos nanossistemas (em porcentagem) foram calculados de acordo às equações 4 e 5, respectivamente:

$$EE(\%) = \left(\frac{\text{massa de DTX adicionado } (\mu\text{g}) - \text{massa de DTX extraído da sílica } (\mu\text{g})}{\text{massa de DTX adicionado } (\mu\text{g})} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

$$CC(\%) = \left(\frac{\text{massa de DTX adicionado } (\mu g) - \text{massa de DTX extraído da sílica } (\mu g)}{\text{massa total do nanossistema } (\mu g)} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

4.8. Derivatização do anticorpo cetuximabe (CTX) via reagente de Traut

Apesar de Wang et al. [69] descreverem o simples acoplamento do anticorpo CTX com as NSMs funcionalizadas com MPTMS (NSMs-S), o protocolo dos autores só poderia ser executado de duas formas, pois o anticorpo CTX não possui grupo tióis livres (SHs) em sua estrutura íntegra, portanto, ou seria necessário fragmentar o CTX, quebrando pontes dissulfeto para obtenção de SHs para modificação, ou, modificar o CTX íntegro via reação com reagente de Traut, como descrito por nós recentemente [80]. Desta forma, escolhemos manter o CTX íntegro e modificá-lo via reagente de Traut, de acordo com protocolo adaptado de [80]. Primeiramente, em eppendorf de 2 mL, adicionou-se 200 µL de CTX (5mg mL⁻¹) a 800 µL de tampão PBS-EDTA 5mM, pH 8. Na sequência, adicionou-se 20 µL de solução EDTA 50mM e 16 µL NaOH 0,1M à solução do anticorpo. Em seguida, adicionou-se 18,8 µL de uma solução de de Traut (2 mg mL⁻¹), deixando sob agitação em vortex por 3 min. Após isso, a solução foi incubada por 1 h a 37 °C em banho termostatzado. Para separar o anticorpo tiolado (CTX-S), a solução foi eluída com tampão PBS, pH 7,4 em coluna PD10, coletando 16 frações de 1mL para análise. As frações correspondentes ao CTX-S (frações 4 e 5) foram combinadas para posterior determinação de concentração via ensaio com ácido bicinonínico (conhecido com ensaio BCA).

4.8.1. Quantificação do CTX-S por ensaio BCA

Primeiramente, o reagente de trabalho usado para quantificação do anticorpo tiolado consiste em “50 partes do reagente A (tampão Carbonato com BCA a pH 11) e 1 parte do reagente B (Sulfato de cobre (CuSO₄))” (50:1), sendo que a mistura de ambos produz uma solução verde (cor de sal de cobre). Assim, 200 µL da solução preparada foi adicionada em cada poço da placa e depois adicionado 25 µL de cada fração, homogeneizado com pipeta e sequencialmente incubados em estufa à 37 °C por 30 min. Antes de incubar a amostra, foi preparada a curva padrão de BSA de acordo com as diluições descritas na tabela 1. De forma similar as amostras, 25 µL do padrão BSA foram adicionados aos 200 µL do reagente de trabalho, homogeneizados e incubados junto as amostras em estufa à 37 °C por 30 min. A reação para quantificação começa instantaneamente:

- **1ª etapa de reação:** o anticorpo reduz o Cu²⁺ em meio alcalino (pH 11) para Cu¹⁺
- **2ª etapa da reação:** Após isso, duas moléculas de BCA complexam o Cu¹⁺, mudando a cor de verde para azul com comprimento de onda máximo em 562 nm. Portanto, a quantidade de Cu¹⁺ convertido, é proporcional a quantidade de anticorpo presente na amostra.

Logo após esfriamento, as amostras (e padrões) foram lidos em leitor de microplacas com comprimento de onda fixo em 562 nm, para detecção da absorbância das amostras e posterior cálculo das concentrações de CTX-S.

Tabela 2. Preparação dos padrões de BSA diluídos.

Esquema de diluição dos padrões para o procedimento de leitura em microplacas (faixa de trabalho 20-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)			
Vial	Volume do diluente (μL)	Volume da fonte de BSA (μL)	Concentração final de BSA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
A	0	300 da solução estoque	2000
B	125	375 da solução estoque	1500
C	325	325 da solução estoque	1000
D	175	175 da diluição do Vial B	750
E	325	325 da diluição do Vial C	500
F	325	325 da diluição do Vial E	250
G	325	325 da diluição do Vial F	125
H	400	100 da diluição do Vial G	25
I	400	0	0 (branco)

4.9. Preparo das NSMs@DTX-CTX via reação com H_2O_2

Após obtenção com sucesso das NSMs modificadas com MPTMS apresentando grupo SH disponível assim como a modificação do CTX para apresentar o grupo SH, foi proposta a reação de acoplamento de tióis para a formação de pontes dissulfetos (a partir destes dois componentes) a partir do uso do agente oxidante peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e NaI como catalizador reacional, metodologia adaptada de Kirihara et al. [81]. Primeiramente, preparou o tampão HEPES (2mM em H_2O , pH 7,0, contendo 3M de NaCl) e a solução de NaI (0,03 mg mL^{-1}). Em seguida, de acordo com adaptação da metodologia proposta por Wang et al. [69], pesou-se 10 mg de NSM1-S@DTX e NSM2-S@DTX, as quais adicionou-se 1 mL do tampão HEPES (20 mM, pH 7,0, contendo 3M de NaCl), seguidos da adição de 850 μL de CTX-S (753,76 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 50 μL de NaI (0,03 mg mL^{-1}) e, por último, 110 μL de H_2O_2 (0,3 %), em eppendorfs de 2 mL, sob agitação orbital por 2 h. Após o final da reação, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, e lavadas ao menos seis vezes com tampão HEPES (20 mM, pH 7,0, contendo 3M de NaCl). Os precipitados obtidos (NSM1@DTX-CTX e NSM2@DTX-CTX) foram ressuspensos em 1 mL do tampão HEPES (20 mM, pH 7,0, contendo 3M de NaCl) e estocados em geladeira para posterior análise.

4.10. Avaliação da eficiência de funcionalização (EF%) de CTX-S nas NSMs-S@DTX

Para determinar a eficiência de conjugação do CTX-S às NSMs foi utilizado o ensaio BCA, de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Scientific). O reagente de trabalho foi preparado a partir da mistura dos reagentes A e B (50:1), como descrito no item 4.8.1. Foram adicionados 25 µL de cada padrão de albumina (20 – 2000 µg mL⁻¹) para a curva padrão de BSA e 25 µL de amostra em placa de 96 poços. A placa contendo 200 µL de reagente de trabalho foi homogeneizada com a amostra por 30 s e incubada a 37 °C por 30 min, posteriormente resfriada a T.A. para análise. O comprimento de onda foi fixo em 562 nm para obtenção das absorbâncias em leitor de microplacas. Para realização do cálculo da eficiência de conjugação foi feita a relação entre a porcentagem de CTX quantificada nas NSMs (purificadas via centrifugação e lavagem) e o total de CTX-S empregado inicialmente no experimento.

4.11. Caracterização físico-química dos nanocarreadores

4.11.1. Análise do tamanho dos nanocarreadores e índice de polidispersividade

O tamanho dos nanocarreadores e o índice de polidispersividade foram determinados a 25 °C por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*), usando laser de HeNe operando a 4 mW e comprimento de onda de 633 nm. O equipamento realiza as medições não invasivas por “backscatteroptics” (NIBS), feitas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medição da cubeta é automaticamente determinada pelo software do equipamento.

O software do equipamento é capaz de medir a difusão aleatória das nanopartículas no fluido em que estão dispersas, convertendo esse resultado no diâmetro hidrodinâmico das partículas e em distribuição de tamanhos, a partir da relação de Stokes-Einstein (Equação 6).

$$Dh = \frac{KT}{3 \pi \eta D} \quad \text{Eq. 6}$$

Em que: Dh = diâmetro hidrodinâmico, K = constante de Boltzman, T = temperatura absoluta, η = viscosidade do meio de dispersão e D = coeficiente de difusão.

As amostras foram dispersas em água ultrapura em concentrações de 0,2 mg mL⁻¹ e levadas ao banho de ultrassom por 20 min, posteriormente colocadas em celas de 1 cm de caminho óptico.

4.11.2. Medida da carga superficial e mobilidade eletroforética

A carga superficial das nanodispersões foram medidas com o potencial zeta (PZ) determinado pela mobilidade eletroforética por meio da equação de Smoluchowski (Equação 7) das partículas/gotículas dispersas submetidas a um campo elétrico.

$$\zeta = \frac{\mu \eta}{\varepsilon} \quad \text{Eq. 7}$$

Em que: ζ = potencial zeta, μ = mobilidade eletroforética, η = viscosidade do meio de dispersão e ε = constante dielétrica.

As análises foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS em ângulo de detecção de 173°. As amostras foram dispersas em água ultrapura em concentrações de 0,2 mg mL⁻¹ e levadas ao banho de ultrassom por 20 min, posteriormente colocadas em celas de 1 cm de caminho óptico.

4.11.3. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

O diâmetro hidrodinâmico médio e a concentração dos nanossistemas foram determinados utilizando o rastreador de nanopartículas (NTA) NanoSight NS300 (Malvern Instruments, UK) equipado com câmara de amostra e laser de $\lambda = 532$ nm. O preparo das amostras foi realizado conforme descrito no item 4.11.1. Um mL de cada amostra em suspensão foi introduzido na câmara de amostra utilizando uma seringa e uma bomba peristáltica. O software utilizado para aquisição e análise dos dados foi o NTA 2.3. As medidas foram realizadas em quintuplicata ($n = 5$) à temperatura ambiente (25 °C). O índice de polidispersão neste caso foi determinado com base no valor de SPAN de acordo com a Equação 8.

$$\text{SPAN} = \frac{D90 - D10}{D50} \quad \text{Eq. 8}$$

4.11.4. Análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As vibrações características das ligações correspondentes à estrutura dos materiais assim como das modificações nos nanocarreadores foram avaliadas no espectrômetro FT-IR, modelo Spectrum 2000 da Perkin Elmer sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com um acúmulo de 64 varreduras, com resolução de 1 cm⁻¹, a faixa espectral analisada correspondente foi de 400 a 4000 cm⁻¹. As amostras foram maceradas e dispersas em pastilhas de KBr.

4.11.5. Análise Termogravimétrica (ATG)

As curvas de termogravimetria foram obtidas para auxiliar na determinação da quantidade de grupos silanois que estão presentes na superfície das NSM1 e NSM2, assim como mostrar que as funcionalizações foram realizadas com sucesso para obtenção dos nanossistemas posteriores. O equipamento utilizado foi o TG-DSC1 STARE, da Mettler Toledo. As condições utilizadas nos experimentos para as amostras foram: atmosfera de ar seco com fluxo contínuo de 50 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. A temperatura inicial de análise foi de 25 °C e a temperatura final de 800 °C. Foram pesados em média 10

mg de cada amostra, utilizando-se cadinho de alumina (Al_2O_3) como referência. As medidas foram realizadas no Instituto de Química / UNESP - Câmpus de Araraquara.

4.11.6. ATG-DSC acoplado a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os experimentos de análise de gases liberados (do inglês *evolved gas analysis, EGA*) (TG-DSC-FTIR) foram realizados através de sistema de análise térmica da Mettler Toledo, modelo TG/DSC1, acoplado ao espectrômetro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da Nicolet, através de uma linha de transferência de aço inoxidável de 120 cm com diâmetro de 3 mm, aquecida a 225 °C, ambos purgados com ar seco (50 mL min^{-1}). O FTIR foi equipado com uma célula de gás aquecida a 250 °C e detector DTGS, com janelas de KBr. Os espectros de FTIR dos gases foram registados com 16 varreduras por espectro a uma resolução de 4 cm^{-1} .

4.11.7. Avaliação da morfologia e estrutura dos nanossistemas desenvolvidos

A morfologia e estrutura de mesoporos dos nanossistemas foram avaliadas por meio da microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM). O equipamento utilizado foi o microscópio TEM-FEG JEOL modelo 2100F, disponível no Instituto de Química da USP – São Carlos, operando em uma potência de feixe de 200 kV. As amostras NSM1 e NSM2 foram preparadas a partir da dispersão dos pós em etanol, enquanto as NSM1@DTX, NSM2@DTX, NSM1@DTX-CTX, NSM2@DTX-CTX, NSM1@FITC foram preparadas a partir da dispersão dos pós em água, sendo todas as amostras submetidas ao banho de ultrassom por 15 min. Posteriormente, $3 \mu\text{L}$ da suspensão foram adicionados sobre a grade de cobre e seca a temperatura ambiente para realização da análise.

4.11.8. Adsorção-Dessorção de Nitrogênio

A capacidade de adsorção das NSMs assim como estrutura, diâmetro e volumes de poros foram avaliadas no equipamento ASAP (*Accelerated Surface Area and Porosimetry System*) marca Micromeritics modelo 2020. As amostras foram degazadas à 200 °C por 6 h antes da análise de adsorção de nitrogênio a -196 °C. As curvas resultantes foram analisadas com o método BET para determinação da área superficial e o método BJH com a equação de espessura KJS para cálculo da distribuição do tamanho dos poros. [82-84] As medidas foram realizadas em colaboração com a professora Márcia Fantini do Instituto de Física/USP – Câmpus São Paulo.

4.11.9. Ressonância Magnética Nuclear de Sólidos (RMN de sólido)

As medidas de RMN foram realizadas para determinar a taxa de hidroxilação (Si-OH disponíveis) nas NSMs e também detectar as modificações covalentes feitas nas nanoplateformas. Para análise foi utilizado o espectrômetro Bruker Avance III HD 400 WB (9,4T) com uma sonda de 4 mm (MAS). As

medidas foram realizadas sob rotação de 10 kHz. Para o experimento de CP MAS do $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$, os espectros foram obtidas com comprimento de pulso de (^1H a 90°) 2,9 μs , tempo de contato de 4,0 ms e tempo de relaxação de 3 s. Para os experimentos de excitação direta (MAS do ^{29}Si), as medidas foram realizadas com pulso de 3,1 μs e tempo de relaxação de 600 s. Os espectros foram referenciados em relação ao TMS (tetrametilsilano). Para a deconvolução dos espectros obtidos foi utilizado o programa Origin. As medidas foram realizadas no Instituto de Química / UNESP - Câmpus de Araraquara.

4.11.10. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Medidas de SAXS foram realizadas nos equipamentos Nanostar (Bruker) e Xeuss 2.0 (Xenocs) usando distância amostra-detector de $\sim 0,67$ e $\sim 3,80$ m, respectivamente, o que forneceu uma faixa efetiva do modulo do vetor de transferência de momento, $q = [4\pi \sin(\theta)]/\lambda$ (onde 2θ é o ângulo de varredura e $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ é o comprimento de onda de raios-X), experimentalmente acessível de 0,003 a $0,35 \text{ \AA}^{-1}$.

As amostras em pó foram colocadas em um porta amostra entre as folhas de mica. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). O tratamento dos dados, os quais incluem integração azimutal, subtração do ruído de fundo e normalização das escalas absolutas, foram realizados usando o software XSACT fornecido pelo Xenocs. As medidas foram realizadas em colaboração com a professora Márcia Fantini do Instituto de Física/USP – Câmpus São Paulo.

4.12. Ensaios de Quantificação dos grupos tióis presentes no CTX-S e nas NSMs-S

O método de quantificação dos grupos tiol livres foi baseado no método Ellman de acordo com Liu e colaboradores [85]. Inicialmente, foi utilizado 2 mg dos pós (amostra das nanopartículas conjugadas ou não com os grupos tiol livres, NSM1-FITC-S e NSM1-FITC, respectivamente) ou 500 μL das amostras CTX-S, homogeneizados em 500 μL de tampão fosfato pH 8,5 com 500 μL do reagente de Ellman ((5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) ou DTNB, $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$) por 2 h. Os experimentos foram realizados em triplicata e a quantificação realizada em leitor de microplacas com comprimento de onda fixo em 450 nm.

Para a quantificação das ligações dissulfeto as amostras foram reduzidas com borohidreto de sódio (NaBH_4) 3% (m/v) por 2 h, e, após esse tempo, a reação foi interrompida adicionando 300 μL de HCl 5M, e posteriormente adicionado reagente de Ellman por mais 2 h para sua correta quantificação. Os experimentos foram realizados em triplicata e a quantificação realizada em leitor de microplacas com comprimento de onda fixo em 450 nm, para obtenção das absorbâncias e posterior quantificação. A curva de calibração para quantificação das amostras foi obtida utilizando concentrações entre $1 \text{ mg} - 32 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N-acetilcisteína puro (Sigma Aldrich, USA) incubados por 2 h com reagente de Ellman em ausência de luz e a temperatura ambiente. Após esse período, os padrões foram lidos em leitor de microplacas com comprimento de onda fixo em 450 nm, para detecção da absorbância e obtenção da curva.

4.13. Estudos em cultura celular: Avaliação de citotoxicidade em célula de câncer de próstata DU145 e PC3

A avaliação da citotoxicidade das formulações NSM1, NSM2, NSM1@DTX, NSM2@DTX, NSM1@DTX-CTX, NSM2@DTX-CTX e DTX solubilizado em DMSO foi realizada nas linhagens celulares PC3 e DU145 utilizando a resazurina como marcador de viabilidade celular, de acordo com metodologia adaptada de [69, 86]. Para a realização deste experimento, 1×10^4 células de cada linhagem foram semeadas isoladamente em placas de cultivo celular de 96 poços e incubadas por 24 h a 37 °C e 5 % CO₂. Após a formação da monocamada celular, o meio de cultivo foi removido dos poços e substituído por meio de cultivo contendo as formulações diluídas na concentração de DTX de 1, 10, 50, 100 e 250 nM, em triplicata. As formulações isentas de DTX foram preparadas nas mesmas diluições das formulações contendo o DTX. Poços acrescidos somente com células e meio de cultivo foram utilizados como controles negativos, e poços acrescidos de meio de cultivo com DMSO (30 %, v/v) foram considerados os controles positivos. Após 48 h de incubação, os meios foram removidos e os poços lavados duas vezes com solução de tampão fosfato de sódio (PBS, pH 7,4). Em seguida, 200 µL de meio de cultivo contendo resazurina (0,025 mg mL⁻¹) foi adicionado em cada poço. As placas foram levadas à estufa por 3 h a 37 °C. Após este período, a fluorescência, no comprimento de onda de excitação de 570 nm e emissão de 600 nm, foi determinada em uma leitora de placas Biotek (modelo Synergy). Os resultados foram expressos através da viabilidade celular (%) e IC₅₀. As análises foram em quadruplicata. O cálculo da concentração mínima das amostras capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC₅₀) foi feito por regressão não linear no software GraphPad Prism 8.0.1 com os dados de viabilidade já normalizados.

4.14. Estudos em cultura celular: Avaliação da internalização das NSM-FITC e NSM-FITC-CTE em célula de câncer de próstata DU145 via citometria de fluxo

A análise de citometria foi realizada no equipamento BD Accuri™ C6 Plus Personal Flow Cytometer (BD Biosciences) para determinar a taxa de internalização (uptake celular) das nanopartículas funcionalizadas e não funcionalizadas nas células da linhagem DU145. Para esta etapa, 1×10^5 células foram plaqueadas em placa de 24 poços e incubadas durante 24 h em 1 mL de meio DMEM suplementado com antibiótico (1%) e soro fetal bovino (10%) em condições de umidade, temperatura (37 °C) e atmosfera (5% de CO₂) controladas para que se formasse uma monocamada celular. Após as 24 h, o meio de cultura foi removido e substituído por 1 mL de DMEM não suplementado contendo as nanopartículas diluídas na mesma concentração das formulações correspondentes a 20 nM de DTX. Foi feito também controle negativo e positivo com 1 mL de meio de cultura. A placa foi novamente incubada desta vez por um período de 6 h, seguido de lavagem dos poços com PBS 1x e tripsinização por 5 min. As amostras receberam 1 mL de meio de cultura para inativação da tripsina, foram ressuspensas e colocadas em tubos de ensaio de vidro. Os tubos correspondentes ao controle positivo (morte celular) foram colocados em banho-maria a

60 °C para indução da morte celular. Antes da leitura, foi adicionado 2 µL de iodeto de propídio em cada tubo para a análise da viabilidade celular. Amostras foram feitas em triplicata e analisadas nos comprimentos de onda de 533 nm para detecção do marcador FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) e 585 nm para quantificação do iodeto de propídio, sendo os resultados expressos em porcentagem (%) de internalização. [69, 86]

4.15. Análise estatística

Utilizou-se a análise de variância ANOVA para o tratamento dos resultados. Foi considerado como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Validação de metodologia analítica para quantificação de DTX por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.1.1. Conformidade do sistema cromatográfico

A Figura 6 apresenta o espectro de absorção do DTX na região do Ultravioleta-Visível, em fase móvel acetonitrila:água ultrapura (65:35, v/v) com máxima absorção no comprimento de onda de 230 nm.

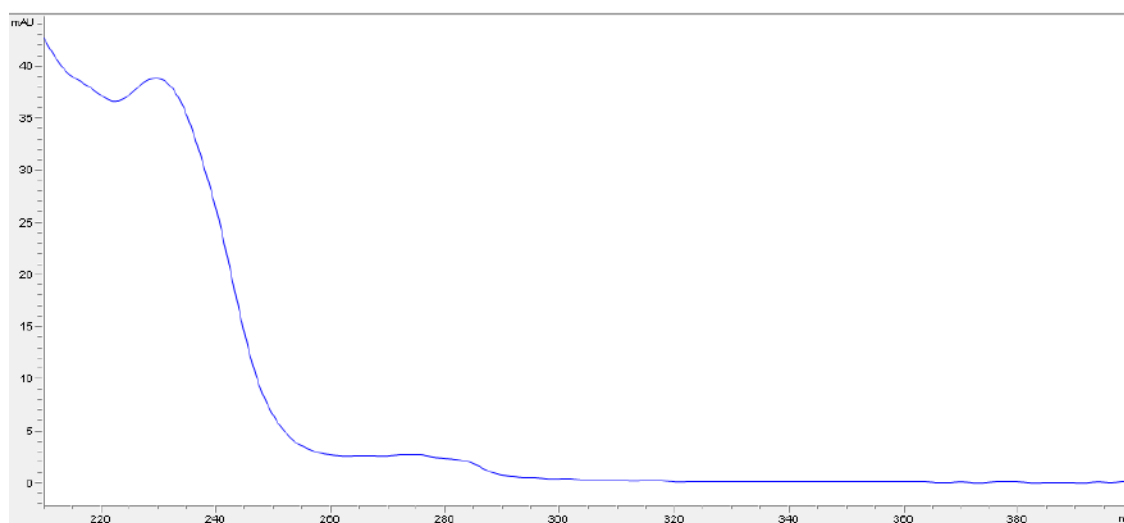


Figura 6. Espectros de absorção na região do ultravioleta do DTX em fase móvel.

Após a avaliação do espectro do fármaco e comprimento de onda de máxima absorção, em 230 nm, a conformidade do método cromatográfico foi avaliada e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3. O número de pratos teóricos obtidos foi superior a 2000, como recomendado [87] e, as médias dos valores dos fatores de assimetria e de cauda estão abaixo do limite preconizado de 2,0, demonstrando que o método desenvolvido é adequado para a quantificação do DTX por CLAE.

Tabela 3. Parâmetros da análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de DTX.

Injeções	Área	Tempo de retenção (tR)	Simetria do pico 10 %	Fator de cauda	Nº de pratos teóricos
N1	368,479	5,264	1,093	1,149	12314
N2	364,608	5,248	1,101	1,149	12133
N3	367,656	5,256	1,093	1,142	12211
N4	369,116	5,258	1,088	1,139	12063
N5	358,833	5,258	1,119	1,164	11918
Média	365,738	5,258	1,099	1,149	12127,8
DP	4,229	0,006	0,012	0,009	149,862
D.P.R%	1,156	0,115	1,126	0,819	1,235

Da mesma forma, como demonstrado na Tabela 3, verificou-se precisão entre os valores de tR e área dos picos cromatográficos, cujos D.P.R.% se encontram abaixo de 2 %. [87, 88] Para demonstrar a resolução e a simetria do pico correspondente ao DTX, os cromatogramas das cinco injeções, obtidos pelo método proposto, foram sobrepostos e estão representados na Figura 7.

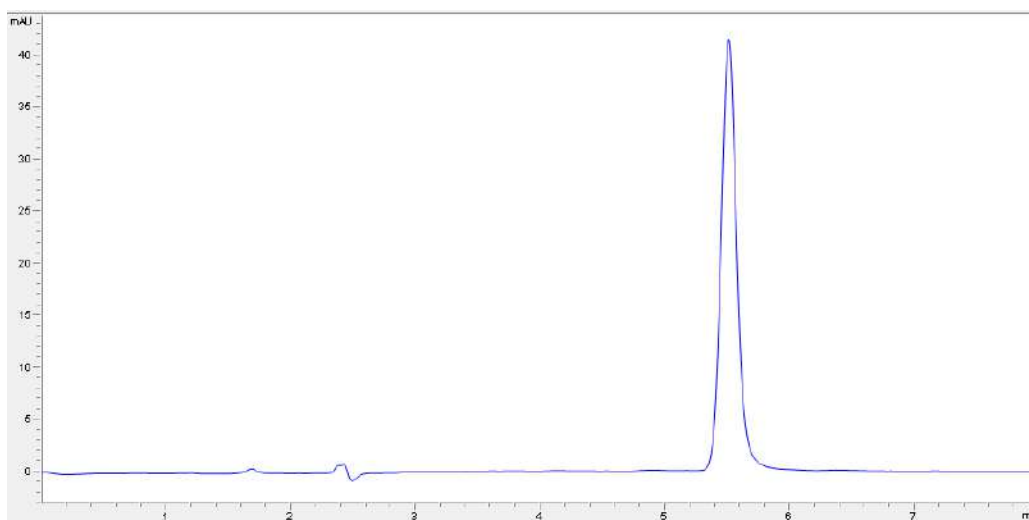


Figura 7. Cromatograma do DTX ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel acetonitrila:água ultrapura (65:35).

5.1.2. Especificidade/Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, sem que estes interfiram no resultado da análise. Em métodos quantitativos, a especificidade/seletividade, pode ser avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos de amostras e dos possíveis interferentes, como os excipientes

das nanopartículas. Em métodos cromatográficos, esse parâmetro é importante, uma vez que a pureza do pico do fármaco deve ser mantida. [87]

Inicialmente, a suspensão de NSM foi preparada em fase móvel, centrifugada e o sobrenadante foi filtrado e injetado para análise utilizando-se o método, assim como o solvente acetonitrila, de acordo com os cromatogramas apresentados na Figura 8 (A e B). De acordo com a Figura 8 (A), não foi observado qualquer tipo de interferência das NSM e também da fase móvel acetonitrila:água ultrapura (65:35), sendo que o pico da fase móvel apareceu abaixo de 2 min. Na Figura 8 (B), foi observado um pico em $t_R = 1$ min, confirmando assim nenhuma interferência no t_R do DTX.

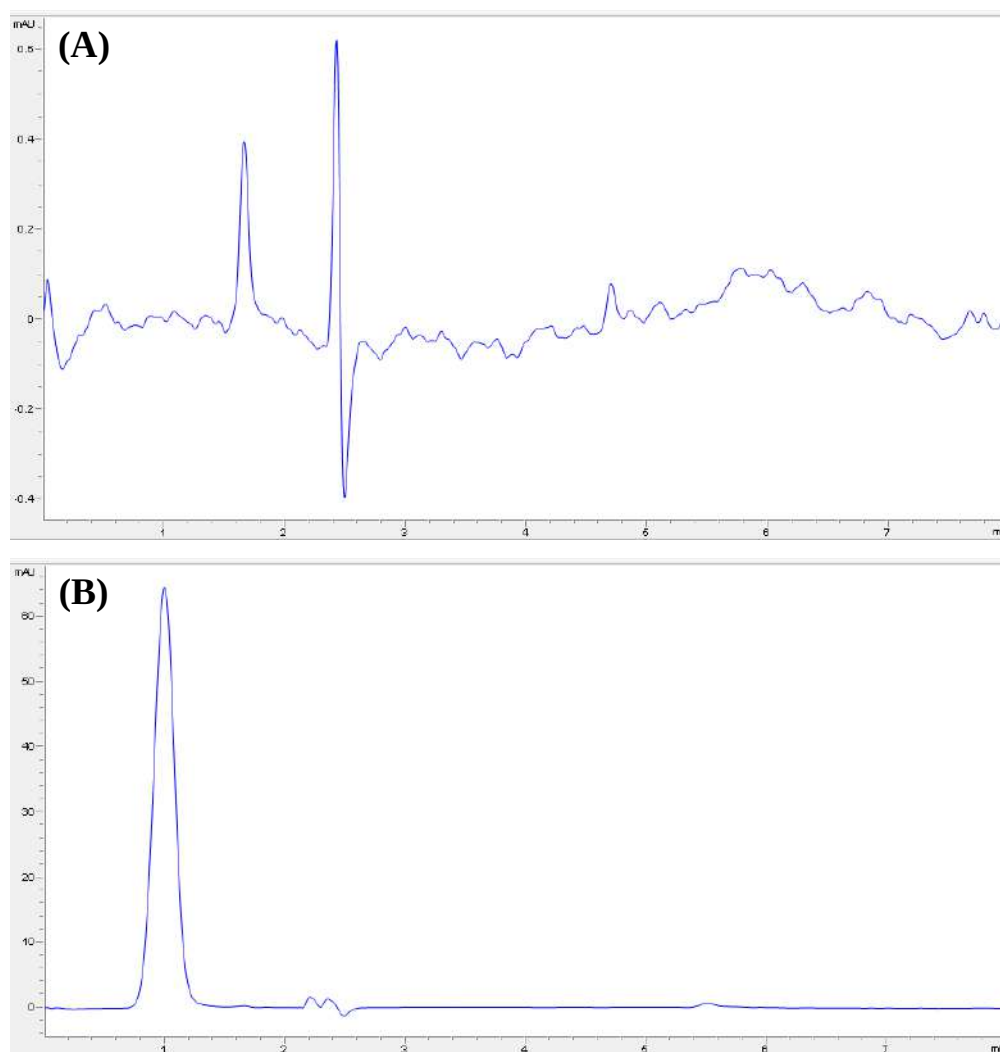


Figura 8. (A) cromatograma das NSM (Concentração = $180 \mu\text{g mL}^{-1}$) em fase móvel (acetonitrila:água ultrapura (65:35) e (B) cromatograma da acetonitrila.

5.1.3. Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco, dentro de um intervalo de concentrações definido. [87, 88] A curva analítica foi construída para DTX (Figura 9), a partir da média dos valores das

áreas em função da concentração de DTX foi construída a partir da média dos valores das áreas obtidas, no comprimento de onda de 230 nm, em função da concentração de fármaco.

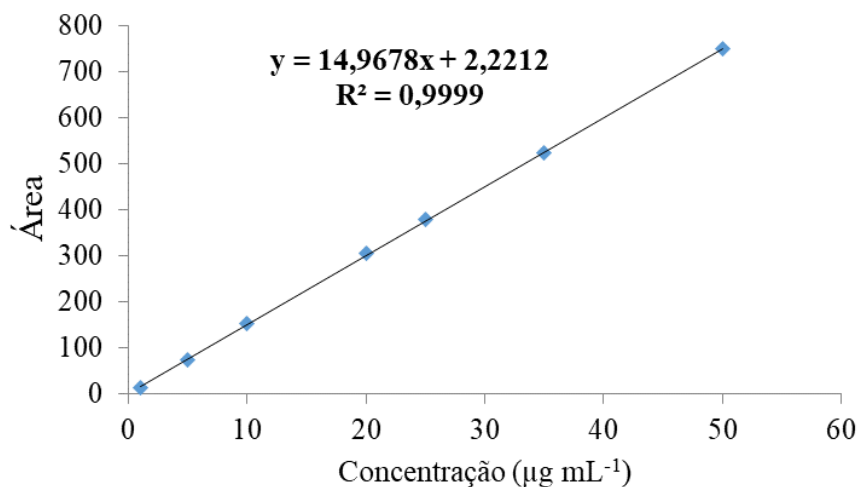


Figura 9. Curva analítica do DTX quantificado por CLAE.

O método analítico desenvolvido apresentou-se linear na faixa de concentração de DTX de 1 a 50 µg mL⁻¹. Realizou-se a análise de variância ANOVA para os dados obtidos a partir da curva analítica do DTX, confirmando que a regressão linear é altamente significativa, pois o valor de F calculado ($5,273 \cdot 10^4$) foi maior do que o valor de F tabelado (6,608), para um nível de 95 % de confiança (Tabela 4). [89]

Tabela 4. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	F calculado	F tabelado
Regressão	$4,101 \cdot 10^5$	1	$5,273 \cdot 10^4^*$	6,608
Resíduo	38,9	5		
Total	$4,102 \cdot 10^5$	6		

*Significativo para $p < 0,05$

5.1.4. Precisão

A precisão de um método analítico avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma múltipla amostragem de uma mesma amostra. [87] Existem três formas comuns de demonstrar a precisão, por meio da precisão intracorrida, intercorrida e precisão interlaboratorial, sendo usualmente expressa através do desvio padrão relativo percentual. [87, 88]

5.1.4.1. Precisão intracorrida

É a repetibilidade do método, ou seja, precisão entre os resultados obtidos pelo mesmo manipulador, utilizando os mesmos equipamentos, dentro de um curto período. [87] A análise foi realizada em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos para o teste de repetibilidade.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Áreas	Concentração real ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Médias	DP	D.P.R. %
1	14,952	0,850			
1	16,127	0,929	0,884	0,040	4,586
1	15,277	0,872			
10	155,108	10,511			
10	155,078	10,509	10,316	0,178	1,728
10	159,715	10,819			
25	394,091	26,477			
25	393,844	26,461	26,549	0,218	0,828
25	399,612	26,846			

O D.P.R% observado para todas as amostras nos ensaios de precisão intracorrida e precisão intercorridas foi inferior à 5%, como preconizado pela legislação vigente [87], portanto, o método desenvolvido é preciso.

5.1.4.2. Precisão intermediária

É a precisão intercorridas, avalia a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes, com manipuladores diferentes e/ou equipamentos diferentes. [88] Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados do ensaio de precisão intercorrida.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Áreas	Concentração real ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Médias	DP	D.P.R. %
1	14,929	0,849			
1	14,952	0,831	0,843	0,011	1,279
1	14,661	0,850			
10	180,083	11,883			
10	180,528	11,913	11,919	0,039	0,327
10	181,242	11,960			

25	414,502	27,544			
25	417,599	27,751	27,465	0,333	1,212
25	407,844	27,099			

5.1.5. Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pela aplicação do método analítico utilizado em relação ao valor teórico real. Valores próximos a 100 % são desejáveis, entretanto, admitem-se variações na faixa entre 80 – 120 %, conforme recomendado pela ANVISA. [87] A exatidão foi calculada e os valores estão apresentados na Tabela 7, demonstrando que a metodologia analítica desenvolvida é adequada para a quantificação do fármaco.

Tabela 7. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de DTX.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração real ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão %
1	0,884	88
10	10,316	103
25	26,298	105

5.1.6. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LD e LQ são utilizados para medir a sensibilidade do método. O LD representa a menor quantidade do fármaco presente na amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado e o LQ representa a menor quantidade de fármaco na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão pelo método desenvolvido. [87] Os valores de LD e de LQ calculados foram de $0,502 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,675 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, demonstrando a capacidade da metodologia desenvolvida de detectar e quantificar reduzidas concentrações de DTX.

5.2. Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosas (NSM1 e NSM2)

Ambos nanossistemas foram sintetizados e tratados para eliminação dos agentes formadores de poros de acordo com metodologia descrita nos itens 4.2.1. e 4.2.2., respectivamente, com rendimento entre 60-70 %. Para comprovar a eficácia dos refluxos, a eliminação efetiva de matéria orgânica presente nos poros, além de determinar as vibrações características das ligações presente nas matrizes, medidas de FTIR foram realizadas a partir da diluição dos pós de NSM e NSM2 em KBr, de acordo com os espectros da Figura 10 (A e B).

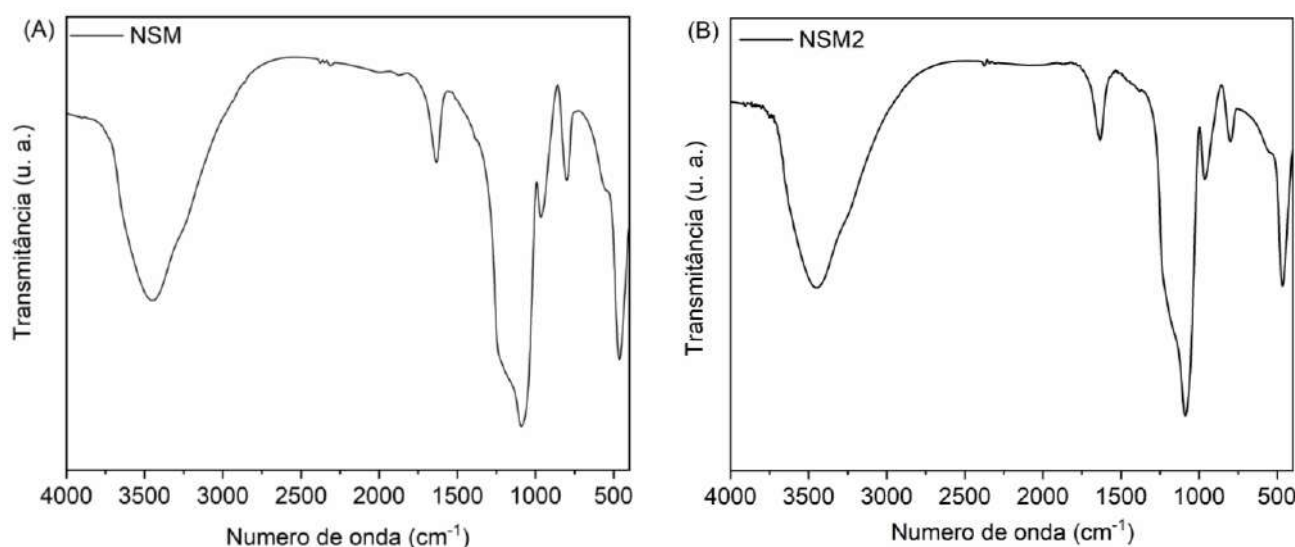


Figura 10. Espectros de infravermelho (FTIR) das (A) NSM e (B) NSM2 diluídas em pastilha de KBr.

Bandas características da rede de sílica a 465, 805 e 1095 cm^{-1} correspondem ao $\delta(\text{Si—O—Si})$, $\nu_s(\text{Si—O—Si})$ e $\nu_{\text{ass}}(\text{Si—O—Si})$, respectivamente. Bandas observadas em 960 e 160 cm^{-1} foram atribuídas as $\nu(\text{Si—OH})$ e $\delta(\text{OH})$. A banda em torno de 3430 cm^{-1} foi atribuída a $\nu(\text{OH})$ e moléculas de água presentes. [73, 75] Os resultados obtidos confirmam a presença de grupos silanois nas matrizes assim como a ausência de matéria orgânica presente nos poros, sendo os refluxos realizados efetivos para eliminação dos surfactantes.

Análises termogravimétricas (ATG e ATD, linhas preta e vermelha, respectivamente) foram realizadas de acordo com as curvas presentes na Figura 11. Dois eventos característicos foram observados para ambos nanossistemas: primeiramente, eventos endotérmicos de 25 a 100 $^{\circ}\text{C}$ correspondentes a desidratação da matriz, eliminação de moléculas de água e solvente dessorvidas, com perda de massa em torno de 20,5 e 68 %, para as NSM e NSM2, respectivamente. O segundo evento (de 200 a 1000 $^{\circ}\text{C}$), com perda de massa de 3 e 4 % (para as NSM e NSM2, respectivamente) correspondem a mudanças estruturais atribuídas a condensação dos grupos silanois presentes nos poros/superfície da matriz. [73, 75] É importante ressaltar que o resultado de ATG/ATD corrobora com o FTIR, confirmando a ausência de matéria orgânica e a presença de silanois disponíveis nas matrizes.

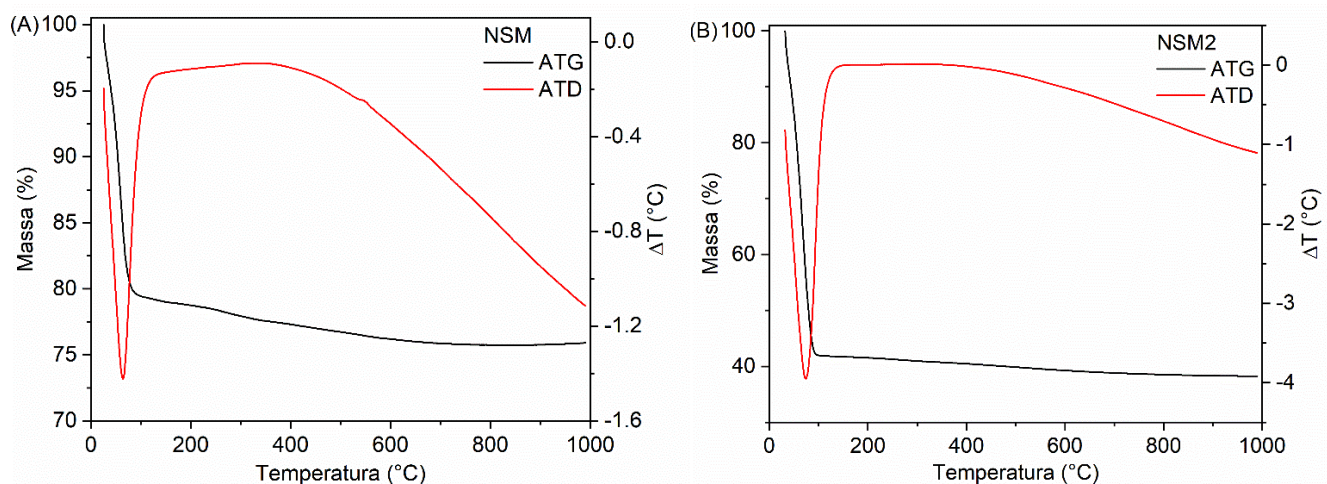


Figura 11. Curvas de análise termogravimétrica (ATG e ATD, linhas pretas e vermelhas, respectivamente) das (A) NSM e (B) NSM2.

O diâmetro hidrodinâmico médio, o índice de polidispersividade (IPD) e também o potencial zeta (PZ) dos nanossistemas foram avaliados em suspensão aquosa, em triplicata, de acordo com as Figuras 12 (A)-(D). Os valores de diâmetro médio, IPD e PZ estão apresentados na Tabela 8.

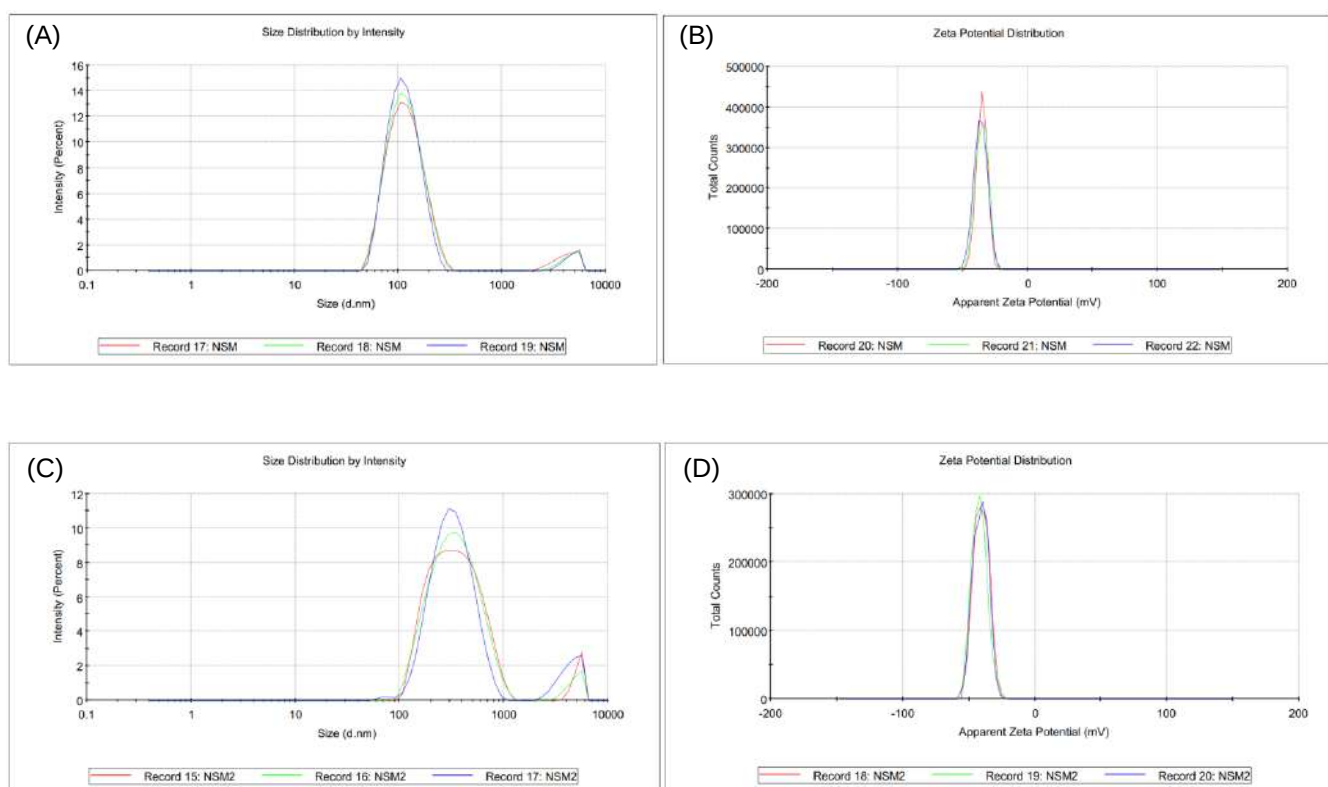


Figura 12. Medidas de espalhamento dinâmico de luz (A e C) e potencial zeta (B e D) das NSM (A e B) e NSM2 (C e D) em suspensão aquosa (M: 0,2 mg mL⁻¹, n = 3).

Considerando as Figuras 12 (A)-(D), pode-se concluir que os nanossistemas apresentaram esperado diâmetro hidrodinâmico (~116 e 334 nm, para NSM e NSM2, respectivamente), boa estabilidade e boa

dispersão em suspensão aquosa com valores de IPD em torno de 0,3, além de valores de PZ próximo a -36 e -41 mV (para NSM e NSM2, respectivamente), característicos de nanopartículas de sílica mesoporosas devido a carga superficial negativa gerada pelas hidroxilas disponíveis na matriz. [76, 77, 90]

Tabela 8. Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade (IPD) e Potencial Zeta (PZ) das NSMs em suspensão aquosa (média $\pm$ DP, n = 3)

Amostra	DLS		
	Tamanho Médio (nm) $\pm$ DP	IPD $\pm$ DP	PZ (mV) $\pm$ DP
NSM	116,6 $\pm$ 1,72	0,238 $\pm$ 0,012	-35,5 $\pm$ 0,55
NSM2	333,8 $\pm$ 12,51	0,322 $\pm$ 0,043	-41,2 $\pm$ 0,62

Para também confirmar os dados obtidos via DLS, foram realizadas análises de rastreamento de nanopartículas (NTA), em suspensão aquosa de concentração similar a das medidas realizada via DLS, em quintuplicata, de acordo com as Figura 13 (A e B).

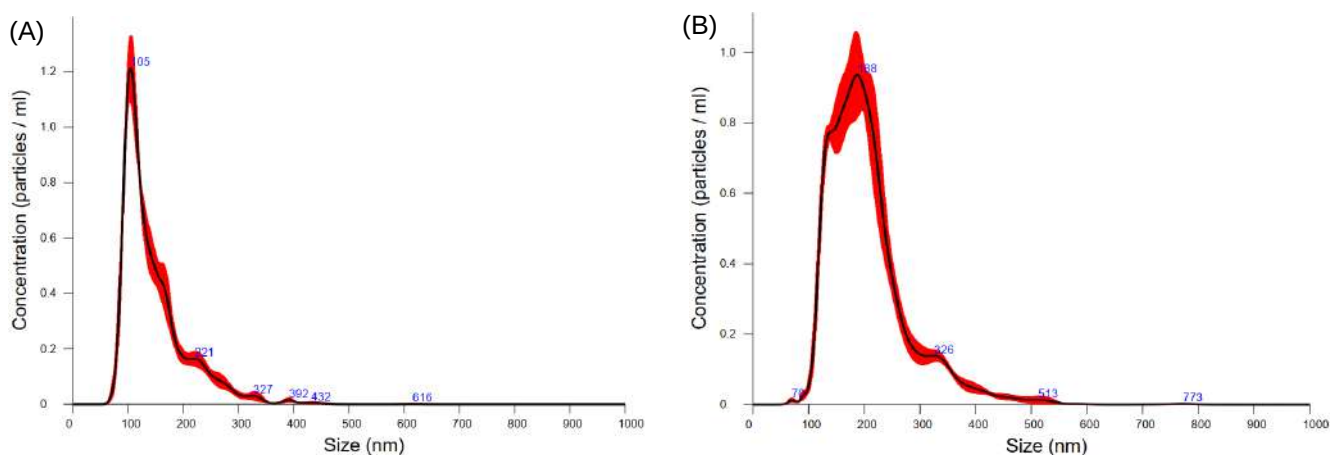


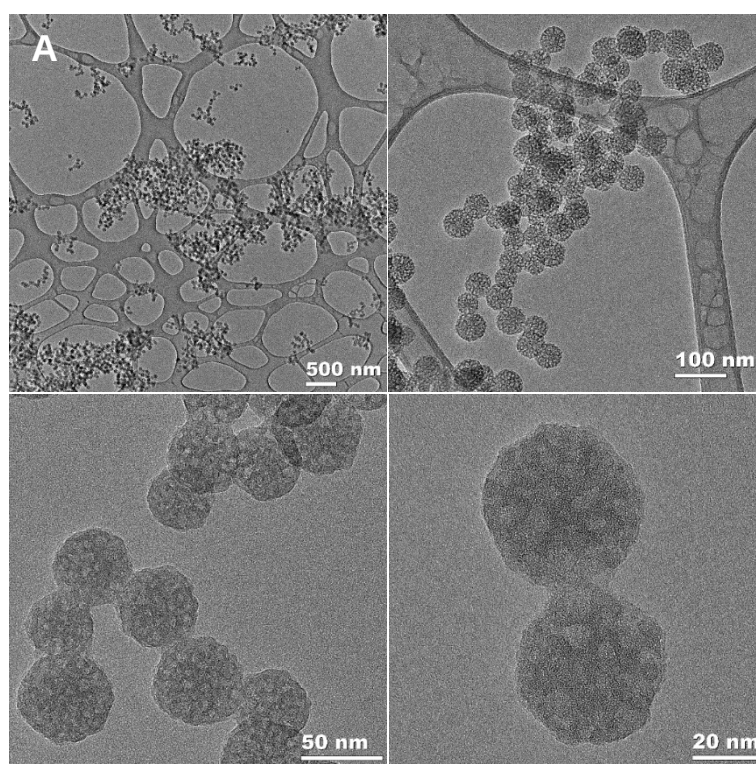
Figura 13. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) realizada para as (A) NSM e (B) NSM2 em suspensão aquosa (M: 0,2 mg mL⁻¹, n = 5).

Os valores obtidos através do NTA estão apresentados na Tabela 9. É possível observar que o diâmetro médio das NSM via DLS foi de 116,6 $\pm$ 1,7 nm enquanto via NTA o valor de diâmetro médio foi de 146,3 $\pm$ 1,8 nm. Para as NSM2, os valores foram 306,9 e 206,5 nm, via DLS e NTA, respectivamente. Considerando os valores de cada população (D10, D50 e D90) apresentados na Tabela 9, os valores de diâmetro hidrodinâmico médio via DLS e NTA foram concordantes, confirmando diâmetro hidrodinâmico estreito na faixa de aproximadamente 100 e 300 nm para as NSM e NSM2, respectivamente. Além disso, pode-se confirmar via NTA a boa polidispersividade dos nanossistemas em suspensão, de acordo com os valores de índice de SPAN 1,06 e 0,87 e com valores de 8,5 $\times 10^8$ e 1,27 $\times 10^8$ partículas mL⁻¹ para as NSM e NSM2, respectivamente, resultados estes concordantes com o DLS. [65, 66]

Tabela 9. Tamanho médio, desvio padrão (DP), concentração de partículas por mL⁻¹ e as populações majoritariamente presentes para as NSM e NSM2 em suspensão aquosa (média $\pm$ DP, n = 5)

Amostra	Tamanho médio (nm) $\pm$ DP	Moda (nm) $\pm$ DP	Concentração de partículas (10 ⁸ mL ⁻¹) $\pm$ DP	NTA			Índice SPAN
				D10 (nm)	D50 (nm)	D90 (nm)	
NSM	146,3 $\pm$ 1,8	102,8 $\pm$ 1,3	8,50 $\pm$ 0,29	93,4 $\pm$ 0,9	127,3 $\pm$ 1,1	228,4 $\pm$ 6,1	1,06
NSM2	206,5 $\pm$ 1,8	179,9 $\pm$ 13,5	1,27 $\pm$ 0,037	131,8 $\pm$ 1,6	192,9 $\pm$ 3,0	299,7 $\pm$ 10,1	0,87

Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (MET) foi realizada com intuito de avaliar a morfologia e o diâmetro dos nanossistemas, assim como a disposição e estrutura de poros. A Figura 14 apresenta distintas magnificações das NSM (A) e NSM2 (B). NSM esféricas, monodispersas, altamente porosas, com poros obtidos em escala nanométrica, distribuídos aleatoriamente pela matriz foram obtidas. Já no caso das NSM2, nanopartículas parcialmente esféricas, com poros distribuídos de forma organizada pela matriz foram obtidas. Os diâmetros médios obtidos foram na faixa de 50 e 100 nm para as NSM e NSM2, respectivamente, concordantes com a literatura [74, 75, 77] e com os dados obtidos via DLS e NTA. Os valores de diâmetro médio para DLS e NTA são maiores pois as informações são obtidas considerando a solvatação dos nanossistemas, ou seja, o diâmetro nestes dois casos é hidrodinâmico, diferente das análises por MET.



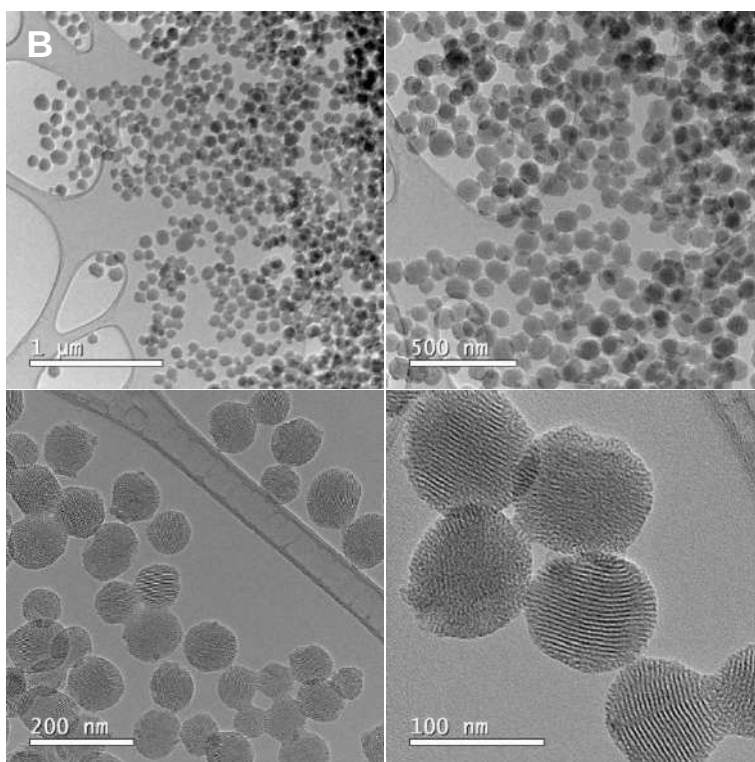


Figura 14. Microscopias eletrônicas de transmissão (MET) das (A) NSM e (B) NSM2 em diferentes magnificações.

Isotermas de adsorção-dessorção de N_2 foram obtidas para ambas as matrizes com intuito de confirmar a estrutura de poros, determinar a área superficial específica (S_{BET}), volume total de poros (V_{PT}) e o diâmetro médio de poros (D_p) (Figura 15).

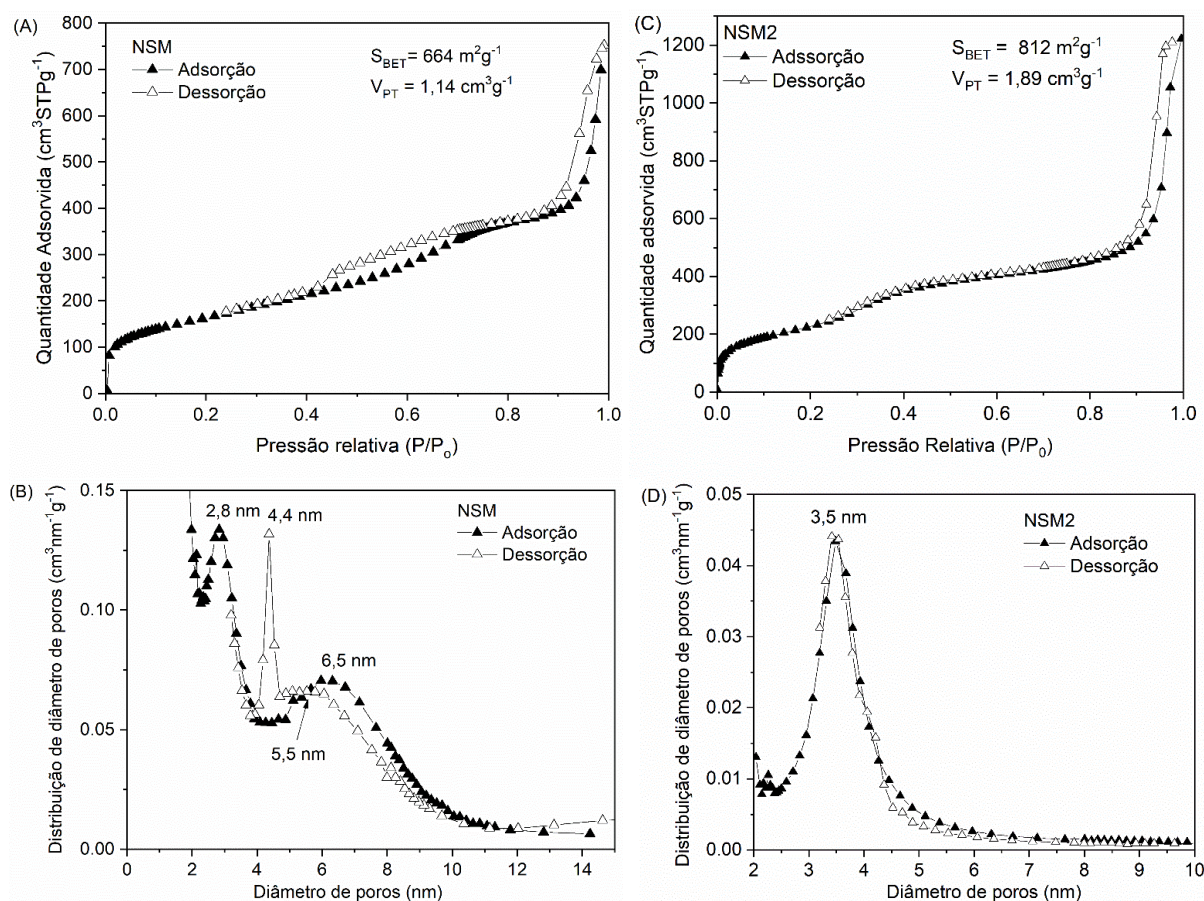


Figura 15. Isotermas de adsorção (triângulo branco) e dessorção (triângulo preto) de N_2 das (A) NSM e (C) NSM2 e distribuição do diâmetro de poros obtidos através das isotermas para (B) NSM e (D) NSM2.

As Figuras 15 (A e C) apresentam as isotermas de N_2 para as NSM, as quais exibem um perfil do tipo IV, característico de materiais mesoporosos. [69, 91-94] Além disso, histereses como a da Figura 16 (A) aparecem em faixas de multicamadas de isotermas de fisissorção, geralmente associadas com a condensação capilar em estruturas mesoporosas. [91-94] De acordo com a definição da IUPAC, estas isotermas apresentam histereses do tipo 1, característicos da condensação capilar em poros cilíndricos e poliédricos com extremidades abertas. [91-94] Além disso, valores consideráveis de S_{BET} de 664 e 812 $m^2 g^{-1}$ e grande $V_{PT} = 1,14$ e 1,89 $cm^3 g^{-1}$ foram obtidos para as NSM e NSM2, respectivamente, a partir das isotermas das Figuras 15 (A e C).

As Figuras 15 B e D apresentam a distribuição de diâmetro de poros nas NSM e NSM2, respectivamente. A ampla faixa de adsorção observada na Figura 16 B é um forte indicativo de uma larga e aleatória distribuição de diâmetro de poros, com D_p de 6,5 nm. [69] Já para a Figura 16 D, a estreita faixa de adsorção é característica de uma estreita distribuição de diâmetro de poros, D_p de 3,5 nm. [69, 93] A larga distribuição de diâmetro de poros obtidas para a NSM corrobora com a metodologia de síntese, que consiste no uso da polimerização do estireno para formar os poros, gerando poros de diâmetros diversos, além de corroborar os dados de MET, que apresentaram distribuição aleatória de poros na matriz. Para as NSM2 (Figura 16 D), a estreita distribuição de poros também está concordante com a literatura, visto que

o agente formador de poros é somente o surfactante CTAB, que se organiza em micelas para formação dos poros. [69]

Medidas de RMN de sólido para o núcleo de ^{29}Si foram realizadas pela irradiação direta do ^{29}Si (MAS ^{29}Si), visando quantificar a porcentagem de sítios ativos (espécies Q^n) presentes nas matrizes, para posterior funcionalização. A Figura 16 exibe o espectro de MAS ^{29}Si das NSM (A) e NSM2 (B) e suas respectivas deconvoluções. Subsequentemente, o grau de condensação das amostras foi calculado de acordo com a Equação 9:

$$C\% = \frac{[(Q^1 + 2 \times Q^2 + 3 \times Q^3 + 4 \times Q^4) \times 100]}{4} \quad \text{Eq. 9}$$

A notação Q^n é usada para as espécies de Si, onde n é o número de ligações siloxanos detectadas no átomo de Si. A faixa de deslocamento químico (δ) atribuída de acordo com a literatura [95] consiste em -80 a -90 ppm para Q^1 ($(\text{Si}(\text{OH})_3(\text{OSi}))$), -91 a -100 ppm para Q^2 ($(\text{Si}(\text{OH})_2(\text{OSi})_2)$), -101 a -110 ppm para Q^3 ($(\text{Si}(\text{OH})(\text{OSi})_3)$) e -111 a -119 ppm para Q^4 ($(\text{Si}(\text{OSi})_4)$).

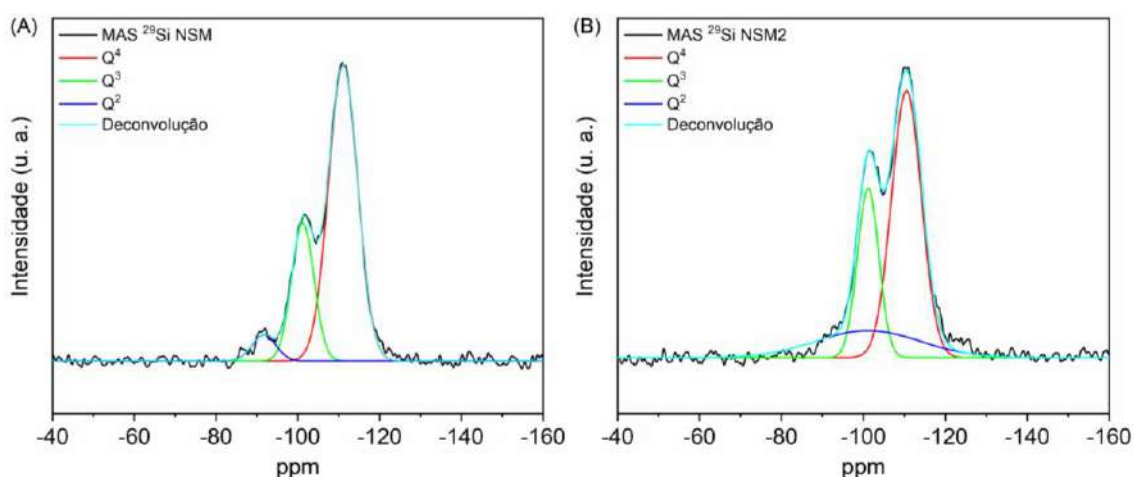


Figura 16. Espectro de ressonância magnética nuclear para o núcleo de ^{29}Si (RMN ^{29}Si) das (A) NSM e (B) NSM2 (linhas pretas) e suas deconvoluções (linhas azuis claras).

Os valores obtidos de deslocamento químico (δ), porcentagem das espécies e grau de condensação para as NSM e NSM2 estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Deslocamento químico (ppm), porcentagem de espécies (%) e grau de condensação (%) obtidos das deconvoluções dos espectros RMN ^{29}Si das NSM e NSM2.

Amostra	Q ²		Q ³		Q ⁴		Grau de condensação (%)
	δ (ppm)	Area (%)	δ (ppm)	Area (%)	δ (ppm)	Area (%)	
NSM	-91	5,1	-101	25,0	-111	69,9	91,2
NSM2	-91	19,5	-101	25,1	-110	55,4	84,0

A partir da deconvolução dos espectros, foi possível detectar as espécies Q², Q³ e Q⁴. As porcentagens obtidas de Q² e Q³ para NSM e NSM2 foram 5,1 e 25 % e 19,5 e 25,1 %, respectivamente, confirmando a presença de grupos silanois disponíveis nas NSM (30,1 %) e NSM2 (44,6 %), sendo estes resultados concordantes com as análises de FTIR e ATG/ATD realizadas. Além disso, pode-se observar que a amostra NSM2 apresentou uma maior porcentagem de sítios Q², apresentando assim uma porcentagem maior de hidroxilas disponíveis totais comparados a NSM, resultado confirmado pelos valores de grau de condensação de 91,2 e 84 % para as NSM e NSM2, respectivamente.

A Figura 17 apresenta dos dados de SAXS coletados em diferentes distâncias amostra-detector, para as NSM (A) e NSM2 (B). Devido a ampla faixa de q analisada, foi possível obter informações sobre o tamanho e forma dos nanossistemas (informação relacionada ao início da curva, em vermelho) assim como informações sobre o tamanho e forma da estrutura de mesoporosos (final da curva, em preto).

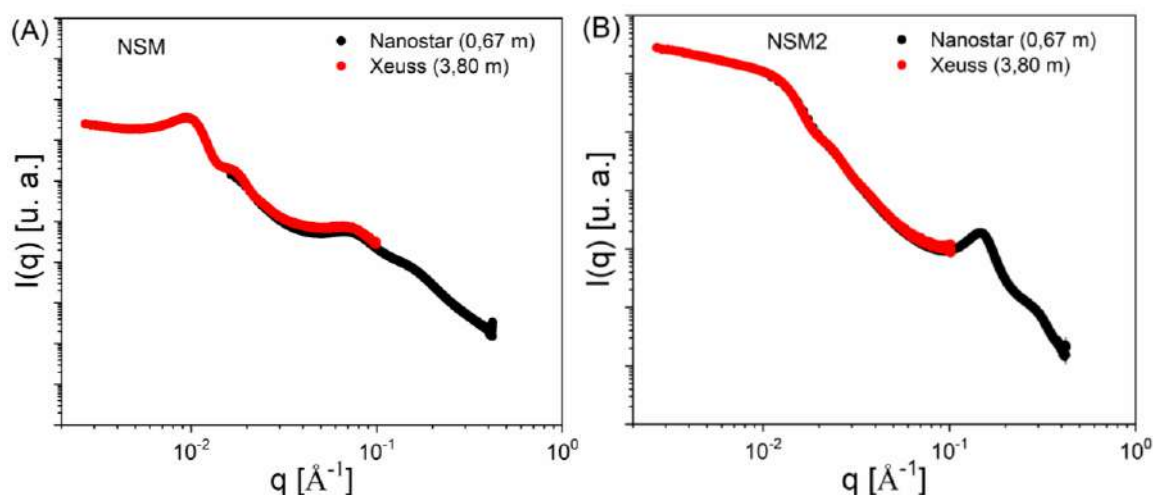


Figure 17. Combinação dos dados de SAXS coletados nos instrumentos com distintas distâncias da amostra ao detector, os quais conduzem a uma ampla faixa de q , fornecendo informações sobre o tamanho e forma das (A) NSM e (B) NSM2 assim como sobre seus mesoporosos.

A Figura 18 exibe uma representação esquemática das análises iniciais dos fits parciais das curvas.

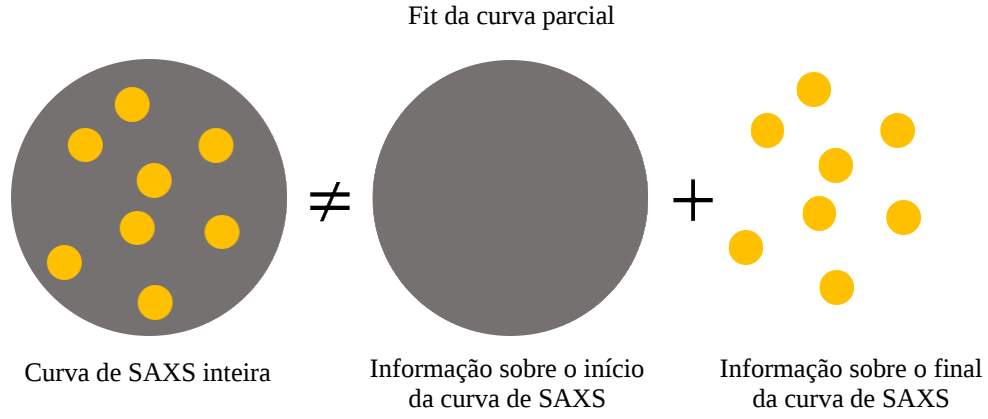


Figure 18. Modelo de fit parcial das curvas, extraindo informações sobre tamanho e forma das NSM e NSM2, assim como do tamanho e forma dos mesoporos, via distintas partes das curvas de SAXS. Um fit único para ambas as curvas de SAXS não foi possível ser realizado.

De acordo com os dados de MET, ambas nanopartículas são aproximadamente esféricas e polidispersas. Desta forma, pode-se representar o espalhamento das amostras de acordo com a Equação 10:

$$I_{NSM}(q) = sc \cdot P(q, R, \sigma_R) \cdot S(q, R_{HS}, \eta) + back \quad \text{Eq. 10}$$

O parâmetro sc é o fator de escala enquanto $back$ considera o espalhamento incoerente. A função $P(q, R, \sigma_R)$, depende do raio médio R das nanopartículas e de seu desvio padrão σ_R , $S(q, R_{HS}, \eta)$ é o fator normalizada do formato de esfera polidispersa, de acordo com as Equações 11, 12 e 13 [96]:

$$P(q, R, \sigma_R) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) V(x)^2 [A(q, x)]^2 dx}{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) V(x)^2 dx} \quad \text{Eq. 11}$$

onde:

$$A(q, x) = 3 \frac{[\sin(qx) - qx \cos(qx)]}{(qx)^3} \quad \text{Eq. 12}$$

$$V(x) = \frac{4}{3} \pi x^3 \quad \text{Eq. 13}$$

e $N(x)$ e a distribuição de log-normal, de acordo com a Equação 14 [74, 75]:

$$N(x) = \frac{1}{x\omega\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln x - \theta}{\omega}\right)^2\right) \quad \text{Eq. 14}$$

Sendo θ e ω a média e o desvio padrão, respectivamente, de uma distribuição Gauss de $\ln x$. O valor esperado (média) para a variável x e seu desvio padrão são, respectivamente, de acordo com as Equações 15 e 16 [97, 98]:

$$R = \exp\left(\theta + \frac{\omega^2}{2}\right) \quad \text{Eq. 15}$$

$$\sigma_R = \sqrt{\exp(2\theta + \omega^2) \cdot (\exp(\omega^2) - 1)} \quad \text{Eq. 16}$$

O fator estrutura das esferas [99], $S(q, R_{HS}, \eta)$ (Equação 10), leva em conta a proximidade das nanopartículas, criando um pico de correlação a $\sim 0.01 \text{ \AA}^{-1}$, onde R_{HS} é o raio da esfera e η é a fração de volume das NSM e NSM2.

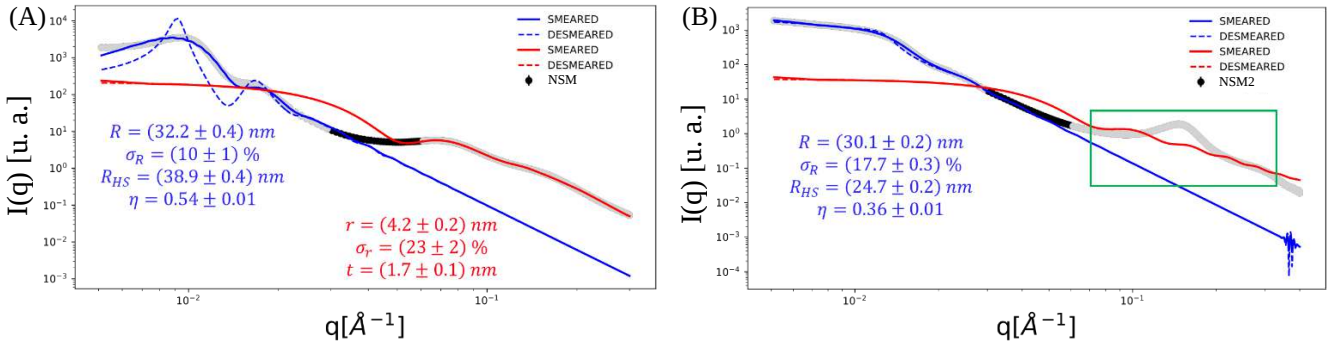


Figure 19. Fit parcial da curva aplicado aos dados de SAXS (linhas cinza e preto) das amostras (A) NSM e (B) NSM2.

Para avaliação dos mesoporos, assumiu-se que eles são buracos esféricos polidispersos na matriz de sílica, de acordo com a Figura 20 (A). Entretanto, esta hipótese não fornece um fit satisfatório. Considerando a formação de tais mesoporos, baseados em moldes em forma de micelas, foi aplicado, com sucesso, o modelo par buracos núcleo-casca (core-shell) polidispersos (Figura 20 (B)). Neste caso, o fator de forma é essencialmente dado pela Equação 11, exceto que $A(q, x)$ deve ser alterado por (Equação 17):

$$A_{cs}(q, x, t) = \frac{V(x+t)A(q, x+t) + (B_{CS} - 1)A(q, x)V(x)}{V(x+t) + (B_{CS} - 1)V(x)} \quad \text{Eq. 17}$$

Onde t é a espessura da parede do mesoporo e $B_{CS} = \frac{\Delta\rho_c}{\Delta\rho_{sh}}$ é a razão de contraste eletrônico entre o núcleo a casca. Sugerindo que o núcleo está totalmente vazio, $\Delta\rho_c = 0 \rightarrow B_{CS} = 0$.

Na Figura 19 (A e B) foram apresentados a aplicação da abordagem para o fit parcial da curva. Os parâmetros como raio das partículas e raio de mesoporos foram concordantes com os resultados de MET. Adicionalmente, a partir destes dados de fit parcial do SAXS, pode-se extrair informações sobre a polidispersividade das partículas.

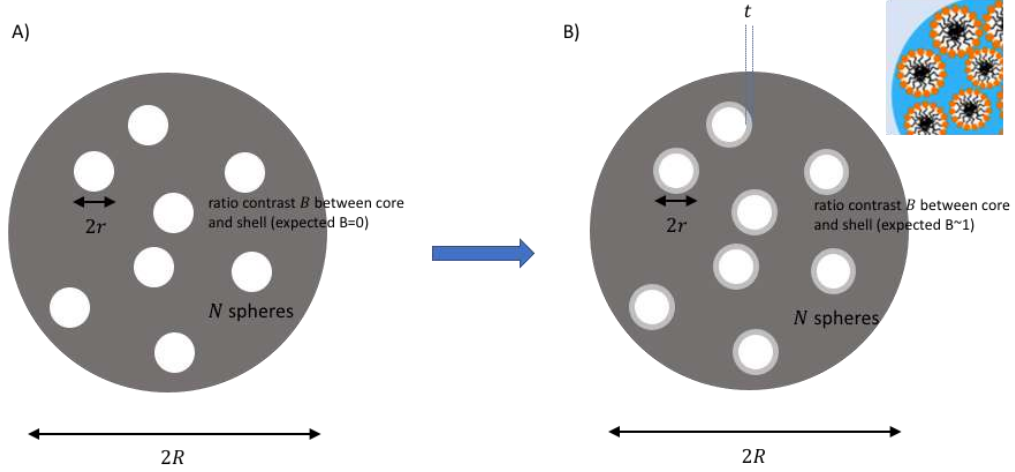


Figura 20. Aperfeiçoamento do modelo prévio (A), considerando os mesoporos como estruturas núcleo-casca (core-shell) (B) devido às micelas usadas nos estágios de síntese (inset da figura B).

Embora os fits estejam satisfatórios, objetiva-se obter a curva por inteiro, a qual poderia trazer mais informações sobre o sistema. Neste sentido, foi proposto a modificação do modelo da literatura [100], a fim de considerar mesoporos com estrutura núcleo-casca (Figura 20 (B)). Neste contexto, a Equação 10 foi mantida, substituindo $P(q, R, \sigma_R)$ por (Equação 18):

$$P(q) = \langle V_{MSN}^2 P_{MSN}(q) \rangle + N(B-1)^2 \langle V_m^2 P_m(q) \rangle + 2N(B-1) \langle V_{MSN} P_{MSN}(q) \rangle \langle V_m A_m(q) \rangle + N(N-1)(B-1)^2 \langle V_{MSN}^2 P_{MSN}(q) \rangle \langle P_m(q) \rangle \quad \text{Eq. 18}$$

Onde N é o número de mesoporos (' m ') dentro das nanopartículas e $B = \frac{\Delta\rho_c + \Delta\rho_{sh}}{\Delta\rho_{MSN}}$. Desde que $\Delta\rho_c = 0 \rightarrow$,

$B = \frac{\Delta\rho_{sh}}{\Delta\rho_{MSN}} < 1$. Os termos da expressão acima são dados abaixo (Equações 19 a 22):

$$\langle V^2 P(q) \rangle = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) V(x)^2 [A(q, x)]^2 dx}{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) V(x)^2 dx} \quad \text{Eq. 19}$$

$$\langle VP(q) \rangle = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) V(x) [A(q, x)]^2 dx}{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) V(x) dx} \quad \text{Eq. 20}$$

$$\langle P(q) \rangle = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) [A(q, x)]^2 dx}{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) dx} \quad \text{Eq. 21}$$

$$\langle VA(q) \rangle = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) V(x) A(q, x) dx}{\int_{-\infty}^{\infty} N(x) V(x) dx} \quad \text{Eq. 22}$$

O novo modelo proposto é apresentado na Figura 21. Embora o fit não esteja satisfatório, ele resume as possibilidades de ter mais informações sobre o sistema do que na abordagem anterior. Especificamente, podemos obter o número de mesoporos dentro das NSM assim como o parâmetro B , o qual está próximo da unidade ($B \sim 1$) (Figura 21 (B)), corroborando a hipótese feita no contraste de densidade média de elétrons do núcleo dos mesoporos.

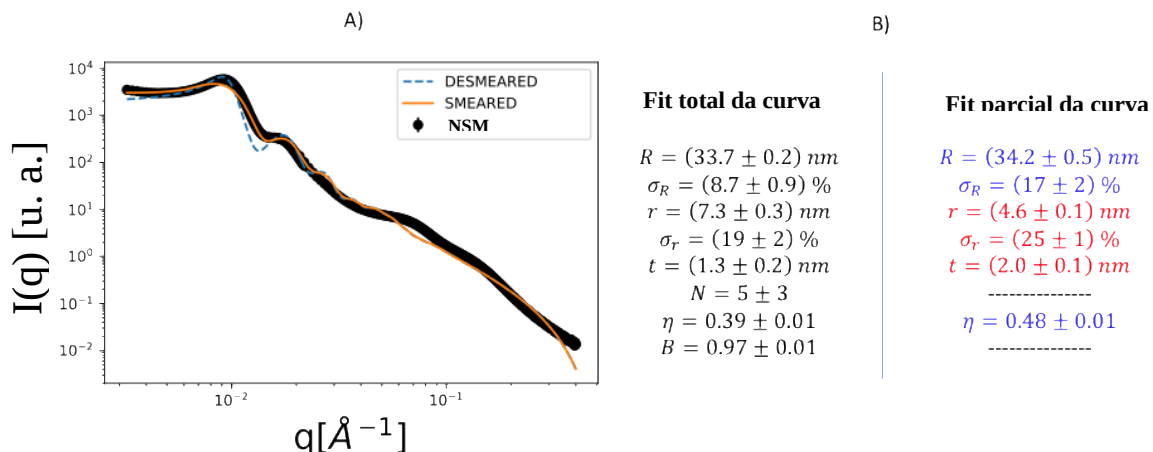


Figure 21. (A) Fit da curva inteira aplicada aos dados de SAXS (linhas cinza e preto) da amostra NSM. (B) Comparação dos valores dos parâmetros obtidos com a nova proposta de modelo.

É importante ressaltar que, para a Figura 19 (B), até o momento não foi realizado um fit satisfatório para a última parte da curva (marcado com retângulo verde) pois o modelo atribuído que considera poros distribuídos hexagonalmente não foi satisfatório. Portanto, outro modelo será proposto para se obter fits satisfatórios das duas partes da curva de SAXS, e consequentemente, gerar um fit total da curva satisfatório.

5.3. Funcionalização das NSMs com 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS)

Desta forma, após obtenção das NSM e NSM2, foram propostas algumas metodologias para funcionalização com MPTMS, sendo que a metodologia adaptada de [78, 79], foi a realizada com sucesso, de acordo com os resultados de análise termogravimétrica presentes nas Figuras 22 (a e b) e (c e d) .

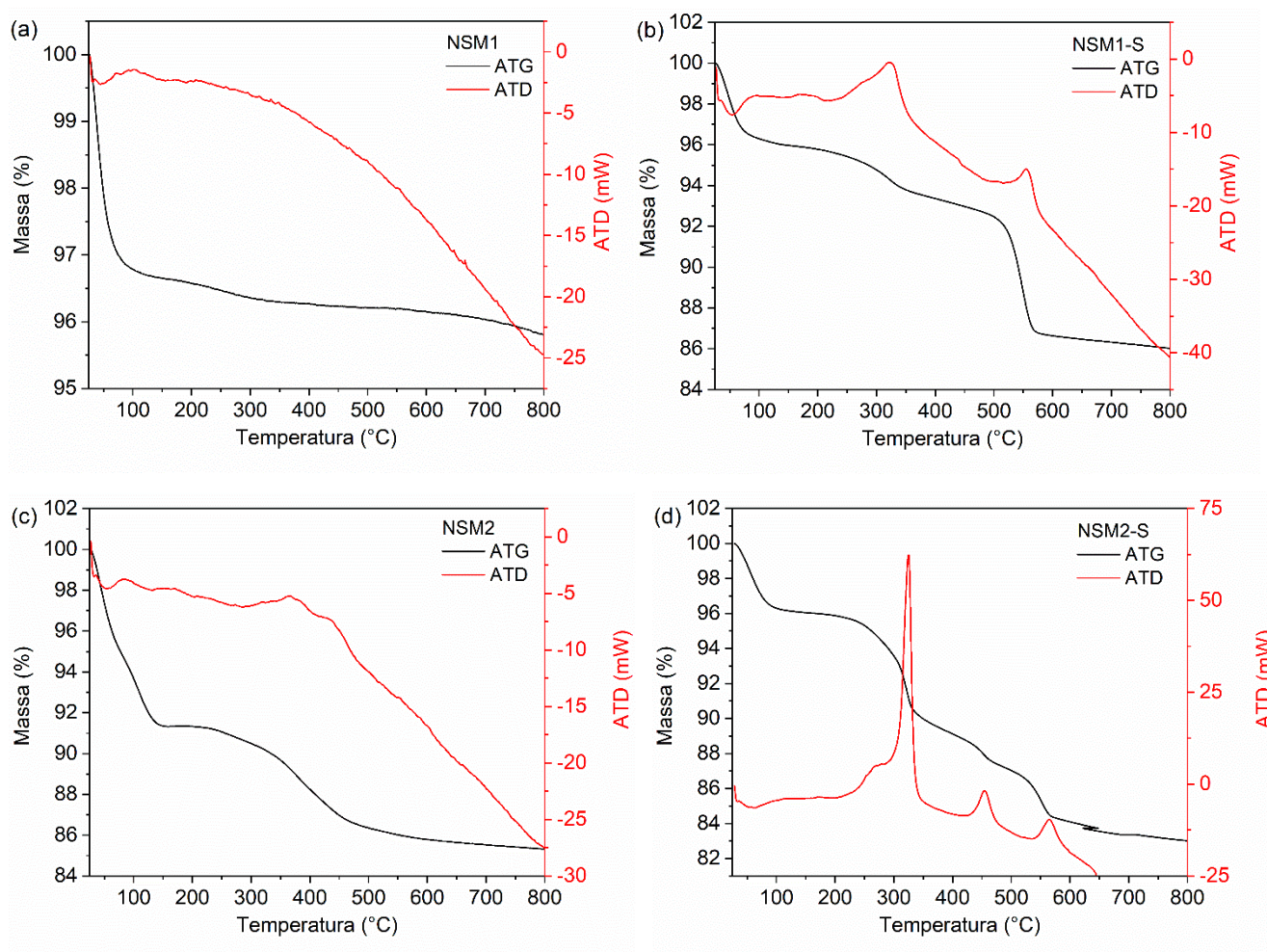


Figura 22. Curvas de análise termogravimétrica (ATG e ATD, linhas pretas e vermelhas, respectivamente) das (a) NSM, (b) NSM-S, (c) NSM2 e (d) NSM2-S.

Análises termogravimétricas (ATG e ATD, linhas preta e vermelha, respectivamente) foram realizadas de acordo com as curvas presentes na Figura 22 (a-d). Dois eventos característicos foram observados para ambos nanossistemas (Figuras 1 (a e c): primeiramente, eventos endotérmicos de 25 a 140 °C correspondentes a desidratação da matriz, eliminação de moléculas de água e solvente dessorvidas, com perda de massa em torno de 3,4 e 8,6 %, para as NSM e NSM2, respectivamente. O segundo evento (de 300 a 400 °C), com perda de massa de 0,4 e 3,2 % (para as NSM e NSM2, respectivamente) correspondem a mudanças estruturais atribuídas a condensação dos grupos silanois presentes nos poros/superfície da matriz. [73-75] É importante ressaltar que, de acordo com as Figuras 1 (a e c) as NSM2 apresentaram maior presença de silanois disponíveis do que as NSM. As Figuras 1 (b e d) correspondem as NSM e NSM2 modificadas com o MPTMS, respectivamente. Neste caso, é possível observar que, na faixa de 400 a 600 °C, os eventos exotérmicos correspondem à decomposição dos grupos alcóxissilanos funcionalizados nas matrizes, com perdas de massa de 6,7 e 5,0 %, respectivamente.

Experimentos da análise de gases liberados (EGA) foram realizados para as amostras NSM-S e NSM2-S, de acordo com as Figuras 23 e 24, respectivamente. Essa técnica consiste no acoplamento do

TGA-DSC com um FTIR, portanto, os gases liberados em função da temperatura de aquecimento e em determinados tempos, são detectados em espectros de FTIR. Assim, pode-se observar que, os gases liberados a partir da perda de massa correspondente, nos tempos de 52 e 51 min (Figuras 2(c) e 3(c), nos espectros de FTIR e TGA), são atribuídos a CO_2 e CO [101], muito provavelmente oriundo da funcionalização do alcóxido MPTMS, assim como bandas relacionadas a presença de compostos de enxofre, como SO_2 , SO_3 e S_2O [101], comprovando a presença de grupos SHs e, consequentemente, a funcionalização das NSMs.

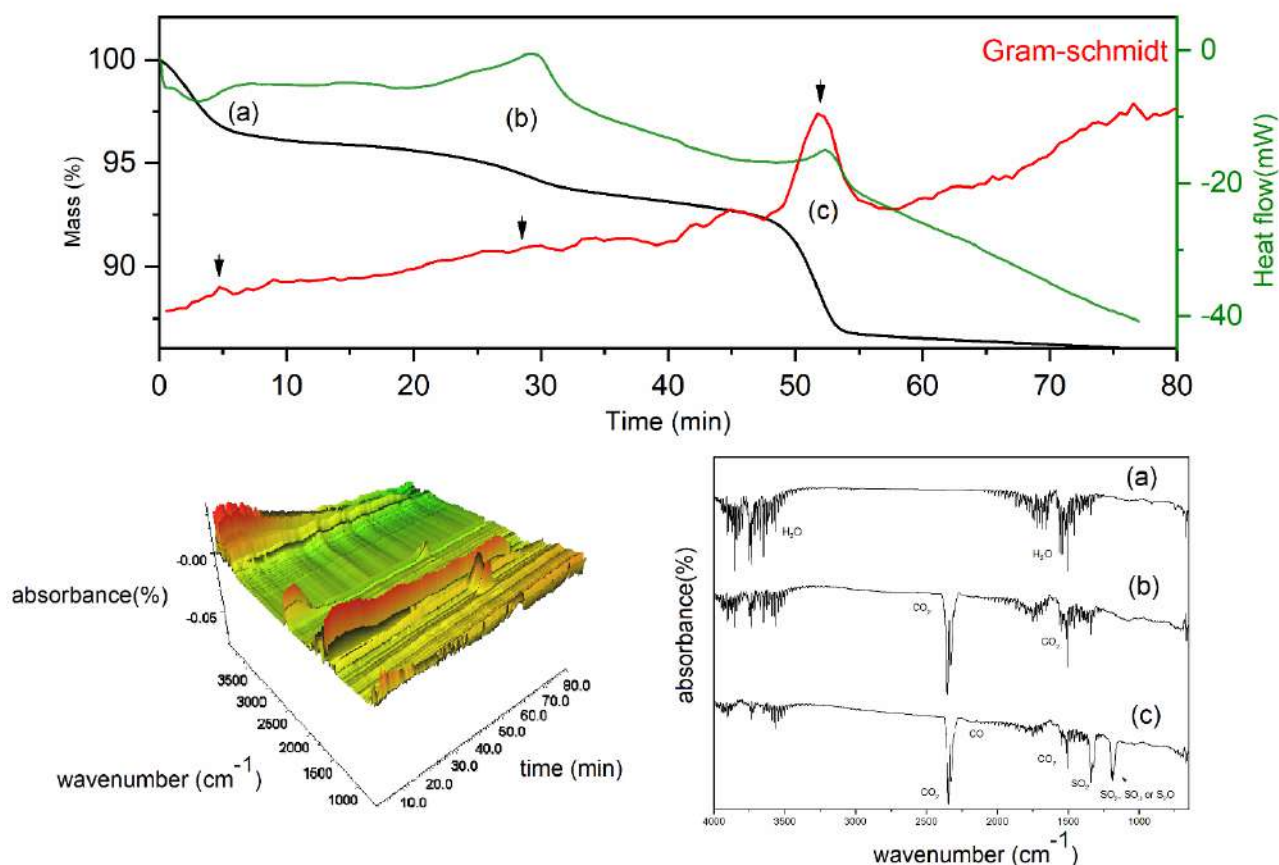


Figura 23. Curvas TG-DSC e Gram-schmidt (gases) associadas aos dados espectroscópicos, pela técnica de EGA (evolved gas analysis) da amostra NSM-S nos tempos (a) 6 min (b) 31 min e (c) 52 min.

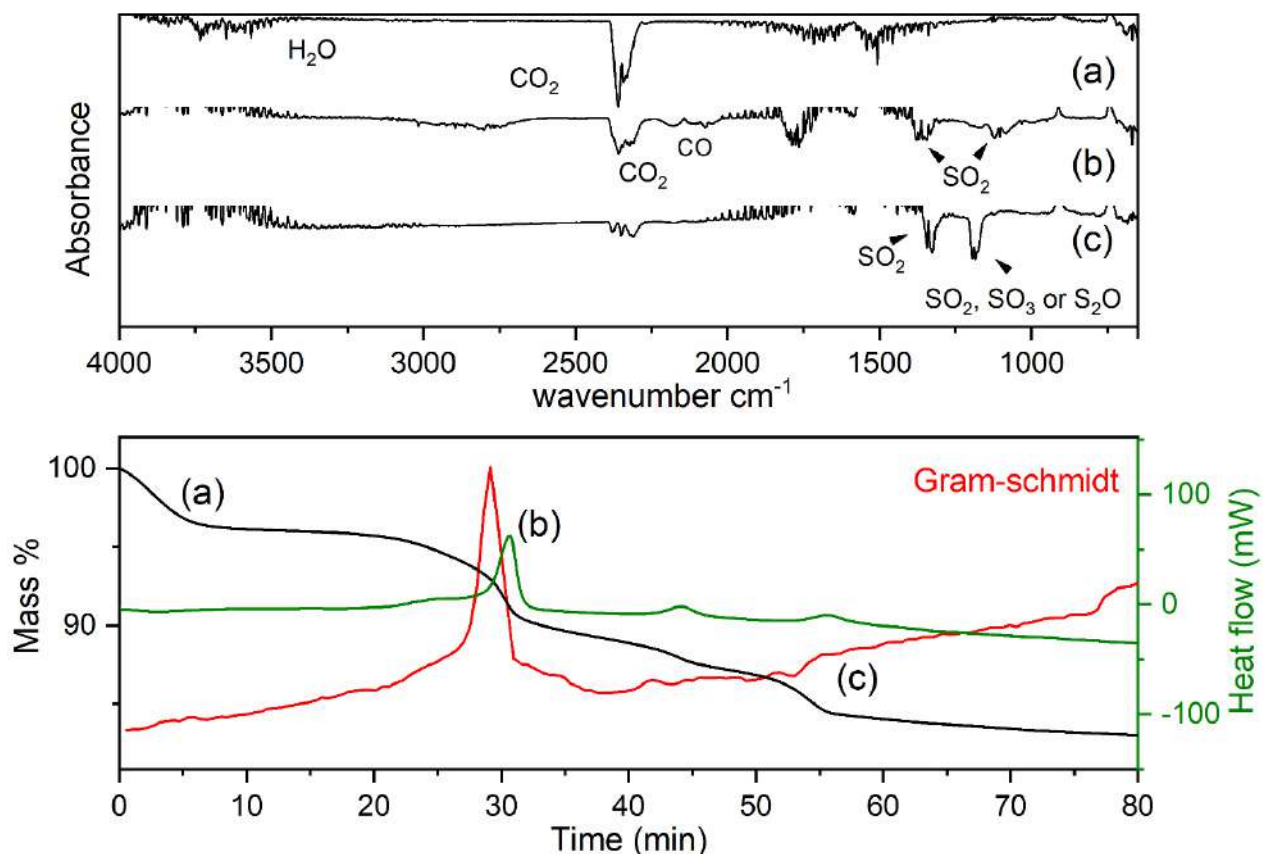


Figura 24. Curvas TG-DSC e Gram-schmidt (gases) associadas aos dados espectroscópicos, pela técnica de EGA (evolved gas analysis) da amostra NSM2-S nos tempos (a) 4 min (b) 23 min e (c) 51 min.

5.4. Modificação do FITC com APTES (FITC-APTES)

A modificação do FITC com APTES foi realizada de acordo com o item 4.3. Para confirmação da modificação, medidas de FTIR foram realizadas para o FITC puro, APTES puro e também o composto proposto FITC-APTES (Figura 25). De acordo com a literatura [102, 103], a banda observada em 2021 cm^{-1} (Figura 23, linha vermelha) é atribuída ao estiramento do grupo NCS na molécula de FITC ($\nu(\text{NCS})$). Desta forma, o desaparecimento da banda em 2021 cm^{-1} , atribuída ao grupo NCS, é um forte indicativo do acoplamento covalente do APTES ao FITC, como pode ser observado na representação das estruturas abaixo (Figura 25):

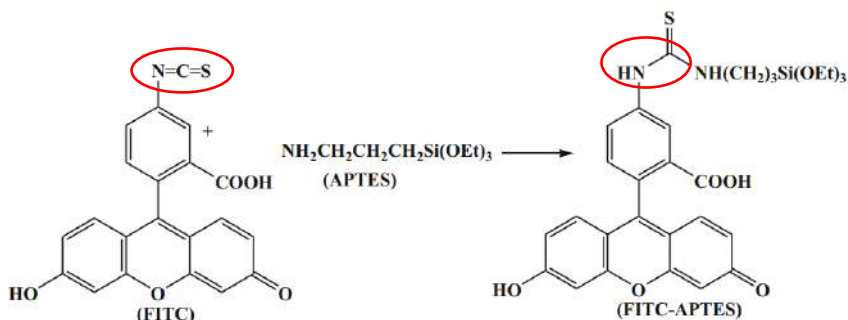


Figura 25. Representação esquemática da reação FITC com APTES.

Além disso, a banda intensa e larga na região de 1085 cm^{-1} observada na Figura 26 (linha preta) é característica de estiramento atribuídos às ligações Si-O-C ($\nu(\text{Si-O-C})$) também pode ser observada no espectro FITC-APTES, confirmando assim a presença dos grupos alcóxissilanos intactos para posterior modificação das matrizes de sílica. [104]

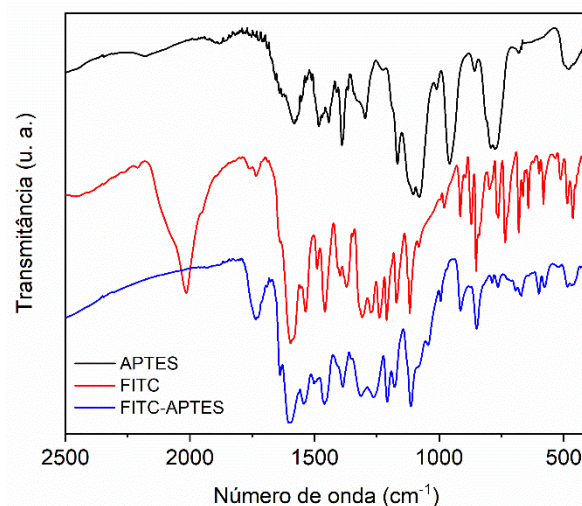


Figura 26. Espectros de infravermelho (FTIR) do APTES, FITC e FITC-APTES (linhas preta, vermelha e azul, respectivamente) diluídos em pastilha de KBr.

5.5. Modificação das NSM com FITC-APTES (NSM-FITC)

A modificação *in situ* das NSM foi realizada com o marcador preparado FITC-APTES, de acordo com metodologia descrita no item 4.4. Medidas de MET foram realizadas com o intuito de avaliar, ao adicionar o FITC-APTES durante a síntese das NSM, se alguma mudança morfológica ou estrutural seria obtida para as novas partículas NSM-FITC. A Figura 27 apresenta diversas imagens de MET em distintas magnificações, as quais confirmar a obtenção da estrutura intacta das NSM, sem alteração significativa de tamanho, estrutura e morfológica. Vale ressaltar que a estrutura de mesoporos distribuídos aleatoriamente foram mantidas, confirmando o sucesso da modificação *in situ* com o marcador FITC-APTES.

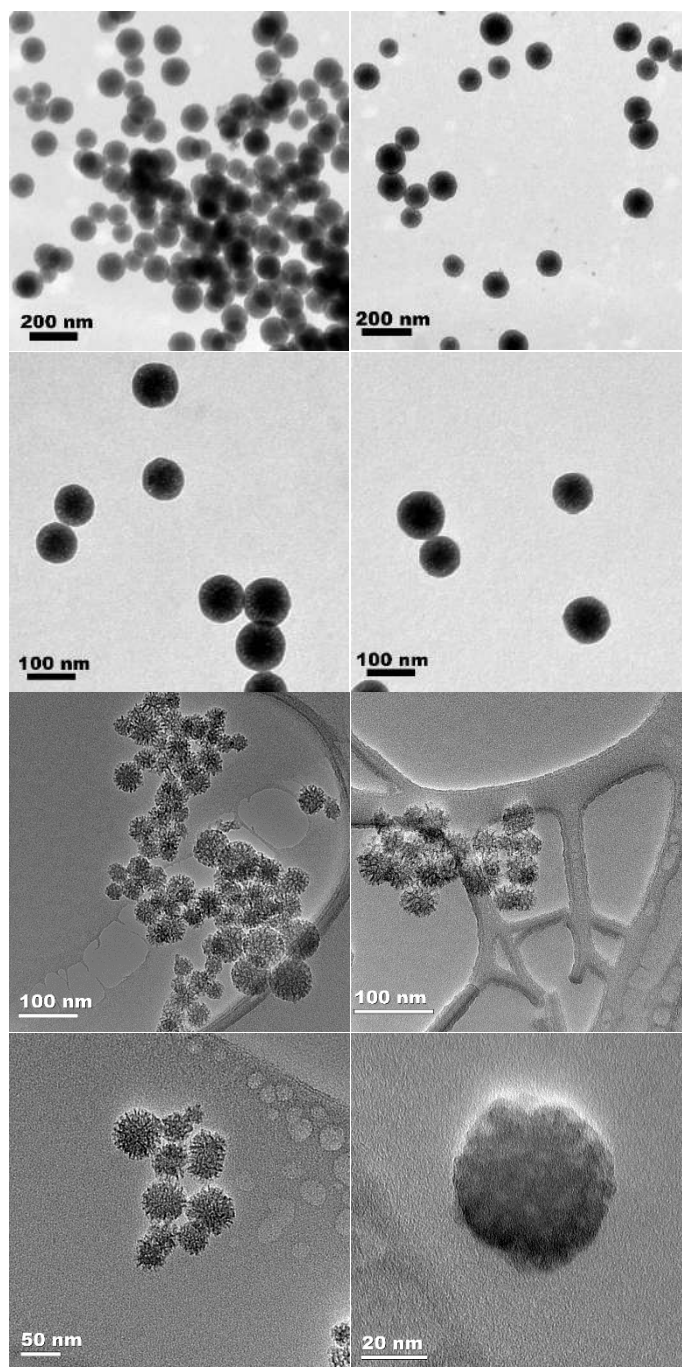


Figura 27. Microscopias eletrônicas de transmissão (MET) das NSM-FITC em diferentes magnificações.

Análises de NTA foram realizadas para confirmar os dados de MET avaliando o diâmetro hidrodinâmico das NSM-FITC obtidas. A Figura 28 e a Tabela 11 apresentam a concentração de partículas mL^{-1} em função do diâmetro hidrodinâmico e os valores médios obtidos, respectivamente, para as NSM-FITC. Foi possível observar que o diâmetro médio das NSM-FITC de $161,5 \pm 2,0$ nm foi ligeiramente maior que o obtido para as NSM ($146,3 \pm 1,8$ nm), o que pode ser atribuído a modificação *in situ* do FITC-APTES, promovendo um aumento no diâmetro médio das nanopartículas. Vale ressaltar os valores de cada população presente na suspensão, a partir dos valores de D10, D50 e D90 apresentados na Tabela 11, sendo a maior população atribuída ao diâmetro hidrodinâmico de $237,1 \pm 5,8$ nm, resultados concordantes com

as NSM pura. Além disso, pode-se confirmar via NTA a boa polidispersividade dos nanossistemas em suspensão, com valores de $2,32 \times 10^8$ partículas mL^{-1} e índice SPAN de 0,92. [105, 106]

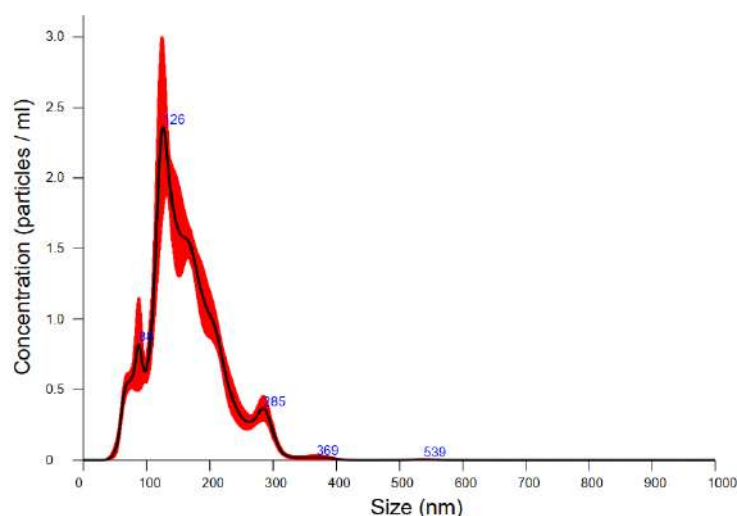


Figura 28. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) realizada para as NSM em suspensão aquosa (M: $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, $n = 5$).

Tabela 11. Tamanho médio, desvio padrão (DP), concentração de partículas por mL^{-1} e as populações majoritariamente presentes para as NSM-FITC em suspensão aquosa (média $\pm$ DP, $n = 5$).

NTA						
Tamanho médio (nm) $\pm$ DP	Moda (nm) $\pm$ DP	Concentração de partículas (10^8 mL^{-1}) $\pm$ DP	D10 (nm)	D50 (nm)	D90 (nm)	Índice SPAN
$161,5 \pm 2,0$	$127,8 \pm 12,2$	$2,32 \pm 0,11$	$97,6 \pm 4,5$	$151,7 \pm 3,2$	$237,1 \pm 5,8$	0,92

5.6. Impregnação das NSM-S e NSM2-S com docetaxel (DTX)

Após obtenção com sucesso das NSM1-S e NSM2-S, o método de impregnação do DTX nos poros das matrizes foi realizado de acordo com metodologia descrita no item 4.6., considerando NSMs:DTX (1:1, m/m), como descrito anteriormente.

5.7. Avaliação da EE e CC (em porcentagem) de DTX nas NSMs@DTX e nas NSMs@DTX

A eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC) foram determinadas de acordo com o item 4.7., a partir da extração do DTX dos mesoporos das NSMs e também das NSMs-S (modificadas com o MPTMS). Os valores de EE e CC para as NSM@DTX e NSM2@DTX e para os nanossistemas finais NSM@DTX-CTX e NSM2@DTX-CTX estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de Eficiência de Encapsulação (EE %) e capacidade de carga CC%) das extrações realizadas das nanopartículas, extrações (1:1, DTX:NSM) e os valores de desvio padrão (DP).

Amostras	EE %	Média	DP	CC %	Média	DP
NSM@DTX	98,82			0,59		
	97,17	97,63	1,03	1,41	1,18	0,52
	96,90			1,54		
NSM2@DTX	95,00			2,49		
	95,94	95,74	0,66	2,02	2,12	0,33
	96,28			1,85		
NSM-S@DTX	96,47			1,76		
	96,28	96,47	0,19	1,85	1,76	0,09
	96,67			1,66		
NSM2-S@DTX	96,15			1,92		
	96,67	96,45	0,26	1,66	1,77	0,13
	96,53			1,73		
Média ± desvio padrão (n = 3)						

Os valores de EE tanto para as extrações das NSMs@DTX quanto para as NSMs-S@DTX foram coerentes apresentando valores de EE entre 95 e 97 %. Wang et al. [69] relataram a preparação de nanoplateformas baseadas em nanopartículas de sílica mesoporosa com EE de DTX na faixa de 31,23 a 63,28 %. Wang et al. [107] descreveram a obtenção de NSM e a incorporação de DTX apresentando EE = 79,04 % ± 0,95 em NSM puras e 48,23% ± 0,91 em NSM funcionalizadas. Em outro estudo, Khosravian et al. [108] relataram a preparação de NSM funcionalizadas com valores de EE entre 9,78 e 20,81 % de DTX. Desta forma, os valores de EE % obtidos neste trabalho foram coerentes baseados na CC % variando entre 1.1 e 2.1 % para os nanossistemas avaliados.

5.8. Derivatização do Anticorpo Cetuximabe (CTX) via reagente de Traut

A tiolação do CTX via reagente de Traut descrita no item 4.8. foi confirmada por quantificação do CTX-S via ensaio de BCA, também descrito no item 4.8.1. A Figura 29 ilustra a modificação do CTX com reagente de Traut.

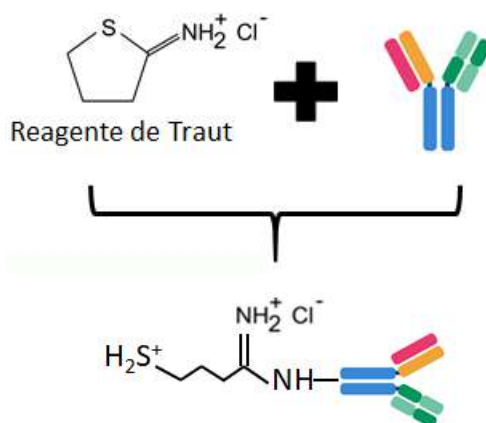


Figura 29. Representação esquemática da modificação do CTX com reagente de Traut, adaptado de [80].

O processo de modificação do CTX com reagente de Traut foi descrito e adaptado. [80] O CTX-S foi eluído em coluna PD-10 e separado para posterior modificação das NSMs, de acordo com a representação esquemática das frações recuperadas na Figura 30.

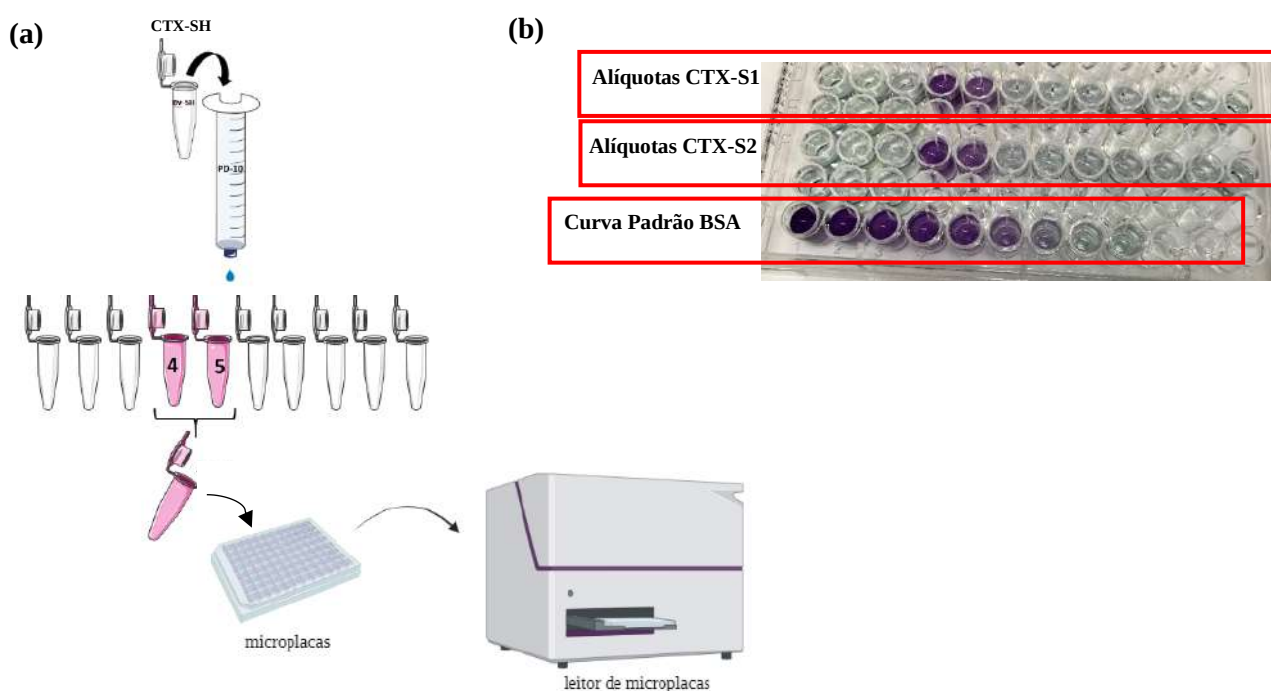


Figura 30. Representação esquemática da (a) separação via coluna PD-10 e quantificação do CTX-S sintetizado e (b) alíquotas e curva padrão analisados via leitor de microplacas.

Vale ressaltar que foram preparadas duas amostras de CTX-S (CTX-S1 e CTX-S2) para modificação das NSM e NSM2. Desta forma, através do leitor de microplacas, foi possível determinar os valores de absorbância, os quais, substituídos na curva padrão de BSA, nos fornecem para as amostras CTX-S1 e CTX-S2 concentrações de 780 e 782,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

5.8. Preparo das NSMs@DTX-CTX e avaliação da eficiência de funcionalização

O método de funcionalização via uso do agente oxidante H_2O_2 descrito no item 4.9. foi realizado com sucesso, de acordo com a representação esquemática da Figura 31 (a). A Eficiência de funcionalização das NSMs-S@DTX com o CTX-S pode ser comprovada através do ensaio de BCA realizado tanto para os nanossistemas NSMs@DTX-CTX quanto para as duas últimas lavagens (5 e 6), realizadas para eliminar todo CTX-S que não tinha sido funcionalizado nas NSMs-S@DTX. Desta forma, de acordo com a Figura 31 (b), fica claro que os nanossistemas contendo o fármaco foram funcionalizados com sucesso com o CTX-S, e que todo CTX-S que não tinha reagido, saiu nas primeiras lavagens pois não foram detectados nas lavagens 5 e 6. Os valores de concentração determinados para as NSM1@DTX-CTX ficaram entre 74 e 86 % enquanto para as NSM2@DTX-CTX ficaram em 100 %, ou seja, todo CTX-S adicionado foi funcionalizado. As porcentagens de funcionalização foram coerentes com os nanossistemas utilizados, pois de acordo com análises prévias das NSM1 e NSM2, ficou claro que a maior presença de silanois disponíveis nas NSM2 conduziram a uma modificação mais eficiente com MPTMS e consequentemente, favoreceu a funcionalização de uma concentração maior de CTX-S, quando comparado com as NSM1. As concentrações de anticorpo detectado para as amostras NSM1@DTX-CTX ficaram entre 582,5 e 680,5 $\mu g mL^{-1}$ enquanto para as amostras NSM2@DTX-CTX foi acima de 780 $\mu g mL^{-1}$. Os valores de eficiência de funcionalização determinados para as NSMs@DTX-CTX são extremamente interessantes levando em conta que eficiências de funcionalização de bevacizumabe (BVZ) na faixa de 62 % foram obtidas para carreadores lipídicos nanoestruturados [80] e, entre 53 e 59 % de eficiência de funcionalização de cetuximabe (CTX) foram obtidos em imunolipossomas. [30, 109]

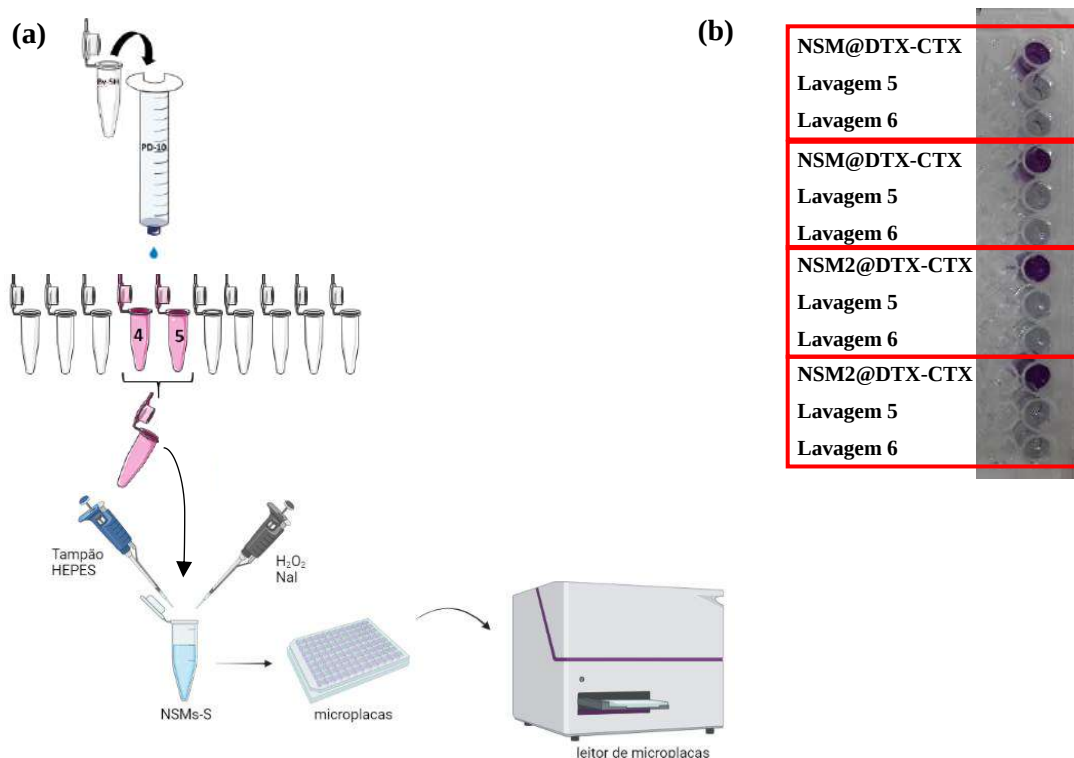


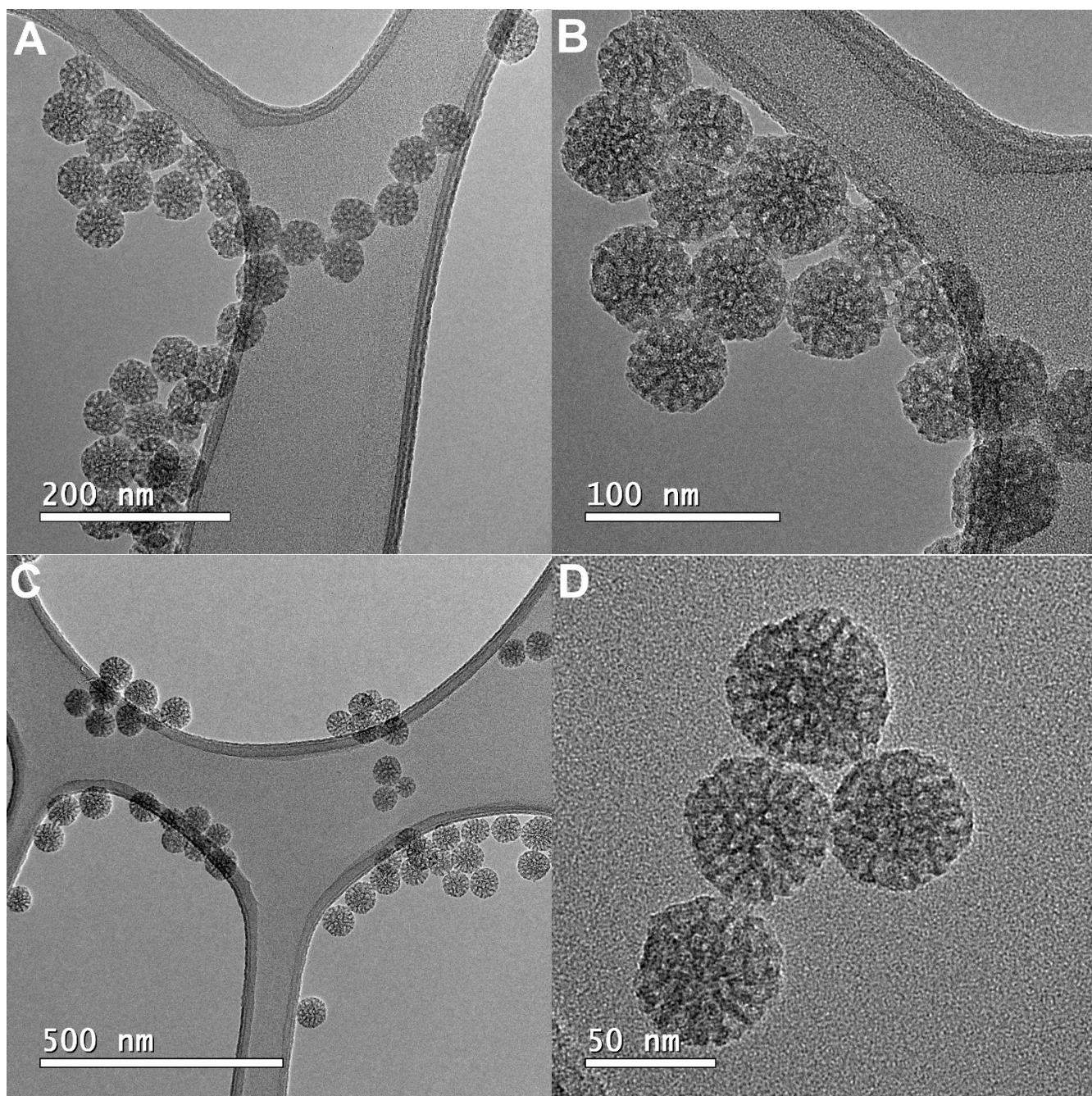
Figura 31. Representação esquemática da (a) preparação das NSMs@DTX-CTX e (b) quantificação do CTX presente nos nanossistemas após 6 lavagens para remoção de todo CTX-S que não reagiu.

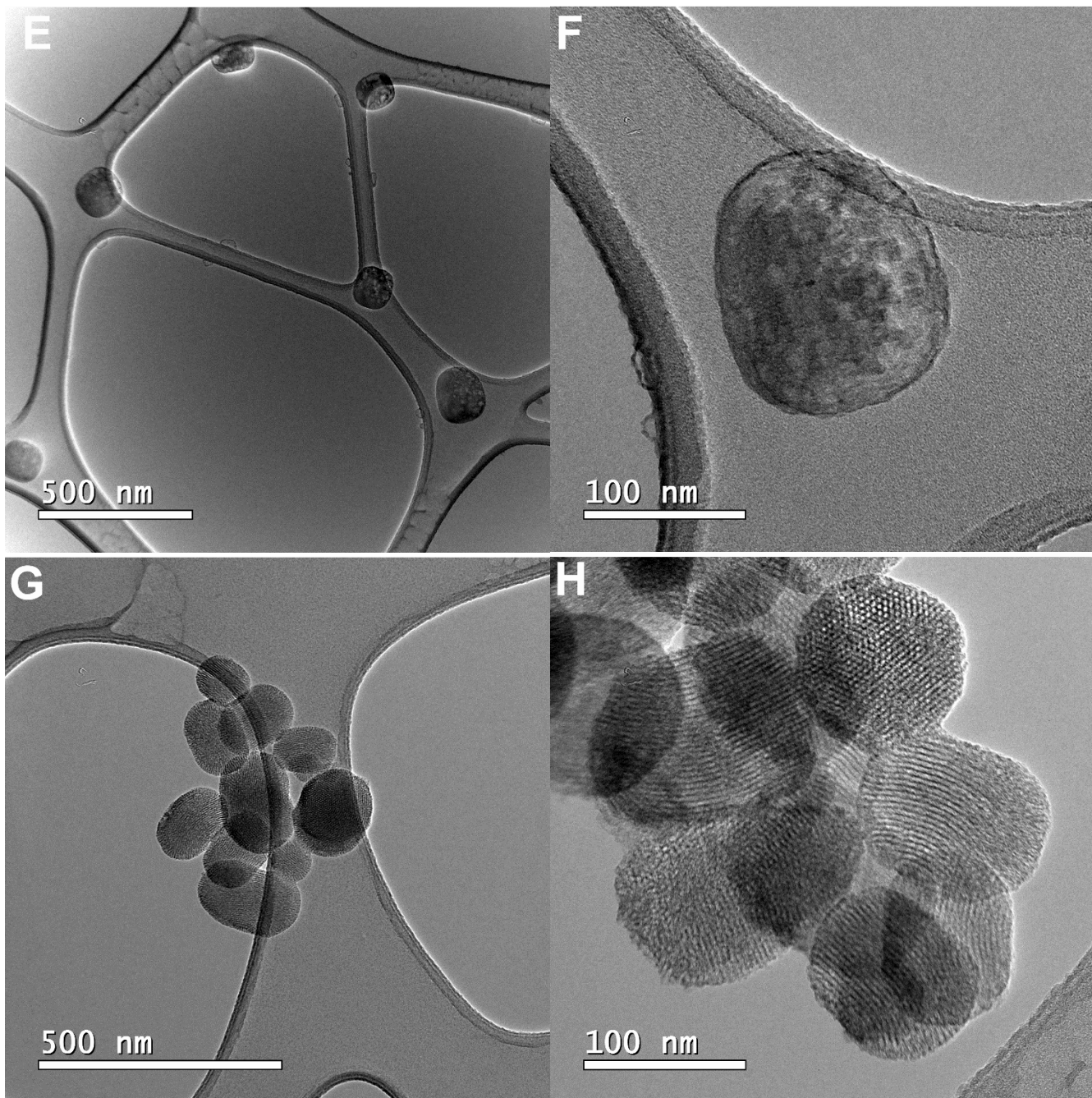
5.7. Caracterização físico-química dos nanossistemas NSMs@DTX-CTX

5.7.1. Avaliação da morfologia e estrutura dos nanossistemas

Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM) foi realizada com intuito de avaliar a morfologia e o diâmetro dos nanossistemas, assim como a disposição e estrutura de poros. Além disso, se seria possível observar modificações dos nanossistemas após a incorporação do DTX, assim como as etapas seguintes de funcionalização até chegar aos nanossistemas contendo CTX. A Figura 32 apresenta distintas magnificações das NSM (A e B), NSM@DTX (C e D), NSM@DTX-CTX (E e F), NSM2 (G e H), NSM2@DTX (I e J) e NSM2@DTX-CTX (K e L). As NSM preparadas são esféricas, monodispersas, altamente porosas, com poros obtidos em escala nanométrica, distribuídos aleatoriamente pela matriz [72-75], como observado na Figura 32 (A e B). As NSM@DTX (Figura 32 (C e D)) apresentaram perfil similar às NSM1, sem alteração no tamanho e na estrutura de poros após incorporação do DTX. Porém, para a amostra NSM1@DTX-CTX (Figura 32 (E e F)), é possível observar o preenchimento dos poros e até um certo revestimento das nanoestruturas, indicando que a funcionalização com CTX nas NSM foi efetiva. Já no caso das NSM2 (Figura 32 (G e H)), as nanopartículas são parcialmente esféricas, com poros distribuídos de forma organizada pela matriz [77]. As NSM2@DTX apresentaram o mesmo perfil das NSM2, exceto pelo fato da dificuldade de se observar os poros organizados hexagonalmente, sugerindo que o DTX foi efetivamente incorporado nas NSM2. Para a amostra NSM2@DTX-CTX (Figura 32 (K e L)), a mesma dificuldade de observação dos poros foi detectada com a presença de um possível revestimento na superfície, indicativo do sucesso da funcionalização do CTX na superfície/poros nas NSM2.

Os diâmetros médios obtidos foram na faixa de 50 e 100 nm para as NSM e NSM2, respectivamente, concordantes com a literatura [74, 75, 77] e com resultados prévios de DLS, NTA e outras microscopias (relatório prévio). O diâmetro médio foi similar para as NSM@DTX e NSM2@DTX, enquanto para os nanossistemas NSM@DTX-CTX e NSM2@DTX-CTX foi possível observar um aumento no diâmetro médio, sugerindo a presença do anticorpo na superfície/poros das nanopartículas.





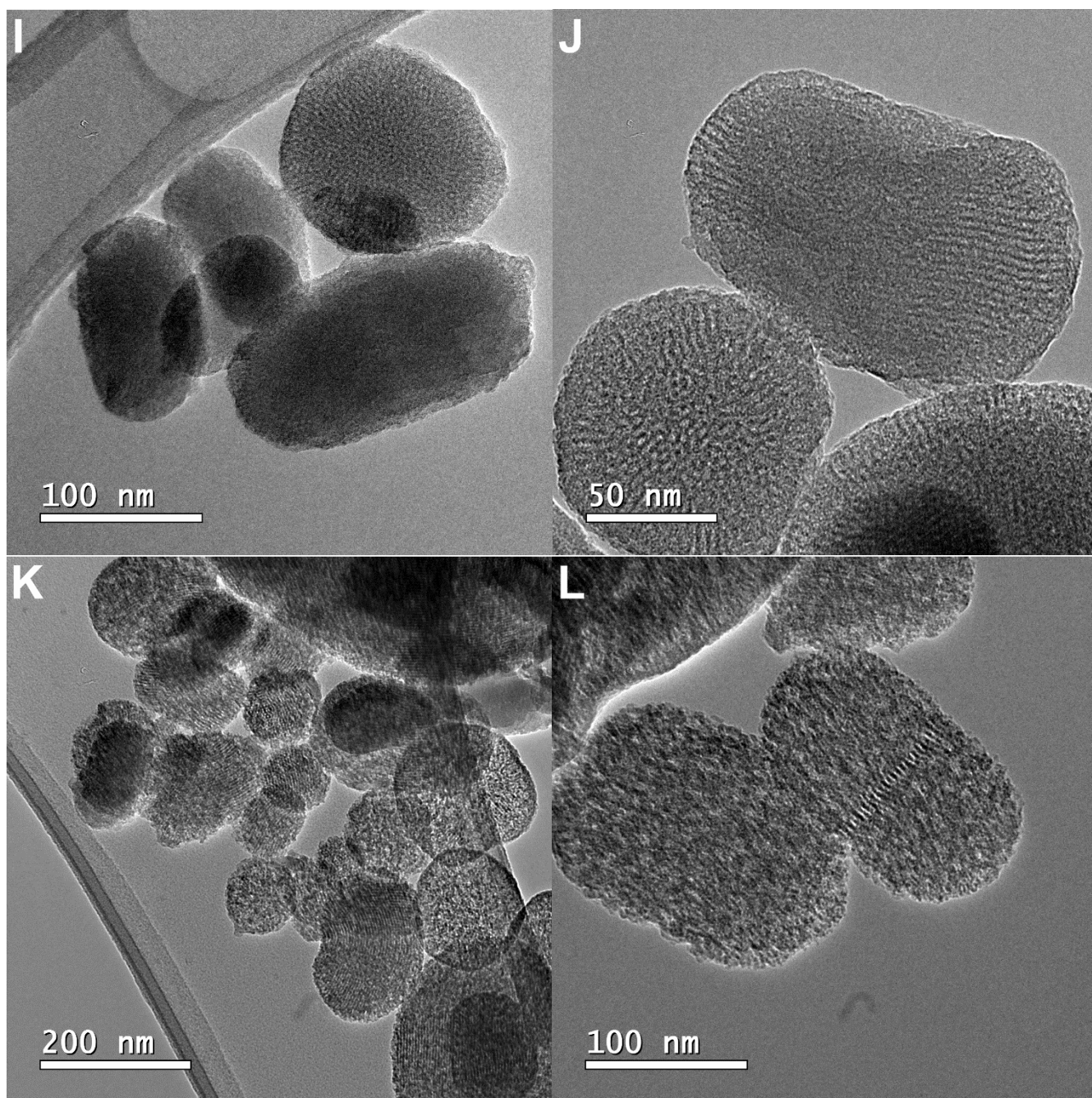


Figura 32. Microscopias eletrônicas de transmissão de alta resolução (HR-TEM) das amostras (A, B) NSM1, (C, D) NSM@DTX, (E, F) NSM@DTX-CTX, (G, H) NSM2, (I, J) NSM2@DTX e (K, L) NSM2@DTX-CTX em diferentes magnificações.

5.8. Ensaios de Quantificação dos grupos tiois presentes no CTX-S e nas NSMs-S

Com o intuito de avaliar a estabilidade dos grupos SH presentes em solução e aumentar a eficiência de funcionalização entre as NSMs-S e os CTX-S, para eficiente formação de ponte dissulfeto, foi proposta a quantificação de grupos tiol em ambos os sistemas, via reagente de Ellman, que reage com os grupos SHs disponíveis e pode ser quantificado via espectrofotometria (Figura 33). Os grupos Tióis reagem com o DTNB, clivando a ligação dissulfeto para dar 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^- , composto dissulfeto), que

ioniza para o di-ânion TNB^{2-} em água em pH alcalino (pH 8,5). Este íon TNB^{2-} tem uma cor amarela e pode ser quantificado via espectrofotometria com comprimento de onda fixo em 450 nm.

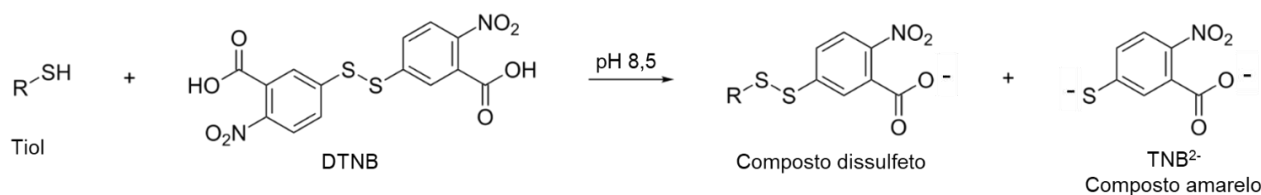


Figura 33. Esquema reacional para quantificação dos grupos SHs com o reagente de Ellman (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico), DTNB), produzindo o composto dissulfeto e o TNB^{2-} .

De acordo com a literatura, sabemos que a presença ativa dos grupos SH livres pode ser reduzida via conjugação espontânea (em solução) das ligações entre os grupos tiol de compostos tiolados, formando pontes dissulfeto indesejáveis entre eles. [110] Na tabela 13, estão apresentados os resultados que, confirmam o descrito na literatura, os CTX-S em solução (quando estocados em tampão), inicialmente não apresentaram grupos SH livres, provavelmente devido a formação da ligação dissulfeto entre os CTX-S em solução. [111] Porém, após adição de agente redutor NaBH_4 , as ligações $\text{S}=\text{S}$ formadas foram quebradas tornando novamente disponíveis os SH, sendo assim possível quantificá-los. Valores entre 11 e 13 μg de tiol mL^{-1} foram determinados para as amostras de CTX-S. Por outro lado, e não menos importante, as NSM1 modificadas com FITC foram avaliadas, contendo grupos tióis ou não (NSM1-FITC e NSM1-FITC-S). De acordo com os resultados da Tabela 13, foi possível observar que os grupos SH disponíveis nas NSMs estão presentes e foram quantificados. A presença dos grupos SH livres nas NSM1-FITC-S pode ser explicada pelo material ser estocado como pó em dessecador, portanto na ausência de solvente, o que poderia favorecer a formação de pontes dissulfeto. As amostras contendo tiol ou não, NSM1-FITC-S e NSM1-FITC, apresentaram 118,4 e 1,5 μg de tiol mL^{-1} , sendo a NSM1-FITC usada como controle para comparação. Desta forma, podemos concluir que as NSMs quando modificadas com MPTMS estão aptas para posterior funcionalização. Atenção maior deve ser dada a preservação dos CTX-S, os quais em solução podem realmente reagir entre eles reduzindo a eficiência de funcionalização nas NSMs.

Tabela 13. Quantificação de grupos tiol nas amostras de anticorpo funcionalizados (CTX-S 1 e CTX-S 2) e NSMs modificadas com grupo MPTMS (NSMs-FITC-S).

Amostras	SH livre (μg tiol mL^{-1})	$\text{S}=\text{S} + \text{SH}$ (μg tiol mL^{-1})
CTX-S 1	0	$13,07 \pm 0,078$
CTX-S 2	0	$11,01 \pm 0,066$
NSMs-FITC-S	$118,42 \pm 0,71$	$22,68 \pm 0,26$
NSMs-FITC	$1,56 \pm 0,0093$	$7,34 \pm 0,0064$

5.9. Estudos em cultura celular

5.9.1. Avaliação de citotoxicidade em célula de câncer de próstata PC3 e DU145

As atividades antitumorais das formulações NSM (neste caso, somente as com poros organizados, chamadas anteriormente de NSM2), NSM@DTX, NSM@DTX-CTX e solução de DTX foram reavaliadas em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata PC3 (baixa expressão de receptores EGF) e DU145 (elevada expressão de receptores EGF) [112] após repreparação das formulações. De acordo com os dados obtidos e já reportados anteriormente (item 5.9.1.) foi possível observar uma redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular de ambas as linhagens com a adição do tratamento com solução de DTX. Estes resultados corroboram os ensaios realizados anteriormente confirmando o potencial antitumoral do DTX, apresentando valores de IC_{50} de 8,70 nM e 4,38 nM para PC3 e DU145, respectivamente. [113, 114]

Ao avaliar a citotoxicidade das formulações desenvolvidas contendo DTX (NSM@DTX e NSM@DTX-CTX) foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (células tratadas com NSM puras) apenas para as NSM@DTX-CTX (Figuras 34-37). Entretanto, de acordo com a Tabela 14, apenas os resultados referentes ao DTX em solução de DMSO (para ambas PC3 e DU145) e a amostra NSM@DTX-CTX em meio de DU145 foram representativos ($R^2 > 0,9$). Considerando o resultado para a amostra NSM@DTX-CTX em meio de DU145 (Figuras 36 e 37, linhas violetas), o valor de IC_{50} obtido foi de 69,99 nM, confirmando a citotoxicidade do nanossistema.

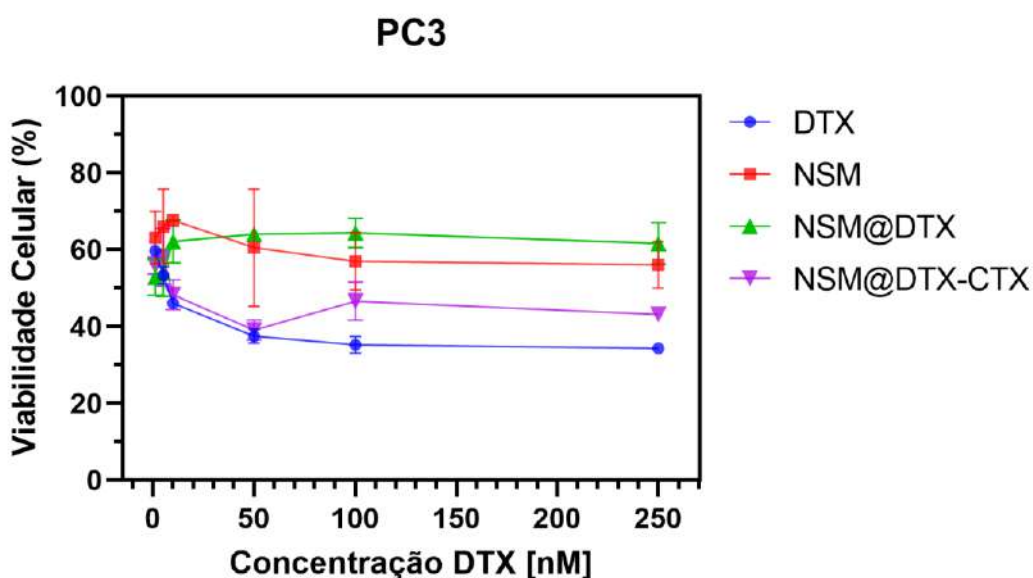


Figura 34. Efeito antiproliferativo das formulações e do fármaco DTX sobre a linhagem celular PC3 após 48 h de tratamento. Dados representados como média $\pm$ Desvio padrão ($n = 3$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ denotam diferença significativa em comparação à NSM pura (NSM).

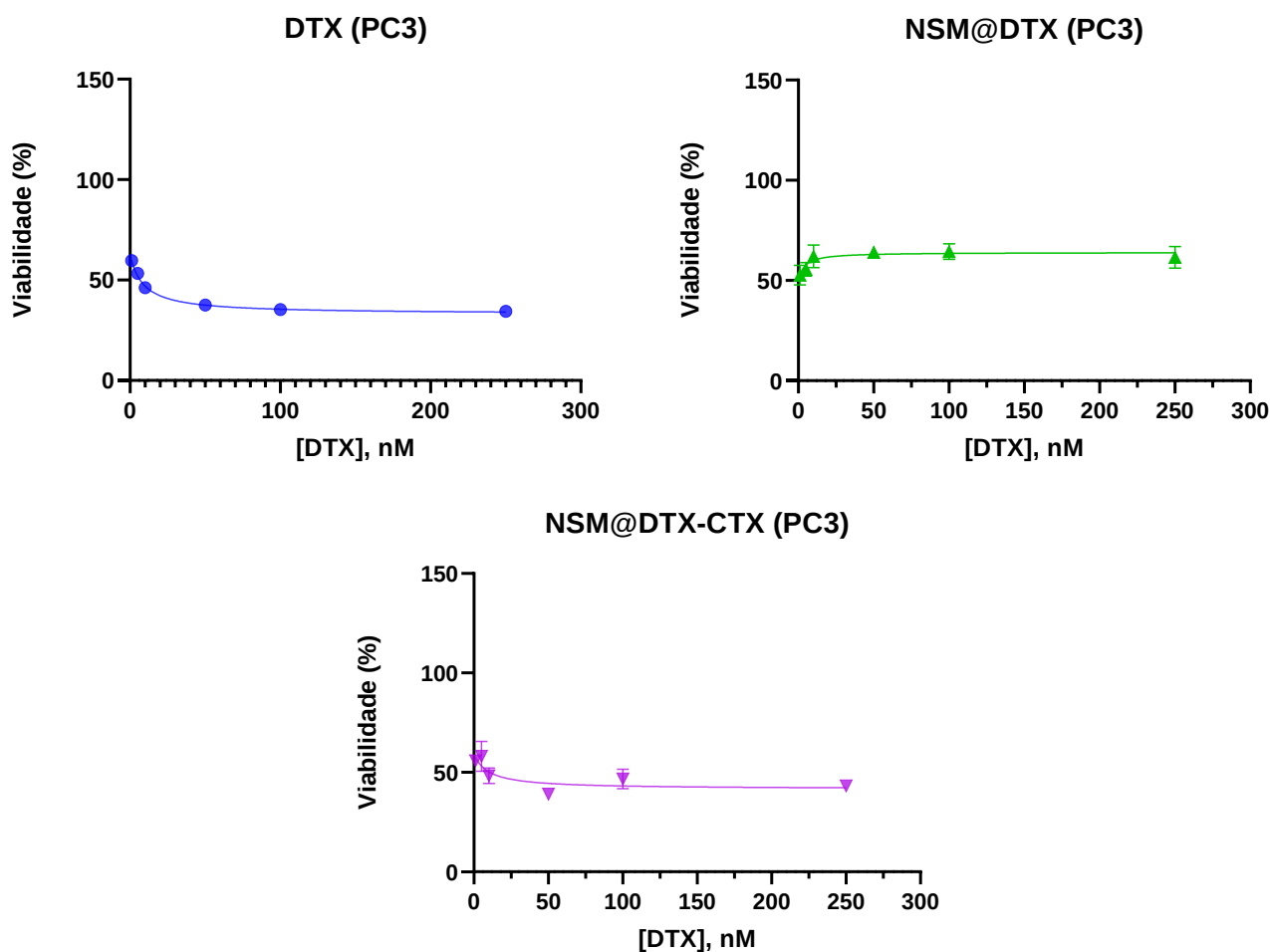


Figura 35. Efeito antiproliferativo do DTX (linha azul), NSM@DTX (linha verde) e NSM@DTX-CTX (linha violeta) sobre a linhagem celular PC3 após 48 h de tratamento, para melhor visualização. Dados representados como média $\pm$ Desvio padrão ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ denotam diferença significativa em comparação à NSM pura (NSM).

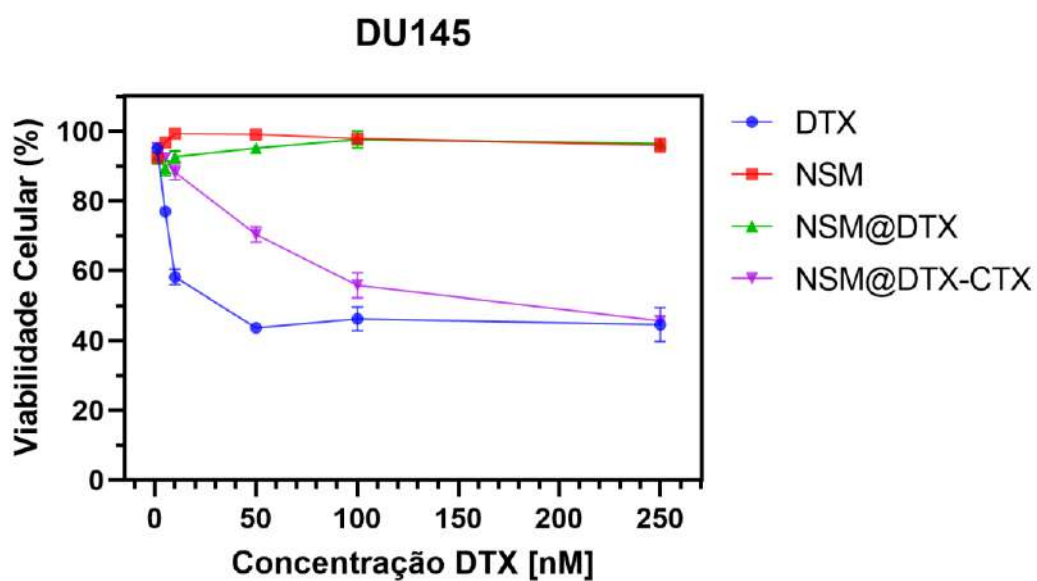


Figura 36. Efeito antiproliferativo das formulações e do fármaco DTX sobre a linhagem celular DU145 após 48 h de tratamento. Dados representados como média $\pm$ Desvio padrão ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ denotam diferença significativa em comparação à NSM pura (NSM).

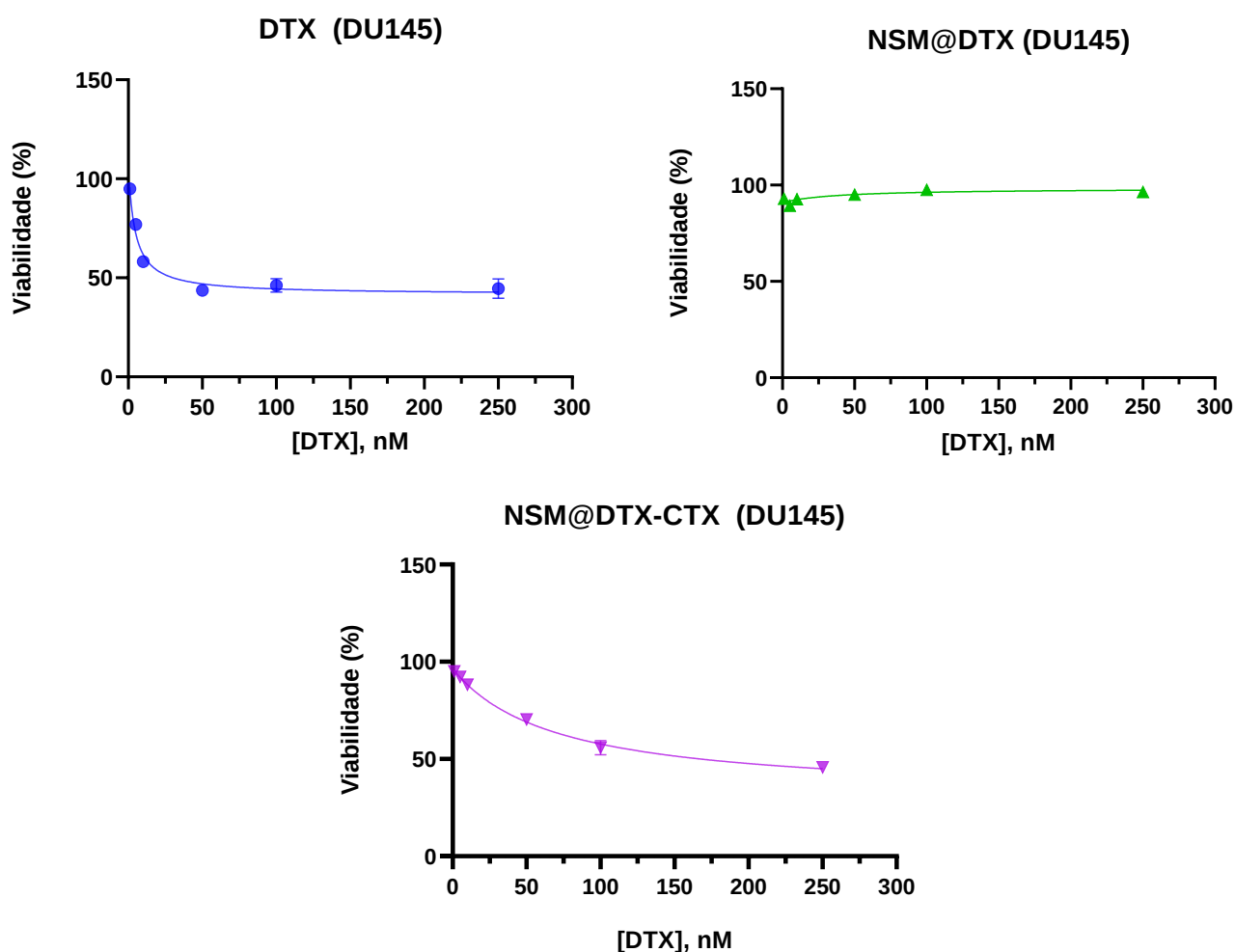


Figura 37. Efeito antiproliferativo do DTX (linha azul), NSM@DTX (linha verde) e NSM@DTX-CTX (linha violeta) sobre a linhagem celular DU145 após 48 h de tratamento, para melhor visualização. Dados representados como média $\pm$ Desvio padrão ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ denotam diferença significativa em comparação à NSM pura (NSM).

Tabela 14. Valores de IC₅₀ e R² para as formulações testadas nas linhagens DU145 e PC3.

Linhagem celular	Formulações	IC ₅₀ (nM)	R ²
DU145	DTX	4,386	0,96
	NSM@DTX	38,92	0,55
	NSM@DTX-CTX	69,99	0,98
PC3	DTX	8,704	0,97
	NSM@DTX	3,626	0,52
	NSM@DTX-CTX	9,667	0,57

A Figura 38 apresenta o efeito das diferentes concentrações de amostra que foram avaliadas frente às células DU145 após 48 h de tratamento. Como descrito anteriormente, considerando os resultados do DTX puro e das NSM@DTX-CTX representativos, podemos observar que ambos foram citotóxicos.

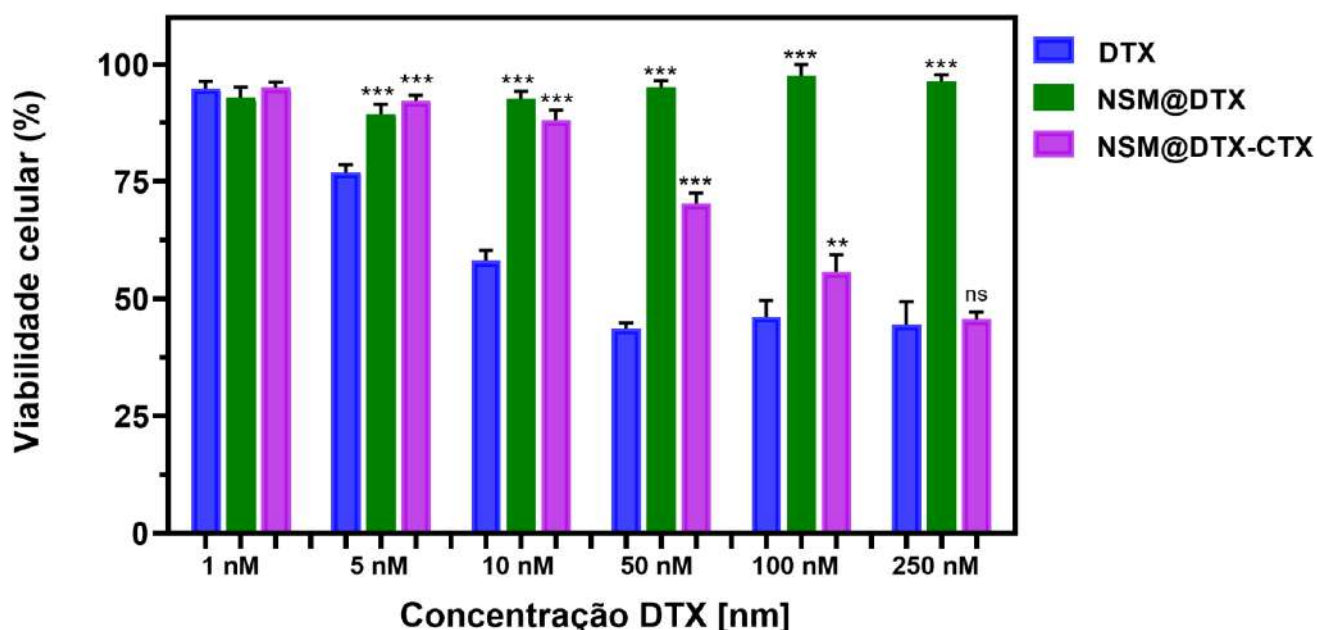


Figura 38. Efeito das diferentes concentrações das formulações sobre o percentual de viabilidade da linhagem DU145 após tratamento de 48 h. Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão com * $P < 0,1$, ** $P < 0,01$, e *** $P < 0,001$ ($n = 3$). ns: não significativo segundo teste ANOVA

Considerando os resultados obtidos para o nanossistema NSM@DTX-CTX (valores confiáveis de citotoxicidade) em relação a linhagem DU145, a qual superexpressa o receptor EGF, a análise de citometria de fluxo para as NSM pura e NSM modificado com CTX foram realizadas a fim de quantificar a internalização celular. Para visualização dos nanossistemas, foi utilizada as NSM modificadas com o marcador fluorescente FITC (amostra NSM-FITC) e também funcionalizadas com o anticorpo CTX (amostras NSM-FITC-CTX), de acordo com as Figuras 39 e 40. Para realização das medidas, o iodeto de propídio (marcador fluorescente) que possui alto peso molecular e baixa lipofilicidade é usado por ser incapaz de internalizar as células cuja membrana plasmática esteja intacta – observado em células viáveis ou apoptóticas - sendo sua presença dentro das células um indicativo de rompimento da membrana por morte celular do tipo necrose ou apoptose tardia. Já o FITC foi utilizado para identificar a internalização ou não das nanopartículas. Desta forma, o tratamento da linhagem DU145 com as NSM-FITC (Figura 39 A) praticamente não apresentou alteração na viabilidade celular das células (Q_3 próximo a 99,3 %) e ao mesmo tempo não foi observada internalização celular (Q_2 e Q_4 , próximo a 0 %). Já para o tratamento com NSM-FITC-CTX (Figura 39 B) após 6 h de incubação foi observado apenas 59,8 % de células viáveis e não internalizadas (valor de Q_3) com células mortas e viáveis sendo internalizadas, correspondendo a Q_2 :

15,6 % e Q₄: 24,5 %, respectivamente. A Figure 40 confirma os resultados obtidos mostrando uma melhor visualização dos nanossistemas internalizados ou não. Os valores calculados de internalização das NSM-FITC e NSM-FITC-CTX foram de $0,5 \pm 0,1$ % e $44,2 \pm 5,2$ %, respectivamente. Os resultados de citometria de fluxo confirmam parte dos resultados das análises de citotoxicidade realizadas, destacando a importância do anticorpo CTX para promover rápida internalização nas células DU145 que superexpressam o receptor EGF, consequentemente favorecendo a ação dos nanossistemas contendo DTX na morte celular. É importante realçar que, de acordo com o pouco que é apresentado para ação de nanossistemas contendo DTX em células DU145 [118], os resultados de internalização e morte celular são relevantes considerando o período de 6 h de incubação. Para melhor análise e comparação, a citometria de fluxo será realizada também para a linhagem PC3 pois não foi possível obter o referido resultado devido à dificuldade no crescimento desta linhagem celular.

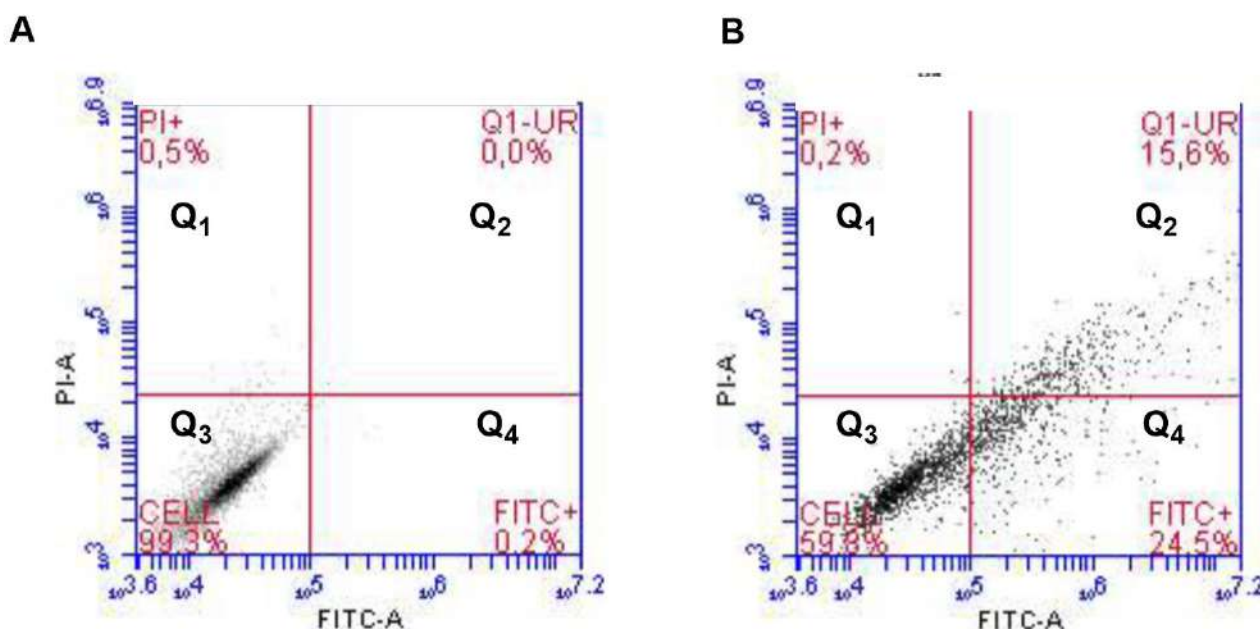


Figura 39. Gráfico de citometria de fluxo após 6 h de incubação da linhagem DU145 com (A) NSM-FITC e (B) NSM-FITC-CTX considerando 20 nM de cada amostra. Os quadrantes Q₁, Q₂, Q₃ e Q₄ representam, respectivamente: células mortas e nanopartículas não internalizadas (iodeto de propídio positivas e FITC negativas); células mortas e nanopartículas internalizadas (iodeto de propídio positivas e FITC positivas); células viáveis e nanopartículas não internalizadas (iodeto de propídio negativas e FITC negativas); células viáveis e nanopartículas internalizadas (iodeto de propídio negativas e FITC positivas). Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão com *P < 0,1, **P < 0,01, e ***P < 0,001 (n = 3). ns: não significativo segundo teste ANOVA

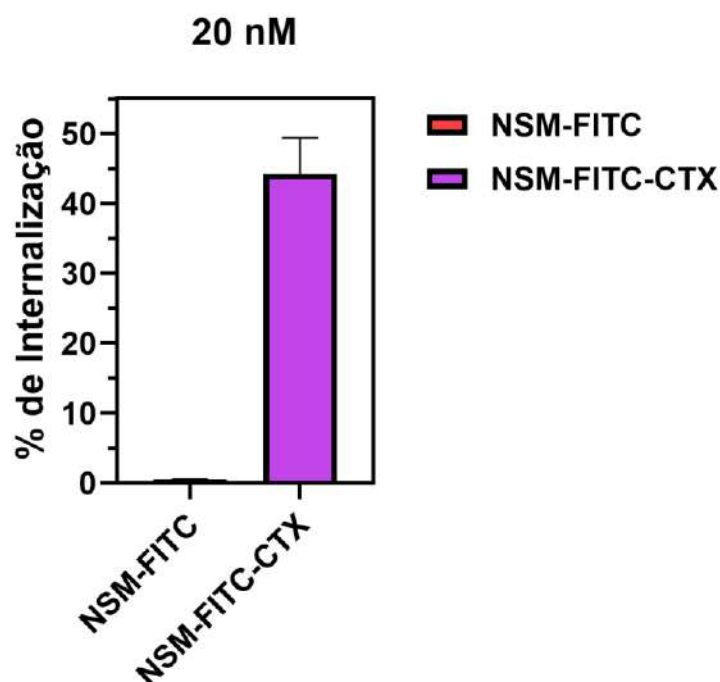


Figura 40. Representação dos dados de citometria de fluxo após 6 h de incubação da linhagem DU145 com (A) NSM-FITC e (B) NSM-FITC-CTX considerando 20 nM de cada amostra. Os quadrantes Q₁, Q₂, Q₃ e Q₄ representam, respectivamente: células mortas e nanopartículas não internalizadas (iodeto de propídio positivas e FITC negativas); células mortas e nanopartículas internalizadas (iodeto de propídio positivas e FITC positivas); células viáveis e nanopartículas não internalizadas (iodeto de propídio negativas e FITC negativas); células viáveis e nanopartículas internalizadas (iodeto de propídio negativas e FITC positivas). Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão com *P < 0,1, **P < 0,01, e ***P < 0,001 (n = 3). ns: não significativo segundo teste ANOVA

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visando o desenvolvimento de nanoplataformas inteligentes baseadas em sílica, contendo docetaxel (DTX) como fármaco para o tratamento do câncer de próstata, primeiramente foi realizada a validação do método analítico para a quantificação do docetaxel (DTX) via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com os parâmetros preconizados pelos órgãos regulatórios. O método demonstrou ser linear, preciso, exato e seletivo, sendo capaz de detectar e quantificar baixas concentrações de DTX (LD e LQ = 0,502 e 1,675 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Posteriormente, nanopartículas de sílica mesoporosas com poros distribuídos aleatoriamente (NSM) e com poros organizados (NSM2) foram preparadas a fim de avaliar e otimizar propriedades de incorporação de fármaco. Os nanossistemas foram sintetizados com sucesso, apresentando morfologia esférica (NSM) e parcialmente esférica (NSM2), com diâmetro hidrodinâmico médio entre 100 e 300 nm e carga parcial em torno de -30 e -40 mV, resultados confirmados por medidas de NTA, DLS e PZ. Via análise de MET, valores de diâmetro médio na faixa de 50 e 100 nm foram detectados para as NSM e NSM2, respectivamente. Vale ressaltar que via análises de MET foi

possível observar a distribuição aleatória dos poros das NSM assim como a distribuição de poros organizados das NSM2. A realização de medidas de FTIR e ATG/ATD confirmaram a ausência de matéria orgânica nos poros das matrizes, deixando-os livres para incorporação do fármaco assim como a presença de hidroxilas disponíveis para posterior funcionalização. Medidas de RMN para o núcleo de ^{29}Si confirmaram os resultados de ATG/ATD e FTIR através da quantificação de hidroxilas disponíveis, com valores de 30 e 44,5 %, para as NSM e NMS2, respectivamente. Esse resultado confirma uma maior disponibilidade de hidroxilas nas NMS2. Além disso, adsorção-dessorção de N_2 foi realizada para determinar área superficial (S_{BET}), volume (V_{PT}) e diâmetro (D_p) de poros dos nanossistemas. Valores de $S_{\text{BET}} = 664$ e $812 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, grande $V_{\text{PT}} = 1,14$ e $1,89 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ e $D_p = 6,5$ e $3,5 \text{ nm}$ foram obtidos para as NSM e NSM2, respectivamente. Os resultados obtidos são interessantes visando a avaliação da incorporação e processos de liberação visto que as NSM e NSM2 apresentam áreas distintas assim como diâmetro e volume de poros, confirmando que as matrizes são nanossistemas mesoporosos (poros com diâmetro de 2 a 50 nm). A partir de medidas de SAXS, foi possível desenvolver metodologias para analisar o diâmetro e morfologia dos nanossistemas (primeira parte da curva) assim como o diâmetro e estrutura de mesoporosa (parte final da curva). Os dados obtidos via SAXS corroboram o diâmetro médio dos nanossistemas assim como sua morfologia.

Para visualização dos nanossistemas em etapas de análise de fluorescência, o acoplamento covalente entre o alcóxido APTES e o marcador FITC foi realizada com sucesso e confirmado por FTIR. O marcador sintetizado (FITC-APTES) foi modificado *in situ* na síntese das NSM, resultado confirmado via análises de MET e NTA, com valores de diâmetro hidrodinâmico de 161,5 nm, mantendo intacta a estrutura e morfologia da NSM. Posteriormente, foi realizado a funcionalização das NSM1 e NSM2 com o alcóxido mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS), sendo a funcionalização confirmada por análise termogravimétrica (ATG) e EGA-acoplado ao FTIR (TG-DSC-FTIR), exibindo a presença de compostos de enxofre nos espectros de FTIR, de ambas os nanossistemas a base de sílica. As NSMs modificadas com MPTMS foram nomeadas como NSM1-S e NMS2-S. Na sequência, a incorporação de docetaxel (DTX) nos poros das NSMs e NSMs-S foi realizada com sucesso, em meio de acetonitrila e agitação por 24 h. A eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC) foi determinada via CLAE para ambos os nanossistemas, modificados ou não com grupos MPTMS (NSM@DTX, NSM2@DTX, NSM-S@DTX e NSM2-S@DTX) considerando a razão massa:massa (1:1, DTX:NSM). Os valores de EE e CC obtidos foram relevantes, compreendendo de 95 a 97 % e 1,1 a 2,1 %, respectivamente.

Após a obtenção dos nanossistemas NSM-S@DTX e NSM2-S@DTX, foi proposta a modificação do anticorpo CTX via reagente de Traut, com o intuito de tiolar o CTX para posterior reação com os nanossistemas NSMs-S@DTX. O CTX foi modificado (chamado CTX-S), separado usando coluna PD-10, e quantificado com sucesso, de acordo com os dados obtidos via ensaios de BCA, com valores de concentração na faixa de 780 a 782,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após obtenção e quantificação do CTX-S, a metodologia

de acoplamento do CTX-S com as NSMs-S@DTX foi proposta em meio oxidante de H_2O_2 contendo catalizador NaI. O meio proposto favoreceu a formação de pontes dissulfeto a partir dos grupos SHs presentes no CTX e nas NSMs. Os nanossistemas desenvolvidos (NSM@DTX-CTX e NSM2@DTX-CTX) foram separados via sucessivas lavagens e centrifugação, posteriormente quantificados via ensaio de BCA. Para as NSM@DTX-CTX e NSM2@TX-CTX foram obtidas concentrações de anticorpo de 582,5-680,5 e acima de 780 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, correspondendo a uma eficiência de funcionalização (EF) acima de 74 % para NSM@DTX-CTX e em torno de 100 % para NSM2@TX-CTX. Além disso, os valores de EF para as NSM2 foram superiores aos das NSM, o que pode ser atribuído ao maior número de silanois disponíveis para funcionalização, possuindo assim mais grupos tióis (SHs) disponíveis para funcionalização do CTX-S. Porém, o aumento da funcionalização das NSM2 ainda tem potencial para um aumento, o que possivelmente depende da concentração de CTX-S que pode ser obtida para posterior conjugação. Adicionalmente, a avaliação da disponibilidade de grupos SHs (tióis) presentes tanto no CTX-S como nas NSMs-S é crucial para a eficiência de conjugação do anticorpo. Assim, foi realizada o ensaio usando método de quantificação de Ellman, confirmando que o CTX-S em solução pode perder sua funcionalidade pois a reação espontânea dos grupos SHs dos anticorpos podem promover a formação de pontes dissulfeto em função do tempo. Por outro lado, as NSM-FITC-S, estocadas em estado sólido, quando avaliadas não apresentaram formação de pontes dissulfeto entre si, sendo possível quantificar 118 $\mu\text{g tiol mL}^{-1}$, confirmando a aptidão as nanopartículas modificadas para funcionalização do anticorpo.

A viabilidade dos nanossistemas frente às linhagens celulares de adenocarcinomas de próstata DU145 e PC3 foi avaliada em diversas concentrações pelo período de 48 h. Os resultados mostraram que no período proposto e concentrações avaliadas, foi possível detectar ação efetiva apenas do DTX em meio de DMSO (para ambas as linhagens) assim como do nanossistema NSM@DTX-CTX. Foi observado que os resultados obtidos para a formulação NSM@DTX, para ambas as linhagens, não foram representativos. De forma similar, o resultado para o tratamento da linhagem PC3 com NSM@DTX-CTX também se mostrou não significativo, tudo de acordo com os valores de IC_{50} reportados na Tabela 14. Apesar dos obstáculos observados, foi possível obter resultado promissor para as NSM@DTX-CTX frente a linhagem DU145 (que superexpressa o receptor EGF), o que comprova a eficácia e importância da funcionalização dos nanossistemas com o anticorpo CTX. Isso é ainda mais bem evidenciado com a realização do estudo de internalização celular, via citometria de fluxo, dos nanossistemas marcados com FITC, ou seja, das formulações NSM-FITC e NSM-FITC-CTX. Após um período de incubação de 6 h, foi possível obter valores de internalização de $0,5 \pm 0,1 \%$ e $44,2 \pm 5,2 \%$, para as NSM-FITC e NSM-FITC-CTX, respectivamente. Estes resultados corroboram parte das análises de citotoxicidade. Ainda assim, é imprescindível destacar que a conjugação com o anticorpo CTX promoveu rápida internalização nas células DU145 que superexpressas o receptor EGF, consequentemente favorecendo a ação dos nanossistemas contendo DTX na morte celular.

Portanto, o desenvolvimento dos nanossistemas, em especial NSM@DTX-CTX compreende uma abordagem interessante e inovadora para continuação dos estudos *in vitro* focados em futuras avaliações *in vivo* para o tratamento do câncer de próstata.

7. DIFICULDADES ENCONTRADAS

Os estudos de citotoxicidade dos nanossistemas desenvolvidos em linhagens de adenocarcinoma PC3 e DU145 são extremamente necessários para que, posteriormente, possa ser vislumbrada a realização dos ensaios *in vivo*. Desta forma, alguns obstáculos foram encontrados até o determinado momento como a dificuldade no crescimento das células PC3 assim como a realização dos ensaios para esta linhagem celular. Os ensaios *in vitro* precisam ser ainda otimizados para obtenção de resultados confiáveis e impactantes para prosseguir em direção aos estudos em animais. A dificuldade em se aumentar a capacidade de carga dos nanossistemas também pode ser um fator impactante nos resultados obtidos para veiculação de DTX. Além disso, a dificuldade em se aumentar a eficiência de funcionalização do anticorpo modificado CTX-S nas matrizes de NSMs também pode ter sido um fator determinante nos resultados *in vitro* apresentados até o momento. Portanto, a otimização e estudo ainda mais aprofundado dos ensaios *in vitro* nas linhagens estudadas ainda se faz necessário antes de prosseguir em direção aos estudos *in vivo*.

8. PERSPECTIVAS

O desenvolvimento dos nanossistemas NSM@DTX-CTX compreende uma abordagem inovadora e ainda pouco explorada na literatura, para tratamento do câncer de próstata. Portanto, a otimização de alguns parâmetros como o aumento da capacidade de carga das NSMs assim como a possibilidade de se aumentar a eficiência de funcionalização de CTX nos nanossistemas, abrem ainda perspectivas para o desenvolvimento de nanossistemas ainda mais robustos a base de NSMs. Além disso, a repetição de estudos *in vitro* utilizando as linhagens PC3 e DU145 com maior número de replicatas pode aumentar a confiabilidade dos resultados, porém são diretamente relacionados com o desenvolvimento e replicação das linhagens em questão.

Por fim, a realização de novos estudos de internalização celular (por citometria de fluxo) assim como utilização de técnicas de imageamento (como microscopia confocal) ainda podem ser empregados para aumentar o nível de compreensão e ação dos nanossistemas desenvolvidos frente as linhagens PC3 e DU145.

9. PARECER SUPERVISOR

O relatório encontra-se adequadamente escrito. Os resultados evidenciaram a citotoxicidade dos nanossistemas de sílica mesoporosa contendo docetaxel funcionalizadas com cetuximabe (NSM@DTX-CTX) frente a linhagem tumoral de prósta DU145, as quais foram internalizadas pelas análises de ciometria

de fluxo. Os resultados evidenciam a importância do anticorpo CTX para promover rápida internalização nas células DU145 considerando 6 h de incubação. Portanto, as NSM@DTX-CTX compreendem nanoplateformas promissoras para continuação e otimização dos estudos *in vitro* visando a avaliação *in vivo* e, conseqüentemente, o tratamento do câncer de próstata. No período de 2020-2024, o bolsista publicou 41 artigos, sendo vários diretamente relacionados ao seu estágio pós-doutoral e um deles relacionado ao estágio BEPE no exterior. Um artigo diretamente relacionado aos dados experimentais do pós-doutorado está em fase de redação, bem como o artigo com os dados do estágio BEPE realizado na Holanda. O bolsista no período co-orientou alunos de mestrado e pós-doutorado, além de contribuir ativamente com as atividades do grupo de pesquisa.

10. REFERÊNCIAS

- [1] SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, p. 209-249, 2021.
- [2] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), France. World Health Organization (WHO). GLOBOCAN 2022: All cancers - number of new cases and deaths in 2020, both sexes, all ages. Lyon: IARC, 2022.
- [3] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), France. World Health Organization (WHO). GLOBOCAN 2022: Brazil - number of new cases in 2020, both sexes, all ages and for male, all ages. Lyon: IARC, 2022.
- [4] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.
- [5] American Cancer Society – Prostate Cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer.html>>. Acesso em: 18 fev. 2024.
- [6] HEIDENREICH, A.; AUS, G.; BOLLA, M.; JONIAU, S.; MATVEEV, V. B.; SCHMID, H. P.; et al. EAU guidelines on prostate cancer. **European Urology**, v. 53, n. 1, p. 68-80, 2008.
- [7] ELOY, F. O. **Lipossomas e imunolipossomas contendo fármacos antitumorais: desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia contra o câncer de mama**. 2016. 110f. Tese (Doutorado em ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.
- [8] ISCAIFE, A. **O uso de microRNA para tratamento do câncer de próstata: *in vitro* e *in vivo***. Tese (Doutorado em ciências). Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- [9] TANNOCK, I. F.; WIT, R.; BERRY, W. R.; HORTI, J.; PLUZANSKA, A.; CHI, K. N.; et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*. v. 351, p. 1502-12, 2004.
- [10] COOPERBERG, M. R.; VICKERS, A. J.; BROERING, J. M.; CARROLL, P. R. Comparative risk-adjusted mortality outcomes after primary surgery, radiotherapy, or androgen-deprivation therapy for localized prostate cancer. **Cancer**, v. 116, n. 22, p. 5226-5234, 2010. doi:10.1002/cncr.25456
- [11] DENMEADE, S. R.; ISAACS, J. T. A history of prostate cancer treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, 389-396, 2002.

- [12] GILSON, C.; MANICKAVASAGAR, T.; CHOWDHURY, S. Treatment of metastatic prostate cancer. **Trends in Urology & Men's Health**, v. 6, n. 4, p. 7-12, 2015.
- [13] LAM, J. S.; LEPPERT, J. T.; VEMULAPALLI, S. N.; SHVARTS, O.; BELLDEGRUN, A. S. Secondary hormonal therapy for advanced prostate cancer. **The Journal of Urology**, v. 175, n. 1, p. 27-34, 2006.
- [14] SUMANASURIYA, S.; DE BONO, J. Treatment of advanced prostate cancer-A review of current therapies and future promise. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 6, p. a030635, 2017.
- [15] ZHOU, Y.; YANG, J.; ZHANG, R.; KOPECEK, J. Combination therapy of prostate cancer with HPMA copolymer conjugates containing PI3K/mTOR inhibitor and docetaxel. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p.107-115, 2015.
- [16] ROLIM, N.; LOPES, F.; RODRIGUES, T.; SANTOS, J. C.; MOTA, R.; COVITA, A.; et al. Complicações da terapêutica de privação androgênica no cancro da próstata / uma revisão. **Acta Urológica Portuguesa**, v.31, p. 82-87, 2014.
- [17] CHOU, R.; DANA, T.; BOUGATSOS, C.; FU, R.; BLAZINA, I.; GLEITSMANN, K.; et al. Treatments for localized prostate cancer: systematic review to update the 2002 U.S. preventive services task force recommendation. **Agency for Healthcare Research and Quality (US)**, n. 91, 2011.
- [18] HURWITZ, M. Chemotherapy in prostate cancer. **Current Oncology Reports**, v. 17, n. 10, p. 2015.
- [19] GILLIGAN, T.; KANTOFF, P. W. Chemotherapy for prostate cancer. **Urology**, v. 60, n. 3, p. 94-100, 2002.
- [20] LIU, J.; KOPEČKOVÁ, P.; PAN, H.; SIMA, M.; BÜHLER, P.; WOLF, P.; et al. Prostate-cancer-targeted n-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer/docetaxel conjugates. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 3, p. 412-422, 2012.
- [21] DA SILVA, G. H.; FERNANDES, M. A.; TREVIZAN, L. N. F.; DE LIMA, F. T.; ELOY, J. O.; CHORILLI, M. A Critical review of properties and analytical methods for the determination of docetaxel in biological and pharmaceutical matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 517-527, 2018.
- [22] BISSERY, M. C. Preclinical pharmacology of docetaxel. **European Journal of Cancer**, v. 31, p. S1-S6, 1995.
- [23] HERBST, R. S.; KHURI, F. R. Mode of action of docetaxel – a basis for combination with novel anticancer agents. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 5, p. 407-415, 2003.
- [24] ENGELS, F. K.; MATHOT, R. A. A.; VERWEIJ, J. Alternative drug formulations of docetaxel: a review. **Anti-Cancer Drugs**, v. 18, n. 2, p. 95-103, 2007.
- [25] QIAN, H.; CHI, C.; TRICARD, T.; ZHU, Y.; DONG, L.; WANG, Y.; et al. A Prospective Randomized Trial of Neoadjuvant Chemohormonal Therapy vs Hormonal Therapy in Locally Advanced Prostate Cancer Treated by Radical Prostatectomy. **The Journal of Urology**, v. 211, p. 648-655, 2024.
- [26] FIZAZI, K.; FOULON, S.; CARLES, J.; ROUBAUD, G.; MCDERMOTT, R.; FLÉCHON, A.; et al. Abiraterone plus prednisone added to androgen deprivation therapy and docetaxel in de novo metastatic castration-sensitive prostate cancer (PEACE-1): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 study with a 2 × 2 factorial design. **Lancet**, v. 399, p. 1695-1707, 2022.
- [27] MANJAPPA, A. S.; GOEL, P. N.; VEKATARAJU, M. P.; RAJESH, K. S.; MAKWANA, K.; UKAWALA, M.; et al. Is an alternative drug delivery system needed for docetaxel? The role of controlling epimerization in formulations and beyond. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 10, p. 2675-2693, 2013.

- [28] ZHANG, L.; YANG, X.; LV, Y.; XIN, X.; QIN, C.; HAN, X.; et al. Cytosolic co-delivery of miRNA-34a and docetaxel with core-shell nanocarriers via caveolae-mediated pathway for the treatment of metastatic breast cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- [29] TAN, Q.; LIU, X.; FU, X.; LI, Q.; DOU, J.; ZHAI, G. Current development in nanoformulations of docetaxel. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 8, p. 975-990, 2012.
- [30] ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; TREVIZAN, L. N. F.; CHORILLI, M. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 454-467, 2017.
- [31] WANG, Q.; ALSHAKER, H.; BÖHLER, T.; SRIVATS, S.; CHAO, Y.; COOPER, C.; et al. Core shell lipid-polymer hybrid nanoparticles with combined docetaxel and molecular targeted therapy for the treatment of metastatic prostate cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- [32] HU, R.; LAN, J.; ZHANG, D.; SHEN, W. Nanotherapeutics for prostate cancer treatment: A comprehensive review. **Biomaterials**, v. 305, p. 122469, 2024.
- [33] COTÍ, K. K.; BELOWICH, M. E.; LIONG, M.; AMBROGIO, M. W.; LAU, Y. A.; KHATIB, H. A.; et al. Mechanised nanoparticles for drug delivery. **Nanoscale**, v. 1, n. 1, p. 16-39, 2009.
- [34] FADEEL, B.; GARCIA-BENNETT, A. E. Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 3, p. 362-374, 2010.
- [35] QUIJIA, C. R.; NAVEGANTE, G.; SÁBIO, R. M.; VALENTE, V.; OCAÑA, A.; ALONSO-MORENO, C.; et al. Macrophage cell membrane coating on piperine-loaded MIL-100(Fe) nanoparticles for breast cancer treatment. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 14, p. 319, 2023.
- [36] DOS REIS, L. R.; LUIZ, M. T.; SÁBIO, R. M.; MARENA, G. D.; DI FILIPPO, L. D.; DUARTE, J. L.; et al. Design of rapamycin and resveratrol coloaded liposomal formulation for breast cancer therapy. **Nanomedicine**, v. 01, p. 002, 2023.
- [37] NICOLETI, L. R.; DI FILIPPO, L. D.; DUARTE, J. L.; LUIZ, M. T.; SÁBIO, R. M.; CHORILLI, M. Development, characterization and *in vitro* cytotoxicity of kaempferol-loaded nanostructured lipid carriers in glioblastoma multiforme cells. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 226, p. 113309, 2023.
- [38] MUNHOZ, L. L. S.; ALVES, M. T. O.; ALVES, B. C.; NASCIMENTO, M. G. F.; SÁBIO, R. M.; MANIERI, K. F.; et al. Bacterial cellulose membrane incorporated with silver nanoparticles for wound healing in animal model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 654, p. 47-54, 2023.
- [39] PRIMO, L. M. D. G.; ROQUE-BORDA, C. A.; CANALES, C. S. C.; CARUSO, I. P.; LOURENÇO, I. O.; COLTURATO, V. M. M.; SÁBIO, R. M.; et al. Antimicrobial peptides grafted onto the surface of N-acetylcysteine-chitosan nanoparticles can revitalize drugs against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 323, p. 121449, 2024.
- [40] LI, Z.; BARNES, J. C.; BOSOI, A.; STODDART, J. F.; ZINK, J. I. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2590-2605, 2012.
- [41] PARK, W.; NA, K. Advances in the synthesis and application of nanoparticles for drug delivery. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 4, p. 494-508, 2015.
- [42] LU, J.; LIONG, M.; LI, Z.; ZINK, J. I.; TAMANOI, F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. **Small**, v. 6, n. 16, p. 1794-1805, 2010.
- [43] SÁBIO, R. M.; MENEGUIN, A. B.; DOS SANTOS, A. M.; MONTEIRO, A. S.; CHORILLI, M. Exploiting mesoporous silica nanoparticles as versatile drug carriers for several routes of administration. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 312, p. 110774, 2021.

- [44] RIBEIRO, T. C.; SÁBIO, R. M.; LUIZ, M. T.; SOUZA, L. C.; FONSECA-SANTOS, B.; SILVA, L. C. C.; et al. Curcumin-loaded mesoporous silica nanoparticles dispersed in thermo-responsive hydrogel as potential Alzheimer disease therapy. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 1976, 2022.
- [45] CARVALHO, G. C.; MARENA, G. D.; LEONARDI, G. R.; SÁBIO, R. M.; CORRÊA, I.; CHORILLI, M.; et al. Lycopene, Mesoporous silica nanoparticles and their association: a possible alternative against Vulvovaginal candidiasis. **Molecules**, v. 27, p. 8558, 2022.
- [46] HOFFMANN, F.; CORNELIUS, M.; MORELL, J.; FRÖBA, M. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angewandte Chemie, International Edition**, v. 45, n. 20, p. 3216-3251, 2006.
- [47] SÁBIO, R. M.; CARVALHO, G. C.; LI, J.; CHORILLI, M.; SANTOS, H. A. Advanced porous materials for antimicrobial treatment. **Nanoselect**, p. 1-20, 2023.
- [48] CARVALHO, G. C.; MARENA, G. D.; KARNOPP, J. C. F.; JORGE, J.; SÁBIO, R. M.; MARTINES, M. A. U.; et al. Cetyltrimethylammonium bromide in the synthesis of mesoporous silica nanoparticles: General aspects and in vitro toxicity. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 307, p. 102746, 2022.
- [49] CARVALHO, G. C.; SÁBIO, R. M.; RIBEIRO, T. C.; MONTEIRO, A. S.; PEREIRA, D. V.; RIBEIRO, S. J. L.; et al. Highlights in mesoporous silica nanoparticles as a multifunctional controlled drug delivery nanoplatform for infectious diseases treatment. **Pharmaceutical Research**, v. 37, p. 191, 2020.
- [50] VALLET-REGÍ, M.; SCHÜTH, F.; LOZANO, D.; COLILLA, M.; MANZANO, M. Engineering mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: where are we after two decades? **Chemical Society Reviews**, 2022.
- [51] CROISSANT, J. G.; BUTLER, K. S.; ZINK, J. I.; BRINKER, C. J. Synthetic amorphous silica nanoparticles: toxicity, biomedical and environmental implications. **Nature Reviews Materials**, v. 5, p. 886-909, 2020.
- [52] CROISSANT, J. G.; FATIEIEV, Y.; KHASHAB, N. M. Degradability and clearance of silicon, organosilica, silsesquioxane, silica mixed oxide, and mesoporous silica nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 29, p. 1604634, 2017.
- [53] LÉRIDA-VISO, A.; ESTEPA-FERNÁNDEZ, A.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; MARTÍ-CENTELLES, V.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. Biosafety of mesoporous silica nanoparticles; towards clinical translation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 201, p. 115049, 2023.
- [54] BUTTIGLIERO, C.; TUCCI, M.; VIGNANI, F.; DI STEFANO, R. F.; LEONE, G.; ZICHI, C.; et al. Chemotherapy-induced neutropenia and outcome in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer treated with first-line docetaxel. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 16, n. 4, p. 318-324, 2018.
- [55] BARKAT, A.; BEG, S.; PANDA, S. K.; ALHARBI, K. S.; RAHMAN, M.; AHMED, F. J. Functionalized mesoporous silica nanoparticles in anticancer therapeutics. **Seminars in Cancer Biology**, v. 69, p. 365-375, 2021.
- [56] LIU, Q.; ZHANG, J.; SUN, W.; XIE, Q. R.; XIA, W.; GU, H. Delivering hydrophilic and hydrophobic chemotherapeutics simultaneously by magnetic mesoporous silica nanoparticles to inhibit cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 999-1013, 2012.
- [57] SÁBIO, R. M.; MENEGUIN, A. B.; RIBEIRO, T. C.; SILVA, R. R.; CHORILLI, M. New insights towards mesoporous silica nanoparticles as a technological platform for chemotherapeutic drugs delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 564, p. 379-409, 2019.
- [58] COLILLA, M.; VALLET-REGÍ, M. Organically modified mesoporous silica nanoparticles against bacterial resistance. **Chemistry of Materials**, v. 35, p. 8788-8805, 2023.
- [59] SAPRA, P.; SHOR, B. Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 3, p. 452-469, 2013.

- [60] BASELGA, J. The EGFR as a target for anticancer therapy-focus on cetuximab. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 16-22, 2001.
- [61] MILENIC, D. E.; WONG, K. J.; BAIDOO, K. E.; RAY, G. L.; GARMESTANI, K.; WILLIAMS, M.; et al. Cetuximab: preclinical evaluation of a monoclonal antibody targeting EGFR for radioimmunodiagnostic and radioimmunotherapeutic applications. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 23, n. 5, p. 619-632, 2008.
- [62] KHAMBATA-FORD, S.; GARRETT, C. R.; MEROPOL, N. J.; BASIK, M.; HARBISON, C. T.; WU, S.; et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 22, p. 3230-3237, 2007.
- [63] PIRKER, R.; PEREIRA, J. R.; VON PAWEL, J.; KRZAKOWSKI, M.; RAMLAU, R.; PARK, K.; et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 1, p. 33-42, 2012.
- [64] CATHOMAS, R.; ROTHERMUNDT, C.; KLINGBIEL, D.; BUBENDORF, L.; JAGGI, R.; BETTICHER, D. C.; 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). **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 21, p. 6049-6057, 2012.
- [65] CUNNINGHAM, D.; HUMBLET, Y.; SIENA, S.; KHAYAT, D.; BLEIBERG, H.; SANTORO, A.; et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 4, p. 337-345, 2004.
- [66] ROSS, J. S.; GRAY, K. E.; WEBB, I. J.; GRAY, G. S.; ROLFE, M.; SCHENKEIN, D. P.; et al. Antibody-based therapeutics: Focus on prostate cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, n. 4, p. 521-537, 2005.
- [67] CHO, Y.-S.; YOON, T.-J.; JANG, E.-S.; SOO HONG, K.; YOUNG LEE, S.; RAN KIM, O.; et al. Cetuximab-conjugated magneto-fluorescent silica nanoparticles for in vivo colon cancer targeting and imaging. **Cancer Letters**, v. 299, n. 1, p. 63-71, 2010.
- [68] ER, Ö.; COLAK, S.; OCAKOGLU, K.; INCE, M.; BRESOLÍ-OBACH, R.; MORA, M.; et al. Selective photokilling of human pancreatic cancer cells using cetuximab-targeted mesoporous silica nanoparticles for delivery of zinc phthalocyanine. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2749-1-14, 2018.
- [69] WANG, Y.; HUANG, H.-Y.; YANG, L.; ZHANG, Z.; JI, H. Cetuximab-modified mesoporous silica nano-medicine specifically targets EGFR-mutant lung cancer and overcomes drug resistance. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.
- [70] LIANG, Z.; YANG, N.; JIANG, Y.; HOU, C.; ZHENG, J.; SHI, J.; et al. Targeting docetaxel-PLA nanoparticles simultaneously inhibit tumor growth and liver metastases of small cell lung cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 337-345, 2015.
- [71] ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Re-27. ICH-International Conference on Harmonisation of Technical Re-Harmonisation of Technical Re of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), 2005.
- [72] NANDIYANTO, A. B. D.; KIM, S. G.; ISKANDAR, F.; OKUYAMA, K. Synthesis of spherical mesoporous silica nanoparticles with nanometer-size controllable pores and outer diameters. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 120, n. 3, p. 447-453, 2009.
- [73] MATURI, F. E.; SÁBIO, R. M.; SILVA, R. R.; LAHOUD, M. G.; MENEGUIN, A. B.; VALENTE, G. T.; et al. Luminescent mesoporous silica nanohybrid based on drug derivative terbium complex. **Materials**, v. 12, n. 6, p. 933, 2019.

- [74] SÁBIO, R. M.; SANTAGNELI, S. H.; GRESSIER, M.; CAIUT, J. M. A.; PAZIN, W. M.; RIBEIRO, S. J. L.; et al. Near-infrared/visible-emitting nanosilica modified with silylated Ru(II) and Ln(III) complexes. **Nanotechnology**, v. 31, n. 8, 035602, 2020.
- [75] SÁBIO, R. M.; SANTAGNELI, S. H.; GRESSIER, M.; CAIUT, J. M. A.; PAZIN, W. M.; LEITE, I. S.; et al. Luminescent nanohybrids based on silica and silylated Ru(II)-Yb(III) heterobinuclear complex: New tools for biological media analysis. **Nanotechnology**, v. 31, n. 8, 085709, 2020.
- [76] LUNGARE, S.; HALLAM, K.; BADHAN, R. K. S. Phytochemical-loaded mesoporous silica nanoparticles for nose-to-brain olfactory drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 513, n. 1-2, p. 280-293, 2016.
- [77] CHENG, C. A.; CHEN, W.; ZHANG, L.; WU, H. H.; ZINK, J. I. A Responsive Mesoporous Silica Nanoparticle Platform for Magnetic Resonance Imaging-Guided High-Intensity Focused Ultrasound-Stimulated Cargo Delivery with Controllable Location, Time, and Dose. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, p. 17670-17684, 2019.
- [78] ZHOU, J.; LI, M.; LIM, W. Q.; LUO, Z.; PHUA, S. Z. F.; HUO, R.; et al. A transferrin-conjugated hollow nanoplateform for redox-controlled and targeted chemotherapy of tumor with reduced inflammatory reactions. **Theranostics**, v. 8, p. 518-532, 2018.
- [79] SANTOS, J. C.; MATOS, C. R. S.; PEREIRA, G. B. S.; SANTANA, T. B. S.; SOUZA, H. O.; COSTA, L. P.; et al. Stable CdTe nanocrystals grown in situ in thiol-modified MCM-41 mesoporous silica: Control synthesis and electrochemical detection of Cu²⁺. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 221, p. 48-57, 2016.
- [80] DI FILIPPO, L. D.; DUARTE, J. L.; AZAMBUJA, J. H.; MANCUSO, R. I.; LUIZ, M. T.; ARAÚJO, V. H. S.; et al. Glioblastoma multiforme targeted delivery of docetaxel using bevacizumab-modified nanostructured lipid carriers impair in vitro cell growth and in vivo tumor progression. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 618, p. 121682, 2022.
- [81] KIRIHARA, M.; ASAI, Y.; OGAWA, S.; NOGUCHI, T.; HATANO, A.; et al. A mild and environmentally benign oxidation of thiols to disulfides. **Synthesis**, v. 21, p. 3286-3289, 2007.
- [82] BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. in Multimolecular. **Journal of American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938.
- [83] BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. **Journal of American Chemical Society**, v. 73, p. 373-380, 1951.
- [84] JARONIEC, M.; SOLOVYOV, L. A. Improvement of the Kruk–Jaroniec–Sayari method for pore size analysis of ordered silicas with cylindrical mesopores. **Langmuir**, v. 22, p. 6757-6760, 2006.
- [85] LIU, D.; LI, J.; PAN, H.; HE, F.; LIU, Z.; WU, Q.; BAI, C.; YU, S.; YANG, X. Potential advantages of a novel chitosan-N-acetylcysteine surface modified nanostructured lipid carrier on the performance of ophthalmic delivery of curcumin. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-14, 2016.
- [86] RASPANTINI, G. L.; LUIZ, M. T.; ABRIATA, J. P.; ELOY, J. O.; VAIDERGORN, M. M.; EMERY, F. S.; et al. PCL-TPGS polymeric nanoparticles for docetaxel delivery to prostate cancer: Development, physicochemical and biological characterization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 627, p. 127144, 2021.
- [87] BRASIL ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos**. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 166, 24/07/2017, 2017.
- [88] USP. **United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34-NF 29)**. Chapter <711> 2011.
- [89] DE SIQUEIRA-MOURA, M. P.; BRITTO LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 621-628, 2008.
- [90] ELBIALY, N. S. et al. Multifunctional curcumin-loaded mesoporous silica nanoparticles for cancer chemoprevention and therapy. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 291, n. June 2019, 2020.

- [91] SING, K. S. W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure & Applied Chemistry*, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.
- [92] TAKAMORI, D. Y.; BIZETO, M. A.; FANTINI, M. C. A.; RUBINGER, C. P. L.; FAEZ, R.; MARTINS, T. S. Polyaniline inclusion into ordered mesoporous silica matrices: Synthesis, characterization and electrical transport mechanism. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 274, p. 212-219, 2019.
- [93] JESUS, R. A.; RABELO, A. S.; FIGUEIREDO, R. T.; CIDES DA SILVA, L. C.; CODENTINO, I. C.; FANTINI, M. C. A. Synthesis and application of the MCM-41 and SBA-15 as matrices for in vitro efavirenz release study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 153-159, 2016.
- [94] JAMBHRUNKAR, S.; KARMAKAR, S.; POPAT, A.; YU, M.; YU, C. Mesoporous silica nanoparticles enhance the cytotoxicity of curcumin. *RSC Advances*, v. 4, n. 2, p. 709-712, 2014.
- [95] SÁBIO, R. M.; GRESSION, M.; CAIUT, J. M. A.; MENU, M.-J.; RIBEIRO, S. J. L. Luminescent multifunctional hybrids obtained by grafting of ruthenium complexes on mesoporous silica. **Materials Letters**, v. 174, p. 1-5, 2016.
- [96] PEDERSEN, J. S.; HANSEN, S.; BAUER, R. The aggregation behavior of zinc-free insulin studied by small-angle neutron-scattering. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 22, 1994.
- [97] PINSKY, M. A.; KARLIN, S. In *An Introduction to Stochastic Modeling (Fourth Edition)*, eds. PINSKY, M. A.; KARLIN, S., p. 1-45. Boston: Academic Press, 2011.
- [98] KISSELL, R.; POSERINA, J. Chapter 4 - Advanced Math and Statistics. In *Optimal Sports Math, Statistics, and Fantasy*, eds. KISSELL, R.; POSERINA, J., p. 103-135. Academic Press, 2017.
- [99] KINNING, D. J.; THOMAS, E. L. Hard-sphere interactions between spherical domains in diblock copolymers. **Macromolecules**, v. 17, p. 1712-1718, 1984.
- [100] KEERL, M.; PEDERSEN, J. S.; RICHTER, W. Temperature sensitive copolymer microgels with nanophase separated structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 3093-3097, 2009.
- [101] BUZYKIN, O. G.; IVANOV, S. V.; IONIN, A. A.; KOTKOV, A. A.; KOZLOV, A. YU. Spectroscopic detection of sulfur oxides in the aircraft wake. **Journal of Russian Laser Research**, v. 26, p. 426, 2005.
- [102] SYAMCHAND, S. S.; APARNA, R. S.; GEORGE, S. Surface Engineered Ho^{3+} Incorporated Fluorescent Dye-Doped Bifunctional Silica Nanoparticles for Receptor Targeted Fluorescence Imaging and Potential Magnetic Resonance Imaging. **Journal of Fluorescence**, v. 27, p. 1897-1908, 2017.
- [103] CHEN, Z. -Z.; CAI, L.; CHEN, M. -Y.; et al. Indirect immunofluorescence detection of *E. coli* O157:H7 with fluorescent silica nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 66, p. 95-102, 2015.
- [104] SÁBIO, R. M.; SANTAGNELI, S. H.; GRESSION, M.; CAIUT, J. M. A.; PAZIN, W. M.; SILVA, R. R.; et al. Near-infrared luminescence from visible-light-sensitized Ruthenium(II)-Neodymium(III) heterobimetallic bridged complexes containing alkoxy(silyl) functional groups. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 4, p. 694-702, 2020.
- [105] BACHURSKI, D.; SCHULDNER, M.; NGUYEN, P.-H.; MALZ, A.; REINERS, K. S.; GRENZI, P. C.; et al. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis – An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8, p. 1596016, 2019.
- [106] KIM, A.; NG, W. B.; BERNT, W.; CHO, N. -J. Validation of Size Estimation of Nanoparticles Tracking Analysis on Polydisperse Macromolecule Assembly. *Scientific Reports*, v. 9, n. 2639, 2019.
- [107] WANG, D.; HUANG, J.; WANG, X.; YU, Y.; ZHANG, H.; CHEN, Y.; et al. The eradication of breast cancer cells and stem cells by 8-hydroxyquinoline-loaded hyaluronan modified mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers containing docetaxel. **Biomaterials**, v. 34, n. 31, p. 7662-7673, 2013.
- [108] KHOSRAVIYAN, P.; SHAFIEE ARDESTANI, M.; KHOABI, M.; OSTAD, S. N.; DORKOOSH, F. A.; AKBARI JAVAR, H.; et al. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 7315-7330, 2016.

- [109] PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; LOPEZ, R. F. V.; LEE, R. J. Cetuximab Immunoliposomes Enhance Delivery of 5-FU to Skin Squamous Carcinoma Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 301-308, 2017.
- [110] MATSUMURA, M.; MATTHEWS, B. W. Control of Enzyme Activity by an Engineered Disulfide Bond. **Science**, v. 243, p. 792-794, 1989.
- [111] REHDER, D. S.; BORGES, C. R. Cysteine sulfenic Acid as an Intermediate in Disulfide Bond Formation and Nonenzymatic Protein Folding. **Biochemistry**, v. 49, p. 7748-7755, 2010.
- [112] ALVES, R.C.; SCHULTE, Z. M.; LUIZ, M. T.; BENTO DA SILVA, P.; FREM, R. C. G.; ROSI, N. L.; CHORILLI, M. Breast Cancer Targeting of a Drug Delivery System through Postsynthetic Modification of Curcumin@N₃-bio-MOF-100 via Click Chemistry. **Inorganic Chemistry**, v. 60, p. 11739–11744, 2021.
- [113] DHUPKAR, P.; DOWLING, M.; CENGEL, K.; CHEN, B. Effects of anti-EGFR antibody cetuximab on androgen-independent prostate cancer cells. **Anticancer Research**, v. 30, p. 1905–1910, 2010.
- [114] GAO, H.; CAO, S.; YANG, Z.; ZHANG, S.; ZHANG, Q.; JIANG, X. Preparation, characterization and anti-glioma effects of docetaxel-incorporated albumin-lipid nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, p. 2137–2147, 2015.
- [115] GU, P. F.; XU, H.; SUI, B. W.; GOU, J. X.; MENG, L. K.; SUN, F.; WANG, X. J.; QI, N.; ZHANG, Y.; HE, H. B.; TANG, X. Polymeric micelles based on poly(ethylene glycol) block poly(racemic amino acids) hybrid polypeptides: Conformation-facilitated drug-loading behavior and potential application as effective anticancer drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 109–122, 2012.
- [116] GUPTA, S.; WESTON, A.; BEARRS, J.; THODE, T.; NEISS, A.; SOLDI, R.; SHARMA, S. Reversible lysine-specific demethylase 1 antagonist HCI-2509 inhibits growth and decreases c-MYC in castration- and docetaxel-resistant prostate cancer cells. **Prostate Cancer Prostatic Diseases**, v. 19, p. 349–357, 2016.
- [117] ELOY, J. O.; RUIZ, A.; LIMA, F. T.; PETRILLI, R.; RASPANTINI, G.; NOGUEIRA, K. A. B.; SANTOS, E.; OLIVEIRA, C. S.; BORGES, J. C.; MARCHETTI, J. M.; AL-JAMAL, W. T.; CHORILLI, M. EGFR-targeted immunoliposomes efficiently deliver docetaxel to prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 194, p. 111185, 2020.
- [118] MOREIRA, T. D. S.; SILVA, A. D. O.; VASCONCELOS, B. R. F.; SANTOS, E. D. S.; DE SOUSA, A. C. C.; DE FREITAS, J. V. B.; DE OLIVEIRA, Y. S.; VIDAL, L. M. T.; RIBEIRO, F. D. O. S.; DE ARAÚJO, A. R.; NETO, J. B. V.; PESSOA, C. O.; PETRILLI, R.; ELOY, J. O. DOPE/CHEMS-Based EGFR-Targeted Immunoliposomes for Docetaxel Delivery: Formulation Development, Physicochemical Characterization and Biological Evaluation on Prostate Cancer Cells. **Pharmaceutics**, v. 15, p. 915, 2023.