



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM
TRANSFERRINA PARA VEICULAÇÃO DE DOCETAXEL PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Mestranda: Mariza Aires Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara - SP

2019



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM
TRANSFERRINA PARA VEICULAÇÃO DE DOCETAXEL PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Mestranda: Mariza Aires Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara-SP

2019

F363a Fernandes, Mariza Aires.
Avaliação do potencial de lipossomas funcionalizados com transferrina para veiculação de docetaxel para o tratamento do câncer de próstata / Mariza Aires Fernandes. – Araraquara: [S.n.], 2019. 108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Marlus Chorilli.

1. Lipossomas. 2. Funcionalização. 3. Docetaxel. 4. Câncer de Próstata. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

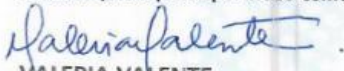
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIZA AIRES FERNANDES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CÂMPUS DE ARARAQUARA-UNESP.

Aos 10 dias do mês de dezembro do ano de 2019, às 14:00 horas, no(a) Sala de Vídeo-conferência do Prédio da Administração da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara UNESP, reuniu-se as Comissões Examinadoras da Defesa Pública, composta pelos seguintes Professores Doutores: MARLUS CHORILLI (Orientador) do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Prof. Dr. JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY do(a) Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem / Universidade Federal do Ceará, Profa. Dra. VALERIA VALENTE do(a) Departamento de Análise Clínicas do Câmpus de Araraquara da UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIZA AIRES FERNANDES, intitulado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM TRANSFERRINA PARA VEICULAÇÃO DE DOCETAXEL PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER DE PRÓSTATA". O Professor Doutor JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY participou da defesa por meio de vídeo-conferência. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora presentes e virtualmente pelo Professor JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY, tendo recebido o conceito final: Aprovado.

Registre-se, que nesta ata, não constará a assinatura do membro da Comissão Examinadora participante por meio de vídeo-conferência. Será anexado a esta ata, parecer circunstanciado do membro participante por vídeo-conferência, enviado por e-mail. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora presentes.


MARLUS CHORILLI (Orientador)

JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY (parecer anexo)
Membro participante por vídeo-conferência


VALERIA VALENTE



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara



**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA.**

DISCENTE: MARIZA AIRES FERNANDES

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM
TRANSFERRINA PARA VEICULAÇÃO DE DOCETAXEL PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER DE PRÓSTATA

DATA: 10 de Dezembro de 2019 às 14:00

LOCAL: Sala de Vídeo-conferência do Prédio da Administração da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas do Campus de Araraquara - UNESP

(X) APROVADO

() REPROVADO

PARECER A SER EMITIDO NO MOMENTO DA DEFESA :

Araraquara, 10 de Dezembro de 2019.

Prof. Dr. JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY

Membro Titular participante por meio de vídeo-conferência

*Dedico este trabalho a minha família, especialmente a minha mãe, **M^a Nadilza Aires Galvão**, e a minha amada **Lays Rodrigues Moura** por todo amor, carinho, conselhos, ajuda, paciência, confiança e incentivos que recebi.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por acreditar que nossa existência pressupõe outra infinitamente superior. Agradeço a ti pelos obstáculos enfrentados, pois através deles pude amadurecer; pela ausência das pessoas que amo, pois através dela pude ver o quanto são importantes na minha vida.

A minha amada mãe, Maria Nadilza Aires Galvão, que faz de tudo pela minha felicidade, realizando os meus maiores sonhos e sempre me motivando a buscar sempre mais, tanto no âmbito emocional quanto profissional. Só tenho a agradecer a Deus todos os dias por tudo que faz por mim. Obrigada pela compreensão em suportar pacientemente uma filha distante da vida familiar durante anos e especialmente a senhora ofereço esta conquista.

À Lays pelo companheirismo, por me motivar a seguir meus sonhos sempre, pela paciência, por ir me ajudar na realização dos experimentos até mesmo aos finais de semana e por me acalmar quando algo não dava certo. Te agradeço de todo meu coração pelo amor, cuidado e atenção.

Ao meu irmão Mário Elder Aires Fernandes, aos meus amigos Luiza Dezem Ambrósio, Rodolfo Paganelli, Luana Galvão, Mariana Pimenta, Alexandre Fernandes, Cássia Suellen Ferreira e aos amigos que fiz na graduação Cristina Almeida da Silva, Lamuel Estevam e Ismael Pinheiro, obrigada pelo companheirismo e carinho.

Aos colegas do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Especialmente Andressa Pironi, Paula Scanavez, Francesca Victorelli, Eliete Von Zuben, Lucas Noboru, Gilmar Hanck, Franciele Baveloni, Mauricio Palmeira, Renata Carolina Alves, Leidiana Reis, Fernanda Boni, Camila Rodero e Mariana Rillo Sato amigos que fiz durante essa etapa, muito obrigada, por todo o apoio e por contribuírem para meu crescimento. Estou certa de que, sem vocês seria mais difícil.

Minha gratidão especial ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, meu orientador, pela pessoa e profissional que é, sempre muito cuidadoso com todos seus alunos e colaboradores. Obrigada por sua dedicação, que até mesmo aos finais de semana e férias deixa de lado seus momentos de descanso para orientar. E principalmente, muito obrigada por ter acreditado e depositado sua

confiança em mim para realização deste trabalho. Sem sua orientação, apoio, confiança e amizade, não somente neste trabalho, mas em todo caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível.

À Professora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião por disponibilizar o espaço, os equipamentos e compartilhar do seu conhecimento durante o período de desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy, primeiramente por contribuir na participação da banca de qualificação desse trabalho e por todo auxílio durante o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à Natalia, técnica do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica por todo o auxílio. E aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação que sempre foram muito atenciosos, pacientes e prestativos.

À Profa. Dra. Maria José Santos-Martinez pela oportunidade e supervisão do trabalho no exterior, colaborando nos experimentos de viabilidade celular e interação receptor - proteína *in vitro* através da Microbalança de Cristal de Quartzo com Dissipação (QCM-D). Aos alunos do grupo —Platelets pelo acolhimento e ensinamentos valiosos, e à Msc. Laura Rodriguez de la Fuente, que me auxiliou e foi muito importante para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Trinity College Dublin (TBSI), por aceitar me receber como aluna visitante e disponibilizar o espaço e os equipamentos para o desenvolvimento do trabalho. Em especial ao —Instituto Panoz, técnico responsável Brian Talbot e ao doutorando Ricardo Cruz.

Aos amigos que fiz em Dublin, conhecer pessoas tão especiais e tão diferentes de mim, foi o melhor que poderia ter acontecido. Me lembrarei sempre de todos vocês com muito carinho.

Ao CMAF-FCFAR pela disponibilidade de utilização do rotaevaporador, sob coordenação da Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin.

Ao Laboratório de Biologia Molecular - FCFAR, em especial ao Prof. Dr. Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli e a doutoranda Angélica Hollunder Klippel pelo auxílio nas análises de SDS-PAGE.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, em especial a doutoranda Marcela Tavares pelo auxílio nas análises de citotoxicidade e *uptake* celular.

Ao Laboratório de Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas - USP, São Carlos, em especial ao Prof. Dr. Júlio César Borges e seu aluno Sérgio Luiz Ramos Junior pelo auxílio nas análises de Dicroísmo circular e Espectroscopia de fluorescência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código de financiamento 001 pelos meses de auxílio financeiro e por atuar na expansão e consolidação da pós-graduação *stricto sensu* em todos os estados do país.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processos nº 2017/25190-8 e 2018/26422-2, pelas bolsas de mestrado e estágio no exterior, como apoio financeiro

À todos aqueles que por um momento de distração deixei de mencionar os nomes, mas de uma maneira ou de outra, colaboraram para que este trabalho se concretizasse, contribuindo de modo efetivo para a sua realização, agradeço de coração.

“A gratidão individual é uma nota harmônica a contribuir para a sinfonia universal, ampliando- se e tornando-se um sentimento coletivo que proporciona o equilíbrio social e espiritual da humanidade”

“Psicologia da Gratidão” - Joanna de Ângelis, Psicografia de Divaldo Franco

RESUMO

O câncer de próstata (CP) é a neoplasia maligna urológica mais comum e a segunda principal causa de mortalidade de homens associada ao câncer no mundo. O tratamento é iniciado por meio de intervenções cirúrgicas que abrangem a prostatectomia radical, tratamentos radioterápicos, terapias envolvendo privação androgênica e as imunoterapias. A quimioterapia também é bastante utilizada e recentes estudos demonstraram um controle notável do crescimento do CP utilizando docetaxel (DTX). No entanto, o DTX apresenta efeitos colaterais associados à toxicidade, tanto do fármaco como da formulação, Taxotere[®]. Em consequência disso, o desenvolvimento de sistemas nanotecnológicos de liberação de fármacos, como lipossomas, tem sido promissor para o tratamento do CP, em virtude das múltiplas características favoráveis desses nanossistemas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade. Uma abordagem atrativa é a modificação superficial dos lipossomas com ligantes específicos dos receptores regulados nas superfícies de células tumorais, como os receptores de transferrina, que podem ser superexpressos em células tumorais de próstata. O atual trabalho visou desenvolver, caracterizar e avaliar a citotoxicidade *in vitro* de lipossomas funcionalizados com transferrina para veiculação do DTX no tratamento do CP. Os lipossomas foram obtidos por meio da técnica clássica da hidratação do filme lipídico e foram constituídos pela mistura de fosfatidilcolina de soja (SPC): colesterol (Col) : DSPE-PEG (2000)-Maleimida e SPC:Col:DSPE-PEG (2000)-Maleimida:DTX, nas proporções molares 10:2:0.78 e 10:2:0.78:0.52, respectivamente. As caracterizações foram realizadas a partir das formulações vazias e com DTX antes e após o processo de funcionalização. Foram realizadas análises do diâmetro médio da partícula, índice de polidispersidade (IPD) e potencial zeta (PZ) empregando o equipamento *Dinamic Light Scattering* (DLS) e análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os valores do diâmetro médio obtidos se mantiveram menores que 100nm, o IPD em 0,400 e o PZ entre -23,06 a -21,2mV. Por meio da MET foi possível comprovar a morfologia esférica da vesícula, corroborando o tamanho obtido pela técnica de DLS. Foram realizadas análises da concentração por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA). O processo de funcionalização foi obtido com sucesso e as estruturas primárias, secundárias e terciárias da transferrina avaliadas por SDS-PAGE, dicróismo circular e por espectroscopia de fluorescência confirmaram que o processo não alterou a sua integridade. A eficiência de funcionalização foi de 31% avaliada pelo ensaio BCA. Para avaliar a eficiência de encapsulação e a liberação do DTX a metodologia analítica foi validada por cromatografia líquida de alta eficiência. Verificou-se que 69 e 37% de DTX estava encapsulado nos lipossomas sem e com funcionalização, respectivamente. O ensaio de liberação foi realizado em PBS pH 7,4 com 1,25% de lauril sulfato de sódio utilizando membranas de diálise de celulose de peso molecular 12-14kDa para o fármaco livre, sistemas funcionalizados (B) e não funcionalizados (D) contendo docetaxel. A difusão do fármaco livre através da membrana foi superior a 60% após 72 horas de estudo, demonstrando que a liberação do DTX não foi limitada pela membrana de diálise. No caso dos lipossomas, a liberação de DTX foi de 51,70% e 31,97% para os lipossomas não funcionalizados e funcionalizados, respectivamente. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* e *uptake celular* em linhagens PC-3 e PNT2 sugerem que os lipossomas vazios e vazios funcionalizados não são tóxicos às linhagens testadas; no entanto, os lipossomas carregados com DTX apresentaram elevada toxicidade em ambas as linhagens. Através do ensaio de microscopia confocal e citometria de fluxo foi possível comprovar que os lipossomas funcionalizados apresentaram *uptake* pronunciado em linhagem PC3. Pode-se comprovar também a interação desses sistemas com os TfR's superexpressos na superfície celular através da QCM-D. Os resultados obtidos evidenciam que os lipossomas funcionalizados com transferrina são uma estratégia promissora para entrega de docetaxel, porém estudos adicionais em modelo celular tridimensional e *in vivo* são necessários.

Palavras-chave: Lipossomas; Funcionalização; Docetaxel; Câncer de Próstata.

ABSTRACT

Prostate cancer (PC) is the most common urological malignancy and the second leading cause of cancer-related mortality in men worldwide. Treatment is initiated through surgical interventions that include radical prostatectomy, radiotherapy treatments, androgen deprivation therapies and immunotherapies. Chemotherapy is also widely used and recent studies have shown remarkable control of CP growth using docetaxel (DTX). However, DTX has side effects associated with the toxicity of both the drug and the formulation Taxotere®. As a result, the development of nanotechnological drug delivery systems, such as liposomes, has been promising for the treatment of CP, due to the multiple favorable characteristics of these nanosystems, such as biocompatibility and biodegradability. An attractive approach is the superficial modification of liposomes with receptor-specific ligands regulated on tumor cell surfaces, such as transferrin receptors, which can be overexpressed in prostate tumor cells. The present work aimed to develop, characterize and evaluate the in vitro cytotoxicity of transferrin-functionalized liposomes for DTX delivery in the treatment of CP. The liposomes were obtained by the classical technique of hydration of the lipid film and consisted of soybean phosphatidylcholine (SPC): cholesterol (Col): DSPE-PEG (2000) -Maleimide and SPC: Col: DSPE-PEG (2000) mixture.) -Maleimide: DTX, in the molar ratios 10: 2: 0.78 and 10: 2: 0.78: 0.52, respectively. The characterizations were performed from the empty formulations and with DTX before and after the functionalization process. Particle average diameter, polydispersity index (IPD) and zeta potential (PZ) analyzes were performed using the Dinamic Light Scattering (DLS) and morphological analysis by transmission electron microscopy (MET). The average diameter values obtained remained below 100nm, the IPD at 0.400 and the PZ between -23.06 to -21.2mV. Through MET it was possible to prove the spherical morphology of the gall bladder, corroborating the size obtained by the DLS technique. Concentration analyzes were performed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). The functionalization process was successfully obtained and the primary, secondary and tertiary transferrin structures evaluated by SDS-PAGE, circular dichroism and fluorescence spectroscopy confirmed that the process did not alter its integrity. Functionalization efficiency was 31% evaluated by the BCA assay. To evaluate the encapsulation efficiency and DTX release the analytical methodology was validated by high performance liquid chromatography. 69 and 37% of DTX were found to be encapsulated in liposomes without and with functionalization, respectively. The release assay was performed in PBS pH 7.4 with 1.25% sodium lauryl sulfate using 12-14kDa molecular weight cellulose dialysis membranes for free drug, functionalized (B) and non-functionalized (D) systems. containing docetaxel. Free drug diffusion across the membrane was greater than 60% after 72 hours of study, demonstrating that DTX release was not limited by the dialysis membrane. In the case of liposomes, DTX release was 51.70% and 31.97% for non-functionalized and functionalized liposomes, respectively. In vitro cytotoxicity and cell uptake assays in PC-3 and PNT2 strains suggest that empty and functionalized empty liposomes are not toxic to the strains tested; however, DTX-loaded liposomes showed high toxicity in both strains. Through the confocal microscopy and flow cytometry assay it was possible to prove that the functionalized liposomes presented pronounced uptake in PC3 strain. The interaction of these systems with the overexpressed TfRs on the cell surface through QCM-D can also be proven. The results obtained show that transferrin-functionalized liposomes are a promising strategy for the delivery of docetaxel, however additional studies in three-dimensional and in vivo cell models are necessary.

Keywords: Liposomes; Functionalization; Docetaxel; Prostate cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do DTX.....	25
Figura 2. Estrutura do lipossoma.....	26
Figure 3. Estruturas químicas dos lipídeos que constituem os lipossomas.....	28
Figura 4. Estrutura da transferrina.....	29
Figura 5. Esquema representando o processo de tiolação da transferrina.....	30
Figura 6. Processo de direcionamento ativo de lipossomas.....	31
Figura 7. Esquema do Processo 1 de funcionalização dos lipossomas com transferrina.....	37
Figura 8. Esquema do Processo 2 de funcionalização dos lipossomas com transferrina.....	38
Figura 9. Componentes básicos da microbalança Q-Sense TM E4.....	48
Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas.....	54
Figura 11. Avaliação de lipossoma funcionalizado com transferrina e Tf livre por SDS PAGE.....	55
Figura 12. Espectro de dicroísmo circular da Tf em solução, Tf tiolada, formulação funcionalizada vazia e formulação funcionalizada com docetaxel.....	56
Figura 13. Espectro de absorção da transferrina em solução e transferrina tiolada com excitação a 280nm (A) e 295nm (B).....	58
Figura 14. Espectro de absorção da transferrina em solução, transferrina tiolada, formulação funcionalizada vazia e formulação funcionalizada com docetaxel (f2+tf) com excitação a 280nm (A) e 295nm (B).....	58
Figura 15. Cromatogramas obtidos a partir da análise de seletividade do método analítico desenvolvido para o docetaxel.....	61
Figura 16. Cromatogramas do DTX obtidos pelo método cromatográfico proposto: acetonitrila-água e (B) em meio receptor.....	62
Figura 17. Curva analítica do DTX em acetonitrila-água com intervalo de concentração de 1-75µg/mL obtida por CLAE.....	62
Figura 18. Curva analítica do DTX em meio receptor com intervalo de concentração de 1-75µg/mL obtida por CLAE.....	63
Figura 19. Eficiência de encapsulação do DTX em lipossomas.....	69
Figura 20. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do DTX livre e encapsulado em lipossomas em tampão PBS pH 7,4 contendo 1,25% de LSS.....	71
Figura 21. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e	

funcionalizado com transferrina (C), da linhagem celular PC3 em 24 horas utilizando o ensaio de resazurina.....74

Figura 22. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C), da linhagem celular PC3 em 48 horas utilizando o ensaio de resazurina.....76

Figura 23. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C), da linhagem celular PC3 em 72 horas utilizando o ensaio de resazurina.....77

Figura 24. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C), da linhagem celular PNT2 em 24 horas utilizando o ensaio de resazurina.....78

Figura 25. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C), da linhagem celular PNT2 em 48 horas utilizando o ensaio de resazurina.....79

Figura 26. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C), da linhagem celular PNT2 em 48 horas utilizando o ensaio de resazurina.....80

Figura 27. Avaliação do *uptake* celular por microscopia confocal da linhagem PC3 após 2 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI.....83

Figura 28. Avaliação do *uptake* celular por microscopia confocal da linhagem PC3 após 4 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).....84

Figura 29. Avaliação do *uptake* celular por microscopia confocal da linhagem PC3 após 24 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).....85

Figura 30. Avaliação do <i>uptake</i> celular por microscopia confocal da linhagem PNT2 após 2 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).....	87
Figura 31. Avaliação do <i>uptake</i> celular por microscopia confocal da linhagem PNT2 após 4 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul)	87
Figura 32. Avaliação do <i>uptake</i> celular por microscopia confocal da linhagem PNT2 após 24 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).....	88
Figura 33. Avaliação do <i>uptake</i> celular por citometria de fluxo da linhagem PC3 após 2, 4 e 24 horas. Grupo controle, lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTf).....	90
Figura 34. Avaliação do <i>uptake</i> celular por citometria de fluxo da linhagem PNT2 após 2, 4 e 24 horas. Grupo controle, lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTf).....	92
Figura 35. Representação dos resultados da QCM-D para a perfusão de PC3 em um sensor ouro.....	93
Figura 36: Representação dos resultados da QCM-D durante a perfusão de lipossomas (seta laranja) nas células PC3 depositadas em um sensor revestido a ouro.....	94
Figura 37: Micrografia representativa obtida por microscopia óptica (10X) da superfície de um sensor revestido a ouro após a perfusão de lipossomas através da camada de células PC3.....	95
Figura 38: Micrografia representativa obtida por microscopia óptica (10X) da superfície de um sensor revestido com ouro tratado com PLL após a perfusão de células PC3.....	95
Figura 39: Representação dos resultados da QCM-D após a perfusão de lipossomas não funcionalizados (seta laranja) nas células PC3 introduzidas e perfundidas (seta verde) através de cristais revestidos a ouro incubados com PLL (à esquerda) e um cristal revestido a ouro sem PLL (direita).....	96

Figura 40: Representação dos resultados da QCM-D após a perfusão de lipossomas (seta laranja) e de células PC3 (seta verde). A perfusão de lipossomas não funcionalizados (A) levou a um aumento na dissipação e na diminuição da frequência quase revertida após a perfusão de PBS.....97

Figura 41: Micrografias representativas obtidas por microscopia óptica (10x) da superfície dos sensores após a perfusão de lipossomas funcionalizados em células PC3.....97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas na metodologia analítica.....	42
Tabela 2. Representação dos valores obtidos para tamanho de partícula, IPD e PZ.....	52
Tabela 3. Caracterização de lipossomas através do NTA.....	53
Tabela 4. Parâmetros da análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise do DTX em fase móvel.....	59
Tabela 5. Parâmetros da análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise do DTX em meio receptor.....	60
Tabela 6. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção das curvas.....	64
Tabela 7. Resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade para o DTX em fase móvel.....	65
Tabela 8. Resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade para o DTX em meio receptor.....	65
Tabela 9. Resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária, DTX em fase móvel.....	66
Tabela 10. Resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária, DTX em meio receptor.....	66
Tabela 11. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de DTX em fase móvel.....	66
Tabela 12. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de DTX em meio receptor.....	67
Tabela 13. Valores obtidos para LD e LQ	67
Tabela 14. Robustez do método analítico para quantificação do DTX.....	68
Tabela 15. Porcentagens de DTX liberado em relação ao tempo.....	71
Tabela 16: Valores de R^2 referentes aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo liberação in vitro do DTX a partir das formulações selecionadas.....	73
Tabela 17 – Valores de IC_{50} da formulação comercial de docetaxel, lipossoma carregado com docetaxel e lipossoma funcionalizado com transferrina e carregado com docetaxel em relação as linhagens celulares normais e tumorais de próstata, PC3 e PNT2 no período de 24, 48 e 72 horas.....	80

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA - Ácido bicinconínico

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

Col – Colesterol

CP – Câncer de Próstata

DC - Dicroísmo circular

DLS – *Dinamic Light Scattering*

DP – Desvio padrão

DPR - Desvio padrão relativo percentual

DTX – Docetaxel

EPR - Efeito de permeabilidade e retenção

FC - Fator de cauda

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

IPD- Índice de polidispersidade

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

LSS - Lauril sulfato de sódio

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

N - Números de pratos teóricos

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PES - membrana sintética de polietersulfona

PZ - Potencial zeta

QCM-D – Microbalança de Cristal de Quartzo com Dissipação

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

SPC – Fosfatidilcolina de soja

Tf – Transferrina

TfR – Receptor de transferrina

t_R - tempos de retenção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Câncer de próstata.....	22
1.1.1. Biologia do câncer de próstata	22
1.2. Tratamento Convencional.....	23
1.3. Docetaxel.....	24
1.4. Nanotecnologia Farmacêutica.....	25
1.5. Lipossomas.....	25
1.5.1. Características físico – químicas e constituição.....	27
1.6. Transferrina.....	28
1.7. Processo de funcionalização de lipossomas com transferrina.....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos Específicos.....	33
3. MATERIAIS.....	34
3.1. Principais reagentes e matérias primas.....	34
3.2. Materiais e equipamentos.....	34
4. MÉTODOS.....	36
4.1. Desenvolvimento de Lipossomas.....	36
4.1.1. Processo de funcionalização dos lipossomas com transferrina.....	36
4.2. Avaliação da eficiência de funcionalização.....	38
4.3. Caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos.....	39
4.3.1. Análise do tamanho, índice de polidispersão (PDI) e do potencial zeta.....	39
4.3.2. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	39
4.3.3. Análise morfológica.....	39
4.3.4. Teste de estabilidade das formulações.....	40
4.4. Avaliação da integridade estrutural da transferrina.....	40
4.4.1. Avaliação da integridade da proteína por SDS-PAGE.....	40
4.4.2. Dicroísmo circular.....	40
4.4.3. Espectroscopia de fluorescência.....	41
4.5. Validação de metodologia analítica para quantificação do DTX por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	41
4.5.1. Determinação dos parâmetros para validação de metodologia analítica.....	41

4.5.2. Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	42
4.5.3. Linearidade.....	42
4.5.4. Especificidade/Seletividade.....	43
4.5.5. Precisão.....	43
4.5.5.1. Repetibilidade.....	43
4.5.5.2. Precisão Intermediária.....	43
4.5.6. Exatidão.....	43
4.5.7. Limite de detecção e de quantificação.....	43
4.5.8. Robustez.....	44
4.6. Avaliação da eficiência de encapsulação (EE %)	44
4.7. Estudo de dissolução do DTX.....	44
4.7.1. Estudo de solubilidade do DTX.....	44
4.7.2. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do DTX.....	45
4.7.2.1. Ensaio de liberação utilizando sacos de diálise.....	45
4.7.3. Análise da cinética de liberação <i>in vitro</i> do DTX.....	45
4.8. Cultura celular.....	45
4.9. Avaliação da viabilidade celular utilizando resazurina.....	45
4.10. Avaliação do <i>uptake</i> celular.....	46
4.10.1. Microscopia Confocal.....	46
4.10.2. Citometria de fluxo.....	47
4.11. Avaliação da interação entre a linhagem celular PC-3 e lipossomas conjugados com transferrina por QCM-D.....	47
4.11.1. Procedimento experimental.....	48
4.11.1.1. Sensor utilizado.....	48
4.11.1.2. Limpeza dos sensores e equipamentos.....	48
4.11.1.3. Interação dos lipossomas com a camada celular PC3.....	49
4.11.1.4. Microscopia óptica.....	49
4.12. Forma de análise dos resultados.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1. Desenvolvimento dos lipossomas.....	51
5.1.1. Avaliação da eficiência de funcionalização.....	51
5.2. Caracterização físico – química dos sistemas desenvolvidos.....	51
5.2.1. Análise do tamanho, índice de polidispersão (PDI) e do potencial zeta	51
5.2.2. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	52

5.2.3. Análise morfológica.....	53
5.3. Avaliação da integridade estrutural da transferrina.....	54
5.3.1. Avaliação da integridade da proteína por SDS-PAGE.....	54
5.3.2. Dicroísmo circular.....	55
5.3.3. Espectroscopia de fluorescência.....	56
5.4. Validação de metodologia analítica para quantificação do DTX por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	59
5.4.1. Conformidade do sistema cromatográfico.....	59
5.4.2. Especificidade/Seletividade.....	60
5.4.3. Linearidade.....	61
5.4.4. Precisão.....	64
5.4.4.1. Repetibilidade.....	64
5.4.4.2. Precisão Intermediária.....	65
5.4.5. Exatidão.....	66
5.4.6. Limite de detecção e de quantificação.....	67
5.4.7. Robustez.....	67
5.5. Avaliação da eficiência de encapsulação (EE %)	68
5.6. Estudo de dissolução do DTX.....	69
5.6.1. Estudo de solubilidade do DTX.....	69
5.6.2. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do DTX.....	70
5.6.3. Análise da cinética de liberação <i>in vitro</i> do DTX.....	71
5.7. Estudos em cultura celular.....	73
5.8. Avaliação do <i>uptake</i> celular.....	81
5.8.1. Microscopia Confocal.....	81
5.8.2. Citometria de fluxo.....	89
5.8. Avaliação da interação entre a linhagem celular PC-3 e lipossomos funcionalizados com transferrina QCM-D.....	92
6. CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

1.INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de próstata

O câncer de próstata é a neoplasia maligna urológica mais comum e a segunda principal causa de mortalidade de homens associada ao câncer no mundo (MORI et al., 2007; GUO et al., 2016). Na última estimativa mundial, foram registrados aproximadamente 1,3 milhão de novos casos por ano e 360 mil mortes para o câncer de próstata, sendo que países como Austrália, Nova Zelândia e países do Norte e Oeste Europeu, e América do Norte possuem as maiores taxas de incidência (IARC, 2018).

No Brasil, sua incidência está abaixo apenas do câncer de pele não-melanoma. Segundo o Instituto Nacional de Câncer no último ano, a estimativa de câncer de próstata seria de 68.220 mil novos casos entre 2018 e 2019 no Brasil. Além disso, vale ressaltar que as regiões do país com maiores índices são as regiões sul, sudeste e centro-oeste, sendo respectivamente 96,85; 69,83 e 66,75 a cada 100 mil homens (INCA, 2018)

1.1.1. Biologia do câncer de próstata

A próstata humana é uma glândula localizada entre a bexiga e o reto, originada de células epiteliais endodérmicas e mesodérmicas. O papel fundamental da próstata é produzir o líquido prostático, o qual protege os espermatozoides, possibilitando a reprodução e fecundação (INCA, 2018). O desenvolvimento e manutenção de suas funções são regulados por um sistema complexo envolvendo células, hormônios, receptores, genes e proteínas (CARRIÓN-SALIP et al., 2012).

Os hormônios androgênicos são os principais responsáveis pela homeostase da próstata normal ao regular a expressão de genes específicos, entretanto exercem função importante no processo inicial de formação e manutenção do tumor de próstata (RAMÍREZ-BALDERRAMA et al., 2013).

Neste sentido, o surgimento do câncer de próstata está relacionado a diversos fatores, o envelhecimento é apontado como principal fator de risco para o surgimento do câncer de próstata, pois à medida que o indivíduo atinge uma certa idade (~ 70 anos) ocorre aumento do tamanho da próstata. No entanto, homens na faixa dos 30 e 40 anos podem apresentar sintomas (MAITLAND, 2013). Os demais fatores de risco são a origem étnica e herança genética e fatores extrínsecos relacionados à dieta, consumo de álcool, tabagismo, exposição à radiação ultravioleta (UV) e doenças sexualmente transmissíveis (SIEGEL et al., 2015; KRIZHANOVSKY et al., 2008).

O câncer de próstata é uma doença heterogênea devido à complexidade de suas características biológicas, hormonais e moleculares, as quais possibilitam o processo de progressão tumoral (RUSSELL; KINGSLEY, 2003). Em fase inicial, a doença é assintomática ou os indivíduos apresentam alterações do volume e ritmo urinário relacionados à hiperplasia prostática benigna (LIU et al., 2017).

A acentuada incidência de morbidade e mortalidade associadas ao câncer de próstata estão relacionadas à sua alta possibilidade de metástase, o que enfatiza a importância de um diagnóstico preciso e precoce. Dentre os métodos de diagnóstico que possibilitam a descoberta da doença em estágio inicial incluem o exame de toque retal e o teste sanguíneo do antígeno prostático específico (PSA). No entanto, em caso de toque anormal e PSA elevado, o paciente deve ser submetido a uma ultrassonografia transretal com biópsia da próstata. Desta forma, o diagnóstico de confirmação do câncer é feito pelo estudo histopatológico do tecido obtido pela biópsia da próstata, permitindo a escolha da melhor estratégia terapêutica de acordo com idade do paciente e estágio da doença (SIEGEL et al., 2015; MORI et al., 2007; TANNOCK et al., 2004).

1.2. Tratamento Convencional

O tratamento é iniciado por meio de intervenções cirúrgicas que abrangem a prostatectomia radical, seguido de vigilância ativa a fim de monitorar os níveis de PSA e biópsias prostáticas. O tratamento convencional também envolve radioterapia e terapia envolvendo privação androgênica (PAUL; BREUL, 2000; INCA, 2018).

A terapia de privação androgênica (ADT, do inglês *androgen deprivation therapy*) é bastante utilizada principalmente em pacientes cujos tumores não são adequados para intervenção cirúrgica ou em associação a radioterapia. A ADT tem por objetivos reduzir os níveis de andrógenos (hormônios masculinos) ou impedir que eles entrem em células de câncer de próstata, as quais são descritas como dependentes de andrógenos para seu crescimento. Com a hormonioterapia, o tumor de próstata entra em período de remissão temporária, mas posteriormente o câncer pode se tornar resistente a ADT (LOCKE et al., 2008). O tratamento, além de não curar o câncer de próstata, provoca efeitos adversos como desenvolvimento de osteoporose, disfunção sexual, ginecomastia, anemia e alterações na composição corporal, dentre outros (ZHOU et al., 2015; ROLIM et al., 2014; CHOU et al., 2011).

O câncer de próstata pode também ser tratado com a quimioterapia, a qual pode melhorar os resultados globais dos pacientes que apresentam a doença em fase de metástase.

São encontrados na literatura estudos que demonstraram um controle notável do crescimento do câncer de próstata utilizando docetaxel (DTX) (LIU et al., 2012; WANG et al., 2017).

1.3. Docetaxel

O DTX, cuja estrutura química está representada na figura 1, pertence à classe dos anticancerígenos taxanos, obtido de forma semi – sintética através do composto natural 10-desacetilbacatina III, um componente não citotóxico obtido das folhas da planta *Taxus baccata*, pode ser encontrado na forma de pó cristalino a esbranquiçado e massa molecular 807, 89 g/mol.

As características físico-químicas do DTX confirmam seu caráter lipofílico, pois apresenta 10, 96 de pKa, log P 2,4 e solubilidade em água 0,0127 mg/mL. Neste contexto, a alta lipofilicidade e insolubilidade em água prejudica seu perfil farmacocinético, no entanto, em comparação com seu análogo paclitaxel (PTX), o DTX apresenta rápida absorção, menor toxicidade e solubilidade em água em consequência de pequenas diferenças na estrutura química em duas posições o grupo tert-butoxi C-13 em vez do grupo fenil benzamida. e o grupo hidroxila C-10 substituindo o grupo acetila (SILVA et al., 2018; PUBCHEM, 2019).

O mecanismo de ação do DTX envolve inibição da proliferação celular a partir do bloqueio mitótico sustentado durante a metáfase/anáfase do ciclo celular, o que promove a polimerização de microtúbulos estáveis e impede a divisão celular (PEREIRA et al., 2016).

O DTX foi aprovado em 2004 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e pela Agência Europeia de Medicina para representar o tratamento de primeira linha para câncer de próstata avançado (LIU et al., 2012). Também é utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, como de mama localmente avançado ou metastático, pulmão, gástrico, entre outros (ENGELS et al., 2007).

A formulação comercial do DTX apresenta o tensoativo não iônico Tween® 80 (polisorbato 80) e 13% de etanol. Berthold e colaboradores (2008) e Abdel-Rahman (2019) descreveram em seu estudo que o uso de docetaxel em pacientes com câncer de próstata com resistência hormonal não foi positivo, pois uma parcela significativa dos pacientes apresentou efeitos colaterais envolvendo neutropenia, toxicidade musculoesquelética e reações de hipersensibilidade (BERTHOLD et al., 2008; ABDEL-RAHMAN, 2019). Em consequência das reações adversas relacionadas ao tensoativo presente na formulação comercial do DTX seu clínico se tornou limitado. Neste sentido, o desenvolvimento de nanoformulações, como por exemplo nanopartículas poliméricas ou lipídicas, micelas, dendrímeros, nanoemulsões e

lipossomas para transportar o DTX de forma eficiente até as células tumorais tem sido bastante estimulado (LIU et al., 2012; ELOY et al., 2014; TAN et al., 2012; MANJAPPA et al., 2013).

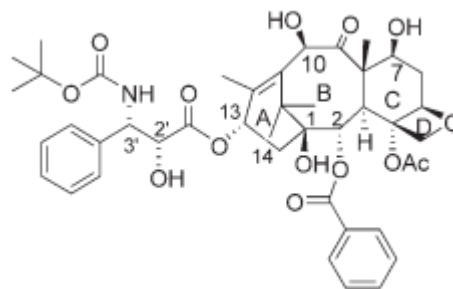


Figura 1: Estrutura química do DTX (GALLETI et al., 2007).

1.4. Nanotecnologia Farmacêutica

A incorporação do DTX em sistemas de liberação nanoestruturados de fármacos tem por objetivo principal melhorar suas aplicações clínicas. Isto porque esses sistemas melhoram a farmacocinética e biodisponibilidade, o que possibilita o acúmulo passivo no tumor pelo aumento do efeito de permeabilidade e retenção (EPR). Além disso, os nanosistemas podem ter a superfície modificada com ligantes que tem como alvo receptores de células cancerígenas, o que permite o direcionamento do fármaco ao alvo, com potencial melhora da eficácia terapêutica (ELOY et al., 2014).

A nanotecnologia é uma estratégia que possibilitou diversas mudanças no desenvolvimento de terapias, solucionando problemas como redução da toxicidade e aumento da eficácia de dosagens convencionalmente utilizadas, além disso podem proteger o princípio encapsulado de degradação (AHMAD et al., 2012).

Com o uso da nanotecnologia farmacêutica se tornou possível o desenvolvimento de sistemas de entrega que auxiliam na liberação de fármacos lipofílicos sem alterar a estrutura da molécula (NOBLE et al., 2014). Por sua vez, as diferentes estruturas em escala nanométrica atualmente desenvolvidas demonstraram ser superiores aos sistemas de administração convencionais, como por exemplo lipossomas, nanoemulsão, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas, dentre outras (CHEN et al., 2011).

1.5. Lipossomas

Os lipossomas foram descobertos por Alec Bangham na década de 1960, o qual observou que fosfolipídeos em soluções aquosas podem formar estruturas fechadas em bicamadas lipídicas concêntricas simples ou múltiplas que encapsulam um compartimento aquoso. Após uma investigação envolvendo difusão de íons através de membranas lipídicas

artificiais que Bangham e colaboradores (1965) difundiram a respeito dos sistemas mais tarde caracterizados como lipossomas (BOZZUTO et al., 2015; BATISTA; CARVALHO; MAGALHAES, 2007; GIBIS et al., 2013; BANGHAM; WATKINS; STANDISH, 1965).

Os lipossomas são vesículas lipídicas que pode variar de alguns nanômetros a vários micrômetros e possuem a capacidade de veicular tanto agentes lipofílicos (membrana lipídica) quanto hidrofílicos (núcleo aquoso) (Figura 2) (TAN et al., 2012). Estes sistemas podem ser obtidos por diferentes técnicas e são classificados de acordo com seu tamanho, são formadas vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV), as quais podem apresentar tamanho de até 5 μm , de 20 a 100 nm e 100-250 nm, respectivamente (PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016).

Neste contexto, os lipossomas são divididos nas seguintes categorias: convencional, polimórficos, de circulação prolongada e sítio-específicos (BATISTA; CARVALHO; MAGALHAES, 2007). Vários métodos estão descritos na literatura para obtenção dos mais diversos tipos de lipossomas, envolvendo processos mecânicos e químicos, os quais definem o tamanho de partícula (ÇAĞDAŞ et al., 2014).

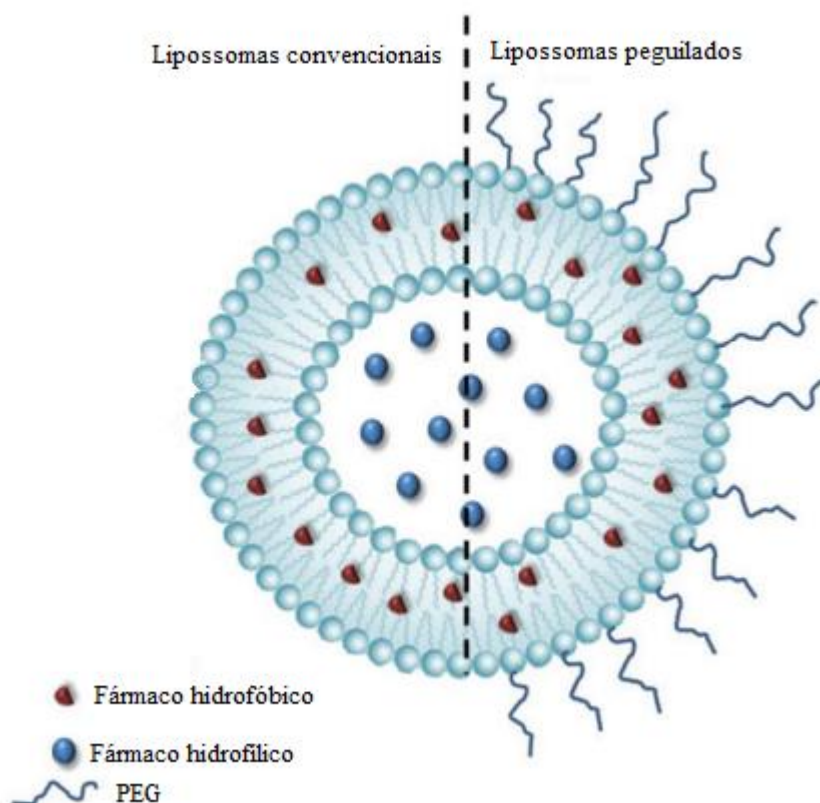


Figura 2. Estrutura do lipossoma convencional (esquerda) e peguillado (direita). Fonte: Adaptado de Ahmed et al., (2016).

1.5.1. Características físico – químicas e constituição

A composição predominante dos lipossomas são fosfolipídios e colesterol, e as características químicas que estes lipídeos apresentam determinarão o desempenho desses sistemas (GARG; RATH; GOYAL, 2015). A fosfatidilcolina é o fosfolipídio habitualmente utilizado na obtenção dos lipossomas, podendo ser natural (proveniente de ovos ou soja) e sintética. No entanto, Jin Li e colaboradores (2015) descrevem em seu trabalho que a fosfatidilcolina natural é menos estável em comparação com as sintéticas, resultado da presença de ácidos graxos poliinsaturados (JIN LI et al., 2015)

A fosfatidilcolina estruturalmente apresenta em sua composição um grupo fosfato polar e por cadeias de hidrocarbonetos (parte hidrofóbica), os quais formam a parte exterior e interior dos lipossomas, respectivamente. Alternativamente, um grupo funcional na porção polar da fosfatidilcolina, como por exemplo 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), pode ser adicionado para possibilitar a ligação de polímeros como o PEG (polietilenoglicol) (MARQUES-GALLEGO; KROON 2014; JING LI et al. 2015).

Neste contexto, os lipossomas peguillados apresentam maior estabilidade e tempo de circulação em relação aos lipossomas convencionais (CUI et al., 2015). A escolha do fosfolipídio adequado é realizada através da avaliação da sua temperatura de transição de fase (T_c), este importante parâmetro define qual temperatura necessária para que o lipídeo se converta em fase de gel em cristalina líquida desordenada. Diante disso, os fosfolipídios que possuem T_c mais altas conferem maior grau de estabilidade as bicamadas (ELOY et al., 2014).

A temperatura de transição de fase (T_c) dos fosfolipídios também é um critério importante para a escolha de fosfolipídios para a preparação de lipossomos (LAOUINI et al., 2012; BOZZUTO & MOLINARI, 2015; JING LI et al., 2015). O colesterol pode ser acrescentado na formulação lipossomal. Sua inserção confere menor fluidez e deformação da membrana, diante disso possibilita a redução do extravasamento do fármaco encapsulado e permeabilidade, resultando na elevação da T_c e o aumento da estabilidade (BATISTA; CARVALHO; MAGALHAES, 2007).

Portanto, esses sistemas apresentam múltiplas características favoráveis, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de elevada variabilidade de carga superficial e fluidez da membrana, o desenvolvimento de lipossomas encapsulando fármacos antitumorais tem atraído atenção das indústrias farmacêuticas, principalmente quando apresentam tamanho na faixa de 100 nm para aplicação em modelos sofisticados de sistemas de liberação de fármacos, pois reduzem o reconhecimento das opsoninas e aumentam o tempo de tempo de

circulação e liberação prolongada (PATIL et al., 2014; BATISTA; CARVALHO; MAGALHAES, 2007).

Neste sentido, existe disponível no mercado uma formulação lipossômica peguilada de doxorubicina (Doxil®), apresenta estabilidade comprovada superior a 18 meses em solução aquosa, aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e disponível comercialmente desde 1995, representa uma alternativa terapêutica para diversos tipos de cânceres em humanos (LI et al., 2015; CUI et al., 2015; BARENHOLZ, 2012; ÇAĞDAŞ et al., 2014).

De acordo com Pereira e colaboradores (2016) a utilização de lipossomas para veiculação do DTX pode ser uma estratégia viável para o tratamento do câncer de próstata, pois avaliaram seu efeito em esferoides da linhagem de câncer de próstata (PC-3) em comparação com a formulação comercial do DTX. O grupo desenvolveu lipossomas contendo o fosfatidilcolina, colesterol e PEG, observou-se que a taxa morte celular nas células tratadas com DTX encapsulado em lipossomas foi superior ao DTX livre (PEREIRA et al., 2016). Kobayashi et al. (2013) também desenvolveram lipossomas catiônicos carregados com docetaxel e induziram tumor de próstata em modelo animal, como resultado observaram que houve a supressão de proliferação celular e destruição óssea (KOBAYASHI et al., 2013).

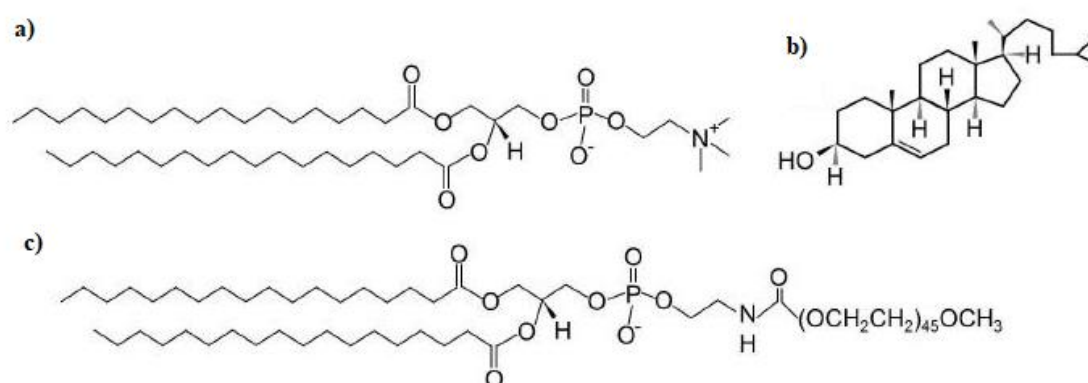


Figure 3. Estruturas químicas dos lipídeos que constituem os lipossomas. a) fosfatidilcolina, b) colesterol e c) 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenoglicol (DSPE -PEG). Fonte: Adaptado de Pandey et al., (2016).

1.6. Transferrina

Na literatura, os receptores de transferrina (TfR) são bem estudados na terapia do câncer, pois são superexpressos por células tumorais principalmente por sua função da homeostase de ferro e na proliferação celular. Segundo Shen e colaboradores (2018), as células tumorais de próstata apresentaram elevados níveis de expressão de TfR (SHEN et al., 2018).

As transferrinas são uma classe de proteínas compostas por uma única cadeia de polipeptídios em torno de 670 a 700 aminoácidos e peso molecular 80kDa (LI; QIAN, 2002).

Sua estrutura possui dois lobos denominados N e C (Figura 4), pois apresentam amino e carboxil terminal, respectivamente (CHENG et al., 2004; BAKER; LINDLEY, 1992; VICENT; LOVE (2012).

Esta proteína é responsável por transportar o ferro para o interior celular. O processo se inicia com a ligação do ferro (Fe^{3+}) em cada um dos lobos formando a holo-transferrina (holo-Tf), em seguida o processo de entrega a célula ocorre pelo receptor expresso na superfície celular por endocitose (BARNUM-HUCKINS; ADRIAN, 2000; TORTORELLA; KARAGIANNIS, 2014; DEGREGORIO-ROCASOLANO et al., 2017). Finalmente, o ferro é liberado dentro da célula e a conformação das proteínas se altera para apo-transferrina (apo-Tf), os subdomínios de cada lobo se fechando ou abrindo com uma forte torção até que a transferrina chegue na superfície celular e circule até encontrar uma nova molécula de ferro livre para que o processo reinicie (CHENG et al., 2005; ANDREWS, 2000).

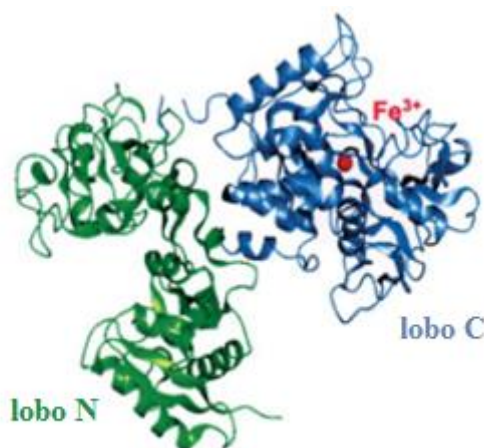


Figura 4. Estrutura da transferrina. O lobo C (azul) contém Fe^{3+} (HoloTf) e lobo N (verde) (apoTf). Fonte: Li & Qian, (2002).

Diante disso, estudos demonstram que existe potencial para utilização da transferrina tanto no diagnóstico como na terapia de doenças em virtude da sua capacidade de ligação a íons metálicos além do ferro e ainda assim ser reconhecido pelo receptor da transferrina (LI; QIAN, 2002; WALLY et al., 2007). Esta característica das células biologicamente mais agressivas apresentarem altos níveis de expressão de TfR tornou este receptor como alvo para os sistemas de administração de drogas na terapia antitumoral (ZHAI et al., 2010; YANG et al., 2015).

1.7. Processo de funcionalização de lipossomas com transferrina

Os lipossomas, além das diversas vantagens apresentadas, podem ser modificados com ligantes para entrega a locais específicos, como membranas celulares cancerígenas, receptores

citoplasmáticos ou nucleares. Uma abordagem atrativa para liberação dos fármacos celular e intracelular é a modificação superficial dos lipossomas (Figura 5 e 6) com ligantes específicos dos receptores regulados nas superfícies de células tumorais, tais como integrinas, receptores de fator de crescimento, transportadores de glicose, receptores de folato, receptores de transferrina, entre outros (SRIRAMAN et al., 2016). Portanto, uma das principais vantagens da funcionalização seria o aumento dos efeitos terapêuticos e diminuição dos efeitos colaterais (GUO et al., 2016; YANG et al., 2015; DANIELS et al., 2012).

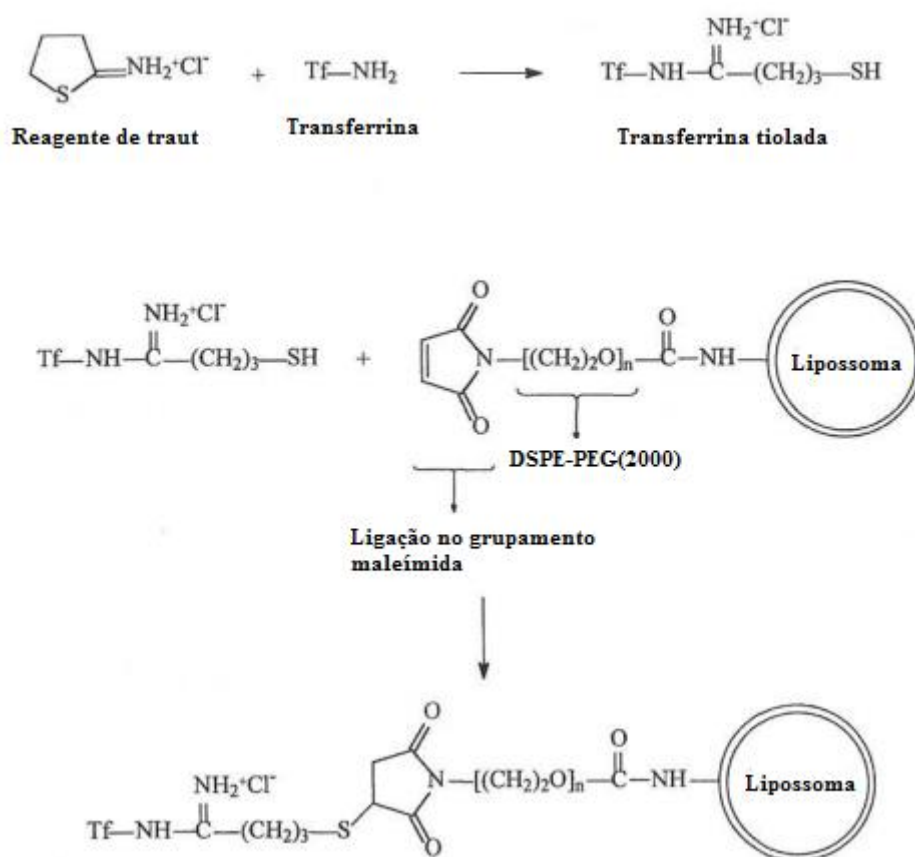


Figura 5: Esquema representando o processo de tiolação da transferrina, conjugação transferrina tiolada com lipossomas contendo DSPE-PEG (2000) – maleímida. Fonte: Derycke; Witte (2002).

Resultados positivos são encontrados em pesquisas envolvendo sistemas de liberação e transferrina para o tratamento de diversos tipos de câncer, ressaltando estudos clínicos em fase 2 em desenvolvimento com pacientes com adenocarcinoma gástrico e esofágico utilizando lipossomas funcionalizados com transferrina para veiculação dos fármacos 5-fluorouracil, leucovorin e oxaliplatina (DANIELS et al., 2012; SHEN et al., 2018; YANG et al., 2015; SENZER et al., 2009).

Zhai e colaboradores (2010) demonstraram que a associação de lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX para o tratamento do câncer epitelial foram satisfatórios, em destaque para a absorção celular em células TfR positivo. Além disso, o estudo farmacocinético indicou liberação prolongada do fármaco a partir da formulação em modelo animal (ZHAI et al., 2010).

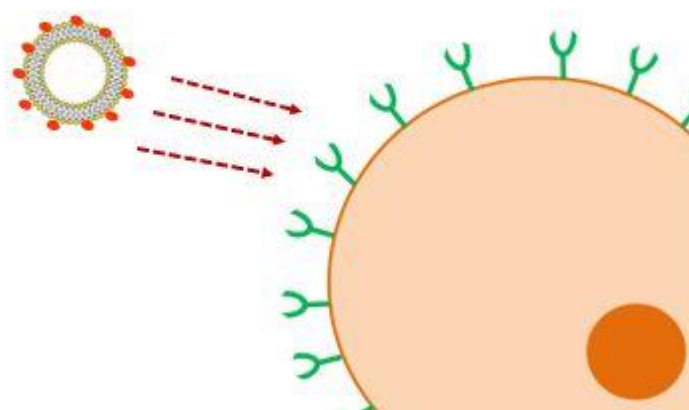


Figura 6: Processo de direcionamento ativo de lipossomas. Fonte: Adaptado de Eloy et al., 2014.

Existem relatos na literatura que a estratégia de funcionalização de lipossomas com transferrina aumenta a citotoxicidade do DTX em células de câncer cerebral (U-87 MG), que são células que superexpressam o receptor de transferrina (JHAVERI et al., 2018). Outro alvo potencial para o direcionamento da transferrina são as células tumorais hepáticas. De fato, Li e colaboradores (2009) demonstraram em seu trabalho que o uso de lipossomas funcionalizados com transferrina para a entrega de doxorubicina aumentou a captação celular e a citotoxicidade *in vitro* usando uma linhagem celular de carcinoma hepático humano (HepG2) (LI et al., 2009).

No presente trabalho, um dos principais objetivos foi confirmar a hipótese de que a funcionalização de lipossomas com transferrina e carregados com DTX poderia resultar em uma captação celular mais seletiva e uma citotoxicidade aumentada na linhagem de células do câncer de próstata que superexpressa o TfR (PC3). Embora os lipossomas carregados com DTX tenham sido testados em esferoides de PC3 e induzam citotoxicidade mais alta do que os grupos tratados com DTX livre (PEREIRA et al., 2016), ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez

que lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX são investigados para câncer de próstata. Para mostrar o efeito da formulação nas células normais (baixa expressão de TfR) foi utilizada a linhagem celular epitelial de próstata não maligna (PNT2).

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial de lipossomas funcionalizados com transferrina para veiculação de docetaxel no tratamento do câncer de próstata *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver lipossomas contendo docetaxel funcionalizados com transferrina;
- Caracterizar físico-quimicamente os sistemas desenvolvidos por técnicas de medidas do tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, NTA, SDS-PAGE, espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular (CD) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM);
- Determinar a eficiência de funcionalização dos lipossomas com transferrina;
- Validar a metodologia analítica para quantificação do docetaxel por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a eficiência de encapsulação do docetaxel nos sistemas desenvolvidos;
- Avaliar a liberação *in vitro* do docetaxel livre e a partir das formulações;
- Verificar a citotoxicidade em linhagens celulares PC-3 (tumoral de próstata com alta expressão de receptor de transferrina) e PNT-2 (linhagem saudável de próstata com baixa expressão de receptor de transferrina);
- Avaliar o *uptake* dos lipossomas nas linhagens celulares de câncer de próstata e em linhagem saudável por citometria de fluxo e microscopia confocal;
- Avaliar a interação dos lipossomas com a linhagem tumoral prostática PC-3 em tempo real empregando tecnologia da Microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D).

3. MATERIAIS

3.1. Principais reagentes e matérias-primas

- Acetato de uranila (Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA);
- Acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker[®], EUA);
- Cloreto de potássio (Synth[®], Brasil);
- Cloreto de Sódio (Vetec[®], Brasil);
- Clorofórmio (Merck);
- Colesterol (Sigma);
- DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol (Sigma Aldrich Chemical Company, Ireland);
- DiO - 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina perclorato (Sigma Aldrich Chemical Company, Ireland);
- Docetaxel (Apichem, China);
- DSPE-PEG (2000) maleimida (MAL) (Avanti, Polar Lipids, INC, EUA);
- Fosfatidilcolina de Soja (Epikuron[®] 200, Lucas Mayer, Brasil);
- Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado (Synth[®], Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico anidro (Synth[®], Brasil);
- Lauril sulfato de sódio (Sigma);
- Reagente de traub (Thermo Fisher Scientific, EUA);
- Sal de Tyroide com bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich Chemical Company, Ireland);
- Transferrina (Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA)

3.2. Materiais e Equipamentos

- Agitador magnético (IKA RCT Basic L6.37);
- Agitador magnético (Quimis);
- Balança semi-analítica (Shimadzu, modelo AW220);
- Banho-maria / Sonicador: Ultrasonic Bath 8890, Supplier- Cole Parmer;
- Banhos ultrassônicos (Ultrasonic Cleaner, Unique);
- Bomba à vácuo (Norte científica);
- Centrífuga (Eppendorf, modelo 5804R);
- Coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (250 mm x 4.6mm 5µm, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia);
- Contador de Partículas Z1 (Beckman Coulter);

- Cromatógrafo Agilent Technologies 1220 Infinity II LC;
- Espectrofotômetro de Fluorescência Hitachi F-4500 controlado por Computador (Velocidades de varredura de até 30.000 nm por min e comprimento de onda de 60.000 nm por min, Excitação 300 nm / Emissão 400 nm, Japão);
- Espectrômetro/espectropolarímetro de dicroísmo circular modelo J – 815 (Jasco Inc., Tóquio, Japão);
- Filtro de ultrafiltração Amicon®;
- Grant QBD1dry Thermo – Block - Fischer, Ireland;
- Homogeneizador a alta pressão, EmulsiFlex-C-3;
- Incubadora shaker refrigerada (Nova técnica, Brasil)
- Incubadora, com atmosfera controlada (Binder® CB);
- Leitor de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG, Labtech);
- Leitor de microplacas Synergy H1 Biotek (Comprimento de onda 230 a 999nm, EUA);
- Membrana em disco, Polietersulfona, 47mm de diâmetro, lisa, poro de 0,45µm (LAC, Brasil);
- Membranas de diálise, Celulose, 12-14kDa (Fisherbrand);
- Microbalança de cristal de quartzo com dissipação: QSense E4, Fornecedor Biolin Scientific, Gotemburgo, Suécia;
- Micropipeta de 10 e 100µL – Eppendorf;
- Micropipeta de 100 e 1000µL – Eppendorf;
- Microscópio de epifluorescência de reflexão BX51M (Olympus, Southend-on-Sea, Reino Unido);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-100CX2 equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR (Voltagem de aceleração: 20, 40, 60, 80, 100 kV; Resolução 0.3 nm; Magnificação: x330 a 450000; Espessura do espécime: 150 nm, EUA);
- Nanobalança: FACT Mettler MT5, Fornecedor - Mettler Toledo;
- pHmetro (Gehaka®, Brasil);
- pHmetro: ORION basic Ph / mV / ORP, Fornecedor - Thermo Fischer Scientific;
- Refrigerador Consul;
- Rotaevaporador RV10 digital (IKA);
- Sistema de purificação de água MILLIPORE®, Milli – Q Plus, condutividade 18, 1µS.cm⁻¹;
- Spectrafuge™ 16 M Microcentrífuga (Labnet®, USA);

- Ultracentrífuga (ThermoScientific);
- UV Ozônio Pro-limpador, fornecedor Bioforce Nanociências (Ames, IA, EUA);
- Vórtex MVS-1 (Biomixer);
- Zetasizer Nano NS Malvern Instruments (Malvern, UK);

4. MÉTODOS

4.1. Desenvolvimento dos lipossomas

Utilizou-se a técnica clássica da hidratação filme lipídico, baseado em Eloy et al. (2016) com modificações. As formulações foram constituídas pela mistura de fosfatidilcolina de soja (SPC): colesterol (Col):DSPE-PEG (2000) -Maleimida e SPC:Col:DSPE-PEG (2000)-Maleimida:DTX, nas proporções molares 10:2:0.78 e 10:2:0.78:0.52, respectivamente. Os lipídeos e docetaxel (DTX) foram pesados e dissolvidos em 2 mL de clorofórmio em balão de fundo redondo. Em seguida, utilizando o rotaevaporador, ocorreu a remoção do clorofórmio por pressão reduzida, rotação de 100 rpm e após 30 minutos restou uma fina película que foi hidratada com 15 mL de tampão fosfato (pH 7,4) durante 30 min a 60 °C a 100 rpm. Para redução da partícula a solução lipossomal foi processada em homogeneizador de alta pressão, EmulsiFlex-C3, com ciclos de pressão que atingiam até 15.000 psi por um período de 20 minutos (41,5 ciclos) e logo em seguida armazenados no refrigerador na temperatura de 2-8°C (HOSNY, 2010; ZHENG-HONG et al, 2004; ELOY et al., 2014; ZHAI et al., 2010).

Foram coletadas amostras antes e depois do processo de homogeneização de alta pressão. Posteriormente, os lipossomas foram purificados por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) utilizando colunas CL-4B (PEREIRA et al., 2018).

4.1.1. Processo de funcionalização dos lipossomas com transferrina

O processo de funcionalização dos lipossomas (Figura 7 e 8) foi conduzido seguindo as metodologias desenvolvidas por Eloy et al. (2016); Zhai et al. (2010); Derycke and Witte (2002); Ulbrich et al. (2009); Derycke et al. (2004), com modificações. Os lipossomas foram preparados inicialmente compostos por SPC:Col:DSPE-PEG (2000) -Maleimida (1) e SPC:Col:DSPE-PEG (2000)-Maleimida-DTX (2). Simultaneamente, a transferrina foi diluída em 200 µL de tampão PBS pH 8,0; 800 µL de tampão PBS-EDTA pH 8,0 (5 mM) e o pH da solução foi ajustado a 8,0 com NaOH (0,1 M). A solução de transferrina, 0,240 mg/mL foi adicionada à solução do reagente de Traut (6,9 mg/mL) na proporção de 50:1 em relação à proteína. Esta solução foi incubada por 1h sob agitação (600 rpm) a temperatura ambiente em ausência de luz para permitir a tiolação. A próxima etapa foi a purificação da mistura contendo Sulfidril Transferrina (Tf-SH) através da cromatografia de gel filtração, utilizando uma coluna

PD-10 e em seguida eluição com tampão PBS-EDTA 5 mM (pH 8,0) para remover o reagente de Traut não reagido. Após determinação da concentração de transferrina em cada alíquota por ensaio BCA (ácido bicinonínico), as frações contendo a proteína foram combinadas e adicionadas ao lipossoma que foi preparado previamente. As misturas foram incubadas por 20 horas a 37 °C, 4 °C e temperatura ambiente (25 °C), por último o lipossoma funcionalizado foi purificado em coluna CL-4B para separação do lipossoma e a proteína livre, utilizando tampão PBS pH 7,4 como eluente (Figura 4) e filtradas em membrana de tamanho de 0,45 µm (PTFE).

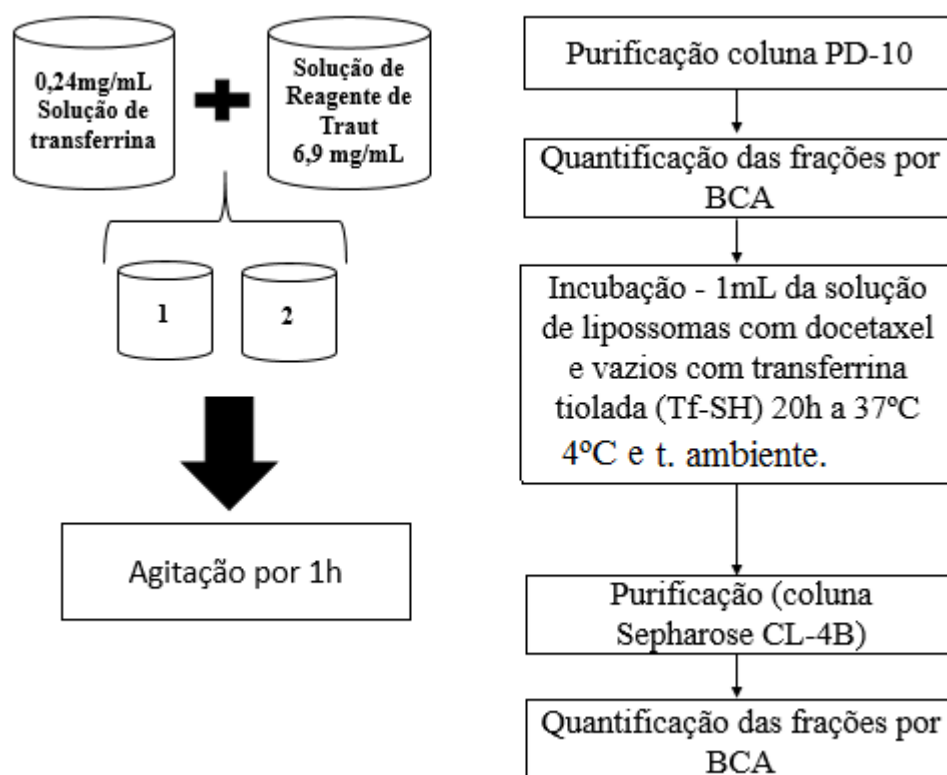


Figura 7: Esquema do Processo 1 de funcionalização dos lipossomas com transferrina. Fonte: Próprio autor.

O processo anterior foi repetido com modificações (Figura 8). A proteína foi diluída como descrito anteriormente; no entanto, foi aumentada a concentração para 1 mg/mL e foi adicionada a solução do reagente de Traut (2,0 mg/mL), na proporção de 40:1 em relação à proteína. Esta solução foi incubada por dois ciclos de 25 minutos e 5 minutos de repouso entre eles sob agitação (600 rpm) a temperatura ambiente em ausência de luz para permitir a tiolação. A próxima etapa foi a purificação da mistura contendo Sulfidril Transferrina (Tf-SH) através da cromatografia de gel filtração, utilizando uma coluna PD-10 e em seguida eluição com tampão PBS-EDTA 5 mM (pH 8,0) para remover o reagente de Traut não reagido. Após determinação da concentração de transferrina em cada alíquota por ensaio BCA (ácido bicinonínico), as frações contendo a proteína foram combinadas e adicionadas ao lipossoma que foi preparado previamente. A mistura foi incubada por 20 horas a temperatura ambiente e

por último o lipossoma funcionalizado foi purificado em coluna CL-4B para separação do lipossoma e a proteína livre, utilizando tampão PBS pH 7,4 como eluente filtradas em membrana de tamanho de 0,45 μm (PTFE) (Figura 5).

Foram obtidos lipossomas vazios (A); lipossomas com docetaxel (B); lipossomas funcionalizados vazios (C); lipossomas funcionalizados com docetaxel (D) e em seguida foram realizadas as caracterizações físico-químicas.

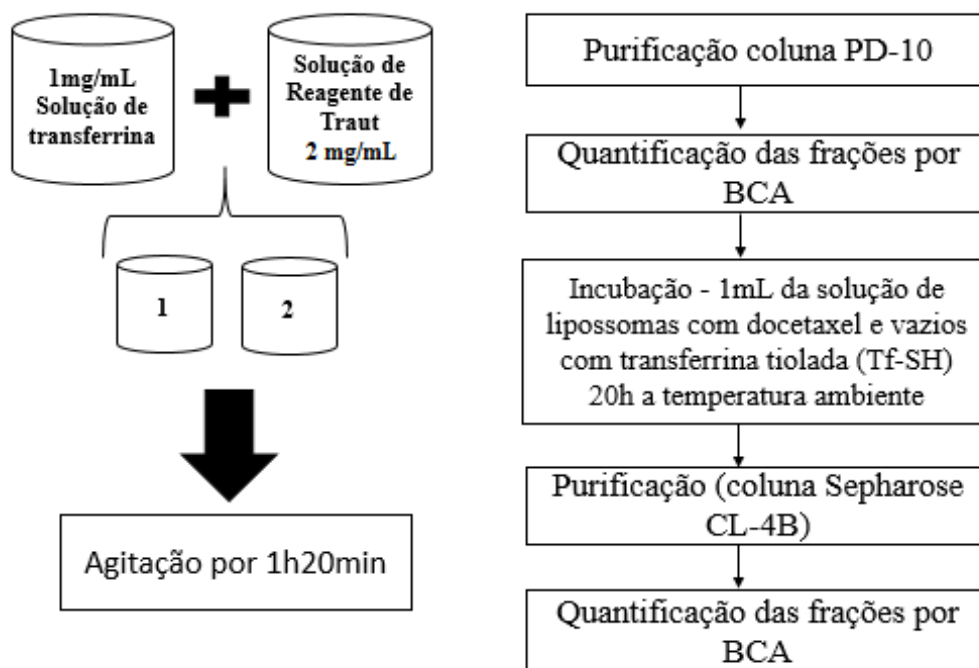


Figura 8: Esquema do Processo 2 de funcionalização dos lipossomas com transferrina. Fonte: Próprio autor.

4.2. Avaliação da eficiência de funcionalização

Para determinar a concentração de proteína após o processo de tiolação e eficiência de conjugação de transferrina aos lipossomas foi utilizado o ensaio BCA, de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific). A curva padrão foi preparada a partir da mistura dos reagentes A e B (proporção 50:1) (Reagente de trabalho). Foram adicionados 25 μL de cada padrão de albumina (20 – 2000 $\mu\text{g/mL}$) para a curva padrão e 25 μL de amostra em placa de 96 poços. A placa contendo 200 μL de reagente de trabalho foi homogeneizada por 30 segundos e incubada a 37 °C por 30 min, em seguida passou por resfriamento. A absorbância foi lida em 562 nm em leitor de microplacas. Para realizar a concentração de proteína foi utilizada a equação da curva padrão e para o cálculo da eficiência de conjugação foi feita a relação entre a porcentagem de proteína quantificada no sistema lipídico (purificado

em coluna Sepharose CL-4B) e o total de proteína empregado no experimento (ELOY et al., 2017).

4.3. Caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos

4.3.1. Análise de diâmetro médio, do índice de polidispersão (PDI) e do potencial zeta

Alíquotas das suspensões lipossomais (100 µL) vazias (A), carregadas com DTX (B), vazias e funcionalizadas com transferrina (C) e carregadas com DTX e funcionalizados com transferrina (D) foram diluídas em 1,5 mL com água destilada e submetidas logo em seguida as medidas de diâmetro médio e índice de polidispersidade foram analisados utilizando método de dispersão de luz dinâmica (DLS) num aparelho Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments), utilizando um laser de 10 mW HeNe operando a 633 nm com um ângulo de incidência de detecção de 173° a 25 °C. A análise de dados foi realizada em modo automático. A carga superficial das dispersões foi determinada pela mobilidade eletroforética das partículas/gotículas dispersas submetidas a um campo elétrico. As análises foram realizadas com o uso do equipamento Zetasizer 3000HSa (ZHAI et al., 2010).

4.3.2. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

O tamanho das partículas e a concentração de lipossomas foram avaliados pelo NTA, utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Reino Unido) equipado com uma câmara de amostra e um laser de 638nm. As amostras (A, B, C e D) foram diluídas 150 vezes em água destilada até um volume final de 1 mL. As concentrações ideais de medição foram encontradas pré-testando o valor ideal de partícula por quadro (20–100 partículas/quadro). As suspensões lipossomais foram injetadas na câmara de amostra com seringas estéreis até o líquido se estender até a ponta da seringa. As medidas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25°C) (RIBEIRO et al., 2018).

4.3.3. Análise morfológica

A morfologia dos lipossomas foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-100CX2. As amostras das formulações A, B, C e D foram diluídas previamente em tampão PBS pH 7,4 de forma que a concentração final de lipídeos obtida foi de 0,5 mg/mL. Em seguida foram colocadas na grade de cobre de 200 mesh e deixadas em repouso por 10 minutos até adsorção, e então o excesso foi removido com papel de filtro. Subsequentemente, uma gota de uma solução a 1% (p/v) de acetato de uranila foi adicionado para contrastação negativa. Depois de 2 minutos o excesso

foi removido e a amostra foi seca à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão com aceleração de 100 kV e aumento de 100.000 vezes (ELOY et al., 2016) pertencente ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e de Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP/ Ribeirão Preto. O software ImageJ foi utilizado para medir o tamanho dos lipossomas a partir das fotomicrografias.

4.3.4. Teste de estabilidade das formulações

Após o preparo das formulações, foram realizadas análise de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta nos tempos 24 horas, 5, 10, 15, 30, 45,60 e 90 dias. As formulações foram armazenadas em refrigerador em temperatura de 2-8°C durante todo o período de análise.

4.4. Avaliação da integridade estrutural da transferrina

4.4.1. Avaliação da integridade da proteína por SDS-PAGE

Para avaliar a integridade da glicoproteína nos lipossomas funcionalizados foi realizado segundo procedimento descrito por Yang et al. (2007) e Eloy et al. (2017) empregando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page), de acordo com as orientações do fabricante (Bio-Rad). Inicialmente, utilizou-se 2-mercapto-etanol para incubação das amostras. Em seguida, para que ocorresse o processo de redução foi utilizado agente redutor, tampão de amostra Laemmli, e incubação a 60 °C por 10 minutos. As condições de eletroforese foram de 175 V por 30 minutos, com o uso de cubas eletroforéticas Mini-PROTEAN e tampão de corrida contendo Tris/glicina/SDS. O padrão de proteínas usado foi o Precision Plus Dual Color Protein (Bio-Rad). Foi empregado o azul de Coomassie para coloração e água deionizada para descorar os géis.

4.4.2. Dicroísmo circular

Os espectros do dicroísmo circular da proteína em solução, proteína tiolada e incorporada na formulação foram obtidos pelo equipamento espectrômetro/espectropolarímetro de dicroísmo circular modelo J – 815 (Jasco Inc., Tóquio, Japão) pertencente ao grupo de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo USP/São Carlos, na região de comprimento de luz entre 260 nm e 200 nm. Este experimento teve por objetivo investigar a integridade da estrutura secundária da proteína após a funcionalização.

4.4.3. Espectroscopia de fluorescência

A partir das soluções de transferrina em tampão, transferrina tiolada (TF-SH), formulações de lipossoma com docetaxel e vazia, formulações funcionalizadas com fármaco e vazias foram realizadas análises comparativas entre os espectros de emissão da transferrina antes e depois do processo de tiolação, bem como das conjugadas com os lipossomas. O objetivo foi identificar interações e modificações na conformação das proteínas após as ligações. As análises foram conduzidas utilizando os comprimentos de onda de excitação em 280 nm e 295nm empregando espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500 controlado por Computador (Velocidades de varredura de até 30.000 nm por minuto e comprimento de onda de 60.000 nm por min, excitação 300 nm/emissão 400 nm) pertencente ao grupo de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP/São Carlos. Este experimento teve por objetivo investigar a integridade da estrutura terciária da proteína após a funcionalização.

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

Na validação do método analítico para quantificação do DTX por CLAE, os seguintes parâmetros foram avaliados: conformidade do sistema, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, especificidade/seletividade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), robustez, seguindo as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2017; USP, 2011). Foram desenvolvidas duas metodologias analíticas, nas quais o DTX foi quantificado em meio receptor (Tampão fosfato PBS pH 7,4 + 1,25% LSS) e em acetonitrila:água.

4.5.1. Determinação dos parâmetros para validação de metodologia analítica

Para a quantificação de docetaxel em formulações, ensaios de solubilidade, eficiência de encapsulação e liberação *in vitro*, validou-se a metodologia analítica seguindo a Farmacopeia Europeia (European Pharmacopoeia, 2011), com modificações. Foi utilizado o cromatógrafo Agilent Technologies 1220 Infinity LC, injetor automático, com detector UV-Vis pertencente ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Unesp, Araraquara. Os parâmetros empregados na metodologia estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas na metodologia analítica.

Parâmetros	
Fase estacionária	Coluna HPLC 250X4,6 mm; 5 µm ZORBAX Eclipse Plus C18
Fase móvel	Acetonitrila: Água (65:35)
Fluxo	0,8 mL/min
λ de detecção	230 nm
Volume de injeção	10 µL
Temperatura do forno	45°C
Tempo de corrida	8 min

As soluções teste foram preparadas a partir de diluições de uma solução estoque do fármaco DTX, em fase móvel, na concentração de 100 µg. mL⁻¹. Dessa maneira foi avaliado o tempo de retenção obtido para o fármaco docetaxel.

4.5.2. Adequabilidade do sistema cromatográfico

Para assegurar que o sistema cromatográfico apresente resultados aceitáveis e confiáveis, foram realizadas seis injeções da solução de DTX (20 µg.mL⁻¹) preparada em fase móvel, a partir da solução estoque. A partir dos picos cromatográficos de cada injeção, avaliou-se o desvio padrão relativo percentual (DPR%) das áreas, dos tempos de retenção (t_R), dos números de pratos teóricos (N), do fator de cauda (FC) e da assimetria do pico, fornecidos pelo software do equipamento utilizado.

4.5.3. Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas analíticas do DTX, a partir da solução estoque. A partir da solução estoque foram preparadas 7 diluições com concentrações variando de 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL. Para cada concentração descrita, foram realizadas três injeções previamente filtradas em membrana de tamanho de 0,45 µm (PTFE). 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 a nível de $\alpha=0,05$ (95% do intervalo de confiança).

4.5.4. Especificidade/Seletividade

A fim de garantir que não haja interferência na detecção e quantificação do fármaco com os componentes das formulações, componentes da fase móvel, amostras das formulações sem DTX, transferrina, solução receptora compostas de tampão fosfato (PBS, pH=7,4) que foram utilizadas posteriormente nos ensaios de liberação *in vitro*. As alíquotas foram filtradas em membrana filtrante de 0,45µm e injetadas no CLAE nas condições cromatográficas descritas no item 4.5.1.

4.5.5. Precisão

4.5.5.1. Repetibilidade

A repetibilidade ou precisão intracorrida foi realizada a partir da injeção de três diluições da solução estoque de DTX, nas concentrações 5,0, 20 e 50 µg. mL⁻¹ (concentrações baixa, média e alta). As injeções foram realizadas no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do DPR% entre as determinações foi analisado.

4.5.5.2. Precisão Intermediária

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 DPR% calculados (Equação 1).

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

4.5.6. Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir da solução estoque de DTX, diluída em fase móvel para as concentrações 5, 20 e 50 µg. mL⁻¹ (baixa, média e alta, respectivamente). Realizou-se cinco injeções de cada concentração e a exatidão foi calculada por meio da Equação 2.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

4.5.7. Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando valores de DP e inclinação das três curvas analíticas do fármaco obtidas e a partir da fórmula descrita na literatura (ANVISA, 2017). Os LD e LQ teóricos serão obtidos através do cálculo das equações 3 e 4, respectivamente:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC} \text{ (equação 3)}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \text{ (equação 4)}$$

onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo dos y e IC é a inclinação da curva analítica.

4.5.8. Robustez

No desenvolvimento do método analítico foi avaliada a robustez que é a capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (ANVISA, 2017). Foi realizada a quantificação do padrão do DTX (20µg/mL) com variação nas seguintes condições cromatográficas: comprimento de onda, proporção de fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura do forno.

4.6. Avaliação da eficiência de encapsulação (EE %)

Para avaliação da eficiência de encapsulação do DTX, os lipossomas (funcionalizados e sem funcionalização) carregados com docetaxel, antes da homogeneização, antes e após a purificação foram diluídos em acetonitrila 1:10 (v/v). Em seguida foram sonicadas por 15 minutos para garantir a ruptura completa dos lipossomas. A concentração de fármaco foi analisada por meio do método cromatográfico validado no item 4.5. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados serão apresentados como média ± desvio padrão. (PEREIRA et al., 2016).

Para a determinação da porcentagem de DTX encapsulado, aplicou-se a Equação 5.

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade de Docetaxel encapsulado}}{\text{Quantidade Total de Docetaxel}} \times 100 \quad (5)$$

4.7. Estudo do perfil de liberação *in vitro* do DTX

4.7.1. Estudo de solubilidade do DTX

A solubilidade do DTX foi determinada no meio utilizado para o ensaio de dissolução, a saber, tampão fosfato (PBS, pH 7,4) contendo 1,25% de lauril sulfato de sódio. Quantidades de fármaco suficientes para se atingir a saturação foram adicionadas ao meio e submetidas à agitação mecânica por 24 horas, em velocidade constante e ao abrigo de luz. Após este período, a solução foi centrifugada a 13240 xg por 30 min e o sobrenadante filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45 µm. Os sobrenadantes foram diluídos, analisados pelo método cromatográfico validado e quantificados a partir da equação da reta para o meio testado. O teste foi realizado em triplicata (ABOUELMAGD et. al., 2015).

4.7.2. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do DTX

4.7.2.1. Ensaio de liberação utilizando sacos de diálise

O perfil de liberação do DTX em solução receptora e nas formulações funcionalizadas ou não foi avaliado em incubadora shaker (Nova técnica, Brasil). Foi utilizada 7mL de solução receptora previamente filtrada, composta por tampão fosfato pH 7,4 e tensoativo (1,25% de lauril sulfato de sódio) nas condições *sink* determinadas pelo estudo de solubilidade, colocadas dentro de tubos PVC envolvidos com membranas de diálise de celulose de peso molecular 12-14kDa (Fisherbrand). As formulações foram pipetadas (1 mL) e transferidas para saco de diálise. Os experimentos (n=5) foram realizados a 37°C com agitação constante da solução receptora a 150 rpm. Alíquotas de 1mL foram coletadas do compartimento receptor em tempos pré-determinados de 5, 15 e 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas e os volumes de amostragens foram repostos em solução receptora fresca. A quantificação do DTX na solução receptora será realizada por CLAE, utilizando a curva analítica obtida na validação do método (ELOY et al., 2016).

4.7.3. Análise da cinética de liberação *in vitro* do DTX

A partir dos dados obtidos foram aplicados alguns modelos matemáticos conhecidos na literatura para discutir os mecanismos de liberação, como os modelos de Baker-Lonsdale, Primeira-Ordem, Higuchi, Hixon-Crowell, Korsmeyer-Peppas e Weibull.

4.8. Cultura celular

A linhagem celular de câncer de próstata humana PC-3 e a linhagem celular normal da próstata humana PNT-2 foram doadas pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. As células foram cultivadas, respectivamente, e mantidas a 37 °C, 5% de CO₂ em RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibiótico/antimicótico e meio DMEM, de acordo com as recomendações da ATCC.

4.9. Avaliação de viabilidade celular utilizando resazurina

A avaliação de citotoxicidade celular foi realizada em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Foram utilizadas as linhagens PC3 (maior expressão de receptor de transferrina) e PNT-2 (menor expressão de receptor de transferrina) (GUO et al., 2016; JOHNSON et al., 2014). Uma vez atingida 80% de confluência, as células foram tripsinizadas

e transferidas (2000 células por poço) para placas de fundo chato 96 poços e incubadas por 24h a 37°C nas condições recomendadas para cada célula. Após a remoção do meio de cultura completo, os poços foram lavados com PBS pH 7,4 e as diferentes formulações (A,B,C e D) diluídas em meio incompleto (sem FBS) e formulação comercial de docetaxel nas concentrações de DTX de 0,1; 1; 5; 10; 25; 50; 75 e 100 nM com n=4 foram adicionados nos poços, sendo que as formulações sem DTX foram adicionadas nas mesmas diluições que as formulações que continham DTX. Foram utilizados somente meio de cultivo como controle negativo e meio de cultivo acrescido de 30% de DMSO como controle positivo. O volume final em cada poço foi de 200 µL. Em seguida foram incubadas a 37°C, por 24h, 48h e 72h. Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS e meio incompleto com solução de resazurina (*7-Hydroxy-3Hphenoxazin-3-one-10-oxide*) foi aplicado, seguido por incubação (4h a 37°C). Subsequentemente, o meio contendo resazurina foi descartado e DMSO foi adicionado para dissolver os cristais que formaram. Após 4 horas de incubação com a resazurina, foi feita a leitura das placas em leitora de placas Bioteck Synergy™ HTX.

4.10. Avaliação do uptake celular

4.10.1. Microscopia Confocal

A avaliação de microscopia confocal foi realizada no Laboratório Multiusuário da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Para este ensaio, DiO (*3,3'Dioctadecyloxacarbocyanine Perchlorate*) 0,5% mol foi empregado como corante fluorescente de bicamadas lipídicas das formulações (ELOY et al., 2017). As células PC-3 e PNT2 (2,5 x 10⁵ células por poço) foram adicionadas em placas de 12 poços contendo lamínula circular de 22x22mm, volume final de 1 mL. As células foram incubadas por 24 horas para formação da monocamada celular na superfície das lamínulas. Posteriormente, foi realizada a adição das formulações LIP-DIO e LIP-TF-DIO diluídas em meio de cultivo na concentração de 2,5 x 10⁹ partículas/mL, n=4. O controle negativo foi realizado com o acréscimo de somente meio de cultivo aos poços. Após 2, 4 e 24 horas de tratamento, os poços foram lavados com duas vezes com PBS. As células foram incubadas por 10 minutos com 500 µL de paraformaldeído 2% (m/v) em cada poço, seguido de lavagem com 500 µL de solução de PBS. As células foram mantidas por 10 minutos com 50 µL de solução de DAPI (0,3 µg/mL). Em seguida, novamente as células foram lavadas duas vezes com PBS. Foi adicionada uma gota de Fluoromount® em lâmina histológica e a lamínula foi vertida sobre a lâmina. Após secagem do meio de montagem Fluoromount®, as lâminas foram analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP8 utilizando objetiva de imersão e comprimentos de onda

de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm para o DIO e 405 e 413-472 nm para o DAPI, respectivamente.

4.10.2. Citometria de fluxo

A avaliação de citometria de fluxo foi realizada no Laboratório Multiusuário da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Para as análises de citometria de fluxo foi empregado o método descrito por Eloy et al. (2017) com modificações, utilizando a linhagem celular PC3 e a linhagem PNT2. Em resumo, $2,5 \times 10^5$ células/poço foram plaqueadas em microplacas de 12 poços e incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂. Em seguida, foi realizada a adição das formulações LIP-DIO e LIP-TF-DIO diluídas em meio de cultivo na concentração de $2,5 \times 10^9$ partículas/mL, n=4. O controle negativo foi realizado com o acréscimo de somente meio de cultivo aos poços. Após 2, 4 e 24 horas, os tratamentos foram removidos e os poços lavados duas vezes com PBS. Foram adicionados 500 µL de solução de tripsina em cada poço e as placas foram incubadas por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de meio de cultivo em cada poço para inativação da tripsina e o conteúdo de cada poço foi centrifugado em eppendorff de 2 mL por 8 minutos a 1765 xg. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS. As células foram colocadas em tubos de citometria. No momento da leitura, as amostras então foram acrescentadas de iodeto de propídio (2 µL de solução 50 µg/mL) e submetidas à análise em citômetro de fluxo, usando λ_{exc} = 488 nm, λ_{em} = 530/30 nm, para Dio, e λ_{exc} = 488 nm e λ_{em} = 670 nm para iodeto de propídio (PETRILLI et al., 2018).

4.11. Avaliação da interação entre a linhagem celular PC-3 e lipossomas conjugados com transferrina por QCM-D

A avaliação da interação entre a linha celular PC-3 e lipossomas conjugados com transferrina por QCM-D foi realizada durante período de estágio no exterior (BEPE), financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), junto ao grupo de pesquisa “Nanoparticle-cell and nanoparticles-platelet interactions (Platelets Group)” coordenado pela Professora Dr. Maria José Santos-Martinez, no Instituto de Ciências Biomédicas (TBSI) da Trinity College Dublin. Neste estudo, a microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D) (Figura 9) foi usada para investigar a interação de lipossomas vazios e lipossomas vazios funcionalizados com transferrina na linhagem celular PC-3. Diferentes condições foram testadas com o objetivo de produzir uma camada de células cancerígenas onde a interação dos lipossomas com transferrina (TfR) pudesse ser avaliada. Para esse fim, as células cancerígenas foram preparadas em solução e perfundidas através do sistema.

Após a deposição e adesão das células, os lipossomas foram introduzidos no sistema e sua interação com as células cancerígenas foi monitorada em tempo real pelo software Q-Sense (QSoft401), sendo que as alterações na frequência f e dissipação de energia D foram medidas e avaliadas. O experimento foi conduzido a 37°C e então as amostras (células e lipossomas) perfundidos usando um sistema de microfluxo peristáltico (ISM 935; ISM 935; Ismatec SA, Glattbrugg, Suíça) (SANTOS-MARTINEZ et al., 2012).



Figura 9: Componentes básicos da microbalança Q-Sense™ E4.

4.11.1. Procedimento experimental

4.11.1.1. Sensor utilizado

Uma grande variedade de sensores de cristal de quartzo está disponível para serem usados com o Q-Sense™ E4. Para esse estudo foram usados cristais de quartzo de 5 MHz revestidos com ouro incubados ou não com poli-L-lisina - PLL (Sigma Aldrich Chemical Company, Irlanda) a 0,1 mg/mL durante 1 h para melhorar a adesão celular.

4.11.1.2. Limpeza dos sensores e equipamentos

Os sensores de cristal foram armazenados em Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% entre as medições e limpos antes e após os experimentos seguindo o mesmo protocolo: primeiro, eles foram sonicados por 5 minutos imersos na solução de SDS a 2% usando um banho ultrassônico (Cole Palmer 8890 ; Particular Sciences, Irlanda), sem seguida os sensores foram lavados com água e colocados em uma solução de água destilada: amônia a 25%: peróxido de hidrogênio a 30% (proporção 5: 1: 1) a 75 °C por 5 minutos. Os cristais foram então lavados novamente com água destilada e secos sob uma corrente suave de gás nitrogênio antes do tratamento com UV.

Antes de cada experimento, os sensores também foram expostos a 2 ciclos de tratamento com UV-ozônio usando ProCleaner UV/Ozônio (BioForce Nanotechnologies, Particular Sciences, Irlanda) por 10 minutos. Este tratamento garante a remoção de quaisquer

resíduos biológicos restantes e também melhora a aderência dos materiais carregados negativamente aos cristais (essa etapa não foi realizada quando os sensores foram previamente revestidos com o PLL carregado positivamente).

Entre as experiências, SDS 2% também foi perfundido através do dispositivo a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 15 minutos, seguido de água destilada por 15-20 minutos, etanol a 70% por 2 minutos e água destilada por 10 minutos para remover qualquer material biológico dos módulos e tubulações. Por fim, os módulos foram então secos ao ar.

4.11.1.3. Interação dos lipossomas com a camada celular PC3

Uma vez que um valor estável de f e D foi obtido após a perfusão de PBS através da camada celular depositada na superfície do sensor, soluções de lipossomas foram perfundidas e suas interações com células PC3 monitoradas através das alterações em f e D pelo software Q-Soft 401. Se alterações em f e D fossem observadas após a introdução dos lipossomas e uma vez atingido o platô, o PBS era perfundido novamente para remover os lipossomas que não haviam interagido com as células PC3. Várias concentrações de lipossomas, vazões e tempos de perfusão foram testadas em um esforço para otimizar as condições experimentais.

Os resultados obtidos pela QCM-D foram expressos como porcentagem da frequência f e dissipação D do terceiro som harmônico para análise, onde as alterações máximas na frequência (desvio negativo) e dissipação (desvio positivo) aos 30 minutos de perfusão de PBS após a formação de a camada celular foi considerada como 100%.

No entanto, devido ao fato de a concentração inicial de lipossomas não ser alta o suficiente para induzir alterações em f e D durante a perfusão através do Q-Sense™ E4, as soluções precisavam ser mais concentradas. Para esse fim, alíquotas de 1 mL de lipossomas vazios e lipossomas funcionalizados com transferrina foram centrifugados a 25 °C a 4000rpm durante 10 minutos usando filtros Amicon-10 kDA (Millipore Corp., MS, EUA). Os grânulos resultantes foram ressuspensos em PBS e sua concentração determinada por NTA.

4.11.1.4. Microscopia óptica

A deposição nas células na superfície do cristal foi visualizada sob um microscópio de epifluorescência de reflexão BX51M (Olympus, Mason Technologies, Irlanda) usando uma objetiva 10 $\times$. As fotomicrografias foram capturadas usando uma câmera digital e o software Cellsense (versão 1.1).

4.12. Forma de análise dos resultados

Utilizou-se a análise de variância ANOVA, com comparação de médias de acordo com o pós teste de Tukey, para o tratamento dos resultados. Foi considerado como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento dos lipossomas

5.1.1. Avaliação da eficiência de funcionalização

A conjugação da transferrina aos lipossomas ocorreu através da âncora lipídica de DSPE-PEG (2000) -MAL, pela reação química entre a proteína tiolada e o grupamento maleímida (ELOY et al., 2017). Foram testados processos (figura 5 e 6) para a obtenção da funcionalização, alterando a concentração de proteína, reagente de Traut e o tempo de agitação. O valor da eficiência de funcionalização de transferrina avaliado pelo ensaio de BCA foi de 4 e 31% para o processo 1 e 2, respectivamente. Foi observado que o tempo de reação entre solução de transferrina e solução de Traut influenciou positivamente na funcionalização, bem como a temperatura de incubação. Derycke e colaboradores (2004) desenvolveram lipossomas funcionalizados com transferrina e obtiveram eficiência de conjugação 13,9%, valor inferior ao resultado obtido no presente trabalho.

5.2. Caracterização físico – química dos sistemas desenvolvidos

5.2.1. Análise do diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) e do potencial zeta

Foram desenvolvidos lipossomas: Vazios (A); carregados com docetaxel (B); vazios e funcionalizados com transferrina (C) e carregados com docetaxel e funcionalizados com transferrina (D). Os valores de índice de polidispersividade, diâmetro médio da partícula e potencial zeta foram apresentados (Tabela 2).

Ao final dos 90 dias de análise, os valores de diâmetro médio de partícula obtidos para a formulação A foram de 89,57nm a 99,39nm e para a formulação B foram de 64,23nm a 76,05nm. O índice de polidispersividade da formulação A foi de 0,258 a 0,273 e para a formulação B de 0,244 a 0,273, indicando que as suspensões apresentaram homogeneidade e não estavam agregadas (MERTINS, 2008). Os valores obtidos para as formulações lipossomais demonstraram valores entre -18,5mV e -25,2mV para as formulações contendo fármaco e -18,3mV e -31,4mV para as formulações vazias, o que permite o aumento da estabilidade dos lipossoma e a redução de interação inespecífica com as membranas celulares (SRIRAMAN et al., 2016; MORAES et al. 2010). Assim, foi possível obter lipossomas com os valores de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta adequados, além de observar que o fármaco antineoplásico docetaxel interferiu positivamente na estabilidade das preparações lipossomais (PEREIRA et al. 2016)

Como já foi demonstrado por Zhai et al. (2010), o lipossoma funcionalizado com transferrina foi obtido pelo método da pós-inserção, e os valores de diâmetro médio de partícula,

PDI e potencial zeta estão representados na Tabela 2. A associação de transferrina, que tem carga negativa, com os lipossomas, apresentou diferença no potencial zeta de -27 mV para -18 mV para as formulações com fármaco e -23 mV para -16,0mV para as formulações vazias. O tamanho de partícula também foi aumentado de 79,95 nm para 220,23 nm para as formulações com fármaco e 81,19nm para 181,93 nm para as formulações sem fármaco. O índice de polidispersividade para as formulações com docetaxel aumentou de 0,29 para 0,33 e 0,36 para 0,38 para as formulações vazias, indicando que as suspensões apresentaram homogeneidade e não estavam agregadas mesmo após a funcionalização (ZHAI et al., 2010).

Tabela 2: Representação dos valores obtidos para tamanho de partícula, IPD e potencial zeta (média com os respectivos desvios) pelo DLS.

Grupos	Tamanho (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial zeta (mV)
A	81.19 ± 7.09	0.36 ± 0.05	-23 ± 4.00
B	79.95 ± 5.57	0.29 ± 0.05	-27 ± 3.00
C	181.93 ± 4.43	0.38 ± 0.01	-16 ± 3.00
D	220.23 ± 3.95	0.33 ± 0.06	-18 ± 2.00

Nota: As amostras representam a média e o desvio padrão de três medições. Lipossomas vazios (A); Lipossomas carregados com docetaxel (B); lipossomas funcionalizados com transferrina e vazios (C) e lipossomas carregados com docetaxel e funcionalizados com transferrina (D).

Em estudo com lipossomas funcionalizados com transferrina, Soni, Kohli e Jain (2008) avaliaram o tamanho da vesícula lipossomal com transferrina e demonstraram que o aumento de tamanho 0,75 para 1,01 μm foi devido a presença da transferrina (SONI; KOHLI; JAIN, 2008). Lipossomas desenvolvidos por Gaspar et al. (2012) também apresentaram alteração no tamanho e potencial zeta ao serem funcionalizados com transferrina (GASPAR et al., 2012).

5.2.2. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

Ribeiro e colaboradores (2018) caracterizaram lipossomas por duas técnicas: análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). No estudo da caracterização lipossomal, sua concentração deve ser avaliada para entender seu desempenho em sistemas biológicos, como ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade. Para demonstrar isso, as concentrações das mesmas amostras usadas no DLS foram avaliadas pelo NTA (Tabela 3). Os resultados mostraram que o tamanho de partícula para os lipossomas sem funcionalização foi maior do que o obtido pelo DLS, no entanto para os lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com docetaxel apresentaram tamanho menor e adequado para o tipo

de administração que se deseja utilizar. Barras de erro alto podem ser explicadas principalmente por contagens de partículas diferentes entre cada medição para a mesma amostra (RIBEIRO et al., 2018).

Tabela 3: Caracterização de Lipossomas através do NTA.

Grupos	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/mL)
A	148.9 ± 4.02	8 x 10 ¹⁰
B	196.8 ± 5.89	5 x 10 ¹⁰
C	184.4 ± 2.99	4 x 10 ¹⁰
D	134.5 ± 1.86	1 x 10 ¹¹

Nota: As amostras representam a média e o desvio padrão de três medições. Lipossomas vazios (A); Lipossomas carregados com docetaxel (B); lipossomas funcionalizados com transferrina e vazios (C) e lipossomas carregados com docetaxel e funcionalizados com transferrina (D).

Felipe, Hawe e Jiskoot (2010) realizaram a caracterização de nanopartículas através dessas duas técnicas (NTA e DLS) e observaram que o NTA requer otimização dos parâmetros para uma análise confiável, apesar disso é uma ferramenta útil para complementar a análise feita através do DLS (FELIPE; HAWE; JISKOOT, et al., 2010). Resultado semelhante foi observado por Boyd, Pichaimuthu e Cuenat (2011) em análises de nanopartículas, o grupo utilizou três técnicas para caracterização e encontraram diferença significativa entre a distribuição de tamanho e diâmetro médio entre as técnicas avaliadas (BOYD; PICHAIMUTH; CUENAT, 2011).

5.2.3. Análise morfológica

A análise por microscopia eletrônica de transmissão é amplamente utilizada para identificar a morfologia, tamanho e estabilidade dos lipossomas (ELOY et al., 2016). Na figura 10 estão evidenciados os lipossomas (A, B, C, D) com estruturas esféricas e com diâmetro em torno de 100nm o que corrobora com o resultado obtido pela técnica de dispersão de luz dinâmica e com observações descritas na literatura (ELOY et. al., 2016; ZHAI et al., 2010).

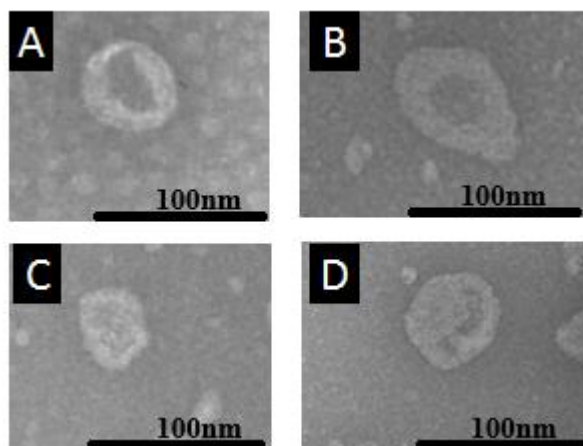


Figura 10 – Microscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas. (A) Lipossoma sem docetaxel; (B)- Lipossoma com docetaxel; (C)- Lipossoma sem docetaxel funcionalizado com transferrina; (D)- Lipossoma com docetaxel funcionalizado com transferrina. Aumento de 100x.

5.3. Avaliação da integridade estrutural da transferrina

5.3.1. Avaliação da integridade da proteína por SDS-PAGE

A transferrina é a glicoproteína transportadora de ferro, possuem em torno de 80kDa. Sua estrutura primária apresenta dois lobos semelhantes o N terminal e C terminal, sendo que a molécula de ferro se liga em um sitio de ligação específicos. Essa população de proteínas é bastante heterogênea apresentando em torno de 650 a 700 aminoácidos com aproximadamente 15 a 19 ligações dissulfeto (THEVIS et. al., 2003; GANDHI et. al.,2016).

A técnica eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS) foi utilizada para avaliar a integridade da estrutura primária da glicoproteína nos lipossomas funcionalizados foi realizado segundo procedimento descrito por Eloy et al. (2017). Após o tratamento com o detergente SDS, os lipossomas foram quebrados e a transferrina liberada na solução. De acordo com a Figura 11, a transferrina livre exibiu uma banda em 70kDa, bem como a transferrina conjugada, confirmando a presença da proteína nos lipossomas.

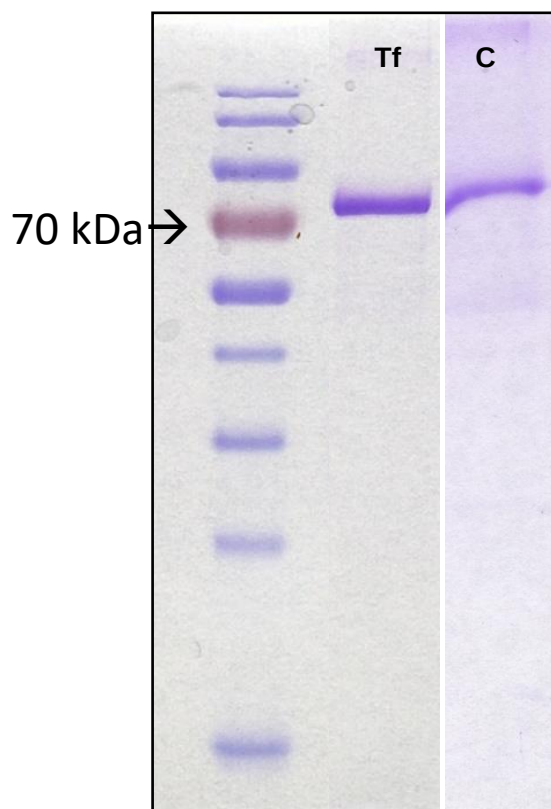


Figura 11: Eletroforese em gel SDS -PAGE: avaliação de lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C) e Transferrina (Tf).

5.3.2. Dicroísmo circular

A emissão de fluorescência fornece a medida da mudança da estrutura terciária da proteína; no entanto, é necessário determinar o efeito da ligação dos lipossomas na estrutura secundária das transferrina. Para isso, foi realizado o método do dicroísmo circular. Como pode ser observado na Figura 12, os espectros de dicroísmo da transferrina exibem uma banda positiva em 202nm e duas bandas negativas em 207nm e 211nm, o que representa característica de uma estrutura α -helicoidal da proteína (MURAKAMI et. al., 2016). Após a conjugação com os lipossomas, não foram observadas alterações significativas nos espectros. Portanto é possível concluir que o processo de funcionalização não provocou mudanças consideráveis na estrutura secundária das proteínas, o que é importante quando forem realizados estudos *in vitro*, pois o receptor de transferrina poderá reconhecer a transferrina conjugada aos lipossomas e em consequência a entrega do docetaxel a célula tumoral de próstata.

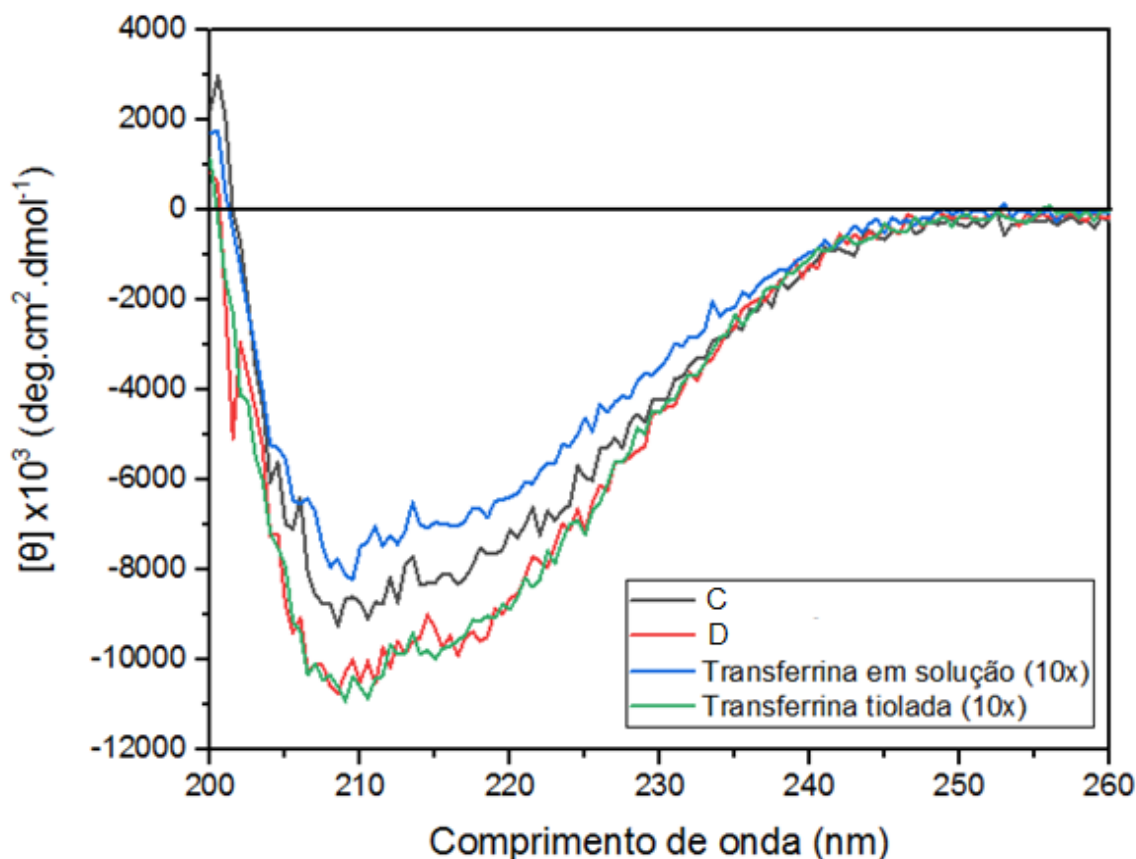


Figura 12. Espectro de dicroísmo circular da transferrina em solução, transferrina tiolada, formulação funcionalizada sem docetaxel (C) e formulação funcionalizada com docetaxel (D) com excitação a 200nm e 260nm.

5.3.3. Espectroscopia de fluorescência

Após analisar a concentração de transferrina tiolada (0,078 mg/mL) purificada em coluna PD-10 (processo 1 de funcionalização) foi realizada espectroscopia de fluorescência comparando com a solução de transferrina (0,240 mg/mL) utilizada no início da conjugação. As proteínas apresentam três tipos de fluoróforos intrínsecos: triptofano, tirosina e fenilalanina. O espectro de fluorescência de cada um se distingue pelo comprimento de onda de excitação e emissão. Esse fato se deve ao rendimento quântico (Q) que é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos de cada um dos três aminoácidos. O triptofano é o fluoróforo intrínseco dominante (possui maior Q), e por isso é mais estudado já que a fenilalanina possui Q muito baixo e a fluorescência da tirosina é baixa devido à supressão. A detecção da tirosina e a fenilalanina pode ser afetada pelo triptofano, enquanto que o triptofano pode ser suprimido na presença de ácidos protonados, como por exemplo, ligação SH de cisteína indicando que este grupo está muito próximo (LAKOWICZ, 2006). Portanto, a principal razão para avaliar a fluorescência de proteínas é obter informações sobre sua conformação e o

resultado da emissão relacionado - se com o ambiente em que se encontram (MARANGONI, 2012).

Quando ocorre a excitação a 295nm, a fluorescência é contribuída pelo triptofano, e ao serem excitados a 280nm pelo triptofano e tirosina. Na Figura 13 são demonstrados espectros de fluorescência da transferrina em solução em comparação com a transferrina tiolada. A emissão máxima obtida foi de 325nm e centro de massa espectral 338,4nm (excitação de 280nm) e 300nm e centro de massa espectral de 336,50nm (excitação de 295nm). O resultado pode indicar que a conformação da transferrina foi alterada no processo de tiolação, bem como a polaridade dos compostos fluoróforos como demonstrado por Śliwińska-Hill (2017). Este processo pode estar associado tanto a um processo de colisão quanto a formação de um complexo entre o supressor (ligação SH de cisteína) e os fluoróforos (triptofano-tirosina).

Análises comparativas entre os espectros de emissão da transferrina em solução, transferrina tiolada e transferrina conjugada aos lipossomas com docetaxel e vazios foram realizadas (Figura 14), com o objetivo de identificar interações e modificações conformacionais nas proteínas após a ligação. As excitações foram realizadas nos comprimentos de onda de 280nm e 295nm, as emissões máximas obtidas foram de 328,4nm (centro de massa espectral 338,92nm) e 329,6nm (centro de massa espectral de 340,27nm). Apesar da concentração protéica representada ser maior do que a representada na figura 13, o espectro de emissão apresentou pouca diferença (MARANGONI, 2012). No entanto ao analisar a figura 14B é possível notar uma diminuição significativa na intensidade da transferrina conjugada com os lipossomas em comparação com a transferrina em solução. Apesar disso, a intensidade da fluorescência nos lipossomas funcionalizados é superior à intensidade nos lipossomas sem funcionalização, o que indica que houve de fato a interação transferrina-lipossomas.

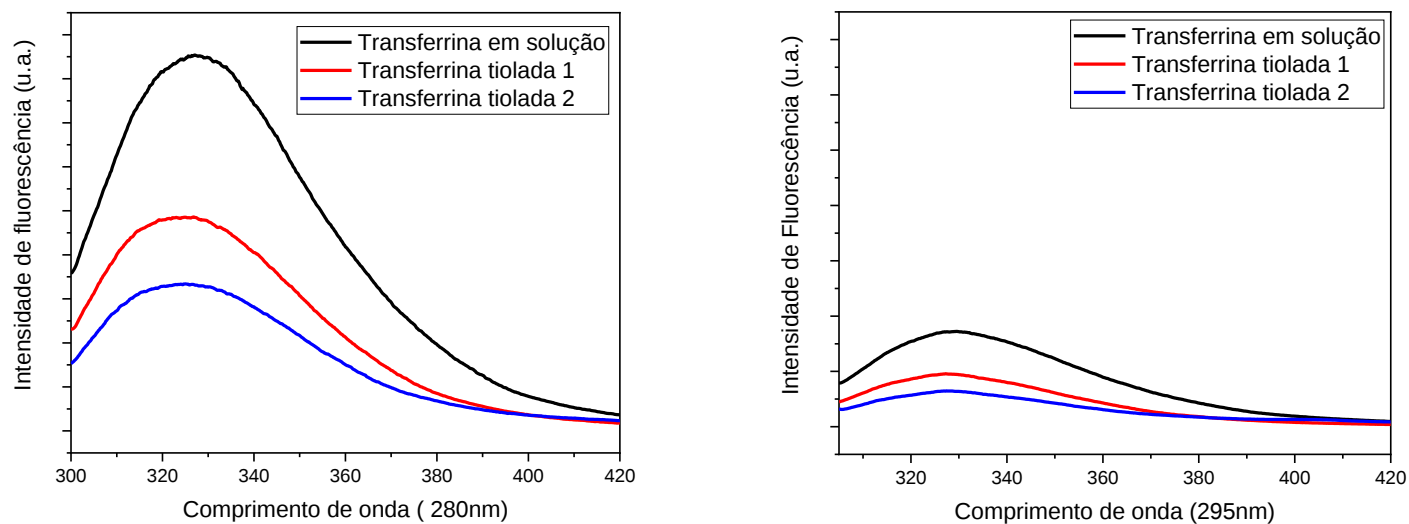


Figura 13. Espectro de absorção da transferrina em solução e transferrina tiolada com excitação a 280nm (esquerda) e 295nm (direita).

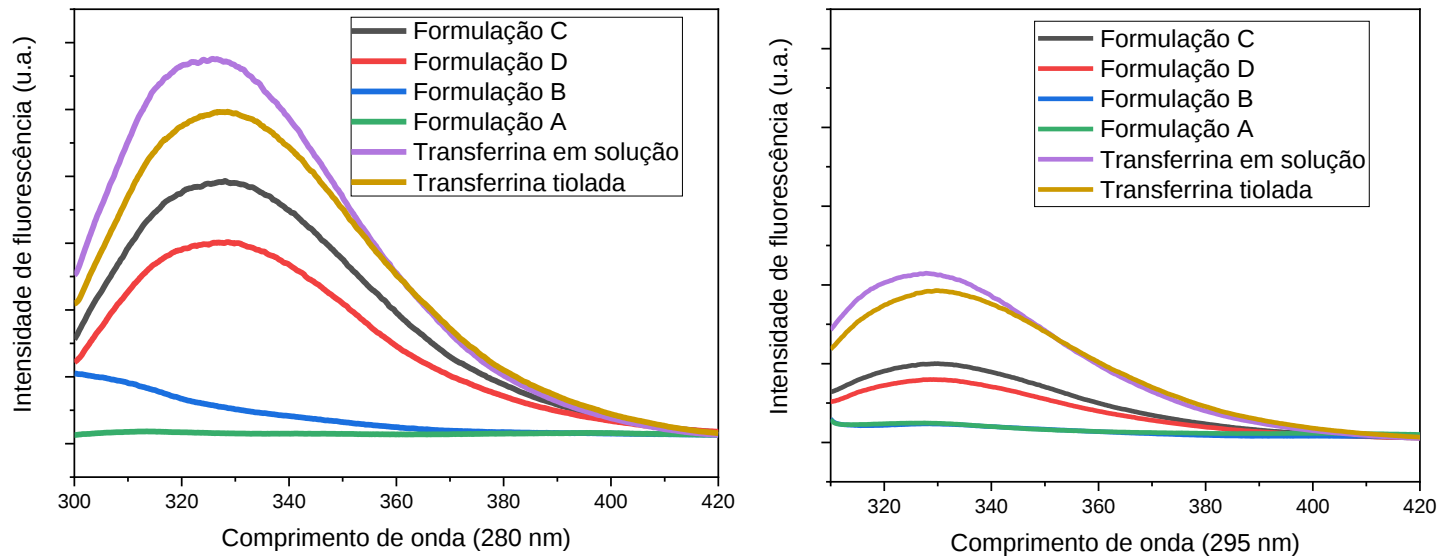


Figura 14. Espectro de absorção da transferrina em solução, transferrina tiolada, formulação vazia (A), formulação com docetaxel (B), formulação vazia e funcionalizada com transferrina (C) e formulação com docetaxel e funcionalizada com transferrina (D) com excitação a 280nm (A) e 295nm (B).

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

Foi utilizado o cromatógrafo Agilent Technologies 1220 Infinity LC, injetor automático, com detector UV-Vis pertencente ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Unesp, Araraquara. O método analítico utilizado para a quantificação de docetaxel foi desenvolvido e validado seguindo a Farmacopeia Europeia (Ph. Eur., 2011), com modificações. A revalidação da metodologia analítica foi realizada utilizando os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, conforme descritos pelos guias ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2017).

5.4.1. Conformidade do sistema cromatográfico

A conformidade do sistema cromatográfico foi avaliada pela análise quantitativa, através do cálculo dos coeficientes de variação da assimetria do pico do DTX, fator de cauda, número de pratos teóricos da coluna, tempo de retenção e área do pico principal de seis replicatas de DTX na concentração de 50 µg/mL. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4 e 5.

Tabela 4. Parâmetros da análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise do DTX em fase móvel.

Injeções	Tempo de retenção	Área	Simetria do pico 10%	Fator de cauda	nº de pratos teóricos (N)
1	5,49	391,87	0,73	1,29	7185
2	5,50	391,92	0,73	1,28	7190
3	5,50	390,50	0,73	1,27	7243
4	5,49	390,60	0,72	1,29	7145
5	5,50	388,60	0,73	1,28	7328
6	5,50	390,20	0,73	1,29	7678
Média	5,5	390,61	0,73	1,29	7294
DP	0,01	1,23	0,01	0,01	198
DPR	0,00	0,31	0,37	0,72	2,71

Tabela 5. Parâmetros da análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise do DTX em meio receptor.

Injeções	Tempo de retenção	Área	Simetria do pico 10%	Fator de cauda	nº de pratos teóricos (N)
1	5,59	349,50	1,01	0,99	7321
2	5,58	349,50	1,01	1,01	7190
3	5,59	349,80	1,02	0,98	7343
4	5,60	347,90	1,02	0,98	7145
5	5,58	351	1,01	0,99	7328
6	5,59	349,80	1,01	1	7328
Média	5,60	349,58	1,01	0,99	7275
DP	0,01	0,99	0,01	0,01	85
DPR	0,13	0,28	0,56	1,18	1,17

Conforme preconizado pelos guias ICH (2005), ANVISA (BRASIL, 2017), o fator de assimetria e de cauda devem ser menores que 2 e o número de pratos teóricos superior a 2000, demonstrando que os métodos desenvolvidos e o equipamento foram adequados para quantificação do DTX. Além disso, para todos os parâmetros avaliados verifica-se precisão entre os valores do tempo de retenção e a área dos picos cromatográficos, o valor adotado de DPR% abaixo de 2%.

5.4.2. Especificidade/Seletividade

Em métodos cromatográficos esse parâmetro é importante, pois a pureza do pico do fármaco deve ser mantida. Portanto, especificidade/seletividade demonstra a capacidade que o método desenvolvido possui de medir uma substância em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, sem que estes interfiram no resultado da análise (BRASIL, 2017).

Foram injetadas separadamente amostras de acetonitrila, água, tampão fosfato (PBS, pH 7,4), lipossoma vazio e transferrina livre e os cromatogramas para comparação (Figura 15). Os ensaios foram realizados em triplicata e conforme pode-se observar na Figura 15, as amostras injetadas não apresentaram picos de absorção no comprimento de onda de 230 nm que possam interferir na quantificação do fármaco.

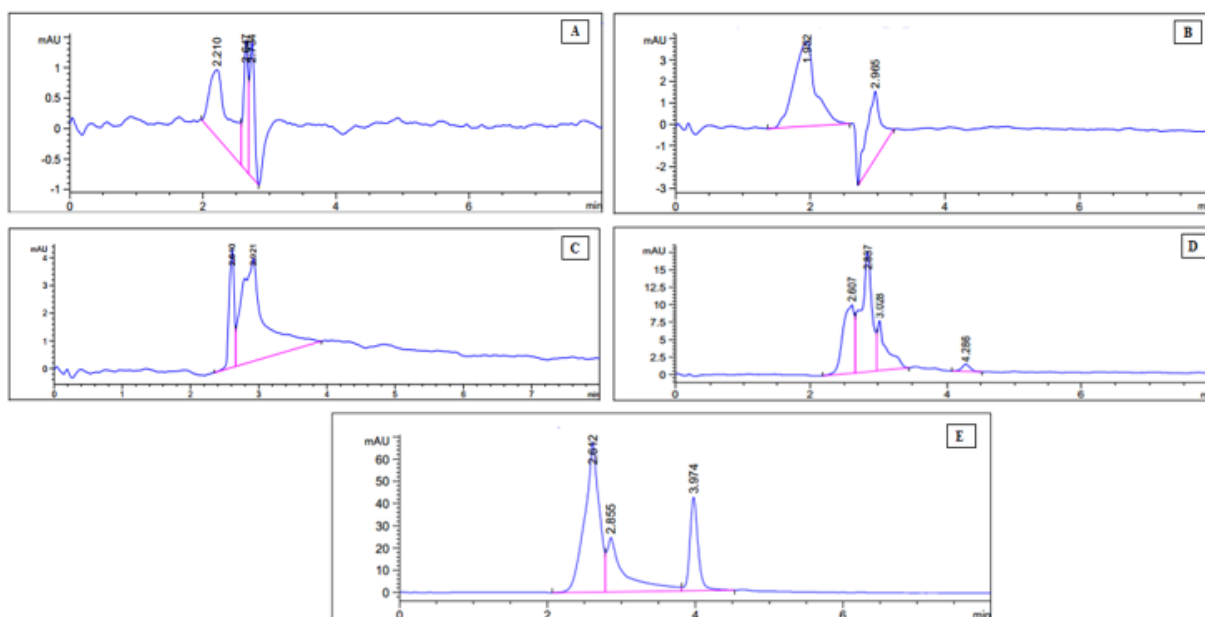


Figura 15. Cromatogramas obtidos a partir da análise de seletividade do método analítico desenvolvido para o docetaxel. Acetonitrila (A); Água (B); Tampão fosfato (PBS, pH 7,4) (C); Lipossoma vazio (D); Transferrina (E). Fase móvel: Acetonitrila: Água (65:35, v/v); Coluna C18-ZORBAX Eclipse Plus, dimensões 4,6mm x 250mm, 5 μ m; Fluxo: 0,8 mL/min, λ =230nm; Injeção: 10 μ L; Temperatura: 45°C.

5.4.3. Linearidade

O parâmetro linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma faixa de aplicação determinada (BRASIL, 2017). Na figura 16 estão representados os cromatogramas obtidos, demonstrando a resolução e a simetria do pico correspondente ao DTX, apresentando tempo de retenção em por volta de 5,5 (fase móvel) (FIGURA 16A), com pico da acetonitrila em 2,82minutos e 5,6 minutos (meio receptor) (FIGURA 16B), com pico de tampão em aproximadamente 3 minutos .

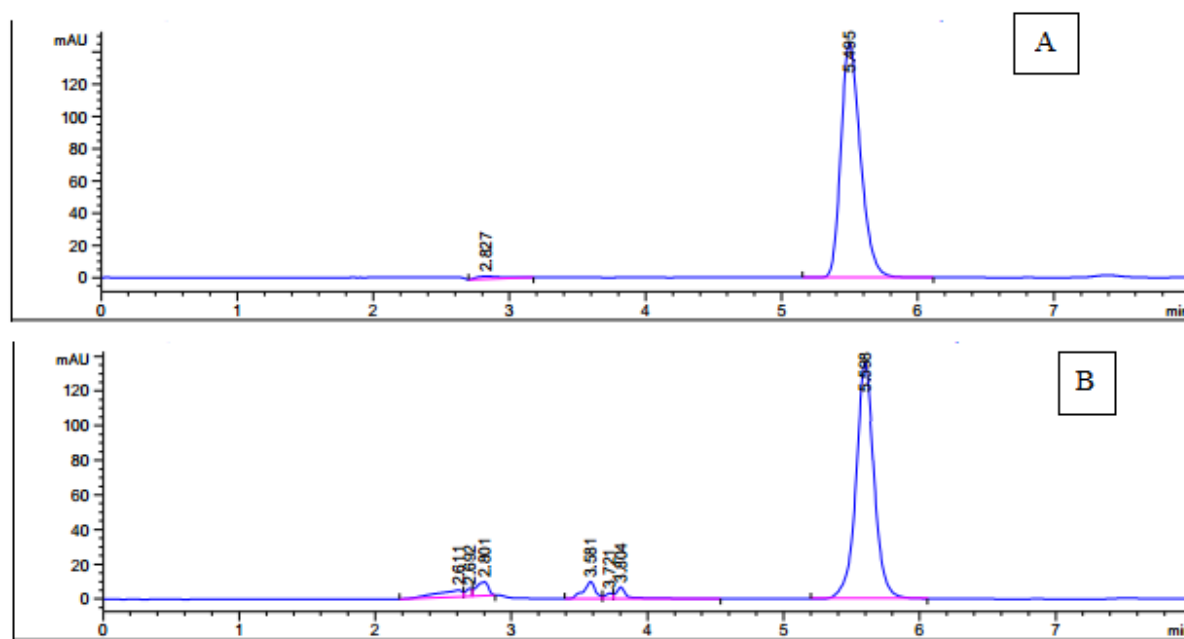


Figura 16. Cromatogramas do DTX obtidos pelo método cromatográfico proposto (A) acetoneitrila:água e (B) em meio receptor. Fase móvel: Acetonitrila: água (65:35, v/v); Coluna: ZORBAX Eclipse Plus C18, dimensões 4,6mm x 250mm; 5 μ m; Fluxo de 0,8 mL/min; λ : 230nm; Injeção 10 μ L; Temperatura: 45°C.

Foram construídas duas curvas analíticas em fase móvel e meio receptor nas concentrações de DTX (1 a 75 μ g/mL) (Figura 17 e Figura 18). Ao longo do intervalo proposto provou-se que as curvas são lineares para o docetaxel, como mostrados pelos coeficientes de correlação linear (R) e determinação (R^2) em fase móvel em meio receptor.

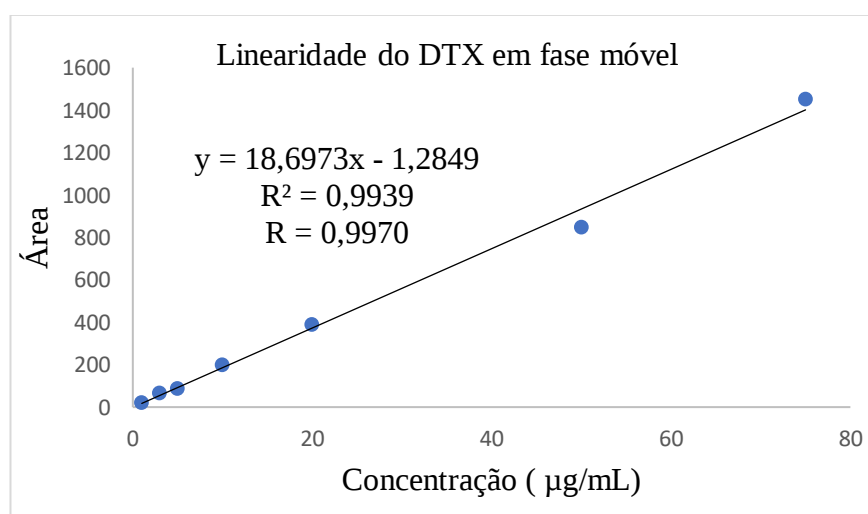


Figura 17. Curva analítica do DTX em acetoneitrila:água com intervalo de concentração de 1-75 μ g/mL obtida por CLAE.

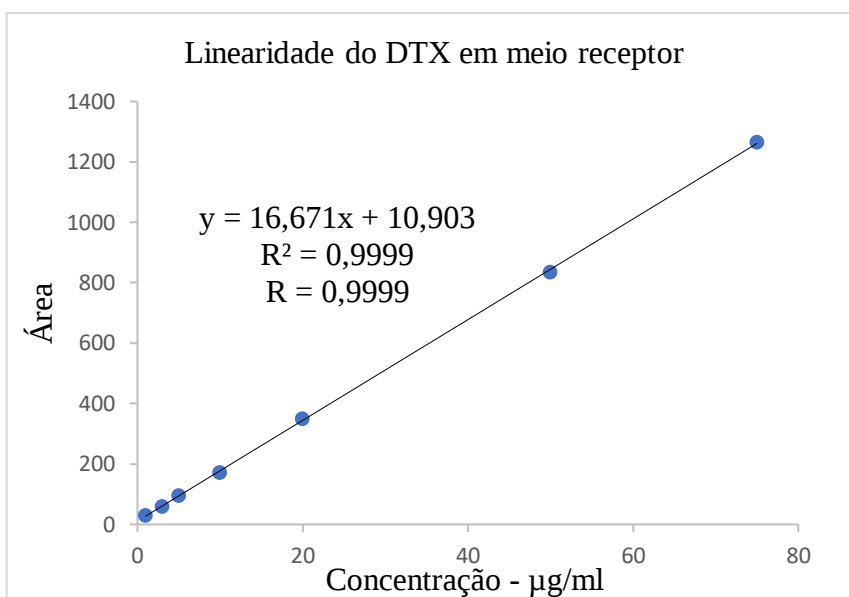


Figura 18. Curva analítica do DTX em meio receptor com intervalo de concentração de 1-75µg/mL obtida por CLAE.

Para testar a validação do método analítico e a significância estatística da curva testada foi realizada a análise estatística da regressão linear (Tabela 6). Foi comprovado através da análise de variância ANOVA que a regressão linear foi significativa para as duas curvas construídas, pois o valor de F tabelado foi inferior ao F calculado. Portanto as regressões obtidas são significativas e podem ser aceitas, considerando que o nível de significância adotado foi de 5%.

Tabela 6. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção das curvas.

Fonte de variação (em fase móvel)	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	6	5080913	846819	381,88	2,85
Regressão Linear	1	5049868	5049868	2277,27	4,60
Desvio da Linearidade	5	31045	6209	2,80	2,96
Dentro (resíduo)	14	31045	2218		
Total	20	5080949			
Fonte de variação (em meio receptor)	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	6	4017550	669592	10869,24	2,85
Regressão Linear	1	4016688	4016688	65201,43	4,60
Desvio da Linearidade	5	862	172	2,80	2,96
Dentro (resíduo)	14	862	62		
Total	20	4017597			

*Significativo para $p < 0,05$

5.4.4. Precisão

De acordo com os padrões determinados pela ANVISA (BRASIL, 2017), deve-se garantir que as análises sejam confiáveis, isso quer dizer que os resultados em uma série de medidas de uma mesma amostra devem ser próximos. Para demonstrar a precisão existem três formas, repetibilidade, precisão intermediária e precisão interlaboratorial e são expressões através do desvio padrão relativo (D.P.R %).

5.4.4.1. Repetibilidade

A precisão foi realizada a partir da injeção de três diluições da solução padrão de DTX (em fase móvel e em meio receptor) nas concentrações 5,20 e 50 µg/mL (baixa, média e alta). As injeções foram realizadas sob as mesmas condições de trabalho, no mesmo dia e pelo mesmo analista.

Tabela 7. Resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade para o DTX em fase móvel.

Concentração teórica (µg/mL)	Áreas	Concentração teórica (µg/mL)	Médias	DP	D.P.R (%)
5	85,1	4,62	4,646	0,037	0,805
	85,3	4,63			
	86,4	4,68			
20	390,2	20,94	20,842	0,090	0,434
	386,7	20,76			
	388,1	20,82			
50	851,6	45,61	45,462	0,136	0,300
	846,7	45,35			
	847,9	45,41			

Tabela 8. Resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade para o DTX em meio receptor.

Concentração teórica (µg/mL)	Áreas	Concentração teórica (µg/mL)	Médias	DP	D.P.R (%)
5	98	5,22	5,07	0,129	2,535
	94,5	5,01			
	94,1	4,99			
20	349,5	20,31	20,31	0,010	0,051
	349,5	20,31			
	349,8	20,32			
50	839,1	49,67	49,45	0,240	0,486
	831,1	49,19			
	835,6	49,46			

O D.P.R % observado para todas as amostras nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária foi inferior a 5% como preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2017), portanto é possível afirmar que o método desenvolvido é preciso.

5.4.4.2. Precisão Intermediária

A precisão intermediária avalia a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2017). Os resultados obtidos para precisão intermediária estão descritos nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária, DTX em fase móvel.

Concentração teórica (µg/mL)	Analista e dia	Concentração teórica (µg/mL)	Médias	DP	D.P.R (%)
5	1	4,61	4,65	0,007	0,153
	2	4,60			
20	1	20,99	21	0,014	0,067
	2	21,01			
50	1	45,52	45,54	0,028	0,062
	2	45,56			

Tabela 10. Resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária, DTX em meio receptor.

Concentração teórica (µg/mL)	Analista e dia	Concentração teórica (µg/mL)	Médias	DP	D.P.R (%)
5	1	5,13	4,65	0,03	0,55
	2	5,09			
20	1	20,29	21	0,035	0,17
	2	20,34			
50	1	49,70	45,54	0,17	0,34
	2	49,46			

5.4.5. Exatidão

Está relacionada com a proximidade dos resultados obtidos pela aplicação do método analítico utilizado em relação ao valor teórica real. A faixa entre 80-120% é admitida de acordo com a ANVISA (Brasil, 2017), no entanto os valores próximos a 100% são desejáveis. Os valores da exatidão estão apresentados na tabela 11 e 12, confirmando que a metodologia analítica é adequada para quantificação do fármaco em meio receptor e em fase móvel.

Tabela 11. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de DTX em fase móvel.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração teórica (µg/mL)	Exatidão (%)
5	4,65	90,15
20	20,84	103,52
50	45,46	90,65

Tabela 12. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de DTX em meio receptor.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração teórica (µg/mL)	Exatidão (%)
5	5,13	90,52
20	20,32	93,49
50	49,46	89,34

5.4.6. Limite de detecção e de quantificação

A sensibilidade do método analítico deve ser avaliada e para isso o limite de detecção e quantificação são usados. O limite de detecção (LD) corresponde a menor quantidade do fármaco presente na amostra que pode ser detectado, no entanto não quer dizer que pode ser quantificado e o limite de quantificação (LQ) corresponde a menor quantidade de amostras que pode ser avaliada com precisão e exatidão pelo método desenvolvido adotado (BRASIL, 2017).

Tabela 13. Valores obtidos para LD e LQ

Limites analisados	Curva em acetonitrila:água (µg/mL)	Curva em meio receptor (µg/mL)
LD	0,14	2,35
LQ	0,49	7,84

5.4.7. Robustez

Para analisar a resistência do método analítico a pequenas variações das condições analíticas a robustez deve ser empregada (BRASIL, 2017). Os resultados obtidos demonstraram que o método analítico desenvolvido é robusto mesmo com alterações na vazão (mL/min), comprimento de onda de detecção no UV (nm), temperatura e proporção de fase móvel, os resultados obtidos de recuperação encontram-se na faixa determinada de 80-120%.

Tabela 14. Robustez do método analítico para quantificação do DTX.

Concentração (µg/mL)	50	50	50
Fluxo (mL/min)	0,7	0,8	0,9
n	3	3	3
DPR	0,12	0,3	0,2
RECUPERAÇÃO (%)	107,2	90,7	84,1

Concentração (µg/mL)	50	50	50
(nm)	229	230	231
n	3	3	3
DPR	0,1	0,3	0,1
RECUPERAÇÃO (%)	94,8	90,7	94,8

Concentração (µg/mL)	50	50	50
Proporção de F.M (v/v)	64:36:00	65:35:00	66:34:00
n	3	3	3
DPR	0,01	0,3	0,1
RECUPERAÇÃO (%)	94,9	90,7	94,8

Concentração (µg/mL)	50	50	50
Temperatura (°C)	1056:00:00	65:35:00	66:34:00
n	3	3	3
DPR	0,08	0,3	0,14
RECUPERAÇÃO (%)	95,1	90,7	94,9

5.5. Avaliação da eficiência de encapsulação (EE %)

Após a validação do método analítico para quantificação do docetaxel, foi realizada a avaliação da eficiência de encapsulação. O processo foi conduzido a partir dos lipossomas recém obtidos, antes e após a purificação, e para os lipossomas funcionalizados com transferrina. Os resultados (Figura 19.a) mostraram uma perda de 44% de fármaco após o processo de homogeneização de alta pressão, portanto considerou-se o valor de 44 µg/mL como sendo 100% de DTX. A quantidade de fármaco representa a porcentagem de encapsulação do fármaco em relação a quantidade medida após a homogeneização, sendo que o valor da eficiência após a purificação foi de 69% (Figura 19.b) e para os lipossomas funcionalizados foi de 37%. Assim como demonstrado por Pereira e colaboradores (2016), observaram diminuição da EE (%) e concluíram que se o fármaco não estiver totalmente incorporado na bicamada, ou seja se o fármaco estiver na superfície externa dos lipossomas será perdido durante o processo de purificação.

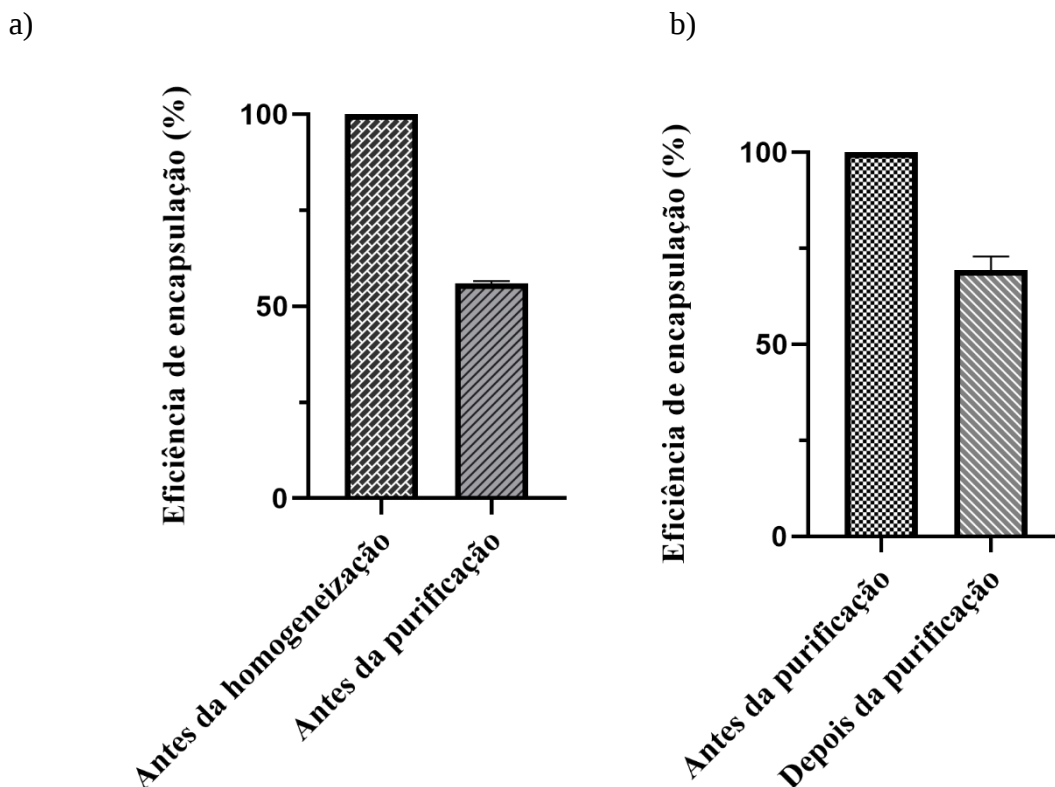


Figura 19: Eficiência de encapsulação do DTX em lipossomas. Os lipossomas SPC:COL: DSPE-PEG (2000) maleimida (MAL): DTX foram purificados usando a coluna CL-4B. (a) Eficiência de encapsulação de DTX em lipossomas antes da homogeneização de alta pressão em comparação com lipossomas antes da purificação, conforme determinado por HPLC; (b) antes da purificação e depois da purificação. Os lipossomas foram rompidos em ACN 1:10 (v/v), sonificados por 15 min e o conteúdo de DTX foi quantificado por HPLC (n = 3). A análise estatística foi realizada usando ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.6. Estudo de dissolução do DTX

5.6.1. Estudo de solubilidade do DTX

Para realizar o ensaio de dissolução *in vitro* é necessário avaliar a solubilidade do fármaco, ou seja, deve-se conduzir a análise dentro das condições *sink*.

A solubilidade do DTX foi determinada no meio de dissolução que utilizado para avaliar a liberação do fármaco (PBS pH 7,4 com 1,25% de LSS). O fármaco em excesso foi adicionado em eppendorf (n=3) até que atingisse o ponto de saturação (LIM et al., 2015).

A curva de calibração do docetaxel descrita no item 5.4.3 foi utilizada para calcular a concentração de saturação em meio receptor. O valor obtido foi de 0,947 mg/mL. Portanto a partir do valor encontrado foi possível desenvolver o ensaio dentro das condições *sink*, considerando o volume de meio que será utilizado e a concentração de fármaco incorporado nos lipossomas.

5.6.2. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do DTX

O perfil de liberação de fármacos encapsulados em lipossomas é relatado na literatura pela rápida perda inicial de fármaco seguida por taxas mais lenta de perda de fármaco. No caso de rápida liberação inicial relaciona-se com o deslocamento do fármaco na superfície lipossomal enquanto que a liberação lenta que ocorre posteriormente sustenta-se pela liberação do fármaco que está localizado nas lamelas internas (PANWAR et al., 2010), como no caso do DTX.

A avaliação perfil de liberação *in vitro* do docetaxel encapsulado nos lipossomas possibilitou verificar a quantidade de fármaco liberada em função do tempo e o mecanismo envolvido nesse processo. Para assegurar a reprodutibilidade e eficácia do estudo de liberação utilizou-se uma amostra de controle contendo apenas o DTX livre (DTX em solução receptora), de forma a garantir que a membrana utilizada não seria uma barreira durante o estudo de liberação.

Na Figura 20 está representado o perfil de liberação do docetaxel em solução receptora (PBS+ LSS 1,25%) e encapsulado nos lipossomas. É possível notar uma redução significativa das taxas de dissolução do DTX encapsulado em relação ao fármaco livre, em que 60,42% do fármaco encontrava-se em solução na primeira hora do teste e o platô observado a partir das 6 horas. A liberação do DTX nos lipossomas peguilados é prolongada, inicialmente ocorre liberação mais lenta, em torno de 6,43%, alcançando 51,70% ao final de 72 horas. No caso dos lipossomas funcionalizados com transferrina, 16,93% de DTX é liberado a partir das 24h e ao final do estudo 31,97%. O resultado indica maior tempo para a liberação do DTX devido possivelmente à presença de colesterol na bicamada, o revestimento com PEG, e além deste fato a presença da transferrina nos lipossomas funcionalizados torna a liberação do fármaco mais demorada.

De acordo com dados da literatura os lipossomas peguilados apresentam maior estabilidade na circulação sanguínea (ELOY et al., 2016; PANWAR et al., 2010; YOUSEFI, et al., 2009). Na tabela 15 estão apresentadas as porcentagens de fármaco liberadas a partir dos lipossomas, onde é possível constatar que houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Neste contexto, a compartimentalização do fármaco em lipossomas funcionalizados pode permitir a proteção contra degradação, bem como a modificação do perfil de dissolução. A partir dos resultados descritos acima indicam que o docetaxel seria estável na circulação sanguínea. No entanto, a modificação superficial dos sistemas com transferrina provavelmente permitiu a formação de um sistema mais rígido e capaz de impor maior resistência à difusão do meio de dissolução para o seu interior e consequentemente a dissolução do fármaco associado (ELOY et al., 2017; HATAKEYAMA et al., 2004; QIN et al., 2014).

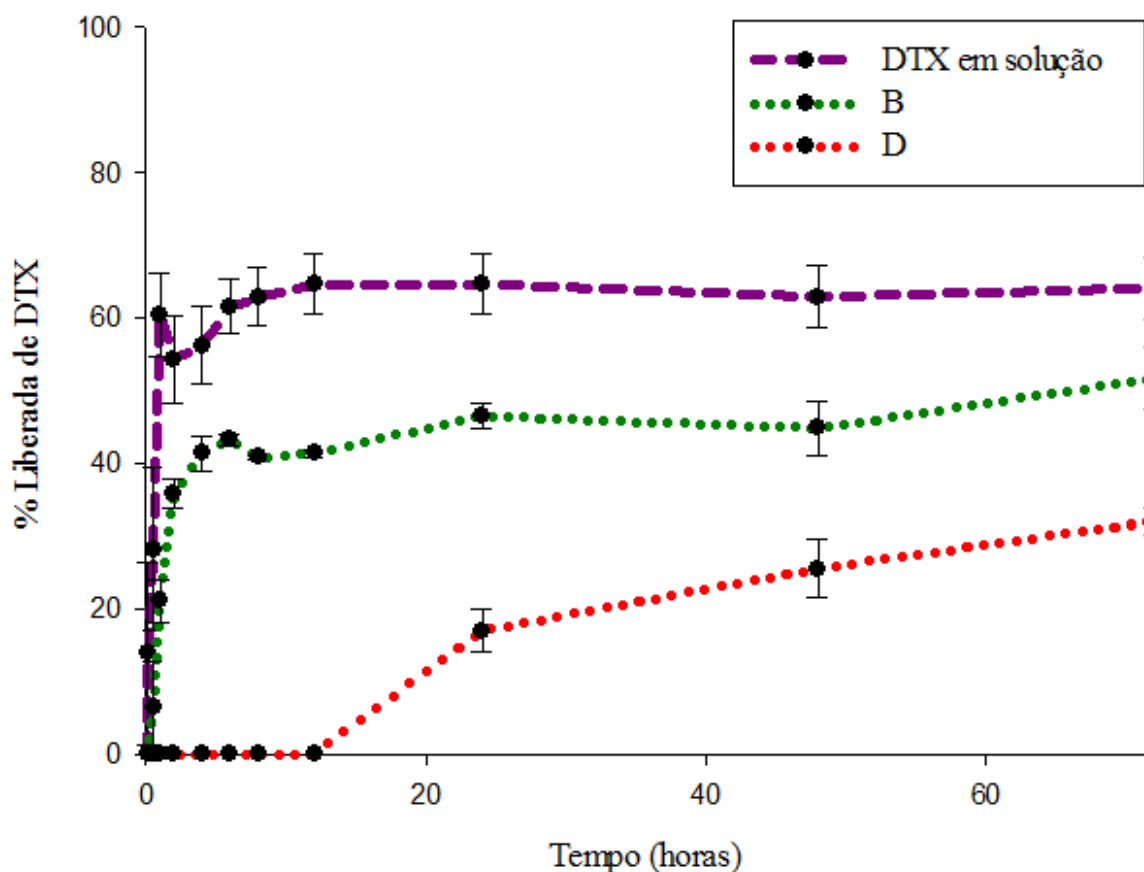


Figura 20. Perfil de liberação *in vitro* do DTX livre e encapsulado em lipossomas em tampão PBS pH 7,4.

Tabela 15: Porcentagens de DTX liberado em relação ao tempo

Formulações	% Liberada de DTX				
	0,5h	12h	24h	48h	72h
Fármaco Livre (DTX Livre)	28,08 ± 11,18	64,60 ± 4,13	64,62 ± 4,12	62,09 ± 4,19	64,09 ± 4,27
DTX - lipossoma (B)	6,43 ± 6,29	41,29 ± 0,49	46,47 ± 1,67	44,78 ± 3,81	51,70 ± 4,26
DTX- lipossoma funcionalizado (D)	0	0	16,93±2,89	25,46±3,99	31,97±1,83

5.6.3. Análise da cinética de liberação *in vitro* do DTX

Para analisar e descrever a cinética de liberação do fármaco foram utilizados os modelos matemáticos Baker & Lonsdale, Korsmeyer-Peppas, Hixon & Crowell, Higuchi, Primeira Ordem e Weibull (Tabela 16). Para esse estudo o modelo Weibull (equação 6) foi considerado como mais adequado, pois apresentou os valores de coeficiente de determinação (R^2) mais próximos de 1,00.

Para avaliar os processos de dissolução e liberação de fármaco pelo modelo proposto por Weibull pode – se utilizar a equação 6, onde é expressa a fração acumulada de fármaco (m), em solução no tempo (t), t_i é o intervalo de tempo antes do início do processo de dissolução ou liberação (sendo que na maioria dos casos é zero) e b indica o mecanismo de transporte envolvido através da bicamada lipídica (PAPADOPOULOU et al., 2006; LAPENDA et al., 2013).

$$m = 1 - \exp \left[\frac{-(t-t_i)^b}{a} \right] \text{ (Equação 6)}$$

Dessa maneira, são denominados:

- I. Modelo de difusão Fickiana, $b \leq 0,75$;
- II. Modelo de difusão Fickiana, Caso II (intumescimento), $0,75 < b < 1,0$;
- III. Modelo não-Fickiano (Mecanismo complexo de liberação complexa) $b > 1$.
- IV. As formulações lipossomais apresentaram b igual a 0,4736 (A) e 0,4620 (B). Portanto, se encaixam no modelo de difusão Fickiana, que é caracterizada pela alta velocidade de difusão do solvente para o interior da bicamada, sendo assim ocorre formação de um gradiente de penetração do solvente. A concentração de solvente diminui exponencialmente da região totalmente intumescida do sistema para o centro da vesícula lipossomal (PAPADOPOULOU et al., 2006; MIRCIOIU et al., 2019; LAPENDA et al., 2013). A adição de PEG a matriz possivelmente permitiu maior grau de organização estrutural, de forma que as taxas de difusão do fármaco através dessa estrutura mais estável e organizada foram responsáveis pelo condicionamento da liberação (ELOY et al., 2016).

Alguns estudos foram descritos na literatura referentes ao perfil de liberação do DTX presente em lipossomas peguilados, nanopartículas e carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com anticorpo monoclonal. Yousefi e colaboradores (2009) desenvolveram lipossomas peguilados com objetivo de melhorar a toxicidade do docetaxel, e assim diminuir a toxicidade associada ao polisorbato 80. Realizaram o ensaio de liberação e ao longo de 14 dias obtiveram perfil de liberação de 5% de DTX. No caso do estudo de liberação realizado por Koopaei e colaboradores (2011) para nanopartículas conjugadas a anticorpo monoclonal houve liberação de 60% de DTX na primeira hora, enquanto que em carreadores lipídicos nanoestruturados também conjugados com anticorpo monoclonal a liberação de 60% ocorreu após 20 horas de ensaio (VARSHOSAZ et al., 2017).

Tabela 16: Valores de R^2 referentes aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo liberação *in vitro* do DTX a partir das formulações selecionadas.

Modelos matemáticos	DTX Livre	B	D
Baker&Lonsdale	$R^2= 0,395$ $k= 0,009$	$R^2= 0,435$ $k= 0,002$	$R^2= 0,736$ $k= 0,0002$
Korsmeyer-Peppas	$R^2= 0,722$ $k= 37,89$ $n= 0,206$	$R^2= 0,7514$ $k= 21,67$ $n= 0,231$	$R^2= 0,932$ $k= 0,378$ $n= 1,055$
Hixon&Crowell	$R^2= -0,499$ $k= 0,030$	$R^2= -0,547$ $k= 0,005$	$R^2= 0,932$ $k= 0,002$
Higuchi	$R^2= 0,145$ $k= 17,932$	$R^2= 0,272$ $k= 8,491$	$R^2= 0,750$ $k= 2,985$
Primeira Ordem	$R^2= -0,231$ $k= 0,125$	$R^2= -0,384$ $k= 0,0233$	$R^2= 0,931$ $k= 0,005$
Weibull	$R^2= 0,972$ $k= 88,984$ $b= 15,014$	$R^2= 0,981$ $k=47,730$ $b= 0,473$	$R^2= 0,999$ $k=85,560$ $b= 0,462$

5.7. Estudos em cultura celular

Com o objetivo de testar a hipótese de que os lipossomas desenvolvidos não são citotóxicos para as linhagens saudáveis e os lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com docetaxel em comparação com a formulação comercial poderia resultar em maior efeito citotóxico em linhagem tumoral de próstata e maior viabilidade de células de próstata normal realizou-se o ensaio de viabilidade celular *in vitro* utilizando resazurina com as linhagens PC3 (célula tumoral de próstata) e PNT2 (célula normal de próstata).

Em estudo realizado anteriormente utilizando células normais e de câncer de ovário, os lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com docetaxel demonstraram efeito citotóxico mínimo nas células de ovário normais. Em contrapartida, houve redução significativa da viabilidade celular das linhagens tumorais em comparação com o docetaxel livre e lipossomas carregados com docetaxel. Em seguida, aumentaram a concentração das soluções lipossomais e a morte celular foi mais expressiva para os lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com docetaxel (YUAN et al., 2013).

As figuras 21, 22 e 23 apresentam os resultados da viabilidade celular da linhagem PC3 após 24, 48 e 72 horas após o tratamento com formulação comercial de docetaxel (DTX), lipossomas vazios (A), lipossomas contendo DTX (B), lipossomas vazios e funcionalizados com transferrina (C) e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D).

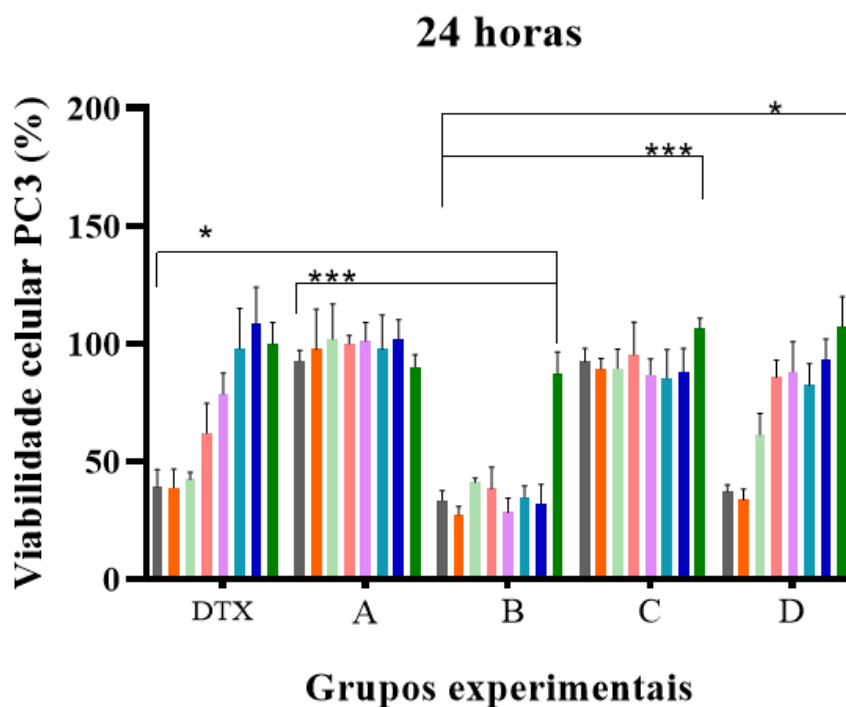


Figura 21. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C) e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D) da linhagem celular PC3 em 24 horas utilizando o ensaio de resazurina. Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey de comparação múltipla (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

A viabilidade celular para a linhagem PC3 foi analisada pela primeira vez em 24 horas (Figura 21). O grupo tratado apenas com DTX apresentou citotoxicidade de aproximadamente 50% para as concentrações entre 50 e 100nM. Observou-se que a morte celular para as células tratadas com lipossoma vazio se manteve menor do que 10% para todas as concentrações. Ao comparar o lipossoma vazio (A) com o vazio funcionalizado (C) a morte celular se manteve igual para as duas formulações. Porém, ao se avaliar os dados dos lipossomas com DTX (B) a morte celular se manteve acima de 70 % para as concentrações maiores ou iguais a 10nM. Por outro lado, lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D) apresentaram valores de morte celular expressiva acima de 60% apenas para as concentrações acima de 75nM.

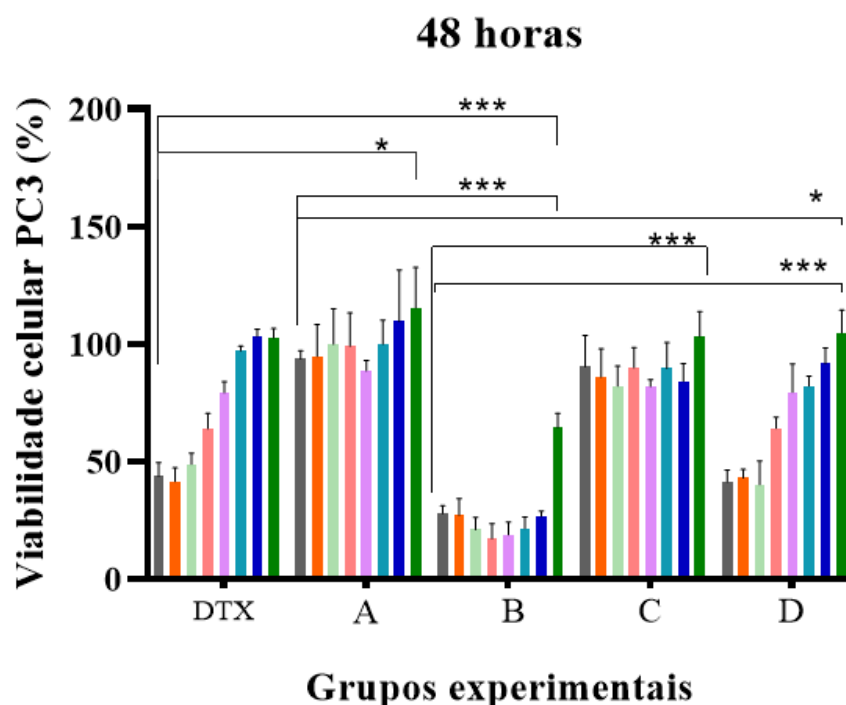


Figura 22. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C) e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D) da linhagem celular PC3 em 48 horas utilizando o ensaio de resazurina. Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey de comparação múltipla (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Para a avaliação de 48 horas (Figura 22) nos grupos tratados com DTX livre observou-se morte de 20% para a concentração de 10nM e de cerca de 51% para os valores superiores a 50nM. Os lipossomas vazios não causaram morte celular expressiva na análise de 48 horas. No entanto, para os lipossomas vazios e funcionalizados (C) houve aumento na morte celular para 16% a partir da concentração de 1nM. O grupo tratado com lipossoma carregado com DTX (B) apresenta comportamento diferente quando comparado com o DTX livre, pois para a menor concentração houve morte de 36% e 74% para as concentrações superiores ou iguais a 1nM. Para os lipossomas funcionalizados e carregados com docetaxel (D) o perfil foi semelhante ao tempo de 24 horas, com uma única diferença, a morte celular de 60% neste caso foi a partir da concentração de 25nM.

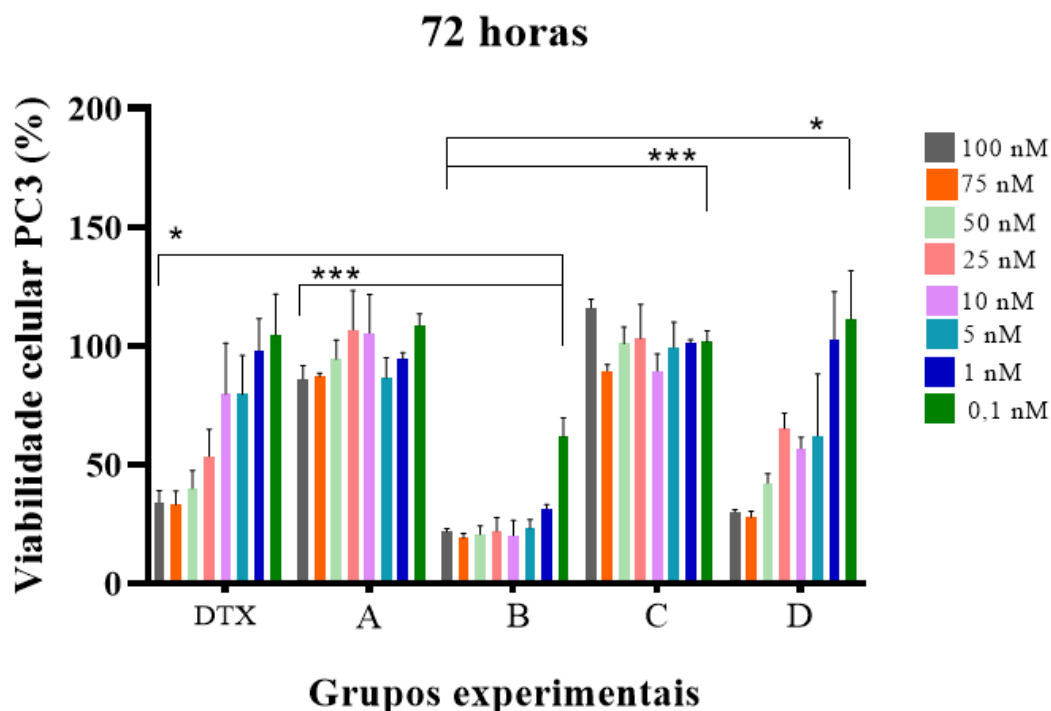


Figura 23. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C) e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D) da linhagem celular PC3 em 72 horas utilizando o ensaio de resazurina. Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey de comparação múltipla (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Os dados obtidos para 72 horas (Figura 23) evidenciaram morte celular para as células tratadas com DTX livre de aproximadamente 45% para a concentração de 25nM e 60% para as concentrações superiores a 50nM. Para os lipossomas vazios (A), a morte celular foi de aproximadamente 15%; entretanto, para a formulação funcionalizada (C) não observou-se grandes eventos de mortes celulares. Em contrapartida, os grupos tratados com lipossomas carregados com DTX (B) apresentaram morte celular superior a 65% para a concentração de 1nM e acima 75% para as concentrações acima de 5nM. Finalmente, os lipossomas funcionalizados e com DTX (D) demonstraram 58,70% de morte celular para as concentrações de 50nM e 100nM, respectivamente.

As Figuras 24, 25 e 26 apresentam os resultados da viabilidade celular da linhagem PNT2 após 24, 48 e 72 horas após o tratamento com formulação comercial de docetaxel (DTX), lipossomas vazios (A), lipossomas contendo DTX (B), lipossomas vazios e funcionalizados com transferrina (C) e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D).

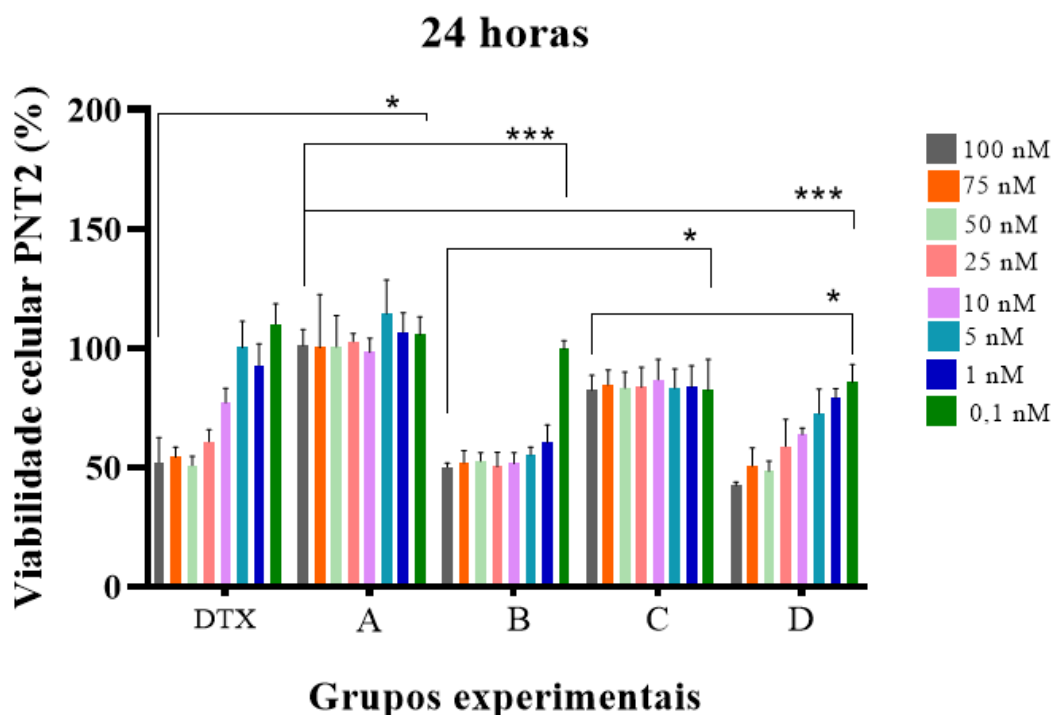


Figura 24. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C) e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D) da linhagem celular PNT2 em 24 horas utilizando o ensaio de resazurina. Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey de comparação múltipla (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Para a linhagem PNT2 na primeira análise às 24 horas (Figura 24), a viabilidade celular foi de aproximadamente 52% para a maior concentração. Já para os lipossomas vazios (A) observou-se que 100% das células estavam viáveis, bem como não se observou morte celular expressiva para o grupo tratado com lipossomas vazios e funcionalizados (C), com 82% de viabilidade celular. Por outro lado, para os lipossomas carregados com DTX (B) nota-se 50% de viabilidade, enquanto que os resultados para lipossomas funcionalizados e carregados com DTX (D) foi de 42%.

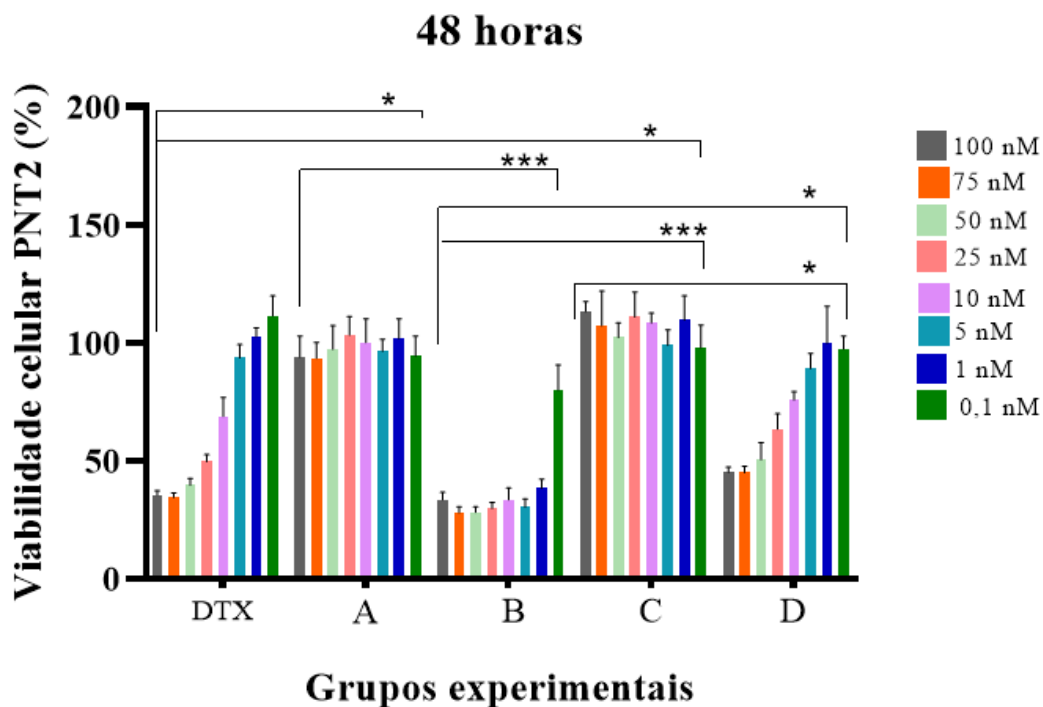


Figura 25. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C) e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D) da linhagem celular PNT2 em 48 horas utilizando o ensaio de resazurina. Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey de comparação múltipla (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Após 48 horas de incubação (Figura 25), não observou-se diferença relevante entre a viabilidade para os lipossomas carregados com DTX (B) e o fármaco livre, sendo a viabilidade 33% e 35%, respectivamente. No entanto, um ligeiro aumento da viabilidade das células PNT2 foi observada para os grupos tratados com lipossoma vazio (A), sendo mais pronunciada para a amostra C (lipossoma vazio funcionalizado) em todas as concentrações, indicando que os lipossomas não são tóxicos para as células saudáveis. Neste ponto, o perfil de viabilidade celular dos lipossomas com fármaco foi melhor apresentado para o grupo D (lipossoma funcionalizado e carregado com DTX), sendo de 45% para as maiores concentrações 75 e 100nM e entre 63 e 97% para as concentrações entre 50 e 0,1nM.

Adicionalmente, ao comparar os resultados obtidos na análise de 72 horas (Figura 26), observou-se morte celular expressiva nos grupos tratados com DTX livre, lipossomas carregados com DTX (B) e lipossomas funcionalizados e carregados com DTX (D), sendo de 24, 21 e 20% de viabilidade celular, respectivamente. Como esperado, os lipossomas vazios e lipossomas vazios e funcionalizados apresentaram aproximadamente 100% de viabilidade.

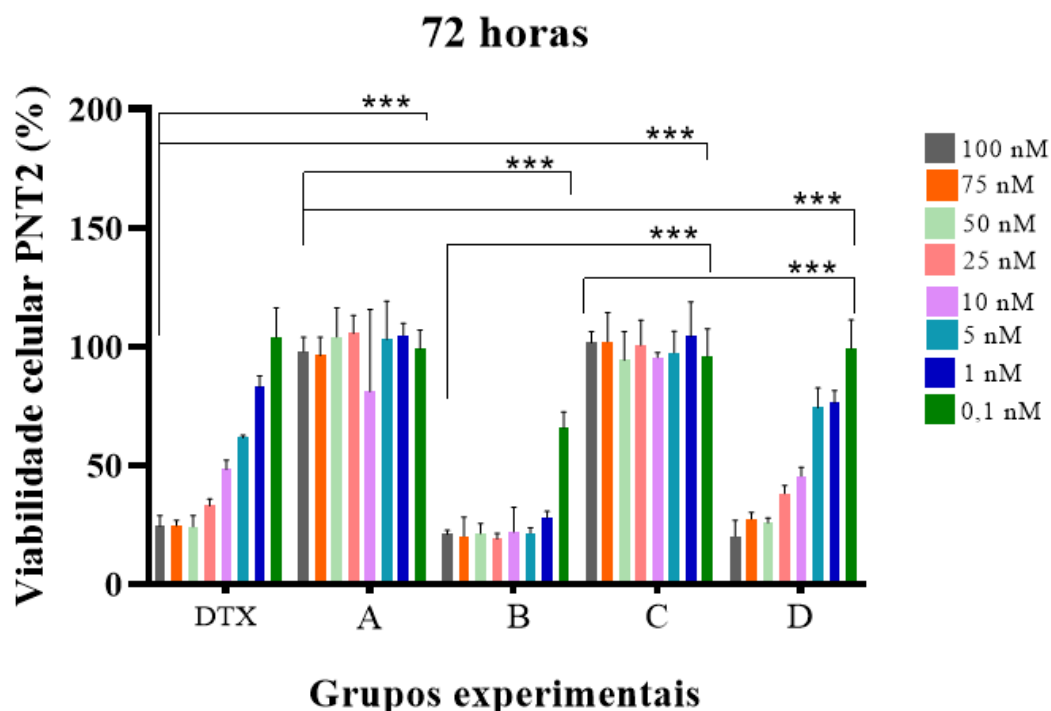


Figura 26. Viabilidade celular (%) das amostras: formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma vazio (A), Lipossoma carregado com docetaxel (B), Lipossoma vazio e funcionalizado com transferrina (C) e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D) da linhagem celular PNT2 em 72 horas utilizando o ensaio de resazurina. Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey de comparação múltipla (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

O surgimento de células tumorais é um processo bastante complexo, pois envolvem mutações produzidas através de alterações gênicas ou de proteínas. Neste sentido, receptores de transferrina são responsáveis pelo controle de processos celulares, tais como a progressão tumoral (SHEN et al., 2018). As células tumorais de cérebro são os principais alvos de estudos envolvendo transferrina como ligante e os resultados apresentados são promissores. Soni et al. (2008) observaram que houve maior captação celular dos lipossomas sem funcionalização pelas células tumorais de fígado em comparação com os lipossomas funcionalizados após 24 horas de estudo. A justificativa seria a menor expressão de receptores de transferrina nestas células em comparação por exemplo com células de cérebro, e, portanto, a transferrina conjugada na superfície lipossomal reduz a captação pois mascara os locais de reconhecimento, o que impede a captação pelo sistema mononuclear fagocitário (SFM) (SONI et al., 2008).

A partir dos valores de IC_{50} obtidos para a formulação comercial, lipossomas carregados com docetaxel e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com docetaxel notou-se que o tratamento das células tumorais de próstata PC3 com estes grupos provocou um aumento expressivo da toxicidade nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores de

IC₅₀ para o período estudo estão descritos na tabela 17. Ao final de 72 horas de estudo notou-se redução significativa dos valores de IC₅₀ para ambos os grupos. Ressaltando que uma concentração maior de formulação seria necessária para alcançar 50% de morte celular para os lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com docetaxel para a linhagem celular normal PNT2, apesar disso não houve diferença significativa entre o grupo tratado com a formulação comercial e esta formulação (D), apresentando valores de IC₅₀ de 10,57 e 11,92 nM, respectivamente.

Tabela 17 – Valores de IC₅₀ da formulação comercial de docetaxel, lipossoma carregado com docetaxel e lipossoma funcionalizado com transferrina e carregado com docetaxel em relação as linhagens celulares normais e tumorais de próstata, PC3 e PNT2 no período de 24, 48 e 72 horas.

IC ₅₀ (nM)						
Grupos	Linhagens celulares					
	PC3			PNT2 (nM)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
DTX	46, 42	55,33	34,98	78,09	34,16	10,57
B	1,55	0,15	0,19	42,87	1,13	0,23
D	61,89	48,13	26,88	58,44	59,56	11,92

Formulação comercial de docetaxel (DTX), Lipossoma carregado com docetaxel (B) e lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX (D).

Diante disso, ressalta-se a importância da análise da viabilidade celular para o desenvolvimento do estudo. Os lipossomas do tipo convencional, compostos apenas de fosfatidilcolina e colesterol são rapidamente fagocitados pelas células; no entanto, ao utilizar abordagens como uso do PEG e funcionalização de moléculas em sua superfície, inibem o reconhecimento através das opsoninas no plasma e posterior captura pelas células (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Assim, observou-se que os lipossomas vazios não apresentaram toxicidade expressiva para as linhagens utilizadas, todavia, para os lipossomas contendo fármaco (B) observou-se morte celular mais evidente. Apesar disso, esperava-se que a viabilidade celular fosse menor nos grupos tratados com D do que com B. Desta forma, seria necessário realizar ajuste no alvo selecionado e estudo utilizando modelo tridimensional, o qual

mimetiza o microambiente tumoral ou até mesmo *in vivo* para melhor esclarecimento dos resultados aqui obtidos.

5.8. Avaliação do *uptake* celular

5.8.1. Microscopia Confocal

Uma variedade de células tumorais superexpressam receptores de transferrina (TfR) em sua superfície, no entanto, em células normais os níveis de expressão são baixos (DANIELS et al., 2012). Diante disso, sistemas de liberação de fármacos funcionalizados com transferrina são estudados no tratamento antitumoral (CHIU et al., 2014). Neste caso particular, o *uptake* celular de lipossomas funcionalizados e não funcionalizados por transferrina contendo a sonda fluorescente responsável por corar as bicamadas lipídicas, perclorato de 3,3'-diocetadeciloxacarboxilamina (DiO) foi avaliado nas linhagens celulares de PNT2 (baixa expressão de TfR) e PC3 (alta expressão de TfR) (GUO et al., 2016; LI et al., 2009; PETRILLI et al., 2018; YEFIMOVA et al., 2012).

No estudo atual, foram utilizados os tempos de incubação de 2, 4 e 24 horas. Os resultados apresentados nas Figura 27,28 sugerem que não houve diferença na captação celular nos tempos de 2 e 4 horas, isto pode ocorrer quando os lipossomas apresentam em sua composição fosfatidilcolina de soja (PC) e colesterol, os quais são biocompatíveis com a membrana celular e possibilitam o processo de endocitose dos lipossomas. Neste contexto, outra justificativa para a semelhança da captação entre os dois sistemas seria a temperatura de transição da PC ser baixa ($T_c = -30$ a -20 °C), resultando em uma vesícula lipossomal com menor rigidez quando comparados com lipossomas compostos de outros fosfolipídeos (LI et al., 2015).

Alguns relatos na literatura destacam o fato de que o tempo de incubação no *uptake* celular é um parâmetro que deve ser cuidadosamente considerado ao projetar experiências de captação celular. Por exemplo, imunolipossomas carregados de rapamicina funcionalizados com trastuzumabe tiveram uma maior internalização celular quando foram incubados com células de câncer de mama por 24 horas em comparação com 6h (ELOY et al., 2017).

Ao observar a figura 29, onde estão representadas as imagens para o tempo de incubação de 24 horas, notou-se que a funcionalização com transferrina promoveu o *uptake* de lipossomas na linhagem PC-3 em relação aos controles, incluindo células não tratadas e células tratadas com lipossomas não funcionalizados.

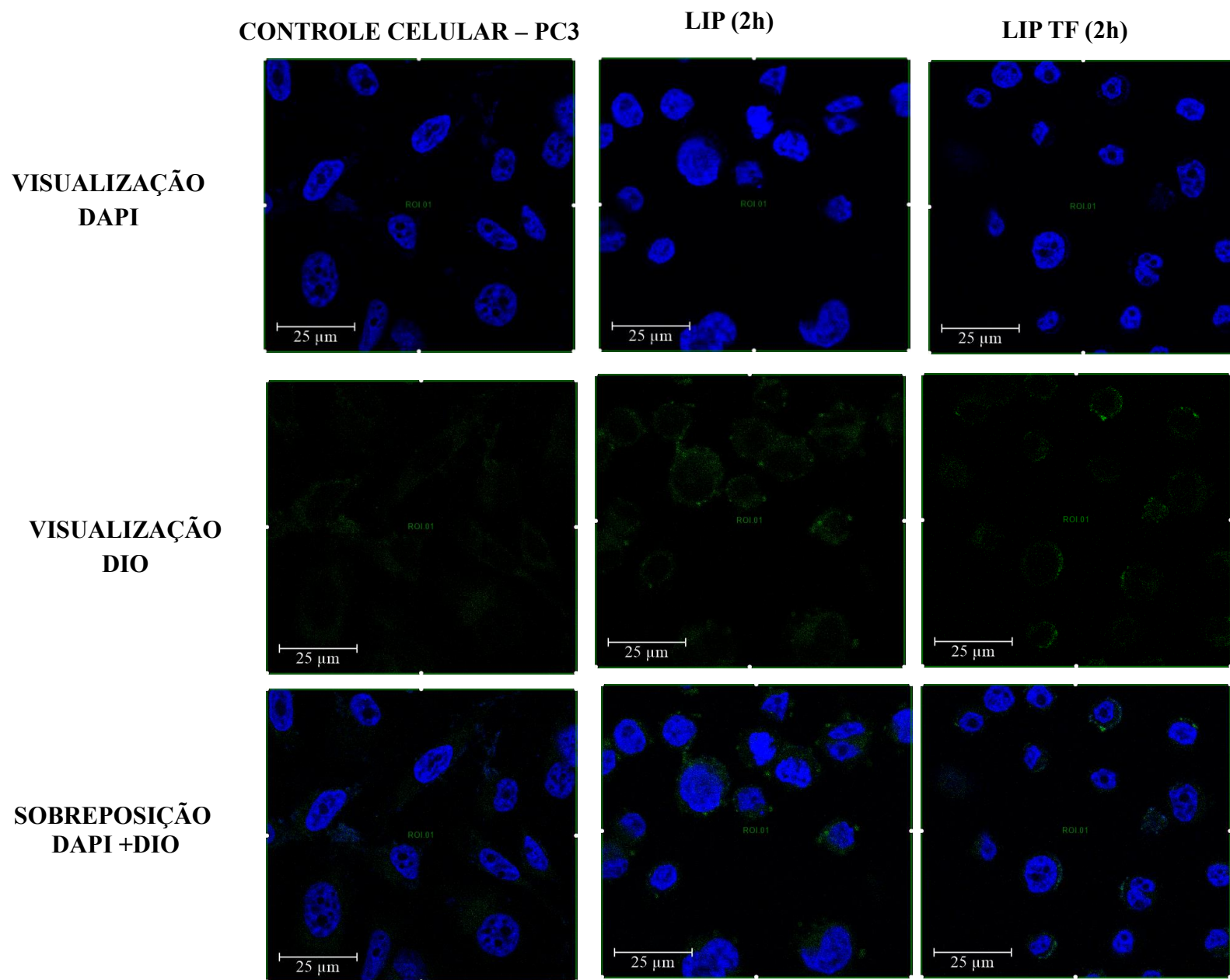


Figura 27. Avaliação do *uptake* celular por microscopia confocal da linhagem PC3 após 2 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).

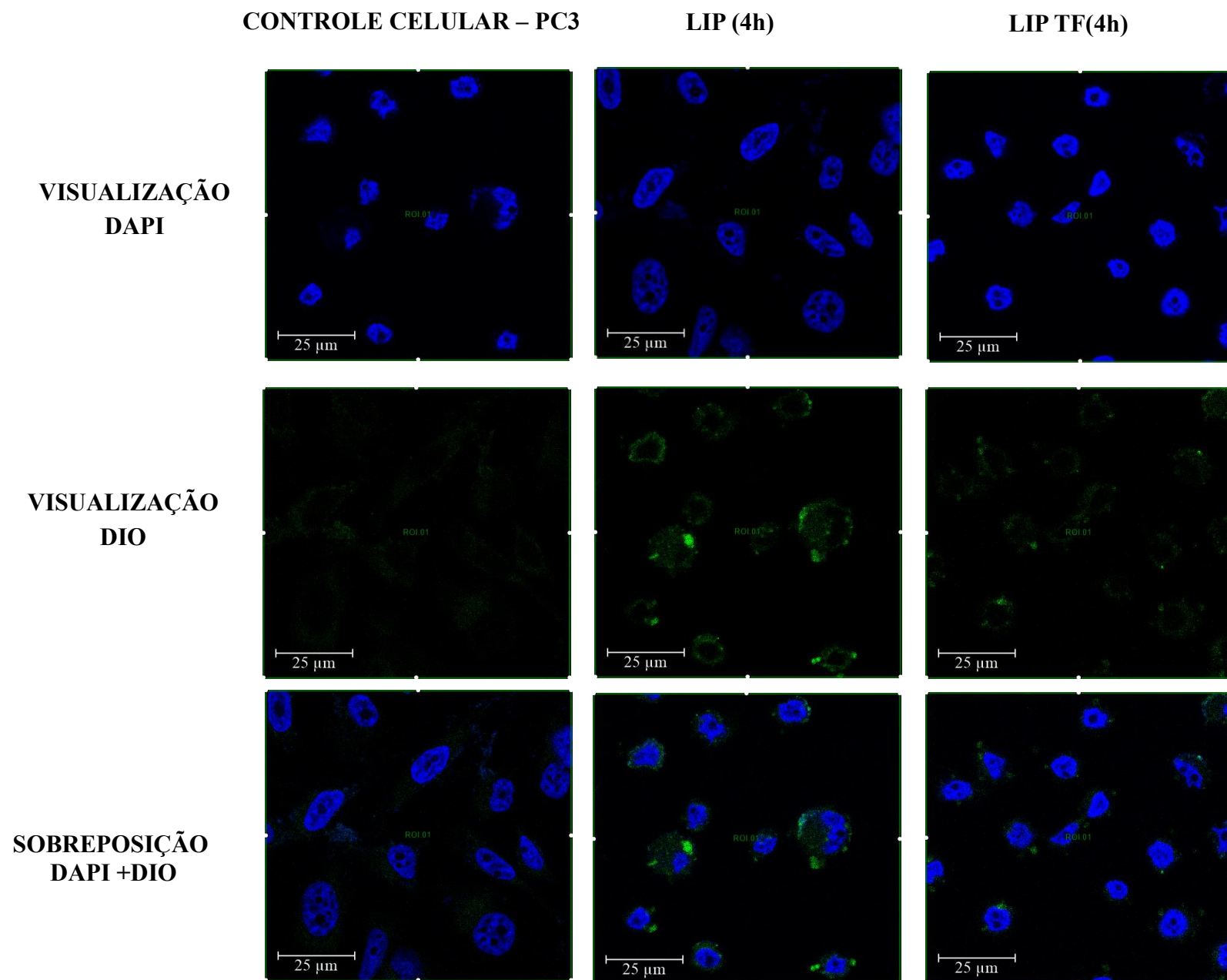


Figura 28. Avaliação do *uptake* celular por microscopia confocal da linhagem PC3 após 4 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).

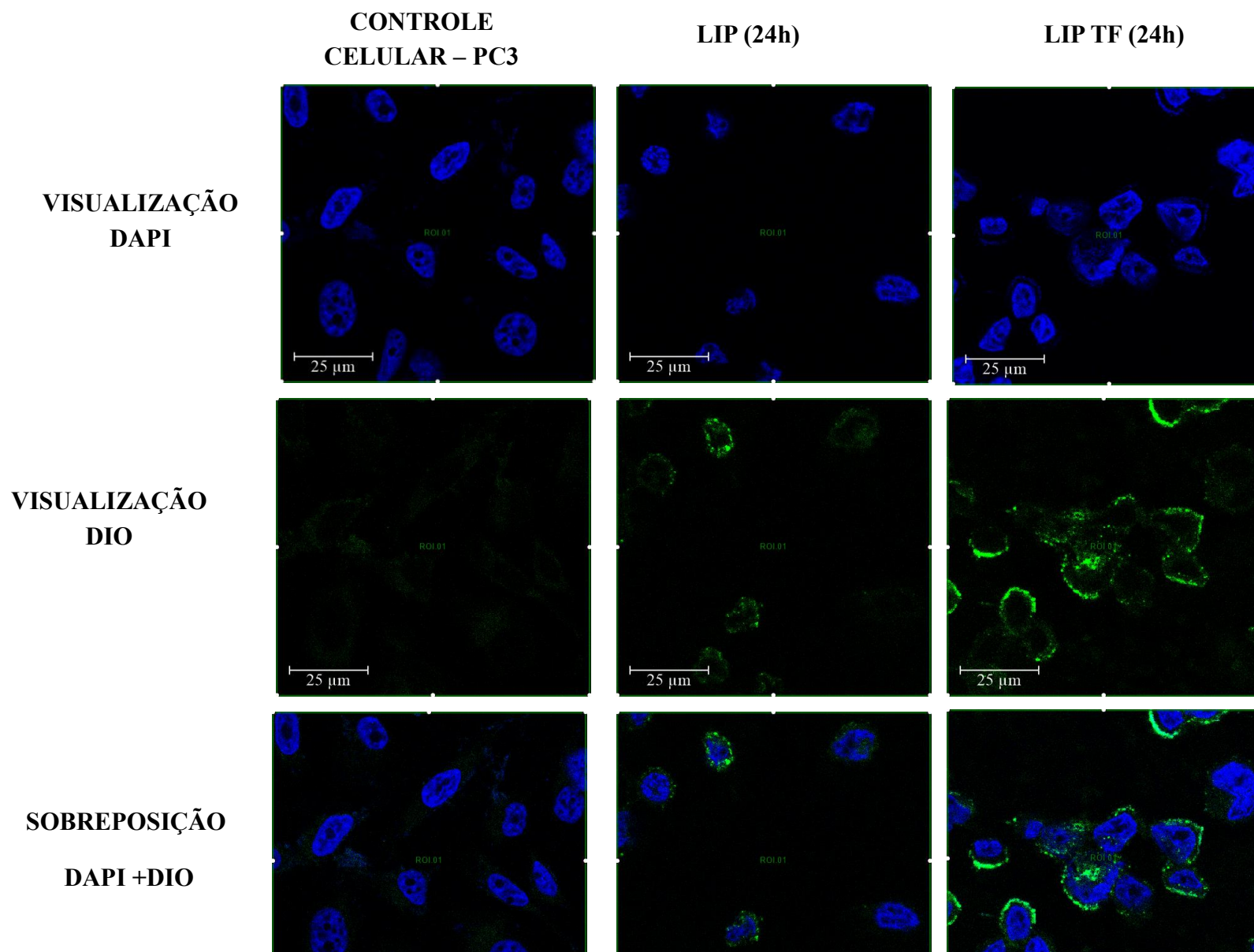


Figura 29. Avaliação do *uptake* celular por microscopia confocal da linhagem PC3 após 24 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).

Para as células TfR negativas (PNT2) (Figura 30) as intensidades de fluorescência do canal DiO foi expressiva para os poços tratados com lipossomas sem funcionalização em todos os tempos analisados, sendo mais expressivo nos tempos 2 e 4 horas, quando comparado com os lipossomas funcionalizados (ELOY et al., 2017; MORTENSEN et al., 2013). Este fato ocorreu provavelmente pela carga negativa apresentada por esses lipossomas, pois de acordo com a literatura a superfície celular apresenta sítios catiônicos que permite que essa interação eletrostática ocorra, sendo assim as partículas com carga negativa se ligam a esses sítios e permitem o *uptake* através de processos de endocitose (HONARY; ZAHIR, 2013).

Dessa forma, é possível verificar que a conjugação de transferrina à superfície lipossomal afetou positivamente o *uptake* desse sistema às células tumorais (PC3). Em contrapartida, foi menos evidente nas células normais (baixa expressão de TfR). Petrilli e colaboradores (2018) demonstraram em seu trabalho que lipossomas funcionalizados com anticorpos tiveram *uptake* mais expressivo em linhagem de câncer de pele que possuíam elevada expressão do receptor do que em linhagem com baixa expressão, adicionalmente testaram o *uptake* dos lipossomas sem funcionalização e o resultado foi semelhante ao encontrado neste estudo (PETRILLI et al., 2018).

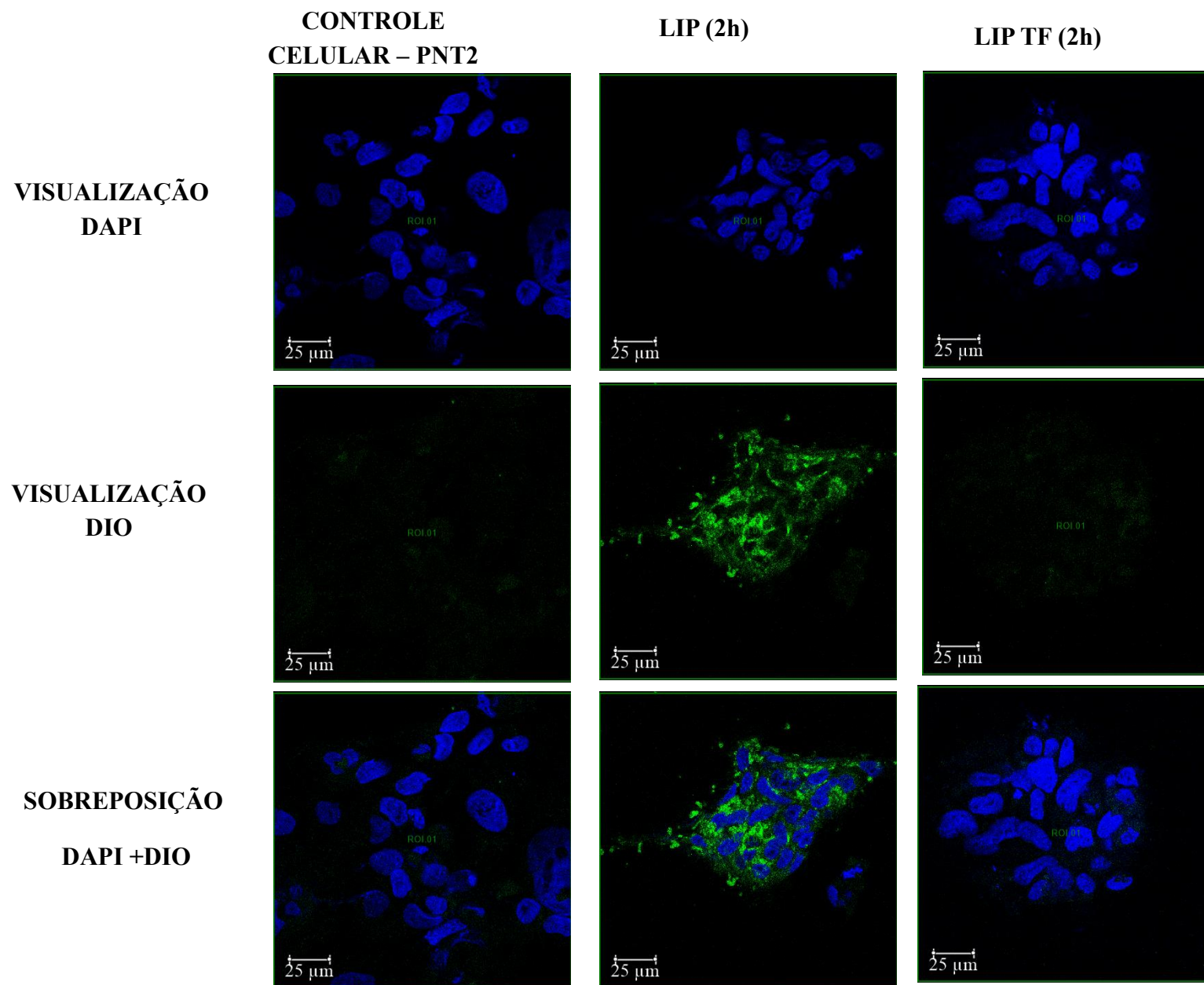


Figura 30. Avaliação do *uptake* celular por microscopia confocal da linhagem PNT2 após 2 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).

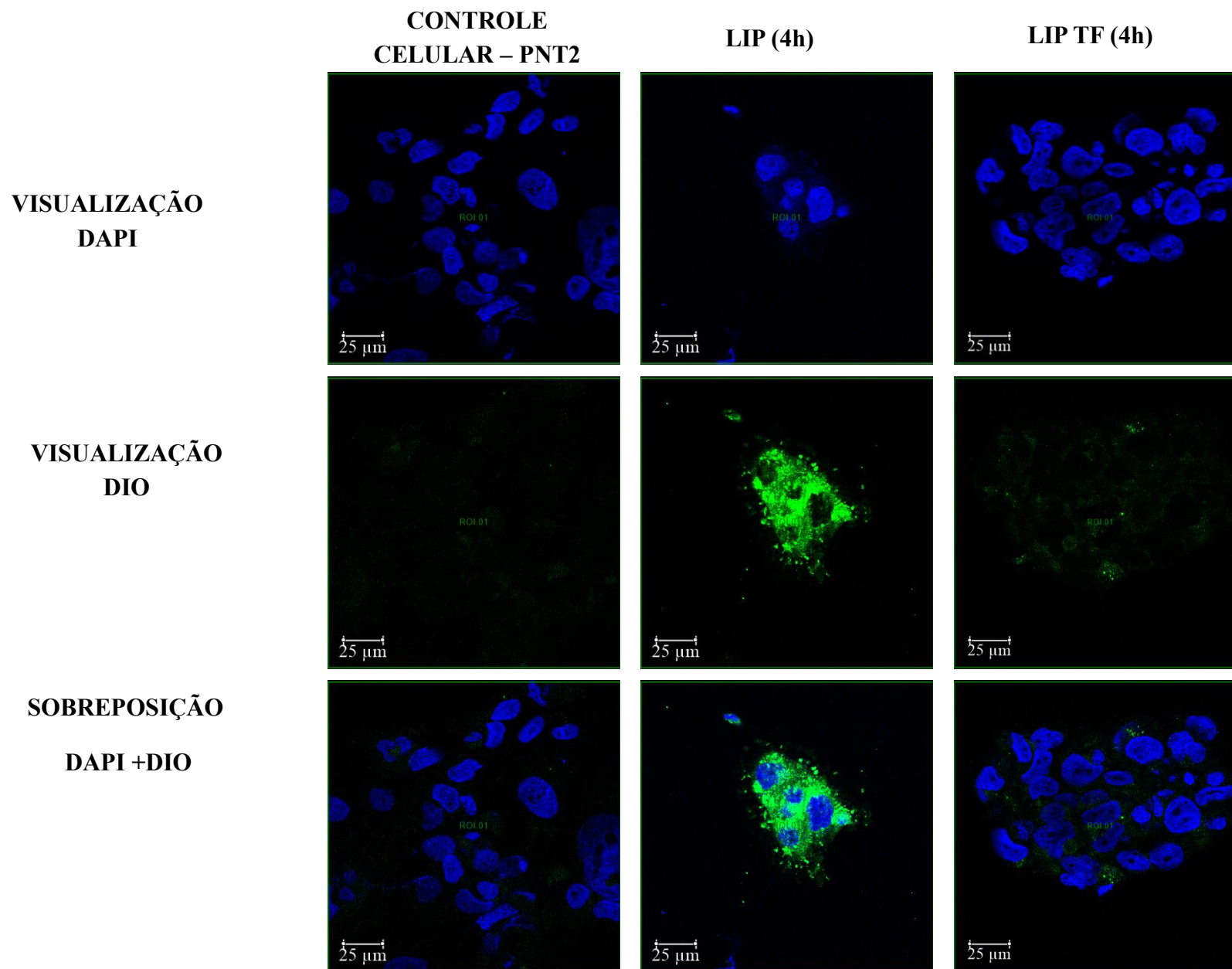


Figura 31. Avaliação do *uptake* celular por microscopia confocal da linhagem PNT2 após 4 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).

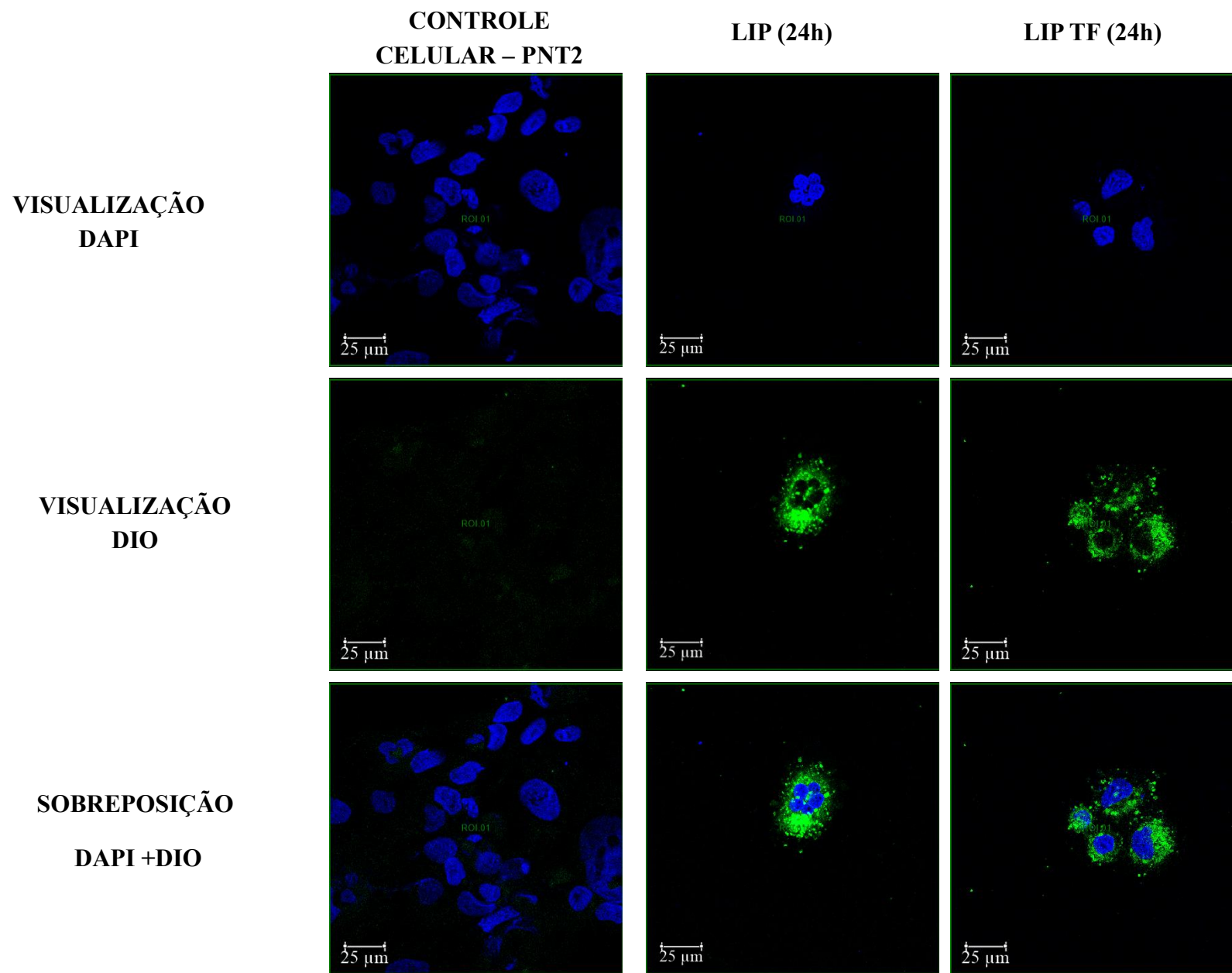


Figura 32. Avaliação do *uptake* celular por microscopia confocal da linhagem PNT2 após 24 horas de tratamento com lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTF) corados com DiO (verde). Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul).

5.8.2. Citometria de fluxo

Para testar a hipótese de que a transferrina melhora a associação celular ao estar funcionalizada em lipossomas utilizou-se a linhagem celular TfR positiva (PC3) no ensaio de citometria de fluxo (Figura 33). Para entender os resultados obtidos ressalta-se a importância de analisar o perfil de fluorescência de acordo com cada quadrante, sendo que os quadrantes Q1 e Q2 representam células coradas com iodeto de propídio (IP) e que perderam a viabilidade. O IP é um marcador fluorescente que possibilita a análise da integridade da membrana plasmática celular, portanto para este ensaio foi utilizado para marcação de células necróticas/mortas. No caso dos quadrantes Q3 e Q4 estão as células vivas e estão marcadas ou não com o DiO, respectivamente (PETRILLI et al., 2018; YEFIMOVA et al., 2012).

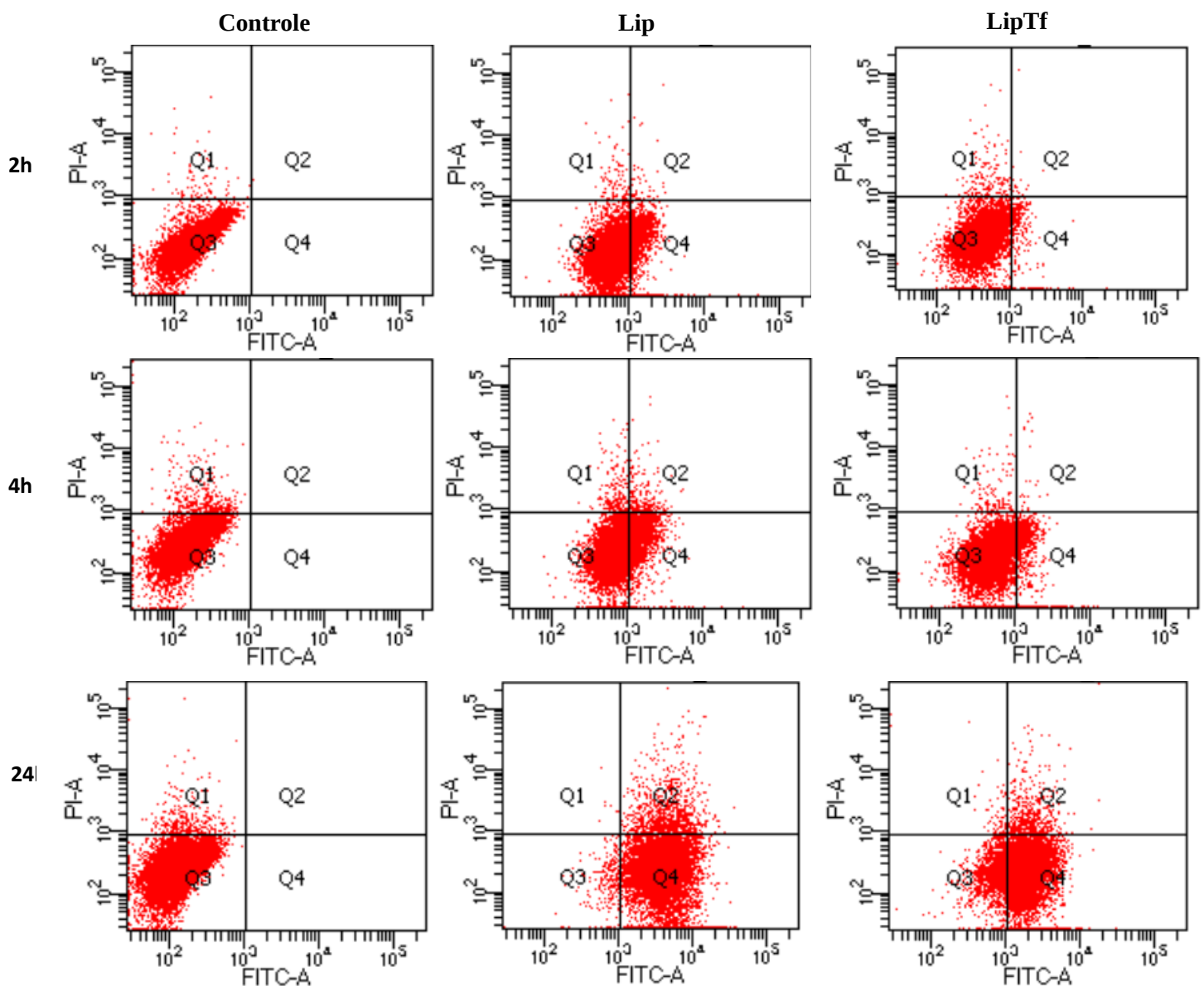


Figura 33. Avaliação do *uptake* celular por citometria de fluxo da linhagem PC3 após 2, 4 e 24 horas. Grupo controle, lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTf).

A viabilidade celular foi obtida através da análise do Q3. O grupo controle apresentou viabilidade de 95,8; 91,7 e 94% para os tempos de 2, 4 e 24 horas, respectivamente (Figura 33). Quando compara-se os dados obtidos no Q4 e Q2, a associação celular dos lipossomas não funcionalizados aumentou proporcionalmente ao tempo, sendo 18,3; 36,2 e 90,5% para os pontos 2, 4 e 24 horas, como observado por Weber e colaboradores (2019).

Para ambos os lipossomas, a viabilidade celular foi de 80%, mas o *uptake* foi menos expressivo nas primeiras horas, sendo 4,08 e 7,60% para os lipossomas funcionalizados. No entanto, ao analisar Q4 e Q2 houve maior taxa de entrada em 24 horas, 77,2%. Cadinoiu e colaboradores (2019) demonstraram em seu trabalho o perfil de *uptake* de lipossomas funcionalizados em linhagem normal e tumoral de pele, sendo que a associação dos lipossomas foi maior em linhagem tumoral para os lipossomas funcionalizados. No entanto, quando comparamos os resultados aqui encontrados nota-se o contrário, os lipossomas não funcionalizados apresentaram maior *uptake* na linhagem tumoral que os funcionalizados. Ao analisar o quadrante Q4, onde estão apresentadas as células viáveis e com DiO observou-se que a associação celular aos lipossomas foi de 80,6% (Lipossomas em funcionalização) e 65,4% (lipossomas funcionalizados).

Diante disso, realizou-se o ensaio com a linhagem saudável (PNT2) para comprovar que a funcionalização promove o direcionamento seletivo (YANG et al., 2015). A viabilidade celular não foi afetada ao realizar a associação com os lipossomas e lipossomas funcionalizados para o tempo de 2, 4 e 24 horas, sendo 62, 44 e 56% para o grupo controle (Figura 34).

Ao comparar os resultados obtidos para as formulações lipossomais não funcionalizadas (**Figura 34**), percebe-se que houve aumento na associação celular, sendo 3,67; 9,47 e 48,20% e de 1,33; 4,77 e 32,20% para os lipossomas funcionalizados. Neste caso, o tratamento com os lipossomas promoveu maior *uptake* em relação aos lipossomas funcionalizados, o que sugere que os lipossomas são mais facilmente captados pelas células normais para todos os tempos analisados e, portanto, os lipossomas funcionalizados realizam o direcionamento ativo visto que essas células apresentam baixa expressão de receptores de transferrina.

Os resultados qualitativos obtidos por microscopia confocal demonstraram que houve maior captação dos lipossomas funcionalizados em relação aos lipossomas sem funcionalização para a linhagem tumoral PC3 (TfR positiva), no entanto isso não foi confirmado pela análise qualitativa realizada por citometria de fluxo. Mas, isso não quer dizer que não houve ligação aos receptores com possível internalização pelas células, já que se observou que houve aumento

da intensidade de fluorescência. Neste sentido, a quantificação da expressão dos receptores expressos pelas linhagens celulares estudadas é um parâmetro importante, pois o receptor pode ser modificado de acordo com o lote de cada linhagem celular e, portanto, não ocorrerá a captação celular desejada, diante disso seria necessário ajuste no alvo (SHEN et al., 2018).

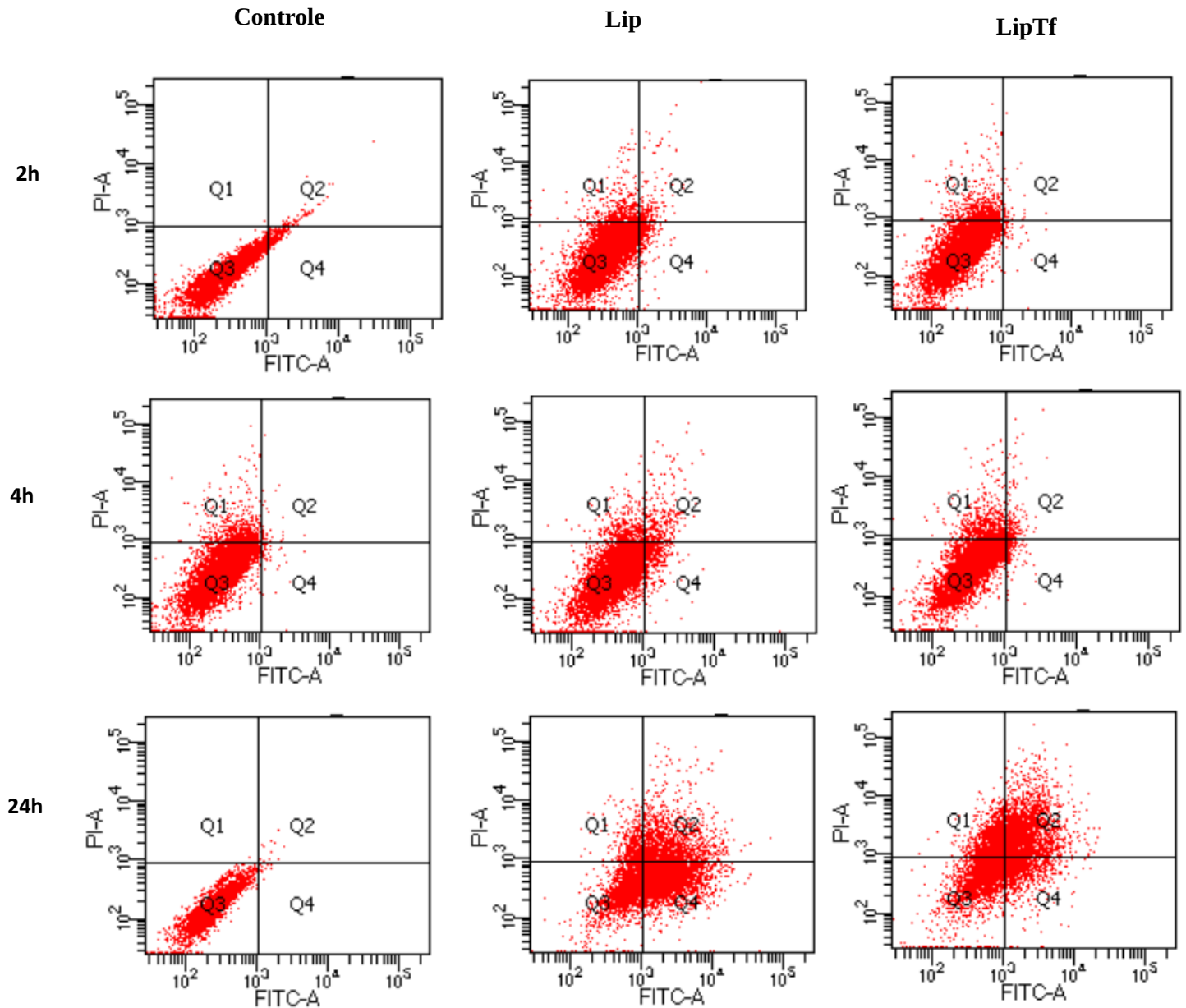


Figura 34. Avaliação do *uptake* celular por citometria de fluxo da linhagem PNT2 após 2, 4 e 24 horas. Grupo controle, lipossomas (Lip) e lipossomas funcionalizados com transferrina (LipTf).

5.8. Avaliação da interação entre a linhagem celular PC-3 e lipossomos funcionalizados com transferrina por QCM-D

O objetivo desta parte do estudo foi demonstrar que os lipossomos funcionalizados com transferrina interagem com os receptores de transferrina superexpressos na superfície celular da linhagem celular PC3 via QCM-D.

O protocolo experimental geral exigiu três etapas principais de otimização: (1) pré-tratamento do sensor (2) adesão celular ao cristal com o objetivo de formar uma camada reproduzível e estreita de células PC3 e (3) perfusão de lipossomos para investigar se sua interação potencial com a camada celular pode ser medida usando essa técnica. Durante esta abordagem experimental, foram avaliados dois tipos de lipossomos (lipossomos vazios - A e lipossomos vazios funcionalizados com transferrina-C).

Inicialmente, o cristal de quartzo revestidos com ouro foi testado quanto à deposição celular e fixação à superfície. A deposição de células ocorreu conforme demonstrado pelas alterações em f e D mostrada na Figura 35.

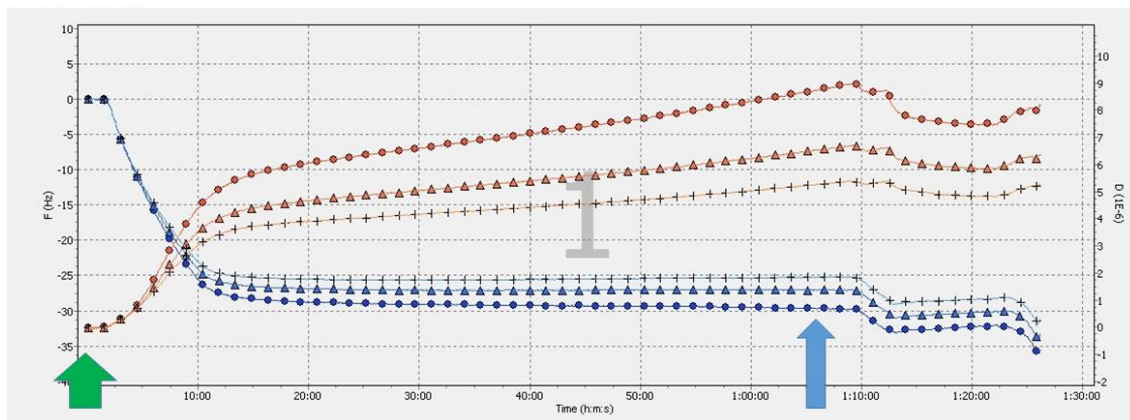


Figura 35. Representação dos resultados da QCM-D para a perfusão de PC3 em um sensor ouro. A perfusão de células (seta verde) induziu uma diminuição na frequência e um aumento nos valores de dissipação. As linhas vermelhas correspondem às diferentes conotações de dissipação e seus valores são mostrados no eixo direito. As linhas azuis correspondem às diferentes conotações de frequência e seus valores são mostrados no eixo esquerdo. Após uma hora de perfusão celular, PBS foi perfundido (linha azul) para remover células soltas.

No passo seguinte, os lipossomos foram perfundidos sobre a camada de células e as alterações em f e D foram monitorizadas ao longo do tempo. Vale ressaltar que as soluções de lipossomos precisaram ser concentradas, pois não foram observadas alterações em f e D (dados não mostrados). Por outro lado, a perfusão de lipossomos concentrados através da camada de células PC3 depositadas em um cristal revestido a ouro, levou à diminuição de f e aumento nos

valores de D , indicando que havia deposição de lipossomos na superfície do sensor revestida com PC3. Além disso, após a perfusão dos lipossomos foi bombeado PBS pelo sistema, notou-se que, embora os valores de f e D aumentem e diminuam ligeiramente respectivamente (indicando provavelmente a remoção de lipossomos não ligados), eles atingiram um platô agradável e estável (Figura 36).

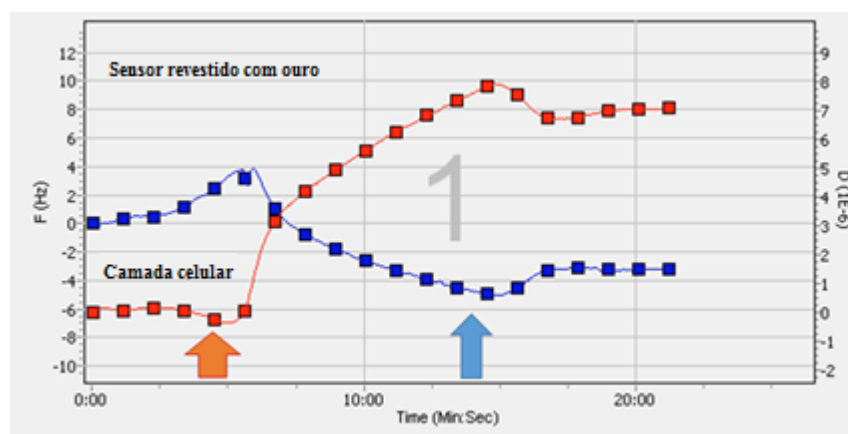


Figura 36: Representação dos resultados da QCM-D durante a perfusão de lipossomos (seta laranja) nas células PC3 depositadas em um sensor revestido a ouro. À medida que a deposição de lipossomos ocorreu, o valor de dissipação aumentou (linha vermelha-eixo direito) e os valores de frequência diminuíram (eixo azul-esquerdo). Após a perfusão de PBS, alcançou-se um platô estável, consistente com a persistência de lipossomos na camada de células e, portanto, a interação de lipossomos com PC3.

Vale ressaltar que quando os sensores de ouro foram levados para microscopia óptica após essas experiências. Embora a maioria dos sensores tenha sido coberta por células, como mostra a Figura 37, algumas partes do sensor foram expostas (espaços livres disponíveis entre as células).

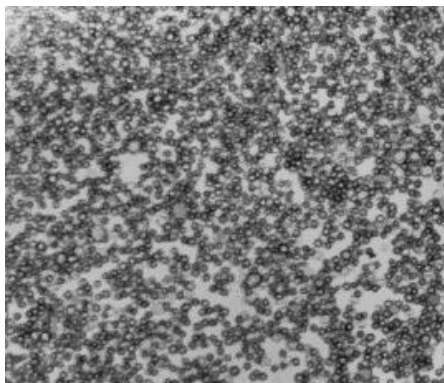


Figura 37: Micrografia representativa obtida por microscopia óptica (10X) da superfície de um sensor revestido a ouro após a perfusão de lipossomas através da camada de células PC3. Observou-se que nem toda a superfície do sensor é completamente coberta por células, pois pequenos espaços em cinza podem ser visualizados entre elas.

Makky e colaboradores (2012) descreveram em seu trabalho que o uso de poli-L-lisina (PLL) durante seus experimentos com QCM-D permitiu a formação de uma camada policatiônica apropriada no sensor para adsorção de células tumorais carregadas negativamente. Portanto, e para confirmar que as alterações em f e D observadas nos experimentos anteriores se deviam à interação dos lipossomas com as células e não à ligação dos lipossomas ao próprio sensor, decidiu-se revestir a superfície dos sensores com PLL com o objetivo de melhorar a adesão celular e evitar a presença de espaços livres entre as células.

Foram realizadas várias experiências com o objetivo de otimizar o método. De fato, foram testadas diferentes concentrações e tempos de incubação de PLL e duas concentrações diferentes de células perfundidas até que uma camada homogênea de células PC3 fosse obtida (Figura 38).

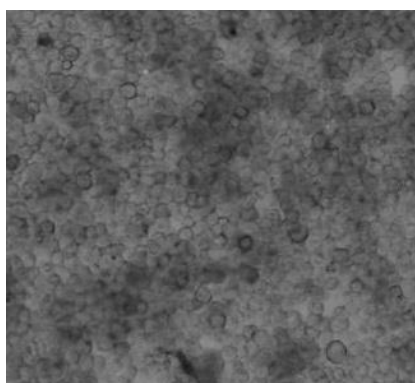


Figura 38: Micrografia representativa obtida por microscopia óptica (10X) da superfície de um sensor revestido com ouro tratado com PLL após a perfusão de células PC3. Observou-se que toda a superfície do sensor é completamente coberta por células cancerígenas.

Na etapa seguinte, os cristais revestidos com ouro foram incubados com e sem PLL e então foram perfundidas as células. Como mostrado na Figura 39, foi obtida uma deposição

mais alta de células quando foram utilizados cristais revestidos com ouro incubados com PLL (denotados por altos valores em D e baixos valores em f). No entanto, quando foram utilizados cristais revestidos com ouro sem PLL, as células se depositaram no sensor, mas os valores para D foram mais baixos e os valores para f mais altos do que após a deposição das células nos cristais revestidos com ouro, incubados com PLL. Além disso, lipossomas não funcionalizados, como esperado, não interagiram com as células depositadas nos cristais revestidos com ouro incubados com PLL, mas as perfundidas através dos cristais revestidos com ouro livre de PLL induziram mudanças em f e D, indicando interação lipossômica, provavelmente com os espaços entre as células que não estavam cobrindo completamente a superfície do sensor (Figura 31).

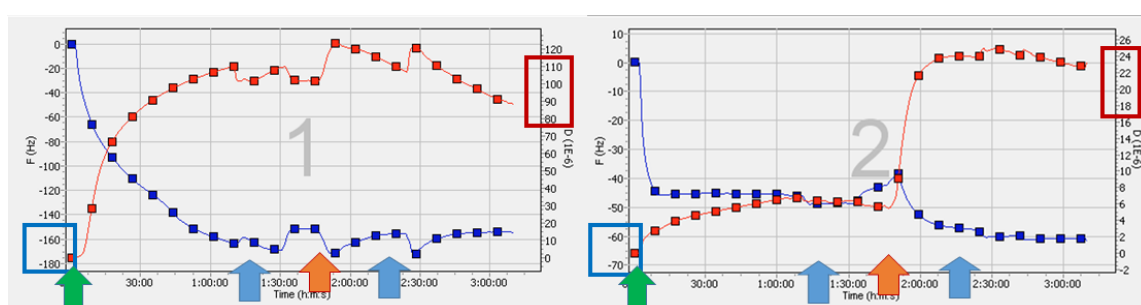


Figura 39: Representação dos resultados da QCM-D após a perfusão de lipossomas não funcionalizados (seta laranja) nas células PC3 introduzidas e perfundidas (seta verde) através de cristais revestidos a ouro incubados com PLL (à esquerda) e um cristal revestido a ouro sem PLL (direita). Os valores de dissipação (eixo vermelho linha-direita) foram maiores e os valores de frequência (eixo azul-esquerdo) muito mais baixos após a deposição de células em cristais revestidos com ouro e incubados com PLL. A perfusão de lipossomas induziu alterações em f e D somente quando cristal de revestimento de ouro sem PLL foi perfundido. As perfusões de PBS são indicadas por uma seta azul.

Uma série de experimentos usando lipossomas não funcionalizados e funcionalizados com transferrina foi então realizada para comparação. Ao definir as condições do sensor os lipossomas não funcionalizados foram perfundidos através do sistema e foram observadas alterações na dissipação como consequência de sua deposição na camada PC3. No entanto, assim como no experimento anterior, com a perfusão de PBS posteriormente, essas alterações foram revertidas, confirmando que uma forte interação com o PC3 não ocorreu porque foram 'lavadas' da superfície da camada celular (Figura 40A). Quando os lipossomas funcionalizados foram perfundidos, as alterações nos valores de frequência e dissipação persistiram após a perfusão com PBS. De fato, como mostrado na figura 40B, eles não retornam ao nível basal após a perfusão das células.

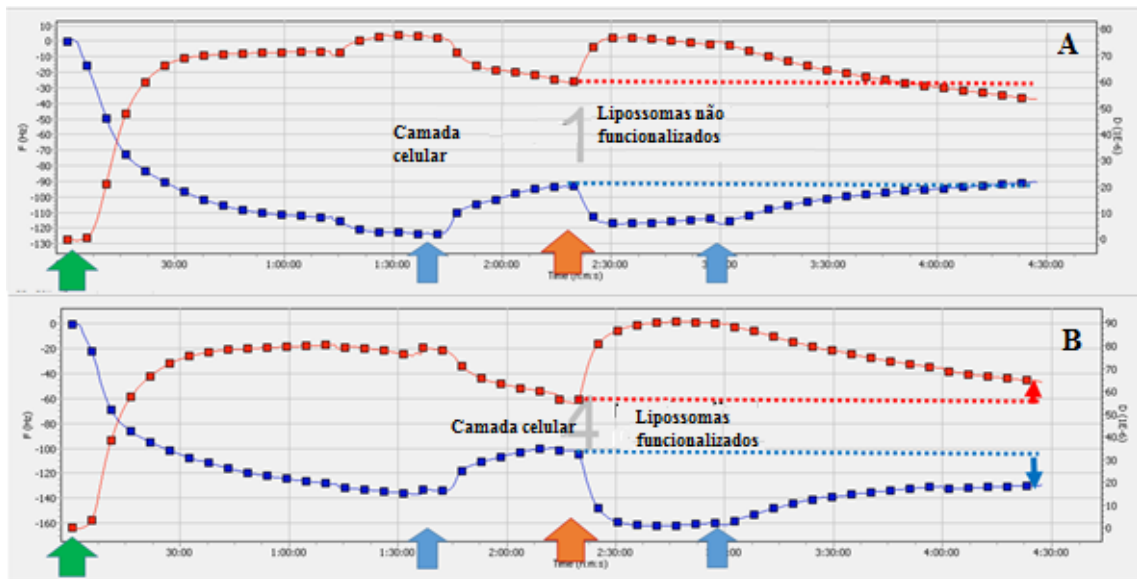


Figura 40: Representação dos resultados da QCM-D após a perfusão de lipossomas (seta laranja) e de células PC3 (seta verde). A perfusão de lipossomas não funcionalizados (A) levou a um aumento na dissipação e na diminuição da frequência quase revertida após a perfusão de PBS. A perfusão de lipossomas funcionalizados (b) levou a um aumento significativo nos valores de dissipação e a uma diminuição na frequência que foi mantida após a perfusão de PBS, demonstrando sua interação com o PC3. As perfusões de PBS são indicadas por setas azuis.

Ao final do experimento, imagens de microscopia óptica corroboraram a presença de células que cobrem todo o sensor; portanto, pode-se supor que as alterações na frequência e dissipação observadas com os lipossomas funcionalizados podem ser devido às interações lipossomos-células e não à interação potencial de os lipossomas com o próprio sensor (Figura 41).

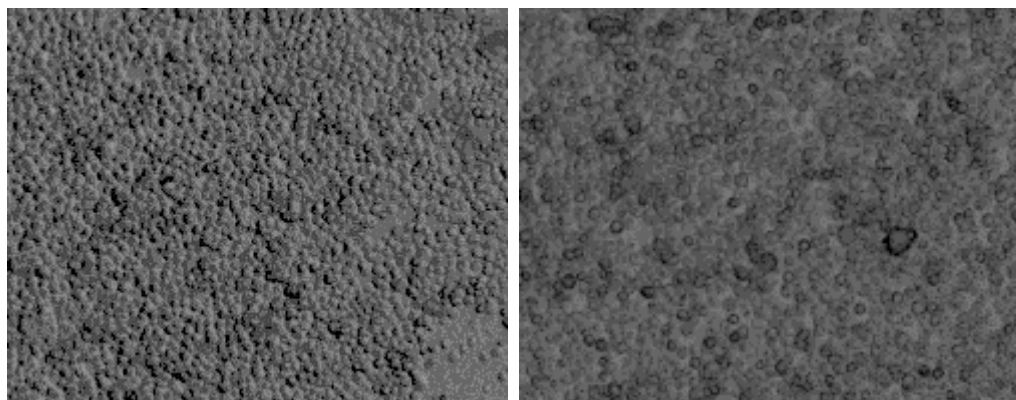


Figura 41: Micrografias representativas obtidas por microscopia óptica (10x) da superfície dos sensores após a perfusão de lipossomas funcionalizados em células PC3. Observou-se que toda a superfície do sensor estava completamente coberta por células cancerígenas.

6. Conclusões

Lipossomas carregados com docetaxel funcionalizados com transferrina foram obtidos com sucesso através da técnica clássica da hidratação filme lipídico. A eficiência de encapsulação do DTX foi de aproximadamente 69 e 37% para os lipossomas com e sem funcionalização, respectivamente, e a eficiência de funcionalização utilizando a transferrina foi de 31%.

Os resultados demonstraram que os sistemas obtidos apresentaram tamanho nanométrico. As análises de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e NTA demonstraram que a presença de docetaxel contribuiu para a redução do tamanho da vesícula e estabilidade do sistema. Foi possível comprovar a morfologia esférica da vesícula, corroborando com o tamanho obtido pela técnica de dispersão de luz dinâmica por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

O método de validação proposto para o DTX demonstrou ser linear, preciso, exato, robusto e adequado. Através deste método foi possível determinar o perfil de liberação *in vitro* do DTX.

Além disso, a técnica de funcionalização utilizada foi adequada e através dos ensaios de SDS-PAGE, dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência comprovou-se a integridade e estabilidade da transferrina após o processo de conjugação com os lipossomas.

Adicionalmente, os estudos em cultura celular demonstraram os lipossomas funcionalizados são menos tóxicos à célula normal do que os lipossomas não funcionalizados no tempo de 48 horas. Além disso, foi possível visualizar o *uptake* através das técnicas de microscopia confocal e citometria de fluxo. Pode-se comprovar a interação desses sistemas com os receptores superexpressos na superfície da célula tumoral através da QCM-D.

Diante disso, conclui-se que os sistemas aqui desenvolvidos apresentaram características promissoras para entrega do docetaxel, porém estudos adicionais em modelo celular tridimensional e *in vivo* são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, O. Efficacy and toxicity outcomes of elderly castrate-resistant prostate cancer patients treated with docetaxel—A pooled analysis of 3 randomized studies. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, 2019. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.09.004.
- ABOUELMAGD, S.A.; SUN, B.S.; CHANG, A.C.; KU, Y.J.; YEO, Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? **Mol Pharm.** v. 12(3), p. 997–1003, 2015. doi:10.1021/mp500817h.
- AHMAD, M. U.; ALI, S. M.; AHMAD, I. Applications of nanotechnology in pharmaceutical development. **Lipids in Nanotechnology**, p.171–190, 2012. doi:10.1016/b978-0-9818936-7-9.50010-x
- AHMED, S. E.; MOUSSA, H. G.; MARTINS, A. M.; AL-SAYAH, M. H.; HUSSEINI, G. A. Effect of pH, ultrasound frequency and power density on the release of calcein from stealth liposomes. **European Journal of Nanomedicine**, v.8, p. 1, 2016. doi:10.1515/ejnm-2015-0046
- ANDREWS, N. C. Iron homeostasis: Insights from genetics and animal models. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n.3, p., 208–217, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35042073>
- BAKER, E. N., & LINDLEY, P. F. New perspectives on the structure and function of transferrins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 47(1), 147–160, 1992 [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(92\)84061-Q](https://doi.org/10.1016/0162-0134(92)84061-Q)
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p.238-52, 1965.
- BARENHOLZ, Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**. v. 160, p. 117-134, 2012.
- BARNUM-HUCKINS, K.; ADRIAN, G. S. Iron regulation of transferrin synthesis in the human hepatoma cell line HepG2. **Cell Biology International**, v. 24, n. 2, p. 71–77, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/cbir.1999.0456>
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHAES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 167-179, 2007.
- BERTHOLD, D. R.; POND, G. R.; SOBAN, F.; WIT, R.; EISENBERGER, M.; TANNOCK, I. F. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 242–45, 2008.
- BITOUNIS, D.; FANCIULLINO, R.; ILIADIS, A.; CICCOLINI, J. Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. **ISRN Pharm.** v. 2012, Article ID: 738432, 11 p. <https://doi.org/10.5402/2012/738432>.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**. v.10, p. 975-999, 2015.

BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.387, n. 1-3, p.35–42, 2011. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.07.020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da União, 2017.

CADINOIU, A.N.; RATA, D. M.; ATANASE, L. I.; DARABA, O. M.; GHERGHEL, D.; VOCHITA, G.; POPA, M. Aptamer-Functionalized Liposomes as a Potential Treatment for Basal Cell Carcinoma. **Polymers**, v. 11, p. 1515. doi:10.3390/polym11091515, 2019.

ÇAĞDAŞ, M.; SEZER, A. D.; BUCAK, S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. In: SEZER, A. D. (Ed). **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. London: IntechOpen, 2014. *E-Book*. Charpt 1. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/58459>.

CARRIÓN-SALIP, D.; PANOSA, C.; MENENDEZ, J. A.; PUIG, T.; OLIVERAS, G.; PANDIELLA, A. et al. Androgen-independent prostate cancer cells circumvent EGFR inhibition by overexpression of alternative HER receptors and ligands. **International Journal of Oncology**, v.41, n. 3, p.1128–1138, 2012. doi:10.3892/ijo.2012.1509

CHEN, C.-W.; LU, D.-W.; YEH, M.-K.; SHIAU, C.-Y.; CHIANG, C.-H. Novel RGD-lipid conjugate-modified liposomes for enhancing siRNA delivery in human retinal pigment epithelial cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2567-2580, 2011. doi:10.2147/ijn.s24447 .

CHENG, Y.; ZAK, O.; AISEN, P.; HARRISON, S. C.; WALZ, T. Single particle reconstruction of the human apo-transferrin-transferrin receptor complex. **Journal of Structural Biology**, v. 152, n. 3, p. 204–210, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.10.006>

CHENG, Y.; ZAK, O.; AISEN, P.; HARRISON, S. C.; WALZ, T. Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. **Cell**, v. 116, n.4, p. 565–576, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00130-8).

CHIU, R.Y.T.; TSUJI, T.; WANG, S.J.; WANG, J.T.; LIU, C.T.; KAMEI, D.T. Improving the systemic drug delivery efficacy of nanoparticles using a transferrin variant for targeting. **Journal of Controlled Release**. v. 180, p.33-41, 2014.

CHOU, R.; DANA, T.; BOUGATSOS, C.; FU, R.; BLAZINA, I.; GLEITSMANN, K.; RUGGE, J.B. 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.

CUI, M.; WUA, W.; HOYGAARDB, L.; LUA, Y.; CHENC, D.; QI, J. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 489, p. 277–284, 2015.

DANIELS, T.R.; BERNABEU, E.; RODRIGUEZ, J.A.; PATEL, S.; KOZMAN, M.; CHIAPPET, D.A.; HOLLER, E.; LJUBIMOVA, J.Y.; HELGUERA, G.; PENICHET, M.L.

Transferrin receptors and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. v. 1820, p. 291-317, 2012.

DEGREGORIO-ROCASOLANO, N.; MARTÍ-SISTAC, O.; PONCE, J.; CASTELLÓ-RUIZ, M.; MILLÁN, M.; GUIRAO, V.; GASULL, T. Iron-loaded transferrin (Tf) is detrimental whereas iron-free Tf confers protection against brain ischemia by modifying blood Tf saturation and subsequent neuronal damage. **Redox Biology**, p. 143–158, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.026>.

DERYCKE, A.S.; WITTE, P.A.M. Transferrin-mediated targeting of hypericin embedded in sterically stabilized PEG-liposomes. **International Journal of Oncology**. v. 20, p. 181-187, 2002.

DERYCKE, A.S.L.; KAMUHABWA, A.; GIJSENS, A.; ROSKAMS, T.; DE VOS, D.; KASRAN, A.; HUWYLER, J.; MISSIAEN, L.; WITTE, P.A.M. Transferrin-Conjugated Liposome Targeting of Photosensitizer ALPcS to Rat Bladder Carcinoma Cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 21, p. 1620–1630, November 3, 2004.

DRUMMOND, D.C.; NOBLE, C.O.; HAYES, M.E.; PARK, J.W.; KIRPOTIN, D.B. Pharmacokinetics and In Vivo Drug Release Rates in Liposomal Nanocarrier Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 11, p. 4696-4740, November, 2008.

DUCA, G.; ANGHEL, L.; ERHAN, R.V. Structural aspects of lactoferrin and serum transferrin observed by FTIR spectroscopy. **Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry**. v. 13, n.1, p. 111-116, 2018.

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

ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; BRUEGGEMEIER, R.W.; MARCHETTI, J. M.; LEE, R. J. Rapamycin-loaded immunoliposomes functionalized with trastuzumab: a strategy to enhance cytotoxicity to HER2-positive breast cancer cells. **Anticancer Agents in Medical Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 48-56, 2016.

ELOY, J.O.; PETRILLI, R.; CHESCA, D.L.; SAGGIORO, F.P.; LEE, R.J.; MARCHETTI, J.M. Anti-HER2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.115, p.159-167, 2017.

ENGELS, F.K.; MATHOTB, R.A.A.; VERWEIJ, J.; Alternative drug formulations of docetaxel: a review. **Lippincott Williams & Wilkins**. v.18, p.95-103,2007.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 7th. ed. **Docetaxel trihydrate**. Strasbourg: Council of Europe: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, 2011. p. 1881-1883.

FELIPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n.5, p. 796–810, 2010. DOI: 10.1007/s11095-010-0073-2.

GALLETI, E.; MAGNANI, M.; RENZULLI, M.L.; BOTTA, M. Paclitaxel and docetaxel resistance: molecular mechanisms and development of new generation taxanes. **ChemMedChem**. v. 2, p. 920 – 942, 2007.

GANDHI, R.; KHATRI, N.; BARADIA, D.; VHORA, I.; MISRA, A. Surface-modified Epirubicin-HCl liposomes and its invitro assessment in breast cancer cell-line: MCF-7. **Drug Delivery**, v. 23:4, p. 1152-1162, 2016. DOI: 10.3109/10717544.2014.999960.

GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A. K.; Colloidal Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 32, n. 2, p. 89–147, 2015.

GASPAR, M. M.; RADOMSKA, A.; GOBBO, O. L.; BAKOWSKY, U.; RADOMSKI, M. W.; & EHRHARDT, C. Targeted Delivery of Transferrin-Conjugated Liposomes to an Orthotopic Model of Lung Cancer in Nude Rats. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 25, n. 6, p. 310–318, 2012. doi:10.1089/jamp.2011.0928.

GIBIS, M.; RAHN, N.; WEIS, J. Physical and Oxidative Stability of Uncoated and Chitosan-Coated Liposomes Containing Grape Seed Extract. **Pharmaceutics**. v.5, p.421-433, 2013.

GOMME, P. T.; MCCANN, K. B. Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 4, p. 267–273, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03333-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03333-1).

GUO, J.; O'DRISCOLL, C.M.; HOLMES, J.D.; RAHME, K. Bioconjugated gold nanoparticles enhance cellular uptake: A proof of concept study for siRNA delivery in prostate cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**. v.509, p. 16–27, 2016.

HANSON, R.; HEANEY, J. A Primer on Automating the Vertical Diffusion Cell (VDC). Hanson Research Corp., Chatsworth, CA, USA, 2013. Disponível em: <http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201305Articles/DT201305_A05.pdf>. Acesso em janeiro de 2019.

HATAKEYAMA, H.; AKITA, H.; MARUYAMA, K.; SUHARA, T.; HARASHIMA, H. Factors governing the in vivo tissue uptake of transferrin-coupled polyethylene glycol liposomes in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**. v.281, p. 25–33, 2004.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

HOSNY, K.M. Optimization of gatifloxacin liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation. **Journal of liposome research**, v. 20, n. 1, p. 31 -37, 2010.

ICH. International Conference on Harmonization. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. Geneva, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), France. World Health Organization (WHO). GLOBOCAN 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Lyon: IARC, 2018.

JHAVERI, A.; DESHPANDE, P.; PATTNI, B.; & TORCHILIN, V. Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma. **Journal of Controlled Release**, v.277, p.89–101, 2018. doi:10.1016/j.jconrel.2018.03.006

JING, L.; XULING, WANG, T. Z.; CHUNLING, W.; ZHENJUN, H.; XIANG, L. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 10, p. 81-98, 2015.

JOHNSON, I. R. D.; PARKINSON-LAWRENCE, E. J.; SHANDALA, T.; WEIGERT, R.; BUTLER, L. M.; BROOKS, D. A.. Altered Endosome Biogenesis in Prostate Cancer Has Biomarker Potential. **Molecular Cancer Research**. v. 12, n. 12, p. 1851-1862, 2014. DOI:10.1158/1541-7786.mcr-14-0074.

JUNG, C. Insight into protein structure and protein–ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Recognition**.v.13, p. 325–351, 2000.

KEER, H. N.; KOZLOWSKI, J. M.; TSAI, Y. C.; LEE, C.; MCEWAN, R. N.; GRAYHACK, J. T. Elevated transferrin receptor content in human prostate cancer cell lines assessed in vitro and in vivo. **Journal of Urology**, v. 143, n. 2, p. 381–385, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)39970-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)39970-6).

KEER, H.N.; KOZLOWSKI, J.M.; TSAI, Y.C.; LEE, C.;MCEWAN, R.N.; GRAYHACK, J.T. Elevated Transferrin Receptor Content in Human Prostate Cancer Cell Lines Assessed in Vitro and in Vivo. **The Journal of Urology**. v.144, p. 381-385, 1990.

KOBAYASHI, D.; KAWAI, N.; SATO, S.; NAIKI, T.; YAMADA, K.; YASUI, T. et al. Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. **The Prostate**, v. 73, n. 9, p. 913–922, 2013. doi:10.1002/pros.22637

KOOPAEI, M.N.; DINARVAND, R.; AMINI, M.; RABBANI, H.; EMANI, S.; OSTAD, S.N.; ATYABI, F. Docetaxel immunonanocarriers as targeted delivery systems for her2-positive tumor cells: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1903–1912, 2011.

KOWALCZYK, A.; BRYNDA-MATYSIAK, E.; BYSTRZEJEWSKI, M.; SUTHERLAND, D.S.; STOJEK, Z.; NOWICKA, A.M. Conformational control of human transferrin covalently anchored to carbon-coated iron nanoparticles in presence of a magnetic field. **Acta Biomaterialia**, v. 45, p. 367-374, 2016.

KRIZHANOVSKY, V.; XUE, W.; ZENDER, L.; YON, M.; HERNANDO, E.; LOWE, S.W. Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. **Methods in Molecular Medicine**, v. 81, p. 21-39, 2008.

LAKOWICS, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd. ed. Baltimore, MD: Springer-Verlag, 2006. Cap. 16, p. 529-575.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR, S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147–168, 2012. doi:10.1166/jcsb.2012.1020

LAPENDA, T.L.; MORAIS, W.A.; ALMEIDA, F.J.; FERRAZ, M.S.; LIRA, M.C.; SANTOS, N.P.; MACIEL, M.A.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Encapsulation of Trans-Dehydrocrotonin in Liposomes: An Enhancement of the Antitumor Activity. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 3, p. 499-510, 2013.

LI, H.; QIAN, Z. M. Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. **Medicinal Research Reviews**, v.22, n. 3, p.225–250, 2002. <https://doi.org/10.1002/med.10008>.

LI, J.; WANG, X.; ZHANG, T.; WANG, C.; HUANG, Z.; LUO, X.; DENG, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 10, p. 81-98, 2015.

LI, X.; DING, L.; XU, Y.; WANG, Y.; PING, Q. Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, p. 116–123, 2009.

LIANG, Z.; YANG, N.; JIANG, Y.; HOU, C.; ZHENG, J.; SHI, J.; ZHANG, R.; LI, D.; LIU, Y.; ZUO, P. Targeting docetaxel-PLA nanoparticles simultaneously inhibit tumor growth and liver metastases of small cell lung cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, p. 337-345, 2015.

LIM, S. M.; PANG, Z. W.; TAN, H. Y.; SHAIKH, M.; ADINARAYANA, G.; & GARG, S. Enhancement of docetaxel solubility using binary and ternary solid dispersion systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 11, p. 1847-1855, 2015. doi:10.3109/03639045.2015.1014818.

LIU, J.; KOPECKOVA, P.; PAN, H.; SIMA, M.; BUHLER, P.; WOLF, P.; ELSA BEILE, U.; KOPECEK, J. Prostate-Cancer-Targeted N-(2 Hydroxypropyl) methacrylamide Copolymer/Docetaxel Conjugates. **Macromolecular Bioscience**. v. 12, p. 412-422, 2012.

LIU, S.; LI, Y.; WANG, X.; MA, J.; ZHANG, L.; XI, G. Preparation, Characterization, and Antitumor Activities of Miriplatin-Loaded Liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 1, p. 78-87, 2015.

LIU, W.; YIN, B.; WANG, X.; YU, P.; DUAN, X.; LIU, C.; WANG, B.; TAO, Z. Circulating tumor cells in prostate cancer: Precision diagnosis and therapy (Review). **Oncology Letters**. v. 14, p. 1223-1232, 2017.

LOCKE, J.A.; GUNS, E.S.; LUBIK, A.A.; ADOMAT, H.H.; HENDY, S.C.; WOOD, C.A.; ETTINGER, S.L.; GLEAVE, M.E.; NELSON, C.C. Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. **Cancer Res**. v.68, p. 6407-6415, 2008.

LOKERSE, W.J.; KNEEPKENS, E.C.M.; HAGEN, T.K.T.; EGGERMONT, A.M.M.; GRULL, H.; KONING, G.A. In depth study on thermosensitive liposomes: Optimizing

formulations for tumor specific therapy and in vitro to in vivo relations. **Biomaterials**, v. 82, p. 138-150, 2016.

MAITLAND N.J. Stem Cells in the Normal and Malignant Prostate. In: TINDALL D. J. (eds) **Prostate Cancer**. Biochemistry, Molecular Biology and Genetics: Protein Reviews, New York, NY: Springer, 2013. v. 16, p. 3-41.

MAKKY, A.; DAGHILDJIAN, K.; MICHEL, J.P.; MAILLARD, P.; ROSILIO, V. Assessment of the relevance of supported planar bilayers for modeling specific interactions between glycodendrimeric porphyrins and retinoblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1818, p. 2831-2838, 2012.

MANJAPPA, A.S.; GOEL, P.N.; VEKATARAJU, M.P.; RAJESH, K.S.; MAKWANA, K.; UKAWALA, M.; NIKAM, Y.; GUDE, R.P.; MURTHY, R.S.R. Is an Alternative Drug Delivery System Needed for Docetaxel? The Role of Controlling Epimerization in Formulations and Beyond. **Pharmaceutical Research**. v.10, p:2675-93, 2013.

MARANGONI, V.S. **Estudo e desenvolvimento de nanocompósitos contendo nanopartículas de ouro conjugadas com biomoléculas: síntese e aplicações em nanomedicina**. Dissertação (Mestrado) Instituto de Física – Universidade de São Paulo, 2012.

MARQUES-GALLEGO, P.; DE KROON, A. I. P.M. Ligation strategies for targeting liposomal nanocarriers. **Biomedical Research International**. v. 2014, Article ID 129458, 12 p. doi: 10.1155/2014/129458.

MIRCIOIU, C.; VOICU, V.; ANUTA, V.; TUDOSE, A.; CELIA, C.; PAOLINO, D.; FRESTA, M.; SANDULOVICI, R.; MIRCIOIU, I. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v.11, p. 140, 2019. doi:10.3390/pharmaceutics11030140.

MORAES, C.M.; PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Physicochemical stability of poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing the local anesthetic bupivacaine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 995–1000, 2010.

MORI, K.; GOFF, B.L.; CHARRIER, C.; BATTAGLIA, S.; HEYMANN, D.; REDINI, F. DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFκB: New insights in the prostate cancer bone metastasis process. **Bone**. v.40, p. 981–990,2007.

MORTENSEN, J. H.; JEPPESEN, M.; PILGAARD, L.; AGGER, R.; DUROUX, M.; ZACHAR, V.; MOOS, T. Targeted antiepidermal growth factor receptor (cetuximab) immunoliposomes enhance cellular uptake in vitro and exhibit increased accumulation in an intracranial model of glioblastoma multiforme. **Journal Drug Delivery**. v. 2013, Article ID 209205, 13 p. DOI: [http://dx. doi.org/10.1155/2013/209205](http://dx.doi.org/10.1155/2013/209205).

MURAKAMI, L.M.Z.; RULLER, R. **Uso da técnica de Dicroísmo Circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas**. Campinas, SP: CNPEM, 2016. (Memorando Técnico).

PANDEY, H.; RANI, R.; AGARWAL, V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 59, e16150477, January-December, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150477>

PANWAR, P.; PANDEY, LAKHERA, P.C.; SINGH, K.P. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosized liposomes. **International Journal of Nanomedicine**. v.5, p. 101–108, 2010.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibul function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p.44–50, 2006, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.044.

PATIL, Y.P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 177, p. 8– 18, 2014.

PAUL, R.; BREUL, J. Antiandrogen withdrawal syndrome associated with prostate cancer therapies: Incidence and clinical significance. **Drug Safety**. v. 23, p. 381–390, 2000.

PEREIRA, S.; EGBU, R.; JANNATI, G.; AL-JAMAL, W.T. Docetaxel-loaded liposomes: The effect of lipid composition and purification on drug encapsulation and in vitro toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 514, p. 150-159, 2016.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; SAGGIORO, F. P.; CHESCA, D. L.; DE SOUZA, M. C.; DIAS, M. V. S. et al. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. **Journal of Controlled Release**, v. 283, p. 151–162, 2018. doi:10.1016/j.jconrel.2018.05.038.

PUBCHEM. Docetaxel. National Center for Biotechnology Information. CID=148124, Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Docetaxel>>. Acesso em 21 de outubro de 2019.

QIN, L.; WANG, C.Z.; FAN, H.J.; ZHANG, C.J.; ZHANG, H.W.; LV, M.H.; CUI, S. A dual-targeting liposome conjugated with transferrin and arginine-glycine-aspartic acid peptide for glioma-targeting therapy. **Oncology Letters**. v. 8, p. 2000-2006, 2014.

RAMÍREZ-BALDERRAMA, L.; LÓPEZ-BRIONES, S.; DAZA-BENÍTEZ, L.; MACÍAS, M. H.; LÓPEZ-GAYTÁN, T.; PÉREZ-VÁZQUEZ, V. Diferenciación neuroendocrina en adenocarcinoma de próstata. **Gaceta Médica de México**. v.149, p. 639-45, 2013.

RIBEIRO, L. N. DE M.; COUTO, V. M.; FRACETO, L. F.; & DE PAULA, E. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, Article 982, 2018. doi:10.1038/s41598-017-18573-7.

ROLIM, N.; LOPES, F.; RODRIGUES, T.; SANTOS, J.C.; MOTA, R.; COVITA, A.; SOARES, M.J.; MONTEIRO, P.; CANHOTO, A.; NOGUEIRA, R.; MONTEIRO, H.; Complicações da terapêutica de privação androgênica no cancro da próstata / uma revisão. **Acta Urológica Portuguesa**. v.31, p.82-87, 2014.

RUSSEL, P.J.; KINGSLEY, E.A. Human Prostate Cancer Cell Lines. **Methods in Molecular Medicine**, v. 81, p. 21-39, 2003.

SALAMANCA, C.H.; BARRERA-OCAMPO, A.; LASSO, J.C.; CAMACHO, N.; YARCE, C.J. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterization of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. **Pharmaceutics**. v.10, n. 3, ID 148, 10 p. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030148>.

SANTOS-MARTINEZ, M.J.; INKIELEWICZ –STEPNIAK, I.; MEDINA, C.; RAHME, K.; D'ARCY, D.M.; FOX, D.; HOLMES, J.D; ZHANG, M. W.R. The use of quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) for studying nanoparticle-induced platelet aggregation. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7, p. 243–255, 2012.

SENZER, N. N.; MATSUNO, K.; YAMAGATA, N.; FUJISAWA, T.; WASSERMAN, E.; SUTHERLAND, W.; SHARMA, S.; PHAN, A. MBP-426, a novel liposome-encapsulated oxaliplatin, in combination with 5-FU/leucovorin (LV) – Phase I results of a Phase I/II study in gastro-esophageal adenocarcinoma, with pharmacokinetics. **Molecular Cancer Therapeutics** v. 8, n. 12, Suppl.1, C36, 2009.

SHEN, Y.; LI, X.; DONG, D.; ZHANG, B.; XUE, Y.; SHANG, P. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. **American Journal Cancer Research**, v. 8, n. 6, p. 916-931, 2018.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A.J. Cancer Statistics, 2015. **Cancer Journal Clinicians**, v.65, p. 5 – 29, 2015.

SILVA, G. H.; FERNANDES, M. A.; TREVIZAN, L. N. F. ; 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, p. 517-527, 2018. DOI: 10.1080/10408347.2018.1456315.

ŚLIWIŃSKA-HILL, U. Interaction of imatinib mesylate with human serum transferrin: The comparative spectroscopic studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 173, p. 468 –475, 2017.

SRIRAMAN, S.K.; SALZANO, G.; SARISOZEN, C.; TORCHILIN, V. Anti-Cancer Activity of Doxorubicin-Loaded Liposomes CoModified with Transferrin and Folic Acid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.105, p. 40-49, 2016.

SONI, V.; KOHLI, D. V.; JAIN, S. K. Transferrin-conjugated liposomal system for improved delivery of 5-fluorouracil to brain. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 1, p. 73–78, 2008.

TAN, Q.; LIU, X.; FU, X.; LI, Q.; DOU, J.; ZHAI, G. Current development in nanoformulations of docetaxel. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 9, p. 975-990, 2012.

TANNOCK, I. F.; WIT, R.; BERRY, W. R.; HORTI, J.; PLUZANSKA, A.; CHI, K. N.; OUDARD, S.; THÉODORE, C.; JAMES, N. D.; TURESSON, I.; ROSENTHAL, M. A.; EISENBERGER, M. A. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 351, p. 1502–1512, 2004.

TAYMOURI, S.; VARSHOSAZ, J.; JAVANMARD, S.H.; HASSANZADEH, F. Development of a Rapid and Precise Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography Method for Analysis of Docetaxel in Rat Plasma: Application in Single-dose Pharmacokinetic Studies of Folate-targeted Micelles Containing Docetaxel. **Advanced Biomedical Research**, v. 7, p. 1-5, 2018. DOI: https://dx.doi.org/10.4103%2Fabr.abr_251_16.

THEVIS, M.; LOO, R.R.O.; LOO, J.A. Mass Spectrometric Characterization of Transferrins and Their Fragments Derived by Reduction of Disulfide Bonds. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v. 14, p.635–647, 2003.

TORTORELLA, S.; KARAGIANNIS, T. C. Transferrin receptor-mediated endocytosis: A useful target for cancer therapy. **Journal of Membrane Biology**, v.247, n. 4, p.291–307, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9637-0>.

ULBRICH, K.; HEKMATARA, T.; HERBERT, E.; KREUTER, J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 251–256, 2009.

VARSHOSAZ, J.; DAVOUDI, M.A.; RASOUL-AMINI, R. Docetaxel loaded nanostructured lipid carriers functionalized with Trastuzumab (Herceptin) for HER2-positive breast cancer cells. **Journal of Liposome Research**, v.28, n. 4, p. 285-295, 2018. DOI: 10.1080/08982104.2017.1370471.

VINCENT, J. B.; LOVE, S. The binding and transport of alternative metals by transferrin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 362–378, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.003>.

WALLACE, S.J.; LI, J.; NATION, R.L.; BOYD, B.J. Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology. **Drug Delivery Translational Research**. v. 2, n. 4, p. 284–292, 2012. doi:10.1007/s13346-012-0064-4.

WALLY, J.; HALBROOKS, P. J.; VONRHEIN, C.; ROULD, M. A.; STEPHEN, J.; MASON, A. B.; BUCHANAN, S. K. The Crystal Structure of Iron-free Human Serum Transferrin Provides Insight into Inter-lobe Communication and Receptor Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24934–24944, 2007. <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.M604592200>.

WANG, Q.; ALSHAKER, H.; BOHLER, T.; SRIVATS,S.; CHAO, Y.; COOPER, C.; PCHEJETSKI, D. Core shell lipid-polymer hybrid nanoparticles with combined docetaxel and molecular targeted therapy for the treatment of metastatic prostate cancer. **Nature**. v.7 p.1-8, 2017.

WEBER, C.; VOIGT, M.; SIMON, J.; DANNER, A.K.; FREY, H.; MAILANDER, V.; HELM, M.; MORSBACH, S.; LANDFESTER, K. Functionalization of Liposomes with Hydrophilic Polymers Results in Macrophage Uptake Independent of the Protein Corona. **Biomacromolecules**. v.20, p. 2989–2999, 2019. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00539.

YANG, T.; CHOI, M.; CUI, F.; SUN, J. Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome. **Journal of Controlled Release**, v. 120, p. 169–177, 2007. doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.01.

YANG, X.; YANG, S.; CHAI, H.; YANG, Z.; LEE, R. J.; LIAO, W.; TENG, L. A novel isoquinoline derivative anticancer agent and its targeted delivery to tumor cells using transferrin-conjugated liposomes. **PLoS ONE**, v. 10, 8, p. 1–12, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136649>.

YEFIMOVA, S.K.; KURILCHENKO, I. Y.; TKACHEVA, T. N.; ROZHKOV, V. A.; SOROKIN, A. V.; LUKIANOVA, N. Y.; BEZDENEZHNYKH, N. A.; MALYUKIN, Y. V.;

CHEKHUN, V. F. Comparative study of dye-loaded liposome accumulation in sensitive and resistant human breast cancer cells. **Expental Oncology**, v.34, n. 2, p. 101-106, 2012.

YOUSEFI, A.; ESMAEILI, F.; RAHIMIAN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Preparation and In Vitro Evaluation of a Pegylated Nano-Liposomal Formulation Containing Docetaxel. **Scientia Pharmaceutica**. v.77, p.453–464, 2009.

YUAN, M.; ZHU, F.; LOU, J.; YUAN, W.; FU, L.; LIU, S. et al. The Anti-tumoral Efficacy of a Docetaxel-loaded Liposomal Drug Delivery System Modified with Transferrin for Ovarian Cancer. **Drug Research**, v. 64, n. 4, p.195–202, 2013. doi:10.1055/s-0033-1355335.

ZHAI, G.; WU, J.; YU, B.; GUO, C.; YANG, X.; LEE, R.J. A Transferrin Receptor-Targeted Liposomal Formulation for Docetaxel. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 10, p. 5129–5136, 2010.

ZHENG-HONG W.; QI-NENG P.; YI W.; JIA-MING L. Hypoglycemic efficacy of chitosan coated insulin liposomes after oral administration in mice. **Acta Pharmacologica Sinica.**, v.25, n.7, p. 966-972, 2004.

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.