UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

JULIANA PALMA ABRIATA

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de policaprolactona contendo paclitaxel funcionalizadas com folato para a otimização da terapia do câncer de ovário

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de policaprolactona contendo paclitaxel funcionalizadas com folato para a otimização da terapia do câncer de ovário

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e cosméticos

Orientada: Juliana Palma Abriata

Orientadora: Profa. Drª. Juliana Maldonado Marchetti

Coorientadora: Profa. Drª. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 26/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Abriata, Juliana Palma
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de policaprolactona contendo paclitaxel funcionalizadas com folato para a otimização da terapia do câncer de ovário. Ribeirão Preto, 2018.

94 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Folato. 2. Nanopartículas poliméricas. 3. Nanotecnologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Juliana Palma Abriata

Título do trabalho: Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de policaprolactona contendo paclitaxel funcionalizadas com folato para a otimização da terapia do câncer de ovário

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e cosméticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho a minha filha Maria Clara, meus pais Nilza e Pedro, minha avó Cacilda e meu irmão Orlando. Sem essa estrutura familiar seria impossível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Professora Drª Juliana Maldonado Marchetti pela orientação, dedicação, confiança, amizade e contribuição científica ao longo deste trabalho. Por todos os nossos cafezinhos e conversas que compartilhamos ao longo desses anos.

Ao meu orientador do exterior, Prof. Dr. Robert Lee, pela receptividade em seu laboratório e atenção na discussão das minhas dúvidas e pela oportunidade de estar em seu laboratório.

À Professora Drª Priscyla Daniely Marcato Gaspari, pela coorientação e contribuição científica.

Aos especialistas Drª Fabíola Praça e José Orestes Del Campo e ao técnico Henrique Diniz do laboratório de tecnologia farmacêutica, pelas contribuições na condução dos experimentos.

À Fabiana Rossetto de Morais, pelo auxílio nas análises de citometria de fluxo.

Ao Eduardo Tozatto, pelo auxílio nas análises de microscopia confocal.

Ao Professor Dr. Vladimir Torchilin, por disponibilizar a linhagem celular SKOV-3.

À Professora Drª Kamilla Swiech por disponibilizar a linhagem celular OVCAR-3 e o seu laboratório de cultivo celular. Ao seu grupo de pesquisa, em especial aos amigos Larissa e Robson, pelo auxílio na condução dos ensaios de cultivo celular.

Ao Professor Dr. Flávio da Silva Emery e ao seu grupo de pesquisa, em especial aos alunos Fernando, Shaiani, Lucas e Miguel, pelo auxílio na condução dos ensaios de síntese do PCL-BODIPY e P407-AF.

Aos amigos do laboratório: Marcela, Giovanni, Larissa, Robson, Renata, Lívia, Josimar, Isabella, Margarete, Marcelo, Juliana Rosa e Ângelo, pelos longos dias de trabalho, tardes de gargalhadas, discussões e cafezinhos.

À minha amiga querida Patrícia Mazureki Campos, pela amizade todos esses anos de pós-graduação, pelo carinho e amizade que construímos, pelo incentivo, pela paciência e companheirismo e por estar sempre disposta a me ajudar.

À minha amiga Marcela Tavares Luiz, por toda amizade e carinho, incentivo, companheirismo, por todos os momentos que esteve ao meu lado e pelas longas discussões enriquecendo, assim, nossos trabalhos. Enfim por todos os momentos em que choramos e sorrimos juntas.

Ao Roger Casanova Turatti, pela amizade e carinho durante esses anos, principalmente pelo auxílio nas etapas iniciais do meu doutorado.

Ao meu amigo Giovanni Raspantini, pela amizade e carinho durantes esses anos, pelas longas discussões que nos enriqueceram a cada dia e contribuição científica.
À minha amiga Larissa Tofani pela amizade, pelas gargalhadas sem fim, incentivo, contribuição científica e auxílio nos ensaios de cultivo celular.
Ao meu amigo Robson pela amizade, incentivo, contribuição científica e auxílio nos ensaios de cultivo celular.
A todos os meus amigos que colaboraram com a escrita desta tese, me enviando mensagens de conforto, me auxiliando em todos os momentos difíceis.
A todo corpo docente que participou na realização desse trabalho.
À sessão de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial aos funcionários Rosana Florêncio, Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e a Professora Drª Renata Fonseca Vianna Lopez.
Às Agências de Fomento CAPES e FAPESP (2013/22747-0 e 2016/06369-4) pelas bolsas concedidas.

Agradecimentos especiais

À minha pequena Maria Clara, que desde que veio a este mundo só me trouxe ensinamentos e só me deu forças para encarar todas as dificuldades da vida. Obrigada por ter vindo a este mundo. Sem você não estaria aqui.
À minha família, por me dar estrutura para a realização deste sonho. Meus pais Pedro e Nilza, por estarem sempre ao meu lado, sempre me incentivando a realizar este sonho. Obrigada pela dedicação, carinho, amor, paciência, pelo suporte financeiro, emocional e psicológico.
À minha querida avó Cacilda, pelo amor, incentivo, dedicação, carinho, por estar sempre torcendo por mim. Obrigada por vibrar a cada página escrita desta tese.
Ao meu irmão querido, pelo carinho, amizade, companhia, principalmente pelo incentivo.
A todos os meus familiares que sempre torceram por mim.

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Temos que ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos”. (Marie Curie)

RESUMO

Abriata, Juliana Palma. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de policaprolactona contendo paclitaxel funcionalizadas com folato para a otimização da terapia do câncer de ovário**. 2018. 94f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O adenocarcinoma ocorre em 90% dos casos de tumores malignos dos ovários e apresenta-se bilateralmente em 30 a 50% das pacientes. Devido à falta de sintomas iniciais da doença e à baixa especificidade dos marcadores tumorais existentes, quando detectado, o câncer encontra-se em estadios III e IV da doença, os quais indicam disseminação na cavidade peritoneal. O paclitaxel (PCX) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento do câncer de ovário, entretanto a sua baixa solubilidade aquosa reduz sua biodisponibilidade. Dessa forma, no medicamento comercial, Taxol®, o PCX está solubilizado em uma mistura de tensoativos tóxicos. O desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos tem sido investigado para promover a redução dos efeitos tóxicos e aumentar a segurança e a eficiência terapêutica com PCX. A funcionalização dos nanocarreadores é uma das estratégias utilizadas para aumentar a seletividade às células tumorais que superexpressam receptores de folato. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo paclitaxel, funcionalizadas e não funcionalizadas com ácido fólico, visando a otimização do tratamento do câncer de ovário. Os sistemas foram obtidos com sucesso, utilizando técnica de nanoprecipitação. Os resultados obtidos mostraram que as formulações NPPCX e NPPCX-AF apresentaram distribuição de tamanhos de partículas de 140 e 154,6 nm, respectivamente, e índices de polidispersão menores que 0,1, com alta eficiência de encapsulação do PCX. Os resultados obtidos foram adequados para a via de administração endovenosa e promoção do direcionamento ativo no ambiente tumoral. Os resultados *in vitro* em testes de citotoxicidade em linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3 demonstraram que as nanopartículas contendo PCX (NPPCX e NPPCX-AF) foram capazes de disponibilizar o PCX e reduzir a viabilidade celular. Os ensaios de citometria de fluxo e de microscopia confocal demonstraram a capacidade de ambas as nanopartículas apresentaram um *uptake* celular tempo dependente, mostrando a capacidade dos nanocarreadores serem internalizados. Além disso, comparando as duas linhagens celulares, a SKOV-3 apresentou maior *uptake* por apresentar maior número de receptores de folato. Dessa forma, as análises *in vitro* sugerem que os nanocarreadores, NPPCX e NPPCX-AF, apresentam potencial para a otimização da terapia do câncer de ovário. No entanto, estudos *in vivo* são necessários para a obtenção de resultados adicionais relativos à eficiência e à segurança para o tratamento de câncer de ovário.

Palavras-chave: folato, nanopartículas poliméricas, nanotecnologia

ABSTRACT

Abriata, Juliana Palma. **Development and characterization of polycaprolactone nanoparticles containing paclitaxel targeted with folate for ovarian cancer therapy optimization**. 2018. 94f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Adenocarcinoma occurs in 90% of cases of malignant ovarian cancer and is present bilaterally in 30 to 50% of patients. Due to lack of initial symptoms and the low specificity of the existing tumor markers, the cancer is detected when it's in stages III and IV, which indicate spread into the peritoneal cavity. Paclitaxel (PCX) is the drug of first choice for ovarian cancer treatment, but it has low aqueous solubility, which reduces its bioavailability. Thus, in the commercial drug, Taxol®, PCX is solubilized in a mixture of toxic surfactants. The development of drug nanocarriers has been investigated to promote the reduction of toxic effects and increase the safety and therapeutic efficacy of PCX. Functionalization of nanocarriers is one of the strategies used to increase selectivity to tumor cells that overexpress folate receptors. The aim of the present work was the development and characterization of folate-modified nanoparticles (NPPCX-AF) and unmodified nanoparticles (NPPCX) and evaluation of in vitro efficacy of developed systems using adenocarcinoma cell lines. The systems were successfully obtained using nanoprecipitation technique. The results showed that the NPPCX and NPPCX-AF formulations had a particle size distribution of 140 and 154.6 nm, respectively, and polydispersity indexes smaller than 0.1, with high PCX encapsulation efficiency. The results obtained were suitable for the intravenous administration route and promotion of active targeting in the tumor microenvironment. The in vitro cellular cytotoxicity assays of SKOV-3 and OVCAR-3 cell lines demonstrated that NPPCX and NPPCX-AF were able to release PCX and reduce cell viability. The flow cytometry assays demonstrated that both nanoparticles presented a time dependent cellular uptake, showing the ability of nanocarriers to be uptake. In addition, comparing both cell lines, SKOV-3 showed a higher uptake due to its greater amount of folate receptors. Thus, in vitro results suggested that the nanocarriers, NPPCX and NPPCX-AF, present a distinguish potential for ovarian cancer therapy optimization. In vivo studies are needed to confirm the in vitro results and provide additional data regarding safety and efficacy of ovarian cancer treatment.

Keywords: folate, polymeric nanoparticles, nanotechnology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estadios do câncer de ovário. 2
Figura 2- Estrutura química do paclitaxel. 4
Figura 3- Representação da ação do paclitaxel nos microtúbulos. 4
Figura 4- Estrutura química da policaprolactona. 7
Figura 5- Esquema da estrutura de nanoesfera e nanocápsula. 7
Figura 6- Representação esquemática da endocitose das nanopartículas poliméricas contendo PCX funcionalizadas com folato. 8
Figura 7- Estrutura química do ácido fólico. 9
Figura 8- Representação esquemática do preparo das nanopartículas de PCL pela técnica de Nanoprecipitação 18
Figura 9- Representação esquemática do preparo das nanopartículas de PCL funcionalizadas com folato pela técnica de nanoprecipitação 19
Figura 10- Representação cromatográfica referente ao PCX 28
Figura 11- Representação cromatográfica referente ao filtrado da nanopartícula sem PCX, sendo A: NP e B: NP-AF. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 12- Curva analítica do paclitaxel analisado por CLAE. 30
Figura 13- Representação gráfica dos resultados de tamanhos e PdI das diferentes formulações de nanopartículas de PCL sem PCX (n=2). 33
Figura 14- Resultados dos potenciais zeta das diferentes formulações de nanopartículas de PCL sem PCX (n=2). 34
Figura 15- Representação gráfica dos resultados de tamanhos e PdI das formulações de nanopartículas de PCL com PCX (n=2). 35
Figura 16- Resultados do potencial zeta das formulações NPPCX-A, NPPCX-D e NPPCX-E (n=2). 36
Figura 17- Resultados da eficiência de encapsulação das formulações NPPCX-A, NPPCX-D e NPPCX-E (n=2). 36
Figura 18 - Representação gráfica do perfil de distribuição de tamanhos da formulação NPPCX-A obtido pela técnica de DLS. 37
Figura 19- Representação gráfica do perfil de distribuição de tamanhos das formulações NP-AF obtidos pela técnica de DLS. 38
Figura 20- Representação gráfica do perfil de distribuição de tamanhos das formulações NPPCX-AF obtidos pela técnica de DLS. 38

Figura 21- Representação gráfica da relação da distribuição de tamanhos das partículas e concentrações de partículas.mL^{-1} das formulações A: NP e B: NPPCX. 41
Figura 22- Representação gráfica da relação da distribuição de tamanhos das partículas e concentrações de partículas. mL^{-1} das formulações A: NP-AF e B: NPPCX-AF. 42
Figura 23- Representação gráfica dos tamanhos de partículas e PdI da formulação NPPCX durante 21 dias de armazenamento (n=2), avaliados pelo teste ANOVA de uma via, seguido de teste de Newman-Keuls. 44
Figura 24- Representação gráfica dos tamanhos de partículas e PdI da formulação NPPCX-AF durante 21 dias de armazenamento (n=2) , avaliados pelo teste ANOVA de uma via, seguido de teste de Newman-Keuls. 44
Figura 25- Representação gráfica do potencial zeta da formulação NPPCX durante 21 dias de armazenamento (n=2), avaliados pelo teste ANOVA de uma via, seguido de teste de Newman-Keuls. 45
Figura 26- Representação gráfica do potencial zeta da formulação NPPCX-AF durante 21 dias de armazenamento (n=2) , avaliados pelo teste ANOVA de uma via, seguido de teste de Newman-Keuls. 45
Figura 27- Avaliação da morfologia das formulações NPPCX (A) e NPPCX-AF (B) por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com aumento de 100.000 vezes.....46
Figura 28- Curvas de DSC das amostras de AF, PCX, P407-AF, NP, NP-AF, NPPCX, NPPCX-AF, de 30 a 330°C, sob taxa de aquecimento de 10°C/min.....47
Figura 29- Espectros de FTIR das amostras de AF, PCX, PCL, P407, P407-AF, NP, NP-AF, NPPCX, NPPCX-AF. 48
Figura 30- Resultado da análise por espectrofotometria das amostras purificadas através da cromatografia de permeação em gel antes do processo de diálise. 50
Figura 31- Resultados das análises espectrofotométricas das amostras purificadas através da diálise seguida de cromatografia de permeação em gel.....50
Figura 32- A: Espectro de ^{1}H RMN adquirido em 300 MHz para a solução de ácido fólico em DMSO-d6, B: estrutura química do ácido fólico e as atribuições dos sinais obtidos no espectro de ^{1}H RMN. 51
Figura 33- Espectros de ^{1}H RMN adquiridos em 300 MHz para a solução de P407 em DMSO-d6. 52

Figura 34- Espectros de ^{1}H RMN adquiridos em 300 MHz para a solução do complexo de P407-AF em DMSO-d6 53
Figura 35- Concentração celular (x10^5 células.mL^{-1}) (linha cheia) e viabilidade (%) (linha pontilhada) por tempo (horas) da linhagem celular SKOV-3. 54
Figura 36- Concentração celular (x10^5 células. mL^{-1}) (linha cheia) e viabilidade (%) (linha pontilhada) por tempo (horas) da linhagem celular OVCAR-3.....55
Figura 37- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular SKOV-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com PCX (A) e Taxol® (B) avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,0001). 56
Figura 38- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular OVCAR-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com PCX (A) e Taxol® (B) avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (p<0,0001).....57
Figura 39- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular SKOV-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com NPPCX (A) e NPPCX-AF (B), avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (*p<0,01, p < 0,001 e ***p<0,0001). 59
Figura 40- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular OVCAR-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com NPPCX (A) e NPPCX-AF (B), avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (*p<0,05, ***p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001).....60
Figura 41- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular SKOV-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com NP (sem PCX) (A) e NP-AF (B), avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls.....62
Figura 42- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular OVCAR-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com NP (A) e NP-AF (B), avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. 62
Figura 43- Resultados do *uptake* celular por citometria de fluxo após 1, 3 e 24 horas de tratamento com as formulações NP e NP-AF em linhagens celulares SKOV-3 (n=3),

sendo A: controle negativo, B: NP e C: NP-AF, I: 1 hora de tratamento, II: 3 horas de tratamento e III: 24 horas de tratamento. 63
Figura 44- Resultados da *uptake* celular por citometria de fluxo após 1, 3 e 24 horas de tratamento com as formulações NP e NP-AF em linhagens celulares OVCAR-3 (n=3), sendo A: controle negativo, B: NP e C: NP-AF, I: 1 hora de tratamento, II: 3 horas de tratamento e III: 24 horas de tratamento. 64
Figura 45- Representação gráfica dos resultados de *uptake* (A) e viabilidade celular (B) por citometria de fluxo em linhagem celular SKOV-3, avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (***p<0,001 e ****p<0,0001). 65
Figura 46- Representação gráfica dos resultados de *uptake* (A) e viabilidade celular (B) por citometria de fluxo em linhagem celular OVCAR-3, avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (***p<0,001 e ****p<0,0001). 65
Figura 47- Imagens de microscopia confocal em linhagem celular SKOV-3 após 24 horas de tratamento com as formulações NP (A) e NP-AF (B). 67
Figura 48: Imagens de microscopia confocal em linhagem celular OVCAR-3 após 24 horas de tratamento com as formulações NP (A) e NP-AF (B). 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporções de FO:FA/PCX:PCL, tipo e proporção de solventes 18
Tabela 2- Precisão do método cromatográfico utilizado na análise de PCX. 30
Tabela 3- Exatidão do método cromatográfico utilizado na análise de PCX. 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido fólico
ANOVA	Análise de variância
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCI	1,1'-Carbonildiimidazole
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EPR	Efeito de permeação e retenção
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FO: FA	Fase orgânica: fase aquosa
FTIR	Infravermelho transformada de Fourier
ICH	International Conference on Harmonization
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MWCO	*Molecular weight cut-off*
NP	Nanopartícula de PCL sem paclitaxel
NPAF	Nanopartícula polimérica funcionalizada com folato
NP-AF	Nanopartícula de PCL funcionalizada com folato, sem paclitaxel
NPPCX	Nanopartícula de PCL contendo paclitaxel
NPPCX-AF	Nanopartícula de PCL contendo paclitaxel funcionalizada com folato
P407	Poloxamer 407®
P407-AF	Poloxamer 407® sintetizado com ácido fólico
PBS	Tampão fosfato salino
PdI	Índice de polidispersão
PCL	Policaprolactona
PCX	Paclitaxel
PLA	Ácido poli lático
PLGA	Ácido lactico-co-glicólico

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS viii
1. INTRODUÇÃO 1
1. Câncer de ovário 1
1.2 Tratamentos convencionais utilizados no tratamento do câncer de ovário 3
1.2.1 Paclitaxel 3
1.3 Nanotecnologia e desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos 5
1.3.1 Nanopartículas poliméricas 6
2. Objetivos 10
2.1. Objetivo geral 10
2.2. Objetivos específicos 10
3. Material e Métodos 11
3.1 Material 11
3.1.1 Substâncias químicas 11
3.1.2 Equipamentos e acessórios 12
3.1.3 Linhagens celulares 13
3.2 Adaptação do método desenvolvido e validado para a quantificação do paclitaxel nas nanopartículas poliméricas 14
3.2.1 Seletividade 14
3.2.2 Curva analítica e linearidade 14
3.2.3 Exatidão e precisão 15
3.2.4 Limite de detecção e quantificação 15
3.3 Síntese do PCL com BODIPY (QHM-51) 16
3.4 Síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico 16
3.5 Preparo das nanopartículas poliméricas contendo paclitaxel 17
3.6 Preparo das nanopartículas contendo paclitaxel funcionalizadas com ácido fólico 18
3.7 Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas 20
3.7.1 Determinação da eficiência de encapsulação do paclitaxel 20
3.7.2 Análise do tamanho e distribuição de tamanhos das nanopartículas por espalhamento dinâmico de luz 20
3.7.3 Análise do potencial zeta 21
3.7.4 Análise do tamanho e distribuição de tamanhos de partículas por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) 21
3.7.5 Estabilidade coloidal dos nanocarreadores ao longo do tempo de armazenamento 21

3.7.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC):.....22
3.7.7 Espectroscopia de Infravermelho – Transformada de Fourier (FT-IR) 22
3.8 Avaliação da funcionalização do Poloxamer® 407 com ácido fólico.....22
3.8.1 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico através da espectrofotometria por UV.....22
3.8.2 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico através da ressonância magnética nuclear de prótons (H^1 RMN) 22
3.9 Caracterização morfológica das nanopartículas através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) 23
3.10 Caracterização biológica dos sistemas desenvolvidos em linhagens celulares de adenocarcinoma de ovário 23
3.10.1 Avaliação da cinética de crescimento das linhagens celulares tumorais: SKOV-3 e OVCAR-3 24
3.10.2 Estudo *in vitro* da eficiência dos nanocarreadores desenvolvidos em linhagens celulares de adenocarcinoma SKOV-3 e OVCAR-3.....24
3.10.3 Avaliação quantitativa do *uptake* e viabilidade celular através da citometria de fluxo.....25
3.10.4 Avaliação do *uptake* celular através da microscopia confocal.....26
3.11 Análise estatística 27
4. Resultados e discussão.....27
4.1 Avaliação do método desenvolvido e validado para a quantificação do paclitaxel nas nanopartículas poliméricas 27
4.2 Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo paclitaxel.....31
4.2.1 Incorporação de paclitaxel nas nanopartículas poliméricas 35
4.2.2 Preparo das nanopartículas poliméricas contendo paclitaxel funcionalizadas com ácido fólico 37
4.2.4 Preparo das nanopartículas poliméricas sem PCX com PCL-BODIPY.....39
4.3 Análise do rastreamento de nanopartículas (NTA).....39
4.4 Estabilidade coloidal dos nanocarreadores desenvolvidos 43
4.5 Caracterização morfológica das nanopartículas através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) 45
4.6 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) 46
4.7 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....47
4.8 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico.....49
4.8.1 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico através da espectrofotometria por UV.....49
4.8.2 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com folato através da ressonância magnética nuclear de prótons (^{1}H RMN).....50
4.9 Avaliação da cinética de crescimento das linhagens celulares tumorais SKOV-3 e OVCAR-3 53
4.11 Avaliação quantitativa do *uptake* celular por citometria de fluxo 62

4.12 Avaliação qualitativa do *uptake* celular por microscopia confocal 66
5. Conclusões.....68
Referências bibliográficas 69

1. INTRODUÇÃO

1. Câncer de ovário

Os ovários são compostos por diferentes células que podem sofrer malignização, transformando-se em tumor maligno. O adenocarcinoma de ovário ocorre em 90% dos casos de tumores malignos dos ovários e apresenta-se bilateralmente em 30 a 50% das pacientes. Este tipo de câncer é o quarto câncer mais comum em mulheres, resultando em 239.000 casos e 152.000 mortes no mundo por ano (REID; PERMUTH; SELLERS, 2017; WENTZENSEN et al., 2016), sendo nos Estados Unidos da América 22.240 novos casos e 14.070 mortes por ano (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Segundo o Instituto Nacional do Câncer, no Brasil, para cada ano do biênio 2018-2019, estimam-se 6.150 novos casos, apresentando um risco de 5,79 casos a cada 100 mulheres (INCA, 2017).

De acordo com a *American Cancer Society* (2018), o câncer de ovário pode ser classificado em quatro estadios: I, II, III e IV, **Figura 1**. No estadio I, o câncer encontra-se confinado no ovário ou tuba de Falópio. No estadio II, o mesmo encontra-se no ovário com disseminação para órgãos próximos dentro da pelve tais como útero, bexiga, cólon sigmoide ou reto. Nos estadios iniciais, I e II, não ocorre disseminação para linfonodos e órgãos próximos e a taxa de sobrevida em 5 anos é de 90 e 70%, respectivamente. Já no estadio III, ocorre a disseminação para órgãos de dentro da pelve e para linfonodos retroperitoniais, além da possibilidade de ocorrer a disseminação para órgãos distantes. No estadio IV, o mesmo encontra-se em fluidos pulmonares, sendo denominado de derrame pleural maligno, podendo ou não ocorrer a disseminação para o interior do baço ou fígado, gânglios linfáticos diferentes dos linfonodos retroperitoneais, outros órgãos ou tecidos fora da cavidade peritoneal (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018; TOMASINA et al., 2013).

Devido à falta de sintomas iniciais da doença e à baixa especificidade dos marcadores tumorais existentes, quando detectado, o câncer encontra-se em estadios III e IV da doença, os quais indicam disseminação na cavidade peritonial, com taxa de sobrevida em 5 anos de 39 e 17%, respectivamente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; TOMASINA et al., 2013; VALENTE; MASSABKI, 2011; XIAO et al., 2009)

Figura 1- Estadios do câncer de ovário.

Fonte: adaptado de *National Ovarian Cancer Coalition Online*.

O câncer de ovário está relacionado com 3 tipos celulares distintos: epiteliais, estromais e germinativas. Cerca de 90% dos tumores malignos estão relacionados com a proliferação das células epiteliais; de 5 a 6%, com células estromais; e de 2 a 3%, com as células germinativas. Os tumores malignos ovarianos de origem epitelial, também denominados adenocarcinomas, apresentam alta heterogeneidade e são subdivididos em 5 tipos histológicos bem definidos: carcinoma seroso de alto grau (70% dos casos); endometrióide (10% dos casos); células claras (3% dos casos), mucinosas (3%) e por último, o seroso de baixo grau (menos que 5%) (REID; PERMUTH; SELLERS, 2017).

Estudos revelam que os subtipos histológicos (tumores serosos, mucinosos, células claras e endometrioides) se originam de cistos de inclusão ou implantes no epitélio da superfície ovariana e possuem mutações KRAS, BRAF ou PTEN. Os tumores serosos de alto grau, caracterizados por mutações TP53 (95% dos casos), se originam nas trompas de Falópio ou no epitélio dos ovários. Sendo este último o mais agressivo e que apresenta uma menor taxa de sobrevida (KUHN et al., 2012; WENTZENSEN et al., 2016).

Os fatores de risco estão relacionados com a idade, obesidade, histórico de reprodução, incluindo histórico de câncer de ovário em familiar (es) de primeiro grau, nuliparidade, infertilidade, controle de natalidade, menarca precoce e menopausa, entre outros fatores. No entanto, os fatores protetores estão ligados à gestação prévia, amamentação, uso de contraceptivos orais e ligadura tubária (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

1.2 Tratamentos convencionais utilizados no tratamento do câncer de ovário

Durante muito tempo, o tratamento convencional de pacientes com câncer de ovário consistiu em uma intervenção cirúrgica seguida de sessões de quimioterapia. No entanto, atualmente o tratamento consta de quimioterapia neoadjuvante a intervenção cirúrgica, seguida de uma quimioterapia adjuvante (VAN MEURS et al., 2013). Entretanto, os agentes quimioterápicos danificam tanto as células cancerígenas quanto as normais, devido à não especificidade do tratamento às células tumorais, que apresentam o descontrole do crescimento e reprodução celular. Por este motivo, este tratamento é realizado em ciclos e com intervalos entre as administrações, para que as células normais se recuperem (ZHANG et al., 2014)

O tratamento do câncer de ovário consiste na administração de taxóides, como paclitaxel e docetaxel; inibidores da topisomerase I; platina; ifosfamida; topotecan, irinotecan, 9-nitro-campotecina e gencitabina. Sendo que o paclitaxel é indicado como primeira e segunda linha de tratamento do carcinoma avançado de ovário, quando indicado como primeira linha de tratamento, geralmente é utilizado juntamente com composto de platina, como cisplatina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.2.1 Paclitaxel

O paclitaxel é um pó branco cristalino, de fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$, peso molecular de 853,918 $g.mol^{-1}$ e com ponto de fusão de 216-217°C. Em 1971 ocorreu a primeira publicação sobre o isolamento do paclitaxel (**Figura 2**) a partir da extração da casca de árvore de *Taxus brevifolia*. Atualmente, o paclitaxel tem sido obtido através de uma reação de acilação de 10-deacetilbacatina-III, que é um precursor presente nas folhas de *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata* (BERNABEU et al., 2017; YARDLEY, 2013).

Alguns estudos demonstram que os maiores alvos de ação do paclitaxel são os microtúbulos, que através da despolimerização e mudanças dinâmicas, resultam no rompimento da rede dos microtúbulos requerida para a mitose e proliferação celular (**Figura 3**). As células tratadas com paclitaxel são incapazes de proceder normalmente através do ciclo celular e são retidas na fase G2 (mitose) (OFIR et al., 2002). Devido a sua elevada eficácia em ocasionar dano celular, tornou-se um

quimioterápico importante no tratamento clínico de câncer de ovário, mama, pulmão, cabeça, pescoço e outros tipos de câncer (ZHANG et al., 2014).

Figura 2- Estrutura química do paclitaxel.

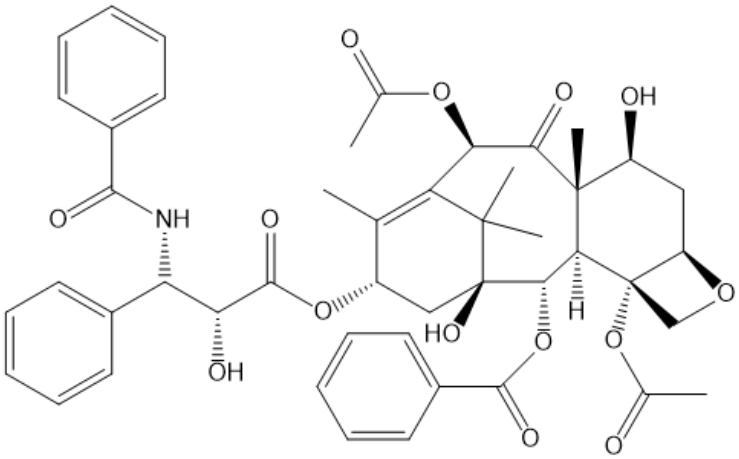
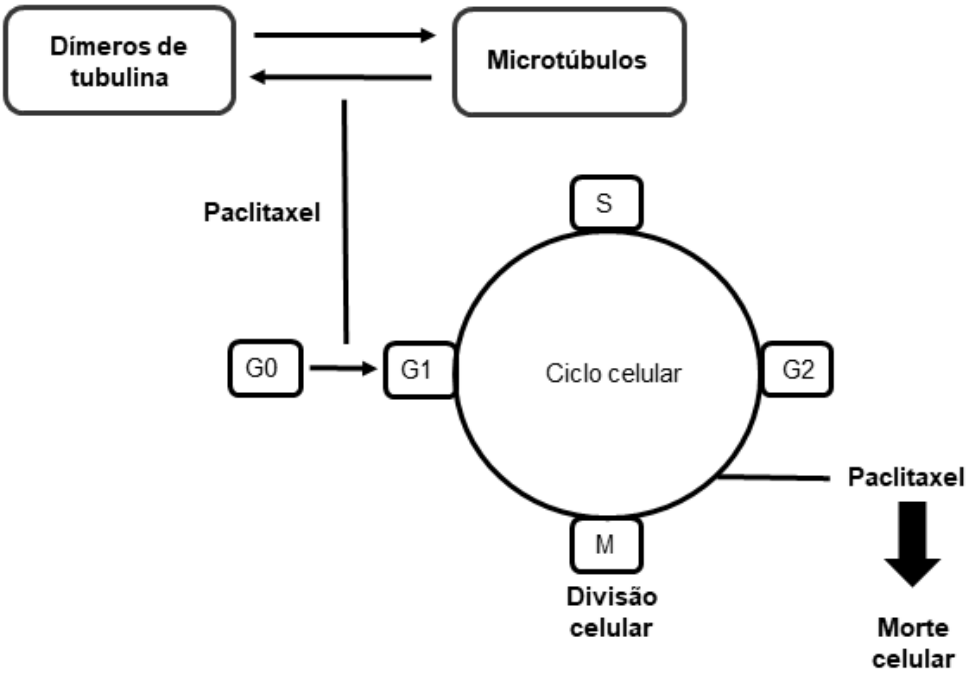


Figura 3- Representação da ação do paclitaxel nos microtúbulos.



Fonte: adaptado de ZHANG et al., 2014

Embora o paclitaxel seja o fármaco de escolha para o tratamento do câncer de ovário, possui uma baixa solubilidade aquosa, o que reduz a sua biodisponibilidade. Por esse motivo, no Taxol®, medicamento disponível comercialmente, o paclitaxel é formulado em uma mistura de Cremophor EL®/etanol (proporção 1:1, v/v). O Cremophor EL® é um tensoativo tóxico que proporciona vários efeitos colaterais, como

reações de hipersensibilidade, mielosupressão e neurotoxicidade (XIAO et al., 2009). Diante destes intercorrentes inerentes da formulação convencional de paclitaxel, pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de aumentar a especificidade do tratamento e proporcionar uma redução dos seus efeitos adversos (LUO et al., 2017; XIONG et al., 2016).

1.3 Nanotecnologia e desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos

A nanotecnologia é uma tecnologia relacionada a produção, manipulação e visualização de materiais em escala nanométrica, sendo promissora em diversas áreas, como médica, farmacêutica, biotecnológica, engenharia, telecomunicação e informação (HORTON; KHAN, 2006).

Esta tecnologia tem sido muito utilizada para a veiculação de diversos fármacos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos. Os nanocarreadores como nanopartículas poliméricas, metálicas, lipossomas, micelas e dendrímeros apresentam diversas vantagens, dentre elas, o aumento da biodisponibilidade e proteção do fármaco contra degradação e inativação. Além disso, são capazes de se acumularem nos tecidos tumorais através do direcionamento passivo e ativo, podendo promover seletividade com consequente diminuição da toxicidade (PATEL et al., 2017; XIAO et al., 2009).

O direcionamento passivo das nanopartículas ocorre devido ao efeito de permeação e retenção aumentados (efeito EPR). Esse efeito ocorre devido ao processo de angiogênese tumoral no qual os vasos são produzidos de maneira rápida, de forma a suprir às necessidades nutricionais do tumor, e de maneira defeituosa, formando fenestrações entre as células epiteliais. Dessa forma, as partículas com tamanhos reduzidos, menores que 200 nm tendem a se acumularem no tecido tumoral, apresentando uma maior permeação devido ao efeito EPR (AVERINENI et al., 2012). Além dessa permeação, a inexistência de uma drenagem linfática eficaz faz com que as partículas permaneçam mais tempo no local de ação para que o fármaco seja liberado e atue na redução tumoral (PATEL et al., 2017).

1.3.1 Nanopartículas poliméricas

O direcionamento de fármacos em tumores sólidos é um desafio, principalmente pela baixa seletividade desses fármacos, o que os torna potencialmente tóxicos tanto para as células tumorais, quanto para as normais. Além disto, os tecidos normais possuem baixa tolerância intrínseca quando comparado com os tumores, limitando a dose necessária para a regressão tumoral. Devido à baixa solubilidade da maioria dos agentes quimioterápicos, a adição de tensoativos à formulação é também um fator limitante por aumentar a ocorrência de efeitos adversos (DANQUAH; ZHANG; MAHATO, 2011).

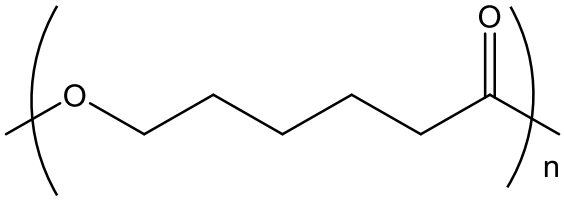
O incentivo ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos capazes de aumentar a biodisponibilidade no local do tumor, maximizar a eficácia terapêutica, e por sua vez diminuir os efeitos adversos é cada vez maior (BERNABEU et al., 2017; ELOY et al., 2017). Dessa forma, estes sistemas têm sido cada vez mais estudados visando uma terapia mais segura e eficaz no tratamento do câncer de ovário (LUO et al., 2017).

As nanopartículas poliméricas destacam-se por possuírem um grande potencial para minimizar os problemas da farmacoterapêutica existente, aumentando a eficácia terapêutica de agentes quimioterápicos, diminuindo os efeitos colaterais e toxicidade. Essa minimização ocorre devido à capacidade de sustentar a liberação do fármaco, aumentando o tempo de residência do mesmo na corrente sanguínea, sendo necessária a diminuição da dose requerida e do número de administrações ao paciente. Além disso, esses sistemas apresentam uma alta eficiência de encapsulação do fármaco, além de protegê-lo contra degradação e possuirem um potencial irritativo reduzido devido ao seu recobrimento polimérico (CRUCHO; BARROS, 2017; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; THAMAKE et al., 2011).

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas a partir de polímeros naturais ou sintéticos. Polímeros sintéticos como ácido poli lático (PLA), poli (ácido lactico-co-glicólico) (PLGA) e poli-ε-caprolactona (PCL) são biodegradáveis e biocompatíveis. Estes materiais podem ser degradados em materiais (monômeros) de baixa massa molecular e atóxicos que, após a liberação do fármaco, são metabolizados e eliminados ou absorvidos pelo organismo (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

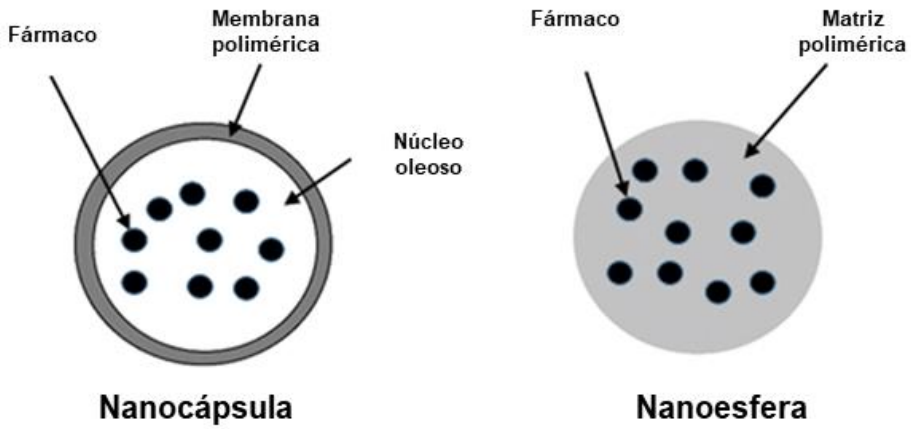
A PCL (**Figura 4**) é um poliéster sintético aprovado pela FDA, semicristalino, biodegradável, biocompatível e de baixo custo, e tem sido utilizada na encapsulação de diversos tipos de fármacos (OSSA et al., 2012; SINHA et al., 2004). É adequado para liberação modificada de fármacos devido a sua biodegradabilidade, atoxicidade (CHEN; BEI; WANG, 2000; SINHA et al., 2004; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010) e por permitir a administração pela via endovenosa (OSSA et al., 2012).

Figura 4- Estrutura química da policaprolactona.



Com relação à obtenção das nanopartículas, a técnica de preparo é muito importante para o desenvolvimento de partículas com características físico-químicas compatíveis com a via de administração desejada. O fármaco pode estar dissolvido, encapsulado, aprisionado ou ligado e dependendo da técnica de preparo, nanoesferas ou nanocápsulas podem ser obtidas (**Figura 5**) originando nanopartículas com propriedades adequadas para garantir liberação do fármaco no alvo desejado (CRUCHO; BARROS, 2017; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). As nanopartículas podem ser preparadas por diversas técnicas, tais como, evaporação do solvente, nanoprecipitação, técnica de emulsão e difusão do solvente e diálise (DASH; KONKIMALLA, 2012).

Figura 5- Esquema da estrutura de nanoesfera e nanocápsula.

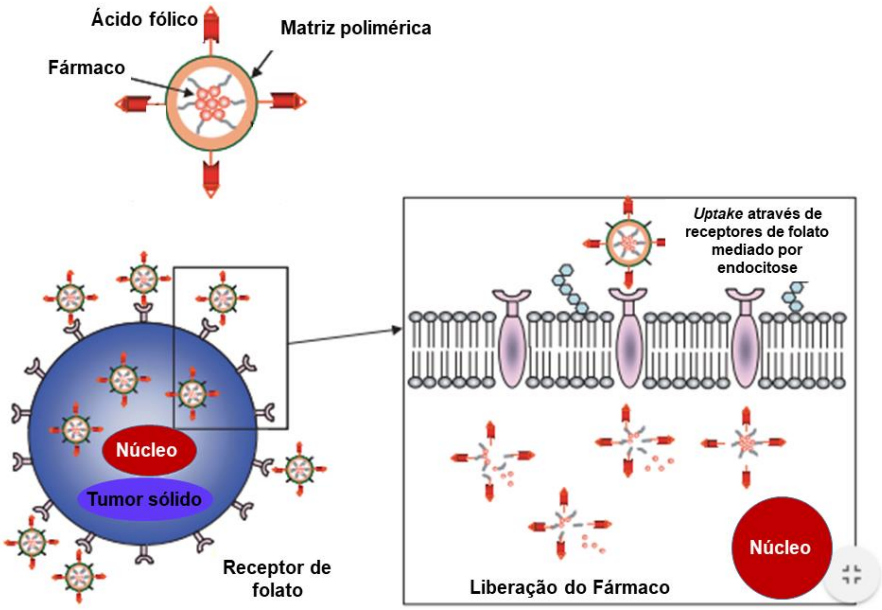


Fonte: adaptado de KHALIL et al., 2017.

1.3.2 Funcionalização de nanopartículas

A quimioterapia e a radioterapia são muito citotóxicas e possuem limitações devido aos efeitos colaterais mencionados no item 1.2.1. Essa toxicidade sensibiliza células normais devido à terapia não ser seletiva para células malignas. Com a finalidade de superar as desvantagens do tratamento convencional, diversos tipos de gerações de nanopartículas tem sido desenvolvidas. A primeira geração compreende partículas que não contém um ligante, demonstrando uma seletividade tumoral relativa como consequência do direcionamento passivo decorrente do efeito EPR, as quais já possuem o uso clínico aprovado (MARCUCCI; LEFOULON, 2004). Já a segunda geração de partículas objetiva um aumento da liberação de fármacos em sítios-alvo através de interações específicas nesses locais quando atividades farmacológicas são requeridas e estas interações incluem antígeno-anticorpo e ligação ligante-receptor (YOKOYAMA, 2005). A seletividade pode ser aumentada pelo acoplamento de anticorpos ou outros ligantes, como o folato, na superfície da nanopartícula que se ligam em receptores superexpressos na membrana de células tumorais, promovendo uma maior internalização das nanopartículas nas células malignas via endocitose mediada por receptores (**Figura 6**) (MARTIN et al., 2017).

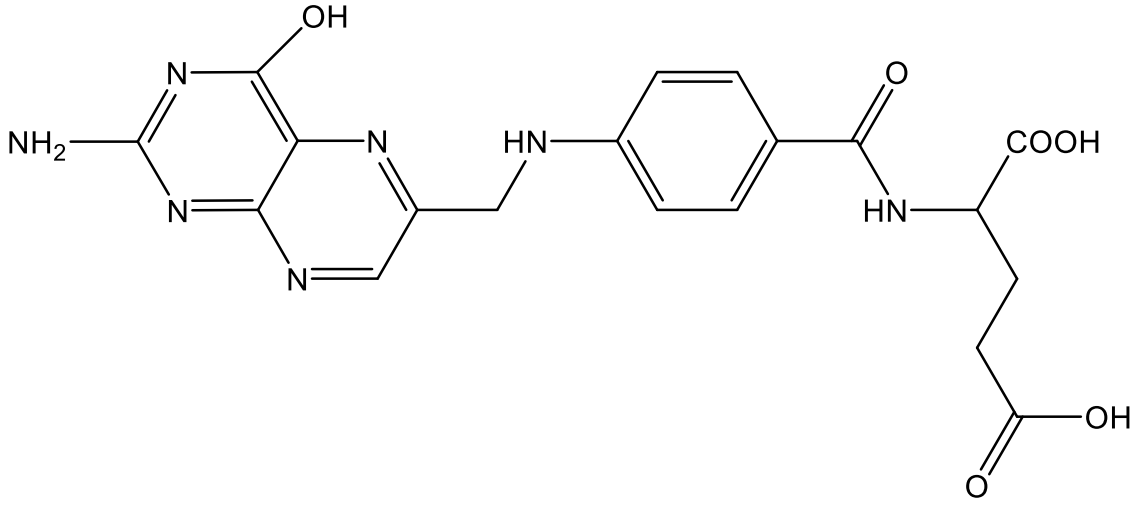
Figura 6- Representação esquemática da endocitose das nanopartículas poliméricas contendo PCX funcionalizadas com folato.



Fonte: adaptado de KIM, 2005.

O ácido fólico (AF) (**Figura 7**), de peso molecular de 441,404 g.mol^{-1} e fórmula molecular $C_{19}H_{19}N_7O_6$, é um aminoácido necessário para a síntese das bases purinas e pirimidinas e apresenta alta afinidade pelos receptores de folato, que são expressos na membrana de algumas células cancerígenas (100-300 vezes mais que em células normais) (SAMADIAN et al., 2016).

Figura 7- Estrutura química do ácido fólico.



Os receptores de folato alfa são potenciais alvos na terapia contra o câncer do ovário. Além disso, é um antígeno que se apresenta em 85-90% das mulheres com câncer do ovário (JONES; LIZZIO; MERKEL, 2016). Devido a essa superexpressão, torna-se interessante a ligação do ácido fólico às nanopartículas poliméricas para que as mesmas sejam internalizadas via endocitose (THU et al., 2015). Thu e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas poliméricas com paclitaxel funcionalizadas e não funcionalizadas com ácido fólico e observaram em estudo *in vivo* que as partículas funcionalizadas causaram uma maior inibição tumoral comparado às nanopartículas poliméricas sem ácido fólico (THU et al., 2015). Essa maior eficácia das nanopartículas funcionalizadas com ácido fólico pode ser atribuída à maior internalização celular das nanopartículas funcionalizadas através de endocitose mediada por receptores de folato. Além disso, o ácido fólico possui baixa imunogenicidade, é fácil de ser produzido e apresenta baixo custo (CHENG et al., 2012; YU et al., 2010).

Neste contexto, o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas de PCL funcionalizadas com folato para a veiculação do paclitaxel é uma potencial estratégia

para a otimização da terapia do câncer de ovário devido a sua capacidade de direcionar o fármaco por mecanismos ativos e passivos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo paclitaxel, funcionalizadas e não funcionalizadas com ácido fólico, visando à otimização do tratamento do câncer de ovário.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento de nanopartículas de policaprolactona para veiculação de paclitaxel para a administração por via endovenosa;
- Quantificação do paclitaxel por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Síntese do polímero policaprolactona com BODIPY;
- Síntese do Poloxamer 407® com o ácido fólico (AF);
- Avaliação da funcionalização do Poloxamer 407® com o ácido fólico através da espectroscopia por UV e ressonância magnética nuclear de prótons (^{1}H RMN);
- Preparo das nanopartículas de policaprolactona contendo paclitaxel funcionalizadas e não funcionalizadas com ácido fólico (NPPCX-AF e NPPCX);
- Caracterização físico-química dos nanocarreadores obtidos utilizando análise e distribuição de tamanhos de partículas por dispersão de luz; análise do potencial zeta; análise do rastreamento de nanopartículas (NTA); avaliação da eficiência de encapsulação do paclitaxel por CLAE; calorimetria diferencial de varredura (DSC) e espectroscopia de infravermelho – transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliação da estabilidade coloidal dos nanocarreadores ao longo do tempo de armazenamento;
- Caracterização da morfologia das nanopartículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão;

- Caracterização das linhagens celulares tumorais SKOV-3 e OVCAR-3 através da cinética de crescimento;
- Avaliação da atividade antitumoral das formulações obtidas em linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3 através do ensaio de resazurina;
- Avaliação do *uptake* e viabilidade celular das formulações desenvolvidas nas linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3 através da citometria de fluxo;
- Avaliação do *uptake* celular das formulações desenvolvidas nas linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3 através da microscopia confocal.

3. Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Substâncias químicas

- 1,1'-Carbonildiimidazole – Sigma-Aldrich, lote: 29332999;
- Ácido fólico – Caisson, lote: 07142030
- Acetona P.A. – Dinâmica®, lote: 87286;
- Acetonitrila, grau HPLC – Panreac, lote: 0000423772;
- Água MilliQ - filtro Gradient – Millipore;
- Álcool isopropílico – Mallinckrodt, lote: 5351KXTGA;
- Azul de Tripan – Sigma-Aldrich
- BODIPY (QHM-51);
- DAPI – Sigma-Aldrich, lote: 075M4010V;
- Dimetilaminopiridina – Sigma-Aldrich, lote: 29333989;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Synth, lote: 121739;
- Dimetilsufóxido deuterado (DMSO-d_6) – Sigma Aldrich, lote: MKCB8352;
- Etilenodiamina – Sigma-Aldrich, lote: 29212100;
- Fluoromount® - Sigma-Aldrich, lote: SLBJ8975V;

- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A. – Synth, lote: 81107;
- Fosfato de sódio bibásico heptahidratado P.A. – Synth, lote: 126886;
- Meio de cultura RPMI 1640 – Sigma-Aldrich, lote: SLBR4620V;
- Paclitaxel (PCX) – APIchem;
- Paraformaldeido – Sigma-Aldrich, lote: 010M1507;
- Policaprolactona – Sigma-Aldrich, lote: 55996PJ;
- Poloxamer 407® - Sigma-Aldrich, lote: BCBJ5711V;
- Resazurina – Sigma-Aldrich, lote: MKBQ3226V;
- Solução de antibíotico contendo 10,000 unidades de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina – Sigma Aldrich, lote: 106M4809V;
- Soro fetal bovino – Sigma-Aldrich, lote: SPBB2353V;
- Taxol® - Bristol-Myers Squibb, lote: W05923;
- Trietilamina – Sigma-Aldrich, lote: 29211912;
- Tripsina 2,5% (10x) – Gibco, lote: 01119L15.

3.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético – Lab disk, IKA;
- Agitador magnético – MAG MULTI, Marte;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência - Thermo Scientific® Dionex UltiMate 3000;
- Balança analítica – Adventurer™, Ohaus;
- Balança semi-analítica – AS 2000C, Marte;
- Banho ultrassônico – Quimis;
- Cabina de fluxo laminar – Cell Logic;
- Centrífuga – Eppendorf;
- Citômetro de fluxo - FACSCanto I;

- Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) IRPrestige-21 – Shimadzu;
- Espectrômetro Drive Shield R modelo DRX300 – BRUKER®;
- Estufa de cultivo celular COM-170AICUVL-PA- Panasonic;
- Filtro Amicon® 10 kDa – Merck Millipore;
- Leitor de placa modelo Synergy - Biotek;
- Leitor de tamanho de partícula e potencial zeta Zetasizer 3000 HSa- Malvern Instruments;
- Leitor de tamanho de partícula NanoSight LM20 – NanoSight;
- Medidor de pH – DM 20, Digimed;
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 20 a 200 µL, 100 a 1000 µL e 1 a 5 mL – Eppendorf;
- Microscópio confocal SP8 – Leica;
- Microscópio de luz invertida TS100 – Nikon;
- Microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM – 100 CXII equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR;
- NanoSight LM20 – NanoSight;
- Sephadex G-25 – GE-Healthcare Life Sciences;
- Zetasizer – Malvern.

3.1.3 Linhagens celulares

- SKOV-3 (ATCC® HTB-77™);
- OVCAR-3 (ATCC® HTB-161™).

3.2 Adaptação do método desenvolvido e validado para a quantificação do paclitaxel nas nanopartículas poliméricas

A quantificação do paclitaxel foi realizada segundo YANG e colaboradores (2007) (YANG et al., 2007), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os estudos foram efetuados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Thermo Scientific® Dionex UltiMate 3000), equipado com detector de arranjo de diodos e injetor automático, coluna de fase reversa C18 (LiChroCART® 250-4 LiCrospher® Merck RP-18 – Alemanha) associada a uma pré-coluna de mesma composição. O comprimento de onda utilizado foi de 227 nm. A fase móvel foi composta de acetonitrila: água (50:50, v/v), com vazão 1,0 $mL.min^{-1}$, volume de injeção de 20 µL e temperatura de 25ºC. Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, de acordo com as diretrizes da ANVISA (ANVISA, 2003) e do documento Q2 (R1) da International Conference Harmonization (ICH) (ICH, 2005).

3.2.1 Seletividade

A seletividade do método analítico foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos a partir de amostras do paclitaxel (15 $\mu g.mL^{-1}$) e dos cromatogramas das nanopartículas sem paclitaxel funcionalizadas (NP-AF) e não funcionalizadas com ácido fólico (NP). As amostras foram filtradas anteriormente à análise em filtro 0,45 µm (Millipore®). As amostras foram analisadas em triplicata.

3.2.2 Curva analítica e linearidade

Soluções nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 5,0; 10 e 15 $\mu g.mL^{-1}$ em acetonitrila foram preparadas. As curvas analíticas foram construídas relacionando os valores em $\mu g.mL^{-1}$ no eixo das abscissas com os valores das integrais das áreas dos picos obtidos. O intervalo linear foi calculado pelos métodos dos mínimos múltiplos quadrados entre a concentração e a resposta, gerando coeficiente linear (b), coeficiente angular (a) e coeficiente de correlação (r). O coeficiente de correlação mínimo aceitável foi de 0,99 (ANVISA, 2003).

3.2.3 Exatidão e precisão

Para a avaliação da exatidão, nove determinações que contemplam o intervalo linear do procedimento, ou seja, triplicata de cada uma das 3 concentrações de PCX 0,25; 5,0 e 15,0 µg.mL^{-1} foram avaliadas (ANVISA, 2003). Os resultados foram calculados de acordo com a fórmula abaixo:

$$E(\%) = \frac{valor\ obtido - valor\ teórico}{valor\ teórico} \times 100$$

Para a avaliação da precisão do método, a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesmo equipamento foi avaliada. Esta análise é denominada precisão intracorrida ou repetibilidade. A repetibilidade do método é realizada com o intuito de avaliar nove determinações que contemplam o intervalo linear do procedimento, ou seja, triplicata de cada uma das 3 concentrações de PCX 0,25; 5,0 e 15,0 µg.mL^{-1} (ANVISA, 2003). Os resultados foram calculados através do coeficiente de variação (CV) e calculado pela razão do desvio padrão (*s*) com a média dos valores obtidos (*X*), de acordo com a fórmula abaixo:

$$CV(\%) = \frac{s}{X} \times 100$$

3.2.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi determinado através do sinal ou ruído da linha de base, de acordo com a fórmula abaixo:

$$LD = DPa \times 3/IC$$

No qual: DPa = desvio padrão médio do intercepto com o eixo y de no mínimo 3 curvas padrão e IC = inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração obtida com precisão e exatidão.

3.3 Síntese do PCL com BODIPY (QHM-51)

A ligação do polímero PCL com a sonda fluorescente BODIPY (QHM-51) foi realizada de acordo com Zhu e colaboradores (2002) acrescida de modificações (ZHU et al., 2002). A síntese foi necessária para produzir nanopartículas poliméricas que emitam fluorescência para a realização dos ensaios de *uptake* celular, por meio das análises de citometria de fluxo e microscopia confocal nas linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3. O BODIPY (QHM-51) utilizado no presente trabalho foi desenvolvido e disponibilizado pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Flávio da Silva Emery. Inicialmente uma reação de aminólise foi conduzida para disponibilizar o grupo funcional amina na terminação do polímero PCL. Para isso, uma solução de 50 mL de etilenodiamina a 10% (v/v) em álcool isopropilico (25%, v/v) foi adicionada em um béquer contendo 2,0 g de PCL e a reação foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos. Em seguida, a reação foi filtrada a vácuo e à reação foi adicionado 50 mL de água Milli Q®. Posteriormente, o sistema foi mantido sob refrigeração a 4 ºC, por 24 horas. Após 24 horas, o sistema foi filtrado a vácuo e adicionado 20 mL de solução de BODIPY (0,01%, m/v) em álcool isopropílico 25% (v/v) ao PCL reativo, preparado anteriormente. Em seguida, a reação foi alcalinizada com 20 µL de trietilamina e o sistema foi novamente refrigerado a 4ºC por 24 horas. Após 24 horas de reação, o sistema foi filtrado a vácuo. Com o intuito de remover o BODIPY que não reagiu com o PCL, o produto final da reação foi submetido a uma lavagem com uma solução de álcool isopropílico 25% (v/v) e filtrada à vácuo novamente. O produto final foi seco à vácuo e armazenado a 4ºC.

3.4 Síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico

Para o preparo das nanopartículas funcionalizadas com ácido fólico (AF), o Poloxamer 407® (P407) foi sintetizado com ácido fólico, de acordo com Lin e colaboradores (2009) acrescido de algumas modificações (LIN et al., 2009). Para o preparo, 0,144 g (0,327 mmol) de AF foram solubilizados em 4 mL de DMSO anidro. Após a solubilização, 0,0584 g (0,3601 mmol) de 1,1'-Carbonildiimidazole (DCI) e 0,0220 g (0,1800 mmol) de Dimetilaminopiridina (DMAP), na razão molar de 2:1, foram adicionados à solução de AF e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 24 horas, em atmosfera inerte e protegido da luz. Após 24 horas, 0,50 g (0,1637 mmol)

de P407 solubilizados em 1 mL de DMSO foram adicionados ao sistema, que permaneceu em agitação sob atmosfera inerte por 24 horas a 25ºC. Ao final da reação, a solução formada foi purificada através de membrana de diálise 3.500 MWCO, por 5 dias, com reposição de água Milli Q® diária para a retirada do AF que não reagiu com o P407 e dos reagentes tóxicos utilizados na síntese. Para a avaliação da eficácia do processo de diálise, foi realizada uma cromatografia de permeação em gel em Sephadex G-25. Essa cromatografia em Sephadex G-25 foi realizada antes e após o processo de diálise e 50 amostras foram coletadas. O produto da reação foi avaliado através da espectroscopia por UV e ressonância magnética nuclear de prótons (H^1RMN).

3.5 Preparo das nanopartículas poliméricas contendo paclitaxel

O preparo das nanopartículas foi realizado através da técnica de nanoprecipitação (**Figura 8**), no qual a fase orgânica composta pelo polímero (PCL) e o fármaco (PCX), em diferentes proporções, foram solubilizados em acetona e submetidos a banho de ultrassom por 30 min. Na fase de otimização, a fase aquosa foi constituída por uma solução contendo P407 (0,05%, m/v) em tampão fosfato 30 mM, pH 7,4. Após a solubilização dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi vertida sob a fase aquosa, sob agitação, e a suspensão resultante foi mantida sob agitação a 600 rpm até a evaporação total do solvente (acetona) a 25ºC.

Durante o desenvolvimento, foi realizado a otimização de proporção de fase orgânica/aquosa (FO:FA) e da proporção de fármaco/polímero (PCX:PCL), de acordo com a **Tabela 1**, visando características físico-químicas compatíveis com a via de administração endovenosa e promoção do efeito EPR. Inicialmente foi realizado o preparo das nanopartículas sem PCX, visando a redução dos custos. Após a otimização da proporção de FO:FA e PCL na fase orgânica, PCX foi incorporado às nanopartículas nas concentrações de 500 e 1000 $\mu g.mL^{-1}$.

Além disso, para a avaliação do *uptake* celular através das técnicas de citometria de fluxo e microscopia confocal, após a otimização das proporções de FO:FA e PCL, as nanopartículas sem PCX foram preparadas com PCL-BODIPY na fase orgânica, através da técnica de preparo descrita acima.

Figura 8- Representação esquemática do preparo das nanopartículas de PCL pela técnica de Nanoprecipitação

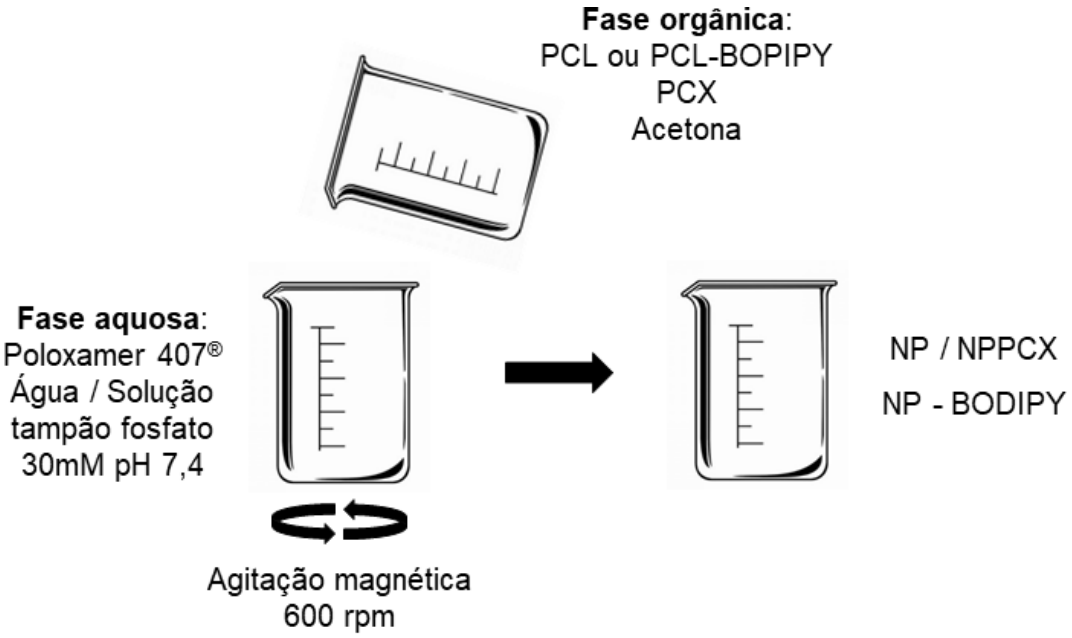


Tabela 1. Proporções de FO:FA/PCX:PCL, tipo e proporção de solventes

Formulações	FO:FA	PCX:PCL	Conc.(μg.mL^{-1})
NPA	1:1	0:5	-
NPB	1:1	0:10	-
NPC	1:1	0:15	-
NPD	1:2	0:5	-
NPE	1:2	0:10	-
NPF	1:2	0:15	-
NPG	1:3	0:5	-
NPH	1:3	0:10	-
NPI	1:3	0:15	-
NPPCX-A	1:1	1:5	1000
NPPCX-D	1:2	1:5	500
NPPCX-E	1:2	1:10	500

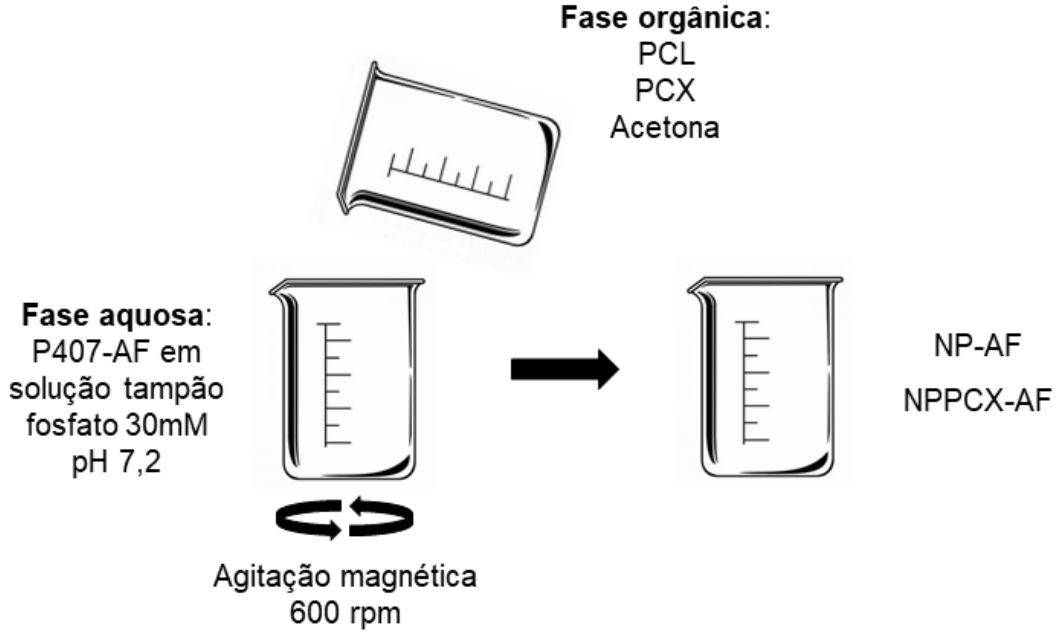
Legenda: FO:FA: fase orgânica: aquosa; PCX:PCL: paclitaxel: policaprolactona; Conc.: concentração de paclitaxel nas nanopartículas poliméricas.

3.6 Preparo das nanopartículas contendo paclitaxel funcionalizadas com ácido fólico

Após a síntese do P407 com ácido fólico (P407-AF), item 3.4, e a otimização das partículas com a obtenção de características físico-químicas compatíveis com a via

endovenosa e promoção do efeito EPR, as nanopartículas funcionalizadas com ácido fólico contendo ou não paclitaxel (NPPCX-AF e NP-AF, respectivamente) foram preparadas através da técnica de nanoprecipitação, **Figura 9**, de acordo com o item 3.5, no qual a fase orgânica composta pelo polímero (PCL) e o fármaco (PCX) foram solubilizados em acetona e submetidos a banho de ultrassom, por 30 min. A fase aquosa foi constituída por uma solução contendo P407-AF (0,5%, m/v) em tampão fosfato 30 mM, pH 7,4. Após a solubilização dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi vertida sob a fase aquosa, sob agitação, a suspensão resultante foi mantida sob agitação a 600 rpm até a evaporação total do solvente (acetona).

Figura 9- Representação esquemática do preparo das nanopartículas de PCL funcionalizadas com folato pela técnica de nanoprecipitação



Além disso, para a avaliação do *uptake* celular através das técnicas de citometria de fluxo e microscopia confocal, após a otimização das proporções de FO:FA e PCL, as nanopartículas funcionalizadas com ácido fólico sem PCX foram preparadas com PCL-BODIPY na fase orgânica, através da técnica de preparo descrita acima.

3.7 Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas

3.7.1 Determinação da eficiência de encapsulação do paclitaxel

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada através do método indireto, que consiste na filtração (2.500 *x g* por 20 min) de uma alíquota das suspensões de NPPCX e NPPCX-AF em um tubo AMICON® com tamanho de poro de 10 KDa. O filtrado foi quantificado em CLAE, conforme item 3.2, corresponde ao PCX não encapsulado. A concentração do PCX foi calculada utilizando a equação da curva analítica, considerando-se o fator de diluição aplicado. A concentração de PCX nas NP foi obtida com base na massa do fármaco adicionado relacionada ao volume final da suspensão (após a evaporação da fase orgânica). A eficiência de encapsulação (EE) foi obtida em porcentagem através da fórmula:

$$EE(\%) = \frac{(\mu g \text{ PCX da suspensão total} - \mu g \text{ PCX da suspensão filtrada}) \times 100}{\mu g \text{ PCX da suspensão total}}$$

3.7.2 Análise do tamanho e distribuição de tamanhos das nanopartículas por espalhamento dinâmico de luz

As análises do tamanho e distribuição de tamanhos das nanopartículas foram realizadas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz em analisador por dispersão de luz Zetasizer Malvern (EUA), modelo Nano ZS, utilizando temperatura controlada de 25 ºC, com ângulo de detecção de 173°. As amostras de nanopartículas (NPA a NPI, NPPCX, NP-BODIPY, NP-AF-BODIPY, NP-AF e NPPCX-AF) foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em água ultrapurificada obtida por sistema Milli-Q®. Após a diluição, as amostras foram colocadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e inseridas na câmara de análise (cubeta), com o auxílio de uma pipeta. Através dessa análise, obteve-se os valores de diâmetro médio das partículas, bem como as distribuições de tamanhos por intensidade, representada pelo índice de polidispersão (PdI).

3.7.3 Análise do potencial zeta

As análises do potencial zeta das partículas foram realizadas em um equipamento Zetasizer Malvern (EUA), modelo Nano ZS, através da técnica de espalhamento de luz eletroforético, utilizando temperatura controlada de 25 ºC e ângulo de detecção de 173°. As amostras de nanopartículas (NPA a NPI, NPPCX, NP-BODIPY, NP-AF-BODIPY, NP-AF e NPPCX-AF) foram diluídas na proporção 1:100 (v/v), em água ultrapura obtida por sistema Milli-Q®. Após a diluição, as amostras foram inseridas em células capilares com o auxílio de uma pipeta e inseridas na câmara de análise.

3.7.4 Análise do tamanho e distribuição de tamanhos de partículas por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

Esta análise foi realizada no equipamento NanoSight LM20 (NanoSight, Reino Unido) com software NTA 3,0 Analytical (NanoSight, UK). As medidas foram realizadas após diluição de 5.000 vezes das amostras: NP (sem PCX), NPPCX e 2.000 vezes das amostras: NP-AF e NPPCX-AF em água ultrapurificada obtida por sistema Milli-Q®. Em seguida, as amostras diluídas foram introduzidas no interior do porta-amostra por meio de uma seringa estéril, até seu total preenchimento (0,5 mL). A análise foi realizada utilizando um feixe de laser de diodo (λ = 635 nm) (BENDER et al., 2012; HOFFMEISTER et al., 2012). As medidas de tamanho foram realizadas em quadruplicata com os dados expressos como a média (desvio padrão).

3.7.5 Estabilidade coloidal dos nanocarreadores ao longo do tempo de armazenamento

As formulações de nanopartículas funcionalizadas (NPPCX-AF) e não funcionalizadas contendo o PCX (NPPCX) foram preparadas de acordo com os itens 3.5 e 3.6 e armazenadas a 4ºC para avaliação da estabilidade coloidal destas formulações em suspensão durante o período de 21 dias (n=2). As amostras foram avaliadas quanto a análise de distribuição de tamanhos, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta e eficiência de encapsulação do PCX.

3.7.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC):

Foi realizada a calorimetria diferencial de varredura para a análise de possíveis interações entre componentes de cada formulação. As amostras (AF, P407-AF, PCX, NP, NP-AF, NPPCX e NPPCX-AF) foram pesadas em recipiente de alumínio e aquecidas, sob atmosfera de nitrogênio, na faixa de 30 a 330 ºC, velocidade de aquecimento correspondente a 10 ºC/minuto e pressão de nitrogênio de 3kgf/cm^2. Os dados foram analisados no programa TAS-Thermal Analysis Workstation (Perkin Elmer, EUA).

3.7.7 Espectroscopia de Infravermelho – Transformada de Fourier (FT-IR)

Os experimentos foram realizados com o uso de equipamento Shimadzu IR Prestige-21. As amostras (AF, PCX, PCL, P407, P407-AF, NP, NP-AF, NPPCX e NPPCX-AF) foram previamente solubilizadas em clorofórmio e deixados sob agitação magnética a 37°C por 24 horas. Cada amostra foi, então, gotejada sobre uma janela cristalina de KBr de maneira a formar um filme fino recobrindo a área pela qual atravessaria o feixe de luz do Infravermelho. Após secagem do solvente ao ar, a janela de KBr foi posicionada para a leitura. As análises foram realizadas com resolução de 2 cm^{-1}, de 4000 a 400 cm^{-1}.

3.8 Avaliação da funcionalização do Poloxamer® 407 com ácido fólico

3.8.1 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico através da espectrofotometria por UV

A formação do complexo P407-AF foi avaliada pela espectrofotometria por UV. Dessa forma, foram coletadas 50 amostras através da cromatografia por exclusão, em Sephadex G-25, realizada antes e pós o processo de diálise. Cada amostra foi analisada através da medida da absorbância no comprimento de onda de 383 nm.

3.8.2 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico através da ressonância magnética nuclear de prótons (H^1 RMN)

Os substratos e o produto final da reação do P407 com AF, purificados através da diálise (3.500 MWCO) e cromatografia de permeação em gel, foram analisados por

H^1 RMN. Os espectros H^1 RMN foram avaliados através do BRUKER (R) - Drive Shield (R) Modelo DRX300 espectrômetro, com 7.05T magneto e uma sonda direta de detecção (^1H: 300.83 MHz) de 5 mm de diâmetro com sistema de fechamento com deutério e *z-gradient generator coil* (campo máximo de 53,5 Gauss.cm^{-1}). As amostras foram preparadas em DMSO-d_6.

3.9 Caracterização morfológica das nanopartículas através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A morfologia superficial das nanopartículas poliméricas (NPPCX e NPPCX-AF) foram observadas através da microscopia eletrônica de transmissão em microscópio de transmissão Jeol JEM – 100 CXII equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR, resolução de 0,3 nm, magnificação de x330 a 450.000 e espessura do espécime de 150 nm. Uma gota de cada amostra foi colocada separadamente em grades de cobre de 200 mesh e deixadas em repouso até a 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 contraste 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 varredura com aceleração de 20 kv e aumento de 100.000 vezes.

3.10 Caracterização biológica dos sistemas desenvolvidos em linhagens celulares de adenocarcinoma de ovário

O estudo da caracterização biológica foi conduzido utilizando duas linhagens celulares: SKOV-3 e OVCAR-3. As linhagens celulares foram cultivadas separadamente em RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% v/v, 1% (v/v) de solução de antibiótico contendo 10.000 unidades de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina, bicarbonato de sódio (2%, m/v) e glicose (2%, m/v). Ambas foram incubadas a 5% de CO_2 a 37°C. Após atingir 70-80% de confluência, ambas linhagens foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) 1X, pH 7,4, tripsinizadas com tripsina diluída 1X para a SKOV-3 e 3X para a OVCAR-3. As linhagens celulares de adenocarcinoma de ovário, SKOV-3, foram gentilmente doada pelo professor Dr. Vladimir P. Torchilin, da Northeastern University, Boston, EUA, e a linhagem celular

OVCAR-3 foi gentilmente doada pela professora Dr.ª Kamilla Swiech Antonietto, da FCFRP - USP.

3.10.1 Avaliação da cinética de crescimento das linhagens celulares tumorais: SKOV-3 e OVCAR-3

As curvas de concentração celular pelo tempo foram obtidas a fim de caracterizar o crescimento das linhagens celulares de adenocarcinoma SKOV-3 e OVCAR-3 em um período de 7 dias. Sendo assim, 0,5 x 10^4 células.mL^{-1} de cada linhagem celular foram plaqueadas em 7 frascos de 25 cm^2 (n=2). As células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v), 1% (v/v) de solução de antibiótico contendo 10,000 unidades de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina, bicarbonato de sódio (2% m/v) e glicose (2% m/v), a 37 ºC e 5% de CO_2 por 7 dias. A cada dia, a concentração celular de cada linhagem celular foi determinada através da quantificação das células em uma câmara de contagem de Neubauer (Boeco, Alemanha) e através do método de exclusão por azul de Tripan 0,4% p/v.

3.10.2 Estudo *in vitro* da eficiência dos nanocarreadores desenvolvidos em linhagens celulares de adenocarcinoma SKOV-3 e OVCAR-3

A avaliação da eficiência dos nanocarreadores foi determinada através da avaliação da atividade mitocondrial das linhagens de adenocarcinoma de ovário SKOV-3 e OVCAR-3, através do método por resazurina. Neste estudo, as células foram semeadas em placa de 96 poços, em uma concentração de 1x10^3 células por poço e incubadas por 24 horas em meio RPMI-1640 completo, a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e umidade controlada, para a formação da monocamada celular. Após a adesão das células, o meio foi substituído por 100 µL dos meios de cultura com os tratamentos propostos nas concentrações de PCX de 0,1; 1; 10; 100 e 1000 nM (n=3), de acordo com os seguintes grupos:

- Grupo I: Controle negativo (células não tratadas);
- Grupo II: Controle positivo (DMSO 30%, v/v);
- Grupo III: PCX solubilizada em DMSO;

- Grupo IV: Taxol®;
- Grupo V: NP;
- Grupo VI: NPPCX;
- Grupo VII: NP-AF;
- Grupo VIII: NPPCX-AF.

O efeito do polímero e tensoativo na viabilidade celular foram testados e concentrações de partículas.mL^{-1} foram determinadas através de diluições seriadas a partir da suspensão de NP e NP-AF (sem PCX). Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, os sobrenadantes foram removidos, os poços foram lavados com 100 µL de PBS 1X e as células foram incubadas com 100 µL de solução de resazurina 0,025 $mg.mL^{-1}$ por 4 horas a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e umidade controlada. Após 4 horas, a fluorescência foi determinada através de um leitor de placas Biotek (modelo Synergy), utilizando o comprimento de onda de excitação de 570 e emissão de 600 nm. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados obtidos para as células incubadas foram comparados com as culturas incubadas somente com meio, considerando 100% de viabilidade celular.

3.10.3 Avaliação quantitativa do *uptake* e viabilidade celular através da citometria de fluxo

O *uptake* celular das nanopartículas funcionalizadas e não funcionalizadas foi avaliado através da citometria de fluxo, em linhagens celulares de adenocarcinoma SKOV-3 e OVCAR-3. Para a realização desta análise, as nanopartículas foram preparadas de acordo com os itens 3.5 e 3.6, através da técnica de nanoprecipitação, com a utilização do polímero PCL funcionalizado com BODIPY (PCL-BODIPY). Neste estudo, 1 x 10^6 células por poço foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas por 24 horas para em meio RPMI-1640 completo, a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e umidade controlada, para a formação da monocamada celular. Após 24 horas de incubação, os meios de cultura foram removidos e 2 mL das formulações de NP e NP-AF (sem PCX) diluídas em meio de cultura contendo a mesma diluição das formulações de nanopartículas correspondentes à 1.000 nM de PCX, foram adicionadas aos poços de tratamento. Da mesma forma, 2 mL de meio de cultura foi

adicionado como controle. As placas foram novamente incubadas e, após os tempos de tratamento de 1, 3 e 24 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e tripsinizadas por 10 minutos. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com 1 mL de meio de cultura, as suspensões de células foram centrifugadas a 1600 rpm por 10 minutos e o pellet de células formado foi ressuspendido em 1 mL de PBS 1X e transferido para um tubo de citometria (Falcon®, EUA). Antes da leitura foi adicionado 2 µL de iodeto de propídio 50 $\mu g.mL^{-1}$ em cada tubo para a análise da viabilidade e *uptake* celular. As análises foram realizadas em triplicatas em citômetro de fluxo FACSCanto (BD, EUA) equipado com Software FACSDiva versão 6.1.3 (BD, EUA), utilizando os comprimentos de onda de excitação de 488 nm e emissão 530 nm para o BODIPY e, 488 e 670 nm para o iodeto de propídio. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.10.4 Avaliação do *uptake* celular através da microscopia confocal

Para a avaliação do *uptake* celular em linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3 por microscopia confocal utilizou-se as formulações de NP e NP-AF (sem PCX) funcionalizadas com BODIPY, conforme descrito anteriormente. As formulações foram diluídas de maneira semelhante às diluições realizadas para a concentração de 1.000 nM de PCX nas formulações de nanopartículas contendo PCX. Neste procedimento 2 mL de meio de cultura contendo $1x10^6$ células por poço (n=3) foram semeadas em placas de 6 poços contendo lamínulas esterilizadas de 22x22 mm e mantidas por 24 horas a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e umidade controlada, para que ocorresse a adesão das células às lamínulas e formação da monocamada celular. Em seguida, adicionou-se 2 mL dos tratamentos em cada poço e as placas foram novamente incubadas por 24 horas. Após este período, o tratamento foi removido e os poços lavados com 1 mL de PBS 1X para completa remoção das formulações dos poços. As células foram fixadas utilizando 1 mL de paraformaldeido 2% (m/v) por 10 minutos. Em seguida, os poços foram lavados novamente com 1 mL de PBS 1X e 30 µL de solução de DAPI (0,3 $\mu g.mL^{-1}$) foram adicionados às lamínulas e as células permaneceram em repouso por 10 minutos. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1X e vertidas em lâminas histológicas contendo o meio de montagem Fluoromount®. Após 24 horas de repouso, as lâminas foram analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP8 com objetiva de imersão de 40 vezes e comprimentos de onda de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm para o BODIPY

e, 405 e 413-472 nm para o DAPI. Nesta análise foram empregados os mesmos parâmetros de intensidade do laser e de exposição para todas as amostras avaliadas.

3.11 Análise estatística

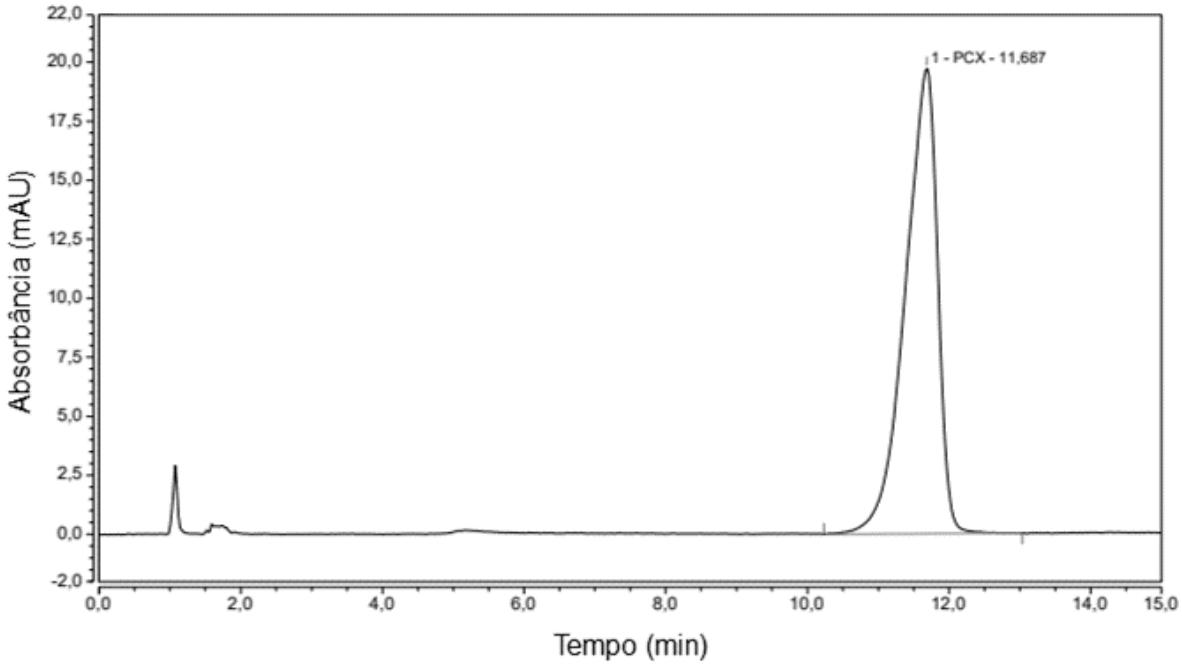
Os resultados obtidos nos ensaios de caracterização físico-química e biológica dos sistemas desenvolvidos foram submetidos a análise de variância, ANOVA uma via ou duas vias, dependendo do ensaio realizado, seguido da determinação do nível de significância das diferenças pelo teste de múltipla comparação Newman-Keuls. Valores de $p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$ e $p<0,0001$ foram considerados estatisticamente significativos. Para esta análise foi utilizado o *Software* GraphPad Prism® 5,0.

4. Resultados e discussão

4.1 Avaliação do método desenvolvido e validado para a quantificação do paclitaxel nas nanopartículas poliméricas

A primeira etapa da adaptação do método desenvolvido e validado correspondeu à avaliação da seletividade. A seletividade é um parâmetro importante, que deve ser realizado no início de um desenvolvimento e visa a análise de possíveis interferentes que possam prejudicar a quantificação do paclitaxel (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004). Na avaliação do filtrado das formulações NP e NP-AF não foi verificada a presença de pico cromatográfico no tempo de retenção do paclitaxel (11,7 minutos) (**Figura 10**) indicando que os componentes das nanopartículas sem fármaco não interferem na análise do fármaco encapsulado nas NP e NP-AF (**Figura 11 A e B**). Portanto, o método adaptado é seletivo para a quantificação do paclitaxel encapsulado em nanopartículas poliméricas.

Figura 10- Representação cromatográfica referente ao PCX.



Outro parâmetro avaliado foi a linearidade do método analítico, que se refere à proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta obtida, sendo realizada através da obtenção de 3 (três) curvas analíticas compreendendo o intervalo entre 0,25 a 15 µg.mL^{-1}, seguida da avaliação do coeficiente de variação (CV%) e do coeficiente de correlação linear (r) ((ANVISA, 2003). As respostas obtidas foram diretamente proporcionais à concentração da amostra para o intervalo determinado, considerando-se os valores de r^2>0,999, apresentando-se linear de 0,25 a 15,0 µg.mL^{-1}. Desta forma, o método se mostrou linear, apresentando uma equação da reta: y = 0,7127x – 0,0137, conforme demonstrado na **Figura 12**.

Figura 11- Representação cromatográfica referente ao filtrado da nanopartícula sem PCX, sendo A: NP e B: NP-AF.

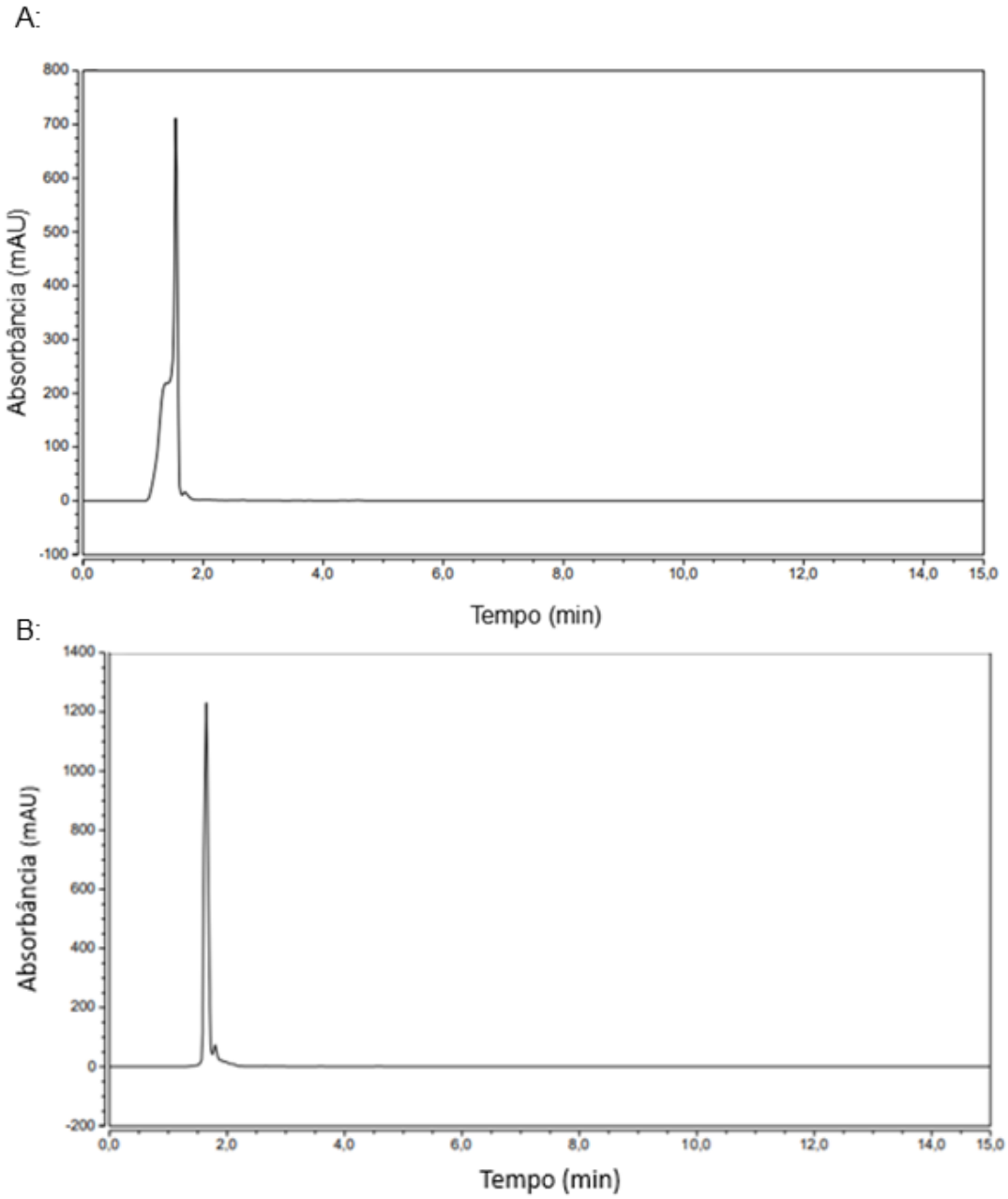
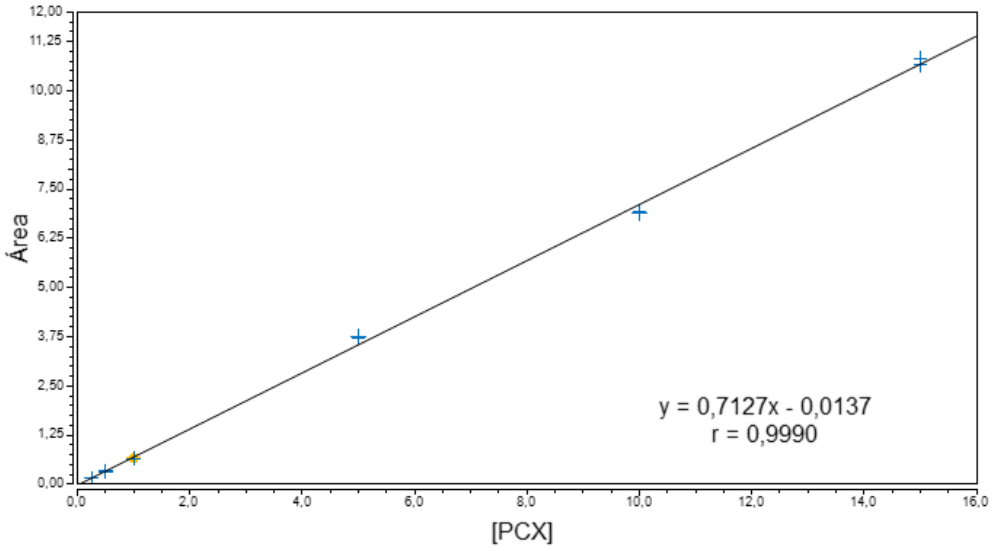


Figura 12- Curva analítica do paclitaxel analisado por CLAE.



Para que a análise do fármaco seja reprodutível, o método deve ser preciso, ou seja, deve apresentar pequena dispersão entre resultados de leitura de uma mesma concentração, e exato, o que é representado pelo grau de concordância entre resultados individuais em um mesmo ensaio, ou ensaios independentes, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005).

Os resultados da precisão do método foram avaliados através do coeficiente de variação (CV), calculado pela razão do desvio padrão com a média dos valores obtidos, como mostra a Tabela 2. Nesta tabela observa-se que o método foi preciso tanto para a repetibilidade, cujo CV máximo foi de 2,8% para a menor concentração analisada, 0,25 $\mu g.mL^{-1}$, e precisão interensaio, onde o CV máximo correspondeu a 2,87% para o limite de quantificação inferior 0,25 $\mu g.mL^{-1}$.

Tabela 2- Precisão do método cromatográfico utilizado na análise de PCX.

Repetibilidade / Conc. teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	0,25	5,0	15,0
N	9	9	9
CV(%)	2,80	0,32	0,90
Precisão Intermediária / Conc. teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	0,25	5,0	15,0
N	3	3	3
CV (%)	2,87	1,51	1,01

Legenda: Conc.: concentração; n: número de replicatas.

Os resultados apresentados na **Tabela 3** mostram que o método desenvolvido foi exato, visto que os desvios com relação aos valores nominais mantiveram-se entre 92,73 e 105,36%, para um mesmo dia de análise, e entre 93,10 e 105,04%, para ensaios em dias diferentes.

Tabela 3- Exatidão do método cromatográfico utilizado na análise de PCX.

Exatidão Intraensaio / Conc. teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	0,25	5,0	15,0
N	9	9	9
E(%)	92,73	105,36	100,72
Exatidão Interensaio / Conc. Teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	0,25	5,0	15,0
N	3	3	3
E(%)	93,10	105,04	99,50

Legenda: Conc.: concentração; n: número de replicatas.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de linearidade, precisão e exatidão, o limite de quantificação do paclitaxel foi considerado de 0,25 $\mu g.mL^{-1}$, enquanto que o limite de detecção do PCX, com base no ruído da linha de base, foi considerado de 0,16 $\mu g.mL^{-1}$.

O método desenvolvido e adaptado de YANG e colaboradores (2007) apresentou-se seletivo, linear, exato e preciso, de acordo com as recomendações da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (2005) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003).

4.2 Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo paclitaxel

As nanopartículas poliméricas foram preparadas, segundo proposto por Fessi e colaboradores (1989), através da técnica de Nanoprecipitação, com algumas adaptações (FESSI et al., 1989). Também denominada de precipitação de polímero pré-formado, tem sua tensão interfacial diminuída quando o solvente, miscível em água, é adicionado à fase aquosa. Logo após essa adição, o solvente se difunde rapidamente através da água e o polímero precipita juntamente com o fármaco, formando as nanopartículas (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

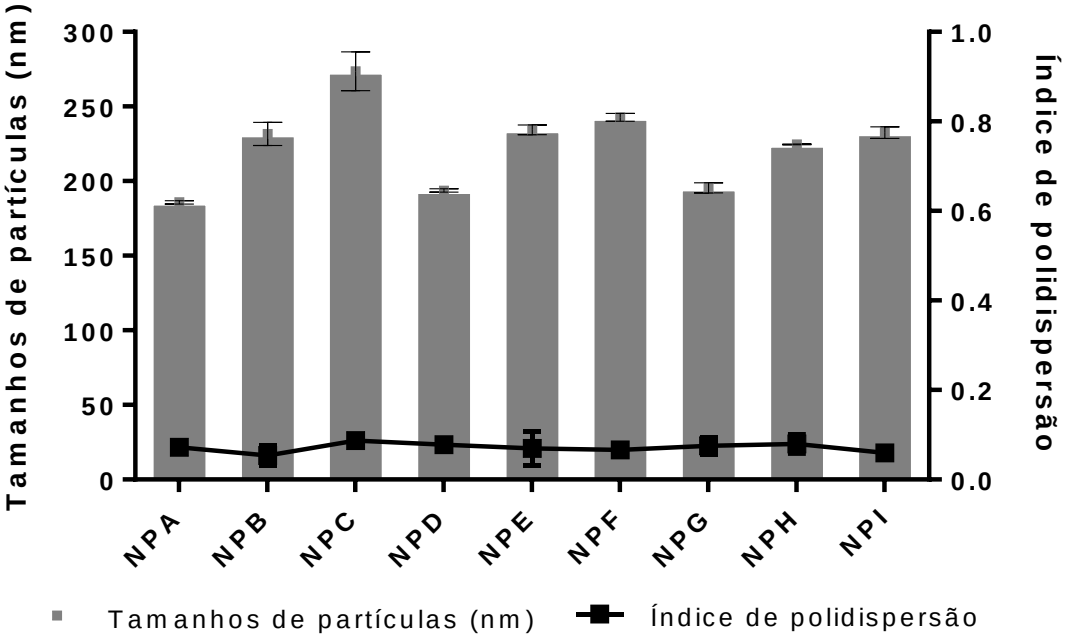
Esta técnica utiliza solventes de menor toxicidade e é simples de ser executada, pois apresenta um passo único de desenvolvimento e de fácil transposição de escala. O processo não requer alta tensão de cisalhamento, sonicação ou altas temperaturas. Essa técnica foi desenvolvida principalmente para fármacos hidrofóbicos e solventes miscíveis em água, tais como etanol, acetona, entre outros (FESSI et al., 1989; LEGRAND et al., 2007; NORDSTRÖM, 2011). No entanto, com o intuito de evitar agregação das partículas e conferir maior estabilidade ao sistema, necessita de tensoativo no seu preparo. Dentre os diversos tensoativos, o P407 é um dos mais utilizados devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e aprovação pela FDA para uso pela via endovenosa. Além disso, as cadeias de polioxipropileno do P407, que são ligados à superfície das nanopartículas permitem com que as cadeias hidrofílicas de polioxietileno apresentem um revestimento estérico à partícula. Dessa forma, a adsorção de proteínas plasmáticas à superfície das nanopartículas é dificultada, o que reduz a captura das nanopartículas pelo fígado e baço além de permitir a obtenção de partícula com diâmetro compatível com a via de administração endovenosa. Este tamanho deve ser estritamente controlado, pois os menores capilares sanguíneos possuem diâmetro entre 4-7 µm e o tamanho nanométrico das partículas evita a oclusão destes e facilita a distribuição do fármaco (CHORNY et al., 2002; MAINARDES; EVANGELISTA, 2005). Estudos afirmam que o diâmetro médio da nanopartícula deve ser menor que 200 nm para evitar fagocitose por macrófagos, garantindo, assim, um tempo maior na corrente sanguínea (AVERINENI et al., 2012).

Sendo assim, o diâmetro médio das nanopartículas possui um efeito relevante no tempo de permanência na corrente sanguínea, no extravasamento, no direcionamento de partículas, na imunogenicidade, na internalização e na degradação de partículas. Dessa forma, o tamanho das nanopartículas influencia no transporte e adesão nos vasos sanguíneos, podendo, também, refletir no seu *clearance* (ENAYATI et al., 2010). Além disso, partículas menores que 200 nm tendem a se acumular em tumores sólidos devido ao aumento do efeito EPR (AVERINENI et al., 2012).

De acordo com a **Figura 10**, referente aos ensaios de otimização das nanopartículas não funcionalizadas sem PCX, podemos observar que com relação à proporção fase orgânica: aquosa, o aumento da quantidade de água manteve o tamanho de partícula, em torno de 190 nm com PdI menor que 0,1, considerando as formulações com a mesma quantidade de PCL. No entanto, o aumento da quantidade

de PCL na fase orgânica aumentou o tamanho das partículas, possivelmente devido ao aumento da viscosidade da formulação (FONSECA; SIMÕES; GASPAR, 2002).

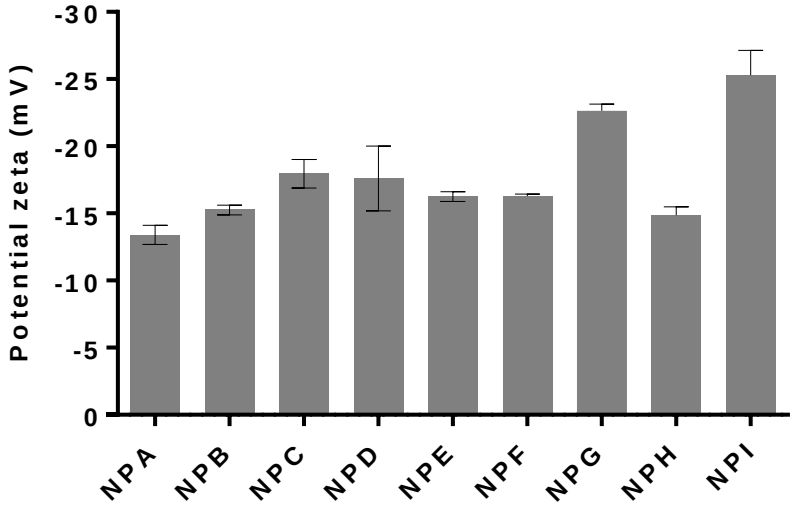
Figura 10- Representação gráfica dos resultados de tamanhos e PdI das diferentes formulações de nanopartículas de PCL sem PCX (n=2).



Para a caracterização dos sistemas, a determinação do potencial zeta constitui um parâmetro importante e nos fornece informações sobre o potencial eletrostático das nanopartículas em suspensão. Esse valor está relacionado com a estabilidade da dispersão e com as propriedades de superfície da partícula, tais como a carga superficial (RUPALI et al., 2012). Os valores de potencial zeta são influenciados pela carga dos diferentes componentes das nanopartículas, polímero, fármaco e tensoativos utilizados no preparo (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Para partículas que apresentam apenas estabilidade elétrica, valores de potencial zeta em módulo igual ou superior a 30 mV são considerados favoráveis para a promoção da estabilidade das dispersões coloidais. Além disso, um potencial zeta neutro ou negativo são preferidos para partículas destinadas a administração endovenosa. A carga neutra ou carga negativa possui a vantagem de evitar a interferência por componentes *in vivo* do plasma. Já um potencial zeta positivo frequentemente causa toxicidade devido a afinidade de ligação intrínseca em relação aos componentes celulares (SATHYAMOORTHY et al., 2017).

De acordo com os resultados da **Figura 11,** a determinação do potencial zeta resultou em valores negativos, compreendidos entre -13,9 a -26,6 mV. O valor negativo do potencial zeta pode ter ocorrido devido à adsorção do tensoativo na superfície das nanopartículas, em que as cadeias de hidrocarbonetos do mesmo interagem com as regiões hidrofóbicas da parede do polímero (PCL) e a porção hidrofílica do tensoativo fica exposta na fase aquosa, gerando o potencial zeta negativo (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; LINCE; MARCHISIO; BARRESI, 2008). Além da estabilidade elétrica, o polímero e o tensoativo utilizados no preparo das nanopartículas poliméricas conferem às partículas uma estabilidade estérica, conferindo uma maior estabilidade ao sistema (ATTWOOD, 2013). Dessa forma, pode-se sugerir que as formulações desenvolvidas apresentam estabilidade elétrica e estérica.

Figura 11- Resultados dos potenciais zeta das diferentes formulações de nanopartículas de PCL sem PCX (n=2).



Após o processo de otimização das formulações de nanopartículas de PCL sem PCX e análise dos parâmetros de distribuição de tamanhos, PdI e potencial zeta de todas as formulações, as três formulações (NPA, NPD e NPE), que apresentaram reduzidos valores de tamanhos de partículas (172,9; 192,9 e 235,8, respectivamente), baixo PdI (0,05; 0,071 e 0,096, respectivamente) e perfis de distribuição de tamanhos monomodais, foram selecionadas para continuar os estudos de otimização com a adição do PCX às formulações.

4.2.1 Incorporação de paclitaxel nas nanopartículas poliméricas

Após a otimização das nanopartículas, PCX foi adicionado à fase orgânica das formulações e de acordo com a quantidade de fase aquosa de cada formulação, as concentrações finais de cada formulação foram: 500 µg.mL^{-1} de PCX para NPPCX-D e NPPCX-E e 1.000 µg.mL^{-1} para NPPCX-A.

De acordo com a **Figura 12**, podemos afirmar que houve alterações nos parâmetros de distribuição de tamanhos, apresentando tamanhos de partículas de 142,5 ± 3.53; 142,1 ± 0,56 e 156,4 ± 0,42, respectivamente para as formulações NPPCX-A, NPPCX-D e NPPCX-E, comparado com as formulações sem PCX. No entanto, os resultados de índice de polidispersão mantiveram-se semelhantes aos resultados obtidos para as nanopartículas sem PCX, menor que 0,08.

Os valores do potencial zeta, de acordo com os resultados da **Figura 16**, permaneceram negativos, -19,9, -24,4 e -25,8 mV para as formulações NPPCX-A, NPPCX-D e NPPCX-E, respectivamente, não apresentando diferenças com as formulações sem PCX. Além disso, ao avaliar a eficiência de encapsulação nas três formulações, obtivemos valores próximos a 100% (**Figura 17**).

Figura 12- Representação gráfica dos resultados de tamanhos e PdI das formulações de nanopartículas de PCL com PCX (n=2).

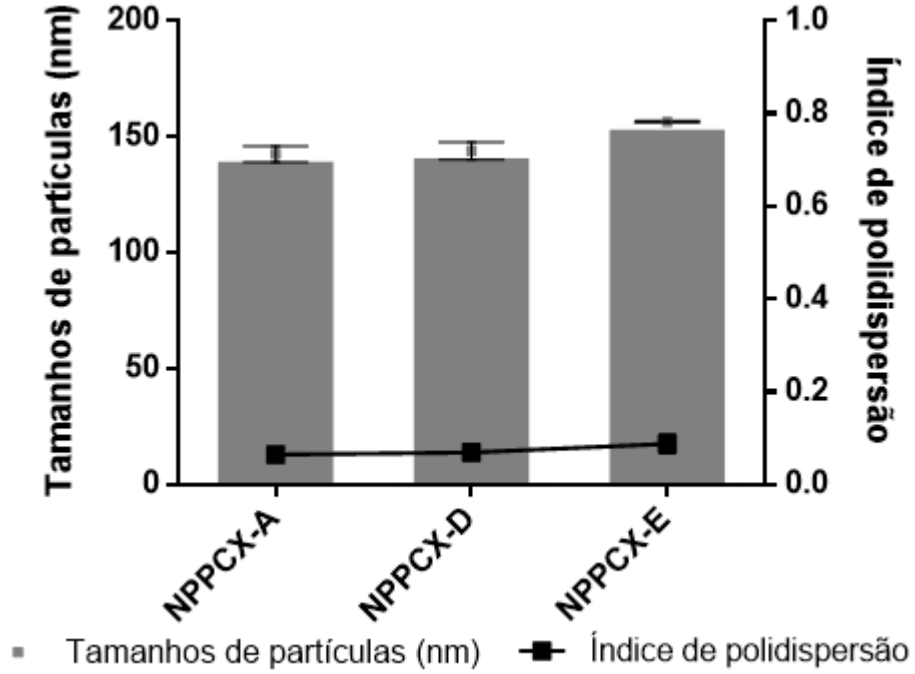


Figura 13- Resultados do potencial zeta das formulações NPPCX-A, NPPCX-D e NPPCX-E (n=2).

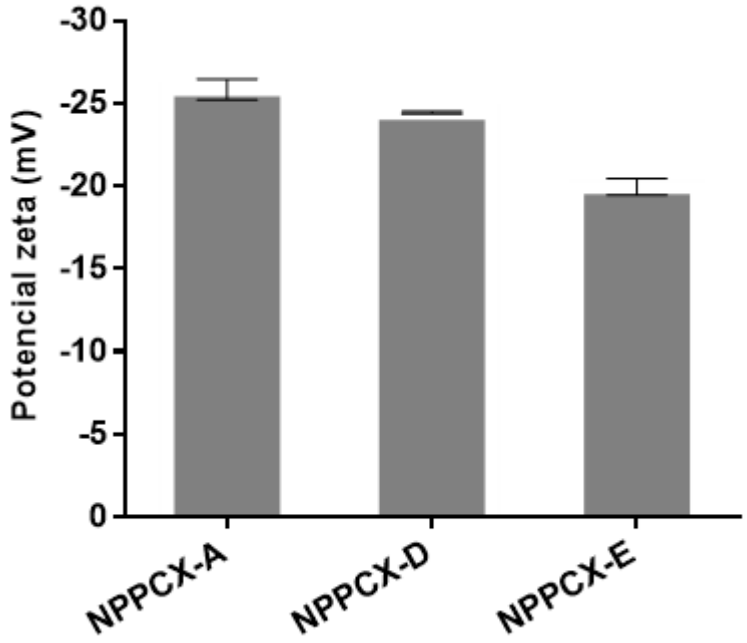
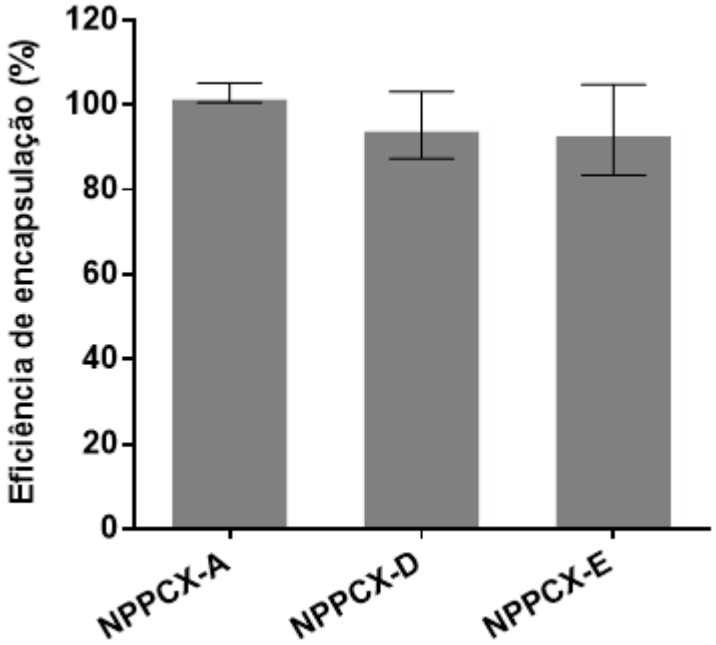


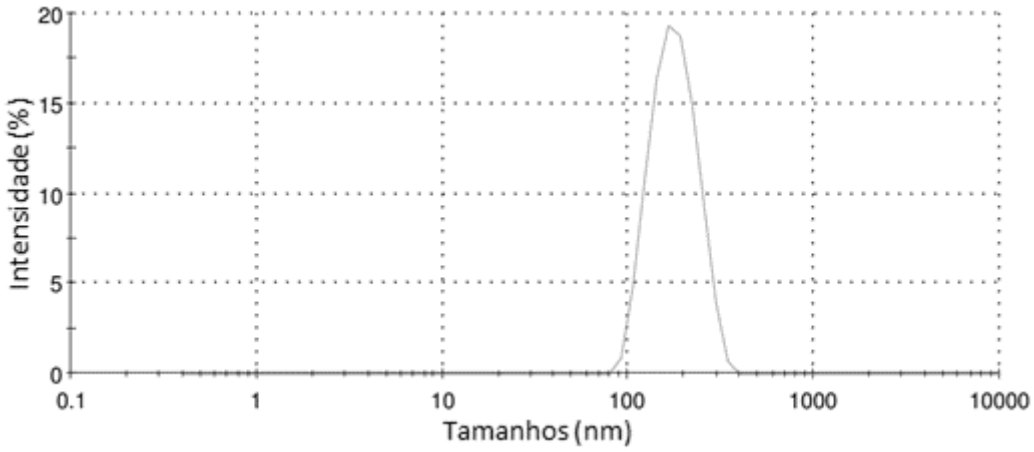
Figura 14- Resultados da eficiência de encapsulação das formulações NPPCX-A, NPPCX-D e NPPCX-E (n=2).



Diante de toda a otimização dos parâmetros críticos do desenvolvimento de uma formulação, embora não tenha tido diferença estatística entre as três formulações, a escolha foi feita baseada no menor custo de produção (menos solvente

e polímero no preparo). Dessa forma, a formulação NPPCX-A (proporção FA:FO de 1:1 e fármaco: polímero de 1:5) foi escolhida para prosseguirmos os estudos por ter apresentado um tamanho de partícula de aproximadamente 140 nm (**Figura 15**), sendo um tamanho adequado para a via de administração endovenosa; um índice de polidispersão de 0,06 com perfil de distribuição de tamanho monomodal; um potencial zeta de -19,9 mV e uma eficiência de encapsulação de 100%. Cirstoiu e colaboradores (2009) desenvolveram nanopartículas poliméricas de PLA contendo paclitaxel e obtiveram resultados semelhantes, apresentando tamanho de partícula em torno de 170 nm e eficiência de encapsulação de 78%. O tamanho, a distribuição dos tamanhos das partículas e a eficiência de encapsulação são fatores críticos que podem afetar a liberação do fármaco, bem como o acúmulo nos tecidos devido ao aumento do efeito EPR e a biodisponibilidade, influenciando diretamente na eficiência da formulação (CIRSTOIU-HAPCA et al., 2009; MAEDA; NAKAMURA; FANG, 2013).

Figura 15- Representação gráfica do perfil de distribuição de tamanhos da formulação NPPCX-A obtido pela técnica de DLS.



4.2.2 Preparo das nanopartículas poliméricas contendo paclitaxel funcionalizadas com ácido fólico

Os tamanhos de partículas obtidos após o preparo das formulações com P407-AF foi de 159,1 e 154,6 nm para NP-AF (**Figura 16**) e NPPCX-AF (**Figura 17**), respectivamente, com valores de indices de polidispersão em torno de 0,05 e valores de potenciais zeta de -23,9 e -24,2 mV para as formulações NPPCX-AF e NP-AF, respectivamente. Os nanocarreadores funcionalizados com AF apresentaram potencial zeta negativo (-24,2 mV) assim como os nanocarreadores não

funcionalizados (-19,9 mV), provavelmente devido aos grupamentos aminoácidos protonados, o que torna o sistema mais estável (HEIDARIAN et al., 2015).

Esses parâmetros avaliados são importantes no tempo de fluxo sanguíneo, direcionamento da partícula, imunogenicidade, degradação da partícula e *uptake* celular. O tamanho da partícula menor que 200 nm influencia no transporte e adesão nos vasos sanguíneos, podendo refletir no seu clearance (ENAYATI et al., 2010). Além disso, as nanopartículas funcionalizadas com folato são importantes para o direcionamento das mesmas ao local de ação via reconhecimento de receptores de folato através da endocitose (MITTAL; PATEL; SHETH, 2010).

Figura 16- Representação gráfica do perfil de distribuição de tamanhos das formulações NP-AF obtidos pela técnica de DLS.

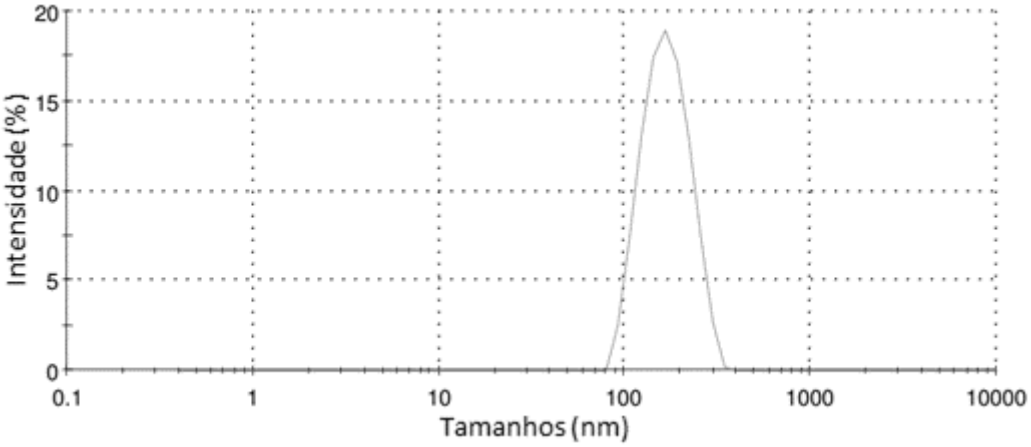
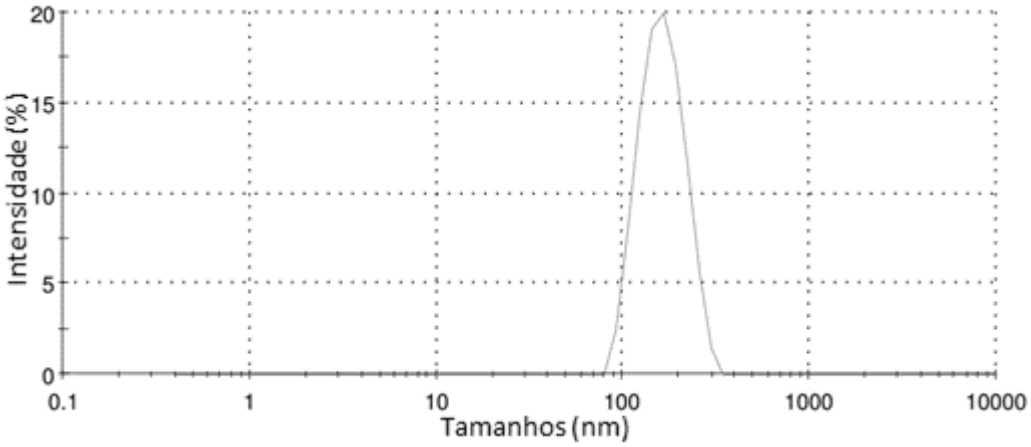


Figura 17- Representação gráfica do perfil de distribuição de tamanhos das formulações NPPCX-AF obtidos pela técnica de DLS.



4.2.4 Preparo das nanopartículas poliméricas sem PCX com PCL-BODIPY

O BODIPY é um composto fluorescente muito utilizado no preparo de nanocarreadores para a avaliação do *uptake* celular em técnicas como citometria de fluxo e microscopia confocal. Este composto, por apresentar grupamento metila, apresenta maior estabilidade e solubilidade em solvente orgânico. Além disso, sua síntese é considerada simples, não forma agregados e apresenta alto rendimento quântico (REZENDE, 2016).

Após o preparo das nanopartículas poliméricas funcionalizadas com BODIPY, foram realizadas as análises de distribuição de tamanhos, PdI e potencial zeta. A formulação NP-BODIPY apresentou tamanho de partículas de 149,6 nm, PdI de 0,094 e potenciais zeta de -24,6 mV, valores próximos aos encontrados na formulação sem a adição de BODIPY. No entanto, a formulação NP-BODIPY-AF apresentou tamanho de partícula de 256 nm, PdI de 0,214 e potencial zeta de -23,6 mV, sendo superior ao tamanho apresentado pela formulação NP-AF. O tamanho e distribuição do tamanho de partículas são muito importantes para que as partículas sejam internalizadas, pois partículas com tamanhos menores que 400 nm tendem a acumularem no tecido tumoral devido ao efeito EPR (BERNABEU et al., 2014). Desta forma, apesar do tamanho superior das formulações desenvolvidas contendo BODIPY, estas foram consideradas adequadas para serem utilizadas na condução dos ensaios de *uptake* celular por citometria de fluxo e microscopia confocal.

4.3 Análise do rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento das nanopartículas (NTA, do inglês *nanoparticle tracking analysis*) é uma técnica que se baseia na dispersão de luz ocasionada pelas partículas em suspensão que analisa individualmente o movimento Browniano de cada nanopartícula presente na dispersão (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). Através desta técnica foi possível caracterizar o tamanho, a distribuição de tamanhos (índice de SPAN) e a concentração das nanopartículas por mililitro. Além disso, esta técnica fornece informações visuais das partículas sendo possível avaliar a agregação em função do tempo em diferentes meios de cultura (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010; HOFFMEISTER et al., 2012).

As medidas foram realizadas em triplicata, com os dados expressos como a média ± desvio padrão. Os diâmetros médios das partículas avaliadas por espalhamento dinâmico de luz foram de 172,9, 140, 154,6 e 159,1 nm para as formulações NP, NPPCX, NP-AF e NPPCX-AF, respectivamente, enquanto que os tamanhos das mesmas avaliadas pelo NTA foram de 172,7 ± 23, 135,3 ± 31,7, 131,5 ± 30,6 e 137,4 ± 29,9 nm, respectivamente (**Figura 18** e **Figura 19**). Com relação ao índice de polidispersão das amostras, a monodispersão de uma amostra pode ser avaliada pelo índice de SPAN (XIAO et al., 2005), sendo calculado com base na D90, D50 e D10 através da fórmula: SPAN = (D90-D50) / D10. Segundo Xiau e colaboradores (2005), quanto maior o valor de SPAN, maior a polidispersão da amostra. Dessa forma, o índice SPAN das formulações foram 0,24, 0,61, 0,49, e 0,45, respectivamente para as formulações NP, NPPCX, NP-AF e NPPCX-AF. Nesse caso, o valor de PdI pela técnica de DLS das amostras foram inferiores aos encontrados no NTA, o que pode ser explicado através da análise por distribuição de tamanho, enquanto que no DLS as análises são dadas através da intensidade da luz espalhada, no NTA nos apresenta a distribuição por número, o que pode acarretar em uma maior alteração nos valores de polidispersão e SPAN (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010).

Figura 18- Representação gráfica da relação da distribuição de tamanhos das partículas e concentrações de partículas.mL^{-1} das formulações A: NP e B: NPPCX.

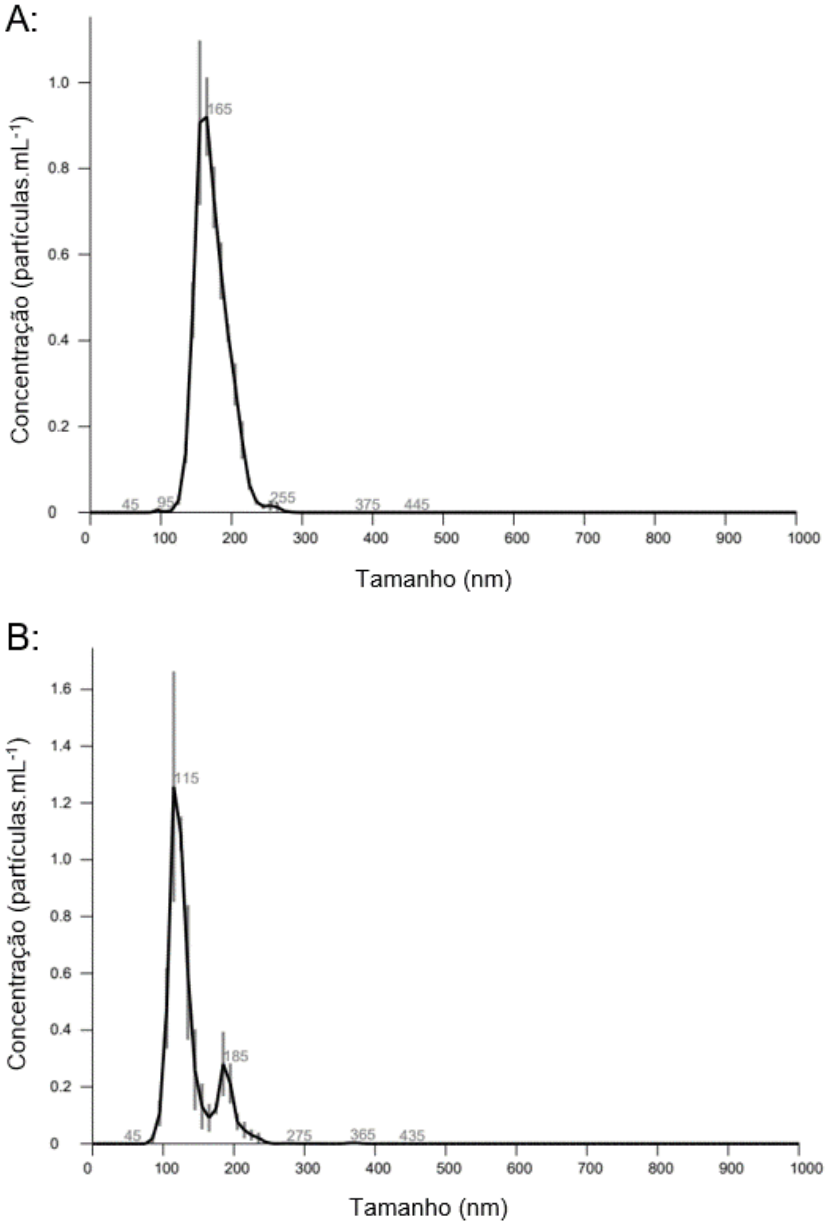
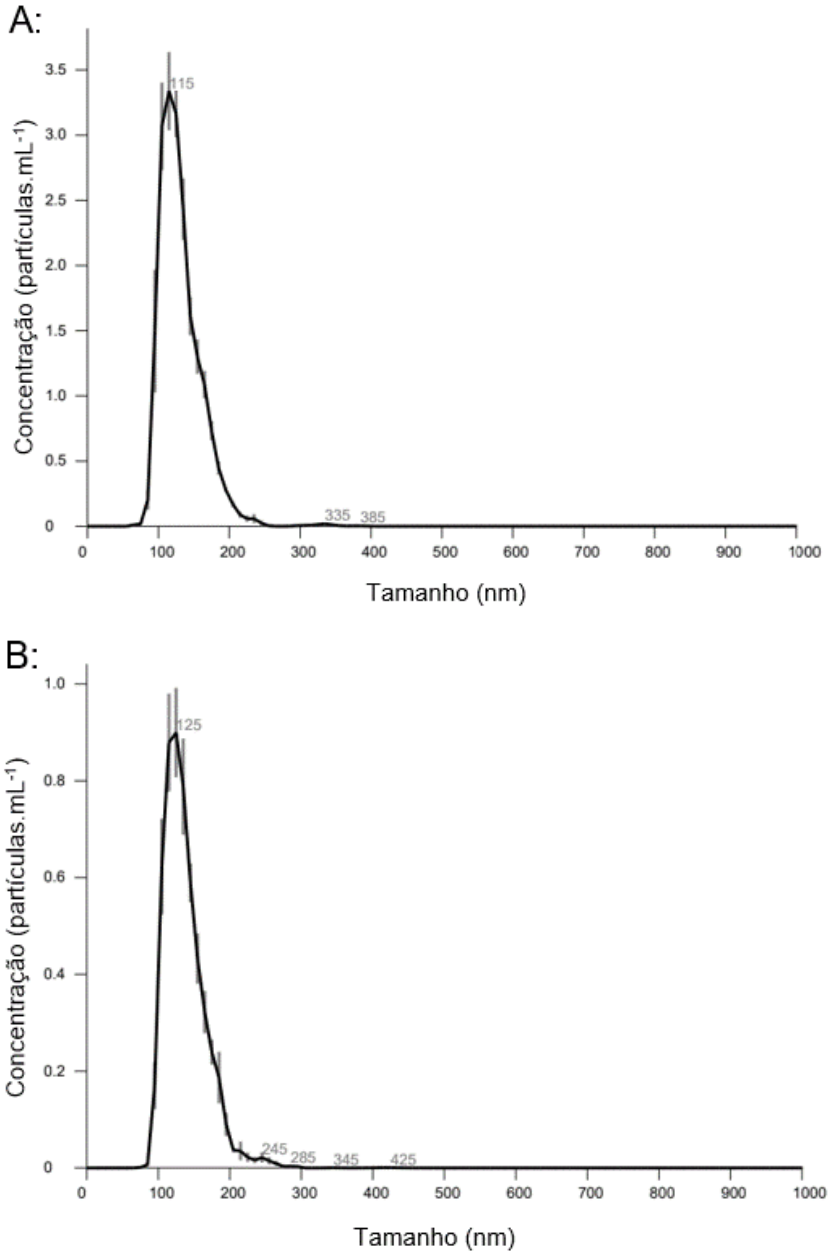


Figura 19- Representação gráfica da relação da distribuição de tamanhos das partículas e concentrações de partículas. mL^{-1} das formulações A: NP-AF e B: NPPCX-AF.



Além do tamanho de partículas, o NTA expressa a concentração de partículas.mL^{-1} de formulação. As formulações NP, NP-PCX, NP-AF e NP-PCX-AF obtiveram concentrações de $4,69 \times 10^{11} \pm 2,81 \times 10^{10}$, $4,8 \times 10^{12} \pm 1,87 \times 10^{11}$, $1,97 \times 10^{12} \pm 3,07 \times 10^{10}$ e $5,39 \times 10^{12} \pm 2,14 \times 10^{11}$ partículas.mL^{-1}, respectivamente. Essa determinação da concentração é importante para a avaliação da dose a ser utilizada nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Khanbeigi e colaboradores (2012) avaliaram o impacto das doses de nanopartículas em análises *in vitro* através de interações entre a partícula e as células indicando que nos estudos com nanopartículas o ideal é

expressar a dose em concentração de nanopartículas por volume e não em massa por volume (KHANBEIGI et al., 2012).

4.4 Estabilidade coloidal dos nanocarreadores desenvolvidos

Os tamanhos de partículas, índices de polidispersão, potenciais zeta e eficiências de encapsulação dos nanocarreadores desenvolvidos (NPPCX e NPPCX-AF) foram avaliados em um estudo de estabilidade em função do tempo. O estudo foi realizado em ambiente refrigerado a 4ºC, durante 21 dias, sendo avaliado os tempos 0, 7, 14 e 21 dias. Comparando os resultados dos valores de tamanhos de partículas e PdI das formulações NPPCX e NPPCX-AF (**Figura 23** e **Figura 24**), pode-se afirmar que os mesmos permaneceram próximos aos valores obtidos no tempo inicial de análise (tempo 0), sem apresentar alteração estatisticamente significativa. No tempo inicial de análise, os tamanhos de partículas obtidos para as formulações NPPCX e NPPCX-AF foram de 144,2 ± 4,5 nm e 153,6 ± 15,1 nm, respectivamente, e após 21 dias, 195,2 ± 17 nm e 156,3 ± 9,9 nm, respectivamente. O mesmo perfil foi observado para os valores de PdI, apresentando, no tempo 0, valores de 0,065 ± 0,03 para a formulação NPPCX e 0,14 ± 0,075 para a formulação NPPCX-AF. Após 21 dias de análise, os valores de PdI encontrados foram de 0,155 ± 0,1 e 0,15 ± 0,08, respectivamente. Além disso, devido às características do polímero, não houve a degradação da matriz polimérica durante os 21 dias, fazendo com a eficiência de encapsulação do PCX se mantivesse em torno de 100%. Os valores obtidos não apresentaram alteração estatisticamente significativa.

Com esses resultados, pode-se afirmar que as formulações mantiveram valores de tamanhos de partículas com PdI reduzidos e perfis de distribuição de tamanhos monomodais o que é importante para a promoção do direcionamento passivo através do efeito EPR. Além disso, a estabilidade das formulações por 21 dias foi importante para garantir as características dos nanocarreadores durante o uso nos ensaios de viabilidade e internalização celular.

Figura 20- Representação gráfica dos tamanhos de partículas e PdI da formulação NPPCX durante 21 dias de armazenamento (n=2), avaliados pelo teste ANOVA de uma via, seguido de teste de Newman-Keuls.

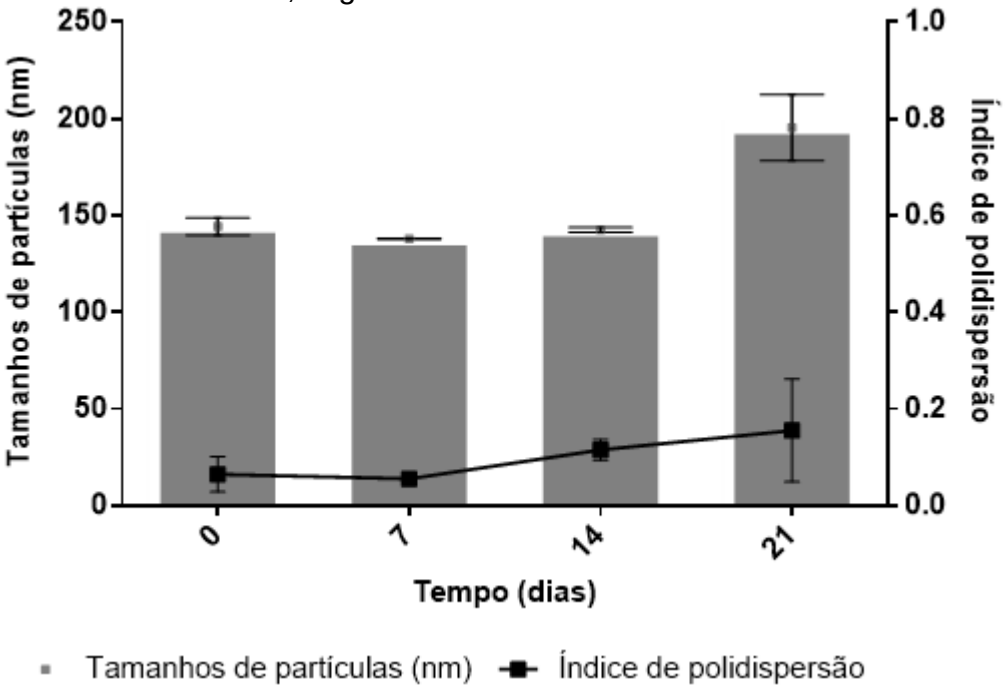
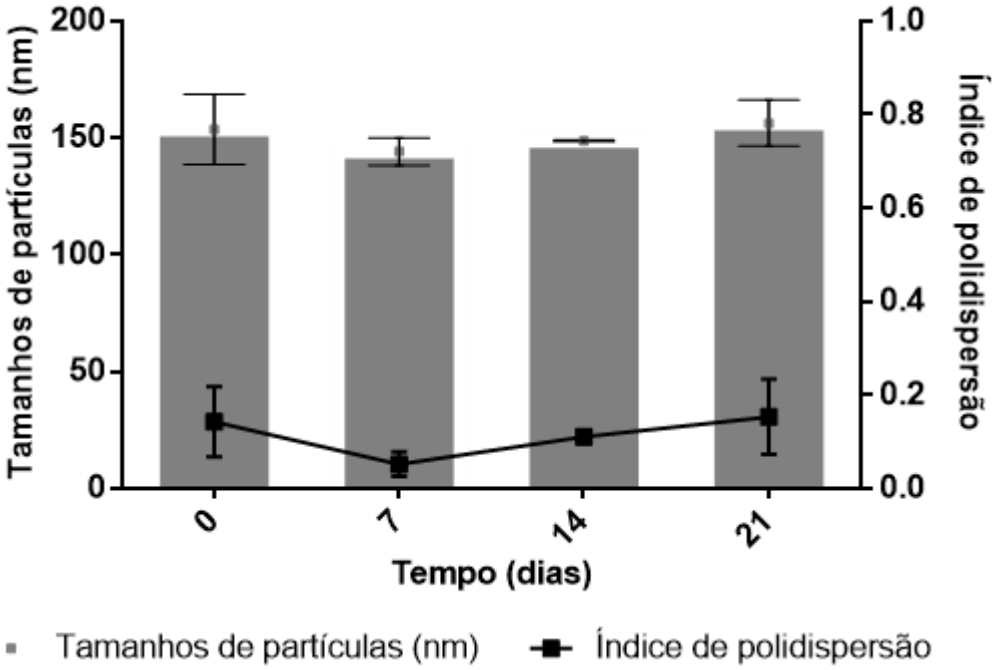


Figura 21- Representação gráfica dos tamanhos de partículas e PdI da formulação NPPCX-AF durante 21 dias de armazenamento (n=2) , avaliados pelo teste ANOVA de uma via, seguido de teste de Newman-Keuls.



De acordo com as **Figura 22** e **Figura 23**, os valores obtido de potencial zeta relacionam-se a estabilidade eletroestérica das nanopartículas poliméricas, variando

de -22,05 a -23,15 mV e -21,9 a -23,9 mV, nos tempos de armazenamento de 0 e 21 dias, para as formulações NPPCX e NPPCX-AF, respectivamente.

Figura 22- Representação gráfica do potencial zeta da formulação NPPCX durante 21 dias de armazenamento (n=2), avaliados pelo teste ANOVA de uma via, seguido de teste de Newman-Keuls.

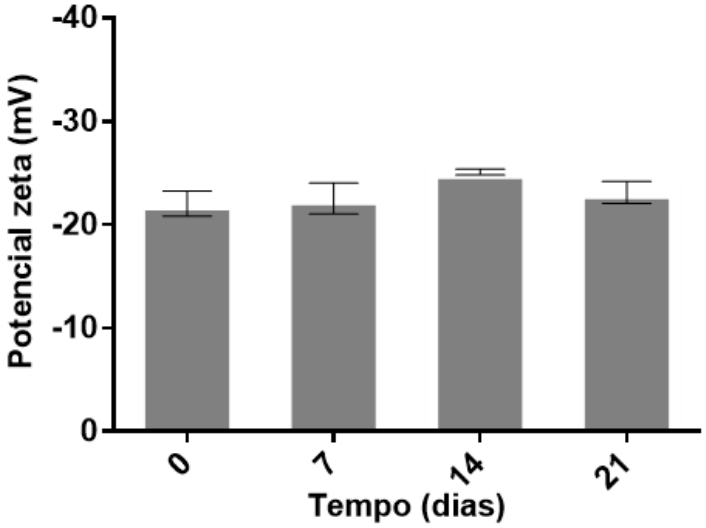
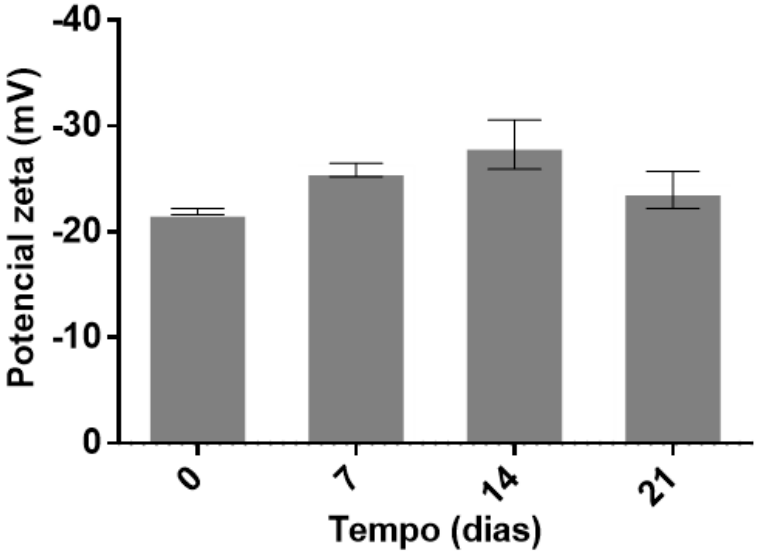


Figura 23- Representação gráfica do potencial zeta da formulação NPPCX-AF durante 21 dias de armazenamento (n=2) , avaliados pelo teste ANOVA de uma via, seguido de teste de Newman-Keuls.

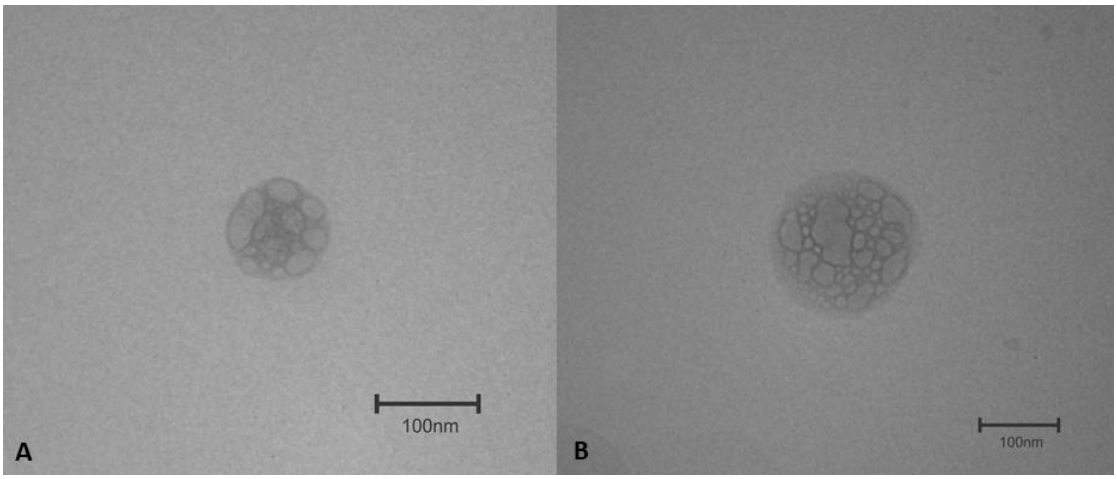


4.5 Caracterização morfológica das nanopartículas através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A morfologia das formulações NPPCX e NPPCX-AF foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão e de acordo com a **Figura 24**, podemos

observar uma morfologia esférica para ambas as formulações, sendo os diâmetros encontrados menores do que os obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. As análises obtidas por TEM demonstraram tamanhos menores, pois no processo de preparo das amostras para análise ocorreu uma desidratação das mesmas resultando em uma retração de tamanho das partículas (HAN et al., 2016).

Figura 24- Avaliação da morfologia das formulações NPPCX (A) e NPPCX-AF (B) por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com aumento de 100.000 vezes.

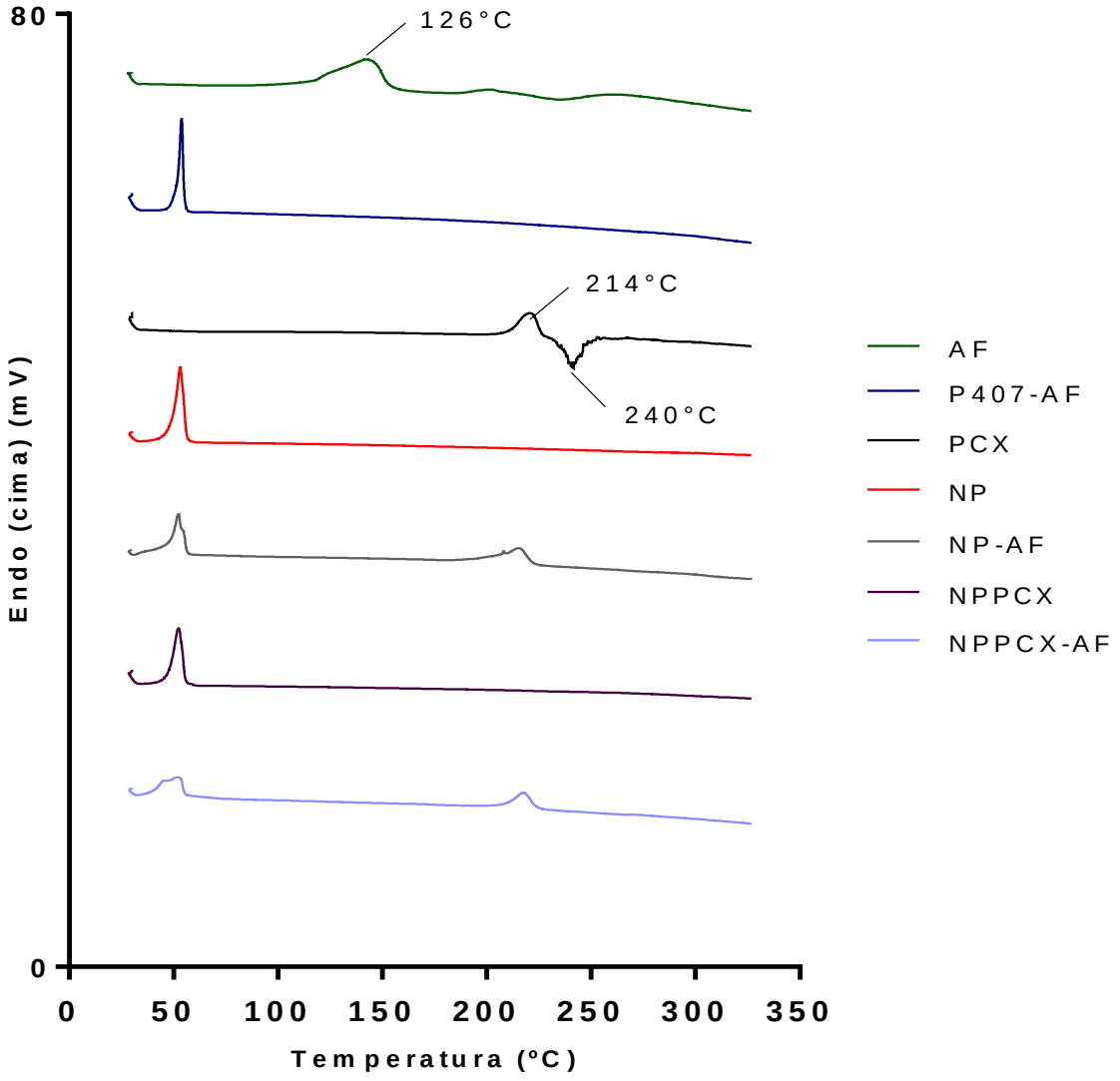


4.6 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Os resultado obtidos por meio da análise de DSC, representados na **Figura 25**, indicam a presença de dois picos característicos do PCX, o pico endotérmico em 219ºC, e o exotérmico a 241ºC (GUPTA et al., 2014). Nas formulações NPPCX e NPPCX-AF esses picos não apareceram, sugerindo que o mesmo esteja completamente encapsulado ou no seu estado amorfo. Estudos demonstraram resultados semelhantes nas análises de DSC, no qual não foi observado o pico do PCX nas nanopartículas contendo o fármaco, indicando que o PCX se encontra em sua forma amorfa nos nanocarreadores (CIRSTOIU-HAPCA et al., 2009; ELOY et al., 2016).

O pico endotérmico do AF encontra-se em 126ºC (PILLAI et al., 2014), no entanto, não foi observado nas nanopartículas funcionalizadas pois o AF encontra-se ligado covalentemente ao P407. Além disso, o mesmo encontra-se em uma quantidade reduzida comparado a quantidade de outros componentes, o que dificultou o aparecimento desse pico nas curvas de NP-AF e NPPCX-AF.

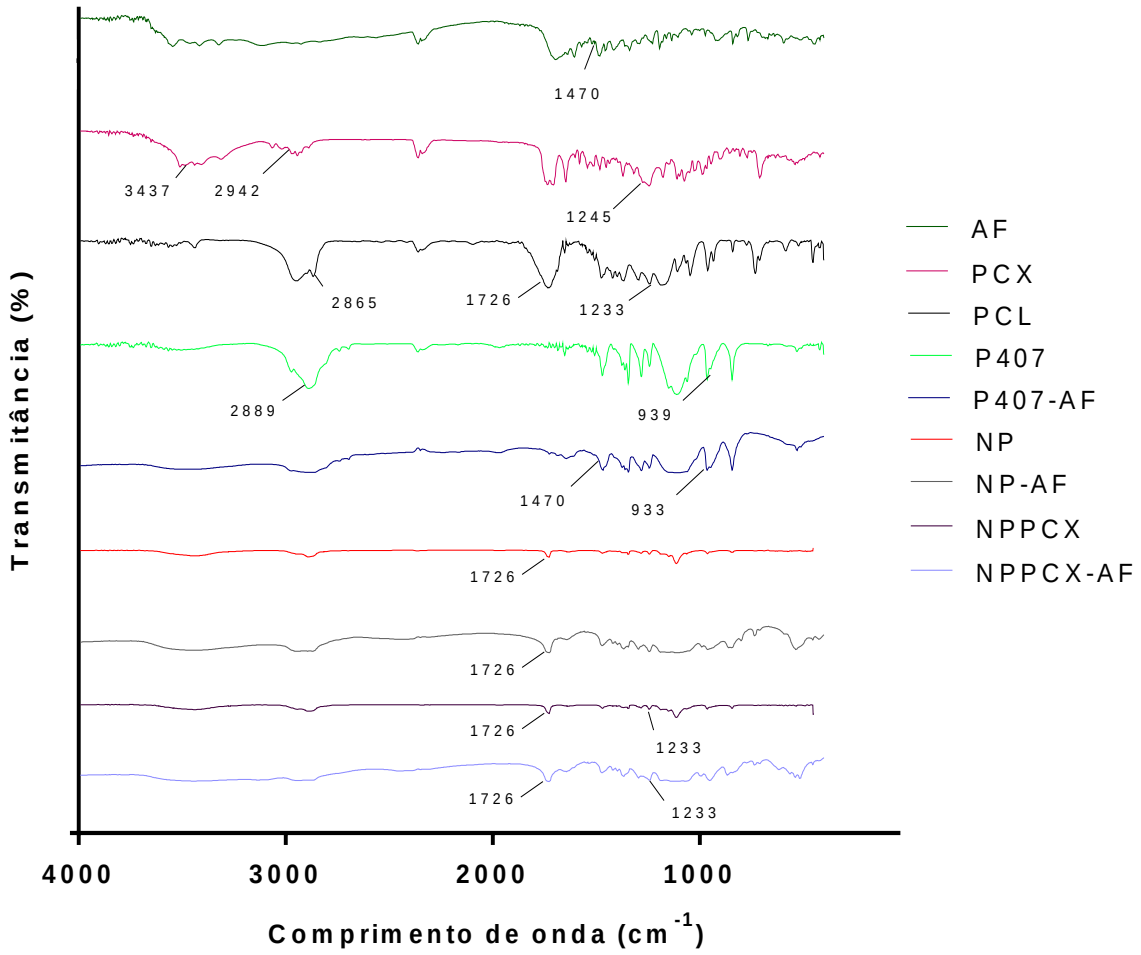
Figura 25- Curvas de DSC das amostras de AF, PCX, P407-AF, NP, NP-AF, NPPCX, NPPCX-AF, de 30 a 330°C, sob taxa de aquecimento de 10°C/min.



4.7 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A análise de FT-IR foi realizada para averiguar possíveis interações moleculares ocorridas entre o paclitaxel e as formulações e, confirmar os resultados obtidos nas análises de DSC. Sendo assim, amostras do AF, PCX, PCL, Poloxamer 407®, P407-AF, NP, NP-AF, NPPCX, NPPCX-AF foram analisados separadamente e os resultados apresentados na **Figura 26**.

Figura 26- Espectros de FTIR das amostras de AF, PCX, PCL, P407, P407-AF, NP, NP-AF, NPPCX, NPPCX-AF.



Os resultados indicam bandas característicos do PCX, como: vibrações de estiramento em 3437 cm^{-1} (N-H), 2942 cm^{-1} ($-CH_2$) e 1245cm^{-1} (C-N) (ELOY et al., 2016; THU et al., 2015). As bandas de PCX observadas na amostra de fármaco pura desapareceram na amostra de NPPCX e NPPCX-AF, demonstrando que não há interação físico-química entre os componentes da formulação que tenha promovido alterações na estrutura química do PCX (DHAS; IGE; KUDARHA, 2015). Esses resultados indicam que o PCX pode estar completamente encapsulado, conforme trabalho de Eloy e colaboradores (2016) que desenvolveram lipossomas contendo PCX e concluíram por FT-IR que houve uma redução da intensidade de algumas bandas nos lipossomas, sugerindo que uma pequena quantidade de PCX não foi encapsulada (ELOY et al., 2016). Outros estudos da literatura desenvolveram nanopartículas poliméricas de PLGA contendo PCX e em análises de infravermelho

concluíram que o mesmo se encontra completamente na sua forma amorfa nas nanopartículas (YERLIKAYA *et al*, 2013). Por outro lado, a banda correspondente à ligação C=C do grupo aromático do AF, em aproximadamente 1470cm^{-1}, não foi observado nos espectros das formulações NP-AF e NPPCX-AF, o que pode estar relacionado a quantidade reduzida de AF comparado a outros componentes da formulação, o que dificultou o aparecimento da banda nesta análise (MOGHIMIPOUR et al., 2018).

4.8 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico

4.8.1 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com ácido fólico através da espectrofotometria por UV

Inicialmente, as amostras foram separadas por meio de cromatografia de permeação em gel (Sephadex G-25) e analisadas por espectrofotometria por UV. O princípio desta cromatografia corresponde à exclusão de moléculas grandes primeiro enquanto que as moléculas pequenas tendem a entrar nas esferas em diferentes proporções de acordo com os seus diferentes tamanhos. Dessa forma, moléculas grandes deixam a coluna primeiro, seguidas das de menor tamanho (EIDELSHTEIN et al., 2016; SYSTEMS, 1999). Segundo a **Figura 27**, a técnica de cromatografia de permeação em gel apresentou 2 picos correspondentes ao ácido fólico, sendo o primeiro correspondente ao complexo P407-AF e o segundo, ao AF que não reagiu com o P407.

Foi realizada também uma purificação por membrana de diálise (3.500 MWCO) por 5 dias, com trocas diárias de água ultrapurificada Milli Q®, seguida de cromatografia de permeação em gel. Pode-se observar, na **Figura 28**, que a purificação por membrana foi eficaz para remover o ácido fólico que não reagiu com o P407. Além disso, esse tipo de purificação tem a capacidade de remover reagentes tóxicos utilizados na síntese. A cromatografia realizada após diálise teve como objetivo confirmar através das leituras individuais das frações coletadas a remoção do ácido fólico que não reagiu com o P407.

Figura 27- Resultado da análise por espectrofotometria das amostras purificadas através da cromatografia de permeação em gel antes do processo de diálise.

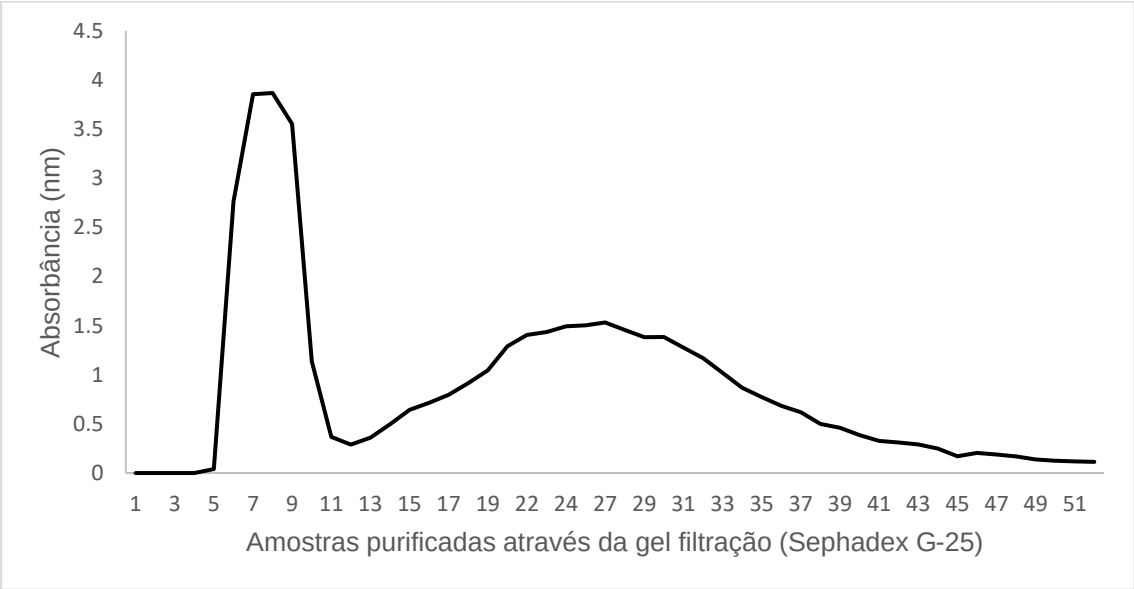
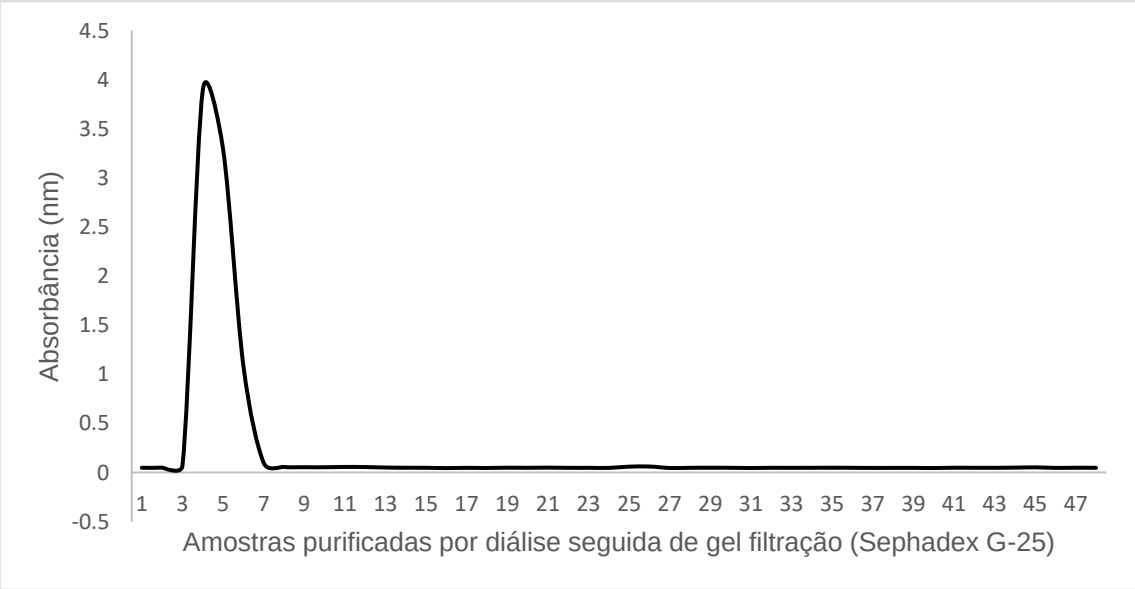


Figura 28- Resultados das análises espectrofotométricas das amostras purificadas através da diálise seguida de cromatografia de permeação em gel.

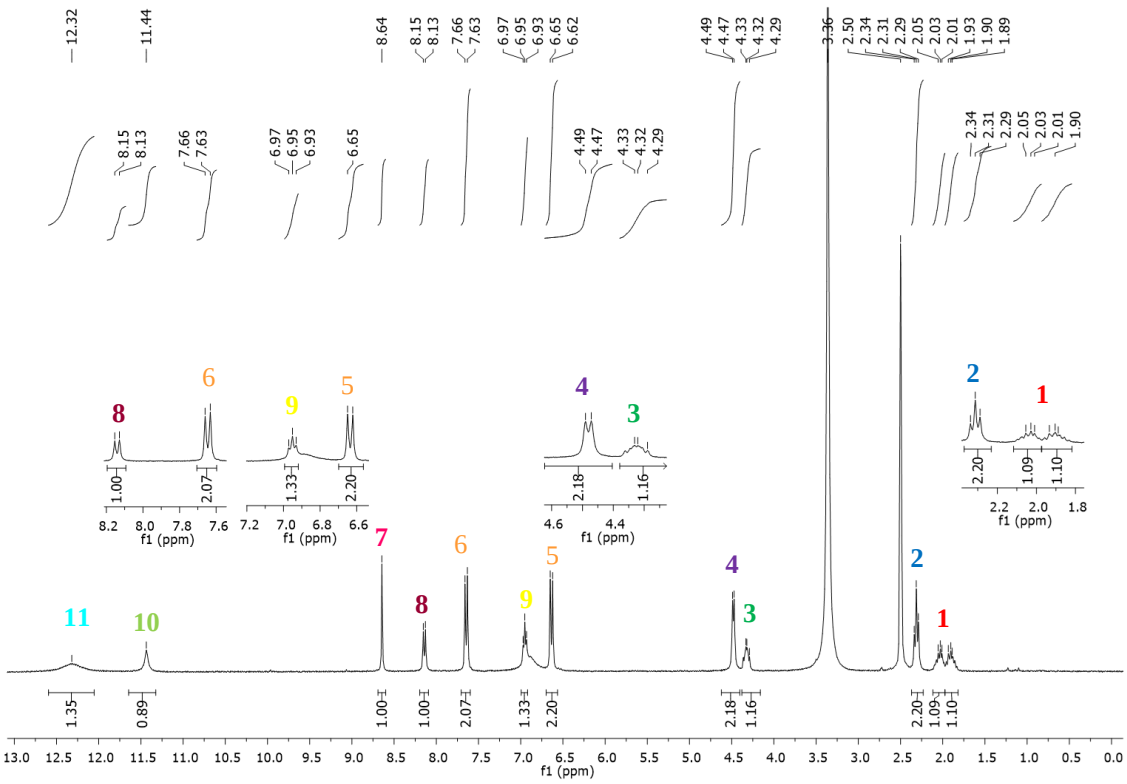


4.8.2 Avaliação da síntese do Poloxamer 407® com folato através da ressonância magnética nuclear de prótons (^{1}H RMN)

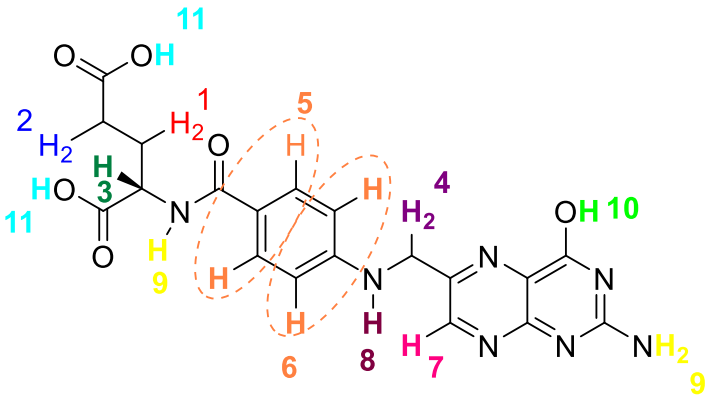
Inicialmente foram adquiridos os espectros de RMN de prótons dos materiais de partida, ácido fólico e P407 (**Figura 32 e 33**), para posterior comparação com o espectro obtido para o produto da reação de P407 com o ácido fólico (**Figura 34**).

Figura 29- A: Espectro de ^{1}H RMN adquirido em 300 MHz para a solução de ácido fólico em DMSO-d6, B: estrutura química do ácido fólico e as atribuições dos sinais obtidos no espectro de ^{1}H RMN.

A:



B:



Um dupleto relativo ao grupamento metila do P407, em 1,0 ppm (**Figura 31A**) (YOON; KIM, 2017) e vários sinais entre 6,5-9,0 relativos aos anéis aromáticos do AF foram identificados (**Figura 31B**) (BODDU; VAISHYA, 2012). Através das integrais desses sinais pode-se estabelecer a relação de moléculas de ácido fólico complexadas com as unidades de repetição do P407. Para cada 4 metilas do P407 observadas há uma molécula de ácido fólico, o que indica uma alta taxa de reação.

De acordo com a literatura, essas observações permitem inferir que houve ligação do P407 com o AF.

Figura 30- Espectros de ^{1}H RMN adquiridos em 300 MHz para a solução de P407 em DMSO-d6.

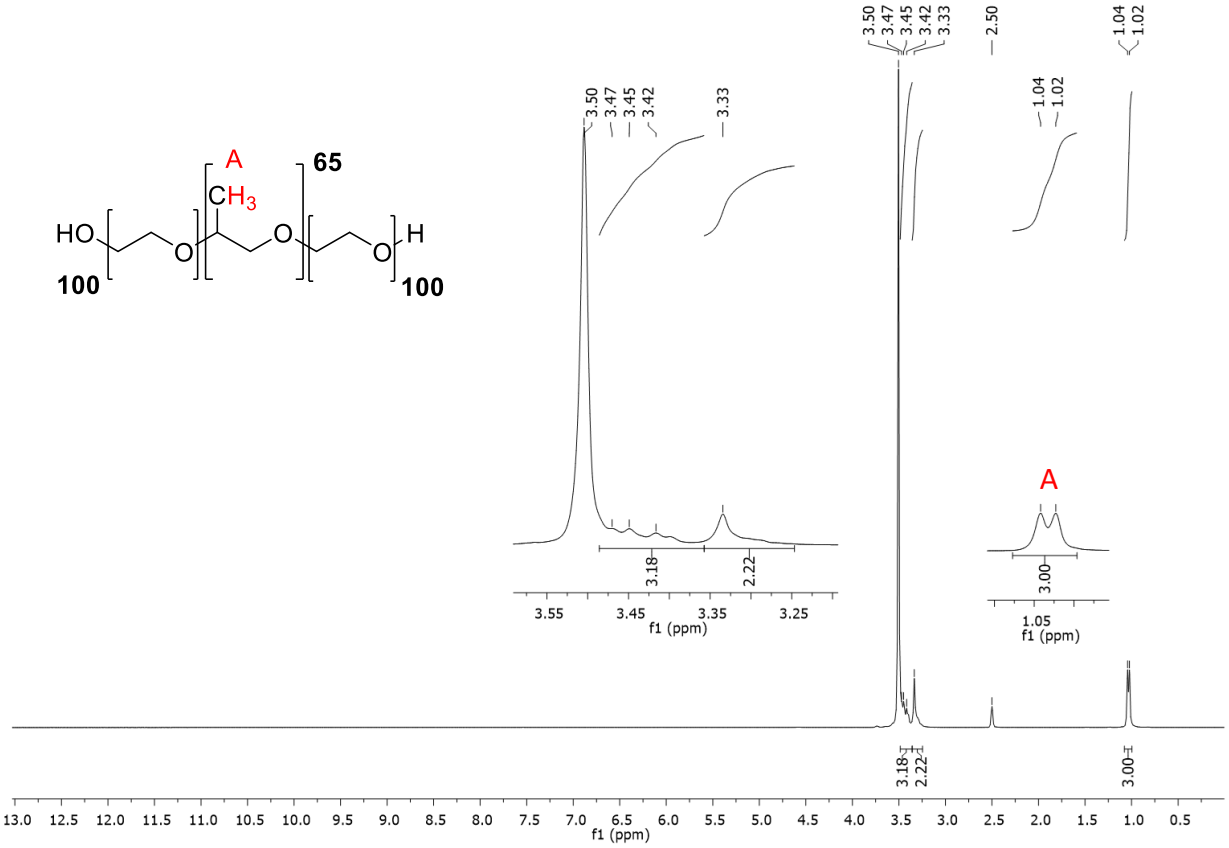
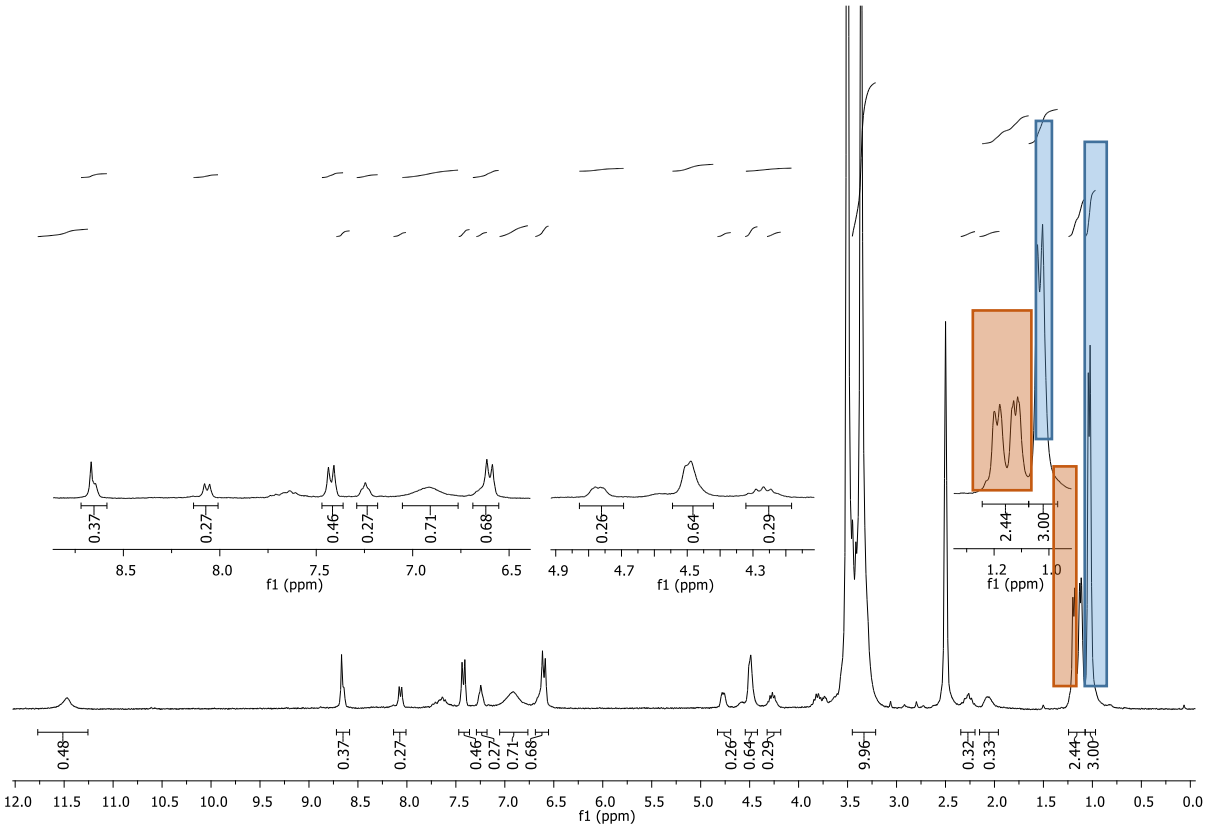
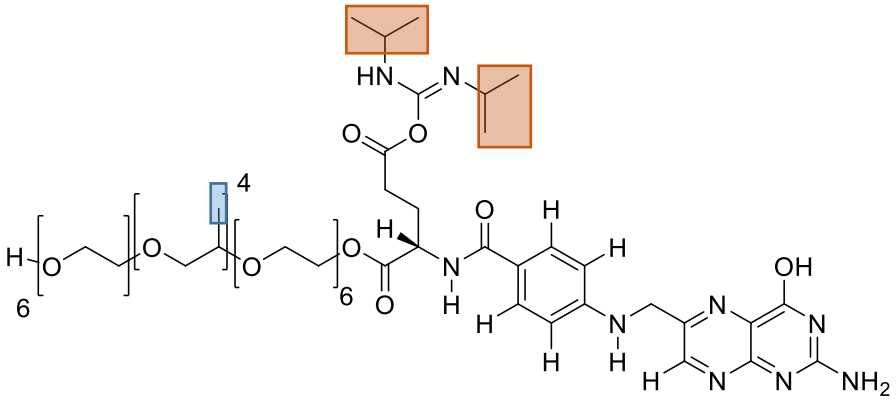


Figura 31- Espectros de ^{1}H RMN adquiridos em 300 MHz para a solução do complexo de P407-AF em DMSO-d6



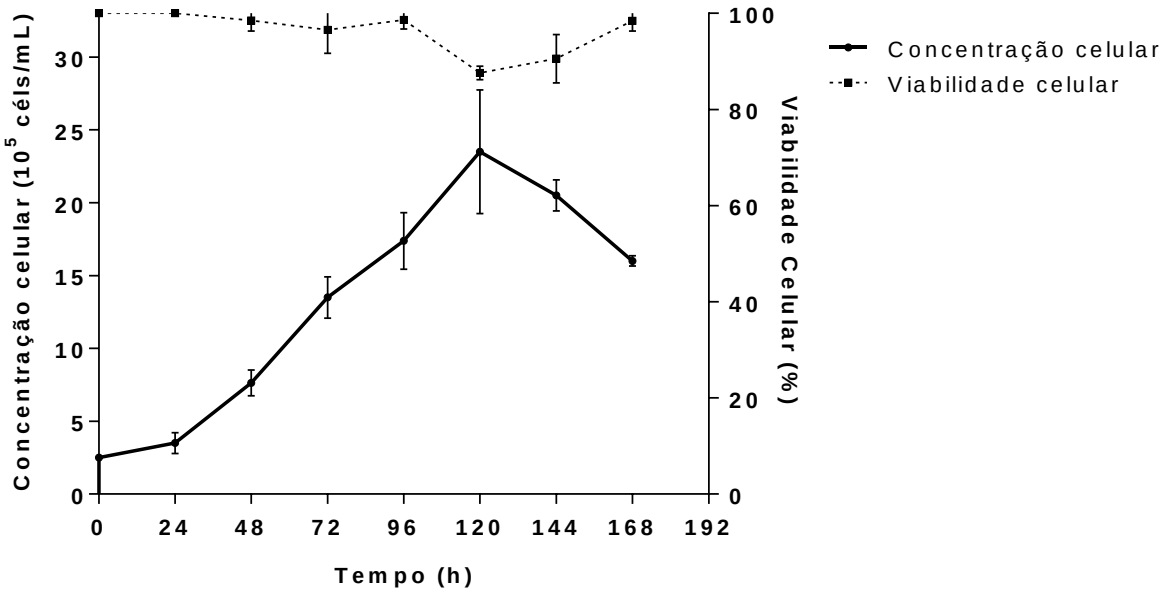


4.9 Avaliação da cinética de crescimento das linhagens celulares tumorais SKOV-3 e OVCAR-3

A curva de crescimento e viabilidade celular apresentados na **Figura 32**, para a linhagem celular SKOV-3, demonstraram crescimento das células até 120 horas, atingindo uma concentração máxima de 23 x 10^5 ± 4,06 x 10^5 células.mL^{-1}, seguido de uma queda até 168 horas de experimento. A viabilidade celular manteve-se em

torno de 100% durante todo experimento. Esse dado correlaciona-se com o descrito no Manual da *American Type Culture Collection* (ATCC®, 2016) em que até 120 horas houve uma fase exponencial de crescimento e depois uma fase de decaimento.

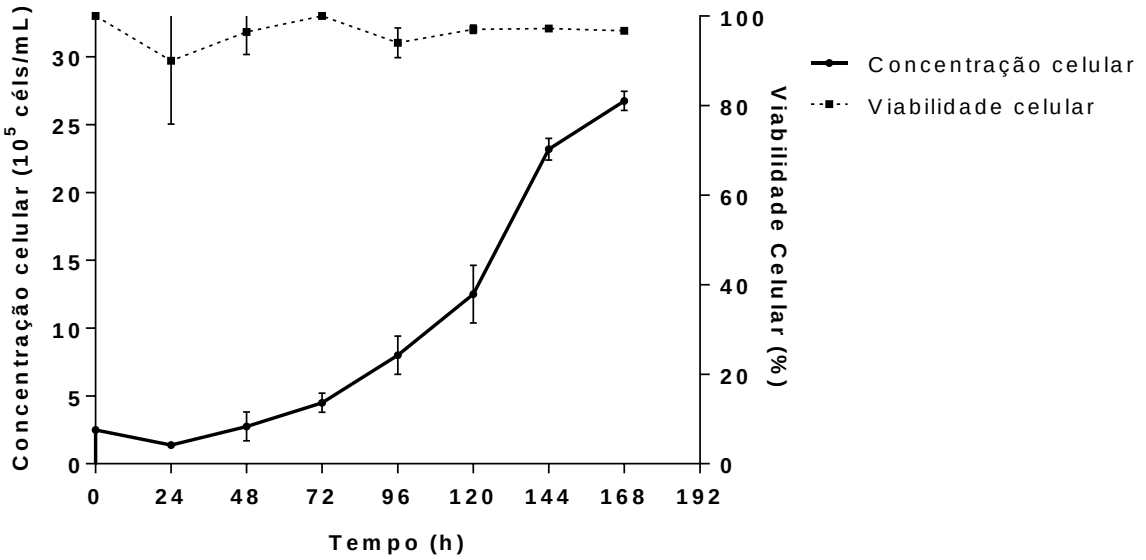
Figura 32- Concentração celular (x10^5 células.mL^{-1}) (linha cheia) e viabilidade (%) (linha pontilhada) por tempo (horas) da linhagem celular SKOV-3.



No entanto, o crescimento celular da linhagem OVCAR-3 demonstrou ser mais lento (**Figura 33**), apresentando um crescimento exponencial até 168 horas de experimento, atingindo uma concentração celular de 26 x 10^5 ± 0,7 x 10^5 células.mL^{-1}. A viabilidade celular manteve-se em torno de 100% durante todo experimento.

A avaliação da cinética de crescimento das células é importante para conhecer o padrão de crescimento das mesmas e avaliação de mudanças no padrão de crescimento das células já que qualquer alteração do padrão de crescimento ou morte celular pode alterar a taxa de confluência das células.

Figura 33- Concentração celular (x10^5 células. mL^{-1}) (linha cheia) e viabilidade (%) (linha pontilhada) por tempo (horas) da linhagem celular OVCAR-3.



4.10 Estudo *in vitro* de eficácia das formulações em linhagens tumorais SKOV-3 e OVCAR-3

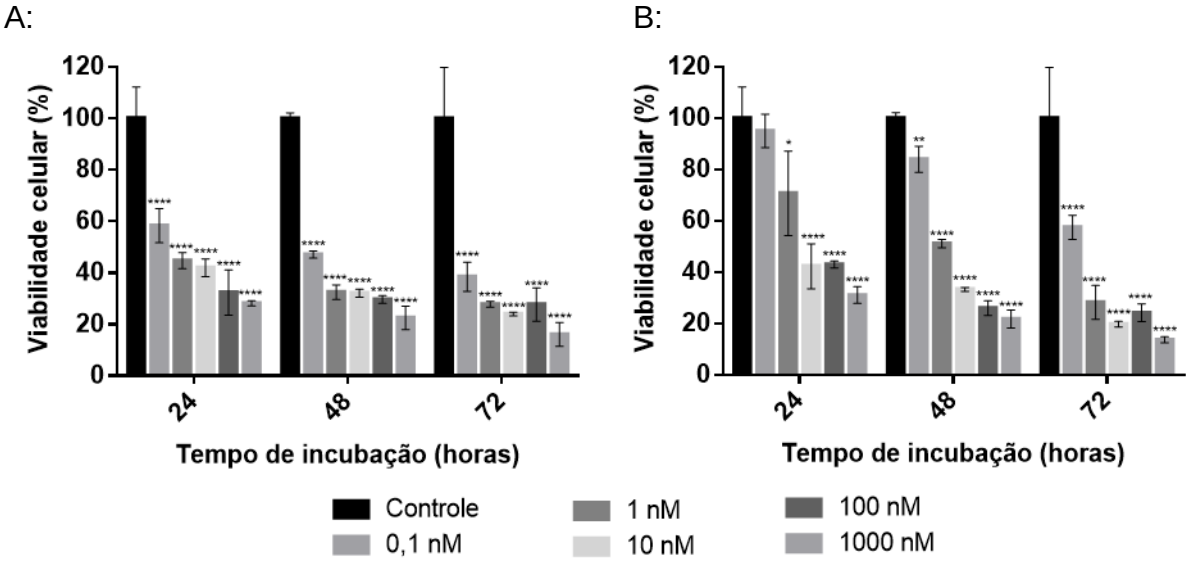
A eficácia das formulações em linhagens celulares de adecarcinoma SKOV-3 e OVCAR-3 foi avaliada através do ensaio por resazurina. As células viáveis convertem resazurina, de coloração azul não fluorescente, em resorufina, de coloração rosa fluorescente, através da atividade de enzimas mitocondriais (TSAKALOZOU; ECKMAN; BAE, 2012). Esta técnica apresenta a vantagem da resazurina ser solúvel em tampões fisiológicos, não apresentar uma etapa de adição de um agente solubilizante, sendo adicionada diretamente às células em cultura, o que reduz erros decorrentes do processo (RISS et al., 2016).

A avaliação da eficácia das formulações desenvolvidas foi avaliada em ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares de adenocarcinoma SKOV-3 e OVCAR-3. As formulações Taxol®, PCX, NPPCX e NPPCX-AF foram avaliadas nas concentrações de PCX de 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 nM e analisadas após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As formulações NP e NP-AF foram avaliadas nas mesmas diluições das formulações NPPCX e NPPCX-AF, por 24, 48 e 72 horas de incubação.

Para a linhagem celular SKOV-3, após o tratamento com PCX e Taxol® pode-se observar, na **Figura 34,** que houve uma redução significativa ($p<0,0001$) das viabilidades celulares na maioria das concentrações de PCX comparadas ao grupo

controle negativo. No entanto, comparando os dois tratamentos, PCX e Taxol®, houve uma maior redução na viabilidade celular após o tratamento com PCX, nas concentrações de 0,1 e 1 nM em 24 horas (p<0,0001) e em 48 horas na concentração de 0,1 nM (p<0,0001).

Figura 34- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular SKOV-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com PCX (A) e Taxol® (B) avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,0001).



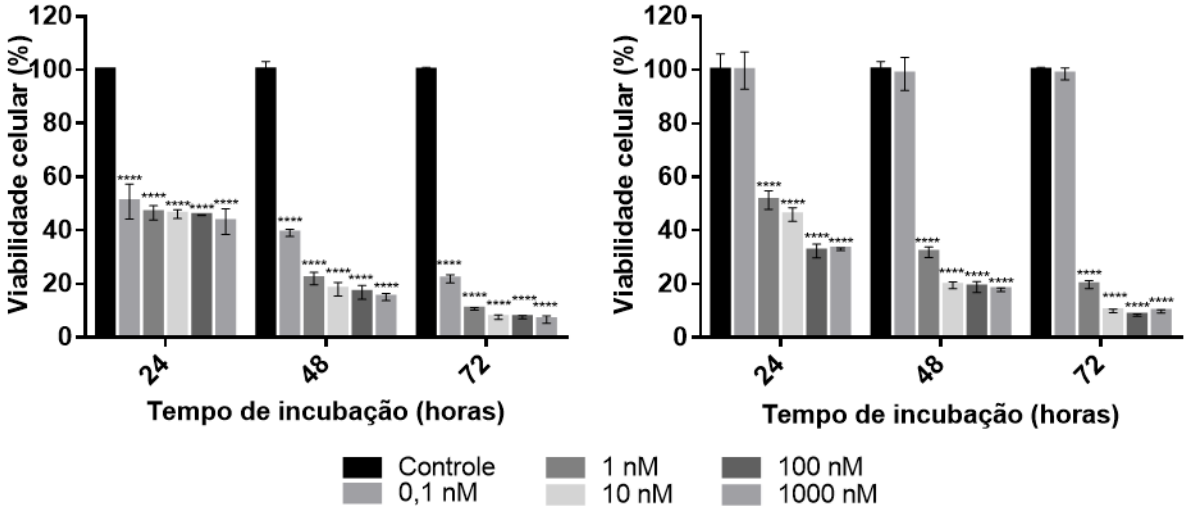
Para a linhagem celular OVCAR-3, **Figura 35**, pode-se observar que após os tratamentos com PCX e Taxol® houve uma redução significativa (p<0,0001) das viabilidades celulares na maioria das concentrações de PCX comparadas ao grupo controle negativo. No entanto, comparando os dois tratamentos houve uma maior redução na viabilidade celular após o tratamento com PCX, nas concentrações de 0,1 nM em todos os tempos de tratamento, e em 48 horas, nas concentrações de 100 e 1.000 nM (p<0,0001).

Os resultados obtidos para o tratamento com PCX e Taxol® corroboraram com os encontrados na literatura. Sathyalmoorthy e colaboradores (2017) avaliaram concentrações crescentes de PCX, de 0,1 a 1000 $ng.mL^{-1}$, e obtiveram resultados semelhantes na redução de células de câncer de mama de 28,9 para 86,4% (SATHYAMOORTHY et al., 2017). O mesmo foi observado por Wang e colaboradores (2011) que avaliaram concentrações de PCX de 2,5; 5 e 25 $\mu g.mL^{-1}$ e observaram em

24 horas uma redução da viabilidade celular de 79, 77 e 59%, respectivamente e 73, 70 e 39%, respectivamente, após 48 horas de tratamento, sendo que a maior concentração de PCX no maior tempo de tratamento, ocasionou maior morte das células de glioma (WANG et al., 2011).

Figura 35- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular OVCAR-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com PCX (A) e Taxol® (B) avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (p<0,0001).

A: B:



Esta diferença na redução da viabilidade celular, entre os grupos de tratamento PCX e Taxol®, pode ser explicada devido ao Taxol® ser uma solução de tensoativos, na qual ocorre a formação de micelas, liberando o fármaco de maneira mais gradativa para exercer sua ação (MIWA et al., 1998). Dessa forma, estes resultados indicam a elevada eficácia do PCX em atuar na estabilização dos microtúbulos, bloquear a divisão celular e assim, ocasionar morte das células tumorais (ZHANG et al., 2014).

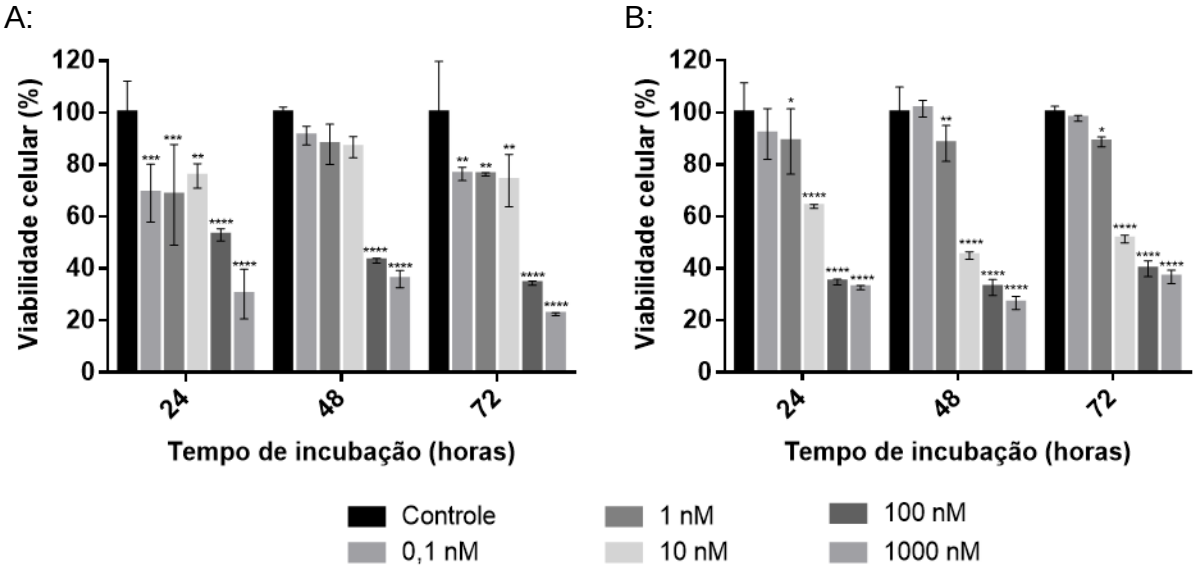
Com relação aos resultados obtidos após os tratamentos com NPPCX, em linhagem celular SKOV-3, pode-se afirmar que houve redução da viabilidade celular de 73,3 ± 13,9; 73,2 ± 20,6; 83,6 ± 2,9; 44,4 ± 10,5 e 32,3 ± 9,1 % nas concentrações de PCX de 0,1; 1; 10; 100 e 1.000 nM, respectivamente, em 24 horas. Em 48 horas de tratamento, a viabilidade celular diminuiu para 83,6 ± 7,3; 77,8 ± 14,1; 73,4 ± 8,9; 42,7 ± 8,1 e 28,6 ± 9,5%, respectivamente. Já em 72 horas de tratamento, 79,5 ± 14,1; 81,3 ± 7,1; 79,1 ± 10,8; 43,1 ± 8,1 e 27,6 ± 6,9 % para as respectivas concentrações

de 0,1; 1; 10; 100 e 1.000 nM de PCX (**Figura 36A**). Comparando as mesmas concentrações entre os tempos de tratamentos, não houve redução significativa, no entanto, nas maiores concentrações de PCX da NPPCX (10, 100 e 1.000 nM) foram observadas maiores reduções da viabilidade celular ($p < 0,0001$) nos três tempos de tratamento, comparado ao controle negativo.

Sathayamoorthy e colaboradores (2017) avaliaram o efeito de concentrações crescentes de PCX nas nanopartículas de PCL, de 0,1 a 1000 $ng.mL^{-1}$, em células de câncer de mama (MCF-7). Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados, apresentando redução na viabilidade celular de 18,6 para 78,8% em 24 horas (SATHYAMOORTHY et al., 2017).

Para a linhagem celular SKOV-3, após 24 horas de tratamento com NPPCX-AF nas concentrações de PCX de 0,1; 1; 10; 100 e 1.000 nM, houve redução na viabilidade celular de 93,2 ± 10,9; 83 ± 8,1; 52,9 ± 10,6; 36,31 ± 2,1 e 31,5 ± 2,4% respectivamente. Em 48 horas de tratamento, a viabilidade celular diminuiu para 99,8 ± 4,6; 90,1 ± 7,1; 53,4 ± 9,5; 37,5 ± 5,0 e 32,0 ± 7,4%, respectivamente. Assim como em 72 horas de tratamento, 98,0 ± 1,2; 92,5 ± 4,3; 53,8 ± 8,9; 33,5 ± 4,2 e 32,4 ± 5,3% para as respectivas concentrações de 0,1; 1; 10; 100 e 1.000 nM de PCX (**Figura 36B**). Da mesma forma que na NPPCX, comparando as mesmas concentrações entre os tempos de tratamentos, não houve redução significativa, mas comparando com o controle negativo, as três maiores concentrações de NPPCX-AF de 10, 100 e 1.000 nM apresentaram redução significativa ($p < 0,0001$) da viabilidade celular. A formulação de NPPCX-AF foi capaz de reduzir a viabilidade celular assim como a NPPCX, não apresentando diferença estatística na maioria das concentrações testadas. No entanto, na concentração de PCX de 10 nm, nas NPPCX-AF, a redução da viabilidade celular foi maior ($p < 0,001$) quando comparada à NPPCX, em 72 horas de tratamento; e a concentração de PCX de 100 nm, na NPPCX-AF, apresentou maior redução da viabilidade celular ($p < 0,01$) quando comparada à NPPCX, em 24 horas de tratamento.

Figura 36- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular SKOV-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com NPPCX (A) e NPPCX-AF (B), avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (*p<0,01, p < 0,001 e ***p<0,0001).



Após os tratamentos com NPPCX, em linhagem celular OVCAR-3, pode-se afirmar que houve redução da viabilidade celular de 96,4 ± 13,0; 65,5 ± 12,9; 45,8 ± 20,6; 18,6 ± 15,3 e 16,9 ± 13,1 % nas concentrações de PCX de 0,1; 1; 10; 100 e 1.000 nM, respectivamente, em 24 horas. Em 48 horas de tratamento, a viabilidade celular diminuiu para 97,9 ± 5,5; 83,5 ± 10,6; 53,1 ± 30,3; 23,7 ± 20,3 e 17,7 ± 14,7%, respectivamente. Já em 72 horas de tratamento, 95,1 ± 9,8; 77,6 ± 3,2; 44,6 ± 17,3; 20,2 ± 14,5 e 15,8 ± 10,2% para as respectivas concentrações de 0,1; 1; 10; 100 e 1.000 nM de PCX (**Figura 37A**). Nas concentrações de PCX, na NPPCX, de 1, 10, 100 e 1.000 nM, foram observadas maiores reduções da viabilidade celular ($p < 0,0001$) nos três tempos de tratamento com relação ao grupo controle negativo.

Em ambas as linhagens celulares, comparando os resultados obtidos após o tratamento com a NPPCX com os obtidos para a o Taxol® e PCX pode-se observar uma redução na viabilidade celular comparáveis às concentrações de PCX de 100 e 1.000 nM em todos os tempos de tratamento, não apresentando diferença significativa entre as concentrações, no mesmo tempo de tratamento.

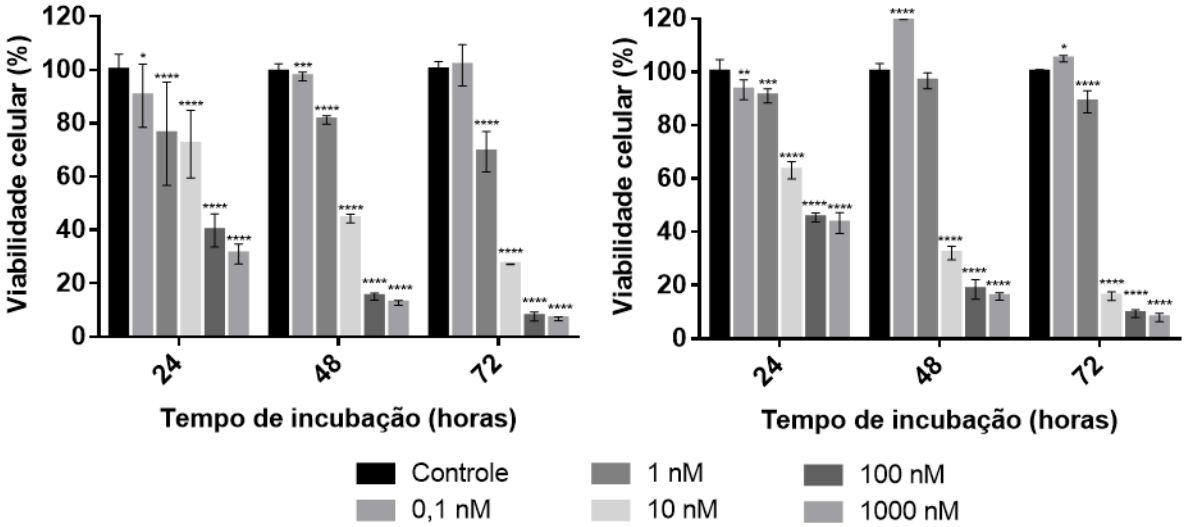
Após 24 horas de tratamento com NPPCX-AF nas concentrações de PCX de 0,1; 1; 10; 100 e 1.000 nM, houve redução na viabilidade celular de 107,1 ± 11,3; 89,7 ± 4,2; 38,4 ± 25,7; 23,3 ± 20,7 e 22,7 ± 20,2% respectivamente. Em 48 horas de

tratamento, a viabilidade celular diminuiu para 105,5 ± 14,8; 92,4 ± 1,1; 37,37 ± 21,6; 25,5 ± 16,5 e 21,3 ± 15,5%, respectivamente. Já em 72 horas de tratamento, 106,5 ±15,7; 94,4 ± 1,1; 35,2 ± 24,5; 24,4 ± 16,5 e 22,8 ± 20,1% para as respectivas concentrações de 0,1; 1; 10; 100 e 1.000 nM de PCX (**Figura 37B**). Da mesma forma que a formulação NPPCX, as três maiores concentrações da formulação NPPCX-AF, 10, 100 e 1.000 nM, apresentaram redução significativa ($p < 0,0001$).

Para a linhagem celular OVCAR-3, comparando as formulações NPPCX e NPPCX-AF pode-se afirmar que ambas foram capazes de reduzir a viabilidade celular. No entanto, em 24 horas de tratamento com NPPCX-AF, as concentrações de PCX de 10 nM ($p < 0,01$) e 100 nM ($p < 0,05$); e em 72 horas, a concentração de 10 nM ($p < 0,05$) nas NPPCX-AF apresentaram maior redução da viabilidade celular comparadas à NPPCX.

Figura 37- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular OVCAR-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com NPPCX (A) e NPPCX-AF (B), avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (*p<0,05, ***p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001).

A: B:



Tao e colaboradores (2012) avaliaram, em ensaio *in vitro*, a redução da viabilidade celular e observaram que nanocarreadores contendo o fármaco funcionalizados com AF promoveram maior morte celular quando comparado aos nanocarreadores não funcionalizados (TAO; HAN; DOU, 2012). Resultados semelhantes foram obtidos por

Boddu e colaboradores (2012) ao avaliar nanopartículas poliméricas contendo doxorrubicina funcionalizadas com AF (BODDU; VAISHYA, 2012). Da mesma forma, Han e colaboradores (2016) observaram maior inibição e consequente toxicidade celular na presença de nanocarreadores funcionalizados com AF (HAN et al., 2016). Os resultados obtidos para ambas as linhagens celulares divergem dos encontrados na literatura, nos quais os nanocarreadores funcionalizados com AF são capazes de promover maior redução da viabilidade celular quando comparado aos nanocarreadores não funcionalizados.

Com esses resultados, podemos afirmar que o ácido fólico apresenta potencial para promover o direcionamento das NPPCX às células tumorais devido à ligação do mesmo aos receptores de folato, promovendo, dessa forma, maior toxicidade celular (JONES; LIZZIO; MERKEL, 2016). Sendo assim, estudo *in vivo* são necessários para a confirmação deste potencial para o tratamento do câncer de ovário.

O efeito citotóxico das nanopartículas sem PCX (NP e NP-AF) em linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3 foi avaliado e, de acordo com a **Figura 38** e na **Figura 39**, a adição das formulações nas concentrações de 3,99 x 10^4; 3,99 x 10^5; 3,99 x 10^6; 3,99 x 10^7 e 3,99 x 10^8 partículas.mL^{-1} para a formulação de NP e 1,67 x 10^5; 1,67 x 10^6; 1,67 x 10^7; 1,67 x 10^8 e 1,67 x 10^9 partículas.mL^{-1} para a formulação de NP-AF, respectivamente, não alterou a viabilidade celular em nenhuma das concentrações e em nenhum dos tempos de incubação comparado com o grupo controle negativo.

Dessa forma, pode-se afirmar que as formulações de NP e NP-AF sem PCX não ocasionaram nenhuma interferência na viabilidade celular para as diluições de nanopartículas estudadas, sendo o efeito na redução da viabilidade ocasionado somente pela liberação do PCX das nanopartículas poliméricas. Abriata e colaboradores (2017) avaliaram o efeito tóxico de nanopartículas de policaprolactona sem fármaco, nas concentrações de 1,85 x 10^{10}; 3,68 x 10^{10}; 5,52 x 10^{10} e 7,36 x 10^{10} partículas.mL^{-1} e verificaram que as mesmas não causaram nenhum efeito tóxico em células de fibroblasto LLC-MK2 (ABRIATA et al., 2017).

Figura 38- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular SKOV-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com NP (sem PCX) (A) e NP-AF (B), avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls.

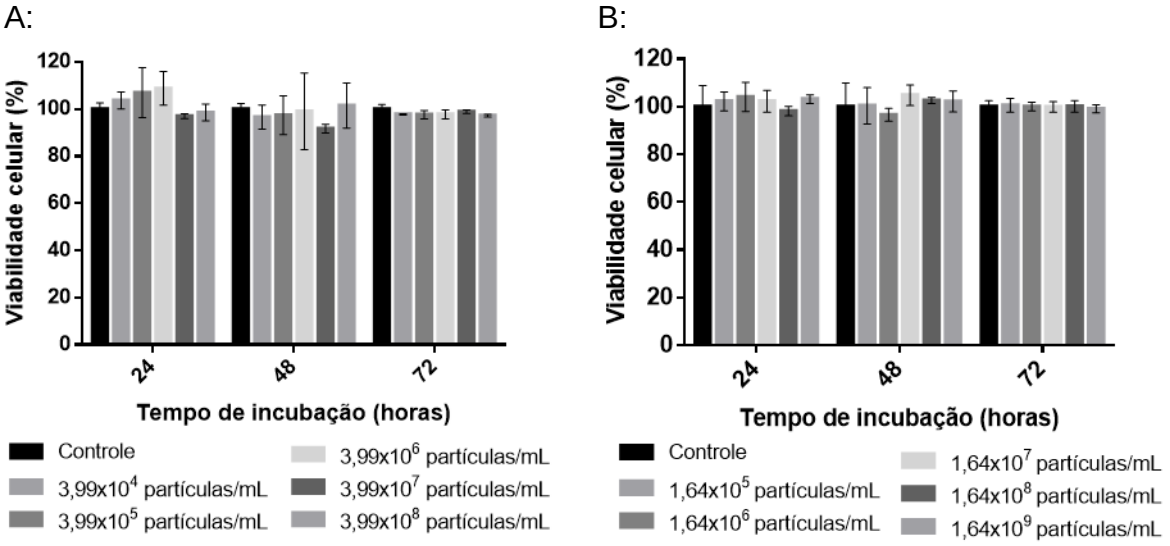
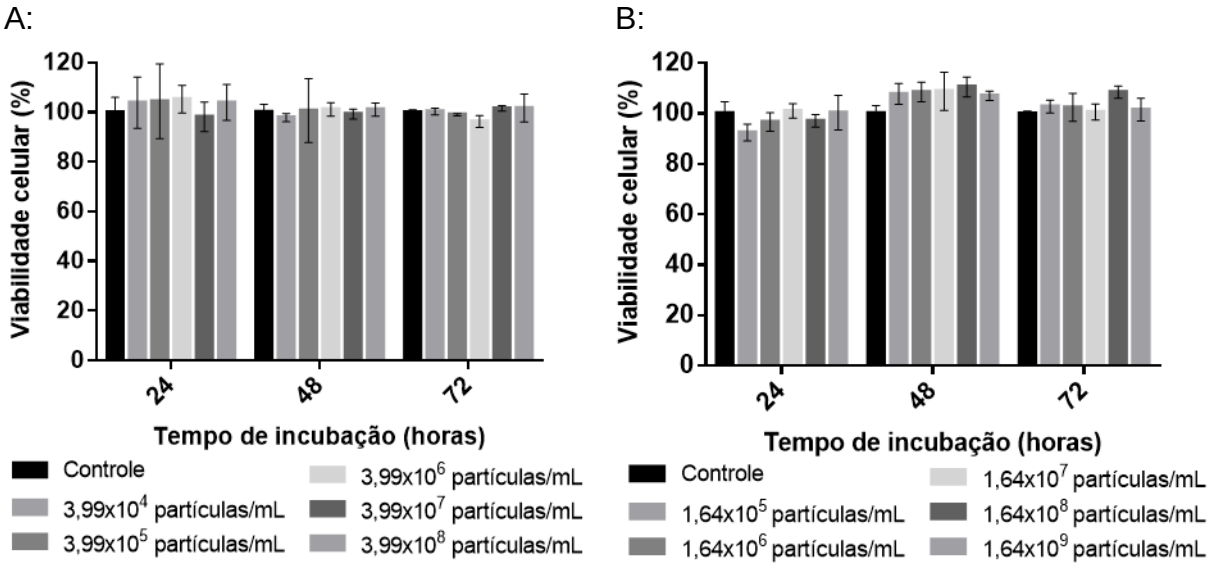


Figura 39- Resultados dos ensaios de viabilidade celular em linhagem celular OVCAR-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com NP (A) e NP-AF (B), avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls.



4.11 Avaliação quantitativa do *uptake* celular por citometria de fluxo

As quantificações do *uptake* celular das formulações NP e NP-AF em linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3 foram realizadas através da análise de citometria de fluxo. Para isso, as nanopartículas sem PCX (NP e NP-AF) foram previamente preparadas com PCL-BODIPY, segundo item 3.5. A **Figura 40** e na **Figura 41** mostram que não houve marcação positiva para BODIPY (representados pelos

quadrantes Q2 e Q4) para os grupos controle negativo (A), o que indica que as células não emitem fluorescência no mesmo comprimento de onda da sonda fluorescente. Além do *uptake* celular, pode-se quantificar a viabilidade celular, que apresenta marcação negativa para iodeto de propídio (quadrantes Q3 e Q4). Essa marcação demonstrou que as nanopartículas desenvolvidas sem PCX (NP e NP-AF) não alteraram a viabilidade celular quando comparado com os controles negativos. Além disso, os resultados obtidos para a viabilidade celular em ambas as células, **Figura 40B** e **Figura 41B**, corroboraram com os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, item 4.10.

Figura 40- Resultados do *uptake* celular por citometria de fluxo após 1, 3 e 24 horas de tratamento com as formulações NP e NP-AF em linhagens celulares SKOV-3 (n=3), sendo A: controle negativo, B: NP e C: NP-AF, I: 1 hora de tratamento, II: 3 horas de tratamento e III: 24 horas de tratamento.

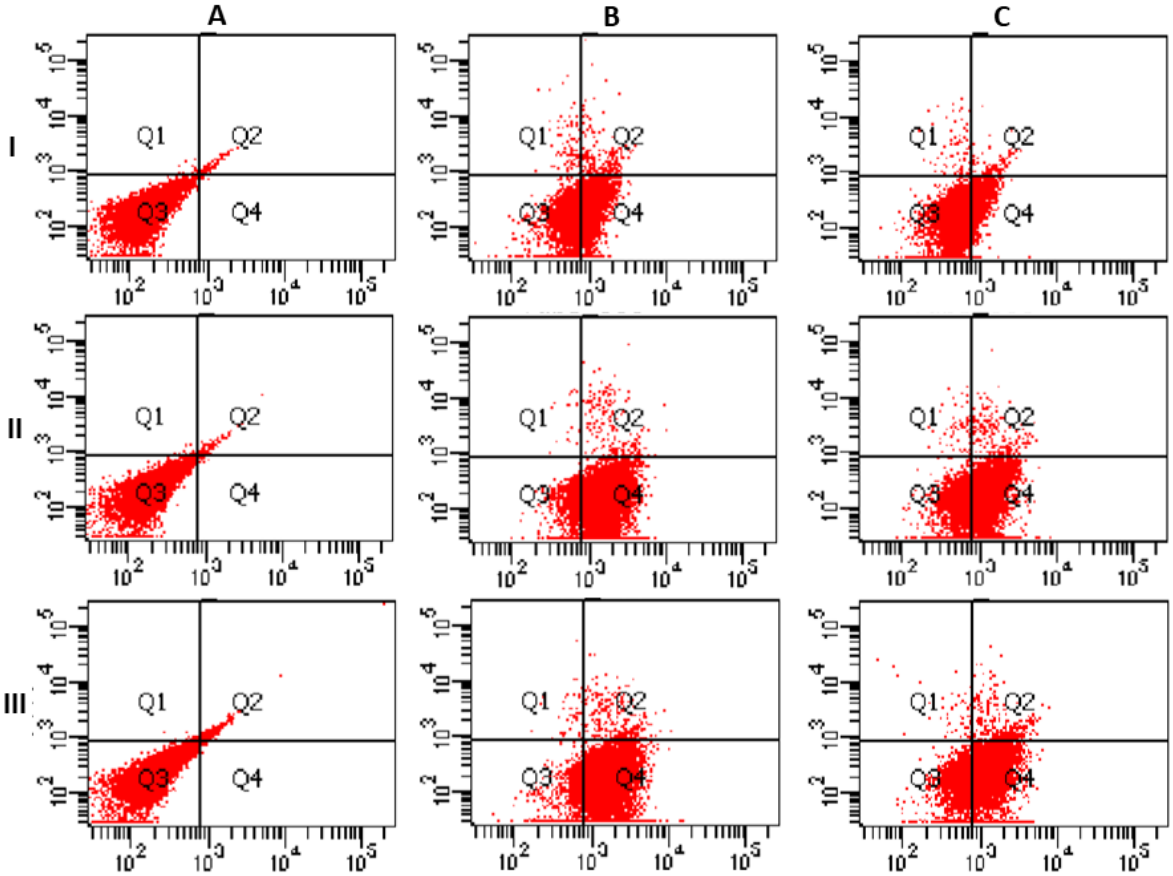
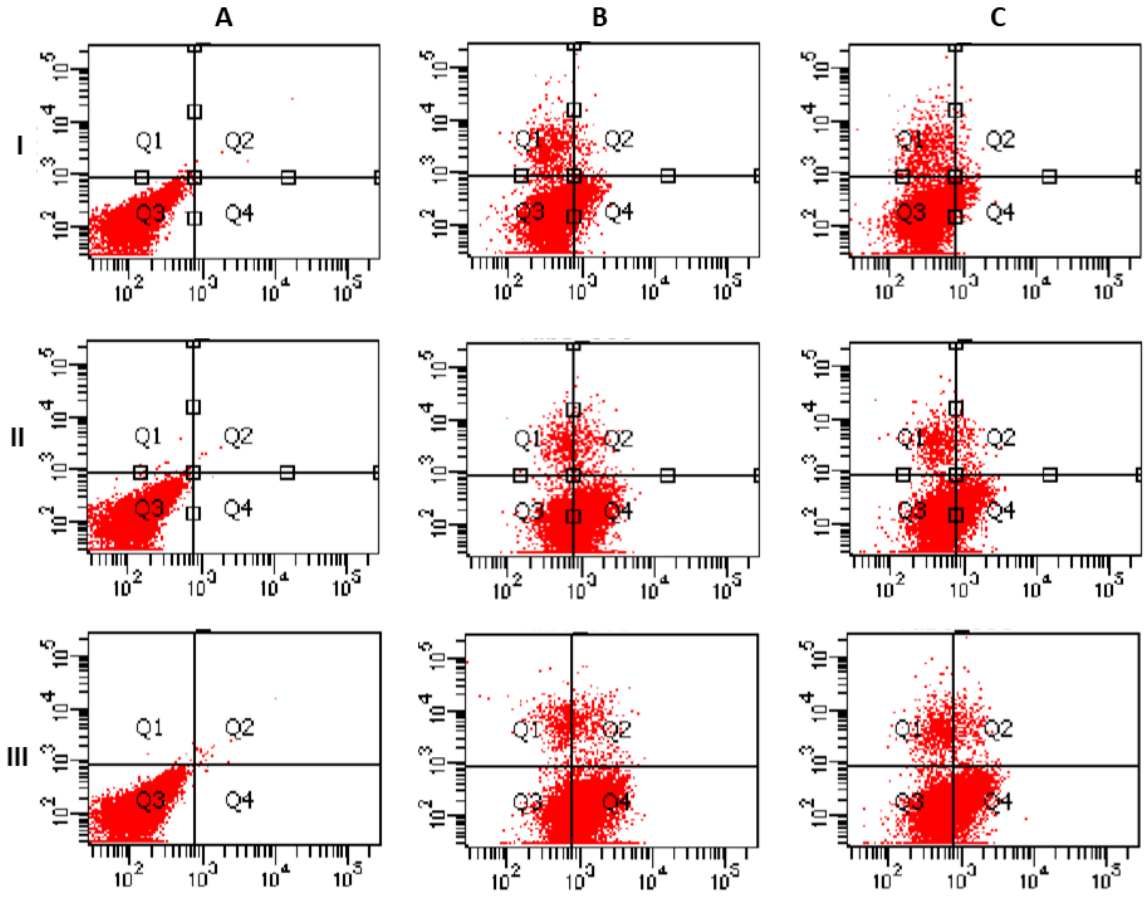


Figura 41- Resultados da *uptake* celular por citometria de fluxo após 1, 3 e 24 horas de tratamento com as formulações NP e NP-AF em linhagens celulares OVCAR-3 (n=3), sendo A: controle negativo, B: NP e C: NP-AF, I: 1 hora de tratamento, II: 3 horas de tratamento e III: 24 horas de tratamento.



De acordo com a **Figura 40** e a **Figura 41**, o *uptake* celular da formulação NP para as duas linhagens celulares, aumentou com o aumento do tempo de tratamento, de 60,7 ± 3,32%, em 1 hora de tratamento, para 87,3 ± 0,91%, em 24 horas de tratamento, para a SKOV-3 (**Figura 42A**), e aumentou de 14,24 ± 2,3 %, em 1 hora de tratamento, para 64,0 ± 0,35%, em 24 horas de tratamento, para a OVCAR-3 (**Figura 43A**). Dessa forma, podemos afirmar que devido à maior superexpressão de receptores de folato, a linhagem celular SKOV-3 apresenta maior *uptake* celular nos três tempos de tratamento quando comparada a OVCAR-3. Wang e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas fluorescentes de PLGA e testaram 3 tempos de incubação: 1, 2 e 24 horas e demonstraram que, com o aumento do tempo de incubação, houve o aumento do *uptake* celular (WANG et al., 2015). Dessa forma, pode-se afirmar que a *uptake* é tempo dependente, o que torna importante para o

tratamento, pois, ao aumentar o *uptake* celular, aumenta a concentração do fármaco dentro da célula tumoral e o efeito terapêutico.

Figura 42- Representação gráfica dos resultados de *uptake* (A) e viabilidade celular (B) por citometria de fluxo em linhagem celular SKOV-3, avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (***p<0,001 e ****p<0,0001).

A: B:

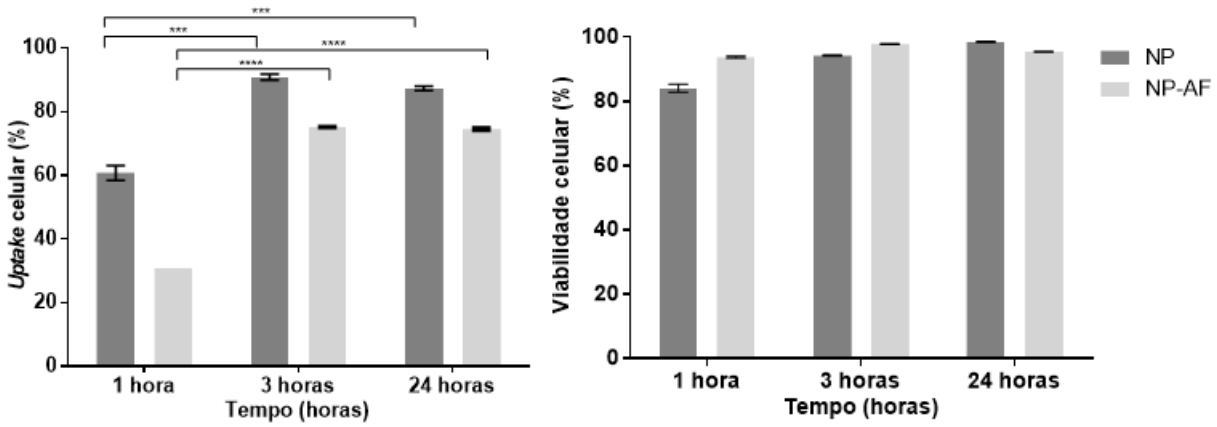
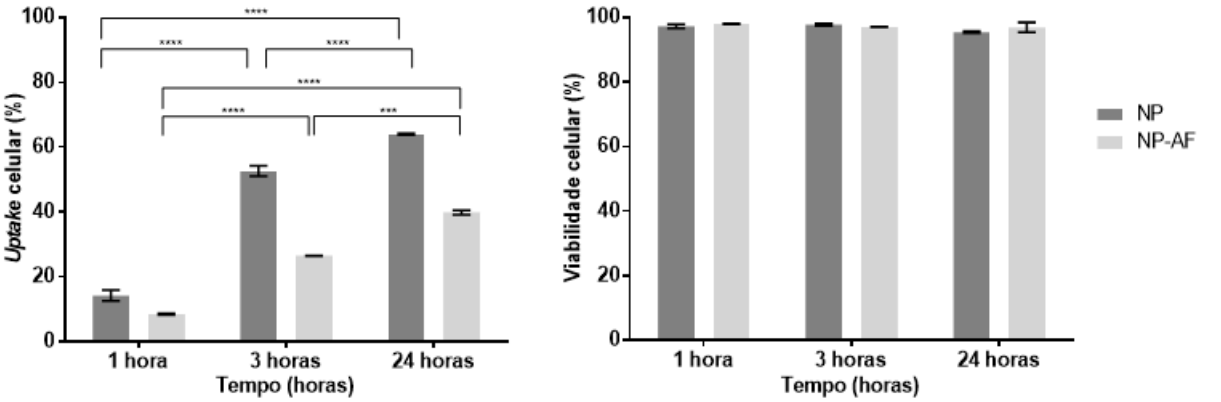


Figura 43- Representação gráfica dos resultados de *uptake* (A) e viabilidade celular (B) por citometria de fluxo em linhagem celular OVCAR-3, avaliados pelo teste de ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle negativo (***p<0,001 e ****p<0,0001).

A: B:



Com relação aos resultados obtidos para a formulação NP-AF, para ambas as linhagens celulares, observou-se um *uptake* celular tempo dependente, assim como os resultados obtidos para as NP. Os resultados obtidos foram de 30,8 ± 0%, em 1 hora de tratamento, para 74,5 ± 0,6%, em 24 horas de tratamento, para a SKOV-3 (**Figura 42A**), e aumentou de 8,4 ± 0,3%, em 1 hora de tratamento, para 39,8 ± 0,9%,

em 24 horas de tratamento, para a OVCAR-3 (**Figura 43A**). No entanto, comparando as formulações NP e NP-AF não houve um aumento do *uptake* celular com a formulação funcionalizada com ácido fólico, conforme o esperado. Isso pode ser explicado devido ao tamanho da partícula da formulação NP-AF com BODIPY ter apresentado um tamanho de 256 nm e PdI de 0,214, valor superior ao obtido para a NP-BODIPY. Yin e colaboradores (2005) avaliaram a internalização de nanocarreadores poliméricos com diferentes tamanhos (200, 500 e 1.000 nm) e demonstraram que tamanhos inferiores a 200 nm apresentaram maior internalização (YIN WIN; FENG, 2005). Dessa forma, a menor internalização pode estar relacionada com o maior tamanho de partícula e PdI da amostra.

Comparando os resultados de *uptake* celular para as duas linhagens celulares, podemos relacioná-los com a expressão de receptores de folato na membrana celular, sendo que a linhagem celular SKOV-3 apresenta maior superexpressão de receptores de folato (95%) que a OVCAR-3 (60%) (QUICI et al., 2015).

4.12 Avaliação qualitativa do *uptake* celular por microscopia confocal

O *uptake* celular das formulações desenvolvidas foi avaliado por microscopia confocal em linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3 através da internalização celular das formulações no tempo de 24 horas de tratamento. As formulações foram preparadas previamente com o fluoróforo BODIPY. Além deste, foi utilizado outro marcador para a identificação do núcleo das células, o DAPI, que concede fluorescência em azul para o núcleo.

De acordo com as imagens obtidas na **Figura 44** e na **Figura 45**, foi possível observar, após 24 horas de tratamento, um *uptake* celular das formulações NP e NP-AF em ambas as linhagens celulares. Pode-se observar uma fluorescência verde do BODIPY no núcleo, citoplasma e membrana celular. Com isso, pode-se identificar que houve internalização celular de ambas as formulações e essa internalização ocorre através de receptores de folato mediada por endocitose (JONES; LIZZIO; MERKEL, 2016). Esses dados correlacionaram-se com os obtidos por citometria de fluxo.

Figura 44- Imagens de microscopia confocal em linhagem celular SKOV-3 após 24 horas de tratamento com as formulações NP (A) e NP-AF (B).

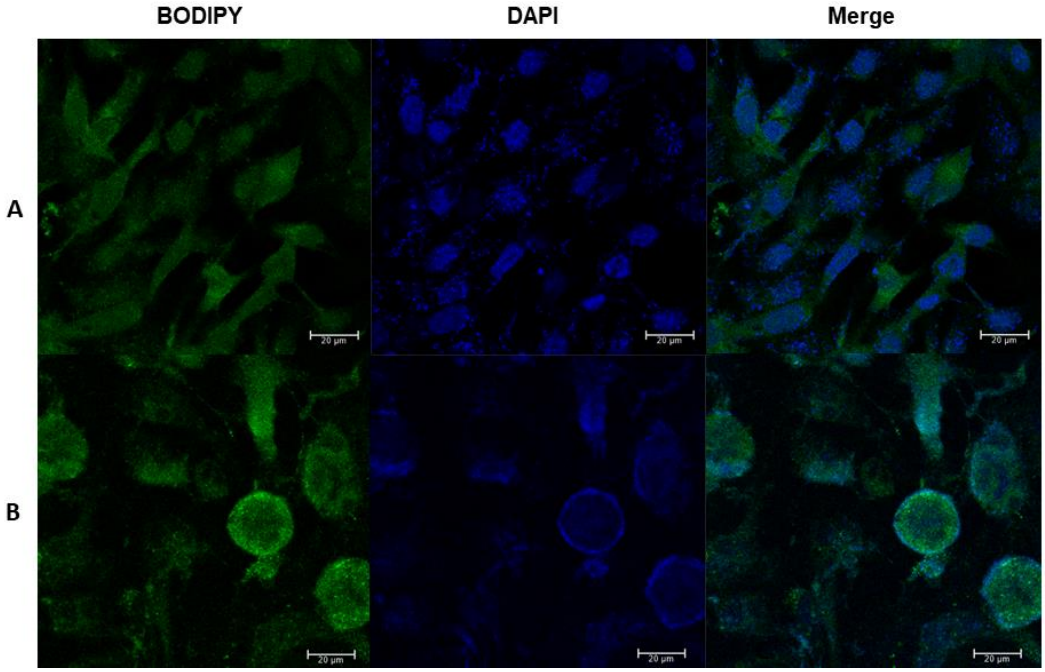
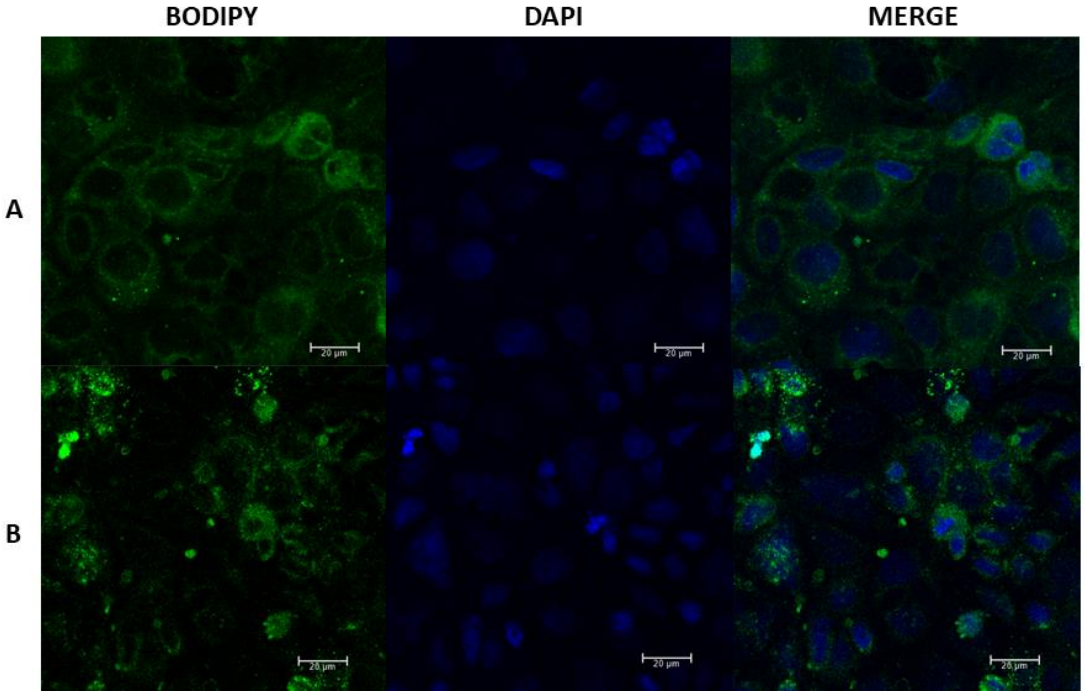


Figura 45: Imagens de microscopia confocal em linhagem celular OVCAR-3 após 24 horas de tratamento com as formulações NP (A) e NP-AF (B).



5. Conclusões

Com base nas técnicas selecionadas e nos resultados obtidos na presente pesquisa, podemos concluir que houve êxito na funcionalização do Poloxamer 407® com o ácido fólico, no processo de otimização, desenvolvimento e caracterização das nanopartículas poliméricas contendo paclitaxel funcionalizadas e não funcionalizadas com ácido fólico. As formulações desenvolvidas apresentaram valores de tamanho de partículas, potencial zeta e eficiência de encapsulação compatíveis com a via de administração pretendida. As análises de DSC e FTIR mostraram que o PCX se encontra encapsulado nas nanopartículas ou adsorvido molecularmente na matriz polimérica. Os resultados *in vitro* em testes de citotoxicidade em linhagens celulares SKOV-3 e OVCAR-3 demonstraram que as nanopartículas contendo PCX (NPPCX e NPPCX-AF) foram capazes de disponibilizar o PCX e reduzir a viabilidade celular. Além disso, ambas as formulações apresentaram um *uptake* celular tempo dependente, mostrando a capacidade dos nanocarreadores serem internalizados. No entanto, a formulação NP-AF apresentou menor *uptake* celular possivelmente devido ao aumento de tamanho de partícula após o uso do PCL-BODIPY. Além disso, comparando as duas linhagens celulares, a SKOV-3 apresentou maior *uptake* por apresentar maior número de receptores de folato. Dessa forma, as análises *in vitro* sugerem que os nanocarreadores, NPPCX e NPPCX-AF, apresentam potencial para a otimização da terapia do câncer de ovário, sendo ainda necessários estudos *in vivo* para a confirmação da eficiência e segurança para o tratamento de câncer de ovário.

Referências bibliográficas

ABRIATA, J. P. et al. Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against Trypanosoma cruzi infection. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1196–1203, 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Ovarian Cancer. **American Cancer Society**, p. 63, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Ovarian Cancer. **American Cancer Society**, 2018.

ANVISA. Guía para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**, p. 1–15, 2003.

ATTWOOD, D. Disperse systems. In: **Aulton's pharmaceutics: the design and manufacture of medicines**, 4th ed. London, Elsevier: 62-93, 2013.

AVERINENI, R. K. et al. PLGA 50:50 nanoparticles of paclitaxel: Development , in vitro anti-tumor activity in BT-549 cells and in vivo evaluation. **Bull. Mater. Sci.**, v. 35, n. 3, p. 319–326, 2012.

BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of poly(ε-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1–2, p. 271–279, 2012.

BERNABEU, E. et al. Paclitaxel-loaded PCL-TPGS nanoparticles: In vitro and in vivo performance compared with Abraxane®. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 43–50, 2014.

BERNABEU, E. et al. **Paclitaxel: What has been done and the challenges remain aheadInternational Journal of Pharmaceutics**, 2017.

BODDU, S. H.; VAISHYA, R. Preparation and Characterization of Folate Conjugated Nanoparticles of Doxorubicin using Plga-Peg-Fol Polymer. **Medicinal chemistry**, v. 2, n. 4, p. 68–75, 2012.

CHEN, D. R.; BEI, J. Z.; WANG, S. G. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 67, n. 3, p. 455–459, 2000.

CHENG, Z. et al. Multifunctional nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. **Science**, v. 338, n. 6109, p. 903–910, 2012.

CHORNY, M. et al. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 83, n. 3, p. 389–400, 30 out. 2002.

CIRSTOIU-HAPCA, A. et al. Nanomedicines for active targeting: Physico-chemical characterization of paclitaxel-loaded anti-HER2 immunonanoparticles and in vitro functional studies on target cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.

38, n. 3, p. 230–237, 2009.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 771–784, nov. 2017.

DANQUAH, M. K.; ZHANG, X. A.; MAHATO, R. I. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 8, p. 623–639, 2011.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly-ϵ-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 158, n. 1, p. 15–33, 28 fev. 2012.

DHAS, N. L.; IGE, P. P.; KUDARHA, R. R. Design, optimization and in-vitro study of folic acid conjugated-chitosan functionalized PLGA nanoparticle for delivery of bicalutamide in prostate cancer. **Powder Technology**, v. 283, p. 234–245, 2015.

EIDELSHTEIN, G. et al. Preparation, Characterization and Manipulation of Conjugates between Gold Nanoparticles and DNA. **Nanomaterials**, v. 6, n. 9, p. 167, 2016.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **Methods Mol Biol**, v. 528, p. 16675–691, 2017.

ELOY, J. O. et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 141, p. 74–82, 2016.

ELOY, J. O. et al. Anti-HER2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 159–167, 2017.

ENAYATI, M. et al. Size mapping of electric field-assisted production of polycaprolactone particles. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. Suppl_4, p. S393–S402, 2010.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FILIPE, V.; HAWE, 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.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 83, n. 2, p. 273–286, 4 out. 2002.

GUPTA, P. N. et al. Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA:poloxamer

blend nanoparticles for cancer chemotherapy. **International journal of biological macromolecules**, v. 69C, p. 393–399, 2014.

HAN, M. H. et al. Novel folate-targeted paclitaxel nanoparticles for tumor targeting: preparation, characterization, and efficacy. **RSC Advances**, v. 6, n. 51, p. 45664–45672, 2016.

HEIDARIAN, S. et al. Active targeted nanoparticles: Preparation, physicochemical characterization and in vitro cytotoxicity effect. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 10, n. 3, p. 241–51, 2015.

HOFFMEISTER, C. R. D. et al. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: A formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, p. 1–24, 2012.

HORTON, M. A.; KHAN, A. Medical nanotechnology in the UK: A perspective from the London Centre for Nanotechnology. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 42–48, 2006.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.].

JONES, S. K.; LIZZIO, V.; MERKEL, O. M. Folate Receptor Targeted Delivery of siRNA and Paclitaxel to Ovarian Cancer Cells via Folate Conjugated Triblock Copolymer to Overcome TLR4 Driven Chemotherapy Resistance. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 1, p. 76–87, 2016.

KHALIL, I. et al. Bacterial-Derived Polymer Poly-y-Glutamic Acid (y-PGA)-Based Micro/Nanoparticles as a Delivery System for Antimicrobials and Other Biomedical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 313, 2017.

KHANBEIGI, A. R. et al. The delivered dose: Applying particokinetics to in vitro investigations of nanoparticle internalization by macrophages. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 2, p. 259–266, 2012.

KIM, G. Targeted cancer nanotherapy. **Nanotoday**, v. 7021, n. February 2014, 2005.

KUHN, E. et al. TP53 mutations in serous tubal intraepithelial carcinoma and concurrent pelvic high-grade serous carcinoma-evidence supporting the clonal relationship of the two lesions. **Journal of Pathology**, v. 226, n. 3, p. 421–426, 2012.

LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International journal of pharmaceutics**, v. 344, n. 1–2, p. 33–43, 1 nov. 2007.

LIN, J. J. et al. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. **Biomaterials**, v. 30, n. 28, p. 5114–

5124, 2009.

LUO, Y. Y. et al. The targeting properties of folate-conjugated Pluronic F127/poly (lactic-co-glycolic) nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 711–719, 2017.

MAEDA, H.; NAKAMURA, H.; FANG, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 71–79, 2013.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: Effect of formulation variables on size distribution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, n. 1–2, p. 137–144, 2005.

MARCUCCI, F.; LEFOULON, F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: Fundamentals and recent progress. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 5, p. 219–228, 2004.

MARTIN, L. P. et al. Characterization of folate receptor alpha (FR α) expression in archival tumor and biopsy samples from relapsed epithelial ovarian cancer patients : A phase I expansion study of the FR α -targeting antibody-drug conjugate mirvetuxima. **Gynecologic Oncology**, v. 147, p. 6–11, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. **Ministério Da Saúde**, v. 1, p. 356, 2014.

MITTAL, V. V; PATEL, S. J.; SHETH, S. K. Development and characterization of folate targeted nanoparticles drug delivery system. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 2, 2010.

MIWA, A. et al. Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 12, p. 1844–50, dez. 1998.

MOGHIMIPOUR, E. et al. Folic acid-modified liposomal drug delivery strategy for tumor targeting of 5- fluorouracil. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, n. December 2017, p. 166–174, 2018.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010.

NORDSTRÖM, P. **Formation of polymeric nanoparticles encapsulating and releasing a new hydrophobic cancer drug**. [s.l: s.n.].

OFIR, R. et al. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 6, p. 636–642, 2002.

OSSA, D. H. P. et al. Poly-ε-caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficac. **Journal of Controlled Release**, n. 161, p. 927–932, 2012.

PATEL, A. et al. Polymeric Nano-Particles for Tumor Targeting – A Review. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 9, n. Figure 1, p. 50–59, 2017.

PILLAI, J. J. et al. Folic acid conjugated cross-linked acrylic polymer (FA-CLAP) hydrogel for site specific delivery of hydrophobic drugs to cancer cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, 2014.

QUICI, S. et al. Folic acid-conjugated europium complexes as luminescent probes for selective targeting of cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2003–2014, 2015.

REID, B. M.; PERMUTH, J. B.; SELLERS, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. **Cancer Biology & Medicine**, v. 14, n. 1, p. 9–32, 2017.

REZENDE, L. C. D. **Síntese, caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do BODIPY**. [s.l: s.n.].

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RISS, T. et al. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**, p. 1–31, 2016.

RUPALI, S. et al. NANOTECHNOLOGY : THE COMING REVOLUTION IN MODERN BIOLOGY AND MEDICINE. **INTERNATIONAL RESEARCH JOURNAL OF PHARMACY**, v. 3, n. 5, p. 109–118, 2012.

SAMADIAN, H. et al. Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 11, p. 2217–2229, 2016.

SATHYAMOORTHY, N. et al. Optimization of paclitaxel loaded poly (ε-caprolactone) nanoparticles using Box Behnken design. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 362–373, 2017.

SINHA, V. R. et al. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International journal of pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 18 jun. 2004.

TAO, Y.; HAN, J.; DOU, H. Surface modification of paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles: Evaluation of in vitro cellular behavior and in vivo pharmacokinetic. **Polymer (United Kingdom)**, v. 53, n. 22, p. 5078–5085, 2012.

THAMAKE, S. I. et al. Surface functionalization of PLGA nanoparticles by non-covalent insertion of a homo-bifunctional spacer for active targeting in cancer therapy. **Nanotechnology**, v. 22, n. 3, p. 35101, 2011.

THU, H. P. et al. In vitro and in vivo targeting effect of folate decorated paclitaxel loaded PLA-TPGS nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 6, p. 683–688, 2015.

TOMASINA, J. et al. Nanocarriers for the targeted treatment of ovarian cancers. **Biomaterials**, v. 34, n. 4, p. 1073–1101, 2013.

TSAKALOZOU, E.; ECKMAN, A. M.; BAE, Y. Combination effects of docetaxel and doxorubicin in hormone-refractory prostate cancer cells. **Biochemistry Research International**, v. 2012, 2012.

VALENTE, V.; MASSABKI, P. S. Tumor markers in ovarian cancer : what 's new? **Rev Bras Clin Med.**, v. 9, n. 5, p. 377–381, 2011.

VAN MEURS, H. S. et al. Which patients benefit most from primary surgery or neoadjuvant chemotherapy in stage IIIC or IV ovarian cancer? An exploratory analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 55971 randomised trial. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 15, p. 3191–3201, 2013.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 5, p. 1025–58, maio 2009.

WANG, B. et al. Paclitaxel and etoposide co-loaded polymeric nanoparticles for the effective combination therapy against human osteosarcoma. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 22, 2015.

WANG, J. et al. Folate-decorated hybrid polymeric nanoparticles for chemically and physically combined paclitaxel loading and targeted delivery. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 1, p. 228–234, 2011.

WENTZENSEN, N. et al. Ovarian cancer risk factors by histologic subtype: An analysis from the Ovarian Cancer Cohort Consortium. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 24, p. 2888–2898, 2016.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, out. 2010.

XIAO, K. et al. A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 6006–6016, 2009.

XIAO, X.-C. et al. Monodispersed thermoresponsive hydrogel microspheres with a volume phase transition driven by hydrogen bonding. **Polymer**, v. 46, n. 9, p. 3199–3209, abr. 2005.

XIONG, X. Y. et al. Novel folated Pluronic/poly(lactic acid) nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel. **RSC Adv.**, v. 6, n. 58, p. 52729–52738, 2016.

YANG, T. et al. Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome. **Journal of Controlled Release**, v. 120, n. 3, p. 169–177, 2007.

YARDLEY, D. A. Nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 3, p. 365–372, 2013.

YIN WIN, K.; FENG, S. S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2713–2722, 2005.

YOKOYAMA, M. Drug targeting with nano-sized carrier systems. **Journal of Artificial Organs**, v. 8, n. 2, p. 77–84, 2005.

YOON, D. Y.; KIM, J. C. Hydrogel composed of acrylic coumarin and acrylic Pluronic F-127 and its photo- and thermo-responsive release property. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 4, p. 481–488, 2017.

YU, B. et al. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. **Mol membr biol**, v. 27, p. 286–298, 2010.

ZHANG, D. et al. Paclitaxel: New uses for an old drug. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 279–284, 2014.

ZHU, Y. et al. Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 6, p. 1312–1319, 2002.