UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
cosméticos

Orientado:

Orientadora: Profa. Dra. Juliana
Maldonado Marchetti

Coorientadora: Priscyla Daniely Marcato
Gaspari

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 05/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

RESUMO

Luiz, M. T. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PLGA funcionalizadas com folato contendo paclitaxel para a otimização da terapia do câncer de ovário**. 2018. 89f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O paclitaxel (PCX) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento do câncer de ovário. Contudo, a baixa solubilidade do PCX torna necessária a adição de adjuvantes tóxicos à formulação comercial (Taxol®). Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados têm sido estudados para promover a redução dos efeitos tóxicos e aumentar a segurança e a eficiência terapêutica do PCX. Uma das estratégias utilizadas para aumentar a seletividade dos nanocarreadores às células tumorais é a funcionalização de suas superfícies com folato, devido a superexpressão dos receptores de folato nas células tumorais. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas de PLGA funcionalizadas (NP-PCX-AF) e não funcionalizadas (NP-PCX) para a veiculação do PCX, bem como a avaliação *in vitro* da eficácia dos sistemas desenvolvidos em linhagens celulares de adenocarcinoma de ovário. Os nanocarreadores foram produzidos pela técnica de nanoprecipitação e avaliados por meio das análises físico-químicas de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação, estabilidade coloidal e espectro de infravermelho. Além disso, foi avaliada a eficácia antitumoral e o uptake dos sistemas desenvolvidos por meio dos ensaios de citotoxicidade celular por resazurina e internalização por microscopia confocal e citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostraram que as formulações funcionalizadas e não funcionalizadas apresentaram reduzidos valores de diâmetros médios de partículas (menor que 150 nm) e índices de polidispersão reduzidos (menor que 0,2) com elevada eficiência de encapsulação do PCX, próximo a 100%, o que é adequado para a via de administração endovenosa e promoção do direcionamento ativo e passivo no ambiente tumoral. Os resultados de citotoxicidade celular *in vitro* em linhagens OVCAR-3 e SKOV-3 demonstraram a elevada capacidade das formulações desenvolvidas em liberar o PCX em tempo hábil para ocasionar dano celular. Além disso, a formulação NP-PCX-AF apresentou maior capacidade citotóxica que a formulação NP-PCX nas menores concentrações de PCX avaliadas, com redução máxima da viabilidade celular, aproximadamente 22 % para a linhagem celular SKOV-3 e 11% para OVCAR-3, utilizando a concentração de 1000 nM no tempo de 72 horas. Os ensaios de citometria de fluxo e de microscopia confocal mostraram a elevada capacidade de ambos os carreadores serem internalizados através do processo de endocitose, com valores de internalização celular superiores a 80% após 1 hora de tratamento. Estudos *in vivo* subsequentes serão necessários para confirmar o potencial da formulação NP-PCX-AF no tratamento do câncer de ovário.

Palavras-chave: Ácido fólico, nanocarreadores de fármacos, nanopartículas poliméricas, nanotecnologia

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de ovário

O câncer de ovário é um dos carcinomas ginecológicos mais letais, representando a quinta maior causa de mortes por câncer entre as mulheres no Estados Unidos da América. Segundo dados da Sociedade Americana de Câncer (do inglês, American Cancer Society), estima-se que no ano de 2018 nos EUA aproximadamente 22.240 mulheres serão diagnosticadas, sendo a taxa de mortalidade para este mesmo ano estimada em 14.070 óbitos (ACS, 2018). Estimativas realizadas pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer) para o ano de 2016 indicaram aproximadamente 6.150 novos diagnósticos no Brasil, com um risco estimado de 5,95 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2016). A elevada letalidade dos tumores ovarianos está relacionada com a falta de sintomas específicos nos estádios iniciais e a falta de exames de rotina para a sua detecção precoce. Estes dois fatores contribuem para um diagnóstico tardio da doença, em que as células tumorais estão disseminadas para outros tecidos (FORTNER; DAMMS-MACHADO; KAAKS, 2017).

De maneira geral os tumores ovarianos são classificados em quatro diferentes graus de malignidade: estádios I, II, III e IV. Dentre estes, aproximadamente 80% dos pacientes são diagnosticados nos estádios mais avançados (III e IV), em que a presença de nódulos tumorais disseminados pela cavidade peritoneal proporciona um impacto negativo no comportamento do tumor e sobre o prognóstico terapêutico (FAGOTTI et al., 2010; TOMASINA et al., 2013; ACS, 2018). Estima-se que os pacientes diagnosticados em estádios avançados III e IV apresentem uma taxa de sobrevivência em 5 anos de cerca de 39 e 17%, respectivamente, sendo esta relação aumentada para 90% nos casos de pacientes diagnosticados no estágio inicial I (ACS, 2018).

O câncer de ovário pode ter a sua origem em um dos três tipos celulares que compõem este órgão: as células epiteliais, as células germinativas e as células estromais. Dentre estes, o câncer epitelial de ovário (adenocarcinoma de ovário) representa 90% dos casos, podendo ser derivado das células epiteliais da superfície do ovário ou das trompas de falópio (KUHN; KURMAN; SHIH, 2012).

O câncer epitelial de ovário é uma doença com elevada heterogeneidade, sendo classificada de acordo com os cinco principais tipos histológicos: carcinoma

seroso de baixo grau (<5%), carcinoma seroso de alto grau (70%), carcinoma endometrióide (10%), carcinoma de células claras (10%) e carcinoma mucinoso (3%). Os dados epidemiológicos, fatores de risco, alterações genéticas, susceptibilidade ao tratamento quimioterápico e o prognóstico do paciente estão relacionados as características inerentes de cada tipo histológico descrito (PRAT; PATH, 2017). De uma maneira geral, cerca de 10% a 15% dos casos de câncer de ovário estão relacionados com fatores hereditários, enquanto que cerca de 90% estão relacionados a fatores ambientais. Dentre os fatores ambientais que podem aumentar o risco de desenvolvimento deste tipo de tumor estão o uso de hormônios para o tratamento da menopausa, endometriose, obesidade, sedentarismo e consumo de bebida alcoólica. Em contrapartida, o uso de contraceptivo oral está inversamente relacionado ao risco de desenvolver câncer de ovário (WEBB; JORDAN, SUSAN, 2017).

Os diferentes tipos histológicos de adenocarcinoma de ovário também podem ser classificados em dois subtipos, I e II. Os tumores que apresentam crescimento lento, permanecem confinados ao ovário e apresentam estabilidade genômica são classificados como do tipo I, incluindo os tumores serosos de baixo grau, tumores mucinosos, tumores endometrióides e tumores de células clara. Os tumores do tipo II são tumores metastáticos de alto grau e que apresentam elevada instabilidade genômica devido à redução da capacidade das células tumorais em promover reparos no DNA, principalmente devido a mutações que inativam o gene p53 que é responsável pelo controle do ciclo celular por meio do reparo de danos no DNA e indução da apoptose. Portanto, os tumores do subtipo II, carcinomas serosos de alto grau, são mais agressivos e comumente encontrados nos estádios mais avançados (estágios III e IV) (SAMTANI; SHARMA; GARG, 2017).

1.2. Tratamento

Após diagnóstico, o tratamento do câncer de ovário pode ser realizado por meio de cirurgia citorrredutora, tratamento quimioterápico ou a combinação de ambos. De maneira geral, é recomendável a pacientes diagnosticados em estádio I o tratamento cirúrgico isolado, visto que os tumores neste estadiamento se encontram em regiões bem delimitadas e é possível a realização de cirurgia citorrredutora máxima, sem tumor residual visível após o procedimento. Entretanto, em pacientes diagnosticados nos estádios II, III e IV (mais de 80% dos pacientes) o

tratamento combinado de cirurgia citorrredutora seguida de quimioterapia adjuvante é o procedimento recomendável (BRASIL, 2012; GIDWANI; VYAS, 2015). Em casos de pacientes em que a cirurgia primária não é passível de ser realizada, pela presença de ascite volumosa ou extensa proliferação tumoral, o protocolo prevê uma quimioterapia prévia (neoadjuvante), seguida do procedimento cirúrgico e quimioterapia adjuvante (BRASIL, 2012; VAN MEURS et al., 2013). Neste protocolo terapêutico o quimioterápico neoadjuvante à base de taxano (paclitaxel ou docetaxel) e composto de platina (cisplatina ou carboplatina) são administrados por 3 a 6 ciclos, seguido de cirurgia para citorredução máxima. Em seguida, no caso de resposta terapêutica positiva, é procedida a quimioterapia adjuvante com o mesmo esquema de ciclos de administração (BRASIL, 2012). Com o intuito de avaliar a progressão clínica dos pacientes com câncer de ovário submetidos aos esquemas terapêuticos pode-se utilizar o doseamento de marcadores tumorais, como antígeno CA 125, antígeno carcinoembrionário (CEA), α -fetoproteína (AFP) e gonadotrofina coriônica humana (HCG) (GIDWANI; VYAS, 2015).

Dentre os taxanos utilizados neste protocolo terapêutico, o paclitaxel (PCX) é considerado o de primeira escolha. O PCX, um pó branco cristalino com ponto de fusão de 216-217°C, é um alcalóide que foi originalmente isolado das cascas da planta *Taxus brevifolia*. Contudo, por se tratar de uma fonte natural não renovável, a obtenção do PCX em quantidades suficientes para o tratamento quimioterápico foi a principal limitação para a sua aplicação clínica. Além disso, devido à complexidade estrutural deste composto (**Figura 1**), a síntese completa do PCX ainda não foi desenvolvida. Sendo assim, atualmente o PCX é obtido por meio de reação de semisíntese com a molécula 10-desacetilbacatina-III extraída das folhas das espécies *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata* (BERNABEU et al., 2017).

Em 1992, foi aprovada pela FDA (do inglês, Food and Drug Administration) sua utilização para o tratamento de câncer de ovário e mama. Além disso, este fármaco apresenta atividade antitumoral contra diversos tipos de tumores sólidos, como câncer de pulmão e sarcoma de Kaposi (BOJAT; BALABANYAN; ALYAUTDIN, 2011; FDA, 2011). Sua ação antitumoral está relacionada a ligação seletiva do PCX à subunidade b da proteína tubulina. Após esta ligação, a tubulina é polimerizada e estabiliza os microtúbulos. Os microtubulos são estruturas que compõem o citoesqueleto e, durante o processo de divisão celular, são responsáveis pelo deslocamento dos cromossomos. Desta forma, essa estabilização promove a

formação de um fuso mitótico disfuncional e interrompe o processo de divisão celular nas fases G2 e M do ciclo celular. Além disso, o PCX também inibe o processo de angiogênese e induz a expressão de citocinas e genes relacionadas a inibição do crescimento celular (BERNABEU et al., 2017).

Figura 1 - Estrutura química do paclitaxel.

Contudo, por se tratar de uma molécula não iônica e praticamente insolúvel em água (valor teórico de $\log P = 3,2$) o PCX apresenta reduzida biodisponibilidade (BERNABEU et al., 2017). Com o objetivo de melhorar a solubilidade do fármaco, a formulação comercial disponível, Taxol[®], foi desenvolvida utilizando como adjuvante o Cremophor EL[®] (óleo de rícino polietoxilado) e o etanol desidratado (proporção 1:1 v/v). Entretanto, devido a necessidade de elevada concentração do Cremophor EL[®], este medicamento tem demonstrado efeitos adversos severos como hipersensibilidade, nefrotoxicidade, letargia, hipotensão e dificuldades respiratórias (MITRA; LIN, 2003). Outra desvantagem desta formulação é a incompatibilidade do PCX com componentes plásticos utilizados na sua administração e a sua instabilidade em meio aquoso, o que pode levar à sua precipitação (KOUDELKA; TURANEK, 2012). Além disso, mais de 70% dos pacientes apresentam resistência a este tratamento (XIAO et al., 2009).

Neste contexto, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de desenvolver formulações que apresentem uma maior eficiência terapêutica contra as células tumorais em detrimento das células normais e com reduzidos efeitos adversos. Sendo assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados tem sido alvo de diversas pesquisas visando tornar a terapia do câncer de ovário mais eficiente e segura para o paciente (GRAZIANI et al., 2017; LUO et al., 2017).

1.3. Nanotecnologia e sistemas de liberação de fármacos

Nas últimas décadas, a nanotecnologia tem se tornado uma estratégia promissora e inovadora para a veiculação de diversas classes de fármacos, visando o aumento da eficiência terapêutica e a redução da toxicidade de diversas terapias (ABRIATA et al., 2017; ELOY et al., 2016). Diante das dificuldades encontradas nos tratamentos de diversos tipos de cânceres, como não especificidade às células tumorais, elevado número de efeitos adversos e alta taxa de resistência aos quimioterápicos, o desenvolvimento de nanocarreadores voltados para o melhoramento destas terapias têm sido uma das principais aplicações desta tecnologia, representando cerca de um-terço das pesquisas com nanocarreadores. Diante deste cenário, em 1995, o primeiro medicamento nanoestruturado, lipossomas contendo doxorubicina (DoxilTM), foi aprovado pela FDA para uso em humanos no tratamento de câncer. Este medicamento apresentou eficácia e segurança superior ao tratamento convencional com doxorubicina. Em seguida, diversos outros nanocarreadores foram aprovados para uso clínico no tratamento de câncer, como MyocetTM, DaunoxomeTM, AbraxaneTM e OnivydeTM (HARE et al., 2017).

A aplicação de nanocarreadores para o tratamento de tumores malignos está relacionado ao elevado número de vantagens destes sistemas quando comparados aos tratamentos convencionais. Dentre estas vantagens, destaca-se o potencial das nanopartículas em aumentar a estabilidade do fármaco, protegendo-o contra a degradação e a inativação, e a possibilidade de um aumento da solubilidade de compostos poucos solúveis (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Além disso, uma das principais vantagens do uso destes sistemas está no fato de que estes nanocarreadores possuem a capacidade de se acumular no ambiente tumoral por meio de dois mecanismos: o direcionamento passivo e o direcionamento ativo (**Figura 2**). Estes dois mecanismos levam a um maior acúmulo do fármaco no sítio de ação, possibilitam a administração de doses menores ao paciente, com consequente redução dos efeitos tóxicos (FAROKHZAD; LANGER, 2009; TOMASINA et al., 2013).

O acúmulo do fármaco na região tumoral pelo direcionamento passivo dos nanocarreadores ocorre devido ao efeito de permeação e retenção aumentados, também denominado de efeito EPR (do inglês, *enhanced permeability and retention effect*). Este efeito ocorre devido ao rápido processo de angiogênese no ambiente

tumoral, em que vasos sanguíneos são produzidos de maneira rápida e defeituosa, formando fenestrações entre as células do epitélio capilar. Estas fenestrações permitem uma maior permeação das partículas no tecido tumoral, principalmente de partículas que apresentam tamanho entre 20 a 200 nm. Além disso, nesta região a deficiência dos vasos linfáticos proporciona um maior acúmulo destes carreadores e permite com que permaneçam por um maior tempo no sítio de ação (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010; TOMASINA et al., 2013).

Figura 2 - Esquema de direcionamento ativo e passivo de nanocarreadores.

Fonte: adaptado de FAROKHZAD; LANGER, 2009.

O direcionamento ativo dos nanocarreadores ocorre por meio do acoplamento de um ligante que apresente receptores específicos ou que sejam superexpressos em células tumorais, como por exemplo anticorpos, peptídeos, proteínas, aptameres, folato e glicose (ELOY et al., 2017; XU et al., 2015). A presença deste ligante promove um direcionamento específico às células tumorais e o acúmulo do fármaco no local de ação, o que reduz a toxicidade e aumenta a biodisponibilidade do fármaco (TRAN et al., 2017).

Com relação ao tratamento de câncer de ovário, nanocarreadores, como nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados e lipossomas estão sendo avaliados frente a capacidade de liberação e direcionamento de fármacos em tumores (GRAZIANI et al., 2017; LUO et

al., 2017; RAVAR et al., 2016). Desta forma, estudos são necessários para o aprimoramento destes sistemas, a fim de possibilitar uma maior especificidade do tratamento às células tumorais por meio do direcionamento passivo e ativo, potencializando o tratamento.

1.4. Nanopartículas poliméricas

Os agentes quimioterápicos têm o seu efeito terapêutico restrito devido o limite da dose que pode ser administrada nos pacientes, visto que estes compostos não são seletivos para as células tumorais e provocam muitos danos aos tecidos saudáveis (DANHIER et al., 2012). Com o intuito de minimizar este problema, as nanopartículas poliméricas vêm sendo estudadas principalmente devido a sua capacidade de modificar a distribuição de fármacos, aumentando a sua concentração no sítio de ação desejado, proporcionando assim uma melhor eficiência no tratamento com consequente redução dos efeitos tóxicos. Estes sistemas conduzem a uma liberação sustentada do agente quimioterápico, o que possibilita a redução do número de doses e de administrações aos pacientes (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Acrescenta-se que as nanopartículas poliméricas permitem elevada eficiência de encapsulação de fármaco lipofílicos e, o recobrimento polimérico do fármaco, é capaz de protegê-lo de possíveis degradações, além de reduzir a sua capacidade de ocasionar irritações (CRUCHO; BARROS, 2017). Devido ao reduzido tamanho dessas nanopartículas, elas podem ser administradas por diversas vias, inclusive a via endovenosa, não apresentando riscos de embolia, pois sua estrutura nanométrica é incapaz de obstruir os vasos sanguíneos, o que é desejado quando se objetiva uma administração endovenosa (MAINARDES; EVANGELISTA, 2005; SOPPIMATH; AMINABHAVI; KULKARNI, 2001).

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas de acordo com a sua morfologia em nanocápsulas ou nanoesferas, sendo os componentes da formulação e a técnica de preparo utilizadas os principais determinantes do tipo de estrutura produzida (**Figura 3**). As nanocápsulas apresentam-se na forma de um reservatório, em que um invólucro sólido circunda um núcleo composto por substâncias que podem estar tanto no estado líquido como semi-sólido à temperatura ambiente. Por outro lado, as nanoesferas possuem uma estrutura matricial, em que os fármacos estão uniformemente dispersos. Ambas podem ser utilizadas na veiculação de

fármacos, podendo estes estarem aprisionados no seu interior ou adsorvidos na superfície da partícula (EL-SAY; EL-SAWY, 2017; LI et al., 2017).

Figura 3 - Estrutura morfológica das nanopartículas poliméricas: nanoesfera e nanocápsula.

Os polímeros comumente utilizados no preparo das nanopartículas podem ser de origem natural, como a quitosana, albumina, gelatina e alginato; ou de origem sintética, tais como, poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA) e poli- ϵ -caprolactona (PCL) (CRUCHO; BARROS, 2017). Dentre estes polímeros, o PLGA (**Figura 4**) apresenta características adequadas para a utilização em sistemas de liberação de fármacos, sendo biocompatível, biodegradável e após a liberação do fármaco, é hidrolisado em seus monômeros de ácido láctico e ácido glicólico, que são posteriormente metabolizados pelo próprio organismo humano durante o ciclo de Krebs, apresentando efeitos tóxicos mínimos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). Devido a estas propriedades este polímero foi autorizado pela FDA para o uso em seres humanos, sendo possível a sua administração por diversas vias, incluindo a via endovenosa (WACKER, 2013). O PLGA é um copolímero sintetizado a partir da reação de copolimerização dos monômeros de ácido láctico e ácido glicólico, sendo comercializado sob a forma de diferentes massas moleculares e em diferentes proporções deste monômero. Sendo assim, as distintas proporções dos copolímeros e a massa molecular do polímero formado influenciam diretamente no tempo de degradação, podendo variar de meses a anos (MAINARDES & EVANGELISTA, 2005; DANHIER *et al.*, 2012).

Figura 4 - Estrutura química do poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por diversas técnicas, sendo este processo crítico para a definição do tamanho, índice de polidispersão (PDI), eficiência de encapsulação do fármaco e do tipo de estrutura formada, nanocápsula ou nanoesfera. De maneira geral, as técnicas de preparo podem ser classificadas em dois tipos: as que envolvem a polimerização de monômeros e as que utilizam polímeros pré-formados. Devido a reação de polimerização resultar em resíduos tóxicos de difícil purificação, as técnicas que utilizam polímeros pré-formados são as mais utilizadas para o desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados, tais como emulsificação e evaporação do solvente, emulsificação e difusão do solvente e nanoprecipitação (CRUCHO; BARROS, 2017).

A nanoprecipitação é uma técnica de fácil execução, reproduzível, de baixo custo e fácil escalonamento. Além disso, as nanopartículas obtidas por meio desta técnica apresentam reduzido tamanho, baixo PDI e elevada eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos, características adequadas para a promoção do direcionamento passivo dos nanocarreadores no ambiente tumoral. De acordo com Wang e colaboradores (2016), alguns parâmetros de produção podem ser otimizados nesta técnica para produzir partículas com reduzido tamanho e PDI e elevada eficiência de encapsulação, como a razão de fase orgânica/ fase aquosa, velocidade de agitação e concentração de polímero e tensoativo (WANG et al., 2016). Chourasiya e colaboradores (2016) avaliaram por meio de planejamento fatorial 3^3 a influência da concentração de polímero, concentração de tensoativo e o volume de fase aquosa sobre o tamanho de partícula e a eficiência de encapsulação do atenolol durante o preparo de nanopartículas de PLGA, demonstrando que estes parâmetros de processo podem influenciar as características dos nanocarreadores produzidos, sendo necessária a sua otimização na produção de nanopartículas poliméricas (CHOURASIYA; BOHREY; PANDEY, 2016).

1.5. Funcionalização

Os agentes quimioterápicos, como o PCX, apresentam elevada citotoxicidade devido à baixa seletividade às células malignas. Em vista disto, os mecanismos de direcionamento ativo dos fármacos têm sido avaliados com o intuito de torná-los mais seletivos, aumentando assim, a eficiência do tratamento e reduzindo os efeitos colaterais gerados pela sensibilização das células normais. O acoplamento de anticorpos, folato, proteínas, peptídeos e aptameres às nanopartículas, pode aumentar a exposição dos agentes quimioterápicos às células malignas, visto que nestas células ocorre a superexpressão de proteínas específicas relacionadas ao aumento do suporte nutricional e da proliferação celular (ALIBAKHSHI et al., 2017; ELOY et al., 2017; JIN et al., 2017).

Dentre estes, o folato tem sido utilizado no direcionamento de fármacos quimioterápicos devido ao seu reduzido tamanho (441 Da), baixo custo, natureza não imunogênica e pela elevada especificidade aos receptores de folato presentes na membrana células das células eucarióticas (BODDU; VAISHYA, 2012). O folato é um componente essencial para a síntese de pirimidinas e purinas, moléculas que compõem o DNA (LIANG et al., 2011). Por isso, o transporte de folato para o interior das células é mediado por dois tipos de receptores: transportador de folato reduzido (RFC) ou receptor de folato mediador do processo de endocitose (RF). RFC são receptores bidirecionais responsáveis por controlar a entrada e a saída de folato das células. Os RF são glicoproteínas de membrana que promovem a entrada de folato no interior das células por meio do processo de endocitose. Dentre os RF existentes, o receptor de folato alfa (RF α) se encontra superexpresso em diversos tipos de tumores epiteliais, como o adenocarcinoma de ovário. Estima-se que cerca de 80% dos tumores epiteliais de ovário apresentem a superexpressão deste receptor. Este fato está relacionado ao maior aporte nutricional necessário às células malignas, que estão em constante processo de divisão celular, enquanto que as células normais apresentam uma baixa expressão de RF α (MARTIN et al., 2017). Algumas pesquisas indicam que estes receptores podem estar cerca de 100 a 300 vezes mais expressos nas células tumorais do que nas normais (SAMADIAN et al., 2016; SAXENA et al., 2012).

Além do reconhecimento específico do folato, o *uptake* celular dos nanocarreadores é favorecido devido ao processo de endocitose mediada pelo RF (**Figura 5**). Após endocitose, a medida que o pH endossomal se aproxima de 5,0, o

folato se dissocia do seu receptor e o fármaco é liberado para o interior do citoplasma celular. Ao final do processo, os receptores livres ou os que permanecem ligados aos nanocarreadores são novamente reciclados para a superfície celular (WANG et al., 2013; ZWICKE; MANSOORI; JEFFERY, 2012). Pesquisas utilizando a funcionalização de sistemas de liberação nanoestruturados com folato têm demonstrado que o acoplamento deste composto às nanopartículas tem proporcionado um aumento do *uptake* celular e redução da citotoxicidade das formulações em células normais (HE et al., 2015; HU et al., 2016; HUANG et al., 2016).

Figura 5 – Esquema do processo de endocitose de nanopartículas funcionalizadas com folato (NPFA) mediada por receptor de folato, sendo A: internalização; B: endossoma recém-formado; C: endossoma acidificado; D: escape endossomal e liberação do carreador para o citoplasma e E: fusão com a membrana.

Fonte: adaptado de Wang e colaboradores (2013) (WANG et al., 2013).

Zhang e colaboradores (2016) desenvolveram carreadores lipídicos funcionalizados com folato para a veiculação de cisplatina visando o tratamento de tumor cervical. A formulação funcionalizada com o folato apresentou uma maior atividade antitumoral *in vitro* em relação ao fármaco livre e ao nanocarreador lipídico não funcionalizado contendo a cisplatina, com valores de IC₅₀ três vezes menor ao utilizar a linhagem celular HeLa. Além disso, os ensaios *in vivo* em modelo animal xenotransplantado confirmaram a maior atividade antitumoral da formulação funcionalizada com folato que apresentou a maior taxa de redução do tumor, 79,3%, seguida do nanocarreador não funcionalizado, 64,4%, e da cisplatina livre, 18,5% (ZHANG et al., 2016).

Outro estudo desenvolvido por Thu e colaboradores (2015) investigou a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de PLA-TPGS funcionalizadas com folato para a veiculação de paclitaxel. Os resultados *in vitro* indicaram que a formulação funcionalizada com folato apresentou maior citotoxicidade celular quando comparado com o PCX livre devido ao direcionamento dos nanocarreadores através dos receptores de folato. Os ensaios *in vivo* também demonstraram uma maior redução do crescimento tumoral quando os animais foram tratados com a formulação de nanopartículas funcionalizadas, demonstrando o potencial do sistema desenvolvido para o tratamento de câncer (THU et al., 2015).

Diante do exposto, diversas pesquisas têm sido conduzidas para a avaliação de nanocarreadores funcionalizados com folato para a otimização do tratamento de câncer de ovário. Dentre estas estratégias, destaca-se o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas de PLGA funcionalizadas com folato para o direcionamento sítio-específico do paclitaxel, sendo um potencial sistema para o tratamento do câncer de ovário.

5. CONCLUSÃO

De acordo com as técnicas e métodos selecionados e os resultados apresentados no presente trabalho concluímos que houve êxito no processo de síntese do P407-AF, na otimização e caracterização das nanopartículas funcionalizadas e não funcionalizadas com folato. As formulações desenvolvidas apresentaram diâmetros médios de partículas, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação do PCX compatíveis com a via de administração pretendida, a via endovenosa. Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade celular em linhagens de adenocarcinoma humano, SKOV-3 e OVCAR-3, demonstraram que as formulações NP-PCX e NP-PCX-AF foram capazes de disponibilizar o PCX nos tempos de incubação propostos e ocasionar dano celular. A formulação NP-PCX-AF nas menores concentrações de tratamento avaliadas apresentou maior efeito citotóxico em ambas as linhagens células utilizadas quando comparada com os efeitos produzidos pela formulação NP-PCX. Além disso, ambos os nanocarreadores desenvolvidos apresentaram elevado *uptake* celular após 1(uma) hora de incubação em meio de cultivo, mostrando a capacidade dos nanocarreadores serem internalizados através do processo de endocitose. Assim, o efeito antitumoral *in vitro* sugere que o nanocarreador NP-PCX-AF apresenta potencial para a otimização da terapia do câncer de ovário, sendo necessários estudos *in vivo* subsequentes para comprovação da sua capacidade de aumentar a eficiência e segurança do tratamento de câncer de ovário.

REFERÊNCIAS

ABRIATA, J. P. et al. Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 77, n. PG-1196-1203, p. 1196–1203, 2017.

ACS - American Cancer Society. 2018. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html> >. Acesso em: 02/02/2018.

ALIBAKHSHI, A. et al. Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 268, n. October, p. 323–334, 2017.

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

BARTELMLESS, B. et al. Boron dipyrromethene (BODIPY) Functionalized Carbon Nano-Onions for High Resolution Cellular Imaging. **Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications**, v. 6, n. 22, p. 13761–13769, 2014.

BERNABEU, E. et al. Paclitaxel- What has been done and the challenges remain ahead. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 526, p. 474-495, 2017.

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

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.

BOJAT, V.; BALABANYAN, V.; ALYAUTDIN, R. The Entrapment of Paclitaxel in PLGA Nanoparticles Increases its Cytotoxicity against Multiresistant Cell Line. **Medicine**, v. 1, n. 4, p. 306–319, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 458, de 21 de maio de 2012. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas – Neoplasia Maligna Epitelial de Ovário. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 de maio de 2012. Seção 1, p. 99-102.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 166, de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União,

Brasília, DF, 25 de julho de 2017. Seção 1, p. 87.

CHOURASIYA, V.; BOHREY, S.; PANDEY, A. Formulation, optimization, characterization and in-vitro drug release kinetics of atenolol loaded PLGA nanoparticles using 3 3 factorial design for oral delivery. **Materials Discovery**, v. 5, p. 1–13, 2016.

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, 2017.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505–522, 2012.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135–146, 2010.

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.

DHAT, S. et al. Risk management and statistical multivariate analysis approach for design and optimization of satranidazole nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 273–283, 2017.

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. Desenvolvimento e validação de um método analítico por clae para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1036–1040, 2012.

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.

FAGOTTI, A. et al. Should laparoscopy be included in the work-up of advanced ovarian cancer patients attempting interval debulking surgery? **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 1, p. 72–77, 2010.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16–20, 2009.

FDA- Food and Drug Administration. **Taxol® (paclitaxel) injection**. Disponível em: < https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020262s049lbl.pdf >. Acesso em: 15/10/2017.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

FILIBE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.

FORTNER, R. T.; DAMMS-MACHADO, A.; KAKS, R. Systematic review: Tumor-associated antigen autoantibodies and ovarian cancer early detection. **Gynecologic Oncology**, v. 147, n. 2, p. 465–480, 2017.

GIDWANI, B.; VYAS, A. The potentials of nanotechnology-based drug delivery system for treatment of ovarian cancer. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 291–297, 2015.

GRAZIANI, S. R. et al. Phase II study of paclitaxel associated with lipid core nanoparticles (LDE) as third-line treatment of patients with epithelial ovarian carcinoma. **Medical Oncology**, v. 34, n. 9, 2017.

GROSS, J. et al. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 30–41, 2016.

HARE, J. I. et al. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 108, p. 25–38, 2017.

HE, C. et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657–3666, 2010.

HE, Z. et al. Co-delivery of cisplatin and paclitaxel by folic acid conjugated amphiphilic PEG-PLGA copolymer nanoparticles for the treatment of non-small lung cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 39, p. 42150–42168, 2015.

HU, G. et al. Utilizing G2/M retention effect to enhance tumor accumulation of active targeting nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 6, n. 17, p. 1–10, 2016.

HUANG, S. et al. Folic-Acid-Mediated Functionalized Gold Nanocages for Targeted Delivery of Anti-miR-181b in Combination of Gene Therapy and Photothermal Therapy against Hepatocellular Carcinoma. **Advanced Functional Materials**, p. 2532–2544, 2016.

ICH – International Conference on Harmonization. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. Disponível em: < https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em: 10/10/2017.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. 2016. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario> >. Acesso: 02/02/2018.

JI, J.; ZUO, P.; WANG, Y. Enhanced Antiproliferative Effect of Carboplatin in Cervical Cancer Cells Utilizing Folate-Grafted Polymeric Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, p. 4–11, 2015.

JIN, H. et al. Folate-Chitosan Nanoparticles Loaded with Ursolic Acid Confer Anti-Breast Cancer Activities in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 6, n. March 2015, p. 1–11, 2016.

JIN, H. et al. EGFR-targeting PLGA-PEG nanoparticles as a curcumin delivery system for breast cancer therapy. **Nanoscale**, v. 9, n. 42, p. 16365–16374, 2017.

KAROLEWICZ, B. et al. The effect of Pluronic F127 on the physicochemical properties and dissolution profile of lovastatin solid dispersions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2283–2290, 2015.

KOUDELKA, S.; TURANEK, J. Liposomal paclitaxel formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 163, n. 3, p. 322–334, 2012.

KUHN, E.; KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. Ovarian Cancer Is an Imported Disease: Fact or Fiction? **Current obstetrics and gynecology reports**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2012.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LEE, H. G. et al. Hsp90 inhibitor SY-016 induces G2/M arrest and apoptosis in paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells. **Oncology Letters**, v. 13, n. 4, p. 2817–2822, 2017.

LI, P. et al. Synthesis and characterization of folate conjugated chitosan and cellular uptake of its nanoparticles in HT-29 cells. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 6, p. 801–806, 2011.

LI, Q. et al. A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, v. 7, n. 6, p. 122, 2017.

LIANG, C. et al. Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 4057–4066, 2011.

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. v. 105, p. 711–719, 2017.

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.

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.

MITRA, A.; LIN, S. Effect of surfactant on fabrication and characterization of paclitaxel-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticulate delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 7, p. 895–902, 2003.

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.

PAL, M. K. et al. Synergistic effect of piperine and paclitaxel on cell fate via cyt-c, Bax/Bcl-2-caspase-3 pathway in ovarian adenocarcinomas SKOV-3 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 791, n. October, p. 751–762, 2016.

PLATEL, A. et al. Influence of the surface charge of PLGA nanoparticles on their in vitro genotoxicity, cytotoxicity, ROS production and endocytosis. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 3, p. 434–444, 2016.

PRAT, J.; PATH, F. R. C. Pathology of borderline and invasive cancers. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 41, p. 15–30, 2017.

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.

RAMBERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

RAVAR, F. et al. Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 229, p. 10–22, 2016.

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

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20–31, 2007.

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.

SAMTANI, R.; SHARMA, N.; GARG, D. Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals and Epigenetic Modifications in Ovarian Cancer: A Review. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 1, p. 193371911771126, 2017.

SAXENA, V. et al. Folate-decorated PEG-PLGA nanoparticles with silica shells for capecitabine controlled and targeted delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 25–31, 2012.

SHAIKH, M. V.; KALA, M.; NIVSARKAR, M. Formulation and optimization of doxorubicin loaded polymeric nanoparticles using Box-Behnken design: ex-vivo stability and in-vitro activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 262–272, 2017.

SHARMA, D. et al. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles for intranasal delivery of lorazepam using Box-Behnken design: In vitro and in vivo evaluation. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SHARMA, D. et al. Nose-To-Brain Delivery of PLGA-Diazepam Nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 5, p. 1108–1121, 2015.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Controlled release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

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.

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

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.

VU-QUANG, H. et al. Theranostic tumor targeted nanoparticles combining drug delivery with dual near infrared and ^{19}F magnetic resonance imaging modalities. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 7, p. 1873–1884, 2016.

WACKER, M. Nanocarriers for intravenous injection - The long hard road to the market. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 1, p. 50–62, 2013.

WANG, Y. et al. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. **Nanomaterials**, v. 6, n. 2, p. 26, 2016.

WANG, Z. et al. Folic acid-functionalized mesoporous silica nanospheres hybridized with AIE luminogens for targeted cancer cell imaging. **Nanoscale**, v. 5, n. 5, p. 2065, 2013.

WEBB, P. M.; JORDAN, SUSAN, J. Epidemiology and Risk Factors of Uterine Fibroids. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 41, p. 3–14, 2017.

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

XU, X. et al. Cancer nanomedicine: From targeted delivery to combination therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 223–232, 2015.

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

YANG, Y. et al. Polysaccharide-based Noncovalent Assembly for Targeted Delivery of Taxol. **Nature**, v. 6, n. 19212, p. 1–10, 2016.

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.

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.

ZHANG, G. et al. Folate-modified, cisplatin-loaded lipid carriers for cervical cancer chemotherapy. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1393–1397, 2016.

ZWICKE, G. L.; MANSOORI, G. A.; JEFFERY, C. J. Targeting of Cancer Nanotherapeutics. **Nano Reviews**, v. 1, p. 1–11, 2012.