

# 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. Dr<sup>a</sup>. Juliana Maldonado Marchetti

**Coorientadora:** Profa. Dr<sup>a</sup>. 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

## 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 estádios 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<sup>®</sup>, 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 apresentarem 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

## 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 estádios: I, II, III e IV, **Figura 1**. No estádio I, o câncer encontra-se confinado no ovário ou tuba de Falópio. No estádio II, o mesmo encontra-se no ovário com disseminação para órgãos próximos dentro da pelve tais como útero, bexiga, cólon sigmoide ou reto. Nos estádios 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 estádio 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 estádio 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 estádios III e IV da doença, os quais indicam disseminação na cavidade peritoneal, 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-** Estádios 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 sobrevivência (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 topoisomerase 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).

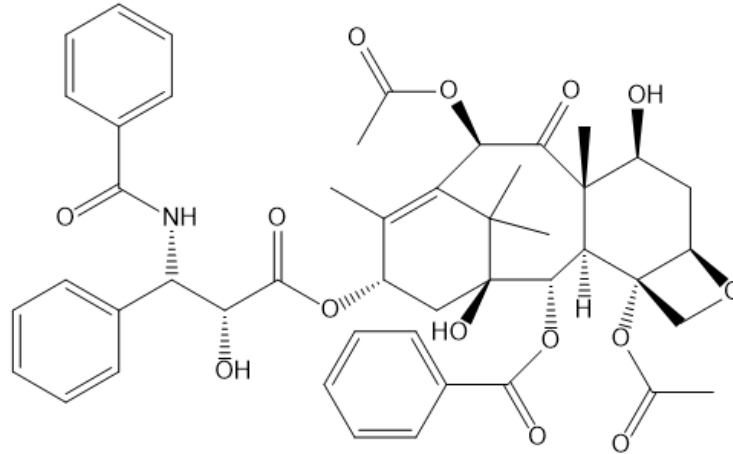
### 1.2.1 Paclitaxel

O paclitaxel é um pó branco cristalino, de fórmula molecular  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , peso molecular de  $853,918 \text{ g.mol}^{-1}$  e com ponto de fusão de  $216\text{-}217^{\circ}\text{C}$ . 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).

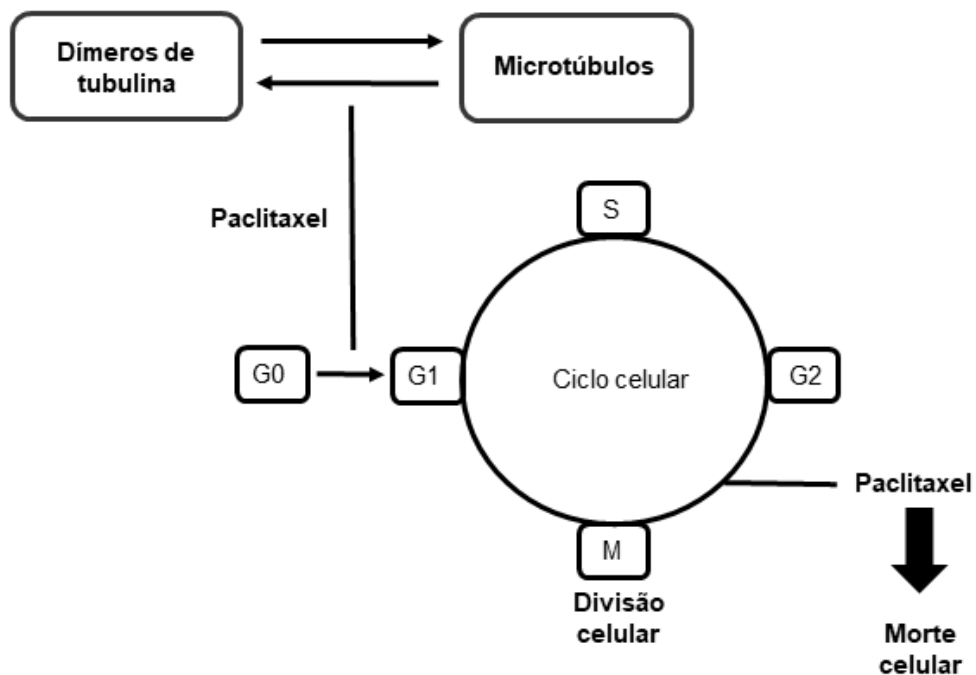
Alguns estudos demonstram que os maiores alvos de ação do paclitaxel são os microtúbulos, que através da despolimerização e mudanças dinâmicas, resultam no rompimento da rede dos microtúbulos requerida para a mitose e proliferação celular (**Figura 3**). As células tratadas com paclitaxel são incapazes 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<sup>®</sup>, medicamento disponível comercialmente, o paclitaxel é formulado em uma mistura de Cremophor EL<sup>®</sup>/etanol (proporção 1:1, v/v). O Cremophor EL<sup>®</sup> 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).

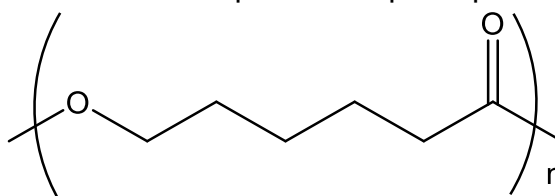
As nanopartículas poliméricas destacam-se por possuírem um grande potencial para minimizar os problemas da farmacoterapêutica existente, aumentando a eficácia terapêutica de agentes quimioterápicos, diminuindo os efeitos colaterais e toxicidade. Essa minimização ocorre devido à capacidade de sustentar 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 possuírem 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- $\epsilon$ -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).



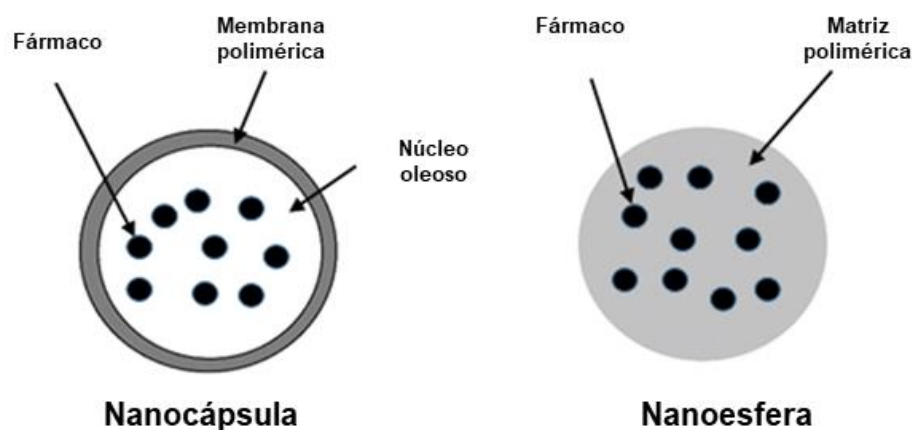
A PCL (**Figura 4**) é um poliéster sintético aprovado pela FDA, semicristalino, biodegradável, biocompatível e de baixo custo, e tem sido utilizada na encapsulação de diversos tipos de fármacos (OSSA et al., 2012; SINHA et al., 2004). É adequado para liberação modificada de fármacos devido a sua biodegradabilidade, 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).

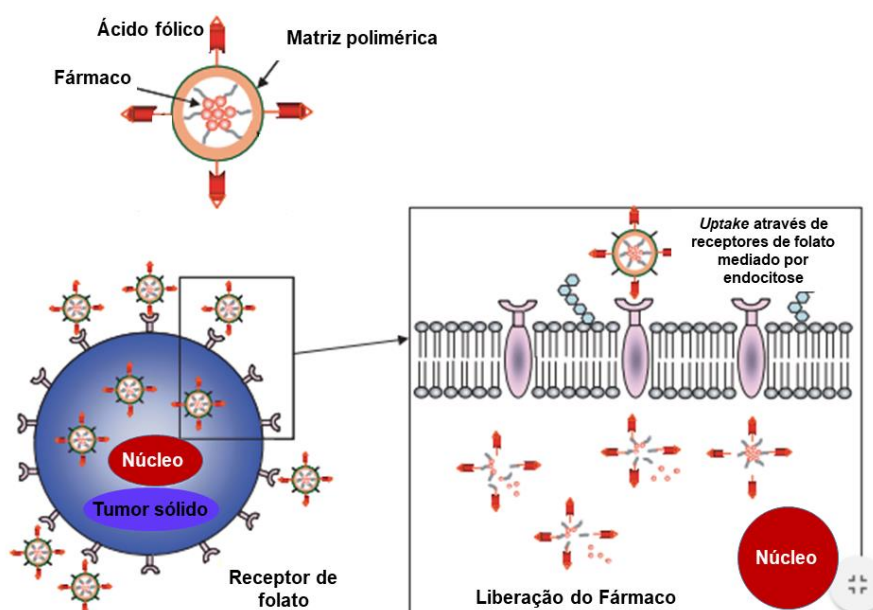
**Figura 5-** Esquema da estrutura de nanoesfera e nanocápsula.



### 1.3.2 Funcionalização de nanopartículas

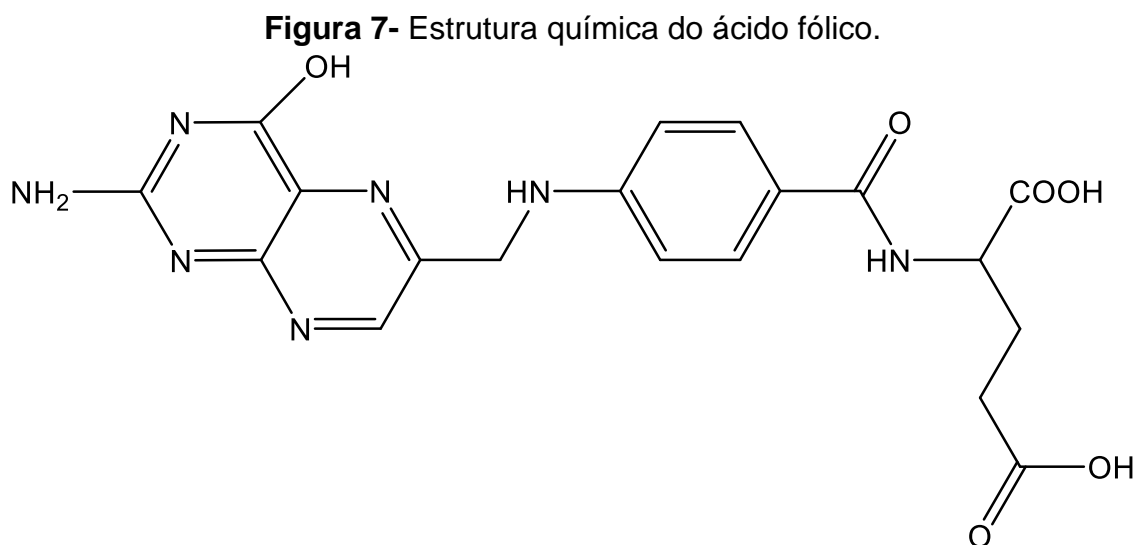
A quimioterapia e a radioterapia são muito citotóxicas e possuem limitações devido aos efeitos colaterais mencionados no item 1.2.1. Essa toxicidade sensibiliza células normais devido à terapia não ser seletiva para células malignas. Com a finalidade de superar as desvantagens do tratamento convencional, 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<sup>-1</sup> e fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>, 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).



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<sup>®</sup> com o ácido fólico (AF);
- Avaliação da funcionalização do Poloxamer 407<sup>®</sup> com o ácido fólico através da espectroscopia por UV e ressonância magnética nuclear de prótons (<sup>1</sup>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;

## 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. Guia 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 pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines**, 4<sup>th</sup> 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 ahead** **International 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.

FILIFE, 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- $\gamma$ -Glutamic Acid ( $\gamma$ -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 pharmaceuticals**, 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  $\alpha$  ) expression in archival tumor and biopsy samples from relapsed epithelial ovarian cancer patients : A phase I expansion study of the FR  $\alpha$  -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- $\epsilon$ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. **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. **Química 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 ( $\epsilon$ -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 pharmaceuticals**, 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.