

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS NA MELHORIA DA RESPOSTA ANTIMETASTÁTICA DE UM
ALCALÓIDE CITOTÓXICO, A CAMPTOTECINA**

GECIONI LOCH NECKEL

**FLORIANÓPOLIS
2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS NA MELHORIA DA RESPOSTA ANTIMETASTÁTICA DE UM
ALCALÓIDE CITOTÓXICO, A CAMPTOTECINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmácia como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elenara M. T. Lemos
Senna

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Alvarez Silva

GECIONI LOCH NECKEL

FLORIANÓPOLIS

2006

Às amigas da graduação, Léa, Marinês e Patrícia
e ao Prof. Aldo Brito.

Agradecimentos

À Prof. Dra. Elenara Lemos Senna que com sua orientação, compreensão e serenidade tornou possível a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Ângela Campos pela amizade e otimismo 'bárbaro', ao Prof. Dr. Valdir Soldi pelas contribuições e disponibilidade e ao Prof. Dr. Carlos Zanetti por ter tornado possível a utilização do biotério do MIP/CCB.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas, em especial a Sandra, por sua amizade e carinho, e a Solange e ao Nilson pelo apoio técnico.

A todos da SAF (Sociedade Amigos da Farmacotécnica), pela amizade.

Ao Marco, por seu auxílio com a cultura celular, ao Daniel pela colaboração nas análises estatísticas e no manejo com os animais, e a ambos pela amizade.

Aos colegas do mestrado pelos bons momentos e pela colaboração

Aos alunos-amigos de iniciação científica, Robson, Daiane e Ana Cristina pela colaboração, durante os vários momentos deste trabalho. A Taty, amiga de tantas risadas, sempre companheira ('mugre') e incentivadora. A Cristiana (Kiki) pelas importantes informações e pela amizade e carinho. A todos pelos bons momentos compartilhados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao César, pelo amor, amizade, companheirismo e incentivo em todos os momentos.

À minha família, em especial aos meus pais, Geni e Vitalino, por me mostrarem que através da determinação e do compromisso é que se obtém as conquistas, e a minha querida irmãzinha, Marta, pela amizade e incentivo.

RESUMO

A camptotecina é um fármaco que apresenta uma considerável atividade antitumoral cujo mecanismo de ação envolve a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores. Entretanto, a administração intravenosa deste fármaco é limitada devido a sua baixa solubilidade aquosa em soluções apresentando baixos valores de pH, e a sua rápida inativação após administração, decorrente da abertura do anel lactônico, em pH fisiológico. Por outro lado, estudos clínicos têm revelado que a camptotecina apresenta a mielossupressão como efeito colateral dose-dependente, além de outros distúrbios tais como cistite hemorrágica, náuseas, vômitos e diarreia. O conjunto destas características faz com que este fármaco seja um bom candidato para a encapsulação nas nanocápsulas. Entretanto, um critério evidente deste tipo de sistema de liberação reside no fato de que as nanopartículas devem apresentar a capacidade de permanecer na circulação sangüínea para fornecer concentrações elevadas do fármaco nos tumores, devendo escapar, portanto, do reconhecimento pelas células do sistema fagocítico mononuclear. Uma estratégia que tem sido testada para contornar esta limitação consiste em utilizar polímeros hidrofílicos, tais como o polietilenoglicol, covalentemente ligados à superfície das partículas. Estas partículas denominadas furtivas escapam da captura pelos macrófagos e, com o aumento do seu tempo de residência plasmática, uma maior concentração de fármaco atingiria os tecidos tumorais. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal preparar e caracterizar suspensões coloidais de nanocápsulas convencionais e furtivas, a partir do poli ácido láctico (PLA) e poli ácido láctico-co-polietilenoglicol (PLA-PEG), contendo a camptotecina, com vistas ao alcance de maiores concentrações do fármaco nos tumores, à redução dos efeitos colaterais e, conseqüentemente, a melhoria da eficácia terapêutica. As suspensões de nanocápsulas de camptotecina (CPT) foram preparadas pela técnica de deposição interfacial do polímero (nanoprecipitação). A influência da quantidade de CPT inicialmente adicionada sobre a eficiência de encapsulação, taxa de recuperação e teor do fármaco foi avaliada. Após determinação da camptotecina por CLAE, a eficiência de encapsulação se manteve em torno de 90% em todas as preparações, o teor de fármaco aumentou proporcionalmente com o aumento da quantidade inicial de CPT, mas a taxa de recuperação diminuiu consideravelmente. Partículas esféricas, apresentando uma estrutura do tipo reservatório, foram visualizadas por MET. O tamanho e o potencial zeta apresentaram valores variando entre 140 - 180 nm e entre -17 a -25 mV, respectivamente, sendo que menores tamanhos e menores valores de potencial zeta foram obtidos para as partículas pegladas. Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados pelo método da difusão através da membrana, empregando-se como meio uma solução de tampão fosfato pH 7,4 a 37° C contendo Tween 80 2% (p/v). Para todas as preparações de nanocápsulas, o máximo de fármaco liberado foi de 60% após 24 horas, entretanto, a liberação pareceu ser governada por um efeito de partição do fármaco entre as partículas e o meio. A eficácia terapêutica das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG 49 e 66,6 kD foi avaliada empregando-se o ensaio de metástase pulmonar, após a inoculação retro-orbital de células B16-F10 em camundongos. Diferentes grupos de animais foram tratados com as suspensões de nanocápsulas de CPT e com o fármaco livre em intervalos de 3 dias durante 15 dias, na dose de 0,5 mg/kg em cada administração. Após, os camundongos foram sacrificados, os pulmões foram removidos e o número de metástases pulmonares foi contado. O sangue dos animais, previamente coletado por punção cardíaca, foi analisado para avaliação da toxicidade hematológica. Neste ensaio, foi observado que todos os grupos tratados com a camptotecina aparentemente conduziram à diminuição do número de metástases pulmonares. Entretanto, a significância estatística foi observada somente nos animais tratados com nanocápsulas de PLA-PEG 49 kD, em relação a dispersão de fármaco livre, e nos animais tratados com nanocápsulas de PLA-PEG 49 e 66,6 kD em relação ao controle positivo. A toxicidade hematológica não foi evidenciada nos vários grupos tratados com a CPT, provavelmente devido à baixa dose do fármaco. Assim, as nanocápsulas poliméricas de PLA-PEG contendo camptotecina demonstraram-se mais eficazes, mesmo em baixas doses, podendo ser consideradas potenciais carreadores deste fármaco para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Camptotecina, nanocápsulas, poli ácido láctico, poli ácido-co-polietilenoglicol, melanoma murino de alto poder metastático, células B16-F10.

ABSTRACT

Camptothecin is a drug which displays a considerable antitumoral activity whose action mechanism involves the inhibition of the topoisomerase I, enzyme found in high concentrations in tumors. However, the intravenous administration of this drug is limited due to its low aqueous solubility in acidic solutions and its inactivation in physiologic pH provided by the opening of the lactone ring. On other side, clinical studies showed that mielossupression is the dose dependent undesirable effect, besides hemorrhagic cistitis, nausea, vomit and diarrhoea. By these reasons, camptothecin can be considered a good candidate to encapsulate in nanocapsules. However, the use of colloidal suspensions by parenteral route is limited by the fast elimination of the particles from systemic circulation after capture by the mononuclear phagocytic systems cells. Nanoparticles presenting polyethyleneglycol chains grafted to its surface have been developed in order to avoid the macrophage capture. These stealth nanoparticles can remain a more prolonged time in the systemic circulation, reaching the tumoral tissues. In view of this, the preparation of poly (D,L-lactide) (PLA) and poly (D,L-lactide)-poly(ethylene glycol) 49 and 66,6 kD nanocapsules containing camptothecin was realized in this work with the aim to maintain the integrity of the molecule, to allow that a more concentration of drug reaches the tumor, to reduce the drug toxicity and consequently, to improve the therapeutic efficacy. The influence of the amount of CPT initially added on the encapsulation efficiency, drug recovery and drug content was examined. After the determination of camptothecin by HPLC, the encapsulation efficiency was around 90% in all preparations, the drug content increased with the increase of the initial drug amount, but the drug recovery decreased considerably. Spherical particles presenting a reservoir structure were visualized in the micrographs obtained by TEM. The particle sizes and the zeta potential values varied from 140 to 180 and from -17 to -25 mV, respectively. The *in vitro* release studies were realized using buffer phosphate solution pH 7,4 containing Tween 80 2% (w/v) maintained at 37°C as release medium. The release of CPT was around 60% after 24 hours for all formulations tested. However, the drug release from nanocapsules showed to be governed by a partition effect. The therapeutic efficacy of nanocapsules was evaluated using a lung metastasis assay after the retroorbital inoculation of the B16-F10 cells in mice. Different groups of animals were treated with the nanocapsules and with the free drug in intervals of 3 days for 15 days with a CPT dose of 0.5 mg/kg. After that, the mice were sacrificed, the lungs were removed and the numbers of metastases were determined. The blood of the animals, previously collected by heart puncture, was analyzed for the evaluation of hematological toxicity. It was observed that for all groups treated with camptothecin the number of lung metastases appeared to be reduce. However, statistically significant results were observe after the administration of camptothecin PLA-PEG nanocapsules versus free drug and after administration of both camptothecin PLA-PEG 49 and 66,6 kD versus positive control. However, hematological toxicity wasn't verified in the groups treated with CPT, neither loss of weight was observed probably due to the low dose of drug. Then, PLA-PEG nanocapsules showed a higher efficacy even in lower doses and can be considered potential carrier for this drug for the cancer treatment.

Key-words: Camptothecin, nanocapsules, poly (D,L-lactide), and poly (D,L-lactide)-poly(ethylene glycol), hightly metastatic murine melanoma, B16-F10 cells.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
ARN	Ácido ribonucléico
BB	Benzoato de benzila
Br	Branças
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPT	Camptotecina
CPT-11	Irinotecano
CPTs	Camptotecinas
CV	Coefficiente de variação
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico])
IP	Índice de polidispersão
IV	Intravenoso
KD	Kilodaltons
NC	Nanocápsulas
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
PCL	Poli-ε-caprolactona
PLA	Poli ácido- láctico
PLA-PEG	Poli ácido-láctico-co-polietilenoglicol
PLGA	Poli-ácido-láctico-co-glicólico
PM	Peso molecular
R ²	Coefficiente de regressão
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SN-38	Metabólito do irinotecano
Topo I	Topoisomerase I
UV	Ultravioleta
9-AC	9-aminocamptotecina
9-NC	9-nitrocamptotecina
10-HCPT	10-hidroxycamptotecina

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química da camptotecina.....	27
FIGURA 2	Mecanismo de conversão da forma lactônica de CPT em carboxilada.....	28
FIGURA 3	Estruturas químicas dos derivados de camptotecina.....	33
FIGURA 4	Esquema de preparação das suspensões de nanocápsulas.....	45
FIGURA 5	Curva de calibração de camptotecina por CLAE.....	61
FIGURA 6	Análise dos resíduos da curva de calibração da CPT obtida por CLAE.....	62
FIGURA 7	Micrografias obtidas por MET das nanocápsulas contendo CPT: (a) PLA; (b) PLA-PEG 66,6 kD e (c) PLA-PEG 49 kD.....	66
FIGURA 8	Curva de calibração da camptotecina obtida por espectrofluorimetria ..	68
FIGURA 9	Análise dos resíduos da curva de calibração da CPT por espectrofluorimetria.....	69
FIGURA 10	Perfis de liberação da CPT a partir das nanocápsulas em tampão fosfato pH 7,4 a 37° C.....	71
FIGURA 11	Gráfico de liberação da camptotecina em função da diluição das suspensões em tampão fosfato pH 7,4, a 37° C.....	73
FIGURA 12	Curva de calibração do pireno obtida por espectrofluorimetria.....	75
FIGURA 13	Espectro de fluorescência obtido após análise de solução de pireno padrão e solução amostra de pireno.....	75
FIGURA 14	Análise dos resíduos da curva de calibração do pireno obtida por espectrofluorimetria.....	76
FIGURA 15	Micrografia obtida por MTE de nanocápsulas contendo pireno.....	77
FIGURA 16	Micrografias de fluorescência de <i>imprint</i> de fígado e pulmão com nanocápsulas.....	79
FIGURA 17	Resultados obtidos na avaliação da duração do ensaio de metástase espontânea em pulmões após a inoculação de células B16-F10	81
FIGURA 18	Fotografia dos pulmões dos camundongos após a realização do ensaio.....	83
FIGURA 19	Avaliação da perda de peso dos camundongos durante o ensaio de metástase em pulmões.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Formulações testadas na avaliação preliminar das suspensões de nanocápsulas.....	43
TABELA 2	Constituição dos grupos, modo de administração, protocolos e doses utilizadas do fármaco para ensaio de metástase em pulmões.....	53
TABELA 3	Características das suspensões de nanocápsulas obtidas no estudo preliminar de formulação.....	57
TABELA 4	Solubilidade da camptotecina em benzoato de benzila e Miglyol.....	58
TABELA 5	Áreas dos picos obtidas após análise das soluções de CPT padrão por CLAE.....	60
TABELA 6	Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração da CPT por CLAE.....	61
TABELA 7	Valores de eficiência de encapsulação e teor de fármaco nas suspensões de nanocápsulas.....	63
TABELA 8	Valores de taxa de recuperação de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas.....	64
TABELA 9	Valores do diâmetro médio e potencial zeta das nanocápsulas contendo CPT.....	65
TABELA 10	Áreas dos espectros de fluorescência obtidas a partir da camptotecina após análise por espectrofluorimetria.....	68
TABELA 11	Análise de dados regressão obtidos a partir da curva de calibração da camptotecina por espectrofluorimetria.....	69
TABELA 12	Análise da variância dos perfis de liberação da CPT a partir das nanocápsulas.....	71
TABELA 13	Liberação da CPT a partir das nanocápsulas em função da diluição das suspensões no meio de liberação.....	72
TABELA 14	Áreas dos espectros de fluorescência do pireno após análise por espectrofluorimetria.....	74
TABELA 15	Análise dos dados obtidos a partir da curva de calibração do pireno por espectrofluorimetria.....	76
TABELA 16	Valores de eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de pireno nas nanocápsulas.....	77
TABELA 17	Valores do diâmetro médio das nanocápsulas contendo pireno.....	78
TABELA 18	Atividade antitumoral da CPT e suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG em modelo de melanoma murino	84
TABELA 19	Resultados dos hemogramas após tratamento dos animais com CPT..	88

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	06
2.1 Objetivo Geral.....	07
2.2 Objetivos Específicos.....	07
3. REVISÃO de LITERATURA	08
3.1 Vetorização de fármacos.....	09
3.1.1 Nanopartículas.....	10
3.1.2 O destino das nanopartículas <i>in vivo</i>	12
3.1.3 Nanopartículas furtivas.....	14
3.1.3.1 Polietilenoglicóis.....	14
3.1.4 Nanopartículas no tratamento do câncer.....	17
3.2 Câncer.....	20
3.2.1 Fisiopatologia do câncer e a formação de metástases.....	22
3.2.2 Tratamento.....	24
3.3 Camptotecina.....	25
3.3.1 Mecanismo de ação.....	28
3.3.2 Farmacocinética.....	30
3.3.4 Derivados de camptotecina.....	31
3.3.6. Sistemas de liberação de camptotecinas.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Materiais.....	40
4.1.1 Matérias-primas.....	40
4.1.2 Solventes e reagentes.....	40
4.1.3 Animais.....	41
4.1.4 Cultura de células.....	41
4.1.5 Equipamentos e materiais de consumo.....	41
4.2 Metodologias.....	42
4.2.1 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas.....	42
4.2.1.1 Estudo preliminar das condições de preparação das suspensões de nanocápsulas.....	42
4.2.1.1.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas.....	42
4.2.1.1.2 Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica das partículas.....	43
4.2.1.1.3 Determinação da solubilidade da camptotecina no componente oleoso das formulações.....	44
4.2.2 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas de PLA e	44

PLA-PEG contendo camptotecina.....	
4.2.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina.....	44
4.2.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e da taxa de recuperação da camptotecina nas suspensões de nanocápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência.....	44
4.2.2.2.1 Condições cromatográficas.....	44
4.2.2.2.2 Preparação da curva de calibração.....	45
4.2.2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e da taxa de recuperação de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas.....	46
4.2.2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas.....	46
4.2.2.3.1 Avaliação da morfologia das nanocápsulas.....	46
4.2.2.3.2 Determinação do tamanho das partículas e do potencial zeta	46
4.2.2.3.3 Determinação do pH.....	46
4.2.2.4 Avaliação do perfil de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas..	47
4.2.2.4.1 Determinação da concentração de camptotecina por espectrofluorimetria.	47
4.2.2.4.1.2 Condições fluorimétricas.....	47
4.2.2.4.2 Preparação da curva de calibração.....	47
4.2.2.4.3 Ensaios de liberação.....	47
4.2.2.4.3.1 Avaliação do perfil de liberação da camptotecina em função do tempo...	47
4.2.2.4.3.2 Avaliação da liberação da camptotecina em função da diluição das suspensões.....	48
4.2.3 Preparação e caracterização de suspensões de nanocápsulas contendo um marcador fluorescente.....	48
4.2.3.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas contendo pireno.....	48
4.2.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e da taxa de recuperação do pireno nas suspensões de nanocápsulas por espectrofluorimetria direta.....	49
4.2.3.2.1 Condições fluorimétricas.....	
4.2.3.2.2 Preparação da curva de calibração.....	49
4.2.3.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e da taxa de recuperação de pireno nas suspensões de nanocápsulas.....	50
4.2.3.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo pireno.....	50
4.2.3.3.1 Avaliação da morfologia das nanocápsulas.....	50
4.2.3.3.2 Determinação do tamanho das partículas.....	50
4.2.3.4 Avaliação da distribuição <i>in vivo</i> das suspensões de nanocápsulas.....	50

4.2.4 Avaliação da eficácia terapêutica das nanocápsulas em modelo de melanoma murino de alto poder metastático.....	51
4.2.4.1 Animais experimentais.....	51
4.2.4.2 Preparação das células B16-F10.....	51
4.2.4.3 Estudos preliminares.....	52
4.2.4.3.1 Determinação do número de células inoculadas e do tempo dos ensaios <i>in vivo</i>	52
4.2.4.4 Ensaios de metastáse em pulmões.....	52
4.2.4.5 Ensaios de toxicidade.....	53
4.2.4.5.1 Hemograma.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas.....	56
5.1.1 Estudo preliminar das condições de preparação das nanocápsulas.....	56
5.1.2 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo camptotecina.....	58
5.1.2.1 Preparação e caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina.....	58
5.1.2.3 Determinação do diâmetro médio e potencial zeta.....	64
5.1.2.4 Avaliação da morfologia das nanocápsulas	65
5.1.2.5 Avaliação dos perfis de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas.....	66
5.1.2.5.1 Determinação da concentração de camptotecina por espectrofluorimetria.....	66
5.2 Avaliação da distribuição <i>in vivo</i> das nanocápsulas de PLA e PLA-PEG.....	73
5.2.1 Preparação das suspensões coloidais contendo pireno.....	73
5.2.1.1 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo o pireno	77
5.2.2 Avaliação da distribuição <i>in vivo</i> das nanocápsulas.....	78
5.3. Avaliação da eficácia terapêutica das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo camptotecina.....	79
5.3.1 Ensaios preliminares.....	80
5.3.1.1 Determinação do número de células inoculadas e do tempo dos ensaios <i>in vivo</i>	80
5.3.2 Ensaios de metastáse em pulmões.....	82
5.3.3 Ensaios de toxicidade	85
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO GERAL-

Muitos fármacos, empregados no tratamento de diversas doenças, são distribuídos indiscriminadamente em diversos órgãos e tecidos após sua administração, podendo ser inativados ou causar efeitos indesejáveis que não estão envolvidos no processo patológico. Além disso, como consequência desta ampla distribuição, para que a concentração terapêutica requerida em certo compartimento do organismo seja alcançada torna-se necessário a administração de grandes quantidades do agente terapêutico. Na perspectiva de contornar estes inconvenientes, o desenvolvimento de novos sistemas carreadores de fármacos permitiria a racionalização da terapia medicamentosa levando à redução da dose e dos efeitos colaterais indesejáveis, assim como a adesão do paciente ao tratamento.

A vetorização de fármacos, baseada na teoria de Paul Ehrlich sobre a capacidade de minúsculas partículas em carrear moléculas ativas aos sítios específicos de ação, tem sido considerada uma das principais linhas da pesquisa biofarmacêutica das últimas décadas, fazendo parte de uma grande área que rapidamente emergiu no Brasil e no mundo, denominada nanotecnologia. É consenso que a utilização de sistemas coloidais nanoestruturados, tais como os lipossomas, nanoemulsões e as nanopartículas poliméricas, constitui-se uma alternativa que visa alterar a biodistribuição de fármacos após administração por diferentes vias. O sistema de liberação vetor-orientado forneceria o fármaco seletivamente para seu sítio de ação de uma maneira a oferecer a atividade terapêutica máxima, prevenir a degradação ou inativação durante o trânsito até o sítio alvo e proteger o corpo de reações adversas devido à distribuição inapropriada (BANKER e RHODES, 1996).

Muitas patologias apresentam potencial de tratamento por meio da vetorização de fármacos, como por exemplo, as infecções por parasitas nas células do sistema reticular endotelial, as doenças que afetam o sistema nervoso central e os tumores, entre outros. Especialmente para o câncer, o aumento da permeabilidade vascular do tecido tumoral possibilita os extravasamento de carreadores de fármacos apresentando entre 10 a 700 nanômetros de diâmetro. Este aumento da permeabilidade capilar é decorrente da má formação da neovasculatura dos tecidos tumorais na qual apresenta lacunas entre as células endoteliais. Assim, a aplicação dos sistemas de transporte vetorizado tem potencial para melhorar a quimioterapia de neoplasias. Seu uso efetivo poderia não somente reduzir a dose do agente quimioterápico para um dado grau da resposta terapêutica, como também melhorar as oportunidades para

algumas células que são normalmente resistentes a certos fármacos. Ainda, a aplicação de quimioterapia via estes sistemas poderia reduzir a complexidade da manipulação cirúrgica, minimizando a severidade da extensão do câncer e/ou reduzindo o volume tecidual. Alternativamente, o uso destes sistemas após diminuição cirúrgica e/ou radiorredução de um tumor pode aumentar a probabilidade da erradicação efetiva de células cancerosas residuais (GUPTA, 1990).

A camptotecina é um alcalóide citotóxico encontrado na casca da *Camptotheca acuminata*, uma árvore nativa da China, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da enzima topoisomerase I, envolvida nos processos de transcrição e replicação do ADN e que se encontra altamente expressa nos tumores. Entretanto, a camptotecina é uma substância altamente hidrofóbica que inviabiliza a sua administração pela via intravenosa na forma de perfusão. Além disso, este fármaco apresenta uma elevada instabilidade em pH fisiológico, decorrente da abertura do anel lactônico e formação de sua forma carboxilada menos ativa. Estudos de estabilidade da camptotecina em tampão fosfato pH 7,4 indicaram que unicamente 13% do fármaco encontra-se na sua forma lactônica, apresentando um tempo de meia vida plasmática de apenas 11 minutos. Por outro lado, estudos clínicos têm revelado que a camptotecina apresenta a mielossupressão como efeito colateral dose-dependente. Além desses, outros distúrbios tais como cistite hemorrágica, náuseas, vômitos e diarreia também foram observados (DEY e WARNER, 1997). O conjunto destas características faz com que este fármaco seja um bom candidato para a encapsulação nas nanocápsulas.

Nanocápsulas são sistemas coloidais de tamanho inferior a um micrômetro, do tipo reservatório, constituídos por um núcleo oleoso recoberto por uma camada polimérica. Neste caso, o fármaco encontra-se predominantemente dissolvido no núcleo oleoso, embora possa se adsorver na superfície das partículas (VILA JATO, 1997). Os métodos de preparação dos sistemas nanoparticulares são vários. Entre eles, um método muito simples denomina-se nanoprecipitação. Esta técnica proposta por FESSI e colaboradores (1989), baseia-se na precipitação de um polímero, previamente dissolvido em um solvente orgânico, após sua adição em um não solvente do mesmo, geralmente a água. A obtenção de nanocápsulas ocorre mediante a dissolução de um óleo na solução do polímero, que seja imiscível com o solvente aquoso (CALVO, 1995). Devido à difusão espontânea do solvente orgânico (ex. acetona), uma turbulência interfacial é gerada entre as duas fases levando à formação de partículas de tamanho reduzido. Com a alteração da polaridade do meio, o

polímero precipita se depositando na superfície das gotículas do óleo (SOPPIMATH et al, 2001).

As propriedades das nanopartículas poliméricas podem ser facilmente controladas pela modificação das propriedades físico-químicas dos polímeros empregados. Polímeros tais como o poli ácido lático (PLA), poliácido lático-co-glicólico (PLGA), os polihidroxicanoatos (PHAs) e a poli- ϵ -caprolactona (PCL) são os mais comumente utilizados por serem biodegradáveis e biocompatíveis. Os sistemas nanoparticulares preparados a partir de tais polímeros permitem a encapsulação de agentes antitumorais com vistas à liberação controlada dos mesmos ou ainda fornecer uma atividade terapêutica maior ou mais durável, quando comparada com aquela produzida pela administração do fármaco livre. Além disso, tais sistemas possibilitam a administração intravenosa de moléculas hidrofóbicas, em elevadas concentrações, melhorando ainda a estabilidade proporcionada pela presença da barreira polimérica, frente à degradação química e enzimática em meio fisiológico (MOSQUEIRA et al, 2001).

Entretanto, um critério evidente deste tipo de sistema de liberação reside no fato de que tais partículas devem apresentar a capacidade de permanecer na circulação sangüínea para fornecer concentrações elevadas do fármaco nos tumores. Quando administrados intravenosamente, os vetores nanoparticulares convencionais são rapidamente removidos da circulação sangüínea pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente representado pelas células Kupffer do fígado e macrófagos do baço. Esta remoção da circulação geralmente ocorre através do reconhecimento específico destes vetores pelos receptores celulares, em um mecanismo intermediado pela adsorção de proteínas plasmáticas (opsonização) nas partículas. Deste modo, a remoção realizada pelo SFM é a maior limitação para a vetorização de fármacos a outros sítios no corpo humano, apesar deste fenômeno ter sido vantajosamente empregado no tratamento de infecções intracelulares no fígado e baço (MOSQUEIRA et al, 2001).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas e testadas para a modificação da superfície das nanopartículas que impeçam a adsorção das proteínas plasmáticas. Os polietilenoglicóis (PEG) são os polímeros mais utilizados para modificar a superfície destas partículas (BAZILE et al, 1995; GREF et al, 1995; PERACCHIA et al, 1999; GREF et al, 2000; LI et al, 2001; MOSQUEIRA et al, 2001). Estes polímeros são moléculas não imunogênicas, hidrofílicas, atóxicas e neutras, aprovadas pelo *Food*

and Drug Administration (FDA) para uso interno humano, podendo ser adsorvido fisicamente ou ligado covalentemente na superfície das partículas (MOSQUEIRA et al, 2001). O mecanismo de funcionamento é baseado na formação de um revestimento hidrofílico, que impede estericamente a opsonização pelas proteínas plasmáticas (GREF et al, 1995). Estas partículas denominadas furtivas escapam da captura pelos macrófagos e, com o aumento do seu tempo de residência plasmática, uma maior concentração de fármaco atinge os tecidos tumorais.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal preparar e caracterizar suspensões coloidais de nanocápsulas convencionais e furtivas, contendo a camptotecina, com vistas à redução dos efeitos colaterais, o alcance de maiores concentrações dos mesmos nos tumores e a melhoria da eficácia terapêutica. A eficácia terapêutica das nanocapsulas foi avaliada em modelo de melanoma murino B16-F10 de alto poder metastático. Os resultados obtidos na avaliação da eficácia terapêutica das nanocapsulas furtivas e não furtivas serão comparados com aqueles produzidos após a administração do fármaco livre. A avaliação da atividade antitumoral de nanopartículas furtivas não é descrita na literatura, evidenciando a originalidade deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver suspensões de nanocápsulas contendo a camptotecina, visando a proteção da molécula frente a inativação pelo pH fisiológico, a melhoria da eficácia terapêutica e a diminuição dos efeitos tóxicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas de camptotecina a partir do poli-ácido lático (PLA) e do poli-ácido lático-co-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG);
- Avaliar a influência da quantidade inicial de fármaco sobre a eficiência de encapsulação e o teor de camptotecina nas nanocápsulas;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanocápsulas em tampão fosfato pH 7,4;
- Avaliar a distribuição *in vivo* das nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo o pireno como marcador fluorescente hidrofóbico;
- Avaliar a eficácia terapêutica das formulações, por meio da avaliação do número e do tamanho das metástases formadas em modelo de melanoma murino, após administração intraperitoneal das suspensões de nanocápsulas em camundongos tratados com células B16-F10 de alto poder metastático;
- Comparar as formulações de nanocápsulas furtivas contendo camptotecina com as nanocápsulas convencionais, e ambas com a suspensão do fármaco livre, no que diz respeito a redução do número de metástases e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica;
- Avaliar e comparar a toxicidade hematológica da camptotecina administrada na forma de nanocápsulas e na forma não encapsulada (livre).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Vetorização de Fármacos

Historicamente, a base para o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas tem residido na otimização da ação do fármaco e, conseqüentemente, no aumento do índice terapêutico. De fato, a resposta farmacológica está diretamente correlacionada com a concentração de fármaco que alcança o sítio de ação. Entretanto, uma vez que as características de distribuição da substância ativa estão essencialmente baseadas nas suas propriedades físico-químicas e nem sempre são adaptáveis àquelas do local desejado, grandes quantidades da mesma necessitam ser administradas. A toxicidade então surge em decorrência da penetração intensa do fármaco em tecidos e órgãos saudáveis (COUVREY et al, 2002).

O conceito de vetorização surgiu como resposta aos inconvenientes apresentados pela terapia sistêmica convencional. A vetorização é uma estratégia terapêutica que visa modular a distribuição de uma substância por meio da sua associação a um vetor. Assim, as características físico-químicas do mesmo, e não mais aquelas do fármaco, passam a governar o perfil de distribuição tecidual do medicamento. Os sistemas utilizados são de natureza variável e mais ou menos sofisticados, mas o princípio geral da vetorização é o mesmo e consiste na liberação do fármaco de forma preferencial no órgão ou célula-alvo, permitindo deste modo, acentuar o efeito farmacológico e reduzir os efeitos colaterais adversos (PUISIEUX e ROBLOT-TREUPEL, 1989; CALVO, 1995).

Os sistemas carreadores de fármacos atualmente propostos apresentam-se divididos em três grupos principais: os vetores de primeira, segunda e terceira geração. São vetores de primeira geração aqueles capazes de liberar o fármaco em um determinado sítio de ação, desde que sejam administrados no local onde devem agir. A este grupo pertencem as microesferas e microcápsulas para a quimioembolização. Os vetores de segunda geração são os vetores propriamente ditos, pois transportam a substância ativa para o local alvo, após administração por uma via geral. Apresentam tamanho menor do que 1 μm e podem ainda ser diferenciados em vetores ativos, onde a distribuição no organismo é induzida e controlada por uma intervenção extra-corpórea (lipossomas termo ou pH sensíveis e nanoesferas magnéticas), e vetores passivos, onde a distribuição do fármaco é imposta pelas características dimensionais e físico-químicas da partícula (lipossomas, nanoesferas e nanocápsulas). Finalmente, os vetores de terceira geração são os

vetores capazes de reconhecer o alvo de ação. A este grupo pertencem, entre outros, os anticorpos monoclonais e certos vetores coloidais pilotados por anticorpos monoclonais (BENOIT et al, 1986; PUISIEUX e ROBLOT-TREUPEL, 1989; BARRATT, 2003).

3.1.1. Nanopartículas

Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais que têm recebido considerável atenção nos últimos anos, particularmente àquelas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis. A utilização destes sistemas para a encapsulação de moléculas terapeuticamente ativas apresenta numerosas vantagens potenciais, tais como: proteção frente à degradação, diminuição dos efeitos tóxicos, obtenção de perfis farmacocinéticos mais favoráveis, maior conforto do paciente proporcionado pela redução do número de administrações e em certas condições, a vetorização em tecidos ou células específicas do organismo (DELLACHERIE et al, 2001).

No que diz respeito às dimensões, o menor tamanho de partícula é geralmente de 5 a 10 nm e o maior tamanho é de aproximadamente 1000 nm (1 μm), embora a média comumente obtida, em especial para os métodos que utilizam polímeros pré-formados, esteja situada entre 100 a 500 nm (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998). Segundo a sua estrutura, estes sistemas se distinguem em matriciais e reservatórios, sendo denominados de nanoesferas e nanocápsulas, respectivamente. Nas nanoesferas, a substância ativa encontra-se dispersa na rede polimérica formada, enquanto nas nanocápsulas, ela se encontra preferencialmente dissolvida em um núcleo interno oleoso que se encontra revestido por uma membrana polimérica. Em ambos casos, o fármaco pode ainda se adsorver na superfície das partículas (MONTASSER *et al.*, 2000). A maior vantagem das nanocápsulas sobre nanoesferas reside na sua capacidade de encapsular maiores quantidades de fármacos hidrofóbicos. Além disso, em virtude do confinamento do fármaco no núcleo oleoso, o efeito de liberação inicial (ou efeito *burst*) pode ser reduzido (COUVREY et al, 2002).

Os métodos de obtenção de nanopartículas podem ser divididos em dois grandes grupos; aqueles que envolvem a polimerização interfacial de monômeros *in situ* e aqueles que utilizam polímeros previamente formados. Os métodos para obtenção de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados podem ainda ser classificados em quatro categorias: emulsão-evaporação, difusão do solvente,

emulsificação-difusão e *salting-out*. Estas técnicas são similares quanto aos procedimentos empregados, pois envolvem a preparação de uma solução orgânica contendo os componentes da nanopartícula e de uma solução aquosa contendo um estabilizante. Vale a pena observar que, embora todas possam ser utilizadas para a preparação de nanoesferas, somente as técnicas de difusão do solvente e de emulsificação-difusão permitem a obtenção de nanocápsulas (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998).

A nanoprecipitação, também conhecida como nanodeposição do polímero pré-formado, é uma técnica simples, reproduzível e facilmente transponível para a produção de nanopartículas em grande escala (COUVREUR et al, 2002). Este método consiste basicamente em injetar uma solução contendo o fármaco e polímero, dissolvidos num solvente orgânico miscível com a água, numa fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico como estabilizante. Imediatamente após a injeção, o solvente orgânico rapidamente difunde-se na água, dando origem a uma suspensão coloidal de nanoesferas. Para a obtenção de nanocápsulas, um óleo e um tensoativo lipofílico são adicionados à fase orgânica da preparação. Após a formação das partículas, as suspensões são submetidas à evaporação para remoção do solvente orgânico e concentração até volume desejado (FESSI et al, 1989; AMMOURY et al, 1990; MONTASSER et al, 2000).

O mecanismo de formação de nanopartículas pela técnica de nanoprecipitação tem sido explicado pela turbulência interfacial gerada durante a difusão do solvente, como consequência da redução localizada da tensão interfacial entre as duas fases. Pequenas gotas de solvente, provavelmente de tamanho nanométrico, são separadas da interface e rapidamente estabilizadas pelo tensoativo até que a difusão do solvente seja completa e a agregação do polímero ocorra com o aumento da polaridade do meio. Para a obtenção de nanocápsulas, um pequeno volume de óleo é incorporado na fase orgânica da formulação e, neste caso, a rápida difusão do solvente induz a deposição do polímero ao redor das gotículas do mesmo. A utilidade desta técnica limita-se ao uso de solventes hidromiscíveis, onde a velocidade da difusão deve ser suficientemente grande para garantir a emulsificação espontânea da fase orgânica. Além disso, este método não é eficiente para encapsular fármacos hidrossolúveis (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998, COUVREUR et al, 2002).

3.1.2. O destino das nanopartículas *in vivo*

No que concerne à composição química das nanopartículas, o uso de numerosos polímeros naturais ou sintéticos tem sido descrito. Entre eles, os poliésteres como a poli- ϵ -caprolactona (PCL), o poli-ácido láctico (PLA) e o poli-ácido-co-glicólico (PLGA) são os polímeros de escolha. Estes compostos são de fácil obtenção, originando uma gama de polímeros de diferentes massas molares, além de apresentam a vantagem de serem biodegradáveis e não tóxicos (DELLACHERIE et al, 2001).

O poli-ácido láctico (PLA) é um polímero amplamente utilizado em formulações de nano e micropartículas, tendo sido aprovado pelo F.D.A. (*Food and Drug Administration*) para uso intravenoso e intramuscular. Este polímero é hidrofóbico, insolúvel em água e solúvel em vários solventes orgânicos. Devido a presença de um centro assimétrico, formas levorotatória (L), dextrorotatória (D) ou racêmica (D,L) do polímero podem ser obtidas (MERKLI et al, 1998). Este polímero pode ser considerado como um polimetabólito, pois seu produto de degradação é o ácido láctico gerado pela quebra da porção terminal da cadeia polimérica. Nas células, o ácido láctico é convertido em piruvato pela lactato desidrogenase presente como diferentes isoenzimas no coração, músculos e fígado, e sua eliminação ocorre via ciclo de Krebs, principalmente pelos pulmões e rins, na forma de dióxido de carbono e água (MAKINO et al, 1986; BAZILE et al, 1992; DELLACHERIE et al, 2001).

O tamanho de partícula e localização *in vivo* são dois de muitos fatores que afetam a velocidade de degradação de nano e micropartículas de PLA. Outros fatores incluem a composição química do polímero, a sua massa molar e a presença de aditivos na formulação. Igualmente, a cristalinidade é um fator importante na biodegradação das mesmas; (D,L)-PLA é completamente amorfo e é degradado *in vivo* mais rapidamente do que o (L)-PLA, a correspondente forma cristalina, em decorrência da maior penetração de água nas regiões amorfas do polímero (THIES, 1989).

A natureza do vetor nanoparticular desempenha um importante papel no perfil de distribuição *in vivo* e conseqüentemente, na eficácia terapêutica da preparação. Em particular, a superfície da partícula é um parâmetro determinante, pois de acordo com

a composição química, influencia a travessia de certas barreiras biológicas e favorece ou mesmo impede a penetração em certas células (DELLACHERIE et al, 2001).

Após administração intravenosa, os carreadores coloidais de fármacos são captados da circulação sangüínea pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM). O SFM é formado por um grupo de células mononucleares originadas na medula óssea, que têm como função remover pequenas partículas estranhas do espaço vascular. Monócitos sangüíneos e macrófagos teciduais pertencem a esta linhagem de células (BECKER, 1988).

Uma característica que distingue os macrófagos entre as outras células mononucleares, e por muitos anos foi uma função atribuída somente a estas células, é sua habilidade em fagocitar e destruir microorganismos e elementos sangüíneos senescentes, ingerir restos celulares, materiais particulados estranhos e substâncias pinocitose-solúveis. Dentro do repertório de proteínas secretadas por macrófagos, temos componentes do complemento, proteases e inibidores de proteases, fibronectina, certas proteínas de resposta de fase aguda, assim como componentes da cascata de coagulação e da fibrinólise. Devido a sua presença em todos os órgãos e tecidos no organismo e sua habilidade de migrar em resposta ao estímulo quimiotáxico, o macrófago pode liberar seus produtos no sítio da infecção ou injúria, com isso influenciando o resultado das reações inflamatórias extravasculares (BECKER, 1988).

A interação do macrófago com um material estranho, como as nanopartículas, requer a opsonização destas últimas, seguida da interação com os receptores Fc (FcR), receptores para complemento (CR) ou receptores de açúcar/lecitina situados sobre a superfície do macrófago. Clássicos exemplos de moléculas opsônicas incluem várias subclasses de imunoglobulinas, proteínas do complemento como C3q e fragmentos gerados de C3 (C3b, iC3b), apolipoproteínas, fator de von Willebrand, trombospondina, fibronectina e proteína manose ligante (FRANK e FRIES, 1991; VITTAZ et al, 1996; MOGHIMI et al, 2001).

Devido à natureza protéica dos componentes sangüíneos, os fatores que determinam a adsorção de proteínas nas superfícies sólidas, como composição química, carga e hidrofobicidade, sem dúvida desempenham um papel importante na opsonização. A carga da superfície das partículas influencia a interação eletrostática com os componentes do meio circundante, sendo esta determinada pelas propriedades eletrostáticas do polímero. É consenso que superfícies carregadas

negativamente conduzem à maior eliminação das partículas da circulação sistêmica quando comparada àquelas neutras ou apresentando carga positiva. A hidrofiliicidade/hidrofobicidade da superfície afeta sua força atrativa, influenciando desse modo no processo de opsonização e na força de interação; assim, quanto mais hidrofóbica a partícula maior é a adsorção de proteínas e mais rápida é a sua remoção da circulação (STOLNIK et al, 1995).

3.1.3. Nanopartículas furtivas

A utilidade de suspensões de nanocápsulas é limitada pelo reconhecimento das partículas pelo SFM e em particular pela sua distribuição preferencial para o fígado e baço, após administração intravenosa. Uma alternativa para uso de nanocápsulas pela via parenteral consiste em utilizar carreadores onde a superfície foi modificada. Estas partículas são chamadas 'furtivas', pois seriam invisíveis às células fagocíticas, particularmente aos monócitos sangüíneos e células de Kupffer, permanecendo mais tempo na circulação sangüínea, e estando assim aptas a liberar o fármaco em outros locais (LEGRAND et al, 1999; MOGHIMI e HUNTER, 2001; COUVREER et al, 2002).

Duas estratégias foram propostas para obter nanopartículas que permaneçam um maior tempo na circulação sistêmica: *i)* a adsorção de surfactantes, tais como os poloxamers, na superfície das partículas e *ii)* o desenvolvimento de copolímeros biodegradáveis contendo segmentos hidrofílicos, tais como os polietilenoglicóis. A última estratégia tem demonstrado ser mais adequada para obter uma camada hidrofílica protetora sobre as partículas, pois evita a possibilidade da rápida dessorção do revestimento após a diluição ou o contato com componentes sangüíneos (VITTAZ et al, 1996; LEGRAND et al, 1999; BRIGGER et al, 2002).

3.1.3.1. Polietilenoglicóis

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero hidrossolúvel e não tóxico, geralmente produzido por polimerização aniônica do óxido de etileno, embora outro iniciador de polimerização possa ser empregado. A reação de polimerização pode ser modulada e polímeros apresentando uma ampla variedade de massas molares (1000-50000) podem ser obtidos com baixos valores de polidispersão, geralmente menor que 1,0.

Além disso, a presença de dois grupos hidroxilas terminais na cadeia do PEG torna possível a formação de um grande número de derivados éter e hidroxil, que são disponíveis comercialmente. A derivatização química dos grupos finais é o primeiro passo na preparação de bioconjugados. Substratos modificados com PEG incluem compostos de baixo peso molecular, entre eles diferentes classes de macromoléculas biológicas, bem como partículas e superfícies de materiais artificiais. Tais polímeros são anfífilos, se dissolvem em solventes orgânicos e água, sendo eliminados pelo fígado e rins, o que os torna ideais para uma aplicação farmacêutica. De fato, o FDA aprova o PEG para uso intravenoso, oral e tópico (ZALIPSKY, 1995; BHADRA et al, 2002; GREENWALD et al, 2003).

As propriedades do PEG têm sido exploradas para a modificação da superfície das nanopartículas com o intuito de prevenir a opsonização das mesmas. Para uma partícula apresentar comportamento “furtivo”, dois critérios devem ser reunidos: o polímero adsorvido não deve ser removido facilmente pelo fluxo *in vivo*, e a densidade da barreira estérica imposta deve ser suficientemente grande para suprimir a opsonização endógena ou prevenir a interação da superfície com os potenciais receptores dos macrófagos (MOGHIMI e HUNTER, 2001). Para tal, cadeias de polietilenoglicóis (PEG) são ligadas covalentemente na superfície das nanopartículas. Além disso, a flexibilidade das cadeias de PEG permite a sua mobilidade na superfície, resultando numa densa nuvem de várias conformações intercambiáveis entre si. Isto faz com que o sistema imune tenha dificuldades em modelar um anticorpo em volta desta estrutura flexível. Este fenômeno explicaria a razão pela qual uma molécula hidrofílica como o dextrano, ligada à superfície das partículas, não aumenta o tempo de permanência das mesmas na circulação sanguínea (JEON et al, 1991a, 1991b; ALLEN, 1994).

Estudos *in vivo* realizados em camundongos evidenciaram um aumento significativo no tempo de permanência circulação sanguínea de nanoesferas de PLGA revestidas com PEG. Após 5 minutos da administração, 66% das nanopartículas convencionais foram removidas pelo fígado, em contraste com os resultados obtidos com as nanoesferas revestidas com PEG 20 kD, onde apenas 30% das partículas foram capturadas 2 horas após a injeção. Neste estudo foi observado que o tempo de permanência na circulação sistêmica aumenta com o aumento da massa molar da cadeia de PEG no copolímero (PLGA-PEG) (GREF et al, 1994).

O potencial de utilização de nanopartículas revestidas com PEG como carreadores do toxóide tetânico para a administração nasal foi avaliado por Tobio e colaboradores (1998). Nanopartículas contendo o toxóide tetânico marcado com ¹²⁵I foram administradas em ratos pela via nasal e a radioatividade no compartimento sanguíneo, linfonodos e outros tecidos foi monitorada durante 48 horas. A presença do revestimento de PEG conduziu ao aumento significativo da penetração do toxóide tetânico em comparação com os resultados obtidos após a administração de nanopartículas convencionais.

Mosqueira e colaboradores (1999) investigaram as interações de nanocápsulas de PLA contendo um marcador fluorescente hidrofóbico com células fagocíticas, onde o poloxamer 188 foi adsorvido ou PEG foi covalentemente ligado à superfície das partículas. Este estudo foi realizado *in vitro* usando como modelo células J774, uma linhagem de macrófagos de camundongos não estimulados de alto poder fagocítico. Os autores verificaram que a interação das nanocápsulas de PLA-PEG com as células foi 3 a 13 vezes menor que com as nanocápsulas de PLA. Além disso, uma dramática redução da fluorescência associada às células foi demonstrada somente para as nanocápsulas de PLA-PEG, indicando que a ligação covalente do PEG é importante para a redução da captura das partículas pelos macrófagos. A redução da interação célula-partícula foi mais eficiente com PEG 20 kD do que PEG 5 kD, ambos apresentando uma mesma distância entre as cadeias.

Em outro trabalho Gref e colaboradores (2000) estudaram a influência da composição das partículas na adsorção protéica pela técnica de eletroforese em gel bidimensional. Suspensões de nanopartículas foram preparadas usando diferentes copolímeros do PLA, PCL e PLGA com o PEG em diferentes massas molares. Estes autores observaram que a adsorção de proteínas plasmáticas sobre as nanopartículas revestidas foi drasticamente reduzida quando comparada com as partículas convencionais. A quantidade de proteínas detectada sobre nanopartículas de PLA 45 kD - PEG 2 kD foi 57% menor do que a quantidade adsorvida sobre as nanopartículas constituídas apenas de PLA 40 kD. Um decréscimo acentuado da adsorção protéica também foi verificado quando a massa molar do PEG foi alterada de 2000 para 5000. Entretanto, para copolímeros apresentando PEG com massa molar maior que 5000, não foi verificada uma redução proporcional na adsorção de proteínas às partículas.

Finalmente, estudos farmacocinéticos e de biodistribuição das nanocápsulas de PLA-PEG, empregando polímeros radiomarcados, foram realizados por Mosqueira e

colaboradores (2001). Nanocápsulas contendo cadeias de PEG covalentemente ligadas demonstraram um perfil de biodistribuição modificado, particularmente para aquelas partículas preparadas a partir de PLA-PEG 20 kD e apresentando um teor de PEG de 30% em relação à massa total do polímero. Estes estudos reforçaram a necessidade da ligação covalente do PEG no polímero formador das partículas, assim como o efeito do aumento do comprimento da cadeia e da densidade de PEG no tempo de permanência das partículas na circulação sanguínea.

3.1.4. Nanopartículas no tratamento do câncer

A liberação de agentes terapêuticos às células tumorais encontra 3 grandes problemas: 1) metabolismo e eliminação do fármaco do organismo, 2) barreiras fisiológicas para transpor os agentes terapêuticos do local de administração até as células tumorais, 3) resistência das células tumorais aos fármacos (YUAN, 1998).

A liberação de fármacos diretamente nos tumores representa um aspecto importante a ser estudado, uma vez que substâncias antineoplásicas são tóxicas para ambas células normais e tumorais, sendo a dose limitada pela tolerância tecidual normal. Além disso, a liberação de fármacos nos tumores não é uniforme, em decorrência da heterogeneidade da vascularização tumoral, que faz com que o tumor apresente regiões de necrose ou hemorrágicas, bem como regiões densamente irrigadas (BRIGGER et al, 2002). Assim, a resistência aos antitumorais pode ser devido não somente a mecanismos envolvendo alterações bioquímicas das células malignas, como mecanismos não celulares decorrentes da pobre vascularização em certas regiões do tumor, que podem reduzir o acesso do fármaco e proteger as células cancerosas da citotoxicidade.

Apesar da heterogeneidade da vasculatura nos tumores, o emprego de suspensões coloidais tem sido considerado uma estratégia promissora para contornar mecanismos de resistência celular e não celular, aumentar a seletividade de fármacos nas células tumorais e reduzir a toxicidade em relação às células normais. A permeabilidade vascular do tecido neoplásico é um fator fisiológico significativo, que deve ser considerado no desenvolvimento de sistemas de liberação em termos de sua capacidade de extravasar os vasos e alcançar o tecido alvo (BRIGGER et al, 2002).

A permeabilidade microvascular nos tumores é elevada, presumidamente devido à exposição das células endoteliais vasculares dos tumores às citocinas, tais

como o fator de crescimento endotelial e fator de permeabilidade vascular (FCEV/FPV). Entretanto, várias rotas de transporte de moléculas e nanopartículas têm sido identificadas. Por um lado, Dvorak e colaboradores (1995)¹, sugeriram que a principal rota é constituída pelas organelas vesiculo-vacuolares, apresentando diâmetro entre 50 e 415 nm, separadas por diafragmas cuja abertura e fechamento regulam a velocidade de transporte. Uma segunda hipótese sugere que a principal rota envolve as junções endoteliais abertas ou fenestradas. Estas estruturas poderiam ser induzidas pelo FCEV/FPV e outras citocinas atingindo até 700 nm de diâmetro. Apesar das discrepâncias entre estas duas hipóteses, ambas concordam que o transporte transvascular de macromoléculas e nanopartículas ocorrem através de estruturas semelhantes a canais (ROBERTS et al, 1995)². Novos vasos (angiogênese) formados nos tecidos neoplásicos tendem a ser mal formados, com fendas entre as células endoteliais. Esta estrutura vascular anormal facilita o extravasamento de partículas e sua captação no parênquima do tumor (KIM e LIM, 2002).

Dentre os vetores coloidais, as nanopartículas poliméricas oferecem ainda certas vantagens para a liberação de fármacos aos tumores. Primeiro, por meio de uma adequada seleção do polímero é possível encapsular fármacos com diferentes propriedades físico-químicas e apresentando teores significativamente maiores do que nas lipossomas ou micelas. Além disso, o fármaco encontra-se dispersado na matriz polimérica, o que previniria o efeito *burst* no plasma. Enfim, com base na escolha do tipo de polímero, tal como aqueles cuja solubilidade é pH dependente, o fármaco encapsulado pode ser liberado ao local desejado (tumor sólido) ou ainda a superfície das partículas pode ser facilmente modificada com ligantes vetorizáveis a sítios específicos (POTINENI et al, 2003).

Vários estudos têm sido realizados visando desenvolver sistemas de liberação para fármacos antineoplásicos, para a melhoria da eficácia terapêutica. Chiannilkulchai e colaboradores (1990) avaliaram a eficácia de nanopartículas contendo doxorubicina, após administração intravenosa, num modelo de reticulosarcoma M 5076, em

¹ DVORAK, H.F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *American Journal of Pathology*, V. 146, p. 1029-1039, 1995. *apud* YAN, F. Transvascular drug delivery in solid tumors. *Seminars in Radiation Oncology*, v. 8, n. 3, p. 164-175, July 1998.

² ROBERTS W.G. *et al.* Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*, v. 108, p. 2369-2379, 1995 *apud* YAN, F. Transvascular drug delivery in solid tumors. *Seminars in Radiation Oncology*, v. 8, n. 3, p. 164-175, July 1998.

camundongos. A eficácia do sistema foi verificada pela contagem de metástases e pelo ensaio de sobrevivência dos animais. Os autores evidenciaram que o acúmulo de nanopartículas contendo doxorubicina nas células de Kupffer criou um gradiente de concentração com uma difusão massiva e prolongada do fármaco livre através do tumor, resultando numa elevada exposição das células neoplásicas ao fármaco.

Lenaerts e colaboradores (1995) encapsularam ftalocianinas, importantes agentes na terapia fotodinâmica tumoral, em nanocápsulas cuja superfície foi modificada pela adsorção com poloxamers. Com isso, os autores obtiveram a redução da fagocitose destas partículas aumentando a concentração de ftalocianinas em tumores primários. O emprego das nanocápsulas revestidas permitiu um acúmulo de ftalocianinas cerca de 200 vezes maior nos tumores do que no sangue, atingindo o valor máximo 12 horas após a injeção, demonstrando assim que tal sistema pode fornecer um eficiente meio para vetorização em tumores.

Reszka e colaboradores (1997) compararam a biodistribuição de mitoxantrona encapsulada em lipossomas unilamelares carregados negativamente e em nanopartículas de polibutilcianocrilato revestidas ou não com poloxamina 1508, em camundongos inoculados com células de melanoma B16. Após determinação do fármaco por CLAE, os autores verificaram uma diferença significativa na distribuição do mesmo para as diferentes formulações testadas. Especialmente relevante foi o aumento da concentração de mitoxantrona nos tumores, após administração das nanopartículas, em comparação com as concentrações obtidas após a administração dos lipossomas e da solução do fármaco. Igualmente maior foi o efeito proporcionado pelas nanopartículas, na redução do crescimento do tumor, após um período de 22 dias sem o aumento da toxicidade.

Bourdon e colaboradores (2000) avaliaram o potencial de suspensões coloidais de nanocápsulas preparadas a partir do PLA, PLA-poloxamina e PLA-PEG, como veículo para liberação de *meta*-tetra-(hidroxifenil)clorina (*m*THPC), empregado como um modelo de fotosensibilizante lipofílico. A captura, localização subcelular e fototoxicidade desta substância foi verificada em macrófagos J774 e células tumorais de adenocarcinoma (HT 29). Estes autores observaram que a captura das nanocápsulas pelos macrófagos foi limitada pela presença de polietilenoglicol ligado covalentemente à parede das nanocápsulas e que, para uma dose de 0,25 µg/mL de

*m*THPC, a sua fototoxicidade foi reduzida, quando comparada com a solução da mesma substância.

Li e colaboradores (2001) investigaram as propriedades farmacocinéticas e a atividade antitumoral do fator de necrose tumoral humano (rHuTNF- α) encapsulado em nanopartículas furtivas e não furtivas, usando modelo de sarcoma murino S-180. Os resultados obtidos demonstraram um aumento no tempo de circulação sanguínea do rHuTNF- α quando encapsulado em nanopartículas furtivas, assim como seu acúmulo no tumor, indicando a maior eficácia terapêutica das mesmas quando comparada com a administração de nanocápsulas não furtivas e do fármaco livre.

Enfim, nanocápsulas e nanopartículas contendo RU 58668, um fármaco antiestrogênico utilizado no tratamento de câncer de ovário, foram avaliadas quanto a ação antitumoral e antiuterotrófica. Este fármaco na forma não encapsulada (livre) diminui o tumor em doses equivalentes a 50 mg/Kg/semana. Neste estudo, um efeito equivalente foi observado por meio da utilização das nanoesferas na dose de 4,3 mg/Kg/semana, ou seja, cerca de 10 vezes menor, indicando assim o aumento da eficácia terapêutica do fármaco. As nanocápsulas foram igualmente eficazes, mas a mesma resposta terapêutica foi observada numa dose 2,5 vezes menor, sugerindo uma melhor eficiência do fármaco liberado de nanocápsulas do que de nanoesferas (AMELLER et al, 2003a).

3.2. CÂNCER

Um organismo humano adulto é composto por aproximadamente 10^{15} células, muitas das quais se dividem e se diferenciam para a reposição em tecidos e órgãos. As células que têm a capacidade para a divisão e reposição são chamadas células tronco e calcula-se que existam aproximadamente 10^{12} divisões por dia nestes compartimentos. Mesmo em órgãos os quais exibem baixos níveis de divisão celular, tal como o fígado, a proliferação massiva pode ser iniciada por eventos como trauma ou infecção. Apesar desta enorme produção de novas células, o corpo humano mantém a massa corporal constante por muitas décadas. Este controle estranho sobre a multiplicação celular é alcançado por uma rede de mecanismos moleculares sobrepostos os quais governam a proliferação celular, por um lado, e a morte celular, denominada apoptose quando resulta de um evento programado, por outro lado. Qualquer fator que altere este balanço entre nascimento e morte celular, apresenta o

potencial de alterar o número de células em tecidos e órgãos, se não for corrigido. Após muitas gerações, esta multiplicidade celular aumentada seria clinicamente detectável como neoplasia, literalmente um novo crescimento (BERTRAM, 2001).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. O câncer apresenta grande variação clínica no início de seu desenvolvimento, taxa de crescimento, estado de diferenciação celular, diagnóstico e detecção, invasividade, potencial metastático, resposta ao tratamento e prognóstico. Em termos de biologia celular e molecular, entretanto, o câncer pode representar um número relativamente pequeno de doenças, causadas por defeitos moleculares similares na função celular, resultando de alterações também similares para um gene. Em última instância, o câncer é uma doença caracterizada pela alteração na expressão dos genes que ocorre através de mecanismos moleculares, incluindo o ataque direto ao ADN (mutações, translocações ou ampliações) e a transcrição e translação anormal dos mesmos (RUDDON, 1995).

A semelhança estrutural das células do câncer com suas células de origem permitem diagnósticos específicos sobre a origem e comportamento do tumor. Além disso, os tumores são classificados de acordo com o tecido ou tipo de células na qual se originam. Assim, os cânceres provenientes de células epiteliais são denominados de carcinomas, de células musculares, sarcomas e de células hematopoiéticas, leucemias (INCA, 2004).

Por definição, tumores benignos não produzem metástases, ou seja, não invadem tecidos adjacentes e não se propagam a sítios distantes, mantendo seu crescimento localizado na área na qual são inseridos. São mais diferenciados e por isso se assemelham mais com o tecido de origem. Em contraste, tumores malignos podem expressar vários graus de diferenciação, desde estruturas relativamente maduras que imitam tecidos normais a uma coleção de células tão primitivas a ponto da célula de origem não poder ser identificada. Além disso, possuem capacidade de penetrar nos tecidos e produzir metástases em órgãos distantes, onde sub-populações de células malignas se instalam, começam a se reproduzir novamente e a invadir outros tecidos (RUDDON, 1995).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 10 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer todos os anos e estima-se que até 2020,

este número alcance 15 milhões. O câncer causa 6 milhões de mortes anuais ou aproximadamente 12% de mortes no mundo, estando o câncer de pulmão, estômago e colo-retal entre os cinco mais comuns. Entre os homens, o câncer de pulmão e estômago são os mais freqüentes enquanto para mulheres, o câncer de mama e o câncer cervical são mais prevalentes. No Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte por doença, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (INCA, 2004).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estando ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas das células normais. De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Alguns destes fatores são bem conhecidos: o cigarro pode causar câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele, e alguns vírus podem causar leucemia. Outros estão em estudo, tais como alguns componentes dos alimentos que ingerimos, mas muitos são ainda completamente desconhecidos. O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato de as células das pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica em parte o porquê de o câncer ser mais freqüente nesses indivíduos. Os fatores de risco ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos. Tais fatores atuam alterando a estrutura genética (ADN) das células (INCA, 2004).

3.2.1. Fisiopatologia do câncer e a formação de metástases

Um variado número de etapas ocorre durante a mudança de célula normal à célula maligna. O primeiro passo ocorre aparentemente, em uma única célula, ou seja, o câncer é uma doença monoclonal e a mudança (ou mutação) na primeira célula neoplásica é um processo ao acaso, onde qualquer fator etiológico pode aumentar a probabilidade transformação celular (LIVOLSI et al, 1994). A carcinogênese pode ser vista como um processo que envolve mudanças celulares aceleradas e anormais, em que os genes controladores da proliferação, diferenciação e apoptose são transformados sob seletivas pressões do meio.

O desenvolvimento do tumor segue três fases distintas: iniciação, promoção e progressão. A fase de iniciação é um evento rápido (dentro de horas ou dias) e irreversível que ocorre quando uma célula normal é exposta ao carcinogênio que provoca o dano ao ADN. Este por si só não é mutagênico, a menos que a mutação somática resultante seja recapitulada via mitose, produzindo um clone da célula mutada. A fase de promoção, um processo prolongado que requer vários anos ou décadas para estabilizar, consiste da expansão de células mutadas, que leva à formação de uma lesão multicelular ativa pré-maligna e proliferante. Durante a fase de progressão, outro evento irreversível ocorre em um tempo relativamente curto, talvez menos que 1 ano, onde novos clones com grande capacidade proliferativa, invasividade e potencial metastático são produzidos (SUN et al, 2004).

Anormalidades tanto nos genes estimuladores de divisão celular (chamados de oncogenes), como nos protetores ou bloqueadores do ciclo celular (denominados supressores tumorais), podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células normais. Cada uma das proteínas envolvidas no ciclo celular é codificada por um gene. Mutações nestes genes podem levar à desregulação do ciclo celular. Os genes que atuam de forma positiva, induzindo ou estimulando a progressão do ciclo, são chamados proto-oncogenes, pois ao sofrerem mutações se tornarão oncogenes, cuja função permitirá ganho de função à célula mutante. Ao contrário, as proteínas envolvidas no controle negativo do ciclo celular são codificadas pelos assim chamados genes supressores tumorais. Mutações nestes grupos de genes se manifestarão pela sua falta de ação, mas o efeito final será similar, ou seja, a perda dos mecanismos controladores do ciclo celular normal. As mutações envolvendo oncogenes são mutações ativantes e podem ocorrer por uma série de mecanismos: translocação cromossômica, amplificação gênica, inserção retroviral, mutação pontual. Os genes supressores, ao contrário, agem inibindo ou prevenindo a expressão do fenótipo maligno (WARD, 2002).

A invasão e a metástase são a principal causa de morbidade e mortalidade relacionadas com o câncer. Para que as células tumorais se desprendam de uma massa primária, entrem nos vasos sanguíneos ou linfáticos e produzam um crescimento secundário em um local distante, várias etapas são necessárias. A célula transformada passa por uma expansão clonal, crescimento e diversificação formando um subclone metastático, que se adere e invade a membrana basal, passando pela matriz extracelular e, finalmente, ganha acesso à circulação. Uma vez na circulação,

as células tumorais são particularmente vulneráveis à destruição por defesas imunes naturais e adaptativas. As células tumorais tendem a se agrupar, favorecidas pela adesão homotípica entre si, bem como pela adesão heterotípica com as células sanguíneas, particularmente as plaquetas. Esta formação de agregados parece aumentar a sobrevivência das células tumorais e a implantabilidade. A parada e o extravasamento dos êmbolos tumorais em locais distantes envolvem a adesão ao endotélio, seguida de egresso pela membrana basal. Envolvidas nestes processos estão as moléculas de adesão e enzimas proteolíticas (ROBBINS, 1996).

O local no qual as células tumorais circulantes deixam os capilares para formar depósitos secundários está em parte relacionado com o local anatômico do tumor primário. Cada neoplasma tende ter preferência por um sítio do organismo. Alguns destes padrões são determinados por considerações puramente anatômicas; por exemplo, a rede de capilares do pulmão é o primeiro local que captura células tumorais intravenosas. O fígado também é outro local bastante atingido por metástases, devido a seu abundante fluxo sanguíneo. Outros padrões de metástases tumorais são explicados apenas como locais mais favoráveis para os neoplasmas. Os principais locais de metástases de disseminação linfática são os linfonodos, principalmente os regionais. A disseminação hematogênica ocorre para o fígado, pulmão, cérebro e ossos. Os carcinomas metastatizam principalmente por via linfática e os sarcomas, por via hematogênica (LIVOLSI et al, 1994; MIRANDA e RIBEIRO, 1996).

3.2.2. Tratamento

Uma consideração chave no tratamento do câncer é a intenção terapêutica. O desenvolvimento de um plano de tratamento individualizado para o paciente deve levar em conta os seguintes aspectos: *i)* a biologia e a história natural do câncer, *ii)* a extensão e disseminação da doença (incluindo locais específicos envolvidos), e, *iii)* o potencial da cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia na erradicação das células tumorais viáveis (HUBBARD, 1985).

A terapêutica antineoplásica ou antiblástica do câncer é empregada fundamentalmente no tratamento de tumores não-curáveis pela cirurgia ou radioterapia. O objetivo primário da quimioterapia, forma mais comum de terapia antiblástica, é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a

maioria dos agentes antitumorais atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto benignas. O tratamento pode ser utilizado com finalidade curativa ou paliativa, podendo ser também sistêmico, regional ou local. O tratamento sistêmico pode ser integrado com outras formas de terapêutica, sendo assim classificados como (i) adjuvante, quando a medicação é administrada posteriormente ao tratamento principal, quer seja ele cirúrgico ou radioterápico; (ii) neo-adjuvante, quando a medicação é administrada previamente ao tratamento definitivo, quer seja ele cirúrgico ou radioterápico e (iii) terapêutico, quando somente o tratamento sistêmico é empregado (ANELLI e ANELLI, 2000; SOLIMANDO et al, 2000).

Muitos fármacos antitumorais atualmente utilizados, especialmente aqueles que são “citotóxicos”, afetam apenas a primeira das características das células cancerosas, o processo de divisão celular, não tendo efeito específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou a tendência de produzir metástases. Os fármacos anticâncer podem ser divididos em fármacos citotóxicos e hormônios. Os fármacos citotóxicos são classificados em quatro grupos: a) agentes alquilantes e compostos relacionados, que agem formando ligações covalentes com o ADN e impedindo assim a replicação deste; b) antimetabólicos, que bloqueiam ou subvertem uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese de ADN; c) antibióticos citotóxicos, que são substâncias de origem microbiana que impedem a divisão de células mamíferas e; d) alcalóides da vinca e compostos relacionados, que são substâncias de origem vegetal que afetam especificamente a função dos microtúbulos e, portanto, a formação do fuso mitótico. Os hormônios agem suprimindo a secreção de hormônios ou antagonizam a ação destes (RANG, DALE e RITTER, 1997).

3.3. CAMPTOTECINA

Alcalóides são princípios ativos, contendo um nitrogênio heterocíclico, isolados de plantas de vários gêneros, que pertencem a mais de 158 famílias botânicas, sendo em muitos casos, metabólitos secundários. No seu meio de origem, os alcalóides existem na forma de sais de ácidos orgânicos, tais como ácido láctico, málico, tartárico ou cítrico. Apesar do grande número de substâncias sintéticas, os alcalóides ainda representam um dos mais potentes grupos de compostos para o tratamento de muitas doenças. Entre os vários alcalóides citotóxicos, os mais estudados devido a sua atividade citotóxica, estão os compostos de três gêneros; Vinca (*Catharantus*), *Taxus* e *Camptotheca* (CORTESE e NASTRUZZI, 1999).

A camptotecina (CPT) é um alcalóide derivado do arbusto *Camptotheca acuminata*, Decaisne (*Nyssaceae*). Esta planta cresce em áreas relativamente quentes do sudoeste chinês, sendo tradicionalmente empregada na medicina chinesa na forma de chá, pó e injetável, para o tratamento de várias doenças, inclusive tumores (POTMESIL, 1994; WALL e WANI, 1996). A CPT foi isolada durante o período de 1950-1959, por ocasião de um meticoloso estudo que objetivava a obtenção de esteróides como precursores da cortisona. A pesquisa não incluiu apenas análise quantitativa para saponinas esteroidais, mas também análise qualitativa para esteróis, alcalóides, taninos e flavonóides. Alguns destes extratos foram testados para avaliação da atividade antiviral, antibiótica e antitumoral. Após muitos testes, foi verificado que apenas o extrato alcoólico da *C. acuminata*, apresentava elevada atividade contra CA 755, então empregado como um dos sistemas padrões (WALL e WANI, 1996).

Quimicamente, a camptotecina é um alcalóide pentacíclico altamente insaturado (Figura 1) que contém um sistema de anéis quinolônicos (anéis A e B), um anel piridona (anel D) e um anel α -hidroxilactona terminal (anel E). A sua estrutura apresenta um centro quiral (C-20) no anel lactônico (DEY e WARNER, 1996). Apresenta-se como um pó amarelo opaco cristalino, com ponto de fusão de 264 – 267° C e massa molar de 348,11, correspondente a fórmula $C_{20}H_{16}N_2O_4$. Possui intensa fluorescência azul sob luz ultravioleta (UV), e é altamente insolúvel em água e em quase todos os solventes orgânicos, exceto em dimetilsulfóxido (DMSO), mas é solúvel em uma grande quantidade de óleos. Produz reações qualitativas negativas nos testes de identificação de fenóis e indóis, bem como nos testes de Dragendorff e Mayer. A CPT não reage com bicarbonato ou carbonato, mas pode ser quantitativamente convertida no seu sal sódico com hidróxido de sódio em temperatura ambiente. Com a acidificação, o sal sódico é rapidamente relactonizado (WALL e WANI, 1996; HATEFI e AMSDEN, 2002).

Após o isolamento e a elucidação estrutural da CPT e de seus análogos 10-hidroxi e 10-metoxi-camptotecina, foi demonstrado que estes fármacos inibiam a síntese de ADN e ARN. Em ensaios em camundongos, a camptotecina demonstrou uma considerável atividade no prolongamento da sobrevivência dos animais tratados com células leucêmicas L1210 ou células leucêmicas P388, quando doses entre 0,5 e 4,0 mg/kg foram administradas, bem como na inibição de tumores sólidos, incluindo o tumor de Walker WM. O análogo 10-metoxi-camptotecina mostrou-se menos ativo,

enquanto que o 10-hidroxicamptotecina demonstrou ser o mais ativo destes três compostos (WALL e WANI, 1996).

Estudos clínicos complementares foram iniciados na década de 60 e os resultados da fase I e parciais da fase II foram publicados entre 1970-1972. Estes estudos foram realizados com o sal sódico, uma vez que a baixa solubilidade aquosa da camptotecina limitava a sua utilização pela via intravenosa. Embora a atividade antitumoral tenha sido observada entre os pacientes com câncer gastrointestinal em alguns ensaios, a verificação de toxicidade medular e outras não hematológicas foi julgada severa para pré-concluir futuros testes. Os efeitos colaterais observados incluíram mielossupressão, toxicidade gastrointestinal, cistite hemorrágica e alopecia, com altas doses do fármaco. Mielossupressão, principalmente caracterizada por leucopenia e trombocitopenia, foi o efeito dose-limitante. Náuseas, vômitos e diarreia foram ocasionalmente severas em pacientes que receberam doses múltiplas de CPT sódica. Adicionalmente, muitos pacientes desenvolveram cistite hemorrágica após terem recebido várias doses de CPT (MOERTEL et al, 1972; MUGGIA et al, 1972; SLICHENMYER et al, 1993).

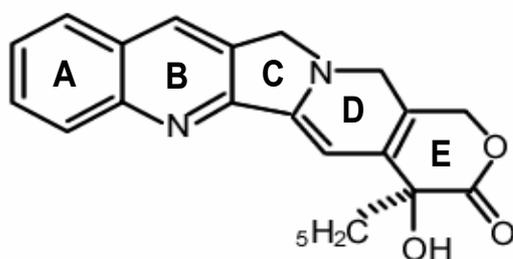


FIGURA 1. Estrutura química da Camptotecina (CPT).

Estudos posteriores evidenciaram que a manutenção do anel lactônico da camptotecina era crucial para a atividade antitumoral. Entretanto, a porção lactônica da molécula é susceptível à hidrólise espontânea, formando a sua correspondente forma carboxilada, num processo onde o equilíbrio é governado pelo pH do meio (Figura 2). Assim a forma lactônica intacta predomina em pH ácido e a presença da espécie carboxilada (anel aberto) é favorecida em meio neutro e alcalino. Apesar da forma carboxilada possuir solubilidade aquosa superior, é cerca de 10 vezes menos

potente, explicando os resultados obtidos nos ensaios clínicos realizados (HERTZBERG et al, 1989; GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002).

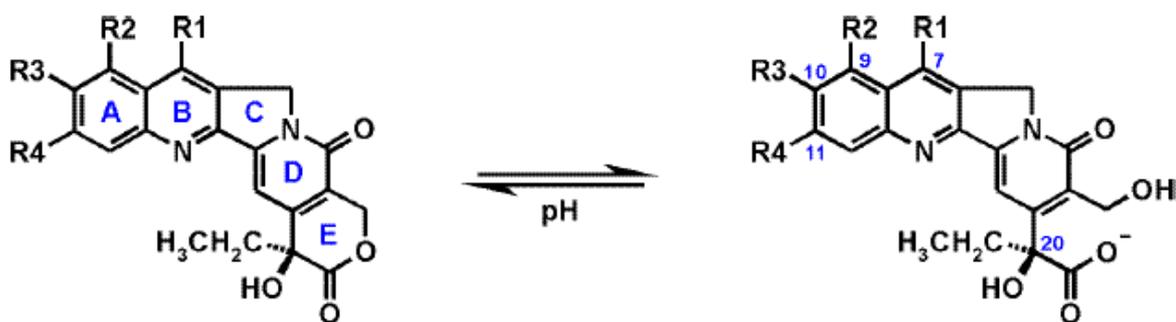


FIGURA 2. Mecanismo de conversão da forma lactônica de CPT em carboxilada.

3.3.1. Mecanismo de ação

O interesse pela camptotecina só foi retomado na década de 80, após a descoberta que seu sítio de ação era a enzima Topoisomerase I. A topoisomerase I é uma enzima nuclear presente em virtualmente todas células somáticas. Trata-se de um polipeptídeo monomérico com massa molar de 100 kD, codificado por um único gene. Similarmente às topoisomerasas, a topo I relaxa o ADN espiralado, induzindo o corte na porção fosfodiéster de uma fita simples e permitindo que a fita intacta passe através deste corte, religando, após, a fita ADN. Durante o curso deste ciclo catalítico, uma ligação covalente é estabelecida entre um grupo tirosina no sítio ativo de Topo I e um grupo fosfatase 3' ao longo da estrutura da ADN, formando o denominado complexo de clivagem (SLICHENMYER et al, 1993, SINHA, 1995).

A camptotecina se liga covalentemente à Topo I estabilizando o complexo ADN-enzima, inibindo fortemente a reação de religação pela Topo I sem afetar a reação de clivagem. A interação entre CPT e Topo I ocorre pelo ataque de um sítio nucleofílico sobre a enzima, na posição acila do anel E do fármaco. A citotoxicidade de CPT pode ser atribuída à interrupção da replicação pelo complexo ADN-enzima-fármaco estabilizado resultando no rompimento da dupla fita e finalmente na cessação da síntese de ARN. Assim, CPT é um fármaco ciclo celular específico da fase S, pois a presença da síntese de ADN é uma condição necessária para induzir a seqüência de eventos levando a citotoxicidade (FASSBERG e STELLA, 1992, HERBEN et al, 1998).

Uma maior expressão de Topo I em células tumorais e a velocidade de crescimento do tumor têm sido indicados como os fatores responsáveis pela resposta terapêutica. Alguns tecidos malignos contêm maiores níveis de Topo I que seus homólogos normais. Há também diferenças significantes na expressão desta enzima entre diferentes tipos de tumor. Por exemplo, uma maior expressão da enzima foi detectada em câncer de cólon e cervical, do que em tumores de pulmão e seio (GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002, ZUNINO et al, 2002). Por outro lado, a CPT e análogos não matam as células somente por diminuir a atividade catalítica total de Topo I. As concentrações destes fármacos que matam as células normais são 50 a 100 vezes menores que as concentrações necessárias para inibir a atividade catalítica de Topo I em 50%. Em vista destas observações, foi proposto que o acúmulo de enzima-ADN induzida pelo fármaco e a formação concomitante de fitas de ADN rompidas de ADN, mais do que a inibição total da atividade catalítica da enzima, são eventos críticos que levam à citotoxicidade da CPT e análogos (SLICHENMYER et al, 1993).

Além do efeito citotóxico, outra utilidade dos inibidores de Topo consiste na sua atividade antiviral, uma vez que esta enzima também está envolvida na função transcriptase reversa, no HIV. Priel e colaboradores (1993) demonstraram que a inibição de Topo I pela CPT pode bloquear o desenvolvimento de danos retrovirais-induzidos em camundongos. Ensaios de atividade antitumoral e antiviral de derivados da camptotecina para doenças associadas ao HIV, tais como o sarcoma de Kaposi e linfomas estão em fase clínica. A atividade antiviral também foi observada contra o papovavirus JC causador da leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), uma infecção oportunista do sistema nervoso central. Além da CPT possuir atividade antitumoral, a atividade antiangiogênica deste fármaco foi relatada, podendo ter relevância clínica no tratamento de outras condições, tal como restenose e psoríase. Finalmente, a CPT, encapsulada em lipossomas foi explorada contra leishmaniose. Como o principal reservatório do parasita na leishmaniose visceral são os macrófagos do fígado e baço, a utilização deste sistema mostra-se promissora, pois os macrófagos tendem a capturar os lipossomas, levando a uma acumulação do fármaco nos tecidos parasitados (HATEFI e AMSDEN, 2002).

Como outros fármacos citotóxicos, a resistência celular à CPT parece ser um fenômeno multifatorial, que potencialmente pode envolver falhas no acúmulo intracelular do fármaco, os quais são dependentes dos sistemas e transporte e

metabolismo, alterações qualitativas e quantitativas do alvo resultando em mudanças na interação fármaco-enzima e alterações na resposta celular a partir da formação dos complexos de clivagem, presumidamente pela redução da proporção de células na fase S em certo tempo (GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002; ZUNINO et al, 2002).

3.3.2. Farmacocinética

A porção lactona na estrutura da CPT é quimicamente instável e sofre hidrólise reversível pH dependente para a forma carboxilada, que é destituída da atividade inibitória de topoisomerase I. Sob condições ácidas ($\text{pH} < 4$) a estrutura lactônica predomina, enquanto em valores de $\text{pH} > 10$, o anel aberto está exclusivamente presente. No pH fisiológico, o processo de equilíbrio favorece a conversão para a forma carboxilada, também sendo influenciado pela ligação do fármaco à albumina. A diferença na afinidade pela albumina da carboxilada sobre a lactônica foi relatada ser 200 vezes maior, alterando significativamente o equilíbrio em favor do fármaco inativo. Como resultado final, tem-se que na presença de níveis fisiológicos de albumina humana, a forma ativa da CPT apresenta um tempo de meia vida muito curto, de aproximadamente 10 minutos. No plasma humano, a 37°C e $\text{pH} 7,4$, o anel lactônico da camptotecina abre rapidamente sendo que no equilíbrio, unicamente 0,2% do fármaco encontra-se na sua forma ativa. No sangue total, a camptotecina mostra-se mais estável e cerca de 5,3% encontra-se na forma lactônica. Este aumento da estabilidade foi relacionado à associação do fármaco com a bicamada lipídica dos eritrócitos, permanecendo protegido frente à hidrólise (BURKE e MI, 1994; MI, 1995; BURKE et al, 1995; HERBEN et al, 1998; ZUFIA et al, 2001; ZUNINO et al, 2002).

A perda da atividade da CPT é atribuída à abertura do anel lactônico por três razões. Primeiramente, a forma carboxilada apresenta uma associação reduzida com a membrana em cerca de duas vezes. A abertura do anel resulta numa alteração estrutural no fármaco que exibe limitada difusibilidade através da bicamada lipídica celular numa região de baixa constante dielétrica. Finalmente, experimentos em cultura de células evidenciaram que a abertura do anel resulta em atenuação da atividade do fármaco contra Topoisomerase I. Estes fatores contribuem conjuntamente com a diminuição da atividade citotóxica da CPT (HATEFI e AMSDEN, 2002).

Trinta minutos após uma injeção i.v. de CPT radiomarcada em camundongos, o fármaco apresentou-se distribuído por todo o organismo, incluindo o sistema nervoso,

pulmão e fígado com acúmulo preferencial na bile e intestino. As CPTs entram nas células de cultura rapidamente, e os níveis do fármaco associados às células permaneceram elevados por um período maior de 24 horas. Durante este tempo, a forma lactona permaneceu reversivelmente associada com a membrana celular (POTMESIL, 1994).

Em estudos *in vivo*, utilizando métodos espectrofluorimétricos para medir a concentração do fármaco, a CPT foi primeiramente eliminada como fármaco não metabolizado, via excreção biliar e fecal. Conseqüentemente, as maiores e mais prolongadas concentrações do fármaco foram medidas no trato gastrointestinal. O acúmulo substancial da CPT também foi observado no parênquima pulmonar (SLICHENMYER et al, 1993). A recuperação média do fármaco na urina foi de 23% da dose, dentro de 48 horas, em pacientes com função renal normal. O tempo de meia vida do fármaco foi maior do fármaco em pacientes com insuficiência renal. A CPT também foi detectada no aspirado de fluído ascítico e gástrico, 12 dias após o tratamento, mas não foi identificada em amostras de fluído biliar e cérebro-espinhal, 2 a 31 dias após o tratamento. Ainda, a CPT não foi encontrada em exame de necropsia do fígado, rins, estômago ou pulmão, de 7 a 12 dias após o tratamento (SLICHENMYER e VON HOFF, 1990; SLICHENMYER et al, 1993).

3.3.4 . Derivados de camptotecina

A camptotecina é um alcalóide natural muito pouco solúvel em água, inviabilizando a preparação de soluções destinadas à administração intravenosa. Por esta razão, uma variedade de análogos têm sido sintetizados na tentativa de manter as características essenciais da molécula para a citotoxicidade e produzir derivados solúveis em condições fisiológicas.

A CPT tem um anel pentacíclico que inclui uma porção pirrolo (3,4- β) quinolona e um centro assimétrico dentro do anel α -hidroxilactônico com configuração 20 (S). Nesta molécula, o sistema pentacíclico é um dos mais importantes fatores na inibição da enzima topoisomerase I. Assim, a omissão do anel A e B ou A, B e C (Figura 1) resulta em compostos tetracíclicos, tricíclicos e bicíclicos que são destituídos da atividade. Similarmente, a saturação do anel B resulta em compostos que apresentam pouca atividade *in vitro* em altas concentrações (>100 $\mu\text{mol/L}$). Por outro lado, modificação da estrutura pentacíclica com uma adição de um sexto anel F,

produzirá um composto hexacíclico que exibe a mesma potência como a CPT, sugerindo que pelo menos o anel pentacíclico é necessário para a atividade citotóxica (ULUKAN e SWAAN, 2002).

Estudos de relação estrutura atividade demonstraram que modificações no anel A e B resultam na manutenção da atividade da molécula, enquanto mudanças no anéis C, D e E levam à redução da atividade. Além da integridade do anel lactônico, a forma estereoquímica da hidroxila 20(S)-CPT é essencial para a atividade antitumoral. A estereoconfiguração da hidroxila em 20(R)-CPT não mostrou qualquer atividade citotóxica. Por outro lado, derivados nos quais a hidroxila em C-20 foi substituída por cloro ou bromo demonstraram-se ativos. A polaridade do halogênio permitiu uma interação suficiente para estabilizar o complexo com a enzima (ZUNINO et al, 2002).

Todos os análogos da CPT possuem estrutura similar. Vários derivados ativos deste fármaco foram obtidos com substituições diferentes em C-7, C-9, C-10, incluindo o irinotecano, topotecano, 9-amino-CPT e 9-nitro-CPT (Figura 3). A posição 7 também tem sido funcionalizada com porções alquilas, tal como o 7-clorometil derivado que é capaz de reagir covalentemente com ADN na presença da topoisomerase I. Substituições na posição 11 com grupos pequenos demonstraram ser ativos, enquanto compostos inativos foram obtidos com a introdução de grupamentos nas posições 12 e 14. Apesar da obtenção de derivados ativos apresentando solubilidade aquosa melhorada, a instabilidade do anel lactônico (E) frente à hidrólise foi mantida. Derivados de camptotecina com anéis E mais estáveis (21-S-lactam e 20-deoxi-camptotecina) demonstraram-se inativos (HERBEN et al, 1998; ZUNINO et al, 2002).

As duas especialidades farmacêuticas contendo derivados de camptotecina são o Hycatim® e o Captosar®, que contém o topotecano e o irinotecano (CPT-11), respectivamente. Uma vez que a forma ativa destes fármacos encontra-se em predominantemente em meio ácido, estes dois compostos são comercializados em meio tamponado (EMERSON, 2000; MURAS e SANTOS, 2000). O topotecano é comercializado na forma de pó, como cloridrato, produzindo uma solução aquosa com pH de 2,5 a 3,5 após dissolução. Tal solução é estável por 12 horas em temperatura ambiente, enquanto o pó apresenta validade de dois anos. No Camptosar®, o irinotecano é igualmente apresentado na forma de pó, que após reconstituição produz uma solução apresentando um valor de pH entre 3,5 e 4,5, estável por três horas ao abrigo da luz (TAKIMOTO *et al.*, 1998). Enquanto o Hycantim® tem sido utilizado principalmente para o tratamento de carcinoma de ovário, o Camptosar®, tem sido

indicado para o tratamento do câncer colorretal (GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002).

A eficácia terapêutica das camptotecinas tem sido avaliada empregando-se diferentes protocolos de administração. Os resultados têm demonstrado que as CPTs são mais efetivas em quando administradas em protocolos prolongados, do que em tratamentos de curta duração com altas doses. Esta característica tem sido atribuída ao fato de que estes fármacos atuam especificamente na fase S do ciclo celular. Uma vez alcançado o nível de citotoxicidade necessário para a atividade inibitória sobre a enzima Topo I, o parâmetro de determina a resposta antitumoral é o tempo de exposição e não o aumento da dose. Além disso, os efeitos tóxicos das CPTs também variaram de acordo com o protocolo de administração (THOMPSON et al, 1998).

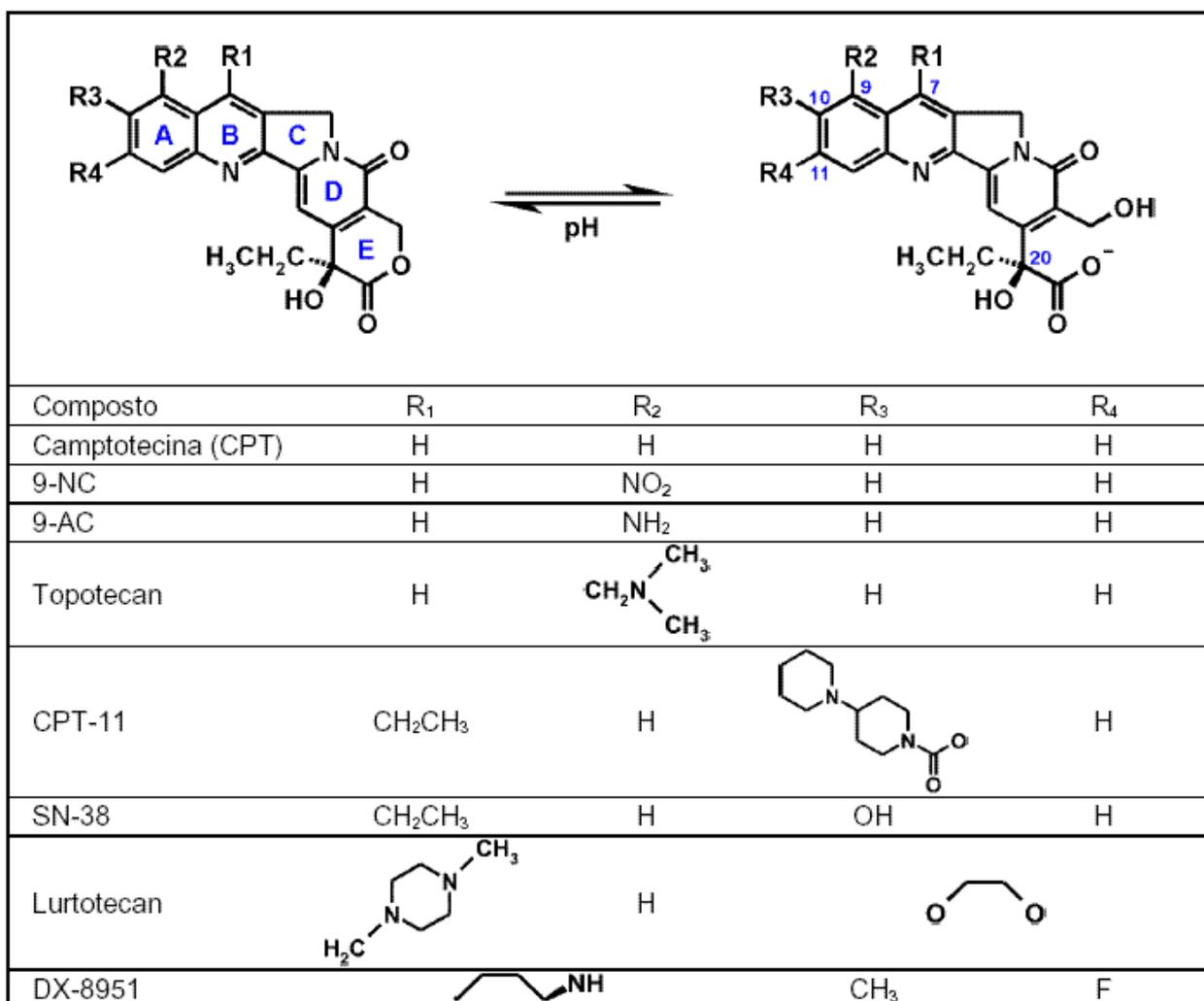


FIGURA 3. Estruturas químicas dos derivados de camptotecina (Adaptado de KEHRER et al, 2001).

3.3.6. Sistemas de liberação de camptotecinas

Com o objetivo de melhorar a eficácia das CPTs, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos tem sido realizado, resultando em mudanças na biodistribuição e estabilidade do fármaco e possibilitando, assim, novas oportunidades terapêuticas.

Dentre as estratégias testadas, a utilização de formulações de liberação prolongada tem apresentado resultados promissores, especialmente com a utilização de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Com este objetivo, Sherendova e colaboradores (1997) utilizaram microesferas de PLGA para a liberação prolongada da 10-hidroxicamptotecina (10-HCPT), preparadas pela técnica de emulsão/evaporação do solvente. Os autores observaram a manutenção da forma lactônica do fármaco no interior das partículas por mais de 10 semanas, num ambiente que simulava as condições fisiológicas. A estabilização da 10-HPTC após encapsulação em microesferas de PLGA também foi demonstrada por Mallery e colaboradores (2001), usando um modelo de regressão do carcinoma celular escamoso oral humano em camundongos. Assim, foi considerado que tais partículas apresentam o potencial para estabilizar outros análogos desta classe terapêutica como a camptotecina, o topotecano e o irinotecano (HATEFI E AMSDEN, 2002).

Ertl e colaboradores (1999) desenvolveram microesferas de CPT de liberação prolongada, empregando uma variante da metodologia de evaporação do solvente e o H-PLGA para a preparação das partículas. Este polímero contendo mais grupamentos carboxílicos terminais que o PLGA foi selecionado para criar um microambiente ácido que favorecesse a presença de CPT na sua forma ativa. Neste caso, a cinética de liberação do fármaco a partir das microesferas seguiu um modelo bifásico, com um efeito *burst* inicial variando entre 20 a 35% da quantidade de fármaco encapsulado.

Na tentativa de melhorar a velocidade de dissolução e a citotoxicidade da CPT, este fármaco foi incorporado em microesferas de celulose oxidizada, usando a metodologia de secagem em torre de aspersão (*spray-drying*). As microesferas contendo CPT demonstraram ser mais efetivas do que o fármaco livre em estudos de citotoxicidade *in vitro* usando linhagens de células leucêmicas mielóides THP-1 e linfóide RPMI-8402. Entretanto, o tempo requerido para a liberação de 50% do fármaco variou entre 19 e 37 horas, não satisfazendo a necessidade de liberação

prolongada do fármaco para uma atividade antineoplásica ótima *in vivo* (KUMAR et al, 2001).

Também com o objetivo de obter formas farmacêuticas de liberação prolongada, Dora (2003) preparou e caracterizou microesferas de CPT usando a poli- ϵ -caprolactona para a obtenção da matriz polimérica. O perfil de liberação do fármaco foi igualmente bifásico, sendo que o efeito *burst* observado aumentou com o aumento da quantidade inicial de CPT adicionada à formulação. A eficácia terapêutica das microesferas e do fármaco livre foi avaliada usando modelo de melanoma murino de alto poder metastático. Apesar das formulações de microesferas terem demonstrado eficácia similar àquela produzida pelo fármaco livre, no modelo utilizado, os efeitos tóxicos foram reduzidos em decorrência, provavelmente, do prolongamento da liberação.

Sistemas lipídicos também têm sido testados para melhorar a estabilidade da CPT frente à hidrólise e aumentar a sua eficácia terapêutica. Burke e Mishra (1993) demonstraram que a CPT se liga às membranas intercalando-se entre as cadeias acilas da membrana fosfolipídica, permanecendo assim estável. Lundberg (1998) desenvolveu ésteres de CPT e de seus análogos, tais como o 10-HCPT e SN-38, capazes de serem incorporados em bicamadas dos lipossomas e emulsões lipídicas submicrônicas. Em termos de atividade ambas moléculas e seus derivados ésteres foram similares. Entretanto, os ésteres associados a vetores lipídicos demonstrou maior atividade contra células T-47D, uma linhagem de câncer de mama, e células Caco 2, células de adenocarcinoma de cólon.

A aplicação da 9-NC na forma de um aerossol lipossomal foi relatada no tratamento xenógrafos de pulmão, cólon e mama em camundongos *nude*. As características farmacocinéticas e a distribuição tecidual da camptotecina lipossomal inalada também foram avaliadas. Neste estudo a liberação pulmonar da CPT demonstrou ser vantajosa por duas razões: o teor de albumina na superfície traqueobronquial sendo mais baixo do que a concentração encontrada no sangue e a mais rápida penetração do fármaco nos tumores auxiliariam na preservação da forma lactônica da molécula (HATEFI e AMSDEN, 2002). Outras vantagens no uso de lipossomas para liberação de CPT são a internalização intracelular aumentada do fármaco, a diminuição da toxicidade sistêmica e aumento da sua solubilidade nos fluidos biológicos. Apesar de todas estas vantagens, estes sistemas sofrem ausência de seletividade pelas células tumorais e embora a liberação do fármaco seja

umentada, a necessidade de liberação sustentada em baixas doses por um longo período de tempo é ainda insatisfatória. A eliminação de lipossomas pelos macrófagos circulantes e sua meia vida relativamente curta são as maiores desvantagens deste tipo de sistema de liberação (HATEFI e AMSDEN, 2002).

Finalmente, diferentes formulações de CPT foram desenvolvidas por Cortesi e colaboradores (1997) com o objetivo de aumentar a solubilidade do fármaco e reduzir a toxicidade associada com a sua administração. Assim, a performance *in vitro* de lipossomas, emulsões e micelas contendo CPT foi avaliada em cultura de células leucêmicas K562. Os resultados demonstraram que as três formulações testadas foram capazes de liberar efetivamente a CPT, apresentando atividade antiproliferativa.

Outra possível estratégia que visa melhorar a eficácia terapêutica das camptotecinas consiste na utilização de sistemas coloidais nanoparticulares. Yang e colaboradores (1999 a,b) prepararam nanopartículas sólidas lipídicas recobertas com Poloxamer 188 pela técnica de homogeneização em elevada pressão. Após administração das nanopartículas em camundongos pela via oral e pela via intravenosa, a concentração da CPT foi determinada no sangue e em vários órgãos, usando uma metodologia de cromatografia líquida com detecção por fluorescência. Dois picos de concentração plasmática foram obtidos após a administração oral das nanopartículas, em contraste com a presença de um único pico quando uma solução do fármaco foi utilizada. Este efeito também foi observado após determinação da CPT no coração, fígado, baço, pulmões, rins e cérebro. A presença de um segundo pico de concentração plasmática foi atribuída à lenta degradação das nanopartículas no intestino pela ação das esterases ou pela translocação das partículas sólidas através do trato gastrointestinal, ou ainda por ambos, sugerindo que as mesmas poderiam representar um promissor sistema de liberação prolongada para a CPT, para administração oral. Por outro lado, a administração intravenosa das nanopartículas resultou no aumento da relação ASC/dose e tempo de residência médio nos órgãos avaliados, sobretudo no cérebro, quando comparados com os valores obtidos após administração da solução, indicando que tal sistema terapêutico poderia ser empregado na vetorização do fármaco nestes tecidos.

Nanopartículas contendo a 10-hidroxicamptotecina-10,20-diisobutil dicarbonato (HCPT-1) foram preparadas a partir de policaprolactona-co-láctico-b-PEG-b-policaprolactona-co-láctico (PCLLA-PEG-PCLLA), apresentando diferentes massas molares de polietilenoglicol, pela técnica de nanoprecipitação. Fatores tais como a

composição e concentração do co-polímero e a quantidade inicial de fármaco demonstraram afetar o tamanho da partícula, eficiência de encapsulação e liberação do HCPT-1 *in vitro*, indicando que tais sistemas ofereceriam ampla flexibilidade para a obtenção de uma resposta terapêutica adequada. Além disso, estudos de biodistribuição realizados após administração intravenosa das nanopartículas indicaram que a concentração do fármaco permaneceu elevada na corrente sanguínea mesmo após 24 da injeção. A concentração do fármaco também foi alta nos pulmões e baço, tendo sido este resultado atribuído a um efeito de filtração de partículas ou agregados grandes pela rede capilar. Por outro lado, a concentração do fármaco foi baixa no fígado, o principal órgão do sistema retículo-endotelial, decorrente provavelmente, da estabilização estérica proporcionada pelo revestimento de polietilenoglicol, na qual que fornece um meio para que as partículas escapem da rápida captura pelos macrófagos teciduais (ZHANG et al, 2004).

Ainda como novos sistemas de liberação, os nanobiohíbridos têm sido propostos para veicular camptotecina (TYNER et al, 2004). Neste caso, a camptotecina foi primeiramente encapsulada em micelas de tensoativos aniônicos. As micelas carregadas negativamente foram então encapsuladas em nanopartículas de hidróxido (HDC) de magnésio e alumínio de dupla camada, por um processo de troca iônica. Neste caso, o complexo formado é neutro e pode ser disperso em meio aquoso. Tal sistema demonstrou ser capaz de liberar rapidamente a camptotecina, dentro de 10 minutos em ambos meios com pH 4,8 e 7,2. Após a inoculação em cultura de células de glioma, os nanobiohíbridos contendo camptotecina resultaram na diminuição significativa do tempo de sobrevivência quando comparado com as células não tratadas ou incubadas na presença do tensoativo e do HDC. Além de aumentar a solubilidade aquosa da camptotecina em três vezes, os autores sugerem que a modificação da superfície das partículas de HDL fornece um meio promissor para a vetorização de fármacos em sítios específicos de ação.

Finalmente, as propriedades antitumorais das nanopartículas de poli ácido láctico-co-metoxipolietilenoglicol contendo camptotecina e preparadas pela técnica de emulsão/evaporação do solvente foram avaliadas por Miura e colaboradores (2004). Após a administração pela via intravenosa, na dose de 0,5 mg de CPT/Kg, a CPT permaneceu por um período maior na circulação sanguínea quando encapsulada nas nanopartículas, do que quando em solução. Em ratos apresentando o modelo de tumor sólido sarcoma 180, a administração de uma ou de duas doses de camptotecina nanoencapsulada, na concentração de 2,5 mg/kg, demonstrou ser muito mais efetiva

quando comparado com a administração de uma solução do fármaco. Além disso, foi verificado a supressão total do tumor no grupo tratado com as nanopartículas na dose de 2,5 mg/kg no 7º e 9º, 4 semanas após a primeira administração, sem a diminuição significativa no peso dos animais. A melhoria na eficácia terapêutica do fármaco foi atribuída à melhoria no seu perfil farmacocinético, quando este se apresentava nanoencapsulado.

Uma estratégia diferente emprega a utilização de pró-fármacos de CPTs ligada covalentemente a diferentes macromoléculas apresentando ou não cargas. Entre os polímeros neutros, dois têm preenchidos os requisitos para uma posterior avaliação pré-clínica, a N-2-(hidroxipropil)metacrilamida e o polietilenoglicol (PEG), que são ligados ao grupamento hidroxila da CPT em C-20 por meio de vários espaçores aminoácidos, com o objetivo de obter uma melhor hidrossolubilização. Tais conjugados CPT-polímero têm demonstrado uma considerável estabilidade no plasma, aumentada eficácia na vetorização ao tumor, prolongada retenção intratumoral e remarcável atividade contra um amplo espectro de modelos de tumores xenógrafos, além de uma limitada toxicidade sistêmica. Resultados preliminares em ensaios clínicos de fase I indicaram um comportamento similar em humanos (ZUNINO et al, 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas

- Benzoato de Benzila (Delaware);
- Camptotecina (Sigma Chemical Company, EUA);
- D,L-poli ácido-láctico 16 kD (Boehringer Ingelheim, França);
- D,L-poli ácido-láctico-co-glicólico 75:25 e 50:50 (Boehringer Ingelheim, França);
- Miglyol 812 N (Sasol, EUA);
- Monooleato de sorbitano (Span 80, Beraca);
- Monooleato de sorbitano polioxietilenado (Tween 80, Delaware);
- Pireno (Sigma-Aldrich, EUA);
- Pluronic F68 (BASF, EUA);
- Poli ácido-láctico-co-poli-etilenoglicol 49 kD e 66,6 kD – 20 % de PEG em ambos copolímeros com massa molar de 5 kD (Alkermes Inc., EUA);
- Poli- ϵ -caprolactona 65 kD (Sigma-Aldrich, EUA).

4.1.2 Solventes e reagentes

Todos os solventes, com exceção daqueles utilizados na análise por CLAE, possuíam grau de pureza para análise (p.a).

- Acetona (Vetec);
- Ácido fosfórico xaroposo concentrado (Vetec);
- Cloreto de potássio (Vetec);
- Cloreto de sódio (Vetec);
- Dimetilsulfóxido (Vetec);
- Dióxido de carbono (White Martins);
- Éter Etílico (FM);
- Fosfato dissódico anidro (Synth);
- Fosfato de potássio monobásico (Synth);
- Hidróxido de sódio (Cinética Química LTDA);
- Metanol para CLAE (Tedia).

4.1.3 Animais

- Camundongos *Mus musculus*, linhagem Swiss; com controle de luz (12 h claro/12 h escuro) e com água e comida sem nenhuma privação.

4.1.4 Cultura de células

- Bicarbonato de sódio (Merck);
- EDTA (Life Technologies);
- Estreptomicina (Sigma-Aldrich);
- Glicose (Synth);
- HEPES (Sigma-Aldrich);
- Meio de cultura RPMI –1640 (Sigma-Aldrich);
- Penicilina G (Sigma-Aldrich);
- Soro bovino fetal (Life Technologies);
- Tripsina (Sigma-Aldrich).

4.1.5 Equipamentos e materiais de consumo

- Agitador magnético Are – Velp científica;
- Bomba de Vácuo Marconi;
- Capela de fluxo laminar vertical Pachane;
- Centrífuga Sigma 2-15, rotor 12148;
- Controlador de exposição Olympus PM-20;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS SPD-10AV VP, workstation Class-VP;
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-5B;
- Evaporador rotatório Quimis Q-344B2;
- Instrumentos cirúrgicos inoxidáveis;
- Máquina fotográfica Olympus PM C35DX;
- Membrana Éster de Celulose Spectra/Por CE MWCO 10000;
- Microscópio de fluorescência Olympus BX 40 Optical;
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 EXII;
- pHmetro WTW pH 330i;
- Spectra/Por Closures;
- Ultrassom Ultrasonic Cleaner Unique 1400 USC;

- Unidade de filtração Millex AA 0,8 μm (Millipore);
- Unidades de ultra-filtração e centrifugação Ultrafree-Mc 100000 NMWL (Millipore, EUA);
- Zetasizer 3000HS Malvern Instruments.

4.2 Metodologias

4.2.1 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas

4.2.1.1 Estudo preliminar das condições de preparação das suspensões de nanocápsulas

4.2.1.1.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas

Suspensões de nanocápsulas brancas (sem fármaco) foram preparadas pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação) descrita por Fessi e colaboradores (1989). Brevemente, o polímero, o tensoativo lipofílico e o óleo foram solubilizados em 10 mL de um solvente orgânico. Esta solução foi adicionada, com auxílio de uma pipeta pasteur e sob agitação magnética, em 20 mL de uma fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico. As suspensões de nanocápsulas foram levadas à evaporação sob pressão reduzida em rotavapor para eliminação do solvente orgânico e concentradas até o volume desejado. A composição das formulações testadas encontra-se demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1. Formulações testadas na avaliação preliminar das condições de preparação das suspensões de nanocápsulas.

	Formulação						
	1	2	3	4	5	6	7
Fase Orgânica							
PCL (mg)	40	40					30
PLA (mg)			40		40		
PLGA 50:50 (mg)				40			
PLGA 75:25 (mg)						40	
Óleo (µL)							
Miglyol 812	120	120	120	120		120	125
Benzoato Benzila					120		
Span 80 (mg)	30	30	40	40	40	40	40
Acetona (mL)	9	8	10	10	10	10	10
DCM (mL)	1	2					
Fase Aquosa							
Tween 80 (mg)	30	30	30	30	30	30	
Pluronic F68 (mg)							100
Água (mL)	20	20	20	20	20	20	20

PCL: poli-ε-caprolactona
 PLA: poli-ácido láctico
 PLGA: poli-ácido láctico-co-glicólico
 DCM: diclorometano

4.2.1.1.2 Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica das partículas

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das nanocápsulas brancas foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica em um Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Reino Unido).

4.2.1.1.3 Determinação da solubilidade da camptotecina no componente oleoso das formulações

Um excesso de camptotecina foi adicionado em 10 mL de benzoato de benzila e miglyol e as misturas foram mantidas sob ultra-som durante 30 minutos. Após repouso de 24 horas, as misturas foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e analisados quanto ao teor de camptotecina por CLAE, segundo metodologia descrita em 4.2.2.1.

4.2.2 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo camptotecina

4.2.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina

Suspensões de nanocápsulas de poli ácido-láctico (PLA) e poli ácido-láctico-co-poli-etilenoglicol (PLA-PEG) contendo camptotecina foram preparadas pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação) descrita por Fessi e colaboradores (1989). Brevemente, 40 mg de polímero (PLA ou PLA-PEG), 120 µL de benzoato de benzila, 40 mg de monooleato de sorbitano foram solubilizados na acetona. A esta solução foi adicionada a camptotecina em diferentes concentrações (50 a 900 µg) e o volume completado até 10 mL com o mesmo solvente. Esta solução (fase orgânica) foi adicionada em uma fase aquosa, contendo Tween 80 0,15% (p/V), sob agitação magnética, previamente ajustada a valores de pH menores que 5,0. As nanocápsulas são formadas instantaneamente após a mistura. A acetona foi então eliminada e o volume foi reduzido a 10 mL em evaporador rotatório. As suspensões resultantes foram filtradas em membrana 0,8 µm (Millex AA, Millipore). O esquema de preparação das nanocápsulas encontra-se demonstrado na Figura 4.

4.2.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e da taxa de recuperação da camptotecina nas suspensões de nanocápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência

4.2.2.2.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu SLCA VP, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS APD-10AV VP e workstation Class-VP, utilizando sistema de fase reversa e modo isocrático. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna Supelcosil LC-18

(15 cm x 4,6 mm ID, 5 μ m; Supelco, EUA), fase móvel, metanol:KH₂PO₄ 10mM (50:50 v/v) ajustado a pH 2,8 com ácido fosfórico; fluxo, 1,0 mL/min; volume de injeção, 20 μ L e detecção no ultravioleta, 254 nm.

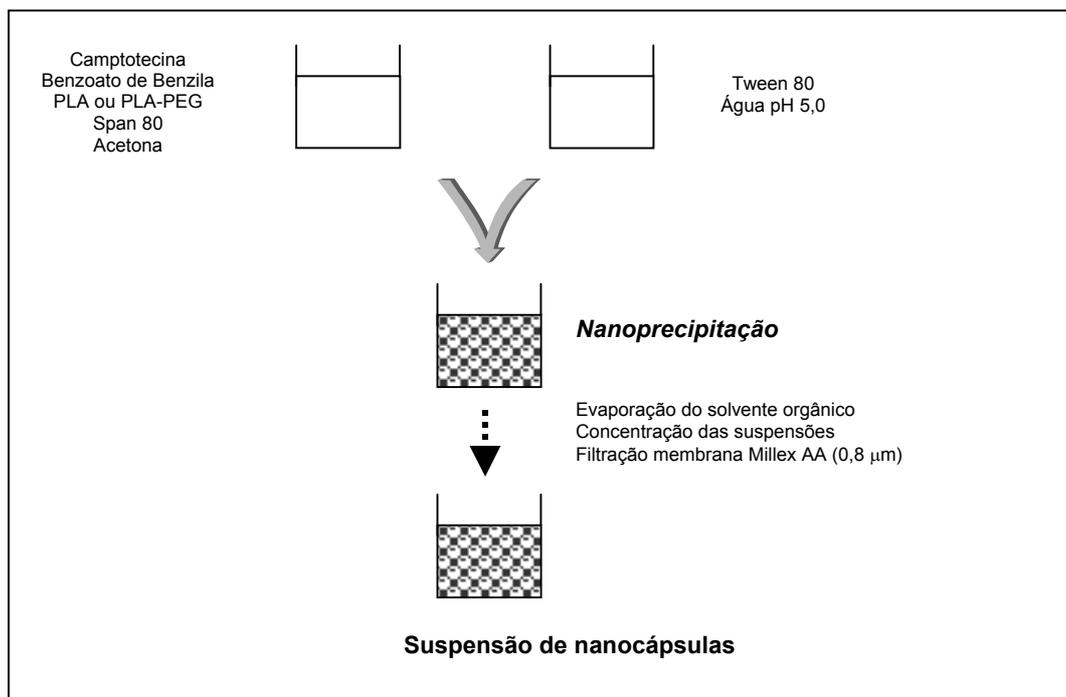


Figura 4. Esquema de preparação das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina.

4.2.2.2.2 Preparação da curva de calibração

Cerca de 10 mg de camptotecina, exatamente pesados, foram dissolvidos em 10 mL de DMSO em balão volumétrico. Uma alíquota de 0,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol. Esta solução foi diluída para obter soluções de camptotecina nas concentrações de 0,05, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75 e 2,0 μ g/mL em metanol. As soluções resultantes foram então analisadas por CLAE como descrito no item 4.2.2.2.1. As soluções foram injetadas em triplicata e as médias das áreas referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise da regressão linear.

4.2.2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e da taxa de recuperação de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas

A concentração de camptotecina foi determinada após completa dissolução das nanocápsulas em metanol (concentração total) e no sobrenadante obtido após separação das partículas por ultrafiltração/centrifugação, empregando-se unidades Ultrafree-MC 100000 (Millipore), a 4500 rpm por 30 minutos (concentração no ultrafiltrado). As amostras foram diluídas em metanol e analisadas por CLAE nas condições descritas no item 4.2.2.2.1. A eficiência de encapsulação (%) foi estimada como sendo a diferença percentual entre a quantidade de fármaco presente na suspensão após dissolução das partículas e aquela encontrada no ultrafiltrado. O teor de fármaco nas suspensões foi expresso em concentração percentual (% p/V). A taxa de recuperação (%) de camptotecina foi calculada como sendo a percentagem encontrada nas suspensões relativa à quantidade inicialmente adicionada.

4.2.2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

4.2.2.3.1 Avaliação da morfologia das nanocápsulas

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada por microscopia eletrônica em modo de transmissão em microscópio Jeol 1010 após coloração das amostras com acetato de uranila 2% (p/v).

4.2.2.3.2 Determinação do tamanho das partículas e do potencial zeta

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das nanocápsulas foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica. O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi determinado a partir da medida da mobilidade eletroforética por anemometria laser doppler num campo elétrico de 150 V/cm. Ambas medidas foram realizadas em um equipamento Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Reino Unido).

4.2.2.3.3 Determinação do pH

A determinação do pH das suspensões foi realizada diretamente em pHmetro WTW pH330i, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

4.2.2.4 Avaliação do perfil de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas

4.2.2.4.1 Determinação da concentração de camptotecina por espectrofluorimetria

4.2.2.4.1.2 Condições fluorimétricas

A análise da concentração de camptotecina no meio de dissolução foi realizada em Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-5B. Os ensaios foram realizados sob as seguintes condições: (i) fendas; excitação, 5 nm e emissão, 2,5 nm e (ii) comprimentos de onda; excitação, 374 nm e emissão, 390-550 nm. Os dados obtidos dos espectros de fluorescência foram exportados como arquivos ASCII para disquetes e posteriormente analisados usando o programa Origin versão 6.0.

4.2.2.4.2 Preparação da curva de calibração

Cerca de 10 mg de camptotecina, exatamente pesados, foram dissolvidos em 10 mL de DMSO em balão volumétrico. Uma alíquota de 0,50 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com uma solução de tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% (p/V) de Tween 80. Esta segunda solução foi diluída para obter soluções de camptotecina nas concentrações de 0,005, 0,01, 0,02, 0,06, 0,10, 0,14, 0,18, 0,22 e 0,26 µg/mL. As soluções foram então analisadas conforme descrito no item 4.3.1.1. As análises foram feitas em triplicata e as médias das áreas dos espectros de emissão referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear.

4.2.2.4.3 Ensaios de liberação

4.2.2.4.3.1 Avaliação do perfil de liberação da camptotecina em função do tempo

Uma alíquota de 2,0 mL de suspensão de nanocápsulas foi medida e transferida para o interior do saco de diálise (Spectra/Por CE MWCO 10000). Após o seu fechamento, o saco de diálise foi colocado em béquer contendo 200 mL de uma solução tampão fosfato pH 7,4 contendo Tween 80 2% (p/V), para obtenção de

condições *sink*. Esse sistema foi mantido sob agitação a 37°C e, no tempo zero e após 0,16, 0,33, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, alíquotas de 3,0 mL do meio de liberação foram coletadas para análise. O volume de amostra retirada foi imediatamente repostado com o meio de liberação. As amostras foram analisadas por espectrofluorimetria conforme descrito em 4.2.2.4.1. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de camptotecina foi determinada após comparação das áreas dos espectros de emissão das amostras com aquelas obtidas a partir de uma solução padrão de camptotecina a 0,18 µg/mL, analisadas nas mesmas condições experimentais. Uma solução tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% (p/V) de Tween 80 foi empregada como branco. A partir destes resultados, curvas de liberação de camptotecina (%) *versus* tempo (horas) foram plotadas.

4.2.2.4.3.2 Avaliação da liberação da camptotecina em função da diluição das suspensões

As suspensões de nanocápsulas foram diluídas 2, 5, 10, 20 e 100 vezes com solução tampão fosfato pH 7,4 contendo Tween 80 2% (p/V) e mantidas sob agitação a 37°C. Após 2 horas, amostras foram coletadas e submetidas a ultrafiltração/centrifugação em unidades Ultrafree (Millipore, EUA). Os ultrafiltrados obtidos foram analisados quanto ao teor de camptotecina por espectrofluorimetria conforme descrito em 4.2.2.4.1. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de camptotecina foi determinada após comparação das áreas dos espectros de emissão das amostras com aquelas obtidas a partir de uma solução padrão de camptotecina a 0,22 µg/mL, analisadas nas mesmas condições experimentais. Uma solução tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% (p/V) de Tween 80 foi empregada como branco.

4.2.3 Preparação e caracterização de suspensões de nanocápsulas contendo um marcador fluorescente

4.2.3.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas contendo pireno

Nanocápsulas de poli ácido-láctico (PLA) e poli ácido-láctico-co-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) contendo pireno foram preparadas pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação) conforme descrito em 4.2.2.1. Brevemente, 40 mg de polímero (PLA ou PLA-PEG), 120 µL de benzoato de benzila, 40 mg de monooleato de sorbitano foram solubilizados na acetona. A esta solução foi

adicionada 300 µg de pireno e o volume completado até 10 mL com o mesmo solvente. Esta solução (fase orgânica) foi adicionada em uma fase aquosa, sob agitação magnética, contendo 30 mg de Tween 80. As nanocápsulas formaram-se instantaneamente após a mistura. A acetona foi então eliminada e o volume foi reduzido a 10 mL em evaporador rotatório. As suspensões resultantes foram filtradas em membrana 0,8 µm (Millex AA, Millipore).

4.2.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e da taxa de recuperação do pireno nas suspensões de nanocápsulas por espectrofluorimetria direta

4.2.3.2.1 Condições fluorimétricas

A determinação da concentração de pireno nas soluções obtidas após completa dissolução das nanocápsulas foi realizada em Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-5B. Os ensaios foram realizados sob as seguintes condições: (i) fendas; excitação, 5 nm e emissão, 2,5 nm e (ii) comprimentos de onda; excitação, 334 nm e emissão, 350-450 nm. Os dados obtidos dos espectros de fluorescência foram exportados como arquivos ASCII para disquetes e posteriormente analisados usando o programa Origin versão 6.0.

4.2.3.2.2 Preparação da curva de calibração

Cerca de 50 mg de pireno, exatamente pesados, foram dissolvidos em 100,0 mL de metanol em balão volumétrico. Uma alíquota de 1,0 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume completado com metanol. Esta segunda solução foi diluída para obter soluções de pireno nas concentrações de 40,0, 50,0, 60,0, 80,0, 90,0 e 100,0 ng/mL. As soluções foram então analisadas conforme descrito no item 4.2.3.2.1. As análises foram realizadas em triplicata e as médias das áreas dos espectros de emissão referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear.

4.2.3.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e da taxa de recuperação de pireno nas suspensões de nanocápsulas

A concentração de pireno nas suspensões foi determinada após completa dissolução das nanocápsulas em metanol (concentração total) e no sobrenadante obtido após separação das partículas por ultrafiltração/centrifugação, empregando-se unidades Ultrafree-MC 100000 (Millipore), a 4500 rpm por 30 minutos (concentração no ultrafiltrado). As amostras foram diluídas em metanol e analisadas por espectrofluorimetria nas condições descritas no item 4.2.3.2.1. A eficiência de encapsulação do pireno nas nanocápsulas foi estimada como sendo a diferença percentual entre a quantidade de pireno presente na suspensão após dissolução das partículas e aquela encontrada no ultrafiltrado. O teor de pireno foi estimado como sendo a concentração percentual de pireno encontrado na suspensão de nanocápsulas. A taxa de recuperação do pireno foi estimada como sendo a diferença percentual entre a quantidade inicialmente adicionada e aquela encontrada nas suspensões.

4.2.3.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo pireno

4.2.3.3.1 Avaliação da morfologia das nanocápsulas

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada conforme descrito em 4.2.2.3.1.

4.2.3.3.2 Determinação do tamanho das partículas

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das nanocápsulas foram determinados conforme metodologia descrita em 4.2.2.3.2.

4.2.3.4 Avaliação da distribuição *in vivo* das suspensões de nanocápsulas

Camundongos *Mus musculus*, linhagem Swiss de 5-6 semanas, pesando de 20-25 g foram injetados intravenosamente via seio retro-orbital com 150 μ L de suspensão de nanocápsulas contendo pireno. Em intervalos de tempo, 10, 30 minutos, 1, 3, 6, e 24 horas após a administração, o sangue foi coletado e em seguida os animais foram sacrificados e o pulmão, fígado, baço, timo, coração e sangue foram removidos. *Imprints* destes órgãos foram obtidos em lâminas que, após a completa

secagem, foram visualizadas em microscópio de fluorescência com filtro WV em aumento de 40 e 100 vezes.

4.2.4 Avaliação da eficácia terapêutica das nanocápsulas em modelo de melanoma murino de alto poder metastático

4.2.4.1 Animais experimentais

O projeto deste trabalho foi previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e após ter sido aprovado (Anexo 1) foram iniciados os ensaios *in vivo*. Nestes ensaios foram utilizados camundongos Swiss fêmeas de 60 dias. Para a inoculação das células tumorais por via retro-orbital, os camundongos foram anestesiados previamente em câmara de CO₂, e para coleta de sangue por punção cardíaca, a anestesia foi feita com éter etílico. O sacrifício dos animais em todos os ensaios foi realizado em câmara de CO₂.

4.2.4.2 Preparação das células B16-F10

Para a realização deste estudo foi utilizada a linhagem de melanoma murino B16-F10 de alto poder metastático (POSTE *et al.*, 1980). Esta linhagem foi cedida pelo banco de células do Rio de Janeiro (Bio-Rio), e encontra-se congelada em nitrogênio líquido, no Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, UFSC.

Estas células foram mantidas *in vitro*, em meio de cultura RPMI-1640, tamponado com 2 g/L de HEPES e bicarbonato de sódio suplementado com 10% de soro bovino fetal, glicose, penicilina e estreptomicina, manipuladas em ambiente estéril e armazenadas em incubadora mantida a 37°C com 95% de umidade e 5% de CO₂ (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 1996). As células foram mantidas rotineiramente em garrafas de plástico de 25 cm² (Costar) e foram repicadas quando atingiram a confluência com uma solução contendo tripsina 0,05% (p/V) e EDTA 0,03% (p/V).

Previamente aos ensaios, uma solução contendo tripsina:EDTA (0,05:0,03, p/V) foi acrescentada às células, e as mesmas foram submetidas à centrifugação. O sobrenadante foi descartado e 2,0 mL de tampão PBS pH 7,4 foi acrescentado sobre as células. Uma alíquota de 10 µL da suspensão de células foi transferida para um

ependorf e diluída com 90 μL de PBS pH 7,4. O número de células viáveis foi então avaliado em câmara de Neubauer para a determinação da quantidade de células necessárias para a realização dos ensaios.

4.2.4.3 Estudos preliminares

4.2.4.3.1 Determinação do número de células inoculadas e do tempo dos ensaios *in vivo*

Para otimizar o tempo dos ensaios *in vivo* e o número de células a serem inoculadas, 3 grupos de 18 camundongos cada foram inoculados por via retro-orbital com células tumorais B16-F10, nas concentrações de 5×10^4 , $7,5 \times 10^4$ e 1×10^5 células por camundongo, previamente ressuspensas em PBS. Três camundongos de cada grupo foram sacrificados, em câmara de CO_2 , nos dias 10, 13, 15, 18, 21 e 24 após a inoculação das células. O número de metástases pulmonares foi determinado após a dissecação microscópica e os pulmões foram fixados com solução de formol a 10%.

4.2.4.4 Ensaios de metastase em pulmões

A partir dos resultados obtidos nos estudos preliminares e dos dados encontrados na literatura (CHIRIVI et al, 1994; YOSHIKAWA et al, 2003), foi realizado o ensaio de metástase em pulmões. Oito grupos de camundongos contendo 9 animais cada foram inoculados com células tumorais B16-F10 por via retro-orbital na concentração de 3×10^4 células/camundongo, previamente ressuspensas em PBS. A constituição dos grupos, o modo de administração e a dose utilizada encontram-se demonstrados na Tabela 2.

O fármaco livre foi administrado após a dispersão em um veículo constituído de 0,3% (p/V) de carboximetilcelulose sódica e 0,2% (p/V) de Tween 80 em tampão PBS pH 7,4. Esta mesma solução foi utilizada como veículo, para a administração nos grupos controle negativo e positivo. As suspensões de nanocápsulas brancas e com CPT foram administradas sem um tratamento prévio da suspensão. Os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 , no 17º dia após a inoculação das células. O número de metástases pulmonares foi determinado após a dissecação microscópica e os pulmões foram fixados com solução de formol a 10%.

TABELA 2. Constituição dos grupos, modo de administração, protocolos e doses utilizadas do fármaco para ensaio de metástase em pulmões.

Grupos	Administração retro-orbital	Administração Intraperitoneal	Protocolos de administração (dias)	Dose diária e total de CPT
Controle negativo	-	Veículo	2/5/8/11/14	-
Controle positivo	Células B16-F10	Veículo	2/5/8/11/14	-
Grupo 1	Células B16-F10	Nanocápsulas brancas de PLA	2/5/8/11/14	-
Grupo 2	Células B16-F10	Nanocápsulas brancas de PLA-PEG 49 kD	2/5/8/11/14	-
Grupo 3	Células B16-F10	Nanocápsulas brancas de PLA-PEG 66,6 kD	2/5/8/11/14	-
Grupo 4	Células B16-F10	CPT livre	2/5/8/11/14	0,5 mg/Kg e 2,5 mg/Kg
Grupo 5	Células B16-F10	Nanocápsulas de PLA com CPT	2/5/8/11/14	0,5 mg/Kg e 2,5 mg/Kg
Grupo 6	Células B16-F10	Nanocápsulas de PLA-PEG 49 kD com CPT	2/5/8/11/14	0,5 mg/Kg e 2,5 mg/Kg
Grupo 7	Células B16-F10	Nanocápsulas de PLA-PEG 66,6 kD com CPT	2/5/8/11/14	0,5 mg/Kg e 2,5 mg/Kg

Os resultados obtidos com os camundongos tratados com fármaco livre, com o veículo e com as suspensões de nanocápsulas foram comparados e analisados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo *posthoc* de Bonferroni.

4.2.4.5 Ensaio de toxicidade

Para a realização dos ensaios de toxicidade foi coletado sangue por punção cardíaca de cinco animais de cada grupo. Neste ensaio, os parâmetros hematológicos foram avaliados, por meio da análise dos hemogramas.

4.2.4.5.1 Hemograma

Os hemogramas foram realizados através pela técnica de citometria de fluxo, em um contador hematológico Serono Baker System 9000 dotado de um Hematology Analyser. Este equipamento utiliza o princípio de contagem eletrônica e tipificação baseada na diferença da condutividade entre células sanguíneas e o diluente nas quais elas estão suspensas (impedância e condutividade) para contagem e determinação de tamanho. O teor de hemoglobina foi determinado usando células fotométrica com filtro de 540nm. Os exames laboratoriais foram realizados no setor veterinário do Laboratório Santa Luzia.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas

5.1.1 Estudo preliminar das condições de preparação das nanocápsulas

A nanoprecipitação ou nanodeposição é um processo simples, reprodutível e de fácil escalonamento, amplamente utilizado para a obtenção de suspensões de nanopartículas (COUVREER et al, 2002). Este método consiste na precipitação de um polímero em solução após a adição de um não solvente, geralmente a água. Quando a técnica da nanoprecipitação é utilizada na preparação de nanocápsulas, gotas submicrômicas de um óleo, previamente adicionado à fase orgânica, são formadas e estabilizadas por uma camada de polímero, que se deposita na interface, fornecendo uma barreira mecânica para a coalescência. Misturas de surfactantes hidrofílico e lipofílico são freqüentemente usadas para a redução no tamanho das partículas e para o aumento da estabilidade física da preparação (MOSQUEIRA et al, 2000).

As características estruturais e físico-químicas das partículas, bem como a estabilidade das suspensões de nanocápsulas, têm demonstrado ser grandemente influenciada pela composição das formulações. Por esta razão, várias formulações foram previamente testadas, empregando-se diferentes componentes e proporções, segundo metodologia descrita em 4.2.1.1.1. As suspensões coloidais resultantes foram avaliadas quanto as suas características macroscópicas e de tamanho de partícula, e estes resultados são demonstrados na Tabela 3.

O fenômeno de cremagem foi observado em NC1, NC2 e NC4. Este fenômeno, característico das suspensões instáveis, decorre da diferença de densidade entre as fases dispersa e dispersante da preparação. Além disto, nestas três formulações, observou-se a presença de partículas apresentando os maiores diâmetros e elevados valores de índice de polidispersão, característico de suspensões apresentando mais de uma população ou uma ampla distribuição de tamanho de partícula. Em NC1 e NC2, a presença de diclorometano na fase interna pode ter conduzido à obtenção de suspensões polidispersas, possivelmente devido à formação prévia de uma emulsão com a conseqüente redução da velocidade de eliminação do solvente. Suspensões homogêneas monodispersas, mas apresentando agregados, provavelmente do polímero, foram visualizadas em NC3, NC6 e NC7. Por outro lado, uma suspensão de nanocápsulas de tamanho reduzido, baixo valor de índice de polidispersão, e homogênea foi obtida em NC5. Esta formulação continha uma relação de 40 mg de

polímero (PLA) para 120 μL de benzoato de benzila, sendo estabilizada por 40 mg de Span 80 e 30 mg de Tween 80. As características macroscópicas e de tamanho de partícula desta suspensão foram consideradas satisfatórias e, portanto, esta formulação foi selecionada para o posterior estudo de encapsulação da camptotecina.

Tabela 3. Características macroscópicas e tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas obtidas no estudo preliminar de formulação.

Formulação	Aspecto macroscópico	Tamanho de partícula¹ nm \pm σ (i.p.)
NC1	Cremagem	382,7 \pm 168,7 (0,883)
NC2	Cremagem	350,9 \pm 151,6 (0,750)
NC3	Homogênea com grumos	331,3 \pm 105,1 (0,208)
NC4	Cremagem	368,4 \pm 136,4 (0,308)
NC5	Leitosa, homogênea	254,9 \pm 61,0 (0,100)
NC6	Homogênea com grumos	309,8 \pm 97,1 (0,174)
NC7	Homogênea com grumos	309,0 \pm 75,8 (0,123)

¹Média \pm desvio padrão; entre parênteses: índice de polidispersão (i.p.).

A técnica de difusão do solvente (nanoprecipitação) permite a preparação de nanocápsulas quando um pequeno volume de óleo é incorporado na fase orgânica. São importantes dois aspectos na seleção deste óleo: primeiro, ele não deve degradar o polímero e segundo, deve ser um bom solvente para o fármaco a fim de prevenir a perda decorrente da sua cristalização durante a preparação (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998).

Uma ampla variedade de óleos é disponível para a preparação das suspensões de nanocápsulas, incluindo óleos vegetais e minerais e compostos puros como o benzoato de benzila e o oleato de etila. Assim, a solubilidade da camptotecina em diferentes óleos foi avaliada para assegurar o máximo de encapsulação do fármaco no interior das partículas. Os resultados obtidos na avaliação da solubilidade da camptotecina encontram-se demonstrados na Tabela 4. Como pode ser observado nesta tabela, a solubilidade da camptotecina foi aproximadamente sete vezes maior no benzoato de benzila do que no Miglyol 812 N. Isto pode ser explicado pelo fato do benzoato de benzila ser um óleo mais hidrofóbico, em contraposição ao Miglyol 812 N que em sua composição apresenta triglicérides do ácido cáprico/caprílico, permitindo, portanto, a maior solubilização do fármaco. A maior solubilidade da camptotecina no benzoato de benzila conduziu a sua seleção como o componente oleoso das suspensões de nanocápsulas.

Tabela 4. Solubilidade da camptotecina no benzoato de benzila e no Miglyol 812 N.

	Solubilidade da CPT	
	$\mu\text{g/mL} \pm \sigma$	CV (%)
Benzoato de benzila	$290 \pm 3,03$	1,04
Miglyol 812 N	$41 \pm 0,17$	0,40

5.1.2 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo camptotecina

5.1.2.1 Preparação e caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina

Nanocápsulas são potenciais carreadores de fármacos, com destaque a sua vantagem sobre outros sistemas coloidais no que se refere ao confinamento do

fármaco no interior da cavidade central, que confere uma adequada proteção ao princípio ativo frente à degradação no meio biológico, além de permitir a veiculação de moléculas hidrofóbicas, como a camptotecina.

As suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina foram preparadas conforme descrito em 4.2.2.1. Três tipos de polímeros foram utilizados para a preparação das suspensões; o poli-ácido lático (PLA) e dois poli-ácido lático-co-poli-etilenoglicóis, apresentando massas molares de 45 KD e 66,6 KD e uma relação de PLA:PEG de 80:20 em sua composição. Estes dois últimos polímeros foram utilizados com o objetivo de obter nanocápsulas furtivas. Além da manutenção do anel lactônico da molécula ser fundamental para a atividade antitumoral, a camptotecina na forma lactônica é pouco solúvel em água e, portanto, na preparação das suspensões de nanocápsulas, a fase aquosa foi mantida em valores de pH menores que 5,0.

Vários métodos têm sido descritos para a quantificação da camptotecina por CLAE, envolvendo a determinação de ambas formas (lactônica e carboxilada) e da concentração total do fármaco, empregando-se a absorção no ultravioleta ou a fluorescência para a detecção (WALL e WANI, 1996; DEY e WARNER, 1996; TAKIMOTO et al, 1994). Geralmente, quando soluções neutras de metanol e água são empregadas como fase móvel, a acidificação das amostras conduz ao aparecimento de um único pico, correspondendo à forma lactônica da camptotecina. Nas amostras com valor de pH próximo à neutralidade observa-se o aparecimento de um segundo pico correspondente à forma carboxilada e, para valores de pH acima de 10, unicamente o pico referente à forma carboxilada é visualizado. Uma vez que as suspensões coloidais apresentavam pH ácido, a dissolução das partículas foi realizada com metanol sem posterior ajuste do pH. Uma mistura de metanol e tampão fosfato 10 mM (50:50; v/v) ajustado a pH 2,8 com ácido fosfórico foi empregada como fase móvel. Esta acidificação da fase móvel permite o aumento da sensibilidade de detecção, assim como a obtenção de um pico simétrico (LOH e AHMED, 1990).

A eficiência de encapsulação, teor de fármaco e taxa de recuperação da camptotecina nas suspensões de nanocápsulas foram determinados conforme descrito em 4.2.2.2. Para a elaboração da curva de calibração foram utilizadas soluções de camptotecina em metanol em concentrações de 0,050 até 2,00 µg/mL. Na Tabela 5 encontra-se demonstrado as áreas dos picos obtidas para a camptotecina nas diferentes concentrações. A equação da reta obtida por regressão linear e o

coeficiente de regressão podem ser visualizados na Figura 5. O tempo de retenção da camptotecina nas condições empregadas foi de 6,5 minutos.

A avaliação do coeficiente de regressão calculado evidenciou a existência de um comportamento linear significativo. Os limites de confiança (Tabela 6) do intercepto calculados ficaram entre -994,04 a 2878. Como estes limites incluem o valor zero, é possível concluir a ausência de erro sistemático constante, onde o fator de variação é independente da concentração dos componentes analisados (FUNCK et al, 1992).

Tabela 5. Áreas dos picos obtidas após análise das soluções de CPT padrão por CLAE.

Concentração de camptotecina ($\mu\text{g/mL}$)	Área do pico ($M \pm \sigma$; $n = 3$)	CV (%)
0,050	9429 \pm 464,04	4,92
0,250	22758 \pm 358,29	1,57
0,500	45091 \pm 1011,33	2,24
0,750	72842 \pm 1177,13	1,62
1,000	93937 \pm 1388,60	1,48
1,250	115452 \pm 253,57	0,22
1,500	142688 \pm 1026,81	0,72
1,750	165037 \pm 1863,25	1,13
2,000	190143 \pm 4806,75	2,53

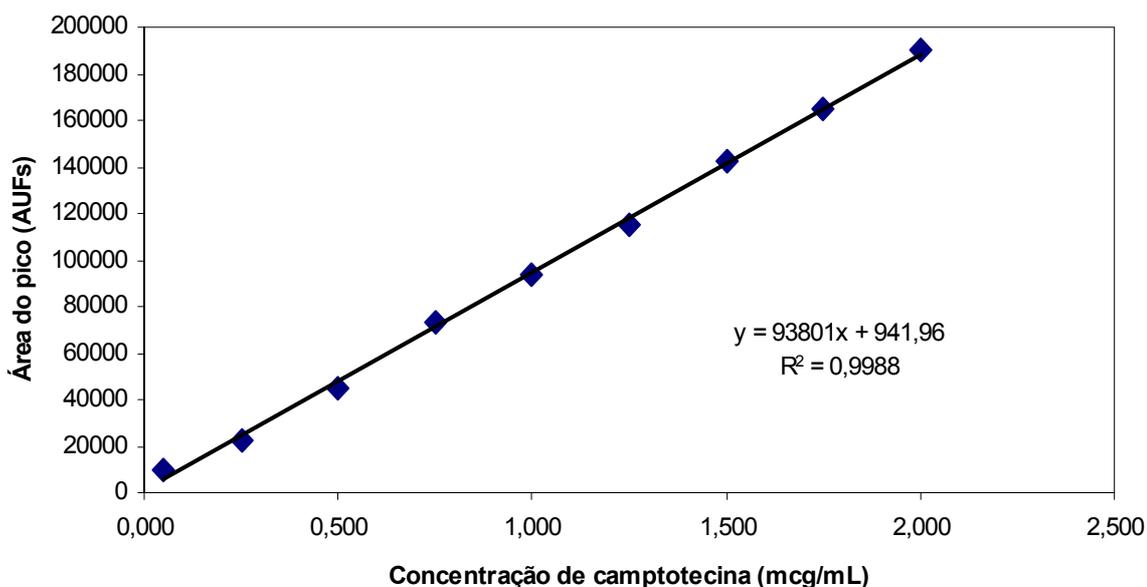


Figura 5. Curva de calibração de CPT obtida por CLAE.

Tabela 6. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração de CPT por CLAE.

Parâmetros de Regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	941,96 (-994,04 a 2878)
Inclinação (intervalo de confiança)	93801 (90884,81 a 96717,19)
R ²	0,9988

A análise dos resíduos, que por sua vez pode ser definida como sendo a diferença entre os valores das áreas dos picos calculados e os encontrados experimentalmente, também fornece informações sobre os dados. Um gráfico de concentração versus resíduo deve apresentar pontos que variam em torno do eixo das abscissas para descartar a presença de tendência dos resultados. A análise dos resíduos, realizada com os dados da curva de calibração da CPT, demonstrou pontos distribuídos em torno do eixo das abscissas, como pode ser visualizado na Figura 6. Assim, a metodologia de CLAE utilizada para a determinação do fármaco foi considerada satisfatória, na faixa de concentração testada.

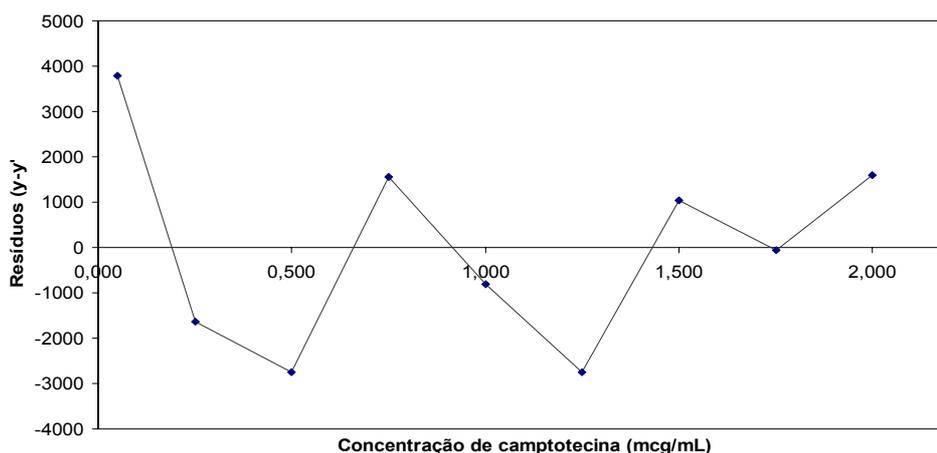


Figura 6. Análise dos resíduos da curva de calibração da camptotecina, obtida por CLAE.

No intuito de otimizar a eficiência de encapsulação e maximizar a taxa de recuperação da camptotecina nas nanocápsulas, foram preparadas várias formulações com quantidades iniciais de fármaco variando entre de 50 a 900 μg .

A eficiência de encapsulação, o teor de fármaco e a taxa de recuperação da camptotecina foram estimados após análise por CLAE das soluções obtidas após ultrafiltração/centrifugação das suspensões (concentração no sobrenadante) e daquelas obtidas após completa dissolução das partículas em metanol (concentração total). As amostras foram analisadas empregando-se uma solução do fármaco na concentração de 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como padrão externo.

A incorporação de fármacos nas nanocápsulas tem demonstrado ser altamente dependente do grau de lipofilia, do pH do meio e, conseqüentemente, da afinidade dos mesmos pelo óleo empregado na preparação. Isto foi verificado em trabalhos onde a eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos nas suspensões de nanocápsulas foi de aproximadamente 100% (AMMOURY et al, 1990; RODRIGUES Jr et al, 1995; MARCHAIS et al, 1998; GUTERRES et al, 2000). Segundo CAUCHETIER e colaboradores (2003), quando se utiliza a técnica da nanoprecipitação são obtidas nanocápsulas com alta capacidade de encapsulação de fármacos lipofílicos de um modo efetivo e reproduzível, devido a sua cavidade central oleosa.

Os valores de eficiência de encapsulação da camptotecina, expressos como sendo a diferença percentual entre a concentração total e aquela encontrada no sobrenadante, encontram-se demonstrados na Tabela 7. Como podem ser

observados, elevados valores de eficiência de encapsulação, variando entre 76 a 97%, foram obtidos nas suspensões preparadas a partir do PLA e PLA-PEG, para todas as quantidades de fármaco inicialmente empregadas. A obtenção destes valores foi igualmente relacionada à grande afinidade do fármaco pelo benzoato de benzila empregado na preparação. Além disso, a manutenção da fase aquosa da formulação em pH 5,0 favoreceu a encapsulação da camptotecina, provavelmente na forma lactônica, pois esta apresenta menor solubilidade aquosa do que a correspondente forma carboxilada.

Tabela 7. Valores de eficiência de encapsulação de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas.

Quantidade inicial de CPT (μg)	Eficiência de encapsulação (%) ($M \pm \sigma$; $n = 3$)		
	PLA	PLA-PEG 49 kD	PLA-PEG 66,6 kD
50	76,80 \pm 6,99	94,12 \pm 2,12	79,49 \pm 5,55
100	80,08 \pm 0,78	92,72 \pm 1,30	79,86 \pm 2,27
300	93,71 \pm 1,71	97,35 \pm 0,43	83,90 \pm 1,74
500	93,86 \pm 1,97	95,45 \pm 3,16	80,52 \pm 5,22
700	87,73 \pm 2,45	95,75 \pm 1,51	92,83 \pm 1,72
900	88,33 \pm 2,52	95,65 \pm 1,29	87,12 \pm 4,74

A taxa de recuperação da camptotecina foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade de fármaco inicialmente adicionado na preparação e aquela encontrada nas suspensões, após análise por CLAE. Conforme pode ser observado na Tabela 8, a taxa de recuperação do fármaco nas suspensões, variou com o tipo de polímero empregado e diminuiu consideravelmente com o aumento da quantidade de camptotecina inicialmente adicionada às formulações. Este resultado pode ser explicado pela eliminação do fármaco em excesso durante a filtração das suspensões, após o limite máximo de encapsulação ter sido alcançado. Valores muito baixos de taxa de recuperação são considerados indesejáveis devido a grande perda de fármaco durante a preparação, justificando assim a necessidade deste estudo prévio de encapsulação. Assim, nas suspensões posteriormente preparadas, a quantidade inicial de camptotecina foi mantida em 300 μg , onde apenas um moderado excesso de fármaco estava presente. Estas suspensões foram caracterizadas e utilizadas no estudo de liberação *in vitro* e no estudo da eficácia terapêutica *in vivo*.

Tabela 8. Valores de taxa de recuperação de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas.

Quantidade inicial de CPT (μg)	Taxa de recuperação (%) ($M \pm \sigma$; $n = 3$)		
	PLA	PLA-PEG 49 kD	PLA-PEG 66,6 kD
50	67,98 \pm 9,55	91,87 \pm 7,01	88,99 \pm 3,63
100	64,04 \pm 5,16	92,72 \pm 1,30	95,07 \pm 4,94
300	50,03 \pm 3,31	88,53 \pm 3,36	36,71 \pm 5,28
500	36,71 \pm 5,28	60,51 \pm 3,16	14,25 \pm 3,07
700	14,25 \pm 3,07	27,02 \pm 9,67	28,75 \pm 4,47
900	8,89 \pm 1,82	21,10 \pm 4,80	14,64 \pm 4,50

Finalmente, o teor de fármaco encontrado, quando a quantidade inicial de CPT foi de 300 μg , foi de 15,01 \pm 0,99 $\mu\text{g/mL}$, 26,56 \pm 1,01 $\mu\text{g/mL}$ e 8,49 \pm 0,33 $\mu\text{g/mL}$ para as suspensões de nanocápsulas preparadas a partir do PLA, PLA-PEG 49 kD e PLA-PEG 66,6 kD, respectivamente.

5.1.2.3 Determinação do diâmetro médio e potencial zeta

O diâmetro médio das nanocápsulas foi determinado por espectroscopia de correlação fotônica, conforme descrito em 4.2.2.3.2. Esta técnica baseia-se no fato de que as partículas movem-se aleatoriamente sob o impacto das moléculas do solvente sobre a sua superfície. A frequência e a amplitude deste movimento, denominado browniano, é dependente do tamanho da partícula e da viscosidade do solvente, ou seja, quanto menor a partícula, maior será a frequência do movimento browniano numa amplitude relativa importante (MALVERN, 2004).

Os resultados obtidos na avaliação do tamanho das partículas das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina são demonstrados na Tabela 9. Populações monodispersas de partículas foram obtidas com a utilização de PLA e PLA-PEG. Além disso, o baixo valor de diâmetro da partícula e de índice de polidispersão obtidos foram considerados aceitáveis. Este último fornece indicações acerca da distribuição granulométrica das mesmas. Valores de índice de polidispersão menores que 0,2 são característicos de suspensões apresentando uma faixa estreita de tamanhos de partícula e/ou monodispersas. Por outro lado, a utilização de copolímeros PLA-PEG conduziu à redução do tamanho das partículas quando comparado ao tamanho daquelas preparadas a partir do PLA. Esta redução no tamanho particular, produzida pela presença da cadeia de PEG covalentemente ligada na superfície das

nanocápsulas, também foi observada por outros autores (TOBIO et al, 1998; AMELLER et al, 2003a), e está provavelmente associada à característica anfifílica do copolímero que conduz à redução da tensão interfacial do sistema.

Nanopartículas possuem carga eletrostática superficial devido à presença de grupamentos químicos do polímero na superfície ou à adsorção preferencial de íons ou de outras moléculas ionizáveis do meio de dispersão aquoso, sendo que a sua intensidade exerce influência na estabilidade física da preparação (MAGENHEIM e BENITA, 1991). O potencial zeta representa a carga da superfície, e depende da natureza da partícula, assim como do meio que a envolve. A carga não pode ser medida diretamente, mas após a aplicação de um campo elétrico em torno dela. As partículas movem-se na presença deste campo elétrico em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o potencial zeta pode ser determinado pela medida da sua velocidade de migração (MALVERN, 2004).

Os valores de potencial zeta das nanocápsulas, determinados conforme descrito em 4.2.2.3.2, situaram-se entre -16,4 a -24,0, como pode ser observado na Tabela 9, sendo que valores mais baixos foram obtidos para as nanocápsulas preparadas a partir do PLA-PEG 49 e 66,6 kD. Isto tem sido explicado, pela presença de grupamentos carboxílicos terminais ionizáveis do PLA na superfície das partículas. No caso das nanocápsulas preparadas a partir dos polímeros peglados tem-se sugerido que o mascaramento de tais grupamentos carboxílicos pelo polietilenoglicol leva à redução da carga superficial das partículas (GREF et al, 1999).

Tabela 9. Valores do diâmetro médio e potencial zeta das nanocápsulas e pH das suspensões de nanocápsulas contendo CPT.

Polímero	Diâmetro Médio (nm)	Índice de polidispersão	pH	Potencial Zeta (mV; $M \pm \sigma$)
PLA	177,3	0,12	4,5	-25,0 \pm 1,0
PLA-PEG 49 kD	148,0	0,12	4,4	- 19,6 \pm 0,8
PLA-PEG 66,6 kD	159,0	0,17	4,5	- 17,9 \pm 1,5

5.1.2.4 Avaliação da morfologia das nanocápsulas

A morfologia das suspensões coloidais, avaliada conforme descrito em 4.2.2.3.1, pode ser visualizada na Figura 7. Partículas esféricas ou levemente ovaladas com diâmetro

em torno de 200 nm podem ser observadas nesta figura. Além disso, é possível visualizar a estrutura característica das nanocápsulas, onde uma membrana polimérica recobre um núcleo interno contendo o fármaco. As micrografias mostram que as partículas obtidas a partir de PLA apresentam uma forma mais regular, sendo mais esféricas que as obtidas a partir de PLA-PEG com diferentes massas molares.



Figura 7. Micrografias obtidas por MET das nanocápsulas de PLA (a) e PLA-PEG 49 kD (b) contendo CPT.

5.1.2.5 Avaliação dos perfis de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas

5.1.2.5.1 Determinação da concentração de camptotecina por espectrofluorimetria

No desenvolvimento de formulações de sistemas coloidais é de grande importância conhecer a extensão e a velocidade com que o fármaco é liberado do carreador. Esta informação pode ser utilizada como dado para o controle de qualidade, para prever o comportamento *in vivo* ou para estudar a estrutura da partícula, assim como o mecanismo de liberação do fármaco a partir do sistema (WASHINGTON, 1989).

Entretanto, previamente aos ensaios de liberação é preciso otimizar e validar um método analítico que permita a quantificação de baixas concentrações do fármaco no

meio de liberação. A camptotecina é caracterizada por apresentar uma forte absorção a 370 nm, conforme indicado pela sua alta absorvidade molar ($19900 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) neste comprimento de onda. Esta molécula também exibe uma forte fluorescência com λ_{max} em aproximadamente 425 nm. Esta característica, aliada à rapidez na determinação do fármaco, fez com que a espectrofluorimetria direta fosse empregada para determinar o teor de camptotecina, na avaliação do seu perfil de liberação a partir das nanocápsulas.

As características espectrais da camptotecina podem ser explicadas com base em sua estrutura. Devido a alta conjugação do anel quinolona, a molécula apresenta uma estrutura planar pelo qual tem-se atribuído o deslocamento do máximo de absorção, com o aumento da polaridade no solvente. A estrutura rígida da molécula também explica a sua alta absorvidade molar e o seu elevado rendimento quântico de fluorescência (DEY e WARNER, 1997). Por outro lado, o espectro de fluorescência da camptotecina também demonstrou ser afetado pelo pH do meio, sendo o máximo de fluorescência deslocado para comprimentos de onda mais longos com o aumento do pH. Este efeito foi relacionado à formação da forma carboxilada do fármaco, caracterizada por apresentar um menor rendimento quântico e maior tempo de vida, devido à perda parcial da rigidez da molécula, ocasionada pela abertura do anel lactônico. A intensidade de fluorescência diminui gradualmente com o aumento do pH, alcançando um mínimo a pH 8,0, pois valores acima deste o fármaco encontra-se predominantemente na sua forma carboxilada.

Portanto, em tampão fosfato pH 7,4 a camptotecina se encontra em ambas as formas, tendo sido determinado a concentração total de fármaco liberado neste meio, empregando-se para isto os valores de áreas obtidos nos espectros de fluorescência. Para a elaboração da curva de calibração foram utilizadas soluções de camptotecina em tampão fosfato pH 7,4, contendo 2% de Tween 80 (p/V), nas concentrações de 0,005 até 0,26 $\mu\text{g/mL}$. Na Tabela 10 encontra-se demonstrado as áreas dos espectros obtidas para camptotecina nas diferentes concentrações. A curva de calibração da camptotecina, a equação da reta obtida pela análise da regressão linear e o coeficiente de correlação podem ser visualizados na Figura 8.

Tabela 10. Áreas dos espectros de fluorescência obtidas a partir da camptotecina após análise das soluções por espectrofluorimetria.

Concentração de camptotecina ($\mu\text{g/mL}$)	Área do espectro $\pm \sigma$ (n=3)	CV (%)
0,005	$0,99 \pm 0,01$	0,06
0,010	$1,98 \pm 0,03$	0,17
0,020	$4,16 \pm 0,02$	0,13
0,060	$11,68 \pm 0,04$	0,14
0,100	$19,13 \pm 0,06$	0,18
0,140	$27,29 \pm 0,03$	0,07
0,180	$34,59 \pm 0,02$	0,04
0,220	$42,28 \pm 0,09$	0,16
0,260	$49,06 \pm 0,09$	0,13

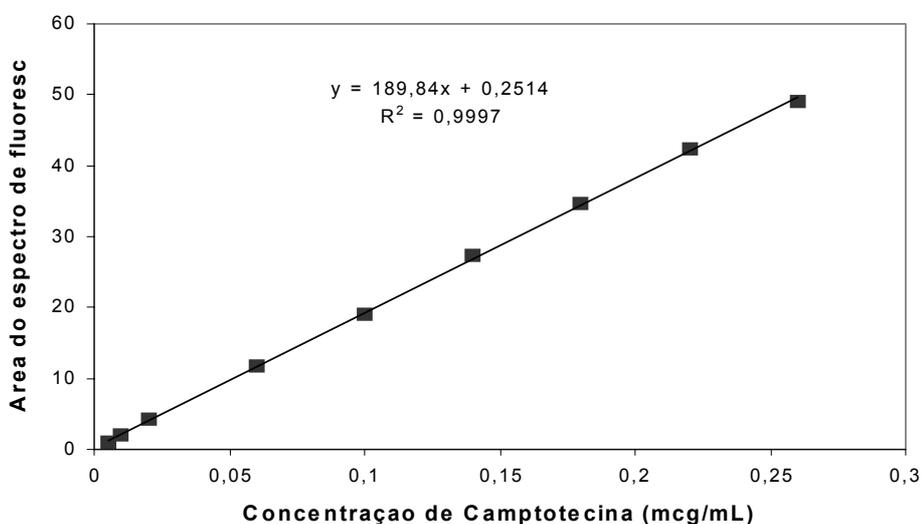


Figura 8. Curva de calibração da camptotecina obtida por espectrofluorimetria direta.

Com objetivo de validar a curva de calibração, foi realizada a análise de regressão linear. Os parâmetros resultantes desta análise estão demonstrados na Tabela 11. A avaliação do coeficiente de regressão evidenciou a existência de um comportamento linear significativo. A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança igualmente demonstraram a ausência de erro

sistemático constante, uma vez que os valores incluíram o zero (Tabela 11). A análise dos resíduos, realizada com os dados da curva de calibração da camptotecina também foi considerada satisfatória, uma vez que os valores de resíduos variaram em torno do eixo das abscissas (Figura 9). Desta maneira, o método de doseamento da camptotecina por espectrofluorimetria, adotada para a avaliação dos perfis de liberação, foi considerada aceitável, na faixa de concentração testada.

Tabela 11. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração da camptotecina por espectrofluorimetria.

Parâmetros de Regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	0,2514 (-0,0096 a 0,5124)
Inclinação (intervalo de confiança)	189,84 (187,66 a 192,02)
R ²	0,9997

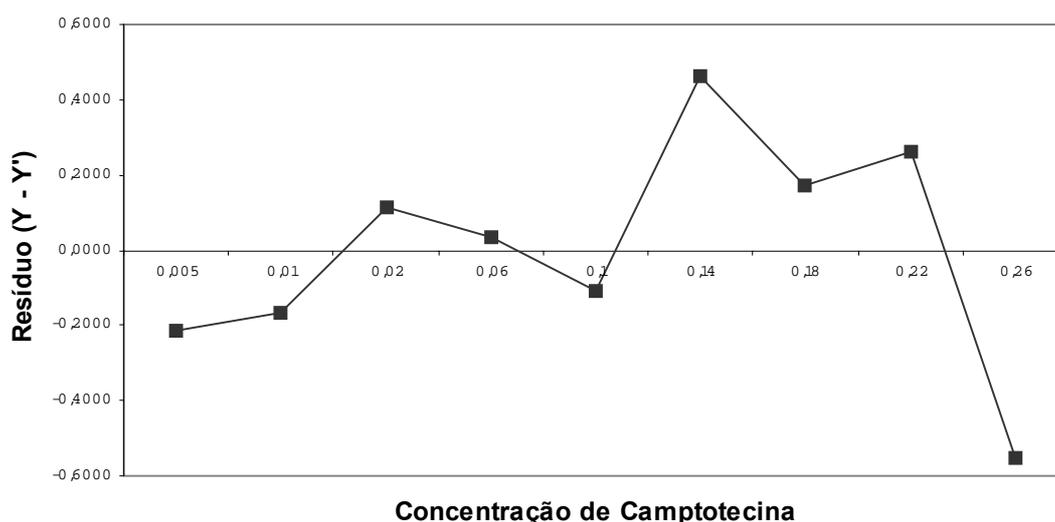


Figura 9. Análise dos resíduos da curva de calibração da camptotecina obtida por espectrofluorimetria.

Medidas do perfil de liberação requerem boas condições *sink*, implicando que a liberação deva ocorrer em grande volume de meio. Esta condição pode ser então definida como uma situação de diluição infinita, onde não há saturação do fármaco no seu meio de liberação (WASHINGTON, 1990). Para os estudos de liberação, tem-se estipulado que a concentração máxima do fármaco no meio deve ser inferior a 10% da sua concentração de saturação (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995). Desta forma a solubilidade do fármaco não atuaria como um fator limitante para a liberação. Assim,

se o fármaco for pouco solúvel em água, é admitido adicionar solventes não aquosos ou agentes solubilizantes para tornar o meio de liberação *sink* (WASHINGTON, 1990).

O perfil de liberação de CPT, a partir de nanocápsulas foi avaliado empregando-se como meio de liberação uma solução tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% (p/v) de Tween 80 como solubilizante. A solubilidade da camptotecina neste meio, determinada experimentalmente, foi de 79 µg/mL (DORA, 2003). Após a liberação da totalidade do fármaco contido nas suspensões, a sua concentração no meio de dissolução corresponderia entre 0,19 e 0,29%, de acordo com a formulação testada, de sua concentração de saturação, tendo sido assim obtidas condições perfeitamente *sink*.

Numerosos métodos têm sido desenvolvidos para caracterizar os perfis de liberação de fármacos a partir de sistemas coloidais dispersos. Entretanto, todos apresentam inconvenientes, sobretudo decorrentes da dificuldade de separar com eficiência e rapidez as partículas da solução onde o fármaco encontra-se dissolvido, visto o tamanho reduzido destes carreadores (MAGENHEIM e BENITA, 1991).

No método da membrana de difusão utilizado neste ensaio, o carreador suspenso em um pequeno volume de fase contínua é separado de um grande volume de fase *sink* por uma membrana de diálise permeável ao fármaco. WASHINGTON (1989) afirma que a cinética do método não é realizada sob perfeitas condições *sink*, uma vez que o carreador coloidal não se encontra diretamente diluído no meio de liberação, mas separado do mesmo por uma membrana. Como resultado, a taxa de liberação do fármaco encontrada na solução de liberação não refletiria seu perfil real de liberação, mas sim o gradiente de concentração entre a fase contínua da dispersão coloidal e o meio. Porém, diferente de outros métodos, não exige etapas de filtração ou centrifugação posteriores, que poderiam induzir a erros no tempo de liberação, tampouco fica restrito a condição do método *in situ*, que exige que apenas o fármaco em solução seja detectado. Portanto, devido à praticidade do procedimento, o método da membrana de diálise foi adotado para a realização dos estudos de liberação.

O estudo de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas de PLA e PLA-PEG foi realizado conforme descrito em 4.2.2.4.3, e os resultados encontram-se demonstrados na Figura 10. Em todas as formulações testadas, a quantidade máxima de camptotecina no meio não ultrapassou 60% da quantidade total de fármaco presente nas suspensões, sendo que unicamente cerca de 20% foi liberado nas

primeiras 5 horas de ensaio. Com o intuito de verificar se a membrana polimérica atuava como barreira, uma solução da camptotecina em meio de liberação, numa concentração correspondente àquela das suspensões (24 µg/mL), foi colocada no interior do saco de diálise e a passagem foi então avaliada nas mesmas condições. A rápida difusão da camptotecina da solução para o meio de liberação, alcançando cerca de 50% nas primeiras 5 horas (Figura 10), sugere que a presença da membrana polimérica retarda a liberação do fármaco.

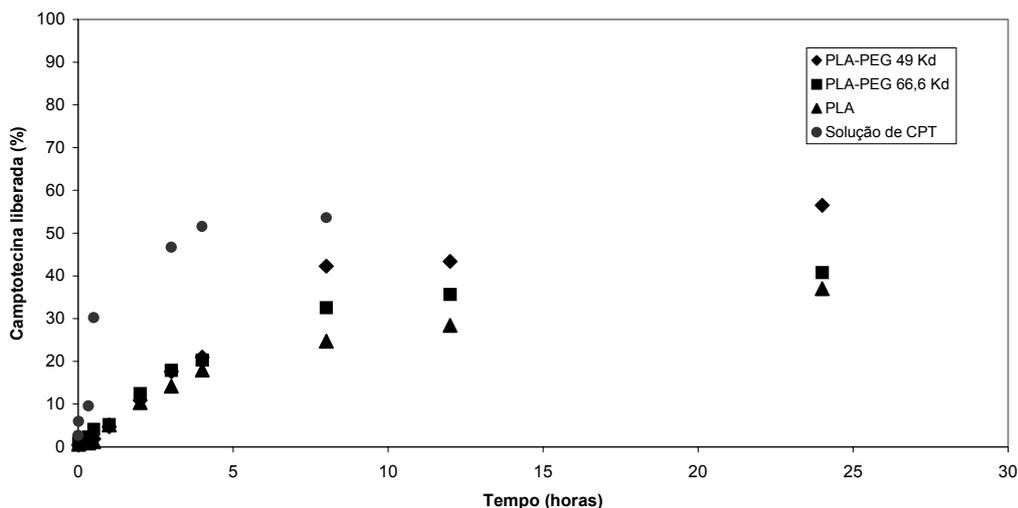


Figura 10. Perfis de liberação da CPT a partir das nanocápsulas e solução do fármaco em tampão fosfato pH 7,4 contendo Tween 2% (p/V).

Finalmente, a análise da variância foi realizada para comparação dos perfis de liberação da CPT a partir das nanocápsulas preparadas com os diferentes polímeros. Para tal, a área sob a curva dos perfis de liberação foi calculada empregando-se o método trapezoidal. Segundo análise estatística, o perfil de liberação não variou significativamente em função do polímero utilizado. O valor de F calculado de 4,426 foi menor que o valor de F tabelado ($F = 5,14$), para um nível de significância de 5% (Tabela 12).

Tabela 12. Análise da variância obtida a partir das áreas sob as curvas dos perfis de liberação da CPT a partir das nanocápsulas.

Causas da variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	$K - 1 = 2$	166536,39	83268,19	4,426
Resíduo	$n - K = 6$	112872,84	18812,14	
Total	$n - 1 = 8$	279409,23		

Fcrítico = $F_{2,6} = 5,14$

Segundo a literatura, a liberação de fármacos a partir das nanocápsulas parece ser governada pelo coeficiente de partição do mesmo entre o núcleo oleoso e o meio aquoso externo (COUVREY et al, 2002). Para verificar a possível presença deste efeito de partição, um estudo de liberação em função do fator de diluição das suspensões foi realizado conforme descrito em 4.2.2.4.3.2. Os resultados deste estudo encontram-se demonstrados na Tabela 13 e Figura 11. O aumento observado na liberação da camptotecina com o aumento da diluição das suspensões indica que a liberação é dependente do volume de meio. Entretanto, na diluição de 100 vezes, cerca de 20 a 30% do fármaco ainda permaneceu retido nas partículas. Além disso, a liberação ocorreu com maior velocidade a partir das nanocápsulas preparadas a partir dos polímeros peglados, talvez em decorrência da maior hidrofília dos mesmos. A diferença observada no percentual de fármaco liberado após diluição de 100 vezes, quando comparado com o estudo de cinética de liberação, ressalta a dificuldade de se obter um método que forneça resultados que representem o real perfil de liberação de fármacos a partir de suspensões coloidais.

Tabela 13. Liberação da CPT a partir das nanocápsulas em função da diluição das suspensões no meio de liberação.

Fator de diluição das suspensões de nanocápsulas	Percentual de CPT liberado (%) (M ± σ; n = 3)		
	PLA	PLA-PEG 49 kD	PLA-PEG 66,6 kD
1:1	34,56 ± 0,15	43,65 ± 0,20	50,73 ± 6,78
1:5	48,41 ± 1,49	65,50 ± 0,73	72,30 ± 2,12
1:10	50,63 ± 0,05	70,00 ± 0,47	77,41 ± 0,77
1:20	64,97 ± 4,71	70,77 ± 1,43	83,48 ± 2,28
1:100	72,73 ± 0,77	72,54 ± 0,66	83,59 ± 1,77

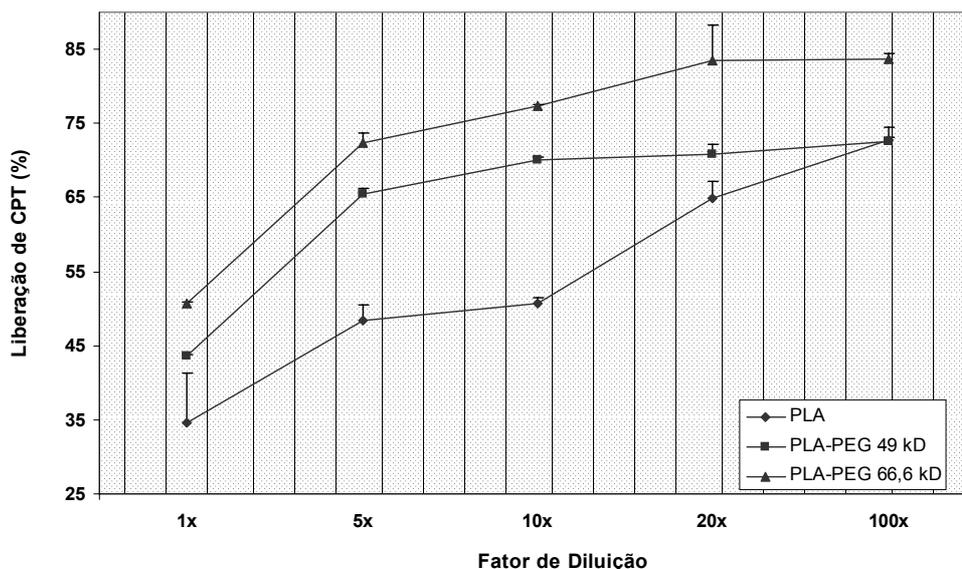


Figura 11. Gráfico de liberação da camptotecina (%) em função da diluição das suspensões em tampão fosfato pH 7,4 contendo tween 2% (p/V), a 37° C.

5.2 Avaliação da distribuição *in vivo* das nanocápsulas de PLA e PLA-PEG

5.2.1 Preparação das suspensões coloidais contendo pireno

O fenômeno da fagocitose é a característica fisiológica mais importante do sistema fagocítico mononuclear (SFM), e é a capacidade de remover rapidamente materiais antigênicos ou tóxicos que, direta ou indiretamente o envolve em numerosas atividades tais como a remoção de fibrina, lipoproteínas, plaquetas agregadas, bactérias e endotoxinas, ou metabolismo de ferro e bilirrubina via ingestão eritrocitária (FERNANDEZ-URRUSUNO et al, 1996).

Quando injetados na circulação sanguínea, sistemas de liberação particulados são rapidamente reconhecidos e removidos da circulação pelo SFM. Muitas estratégias têm sido propostas para evitar a captura destas partículas após a administração. Entre elas, o revestimento das partículas com polietilenoglicóis fornece uma camada hidrofílica, formando uma barreira estérica que impede o reconhecimento das mesmas pelas opsoninas e conseqüentemente diminui sua rápida eliminação do sangue. O efeito protetor da cadeia de PEG e outros polímeros hidrofílicos, tem sido explorado para a estabilização de nanopartículas na circulação sistêmica (CAVALLI et al, 1999).

Uma vez que tais partículas, denominadas furtivas, representam um potencial meio de veicular fármacos em outros tecidos, uma tentativa de verificar o perfil de

distribuição foi realizada usando para tal um marcador fluorescente hidrofóbico como o pireno, para a encapsulação nas nanocápsulas. A utilização de nanopartículas fluorescentes permitiria identificar e localizar estes sistemas após administração intravenosa.

O pireno é uma substância insolúvel em água e bastante solúvel em solventes orgânicos (BUDAVARI, 1989), apresentando uma fraca fluorescência azul, e um espectro apresentando cinco bandas de absorção. Esta substância tem sido utilizada como modelo de substância hidrofóbica na medida da polaridade do meio e na investigação da eficiência de encapsulação em nanopartículas e micelas poliméricas (JEONG et al, 1999; LIU et al, 2003). Assim, suspensões de nanocápsulas contendo pireno foram preparadas conforme descrito em 4.2.3.1.

A espectrofluorimetria direta foi empregada para a determinação do pireno nas suspensões de nanocápsulas. Para a elaboração da curva de calibração foram utilizadas soluções de pireno em metanol, nas concentrações de 40 a 100 ng/mL. Os espectros obtidos após a análise de uma solução padrão e amostra de pireno podem ser observados na Figura 13. Na Tabela 14 encontram-se relacionadas as áreas dos espectros obtidos para o pireno nas diferentes concentrações. A curva de calibração do pireno, da equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de correlação estão demonstrados na Figura 12.

Tabela 14. Áreas dos espectros de fluorescência obtidas a partir do pireno após análise das soluções por espectrofluorimetria.

Concentração de pireno (ng/mL)	Área do espectro $\pm \sigma$ (n=3)	CV (%)
40	1,3752 \pm 0,01	0,52
50	1,7572 \pm 0,07	2,49
60	2,2312 \pm 0,08	2,50
80	2,8952 \pm 0,04	1,02
90	3,2012 \pm 0,06	1,51
100	3,5642 \pm 0,11	2,33

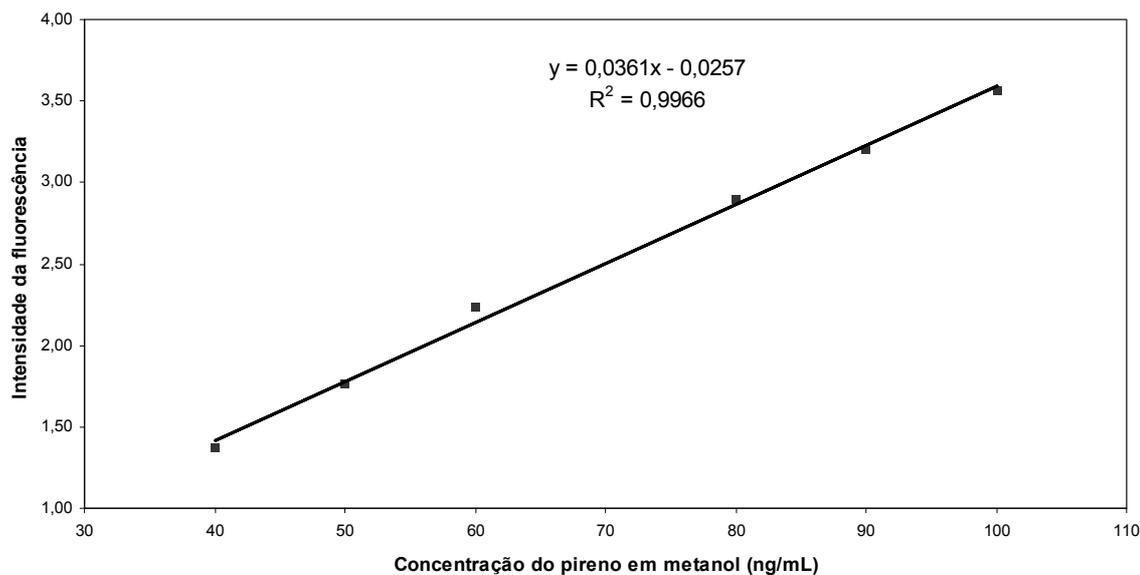


Figura 12. Curva de calibração do pireno obtida por espectrofluorimetria direta.

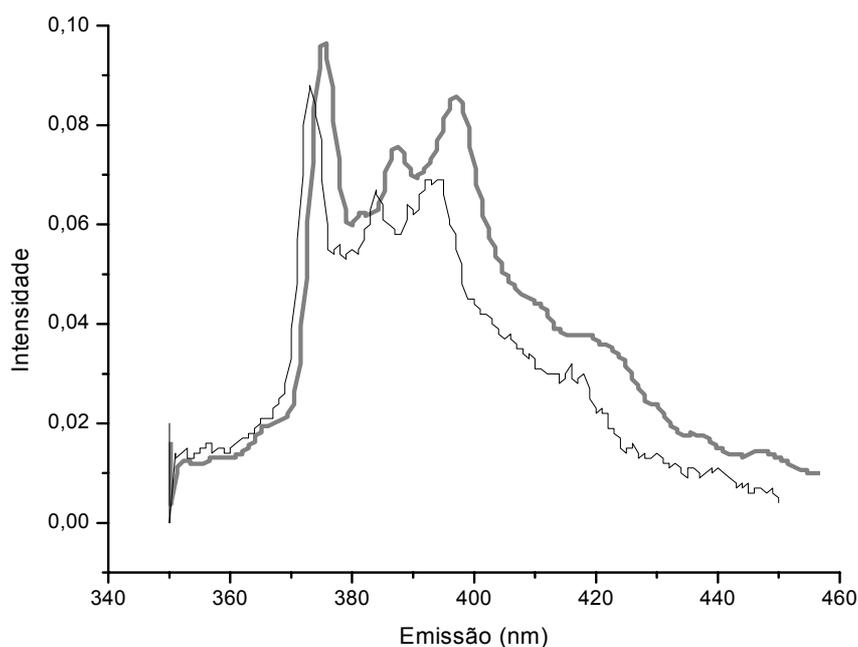


Figura 13. Espectro de fluorescência obtido após a análise da solução de pireno padrão (preto) e amostra (cinza) em metanol.

A validação da curva de calibração (Figura 12) foi realizada pela análise da regressão linear. Os parâmetros resultantes desta análise estão relacionados na Tabela 15. A avaliação do coeficiente de regressão calculado mostrou a existência de um comportamento linear significativo. A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança demonstraram a ausência de erro sistemático,

já que os valores incluíram o zero. A análise dos resíduos, realizada a partir da curva de calibração (Figura 14), foi considerada satisfatória, na faixa de concentração de pireno testada.

Tabela 15. Análise dos dados obtidos a partir da curva de calibração do pireno por espectrofluorimetria.

Parâmetros de Regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	0,0257 (-0,0770 a 0,1284)
Inclinação (intervalo de confiança)	0,0361 (0,0405 a 0,0317)
R ²	0,9966

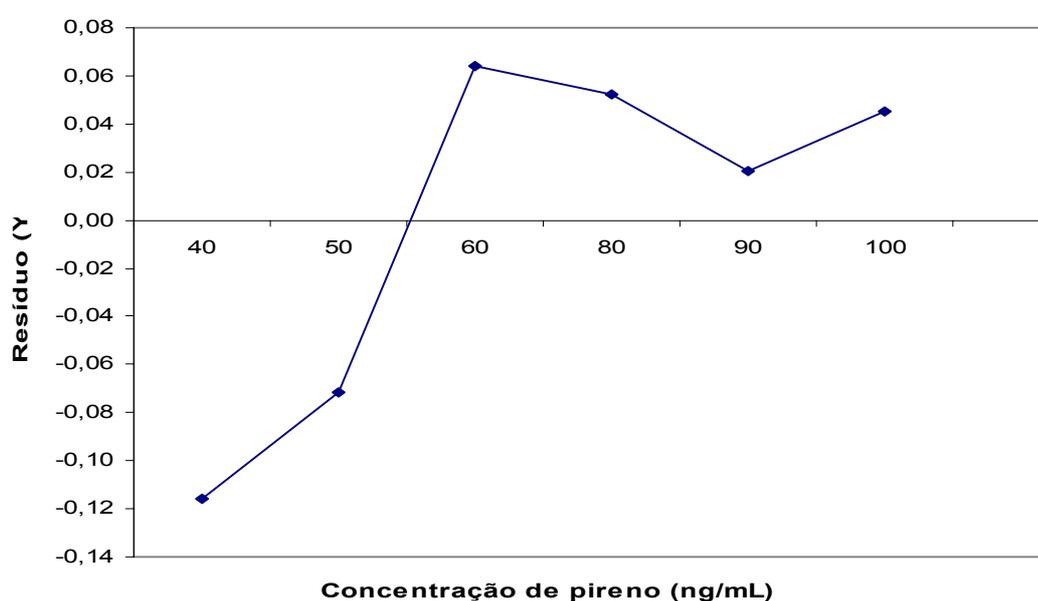


Figura 14. Análise dos resíduos da curva de calibração do pireno obtida por espectrofluorimetria.

Os valores de eficiência de encapsulação e taxa de recuperação do pireno encontram-se demonstrados na Tabela 17. Elevados valores de eficiência de encapsulação foram verificados, podendo ser explicado em função da alta hidrofobicidade desta substância e, conseqüentemente, a sua grande afinidade pela fase oleosa da preparação. Elevadas taxas de recuperação foram também obtidas, para a quantidade inicialmente adicionada à formulação, correspondendo, portanto, a teores variando entre 24 e 27 µg/mL de pireno na suspensão.

Tabela 16. Valores de eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de pireno nas nanocápsulas.

	PLA		PLA-PEG 49 kD		PLA-PEG 66,6 kD	
	(%)	M $\pm\sigma$	(%)	M $\pm\sigma$	(%)	M $\pm\sigma$
Taxa de Recuperação	85,93	90,19 \pm	87,73	86,07 \pm	83,13	81,15 \pm
	93,40	3,14	84,40	1,67	81,10	1,59
	91,23				79,23	
Eficiência de Encapsulação	96,93	98,29 \pm	96,43	98,21 \pm	99,32	98,78 \pm
	100,00	1,28	99,98	1,78	100,00	1,28
	97,95				97,01	

5.2.1.1 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo o pireno

As suspensões de nanocápsulas contendo pireno foram caracterizadas conforme descrito em 4.2.3.3. A micrografia obtida por MET (Figura 15), mostra que a partícula obtida a partir de PLA apresenta uma forma mais regular, sendo mais esférica que aquelas obtidas a partir do PLA-PEG (não demonstradas) de diferentes massas molares. Suspensões coloidais de partículas monodispersas foram evidenciadas após determinação do diâmetro médio das mesmas por espectroscopia de correlação fotônica (Tabela 17). O tamanho das partículas foi igualmente reduzido quando o PLA-PEG foi empregado na preparação, evidenciando novamente o efeito da característica anfifílica deste polímero sobre as propriedades das suspensões coloidais.



Figura 15. Micrografia obtida por MET a partir de suspensão de nanocápsulas contendo pireno.

Tabela 17. Valores do diâmetro médio das nanocápsulas contendo pireno.

Polímero	Diâmetro Médio (nm; $M \pm \sigma$)	Índice de polidispersão ($M \pm \sigma$)
PLA	262,8 \pm 18,2	0,191 \pm 0,06
PLA-PEG 49 kD	168,3 \pm 3,8	0,196 \pm 0,008
PLA-PEG 66,6 kD	166,9 \pm 3,9	0,170 \pm 0,019

5.2.2 Avaliação da distribuição *in vivo* das nanocápsulas

A avaliação da distribuição *in vivo* das nanocápsulas foi realizada após a inoculação das suspensões de nanocápsulas, via retro-orbital, e em tempos estipulados os camundongos foram sacrificados e seus órgãos coletados para a realização dos *imprints* teciduais dos animais.

A Figura 16 demonstra as micrografias obtidas a partir dos *imprints* de fígado e pulmão, após 3 e 1 hora, respectivamente, da inoculação das suspensões de nanocápsulas de PLA contendo o pireno. A fluorescência pôde ser observada com maior intensidade nos órgãos destes animais tratados com nanocápsulas de PLA, do que naqueles tratados com partículas obtidas a partir de PLA-PEG (resultados não demonstrados), corroborando assim, com dados da literatura que indicam que partículas preparadas a partir de polímeros peglados permanecem por maior tempo na circulação sanguínea (GREF et al, 1994; BAZILE et al, 1995). Entretanto estes resultados foram insuficientes para concluir acerca do perfil de distribuição das nanocápsulas *in vivo*, necessitando ainda a realização de ensaios posteriores com marcadores que permitissem a quantificação da fluorescência nestes órgãos.

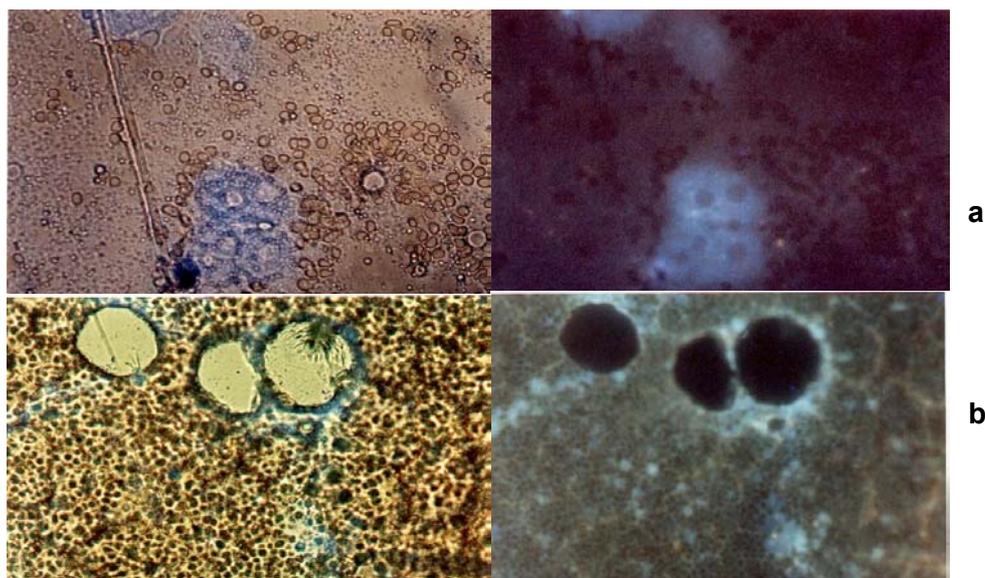


Figura 16. Micrografias obtidas a partir dos *imprints* de (a) fígado após 3 horas e de (b) pulmões após 1 hora da administração de suspensões de nanocápsulas de PLA contendo o pireno.

5.3. Avaliação da eficácia terapêutica das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo CPT

A eficácia terapêutica das nanocápsulas contendo camptotecina foi avaliada em modelo de melanoma murino. Nestes ensaios, foi utilizada a linhagem de células B16-F10 de alto poder metastático, desenvolvida a partir das células B16-F0. Para obtenção desta linhagem, as células de melanoma B16-F10 foram injetadas por via intravenosa em camundongos e, após duas a três semanas, as colônias destas células presentes nos pulmões foram removidas, formando uma cultura denominada B16-F10. Este procedimento foi repetido sucessivamente até a formação das células B16-F10, capazes de produzir significativamente mais metástases pulmonares do que a linhagem inicial. Este aumento no número de metástases está relacionado com a seleção de clones, que resultam num maior número de metástases pulmonares por célula de melanoma injetada (RUDDON, 1995).

A eficácia antitumoral de diversos agentes terapêuticos tem sido avaliada após a inoculação das células B16-F10 e de uma variante destas células, a linhagem B16-BL6 em camundongos isogênicos (CHIRIVI et al, 1994, YOSHIKAWA et al, 2003). A eficácia terapêutica é avaliada pela contagem do número de metástases pulmonares produzidas nos animais tratados com o fármaco antitumoral, comparando-se com o número de metástases produzidas nos animais empregados como controles.

Entretanto, devido à variação do número de células inoculadas por camundongo e dos diferentes períodos utilizados para a realização dos ensaios descritos na literatura, bem como a utilização de camundongos não isogênicos pelo biotério da UFSC, um estudo preliminar foi realizado para otimizar as condições dos ensaios *in vivo*.

5.3.1 Ensaios preliminares

5.3.1.1 Determinação do número de células inoculadas e do tempo dos ensaios *in vivo*

Um estudo preliminar foi realizado com o objetivo de determinar as condições de ensaio *in vivo*, no que diz respeito ao número de células a ser inoculada nos animais e à duração do experimento. Para isto, três grupos contendo 18 animais cada foram inoculados com diferentes concentrações de células conforme descrito em 4.2.4.3.1. Os animais foram sacrificados e as metástases pulmonares foram contadas após dissecação. Conforme demonstrado na Figura 17, o número de metástases formadas pareceu ser afetado pela concentração das células B16-F10, com um maior número de metástases sendo alcançado entre o 10º e o 13º dia após a inoculação, havendo nos três casos uma tendência a diminuir com o tempo. Esta diminuição observada parece estar relacionada com o aparecimento de uma resposta imunológica do animal contra as células tumorais. Por outro lado, após 18 dias de ensaio os pulmões apresentavam coloração escura e os pontos de metástases não puderam ser identificados, devido a uma necrose maciça, com focos hemorrágicos, do tecido pulmonar. Além disso, ocorreram mortes de animais no grupo inoculado com 1×10^5 células entre o 18º e o 24º dia. Diante destes resultados, a concentração de células de 5×10^4 para um tempo de 17 dias de ensaio pareceu ser adequado para a continuidade dos experimentos, tendo sido então selecionado.

A atividade antitumoral da camptotecina tem sido avaliada empregando-se diferentes doses e protocolos de administração. Estudos realizados em camundongos inoculados com células de melanoma BRO demonstraram a inibição do crescimento do tumor com a administração de 4 mg/Kg de CPT duas vezes por semana pela via intramuscular (PANTAZIS et al, 1992). Por outro lado, doses entre 0,5 e 4,0 mg/kg de camptotecina demonstraram uma considerável atividade contra células leucêmicas L1210 e P388, bem como, na inibição de tumores sólidos, incluindo o tumor de Walker WM (WALL e WANI, 1996).

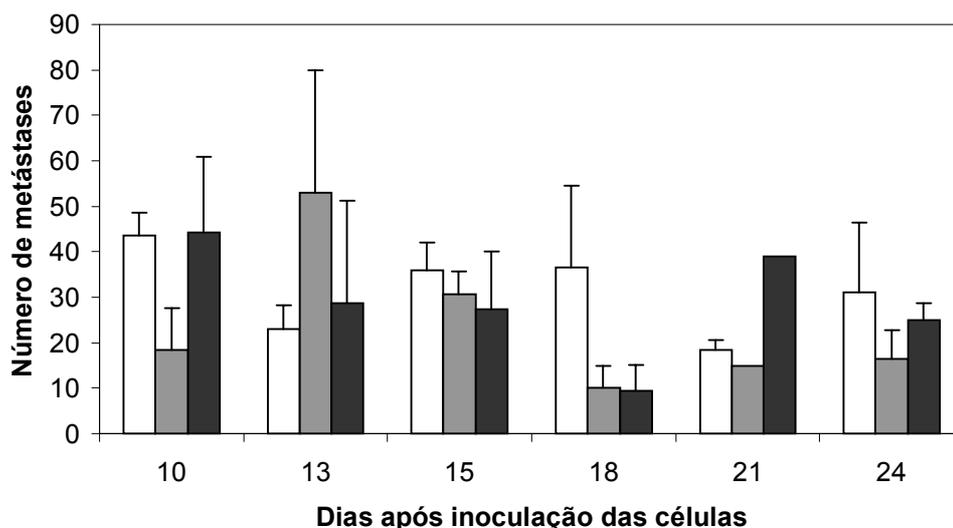


Figura 17. Resultados obtidos na avaliação da duração do ensaio de metástase espontânea em pulmões após a inoculação de 5×10^4 (branco), $7,5 \times 10^4$ (cinza) e 1×10^5 (preto) células B16-F10 a serem inoculadas.

Um importante parâmetro a ser considerado na administração das suspensões coloidais refere-se à relação entre a concentração de fármaco e polímero na preparação, uma vez que a dose da suspensão depende do teor de fármaco encapsulado nas partículas. Como a via intravenosa foi inicialmente visada, as suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina foram concentradas 25 vezes em evaporador rotatório, com o intuito de maximizar a concentração de fármaco e permitir a administração do mesmo na dose de 1,5 - 2,0 mg/kg de animal. Com este procedimento, a concentração de polímero administrada nos animais, na forma de nanopartículas, era cerca de 476 mg/kg.

Entretanto, os ensaios preliminares de metástase espontânea pulmonar demonstraram uma elevada toxicidade das suspensões de nanocápsulas preparadas a partir do PLA, ocorrendo a morte de praticamente todos os animais antes do final do experimento. Este resultado foi posteriormente explicado por meio de relatos da literatura. PLARD e BAZILE (1999) demonstraram que a administração de suspensões de nanopartículas de PLA, em doses correspondentes a 440 e 220 mg/kg de polímero, foram tóxicas, ocorrendo elevada mortalidade, alterações hematológicas tais como redução da contagem de trombócitos, aumento do tempo de protrombina e do tempo de tromboplastina parcial ativada, além do aumento da atividade das aminotransferases. Sinais clínicos como dispnéia e redução da atividade motora e a presença de pulmões hemorrágicos foram observados. Estes resultados foram relacionados com a saturação do sistema fagocítico monocuclear (SFM), que conduziu

a maior exposição às proteínas plasmáticas, tais como os componentes da coagulação. Assim, a toxicidade das suspensões foi atribuída à coagulação intravascular disseminada em decorrência da interação das partículas de PLA com a trombina e o fator V. Esta toxicidade não foi observada após a administração de partículas de PLA-PEG, uma vez que elas não ativam nem o sistema complemento, nem a cascata da coagulação.

Diante dos resultados, as suspensões de nanocápsulas foram concentradas unicamente 3 vezes, correspondendo a quantidade de polímero, administrado na forma de partículas, de cerca de 57 mg/kg. A dose de camptotecina foi 0,5 mg/kg e a via intraperitoneal foi então utilizada, pois permitiria a administração de um volume maior de preparação.

Por outro lado, pontos de necrose maciça foram observados após a inoculação de 5×10^4 células, em todos os grupos tratados, inclusive no grupo referente ao controle positivo. Isto foi atribuído ao menor peso dos animais empregados, fazendo que a concentração de células B16-F10 fosse reduzida para 3×10^4 , nos ensaios posteriores.

5.3.2 Ensaio de metástases em pulmões

Neste estudo, foi avaliado o número de metástases pulmonares produzidas nos animais tratados com as suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina, comparando-se com o número de metástases produzidas nos animais tratados com o fármaco livre e com os controles, segundo protocolo e grupos descritos em 4.2.4.4. Os resultados de atividade antitumoral obtidos após administração da camptotecina livre e suspensão de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG, assim como o número de óbitos e a variação do peso dos animais no final dos experimentos, podem ser visualizados na Tabela 18. Na Figura 18 encontra-se demonstrado a fotografia dos pulmões dos camundongos após a realização do ensaio de metástase em pulmões.



FIGURA 18. Fotografia dos pulmões dos camundongos após a realização do ensaio de metástases espontânea em pulmões.

Conforme observado na Tabela 18, o número de metástases pulmonares pareceu ser reduzido em todos os grupos tratados com a camptotecina. Entretanto, o número de metástases foi significativamente reduzido após a administração de nanocápsulas de PLA-PEG 49 kD contendo CPT em relação à administração do fármaco livre, para um nível de significância 5% ($p < 0,05$). Além disso, a significância estatística também foi observada após a administração de nanocápsulas de PLA-PEG 49 e 66,6 kD contendo camptotecina, em relação ao controle positivo ($p < 0,001$). A maior eficácia produzida pelas nanocápsulas de camptotecina preparadas a partir de polímeros peglados pode estar relacionada com a redução da captura das partículas pelos macrófagos no peritônio, tornando o fármaco mais disponível para atingir os tumores.

Estas partículas também poderiam atingir a circulação sistêmica, via circulação linfática, em maior concentração. Além disso, a redução do número de metástases pulmonares proporcionada pela administração das suspensões de PLA-PEG 49 kD, em relação ao fármaco livre, pode estar relacionada à manutenção da forma lactônica da camptotecina nas partículas.

TABELA 18. Atividade antitumoral da CPT livre e das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG administradas a cada 3 dias, em modelo de melanoma murino de alto poder metastático na dose de 0,5 mg/kg.

Grupos	Número de metástases pulmonares (M ± σ)	Número de óbitos ^(a)	Varição de peso (%; M ± σ) ^(b)
Controle negativo	0	0	123,89 ± 2,03
Controle positivo	14,57 ± 2,23	1	106,21 ± 0,73
Suspensão de CPT	8,00 ± 1,41	2	117,51 ± 1,72
Suspensão de nanocápsulas brancas de PLA	7,40 ± 7,40** ^{ββ}	3	109,64 ± 0,87
Suspensão de nanocápsulas brancas de PLA-PEG 49 kD	9,00 ± 6,56	3	99,01 ± 1,19
Suspensão de nanocápsulas brancas de PLA-PEG 66,6 kD	9,67 ± 5,61***	3	106,99 ± 0,99
Suspensão de nanocápsulas de PLA/CPT	5,75 ± 2,12	0	96,67 ± 1,71
Suspensão de nanocápsulas de PLA-PEG 49 kD/CPT	1,20 ± 1,64 ^{αα βββ}	3	103,87 ± 0,92
Suspensão de nanocápsulas de PLA-PEG 66,6 kD/CPT	1,60 ± 1,52 ^{βββ}	3	103,51 ± 1,03

A significância estatística foi avaliada pela ANOVA seguida do *posthoc* de Bonferroni: p<0,001*** e p<0,05 ** vs controle negativo, p<0,001^{βββ} e p<0,05^{ββ} vs controle positivo, p<0,05^{αα} vs dispersão de CPT.

^(a) Número total de óbitos após 17 dias de ensaio.

^(b) Determinado em relação ao peso inicial do animal, após 17 dias de ensaio.

Por outro lado, nos animais tratados apenas com suspensão de nanocápsulas brancas, foi verificado também uma pequena redução no número de metástase, que pode ser explicada pela resposta imunológica dos animais às partículas injetadas, contribuindo assim na redução das metástases. O fator de necrose tumoral (TNF-α), uma proteína que exibe efeitos biológicos importantes, tais como citotoxicidade direta contra várias classes de tumor, ativação da resposta imune antitumoral e indução de necrose hemorrágica de certos tumores sólidos, pode estar envolvida nesta resposta imunológica (LI et al, 2001). Embora esta proteína possa ter atuado na redução de metástases em alguns animais, em três deles do grupo tratado com suspensões de nanocápsulas brancas de PLA-PEG 49 kD e dois do grupo de animais tratados com suspensões de nanocápsulas brancas de PLA-PEG 66,6 kD, ocorreram uma hemorragia difusa nos pulmões, o que inviabilizou a contagem de metástases nestes animais, podendo ter causado desvios nos resultados observados.

Uma vez que nos estudos preliminares foi visualizada uma redução no peso dos camundongos, o peso dos animais de todos os grupos testados foi determinado ao longo deste experimento. A variação de peso dos animais dos grupos controles, bem como dos grupos que receberam o fármaco livre, as suspensões de nanocápsulas sem fármaco (brancas) e as suspensões de nanocápsulas com camptotecina, encontra-se demonstrada na Figura 19. O percentual de variação de peso obtido no final dos ensaios pode ser observado na Tabela 18. Embora a perda de peso não tenha sido significativa nos vários grupos, com os animais que permaneceram até o final do experimento, ela foi mais importante nos animais que foram a óbito, sendo que esta variação foi mais pronunciada nos animais tratados com a camptotecina livre (76,70%), do que nos grupos tratados com CPT encapsulada (87,18; 87,67 e 86,05% para suspensões de nanocápsulas de PLA, PLA-PEG 49 kD e PLA-PEG 66 kD respectivamente).

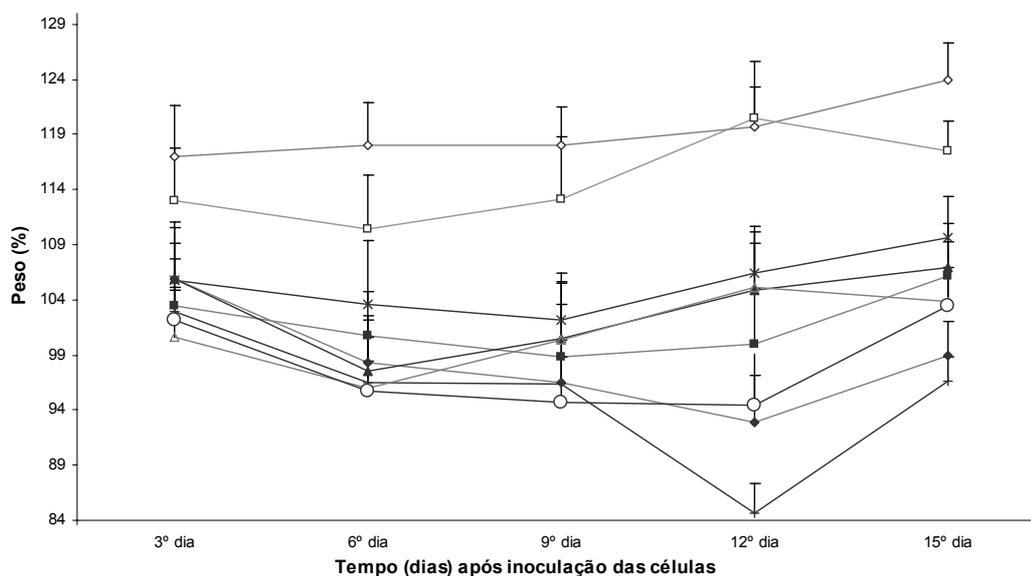


FIGURA 19. Avaliação da perda de peso dos camundongos tratados durante o ensaio de metástase em pulmões. Controle negativo (◇), controle positivo (■), dispersão de CPT livre (□), suspensão de nanocápsulas brancas de PLA (X), suspensão de nanocápsulas de PLA-PEG 49 kD (◆), suspensão de nanocápsulas brancas de PLA-PEG 66,6 kD (▲), suspensão de nanocápsulas de PLA com CPT (I), suspensão de nanocápsulas de PLA-PEG 49 kD com CPT (Δ), suspensão de nanocápsulas de PLA-PEG 66,6 kD com CPT (O).

5.3.3 Ensaio de toxicidade

Dora (2003) observou, durante os ensaios *in vivo*, a presença de efeitos tóxicos, como perda de peso e diarreia, além da elevada mortalidade dos animais

tratados com o fármaco livre, com a administração de doses de 28 e 35 mg/kg. A toxicidade da camptotecina tem sido demonstrada ser dependente do protocolo e da via de administração, e a mielossupressão ocasionada principalmente pela neutropenia severa foi o efeito tóxico dose limitante para a maioria dos protocolos testados, mas muitos outros distúrbios, tais como cistite hemorrágica, trombocitopenia e diarreia, foram também observados (SLICHENMYER e VON HOFF, 1990).

Com objetivo de comparar a toxicidade produzida pela administração da camptotecina na forma livre e nas suspensões de nanocápsulas, hemogramas dos animais foram obtidos conforme descrito em 4.2.4.5. No hemograma, vários parâmetros são avaliados. As hemácias ou eritrócitos são os mais numerosos elementos do sangue e servem como veículo para a hemoglobina que possui a função de transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos e dióxido de carbono no sentido inverso (FAILACE, 2003). O valor do hematócrito ou volume globular médio reflete a massa eritrocitária total na unidade de volume do sangue. Entre os índices eritrocíticos, o volume corpuscular médio (VCM) refere-se ao volume médio dos eritrócitos, sendo estimado a partir dos resultados obtidos no hematócrito e na contagem de eritrócitos, e a hemoglobina corpuscular média (HCM) corresponde ao conteúdo de hemoglobina por eritrócito e é calculado a partir da concentração de hemoglobina e do número de eritrócitos. A concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) corresponde à concentração de hemoglobina num dado volume de eritrócitos compactados sendo calculada a partir da concentração de hemoglobina e do hematócrito e o RDW representa o coeficiente de anisocitose dos eritrócitos, ou seja, o coeficiente de variação do tamanho dos eritrócitos. Todos esses parâmetros estão classificados dentro da série vermelha do hemograma e são muito utilizados no estudo de todos os tipos de anemias (LEE, 1998; BEUTLER, 2001).

Os leucócitos são conhecidos como os elementos figurados brancos do sangue e desempenham papel essencial no mecanismo de defesa do organismo. Eles são divididos em três grandes classes: (i) granulócitos, (ii) linfócitos e (iii) monócitos. Os neutrófilos, basófilos e eosinófilos fazem parte da classe dos granulócitos e se distinguem pela afinidade de seus grânulos para corantes neutros, básicos e ácidos, sendo que os neutrófilos são os leucócitos mais numerosos e uma redução do seu número é denominada neutropenia (FAILACE, 2003).

As plaquetas contribuem para a hemostasia, principalmente pela propriedade que possuem de aglutinar e aderir a rupturas vasculares, tamponando a ferida, ao

mesmo tempo em que liberam substâncias de ação vasoconstritora. A deficiência do número de plaquetas é conhecida por trombocitopenia e caracteriza uma maior propensão a casos de hemorragias (LEE, 1998; BEUTLER, 2001).

Os resultados dos hemogramas dos animais são demonstrados na Tabela 19, juntamente com os valores de referência. Como podem ser observados, os valores obtidos na contagem de hemácias, no teor de hemoglobina e no hematócrito situaram-se dentro da faixa dos valores de referência. Além disso, apesar de uma aparente redução da contagem de neutrófilos nos hemogramas do controle positivo, esta redução não foi estatisticamente significativa, devido a grande variabilidade nos valores obtidos nos grupos. Por outro lado, a neutropenia não foi observada nos grupos tratados com a camptotecina livre ou encapsulada, diferentemente dos resultados obtidos por Dora (2003). Este resultado pode ser justificado pela menor dose de fármaco administrada nos animais, que com o protocolo testado correspondeu à dose total de 2,5 mg/kg, ou seja, cerca de 10 a 15 vezes menor àquelas administradas por Dora (2003). Finalmente, uma elevação do número de plaquetas (trombocitose) ao invés de trombocitopenia, foi observada nos grupos tratados com suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo o fármaco, situando-se todos os valores fora da faixa de referência. No entanto, a trombocitose também foi verificada após a administração das suspensões de nanocápsulas brancas, podendo ser sugerido que este efeito ocorreu devido à administração intraperitoneal das partículas em suspensão, com conseqüente produção de um processo inflamatório.

TABELA 19. Resultados obtidos nos hemogramas após tratamento dos animais com camptotecina livre e com as suspensões de nanocápsulas.

	Valores de referência	Controle (-)	Controle (+)	Dispersão de CPT	Suspensão de nanocápsulas brancas de PLA	Suspensão de nanocápsulas brancas de PLA-PEG 49 kD	Suspensão de nanocápsulas brancas de PLA-PEG 66,6 kD	Suspensão de nanocápsulas com CPT de PLA	Suspensão de nanocápsulas com CPT de PLA-PEG 49 kD	Suspensão de nanocápsulas com CPT de PLA-PEG 66,6 kD	
Eritrócitos											
Hemácias (milhões/mm³)	7,0 ± 12,5	7,31 ± 0,33	7,28 ± 0,31	7,64 ± 0,63	7,48 ± 0,44	8,63 ± 1,18	7,01 ± 0,70	7,00 ± 0,47	7,45 ± 0,49	7,12 ± 0,17	
Hemoglobina (g/dL)	10,2 ± 0,9	12,22 ± 0,92	12,35 ± 0,53	12,24 ± 1,21	13,16 ± 0,45	14,60 ± 1,90	11,95 ± 0,75	12,00 ± 0,74	11,78 ± 0,86	12,63 ± 0,29	
Hematócrito (%)	39 ± 49	37,86 ± 1,72	38,95 ± 2,68	38,44 ± 2,83	38,86 ± 3,15	44,00 ± 4,92	36,00 ± 3,73	35,82 ± 2,29	36,46 ± 2,98	36,88 ± 1,34	
VCM (fl)	-	51,78 ± 0,53	53,50 ± 2,89	50,58 ± 4,70	51,86 ± 1,27	51,48 ± 5,85	51,93 ± 0,58	51,84 ± 2,66	49,02 ± 3,27	51,83 ± 2,48	
HCM (Pg)	-	16,74 ± 0,93	16,98 ± 0,40	16,16 ± 2,12	17,62 ± 0,7	17,02 ± 1,94	17,13 ± 0,76	17,14 ± 0,46	15,90 ± 1,60	17,73 ± 0,13	
CHCM (g/dL)	-	32,28 ± 2,10	31,78 ± 1,11	31,80 ± 1,54	34,02 ± 1,86	33,38 ± 3,85	32,98 ± 1,34	33,50 ± 0,83	32,40 ± 2,05	34,28 ± 1,48	
RDW (%)	-	22,96 ± 0,60	17,20 ± 4,37	23,90 ± 1,57	20,42 ± 3,31	22,62 ± 1,14	21,43 ± 4,45	20,64 ± 3,08	23,20 ± 4,46	22,93 ± 1,11	
Leucócitos											
Leucócitos (mm³)	6000 – 15000	6580 ± 1273	6750 ± 2379	10120 ± 331	5520 ± 1596	7460 ± 1316	4825 ± 1035	7940 ± 3047	6540 ± 902	6750 ± 2225	
Neutrófilos (%)	10 – 40	25,80 ± 29,88	9 ± 4,30	32,00 ± 29,91	42,20 ± 28,77	25,40 ± 3,93	18,75 ± 2,28	16,20 ± 4,12	20,60 ± 7,68	23,50 ± 6,34	
Eosinófilos (%)	0 – 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Linfócitos (%)	55 – 95	73,20 ± 29,42	89,75 ± 4,09	67,20 ± 29,40	57,60 ± 28,84	73,40 ± 4,18	80,00 ± 1,58	83,60 ± 4,22	78,40 ± 8,31	76,25 ± 6,46	
Monócitos (%)	0,1 – 3,5	0,81 ± 0,75	1,25 ± 1,64	0,80 ± 0,98	0,20 ± 0,40	0,60 ± 0,49	1,25 ± 0,83	0,20 ± 0,40	1,00 ± 0,55	0,25 ± 0,43	
Plaquetas	Contagem (x10⁶, mm³)	0,8 – 1,1	0,692 ± 0,58	0,857 ± 0,30	1,108 ± 0,30	1,331 ± 0,13	1,465 ± 0,12	1,243 ± 0,52	1,572 ± 0,24	1,252 ± 0,37	1,563 ± 0,14

6. CONCLUSÕES

- A preparação de suspensões coloidais de nanocápsulas contendo camptotecina, a partir do poli-ácido lático (PLA) e poli-ácido lático-co-poli-etilenoglicol (PLA-PEG) 49 e 66,6 kD, pela técnica de deposição interfacial do polímero, mostrou-se viável.
- A forma lactônica da camptotecina foi provavelmente mantida na preparação pela acidificação da fase aquosa das suspensões em valores de pH menores que 5,0.
- A técnica empregada conduziu à obtenção de partículas esféricas monodispersas apresentando diâmetro médio de 177,3, 148 e 159 nanômetros, e potencial zeta de -25,0, -19,6 e -17,9, para as suspensões preparadas a partir do PLA, PLA-PEG 49 e PLA-PEG 66,6 kD, respectivamente.
- A eficiência de encapsulação da camptotecina nas nanocápsulas foi elevada, variando entre 76 a 97%, devido à grande afinidade deste fármaco hidrofóbico pela componente oleoso da preparação. Por outro lado, a taxa de recuperação do fármaco nas suspensões, variou com o tipo de polímero empregado e diminuiu consideravelmente com o aumento da quantidade de camptotecina inicialmente adicionada às formulações. O teor de fármaco nas suspensões variou entre 8,5 e 26,5 µg/mL, para uma quantidade de fármaco inicialmente empregada de 0,300 mg.
- Os perfis de liberação da camptotecina pela técnica de difusão através da membrana demonstraram que apenas cerca de 60% do fármaco contido nas nanocápsulas foi liberado após 24 horas. No entanto, o ensaio de liberação do fármaco em função do fator de diluição das suspensões indicou que a liberação é governada por um fenômeno de partição.
- Suspensões de nanocápsulas contendo pireno como um marcador fluorescente foram preparadas a partir do PLA e PLA-PEG 49 e 66,6 kD, pela técnica de nanoprecipitação, e elevados valores de eficiência de encapsulação e taxa de recuperação foram obtidos para esta substância.
- A técnica empregada conduziu a obtenção de partículas esféricas monodispersas apresentando diâmetro médio de 262,8, 168,3 e 166,9 nanômetros para as suspensões preparadas a partir do PLA, PLA-PEG 49 e PLA-PEG 66,6 kD, respectivamente.
- As fotografias obtidas em microscópio de fluorescência a partir de *imprints* de pulmão e fígado, após 1 e 3 horas da administração de suspensões de nanocápsulas de PLA contendo pireno, demonstrou a presença de partículas nestes órgãos, corroborando com dados da literatura. Entretanto, os resultados obtidos a partir deste estudo foram insuficientes para concluir acerca da distribuição das nanocápsulas de PLA e PLA-PEG *in vivo*.
- As suspensões de nanocápsulas foram concentradas 25 vezes para a obtenção de elevados teores de camptotecina na preparação. Entretanto, a administração intravenosa de altas concentrações de nanocápsulas de PLA foram tóxicas, o que foi evidenciado pela presença de dispnéia, pulmões hemorrágicos, e elevada taxa de mortalidade dos animais. Este resultado

confirma a alta interação destas partículas com as proteínas plasmáticas, o que não ocorreu com as partículas de PLA-PEG.

- A inoculação de 3×10^4 células nos camundongos e a duração do ensaio de 17 dias foram consideradas satisfatórias para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, devido à produção de um número adequado de metástases pulmonares passíveis de serem contadas.
- A administração de camptotecina livre e encapsulada por via intraperitoneal pareceu reduzir o número de metástases pulmonares após a inoculação de 3×10^4 células B16-F10. Entretanto, a significância estatística foi observada após a administração de suspensões de nanocápsulas de PLA-PEG 49 kD, em relação ao fármaco livre, e após a administração de suspensões de nanocápsulas de PLA-PEG 49 e 66,6 kD, em relação ao controle positivo.
- A perda de peso não foi significativa nos animais tratados com a camptotecina livre e encapsulada. Esta perda foi maior nos animais que foram a óbito tratados com o fármaco livre, do que aqueles tratados com as suspensões de nanocápsulas.
- A análise dos hemogramas dos camundongos não evidenciou toxicidade hematológica, nem nos animais tratados com CPT livre, nem nos animais tratados com as suspensões de nanocápsulas, podendo ser relacionado à baixa dose de fármaco administrada.
- A administração de suspensões de nanocápsulas de PLA-PEG demonstrou ser mais eficaz mesmo em baixas doses de camptotecina, podendo este resultado ser correlacionado a menor captura das partículas pelos macrófagos e/ou seu maior alcance na circulação sistêmica.
- A maior eficácia das suspensões de PLA-PEG 49 kD em relação ao fármaco livre pode estar associada à manutenção da camptotecina na forma lactônica na preparação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, T.M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 13, p. 285-309, 1994.
- ALVAREZ-SILVA, M., TRENTIN, A. G. Undersulfation of proteoglycans reduces the proliferation of leukemia cell in vitro. *Brazilian Journal of Medical Research*, v. 29, p. 1239-1242, 1996.
- AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; BARRATT, G.; RENOIR, J. M. Polyester-poly(ethylene glycol) pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization proprietes. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 7, p. 1063-1070, july 2003 b.
- AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; RENOIR, J. M. *In vitro* and *in vivo* biologic evaluation of long-circulating biodegradable drug carriers loaded with pure antiestrogen RU. *International Journal of Cancer*, v. 106, p. 446-454, 2003 a.
- AMMOURY, N.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F.; BENITA, S. In vitro release kinetic pattern of indomethacin from poly(D,L-Lactide) nanocapsules. *Journal of Pharmaceutics Sciences*, v. 79, n. 9, p. 763-767, september 1990.
- ANELLI, A.; ANELLI, T. Fundamentos em quimioterapia antineoplásica. In: AYOUB, A.; FRIAS, M.; BARROS, M.; KOBAYASHI, R. *Bases da Enfermagem em Quimioterapia*. São Paulo: Lemar, 2000. p. 35-54.
- BANKER, S. G.; RHODES, C. T. *Modern Pharmaceutics*. New York: Marcel Dekker, 1996.
- BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *CMLS Celular and Molecular Life Sciences*, v. 60, p. 21-37, 2003.
- BAZILE, D.; PRUD'HOMME, C.; BASSOULLET, M. T.; MARLARD, M.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M. Stealth me.PEG_PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 84, n. 4, p. 493-498, april 1995.
- BAZILE, D.V.; ROPERT, C.; HUVE, P.; VERRECCHIA, T.; MARLARD, M.; FRYDMAN, A.; VEILLARD, M.; SPENLEHAUER, G. Body distribution of fully biodegradable [¹⁴C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials*, v. 13, n. 15, p. 1093-1102, 1992.
- BECKER, S. Functions of the human mononuclear phagocyte system (a condensed review). . *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 2, p. 1-29, 1988.
- BENOIT, J. P.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. P.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. Les formes « vectorisees » ou a « distribution modulle », nouveaux systemes d'administration des medicaments. *Journal de Pharmacie Belgique*, v. 41, n. 5, p. 319-329, 1986.
- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 21, p. 167-223, 2001.
- BEUTLER, E. (Ed). *Williams Hematology*. 6° ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

- BHADRA, D.; BHADRA, S.; JAIN, P.; JAIN, N. K. Pegnology: a review of PEG-ylated systems. *Pharmazie*, v. 57, n. 1, p. 5-29, January, 2002.
- BOURDON, O.; MOSQUEIRA, V.; LEGRAND, P.; BLAIS, J. Acomparative study of cellular uptake, localization and phototoxicity of *meta*-tetra(hydroxyphenyl) chlorine encapsuled in surface-modiefed submicronic oil/water carriers in HT29 tumor cells. *Journal of Photochemical and Photobiology B: Biology*, v. 55, p. 164- 171, 2000.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 631-65, 2002.
- BUDAVARI, S. (Ed). *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 11^a th ed. New York: Bocca Raton, 1989.
- BURKE, T. G.; MI, Z. The structural basis of camptothecins interactions with human serum albumin: impacto on drug stability. *Journal Medicinal Chemistry*, v. 37, p. 40-46, 1994.
- BURKE, T. G.; MISHRA, A. K. Lipid bilayer partitioning and stability of camptothecin drugs. *Biochemistry*, v. 32, p. 5352-5364, 1993.
- BURKE, T. G.; MUNSHI, C. B.; MI, Z.; JIANG, Y. The important role of albumin in determining the relative human blood stabilities of the camptothecin anticancer drugs. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 84, p.518-519, 1995.
- CALVO, M. P. S. *Desarrollo de nuevos sistemas coloidales y su aplicacion em la administracion topica ocular de medicamentos*. 1995, p. 91-100. Tese (Doutorado em Farmácia) – Departamento de Farmacologia, Farmácia y Tecnologia Farmacêutica, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.
- CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A. ; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules : influence of the nature the polymer on their in vitro characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, p. 273-281, 2003.
- CAVALLI, R.; BOCCA, C.; MIGLIETA, A.; CAPUTO, O.; GASCO, M. R. Albumin adsorption on stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *S. T. P. Pharma Sciences*, v. 9, n. 2, p. 183-189, 1999.
- CHIANNILKULCHAI, N.; AMMOURY, N.; CAILLOU, B.; DEVISSAGUET, J. PH. ; COUVREUR, P. Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M 5076 metastasis-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 26, p. 122-126, 1990.
- CHIRIVI, R., GAROFALO, A., CRIMMIN, M. J., BAWDEN, L., STOPPACCIARO, A., BROWN, P. D., GIAVAZZI, R. Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *International Journal of Cancer*, v. 58, p. 460-464, 1994.
- CHORNY, M.; FISHBEIN, I.; DENENBERG, H. D.; GOLOMB, G. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release*, v. 83, p. 389-400, 2002.

- CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; MAIETTI, A.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 159, p. 95-103, 1997.
- CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Liposomes, micelles and microemulsions as new delivery systems for cytotoxic alkaloids. *PSTT*, v. 2, n. 7, p. 288-298, July 1999.
- COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology : a review. *Critical Reviews™ in Therapeutic Carrier Systems*, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.
- DELLACHERIE, E.; GREF, R.; QUELLEC, P. Les nanosphères « furtives » comme nouvelles formes galéniques injectables : espoirs et réalités. *Médecine/Sciences*, v. 17, n. 5, p. 619-626, 2001.
- DEY, J.; WARNER, I. M. Spectroscopic and photophysical studies of the anticancer drug: Camptothecin. *Journal of Luminescence*, v. 71, p. 105-114, 1997.
- DEY, J.; WARNER, I.M. Excited state tautomerization of camptothecin in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v.101, p.21-27, 1996.
- DORA, C. L. *Preparação, caracterização e avaliação da eficácia terapêutica de microesferas de camptotecina preparadas a partir da poli-ε-caprolactona*. Florianópolis, 2003. 101 f. Dissertação (mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina.
- ERTL, B.; PLATZER, P.; WIRTH, M.; GABOR, F. Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery and stabilization of camptothecin. *Journal of Controlled Release*, v. 61, p. 305-317, 1999.
- EMERSON, D. L. Liposomal delivery of camptothecins. *PSTT*, v. 3, n. 6, p. 205-209, June 2000.
- FAILACE, R. *Hemograma*. 4º ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- FASSBERG, J.; STELLA, V. J. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. *Journal of Pharmaceutics Sciences*, v. 81, n. 7, p. 676- 684, July 1992.
- FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R.; FATTAL, E.; RODRIGUES Jr, J. M.; FÉGER, J.; BEDOSSA, P.; COUVREUR, P. Effect of polymeric nanoparticle administration on the clearance activity of the mononuclear phagocyte system in mice. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 31, p. 401-408, 1996.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, R1-R4, 1989.

- FRANK, M. M.; FRIES, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology Today*, v. 12, n. 9, p. 322-326, 1991.
- FUNCK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. Weinheim: VHC, 1992.
- GALLARDO, M.; COUARRAZE, G.; DENIZOT, B.; TREUPEL, L.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate. *International Journal of Pharmaceutics*, v.100, p. 55-64, 1993.
- GARCIA-CARBONERO, R.; SUPKO, J. G. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clinical Cancer Research*, v. 8, p. 641-661, march 2002.
- GREENWALD, R. B.; CHOE, Y. H.; MCGUIRE, J.; CONOVER, C. D. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, p. 217-250, 2003.
- GRAF, R., DOMB, A.; QUELLEC, P.; BLUNK, T.; MÜLLER, R. H.; VERBAVATZ, J. M.; LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 16, p. 215-233, 1995.
- GRAF, R., LÜCK, M.; QUELLEC, P.; MARCHAND, M.; DELLACHERIE, E.; HARNISCH, S.; BLUNK, T.; MÜLLER, R. H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG) : influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 18, p. 301-313, 2000.
- GRAF, R.; MINATAKE, Y.; PERACCHIA, M. T.; TRUBETSKOY, V.; TORCHILIM, V., LANGER, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, v. 263, p. 1600-1603, 1994.
- GRAF, R.; MIRALLES, G.; DELLACHERIE, E. Polyoxyethylene-coated nanospheres : effect of coating on zeta potential and phagocytosis. *Polymer International*, v. 48, p. 251-256, 1999.
- GUPTA, P. K. Drug targeting in cancer chemotherapy: a clinical perspective. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 79, n. 11, p. 949-962, november, 1990.
- GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac : I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v.113, p. 57-63, 1995 a.
- GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Delivery*, v. 7, p. 195-199, 2000.

- HATEFI, A.; AMSDEN, B. Camptothecin delivery methods. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n. 10, p. 1389-1399, october 2002.
- HERBEN, V. M. M., HUININK, W. W. B.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H. Clinical pharmacokinetics of camptothecin topoisomerase I inhibitors. *Pharmacy World & Science*, v. 20, n. 4, p. 161-172, 1998.
- HERTZBERG, R. P.; CARANFA, M.J.; HOLDEN, K. G.; JAKAS, D. R.; GALLAGHER, G.; MATTERN, M. R.; MONG, S. M.; BARTUS, J. O.; JOHNSON, R. K.; KINGSBURY, W. D. Modification of hydroxyl lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 32, p. 715-720, 1989.
- HUBBARD, S. M. Cancer Treatment. In: JOHNSON, L. B.; GROSS, J. *Handbook of oncology Nursing*. New York: A Wiley Medical Publication, 1985, cap. 2, p. 21-65.
- INCA – Ministério da Saúde. Câncer. Disponível em:
<<http://www.inca.gov.br/cancer/cancer.html>>. Acesso: Maio de 2004.
- JEON, S. I.; ANDRADE, J. D. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. II. Effect of protein size. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 142, n. 1, p. 159-166, march 1, 1991.
- JEON, S. I.; LEE, J. H.; ANDRADE, J. D.; DE GENNES, P. G. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 142, n. 1, p. 149-158, march 1, 1991.
- JEONG, Y. I.; NAH, J. W.; LEE, H. C.; KIM, S. H.; CHO, C. S. Adriamycin release from flower-type polymeric micelle based on star-block copolymer composed of poly(γ -benzyl-L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 188, p. 49-58, 1999.
- KEHRER, D. F. S.; SOEPENBERG, O.; LOOS, W. J.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Modulation of camptothecin analogues in the treatment of cancer: a review. *Anti-Cancer Drugs*, v.12, p.89-105, 2001.
- KIM, C. K.; LIM, S. J. Recent progress in drug delivery systems for anticancer agents. *Archives of Pharmacal Research*, v. 25, n. 3, p. 229-239, 2002.
- KONG, G.; BRAUN, R. D. DEWHIRST, M. W. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Research*, v. 61, p. 3027-3032, april 1, 2001.
- KUMAR, V.; KANG, J.; HOHL, R. Improved dissolution and citotoxicity of camptothecin incorporated into oxidizes-cellulose microspheres prepared by spray drying. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 6, p.459-467, 2001.
- LEE, R. (Ed). *Wintrobe Hematologia Clínica*. São Paulo: Manole LTDA, 1998.
- LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. *S.T.P. Pharma Sciences*, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

- LENAERTS, V.; LABIB, A.; CHOUINARD, F.; ROUSSEAU, J.; ALI, H. ; VAN LIER, J. Nanocapsules with a reduced liver uptake : targeting of phthalocyanines to EMT-6 mouse mammary tumour in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 41, n. 1, p. 38-43, 1995.
- LI, Y. P.; PEI, Y. Y.; ZHOU, Z. H.; ZHANG, X. Y. ; GU, Z. H.; DING, J. ; ZHOU, J. J.; GAO, X. J.; ZHU, J.H. Stelth polycyanocrylate nanoparticles as tumor necrosis factor- α carriers: pharmacokinetics and anti-tumor effects. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v. 24, n. 6, p. 662-665, 2001.
- LIU, X. M.; YANG, Y. Y. ; LEONG, K. W. Thermally responsive polymeric micellar nanoparticles self-assembled from cholesteryl end-capped random poly(*N*-isopropylacrylamide-co-*N,N*-dimethylacrylamide): syntesis, temperature-sensitivity, and morphologies. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 266, p. 295-303, 2003.
- LIVOLSI, V. A.; MERINO, M. J.; BROOKS, J. S. J.; SAUL, S. H.; TOMASZEWSKI, J. E. *The national medical series for independent study. Pathology*. 3^a ed. Philadelphia: Harwal Publishing, 1994.
- LOH, J. P.; AHMED, A. E. Determination of camptothecin in biological fluids using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, v. 330, p. 367-375, 1990.
- LUNDBERG, B. B. Biologically active camptothecin derivatives for incorporation into liposome bilayers an lipid emulsions. *Anticancer Drug design*, v. 13, p. 453-461, 1998.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *S.T.P. Pharma Sciences*, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.
- MAGENHEIM, B.; LEVY, M. Y.; BENITA, S. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers – ultrafiltration technique at low pressure. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 94, p. 115-123, 1993.
- MAKINO, K.; OHSHIMA, H.; KONDO, T. Mechanism of hydrolytic degradation of poly(L-lactide) microcapsules: effects of pH, ionic strength and buffer concentration. *Journal of Microencapsulation*, v. 3, n. 3, p. 203-212, 1986.
- MALLERY, S. R.; SHERENDOVA, A.; PEI, P.; BEGUM, S.; CIMINIERI, J. R.; WILSON, R. F.; CASTO, B. C.; SCHULLER, D. E.; MORSE, M. A. Effects of 10-HCPT, delivered from locally injectable poly(lactide-co-glycolide) microspheres, in a murine human oral squamous cell carcinoma regression model. *Anticancer Research*, v.21, p.1713-1722, 2001
- MALVERN INSTRUMENTS. Disponível em:
<<http://www.malvern.co.uk/labeng/products/iwtm/zeta.html>>. Acesso: Julho de 2004.
- MARCHAIS, H.; BENALI, S.; IRACHE, J. M.; THARASSE-BLOCH, C. ; LAFONT, O. ; ORECCHIONI, A. M. Entrapment efficiency and initial release of phenilbutazone from nanocapsules prepared from different polyesters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, n. 9, p. 883-888, 1998.

- MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Progress Polymers Sciences*, v. 23, p. 563-580, 1998.
- MI, Z. Reduced albumine binding promotes the stability and activity of topotecan in human blood. *Biochemistry*, v. 34, 13722-13728, 1995.
- MIRANDA, D.; RIBEIRO, G. M. Patologia do Câncer. In: MURAD, A. M.; KATZ, A. *Oncologia. Bases clínicas do tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, cap. 3. p. 21-30.
- MIURA, H.; ONISHI, H.; SASATSU, M.; MACHIDA, Y. Antitumor characteristics of methoxypolyethyleneglycol-poly(DL-lactic acid) nanoparticles containing camptothecin. *Journal of Controlled Release*, v. 97, p. 101-113, 2004.
- MOERTEL, C. G.; SCHUTT, A., J.; REITEMERER, R. G.; HAHN, R. G. Phase II study of camptotecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Chemotherapy Reports*, v. 56, p. 95, 1972.
- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. *Critical Reviews™ in Therapeutic Carrier Systems*, v. 18, n. 6, p. 527-550, 2001.
- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews*, v. 53, n. 2, p. 283-318, 2001.
- MONTASSER, I.; BRIANÇON, S.; LIETO, J.; FESSI, H. Méthodes d'obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques. *Journal de Pharmacie Belgique*, v. 55, n. 6, p. 155-167, 2000.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GREF, R.; HEURTAULT, B.; APPEL, M.; BARRAT, G. Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly(D,L-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol). *Journal of Drug Targeting*, v. 7, n. 1, p. 65-78, 1999.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; MORGAT, J. L.; VERT, M.; MYSIKINE, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J. P.; BARRAT, G. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: Effects of PEG chain length and density. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 10, p. 1411-1419, october 2001.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutics Sciences*, v. 89, n. 5, p. 614-626, may 2000.
- MUGGIA, F. M.; CREAVER, P. J.; HANSON, H. H.; COHEN, M. C.; SELAWRY, O. S. Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptotecin (NCS-100880): correlation and preclinical studies. *Biochemistry*, v. 56, p. 515-521, 1972.

- MURAS, A. G.; SANTOS, V. A. Descrição das Drogas Quimioterápicas In: AYOUB, A.; FRIAS, M.; BARROS, M.; KOBAYASHI, R. *Bases da Enfermagem em Quimioterapia*. São Paulo: Lemar; 2000. p. 62-109.
- PANTAZIS, P.; HINZ, H.R.; MENDOZA, J.T.; KOZIELSKI, A.J.; WILLIAMS, L.J.; STEHLIN, J.S.; GIOVANELLA, B.C. Complete inhibition of growth followed by death of human malignant melanoma cells *in vitro* and regresión of human melanoma xenografts in immunodeficient mice induced by camptothecins. *Cancer Research*, v. 52, p. 3980-3987, 1992.
- PERACCHIA, M. T.; FATTAL, E.; DESMAËLE, D.; BERNARD, M.; NOËL, J. P.; GOMIS, J. M.; APPEL, M.; d'ANGELO, J.; COUVREUR, P. Stealth® PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *Journal of Controlled Release*, v. 60, p. 121-128, 1999 b.
- PLARD, J. P.; BAZILE, D. Comparison of the safety profiles of PLA₅₀ and Me.PEG-PLA₅₀ nanoparticles after single dose intravenous administration to rat. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 16, p. 173-183, 1999.
- POSTE, G.; DOLL, J.; HART, I. R.; FIDLER, I. J. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Reseach*, v. 40, p. 1636-1644, 1980.
- POTINENI, A.; LYNN, D. M.; LANGER, R.; AMIJI, M. M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(β -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive biodegradable system for paclitaxel delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 86, p. 223-234, 2003.
- POTMESIL, M. Camptothecins: from bench research to hospital wards. *Cancer Research*, v. 54, p. 1431-1439, march 15, 1994.
- PRIEL, E.; AFLALO, E.; CHECHELNITSKY, G.; BENHARROCH, D.; ABOUD, M.; SEGAL, S. Inhibition of retrovirus-induced disease in mice by camptothecin. *Journal of Virology*, v. 67, p. 3624-3629, 1993.
- PRISTA, N. L.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 5ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.
- PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. Vectorisation et vecteurs de médicaments. *S.T.P. Pharma*, v. 5, n. 2, p. 107-113, 1989.
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- RESZKA, R.; BECK, P.; FICHTNER, I.; HENTSCHEL, M.; RICHTER, J.; KREUTER, J. Body distribution of free, liposomal and nanoparticle-associated mitoxantrone in B16-melanoma-bearing mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 280, n. 1, p. 232-237, 1997.

- ROBBINS. *Patologia estrutural e Funcional*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RODRIGUES Jr, J. M.; FESSI, H.; BORIES, C.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Primaquine-loaded poly(lactide) nanoparticles : physicochemical study and acute tolerance in mice. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 126, p. 253-260, 1995.
- RUDDON, R. W. *Cancer biology*. 3^a ed. New York: Oxford University Press, 1995.
- SINHA, B. K. Topoisomerase Inhibitors. A review of their therapeutic potential in cancer. *Drugs*, v. 49, n. 1, p. 11-19, 1995.
- SHENDEROVA, A.; BURKE, T.G.; SCHWENDEMAN, S.P. Stabilization of 10-hydroxycamptothecin in poly (lactide-co-glycolide) microspheres delivery vehicles. *Pharmaceutical Research*. v.14, n 10, p.1406- 1414, 1997.
- SLICHENMYER, W. J.; ROWINSKY, E. K.; DONEHOVER, R. C.; KAUFMANN, S. H. The current status of camptotecin analogues as antitumor agents. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 85, n. 4, p. 271-291, february 17, 1993.
- SLICHENMYER, W. J.; VON HOFF, D. D. New natural products in cancer chemotherapy. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 30, p. 770-778, 1990.
- SOLIMANDO, D. A.; BRESSLER, L. R.; KINTZEL, P. E.; GERACI, M. C. *Drug Information Handbook for Oncology*. 2^o ed. Hudson: Lexi-Comp, 2000.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.
- STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Long circulating microparticulate drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 16, p. 195-214, 1995.
- SUN, S. Y.; HAIL, N. J.; LOTAN, R. Apoptosis as novel target for cancer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 96, n. 9, p. 662-671, may 5, 2004.
- TAKIMOTO, C. H.; KLECKER, R.W.; DAHUT, W.L.; YEE, L.K.; STRONG, J.M.; ALLEGRA, C.J.; GREM, J.L. Analysis of the active lactone form of 9-aminocamptothecin in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 655, p. 97-104, 1994.
- TAKIMOTO, C. H.; WRIGHT, J.; ARBUCK, S. G. Clinical applications of the camptothecins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1400, p. 107-119, 1998.
- THIES, C. Dispersed systems for parenteral administration. In: ROSOFF, M. *Controlled release drugs polymers and aggregate systems*. New York: VCH Publishers, 1989, cap. 3, p. 97-123.
- THOMPSON, J.; STEWART, C. F.; HOUGHTON, P. J. Animals models for studying the action of topoisomerase I targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1400, p. 301-319, 1998.

- TOBIO, M.; GREF, R.; SANCHEZ, A.; LANGER, R.; ALONSO, M. J. Stealth PLA-PEG as protein carriers for nasal administration. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 2, p. 270-275, 1998.
- TYNER, K. M.; SCHIFFMAN, S. R. ; GIANNELIS, E. P. Nanobiohybrids as delivery vehicles for camptothecin. *Journal of Controlled Release*, v. 95, p. 501-514, 2004.
- ULUKAN, H.; SWAAN, P. W. Camptothecins. A review of their chemotherapeutic potential. *Drugs*, v. 62, n. 14, p. 2039-2057, 2002.
- VITTAZ, M.; BAZILE, D.; SPENLEHAUER, G.; VERRECCHIA, T. ; VEILLARD, M. ; PUISIEUX, F. ; LABARRE, D. Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials*, v. 17, p. 1575-1581, 1996.
- VILA JATO, J. L. (Ed.) *Tecnologia Farmacêutica: Aspectos fundamentais dos sistemas farmacêuticos e operações básicas*. Madrid: Ed.Sintesis, 1997.
- WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 239-254, 1996.
- WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, v. 46, n. 4, p. 351-360, agosto 2002.
- WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 58, p. 1-12, 1990.
- WASHINGTON, C. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 56, p. 71-74, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:
<<http://www.who.int/cancer/en.html>>. Acesso: Maio de 2004.
- YANG, S. C.; LU, L. F.; CAI, Y. ; ZHU, J. B. ; LIANG, B. W. ; YANG, C. Z. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *Journal of Controlled Release*, v. 59, p. 299-307, 1999a.
- YANG, S. C.; ZHU, J. B.; LU, L. F.; LIANG, B. W. ; YANG, C. Z. Body distribution of camptothecin of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 5, p. 751-757, 1999b.
- YOSHIKAWA, N.; NAKAMURA, K.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Effect of PKC412, a selective inhibitor of protein kinase C, on lung metastasis in mice injected with B16 melanoma cells. *Life Sciences*, v. 72, p.1377-1387, 2003.
- YUAN, F. Transvascular drug delivery in solid tumors. *Seminars in Radiation Oncology*, v. 8, n. 3, p. 164-175, July, 1998.
- ZALIPSKY, S. Funcionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, v. 6, n. 2, p. 150-165, 1995.

- ZHANG, L.; HU, Y.; JIANG, X.; YANG, C. ; LU,, W. ; YANG, Y. H. Camptothecin derivative-loaded poly(caprolactone-co-lactide)-b-PEG-b-poly(caprolactone-co-lactide) nanoparticles and their biodistribution in mice. *Journal of Controlled Release*, v. 96, p. 135-148, 2004.
- ZUFIA, L.; ALDAZ, A.; GIRALDEZ, J. Separation methods for camptothecin and related compounds. *Journal of Chromatography B*, v. 764, p. 141-159, 2001.
- ZUNINO, F.; DALLAVALLE, S.; LACCABUE, D.; BERETTA, G. ; MERLINI, L. ; PRATESI, G. Current status and perspectives in the development of camptothecins. *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, p. 2505-2520, 2002.