

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

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IN VITRO  
ANTILEUCÊMICA DE NANOCÁPSULAS DE CAMPTOTECINA CONVENCIONAIS  
E FURTIVAS.**

**ANDRÉA GRANADA FERREIRA**

**FLORIANÓPOLIS ,  
2007**

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

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IN VITRO  
ANTILEUCÊMICA DE NANOCÁPSULAS DE CAMPTOTECINA CONVENCIONAIS  
E FURTIVAS.**

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

**ANDRÉA GRANADA FERREIRA**

**FLORIANÓPOLIS ,**  
**2007**

# “Preparação, Caracterização e avaliação da atividade antileucêmica in vitro de nanocápsulas de camptotecina convencionais e furtivas”.

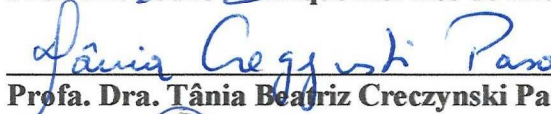
POR

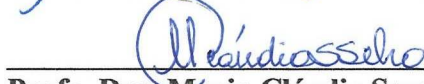
## Andréa Granada Ferreira


Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

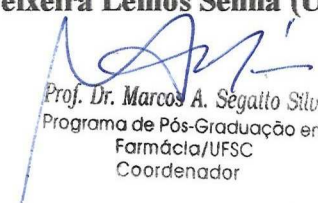
Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo (UFSC - Membro Titular)

  
Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Membro Titular)

  
Profa. Dra. Maria Cláudia Santos Silva (UFSC - Membro Titular)

  
Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna (UFSC – Orientadora)

  
Prof. Dr. Marcos A. Segatto Silva  
Programa de Pós-Graduação em  
Farmácia/UFSC  
Coordenador

Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 05 de novembro de 2007.

*“No meu reflexo no espelho  
Enxergo tão bem minha essência  
Com seus traços cravados em mim  
Traços do amor incondicional  
Do amor paternal...”*

**Ao meu Pai, Luiz Ferreira Filho.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof. Dra. Elenara Lemos Senna pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva pela amizade, apoio e contribuições fundamentais para a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Tânia Pasa e à Mestra Syntia pelo comprometimento nas etapas finais deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas, em especial Sandra e Nilson, pela amizade e dedicação.

Aos amigos conquistados no mestrado, Tati e Fábio, pela amizade desde o início, proporcionando momentos de alegria imensuráveis. Sentirei saudades de tudo.

Aos amigos, Samantha, Rafael e Larissa, que na distância mantiveram-se ao meu lado sempre, com amor e incentivo.

Aos amigos e colegas, Rafa, Gis, Bruno, Mônica, Françoise, Juliana, Geci, Taty, Letícia e Carine pela presença e companheirismo neste percurso.

À minha família pelo amor, incentivo e compreensão.

Aos sobrinhos, pequeninos, Breno, Cauan e Yasmin que trouxeram-me brilho nos momentos que precisei.

Com carinho, meus sinceros agradecimentos...

*Tudo o que eu pensei saber ainda é mistério...  
É singular o fecho todo ou já são vários fins?  
É sempre a mesma afirmação ou já são vários  
sins?*

**(Oswaldo Montenegro)**

## RESUMO

A camptotecina (CPT), um alcalóide proveniente do arbusto *Camptotheca acuminata* (Descaisne, Nyssaceae), é um fármaco que apresenta elevada atividade antitumoral, cujo mecanismo envolve a inibição da Topoisomerase I, uma enzima altamente expressa nos tumores. Entretanto, a utilização deste fármaco na terapêutica foi limitada, durante anos, em virtude de suas características de baixa solubilidade aquosa, elevada instabilidade em meio fisiológico, e elevada toxicidade. Com o intuito de contornar os inconvenientes da administração deste fármaco e melhorar a sua eficácia terapêutica, estudos da encapsulação da CPT em nanocápsulas poliméricas foram realizados, empregando o poli (D,L-ácido lático) (PLA) e copolímeros em bloco do poli (D,L-ácido lático) e polietilenoglicol (PLA-PEG 49 e 66,6 kD). Estes últimos foram empregados com o intuito de obter nanopartículas furtivas, ou seja, que escapam do reconhecimento e captura pelos macrófagos. As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação) e caracterizadas quanto ao diâmetro médio das partículas e potencial zeta. A viabilidade da preparação das nanocápsulas em diferentes condições foi avaliada. A eficiência de encapsulação e o teor de fármaco foram determinados por meio de uma metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência previamente validada. Um delineamento estatístico fatorial foi aplicado para determinar a influência de duas variáveis independentes (tipo de óleo e tipo do polímero) sobre o teor de camptotecina nas suspensões coloidais. Suspensões coloidais monodispersas, apresentando partículas com diâmetro médio entre 140 e 200 nm e potencial zeta entre -25 e -42 mV, foram obtidas pela técnica de nanoprecipitação. Elevados valores de eficiência de encapsulação foram obtidos em todas as formulações testadas. Ambos, tipo de polímero e tipo de óleo afetaram significativamente o teor de fármaco das formulações. Ensaios de liberação foram realizados empregando a técnica de difusão através de membrana e tampão fosfato pH 7,4 contendo Tween 2% como meio de liberação. A concentração de CPT no meio de liberação foi determinada por uma metodologia de espectrofluorimetria. Após 96 horas de ensaio, cerca de 40 a 60% do fármaco foi liberado, dependendo da formulação testada. Estudos de citotoxicidade *in vitro* da CPT livre e encapsulada foram conduzidos usando linhagens de células de leucemia linfoblástica aguda murina L1210 e de leucemia mielomonocítica murina WEHI-3B. Na concentração de 0,1 µg/mL, tanto a CPT livre como encapsulada reduziram significativamente o número de células leucêmicas L1210 viáveis ( $P < 0,005$  versus grupo controle), mas não foi observada diferença significativa quando o grupo tratado com as nanocápsulas foi comparado com o tratado com o fármaco livre. Na mesma concentração, quando as células leucêmicas WeHi-3B foram testadas, somente as nanocápsulas de PLA contendo CPT reduziram significativamente o número de células viáveis ( $P < 0,005$ ). Estudos *in vivo* necessitam ainda ser conduzidos para demonstrar o interesse da utilização de nanocápsulas no tratamento das leucemias.

**Palavras-chave:** Camptotecina, leucemia, nanocápsulas convencionais e furtivas.

## Preparation, characterization and evaluation of the in vitro antileukemic activity of stealth and non-stealth nanocapsules containing camptothecin

### ABSTRACT

Camptothecin (CPT), an alkaloid obtained from *Camptotheca acuminata* (Descaigne, Nyssaceae), is a drug that displays high antitumor activity, and its mechanism entails the inhibition of the Topoisomerase I, an enzyme highly expressed in the tumors. Nevertheless, camptothecin's use in therapeutics has been limited by its low water solubility, low stability in physiological medium, and high toxicity. In order to overcome these drug drawbacks and to improve the therapeutic efficacy, encapsulation studies of CPT in nanocapsules was done using poly (D,L-lactide) (PLA) and poly (D,L lactide)-poly(ethyleneglycol) diblock copolymers (PLA-PEG 49 e 66.6 kD). These polymers were used in order to obtain stealth nanocapsules, which are able to escape from macrophage uptake. The nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer (nanoprecipitation) and were physicochemically characterized. The feasibility of the nanocapsule preparation using different conditions was evaluated. The encapsulation efficiency and CPT content in the nanocapsules were estimated by a validated high performance liquid chromatography method. A factorial design was employed to investigate the effect of two independent variables (oil and polymer type) on CPT content. The nanoparticles displayed mean diameter varying from 140 to 200 nm and zeta potencial from -25 to -40 mV. The encapsulation efficiency values were high for all tested formulations. Both type of the polymer and oil affected significantly the CPT content in the nanocapsule suspensions. In vitro release studies were done using the membrane diffusion method and phosphate buffer solution pH 7.4, containing 2% Tween 80, as releasing medium. The release of CPT varied from 40 to 60% after 96 hours. The cytotoxicity of the free drug and CPT-loaded nanocapsule suspensions was evaluated by MTT method against a mouse lymphocytic leukemia cell line (L1210) and a myelomonocytic leukemia cell line (WeHi-3B). The free drug and CPT-loaded nanocapsules caused significant L1210 cell death in the concentration of 0.1 µg/mL ( $P < 0.005$  versus control group). However, statistical significant difference was not observed when cells were treated with the CPT-loaded nanocapsules or free drug. On the other hand, only CPT-loaded PLA nanocapsules reduced significantly the number of WeHi 3B viable cells ( $P < 0.005$  versus control group). In vivo studies are still need to evaluated the effect of CPT-loaded nanocapsules on leukemia.

**Key words:** Camptothecin, leukemia, stealth and non-stealth nanocapsules.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas .....	31
Figura 2. Métodos usuais, empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, .....	33
Figura 3. Estrutura química da Camptotecina (CPT).....	38
Figura 4. Representação da conversão da forma lactônica da CPT em carboxilada. ....	40
Figura 5. Curvas de DSC dos polímeros.....	71
Figura 6. Curvas de TG dos polímeros: .....	72
Figura 7. Espectro de ressonância magnética nuclear RMN <sup>1</sup> H dos copolímeros ....	74
Figura 8. Cromatograma obtido após a injeção.....	84
Figura 9. Representação gráfica da curva de calibração da camptotecina obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta. ....	85
Figura 10. Análise dos resíduos da curva de calibração da camptotecina obtida por CLAE.....	86
Figura 11. Curva de calibração da camptotecina obtida por espectrofluorimetria. ....	95
Figura 12. Análise dos resíduos da curva de calibração da camptotecina obtida por espectrofluorimetria.....	96
Figura 13. Perfil de Liberação da CPT .....	97
Figura 14. Efeito citotóxico da camptotecina livre (CPT), nanocápsulas brancas de PLA (PLA) e PLA-PEG (PEG49 e PEG66) e de nanocapsulas contendo camptotecina (PLA+CPT, PEG49+CPT e PEG66+CPT) .....	99
Figura 15. Efeito citotóxico da camptotecina livre (CPT), nanocápsulas brancas de PLA (PLA) e PLA-PEG (PEG49 e PEG66) e de nanocapsulas contendo camptotecina (PLA+CPT, PEG49+CPT e PEG66+CPT) .....	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Melhorias das propriedades das camptotecinas proporcionada pelo emprego de sistemas de liberação.....	42
<b>Tabela 2.</b> Formulações testadas na seleção do óleo das suspensões de nanocápsulas brancas.....	57
<b>Tabela 3.</b> Delineamento fatorial 33 empregado para avaliar a influência do tipo de polímero e de óleo sobre o teor de CPT nas suspensões de nanocápsulas. ....	60
<b>Tabela 4.</b> Formulações testadas na seleção do óleo das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina.....	61
<b>Tabela 5.</b> Composição estimada de PLA:PEG nos copolímeros.....	75
<b>Tabela 6.</b> Características macroscópicas das suspensões de nanocápsulas brancas após a preparação (tempo zero) e após 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento....	77
<b>Tabela 7.</b> Valores do diâmetro médio e índice de polidispersão (entre parêntesis) das nanocápsulas brancas. ....	78
<b>Tabela 8.</b> Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas brancas.....	80
<b>Tabela 9.</b> Viscosidade das suspensões de nanocápsulas brancas.....	80
<b>Tabela 10.</b> Solubilidade da camptotecina no componente oleoso.....	81
<b>Tabela 11.</b> Áreas dos picos obtidos após análise das soluções de CPT padrão por CLAE.....	84
<b>Tabela 12.</b> Resultados obtidos na avaliação da precisão do método.....	87
<b>Tabela 13.</b> Recuperação de solução padrão de CPT adicionada nas amostras de suspensão de nanocápsulas. ....	88
<b>Tabela 14.</b> Resultados obtidos pelo estudo da robustez do método de CLAE.....	89
<b>Tabela 15.</b> Valores de eficiência de encapsulação e teor de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas.....	90
<b>Tabela 16.</b> Análise de variância realizada no estudo da influência dos fatores de formulação sobre os valores de teor de fármaco das nanocápsulas.....	91
<b>Tabela 17.</b> Diferenças absolutas entre as médias dos teores de camptotecina obtidos em cada um dos tratamentos. ....	92
<b>Tabela 18.</b> Valores de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das suspensões de nanocápsulas brancas e contendo CPT, preparadas a partir do óleo de rícino.....	93

**Tabela 19.** Áreas dos espectros de fluorescência obtidas a partir da camptotecina após análises das soluções por espectrofluorimetria..... 95

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABRALE	Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia
ANOVA	Análise de Variância
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO <sup>2</sup>	Gás carbônico
CPT	Camptotecina
CPT-11	Irinotecano
CPTs	Camptotecinas
CV	Coeficiente de variação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTAB	Brometo de dodeciltrimetilamônio
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
HCl	Ácido clorídrico
HCPT	10-hidroxicamptotecina,
HCPT-1	10-hidroxicamptotecina-10,20-diisobutil dicarbonato
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N-[2-etanosulfônico]
H <sub>2</sub> O	Hidróxido de oxigênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Índice de polidispersão
IV	Intravenoso
KD	Kilodaltons
LOQ	Limite de quantificação
MTT	Brometo de dimetiazol difeniltetrazólio
NC	Nanocápsulas
PEG	Polietilenoglicol
PCL	Poli-ε-caprolactona
PLA	Poli ácido-lático
PLA-PEG	Poli ácido-lático-co-polietilenoglicol
PLAGA	Poli ácido-lático-co-glicólico

PM	Peso molecular
R <sup>2</sup>	Coefficiente de regressão
RNA	Ácido ribonucleico
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SN-38	Metabólito do irinotecano
TG	Termogravimetria
Tg	Temperatura de transição vítrea
Topo I	Topoisomerase I
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
9-AC	9-aminocamptotecina
9-NC	9-nitrocamptotecina
10-HCPT	10-hidroxycamptotecina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	23
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>24</b>
3.1 CÂNCER .....	25
<b>3.1.1 Aspectos gerais</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.2 Leucemia</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1.3 Tratamento</b> .....	<b>28</b>
3.2 NANOENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS .....	29
<b>3.2.1 Nanopartículas furtivas</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2.2 As nanopartículas no tratamento do câncer</b> .....	<b>36</b>
3.3 CAMPTOTECINA.....	37
<b>3.3.1 Aspectos gerais</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3.2 Sistemas de liberação de camptotecinas</b> .....	<b>41</b>
3.3.2.1 Microencapsulação.....	43
3.3.2.2 Hidrogéis poliméricos .....	44
3.3.2.3 Lipossomas e emulsões .....	45
3.3.2.4 Nanopartículas e micelas poliméricas .....	46
3.3.2.5 Conjugados de camptotecinas .....	51
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>52</b>
4.1 MATERIAIS .....	53
<b>4.1.1 Matérias-primas</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1.2 Solventes e reagentes</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1.3 Cultura de células</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1.4 Equipamentos e materiais de consumo</b> .....	<b>54</b>
4.2 METODOLOGIA.....	55
<b>4.2.1 Caracterização dos materiais poliméricos</b> .....	<b>55</b>
4.2.1.1 Calorimetria exploratória diferencial .....	55
4.2.1.2 Termogravimetria .....	55
4.2.1.3 Ressonância magnética nuclear <sup>1</sup> H.....	56

<b>4.2.2 Preparação e caracterização das suspensões coloidais de nanocápsulas brancas</b> .....	<b>56</b>
4.2.2.1 Preparação das suspensões coloidais .....	56
4.2.2.2. Caracterização físico-química das suspensões coloidais.....	57
4.2.2.2.1 <i>Avaliação das características macroscópicas</i> .....	57
4.2.2.2.2 <i>Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica das partículas</i> .....	58
4.2.2.2.3 <i>Determinação do potencial zeta</i> .....	58
4.2.2.2.4 <i>Viscosidade cinemática</i> .....	58
<b>4.2.3 Preparação e caracterização das suspensões coloidais de nanocápsulas contendo camptotecina</b> .....	<b>59</b>
4.2.3.1 Determinação da solubilidade da camptotecina no componente oleoso das formulações.....	59
4.2.3.2 Preparação das suspensões coloidais .....	59
4.2.3.2.1 <i>Delineamento estatístico</i> .....	60
4.2.3.3 Caracterização das suspensões coloidais contendo camptotecina.....	62
4.2.3.3.1 <i>Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas</i> .....	62
<b>4.2.3.3.1.1 Determinação da concentração de camptotecina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</b> .....	<b>62</b>
4.2.3.3.1.1.1 Condições cromatográficas .....	62
4.2.3.3.1.1.2 Validação da metodologia analítica .....	62
<b>4.2.3.3.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas</b> .....	<b>64</b>
4.2.3.3.2 <i>Determinação do diâmetro médio e potencial zeta</i> .....	65
<b>4.2.4 Avaliação do perfil de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas</b> .....	<b>65</b>
4.2.4.1 Determinação da concentração de camptotecina por espectrofluorimetria ....	65
4.2.4.1.1 <i>Condições fluorimétricas</i> .....	65
4.2.4.1.2 <i>Linearidade</i> .....	66
4.2.4.2 Ensaio de liberação .....	66
<b>4.2.5 Ensaio de citotoxicidade</b> .....	<b>67</b>
4.2.5.1 Cultura de células.....	67
4.2.5.2 Tratamento das células .....	67

4.2.5.3 Ensaio de viabilidade celular (teste do MTT).....	67
4.2.5.4 Análise estatística .....	68
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS POLIMÉRICAS .....	70
<b>5.1.1 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria .....</b>	<b>70</b>
<b>5.1.2 Ressonância magnética nuclear 1H (RMN 1H) .....</b>	<b>73</b>
5.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS BRANCAS (SEM FÁRMACO).....	75
<b>5.2.1 Avaliação das características macroscópicas das suspensões.....</b>	<b>76</b>
<b>5.2.2 Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica das partículas .....</b>	<b>77</b>
<b>5.2.3 Determinação do potencial zeta.....</b>	<b>78</b>
<b>5.2.4 Viscosidade das suspensões de nanocápsulas.....</b>	<b>80</b>
5.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE CONTENDO CAMPTOTECINA .....	81
<b>5.3.1 Determinação da solubilidade da camptotecina no componente oleoso das formulações.....</b>	<b>81</b>
<b>5.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e taxa de recuperação da camptotecina nas suspensões de nanocápsulas .....</b>	<b>82</b>
5.3.2.1 Determinação da concentração de camptotecina por cromatografia líquida de alta eficiência.....	82
5.3.2.1.1 <i>Validação da metodologia analítica .....</i>	83
5.3.2.2 Avaliação do efeito do tipo de polímero e de óleo sobre a encapsulação da camptotecina nas nanocápsulas .....	89
<b>5.3.3 Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina .....</b>	<b>92</b>
<b>5.3.4 Avaliação dos perfis de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas .....</b>	<b>93</b>
5.3.4.1 Determinação da concentração de camptotecina por espectrofluorimetria...	93
5.3.4.2 Avaliação dos perfis de liberação .....	96
5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO .....	98
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>117</b>



<b>ANEXO A - Artigo científico aceito por Journal of AOAC INTERNATIONAL em 07/10/2007. ....</b>	<b>118</b>
---	------------

## 1. INTRODUÇÃO

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, a administração de grandes quantidades do agente terapêutico torna-se necessária. Na perspectiva de contornar estes inconvenientes, o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados para a vetorização 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. Entende-se como vetorização, a capacidade do agente terapêutico acumular-se seletivamente e quantitativamente no órgão ou tecido alvo, independentemente do sítio ou modo de administração. Desta maneira, as seguintes vantagens para a vetorização de medicamentos são evidentes: (i) o protocolo de administração do medicamento pode ser simplificado; (ii) a quantidade de fármaco requerida para obtenção da resposta terapêutica bem como o custo da terapia pode ser reduzido e (iii) a concentração do mesmo no sítio de ação pode ser aumentada sem produzir efeitos negativos sobre os órgãos não almejados (TORCHILIN, 2000).

As nanopartículas poliméricas têm sido extensivamente estudadas como carreadores de fármacos devido à sua habilidade de controlar a liberação (PEPPAS, 1995; CHUNG *et al.*, 2006; CSABA *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006), aumentar a estabilidade (ALLÉMANN *et al.*, 1998; JUNG *et al.*, 2000; VILA *et al.*, 2002) e diminuir a toxicidade dos mesmos (GUTERRES *et al.*, 1995; GUTERRES *et al.*, 2001; BARAN *et al.*, 2002). De maneira geral, o termo nanopartículas é empregado tanto para nanoesferas quanto para nanocápsulas, sendo este último diferenciado pela presença de óleo em sua composição (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Enquanto as nanoesferas são constituídas por uma matriz onde o fármaco encontra-se disperso, as nanocápsulas são sistemas reservatórios, onde um núcleo oleoso contendo o fármaco é circundado por uma parede de natureza geralmente polimérica (COUVREUR *et al.*, 2002). Uma das grandes vantagens das nanocápsulas sobre as nanoesferas está relacionada com a quantidade de fármaco capaz de se associar às partículas. Neste sentido, as nanocápsulas são capazes de

transportar elevadas quantidades de fármaco hidrofóbico, podendo a concentração do mesmo ser otimizada pela escolha do óleo que compõe o núcleo interno da partícula. Outra vantagem da presença de uma cavidade central é a ausência de um contato direto do fármaco com os tecidos, diminuindo assim a irritação local, além de proteger a substância encapsulada frente à degradação (COUVREUR *et al.*, 2002).

Polímeros tais como o poli (ácido láctico) (PLA), poliácido láctico-co-glicólico (PLAGA) e a poli-ε-caprolactona (PCL), são os mais empregados na preparação das nanopartículas por serem biodegradáveis e biocompatíveis. Entretanto, nanopartículas preparadas a partir destes materiais, quando administradas intravenosamente, são rapidamente removidas da circulação sistêmica pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), representado principalmente pelas células de Kupffer no fígado e macrófagos do baço. Esta remoção da circulação sistêmica geralmente ocorre por meio do reconhecimento específico destes vetores pelos receptores celulares, em um mecanismo intermediado pela adsorção das proteínas plasmáticas (opsonização) nas partículas. Deste modo, a remoção pelo SFM é a maior limitação para a vetorização de fármacos em outros sítios do corpo humano, apesar deste fenômeno ter sido vantajosamente empregado no tratamento de infecções intracelulares do fígado e baço (MOSQUEIRA *et al.*, 2001).

Muitas técnicas têm sido testadas para a modificação da superfície das nanopartículas de modo a evitar o seu reconhecimento e captura pelos macrófagos. Entre elas destaca-se a obtenção de nanopartículas revestidas com polímeros hidrofílicos, como o polietilenoglicol, o qual impede estericamente a opsonização. Estas nanopartículas denominadas furtivas escapam da captura pelos macrófagos, permanecendo por um período prolongado na circulação sistêmica e, desta forma, podem alcançar outros locais onde a liberação do fármaco é desejável (GREF *et al.*, 1995).

Muitas patologias apresentam potencial de tratamento por meio da vetorização de fármacos. Especialmente o câncer, em que o aumento da permeabilidade capilar decorrente da má formação da neovasculatura dos tecidos tumorais, possibilita o extravasamento de carreadores de fármacos apresentando

entre 10 e 700 nm. 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, como também melhorar a eficácia de certos fármacos cujas células são resistentes (GUPTA, 1990). Além disso, a vetorização de fármacos antitumorais em nanopartículas tem sido considerada uma estratégia promissora no tratamento do câncer, uma vez que mataria unicamente as células do tumor, não afetando as células normais dos outros tecidos (PUISIEUX *et al.*, 1994).

Estudos epidemiológicos e testes pré-clínicos têm revelado um grande potencial dos compostos fitoquímicos no combate ao câncer. Entre os fármacos de origem natural que apresentam atividade antitumoral destacam-se os alcalóides. A camptotecina é o alcalóide protótipo obtido da *Camptotheca acuminata*, uma árvore nativa da China que se desenvolve em regiões relativamente quentes do sudoeste deste país. Entretanto, a utilização da camptotecina na terapêutica foi praticamente banida devido a sua escassa solubilidade aquosa, impossibilitando a sua utilização em perfusões intravenosas. Além disso, este fármaco é rapidamente inativado em pH fisiológico em decorrência da abertura do grupamento  $\alpha$ -hidroxi-lactônico presente no anel pentacíclico da molécula, conduzindo à formação de uma forma carboxilada, menos ativa e mais tóxica (EMERSON, 2000).

Na década de 80, a descoberta do mecanismo ação único para um alcalóide, envolvendo a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores, trouxe um novo impulso às pesquisas científicas com a CPT. Inicialmente, inúmeros derivados hidrossolúveis foram sintetizados com o objetivo de permitir a administração de soluções aquosas pela via intravenosa (O'LEARY e MUGGIA, 1998). Entretanto, apesar da estratégia de síntese ter contornado os problemas inerentes à baixa solubilidade das camptotecinas, todos os derivados hidrossolúveis permaneceram suscetíveis à hidrólise e inativação em meio fisiológico, em maior ou menor extensão. Por outro lado, estudos demonstraram que a exposição contínua ao tumor, muito mais que a dose, aumentava a eficácia terapêutica destas moléculas. O sucesso da administração da CPT e de seus análogos passou a requerer, portanto: (i) a manutenção da forma lactônica da

molécula durante todas as etapas de fabricação do medicamento, (ii) o alcance e a manutenção de concentrações efetivas da forma ativa nos tumores e (iii) a obtenção de preparações que conduzam à redução dos efeitos colaterais.

Assim, o aproveitamento do potencial terapêutico da CPT, por meio da sua incorporação em sistemas de liberação, tornou-se, nas últimas décadas, objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa. A CPT é um fármaco que apresenta uma atividade antileucêmica considerável. As leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e nos tecidos linfóides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem infiltrar-se em outros sistemas orgânicos. No mundo, ocorrem 257 mil novos casos de leucemia por ano, dos quais cerca de 56% em homens, sendo que o número dos casos novos de leucemia vem aumentando especialmente em pessoas idosas (INCA,2007). Diante destes aspectos, este trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar nanocápsulas convencionais e furtivas contendo camptotecina, com vistas ao controle da liberação e a manutenção da integridade deste fármaco, de modo a obter sistemas de liberação aplicáveis para o tratamento das leucemias. Para tal, estudos de citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas convencionais e furtivas usando duas linhagens de células leucêmicas, L1210 e WeHi-3B, foram também realizados no presente trabalho.

## 2. OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

- Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas convencionais e furtivas contendo camptotecina e avaliar o efeito citotóxico sobre células de linhagem leucêmicas agudas.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina, a partir do poli (ácido láctico) (PLA) e poli ácido láctico-co-polietilenoglicol (PLA-PEG).
- Avaliar a viabilidade de preparação das suspensões de nanocápsulas usando três diferentes polímeros e três diferentes óleos.
- Validar uma metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação e determinação da eficiência de encapsulação da camptotecina nas suspensões de nanocápsulas.
- Avaliar o efeito do tipo de polímero e do tipo de óleo empregado sobre o teor de fármaco nas suspensões de nanocápsulas.
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da camptotecina a partir das nanocápsulas.
- Avaliar o efeito citotóxico *in vitro* das nanocápsulas convencionais e furtivas contendo CPT em cultura de células leucêmicas L1210 e WeHi 3B e comparar com aquele produzido pelo fármaco livre.



### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 3.1 CÂNCER

### 3.1.1 Aspectos gerais

Câncer é a denominação dada ao 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. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias. Por definição, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original. Tumores benignos não invadem tecidos adjacentes e não se propagam a sítios distantes mantendo seu crescimento localizado na área na qual são inseridos e raramente constituem risco de vida. Em contraste, tumores malignos podem expressar vários graus de diferenciação, desde estruturas relativamente maduras que imitam tecidos normais a uma coleção de células tão imaturas a ponto de uma célula de origem não poder ser identificada. Além disso, possuem capacidade de infiltrar-se em outros tecidos e produzir metástases em órgãos distantes (RUDDON, 1995). Assim, os diversos tipos de câncer diferenciam-se entre si pela velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos (metástases). Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas é denominado carcinoma; se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é denominado de sarcoma e se são provenientes de células hematopoiéticas são chamados de leucemias (INCA, 2007). A sua prevalência está relacionada diretamente com o aumento da expectativa de vida da população e, em se tratando de uma doença degenerativa espera-se que a sua frequência seja maior na faixa etária mais avançada.

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 nas células normais.

De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Alguns deles 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, e muitos são ainda completamente desconhecidos. O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somando ao fato de as células das pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco de 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. Esses fatores atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células (INCA, 2007).

A incidência nacional de câncer tem sido um recurso indispensável para o planejamento de ações de promoção à saúde, detecção precoce e de atenção oncológica em todos os níveis. No Brasil, as estimativas para o ano de 2006 apontavam 472.050 casos novos de câncer. Entre os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, estavam os de próstata e pulmão, no sexo masculino, e mama e colo do útero, no sexo feminino. A incidência de leucemias embora não esteja no patamar de mais alto nível, também reflete um número preocupante, tendo sido estimado 9.550 casos novos, os quais atingiram 5.330 atingem homens e 4.220 mulheres (INCA, 2007).

### **3.1.2 Leucemia**

As leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas, caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e nos tecidos linfóides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem infiltrar-se em outros sistemas orgânicos (DIPIRO *et al.*, 2002, BAIN, 2003). A proliferação descontrolada de células leucêmicas inibe a produção das células

sangüíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Em decorrência da não-funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos afetados, além de sofrerem de anemia e de desordens hemorrágicas, estão mais sujeitos a infecções (BAIN, 2003, BASSAN et al., 2004, GUIMARÃES, 2004).

As células leucêmicas originam-se a partir de uma mutação somática em uma única célula tronco ou célula primordial (stem cell), a qual forma o clone leucêmico. A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides e mielóides, o que o caracteriza com uma doença heterogênea, sob o aspecto biológico e morfológico. Assim, as leucemias podem ser divididas em linfóides e mielóides, e em agudas e crônicas (BAIN, 2003). Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia (INCA, 2007).

A leucemia aguda é rapidamente progressiva e afeta a maioria das células imaturas (ainda não totalmente diferenciadas ou desenvolvidas). Nos casos de leucemia linfóide aguda as células imaturas são denominadas de linfoblastos, e mieloblastos nos casos de leucemia mielóide aguda (BAIN, 2003). A leucemia crônica progride lentamente e permite o crescimento de um maior número de células já desenvolvidas. Em geral, essas células mais diferenciadas podem ser capazes de exercer algumas de suas funções normais.

As leucemias são doenças em que há uma alteração genética adquirida (não congênita) nas células primitivas da medula óssea. É importante ressaltar que não se trata de um fenômeno hereditário apesar de ocorrer nos genes. O resultado desta alteração é uma proliferação anormal dos glóbulos brancos que perdem suas funções, mas mantém sua capacidade de proliferação aumentando seu número no sangue periférico (ABRALE, 2007). Como não se conhece a causa da leucemia, o tratamento em o objetivo de destruir as células leucêmicas, para que a medula óssea volte a produzir células normais. Entretanto, as pesquisas comprovam que ainda restam no organismo muitas células leucêmicas (doença residual mínima), o que obriga a continuação do tratamento para não haver recaída da doença

(SACHER, 2002; CHEOL e EVANS, 2006; DOBIN, 2007).

### 3.1.3 Tratamento

O tratamento para câncer varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença. Estes tumores podem ser tratados com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou, ainda, com a combinação dessas técnicas (ALMEIDA-SOUZA, 2006; SANTOS-SILVA, 2002; ALMEIDA et al., 2005). A quimioterapia é utilizada em tratamento sistêmico, com fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois conseguem maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (SOUZA, 2003).

O câncer pode ser tratado de pelo menos três maneiras distintas: (i) neoadjuvante, (ii) adjuvante e (iii) terapêutica. A quimioterapia neoadjuvante ou de indução consiste na administração dos agentes quimioterápicos antes da cirurgia. O uso desta terapia apresenta vantagens, pois pode tornar o tratamento mais efetivo antes que o aporte sanguíneo para o tumor seja alterado pelo ato cirúrgico ou pela radioterapia. A quimioterapia adjuvante para o tratamento sistêmico da neoplasia é realizada após o tumor primário ter sido controlado por cirurgia ou radioterapia. A quimioterapia terapêutica é aquela que se destina a ser a principal arma no tratamento, principalmente quando a cirurgia e a radioterapia não são as melhores escolhas terapêuticas (SOLIMANDO *et al.*, 2000).

A terapia antineoplásica ou antitumoral do câncer é empregada fundamentalmente no tratamento de tumores não curáveis pela cirurgia ou radioterapia. Os agentes antineoplásicos atualmente utilizados, em particular os citotóxicos, afetam, em sua maioria, o processo de divisão celular sendo, portanto, antiproliferativos. Esses fármacos não exercem nenhum efeito inibitório específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou a tendência a sofrer

metástases. Para muitos deles, a ação antiproliferativa resulta principalmente de um bloqueio durante a fase S do ciclo celular, sendo a apoptose desencadeada pela conseqüente lesão do ADN. Além disso, como seu efeito principal é exercido sobre a divisão celular, eles irão afetar todos os tecidos normais que se dividem rapidamente, podendo produzir, em maior ou menor grau, efeitos tóxicos não desejáveis (RANG, DALE e RITTER, 2001). Os principais agentes antineoplásicos podem ser divididos em agentes citotóxicos, hormônios e agentes diversos.

Os agentes citotóxicos são classificados em: a) agentes alquilantes e compostos relacionados que atuam através da formação de ligações covalentes com o DNA, impedindo assim sua replicação; b) antimetabólitos, que bloqueiam ou subvertem uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA; c) antibióticos citotóxicos, isto é, substâncias de origem microbiana que impedem a divisão das células nos mamíferos e d) derivados vegetais (alcalóides da vinca, taxanos, camptotecinas), a maioria afetando especificamente a função dos microtúbulos e, por conseguinte, a formação do fuso mitótico. Os esteróides (glicocorticóides, estrogênios e androgênios) suprimem a secreção de hormônios ou antagonizam sua ação e, finalmente, os agentes diversos são aqueles que não se enquadram nas categorias anteriores (RANG, DALE e RITTER, 2001).

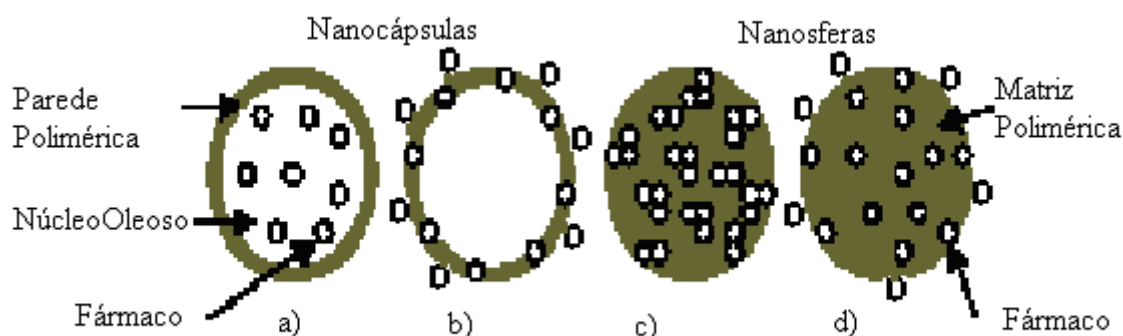
### 3.2 NANOENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS

A resposta farmacológica de um fármaco está diretamente relacionada com a concentração com que este atinge o sítio de ação. Entretanto, uma vez que as características de distribuição da substância ativa estão essencialmente baseadas nas suas propriedades físico-químicas, que nem sempre são adaptáveis aquelas do local desejado, grandes quantidades da mesma necessitam ser administradas. A toxicidade então surge em decorrência da penetração do fármaco em tecidos e órgãos saudáveis (COUVREUR *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 ou carreador. 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 ROBLO-TREUPEL, 1998; CALVO, 1995).

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos dez anos. Dentre os diferentes carreadores de fármacos estão incluídos as micropartículas e os sistemas coloidais nanoestruturados. Em particular, aqueles constituídos por polímeros biodegradáveis têm atraído grande atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluídos biológicos e a maior facilidade de preparação. Nanopartículas são sistemas coloidais matriciais ou reservatórios cujo tamanho se situa entre 100 e 500 nm (QUINTANAR-GUERREIRO *et al.*, 1998; SOPPIMATH *et al.*, 2001; LABHASETWAR *et al.*, 2005). Tais sistemas caracterizam-se em carrear substâncias ativas, protegendo-as da degradação após administração, fazendo com que maiores concentrações do fármaco alcancem o local de ação. Além disso, dependendo do seu tamanho e características de superfície, as nanopartículas podem atravessar barreiras, como o endotélio vascular e a membrana basal, permitindo a liberação do fármaco em locais específicos.



**Figura 1.** Representação esquemática de nanocápsulas e nanosferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanosferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanosferas.

Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003, p. 726

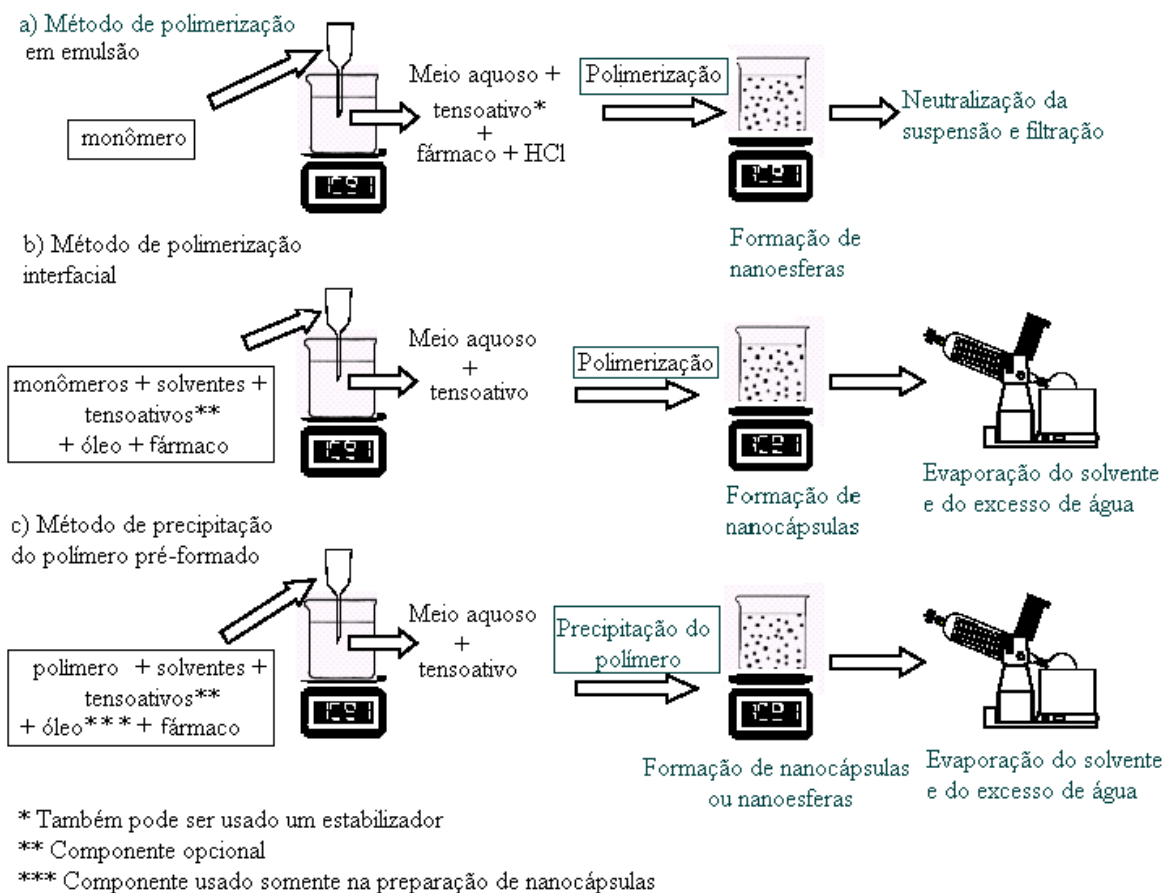
Os polímeros empregados para a formulação de nanopartículas incluem os polímeros sintéticos, tais como os polilactídeos, poliglicolídeos e seus copolímeros, os poliácridatos e a policaprolactona (PCL) ou polímeros naturais, como a albumina, gelatina, colágeno e quitosana. Destes polímeros, o poliácido D,L-láctico (PLA) e o poliácido D,L-láctico-co-glicólico (PLGA) têm sido os mais investigados para liberação de fármacos. Após administração, esses polímeros sofrem hidrólise no organismo formando sub-produtos (ácido láctico e ácido glicólico) biologicamente compatíveis e metabolizáveis que serão removidos do organismo pelo ciclo do ácido cítrico. Os produtos de degradação polimérica são formados lentamente e não afetam as funções normais das células. Esses polímeros têm sido testados quanto à toxicidade e segurança em modelos animais, e estão sendo empregados atualmente em humanos para suturas reabsorvíveis, implantes ósseos e implantes contraceptivos. Também são utilizados como enxerto para órgãos artificiais, e recentemente como suportes na pesquisa de engenharia de tecidos (PANYAM e LABHASETWAR, 2003).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas (Figura 2), os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros



dispersos (ex.; cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímeros pré-formados. A nanoprecipitação, também conhecida como nanodeposição do polímero pré-formado, é uma técnica simples, reprodutível 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 em um 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 conseqüência 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, em que 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-GUERREIRO *et al.*, 1998; COUVREUR *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Métodos usuais, empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na utilização de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados.

Fonte: Adaptado de SCHAFFAZICK *et al.*, 2003, p. 727.

Independentemente do método de preparação os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados. Além disso, podem ocorrer problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, incluindo o fármaco, podem ocorrer (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. Além disto, a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores dos colóides, sob diferentes condições de armazenagem, é de fundamental importância. O tamanho de partícula, o potencial zeta, a distribuição da massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH são geralmente

os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas. Poucos estudos referentes à estabilidade de nanopartículas contendo diferentes fármacos são encontrados na literatura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

De acordo com os estudos publicados, diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as suas características físico-químicas, o pH do meio, as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a ordem de adição do fármaco na formulação, ou seja, antes (incorporação) ou após (incubação) a formação das nanoestruturas, a natureza do óleo utilizado (no caso das nanocápsulas) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A liberação do princípio ativo é vinculada a difusão das moléculas ativas através da rede polimérica. Por outro lado, nas nanocápsulas o princípio ativo está dissolvido em um reservatório interno oleoso circundado por uma fina membrana polimérica (MONTASSER, 2000). Neste sistema, a liberação do fármaco parece ser controlada pelo coeficiente de partição do fármaco entre o núcleo oleoso e o meio externo aquoso e o volume relativo destas duas fases. Isto sugere claramente, que a membrana polimérica pode ser um pouco porosa e comportar-se como uma barreira contínua para a liberação difusional (COUVRER, 2002).

### **3.2.1 Nanopartículas furtivas**

A utilização de carreadores nanoestruturados pela via intravenosa é limitada pela rápida remoção das partículas da circulação sistêmica pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). O SFM é formado por um grupo de células mononucleares originadas na medula óssea, que tem como função remover pequenas partículas estranhas do espaço vascular. Monócitos sangüíneos e macrófagos teciduais pertencem a esta linhagem de células (BECKER, 1988). Entretanto, a captura pelas células fagocitárias requer a adsorção prévia das

proteínas plasmáticas sobre as nanopartículas (opsonização), para que a interação com os receptores Fc, receptores para complemento ou receptores de açúcar/lecitina, situados na superfície dos macrófagos, seja efetuada (MOGHIMI *et al.*, 2001).

Os fenômenos de adsorção de proteínas plasmáticas e fagocitose das nanopartículas têm sido extensivamente estudados nos últimos anos. Além do tamanho, a hidrofobicidade da superfície das partículas determina a extensão de adsorção das proteínas plasmáticas (opsoninas) (SOPPIMATH *et al.*, 2001). De modo geral, quanto mais hidrofóbica é a partícula, maior é a adsorção das proteínas plasmáticas e mais rápida é a sua remoção da circulação. Também é consenso que superfícies carregadas negativamente conduzem à maior eliminação das partículas da circulação sistêmica quando comparadas àquelas apresentando superfície neutra ou carregada positivamente (STOLNIK *et al.*, 1995). A principal consequência da captura das partículas reside na sua distribuição preferencial para o fígado e baço, órgãos ricos em macrófagos fixos, conhecidos como células de Kupffer, reduzindo significativamente o alcance em outros órgãos. Assim, uma alternativa para o uso de nanopartículas pela via parenteral consiste em utilizar carreadores com superfície foi modificada. Estas partículas são chamadas de “furtivas”, pois são invisíveis às células fagocíticas, permanecendo mais tempo na circulação sanguínea, e estando assim aptas a liberar o fármaco em outros locais (LEGRAND *et al.*, 1999; MOGHIMI e HUNTER, 2001; COUVRER *et al.*, 2002).

Duas estratégias têm sido propostas para a obtenção de nanopartículas que permaneçam 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 (PEGs). Entretanto, para uma partícula apresentar comportamento “furtivo”, dois critérios devem ser reunidos: o polímero não deve ser removido facilmente pelo fluxo *in vivo*, e a densidade da barreira 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). A obtenção de nanopartículas a partir de copolímeros em bloco é a estratégia que tem se demonstrado mais adequada, pois evita a possibilidade da

rápida dessorção do revestimento hidrofílico após a diluição ou o contato com os componentes sangüíneos (BRIGGER *et al.*, 2002). A presença de cadeias de polietilenoglicol (PEG) na superfície das partículas resulta numa densa nuvem de várias conformações intercambiáveis entre si, como conseqüência o sistema imune apresenta dificuldades em modelar um anticorpo em volta desta estrutura flexível (JEON *et al.*, 1991a, 1991b; ALLEN, 1994).

Estudos têm evidenciado um aumento significativo no tempo de permanência na circulação sistêmica de nanoesferas de PLAGA revestidas com PEG (PLAGA-PEG). As nanopartículas convencionais foram removidas da circulação em 66%, após 5 minutos de administração, enquanto as nanoesferas revestidas com PEG 20 kD foram removidas em 30%, após 180 minutos de administração (GREF *et al.*, 1994). Nanocápsulas contendo cadeias de PEG covalentemente ligadas demonstraram um perfil modificado de biodistribuição, particularmente àquelas partículas preparadas a partir de PLA-PEG 20 kD e apresentando um teor de PEG de 30% em relação à massa total do polímero (MOSQUEIRA *et al.*, 2001).

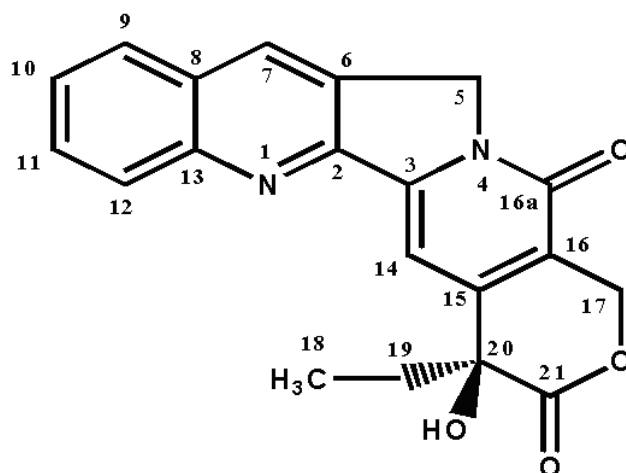
### **3.2.2 As nanopartículas no tratamento do câncer**

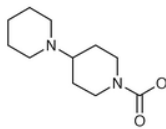
São inúmeros os trabalhos que mostram o interesse de nanopartículas furtivas no tratamento do câncer. Na busca de um sistema eficaz para o tratamento de tumores sólidos, os perfis de biodistribuição de nanopartículas de gelatina e de gelatina modificada com unidades de polietilenoglicol (gelatina peguilada) foram avaliados e comparados em camundongos inoculados com células de carcinoma de pulmão de Lewis. As nanopartículas foram radiomarcadas com <sup>125</sup>I e administradas intravenosamente nos animais. Após o sacrifício dos animais, a radioatividade foi determinada, indicando uma maior percentagem de nanopartículas peguiladas no sangue e tumor em até 12 horas após a administração (GREF *et al.*, 1994; KAUL e AMIJI, 2004).

### 3.3 CAMPTOTECINA

#### 3.3.1 Aspectos gerais

Os alcalóides são substâncias isoladas de plantas de vários gêneros caracterizados por apresentar um nitrogênio heterocíclico. Tais substâncias ainda constituem uma das mais importantes classes de fármacos antitumorais, sendo que os mais estudados pertencem a três gêneros: Vinca (*Catharantus*), *Taxus* e *Camptotheca* (CORTESE e NASTRUZZI, 1999). A camptotecina (CPT) é um alcalóide proveniente do arbusto *Camptotheca acuminata* (Decaisne, Nyssaceae), uma planta que cresce em áreas relativamente quentes do sudoeste chinês, sendo tradicionalmente empregada na medicina chinesa na forma de chá. Estruturalmente, este fármaco é caracterizado por apresentar um anel pentacíclico altamente insaturado, constituído por uma porção pirro[3,4-b] quinolina (anéis A, B e C), um anel piridona (anel D) e um anel  $\alpha$ -hidroxilactona terminal (anel E), apresentando um centro quiral no carbono 20 (C-20) (Figura 3). É importante ressaltar que, das duas formas enantioméricas da camptotecina, 20-(S) e 20-(R), apenas a forma 20-(S) apresenta atividade antitumoral (HATEFI e AMSDEN, 2002). A CPT apresenta-se como um pó amarelo, opaco e cristalino, de elevado ponto de fusão (264-267 °C) e peso molecular de 348,11, correspondente à fórmula  $C_{20}H_{16}N_2O_4$  (WALL e WANI, 1996).



	C-7	C-9	C-10
Camptotecina	H	H	H
9-aminocamptotecina	H	NH <sub>2</sub>	H
9-nitrocamptotecina	H	NO <sub>2</sub>	H
Irinotecano	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	
Topotecano	H	NCH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
SN-38	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	OH

**Figura 3.** Estrutura química da Camptotecina (CPT).

A CPT foi isolada durante o período de 1950-1959, por ocasião de um meticuloso estudo que objetivava a obtenção de esteróides a partir da hidrocortisona. Após o isolamento e elucidação estrutural da CPT e seus análogos 10-hidroxi e 10-metoxi-camptotecina, foi demonstrado que estas substâncias inibiam a síntese de ADN e ARN. Os primeiros estudos *in vivo* realizados com este fármaco evidenciaram uma considerável atividade antitumoral em animais tratados com células leucêmicas L1210 ou P388, quando doses entre 0,5 e 4,0 mg/kg eram administradas, além de uma elevada atividade na inibição de tumores sólidos,

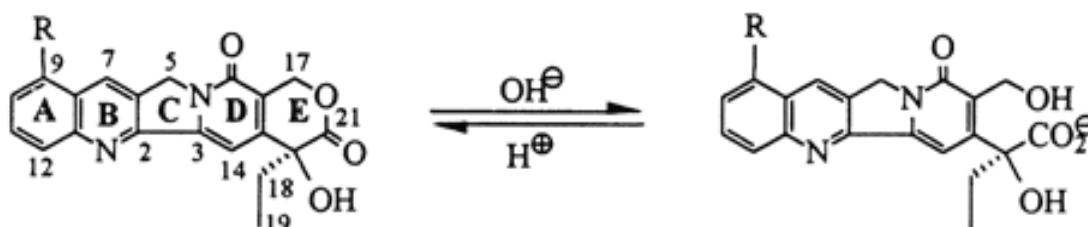
incluindo o tumor de Walker WM (WALL e WANI, 1996). Posteriormente, estudos demonstraram que a camptotecina inibia o crescimento das células endoteliais humanas *in vitro* e possuía atividade antiangiogênica *in vivo*, provocando uma inibição de cerca de 30% no crescimento vascular. Estas observações indicaram que além da atividade citotóxica, a CPT apresenta uma atividade antitumoral indireta, por meio da inibição da angiogênese (CLEMENTE *et al.*, 1999).

Os primeiros estudos clínicos realizados com a camptotecina foram conduzidos com o seu sal sódico, uma vez que a baixa solubilidade deste fármaco limitava a sua utilização pela via intravenosa. Embora a atividade antitumoral tenha sido observada em pacientes com câncer gastrointestinal, a verificação da toxicidade medular e outras não hematológicas foi considerada severa para prosseguir com outros testes. Os efeitos colaterais observados incluíram mielossupressão, toxicidade gastrointestinal, cistite hemorrágica e alopecia. A mielossupressão, principalmente caracterizada pela leucopenia e trombocitopenia, foi o efeito dose-limitante. Náuseas, vômitos e diarreia foram ocasionalmente severas em pacientes que receberam múltiplas doses de CPT sódica (MOERTEL *et al.*, 1972, MUGGIA *et al.*, 1972, SLICHENMYER *et al.*, 1993).

Estudos posteriores evidenciaram que a manutenção do anel lactônico da CPT era crucial para a atividade antitumoral. Entretanto, a porção lactônica da molécula é suscetível à hidrólise espontânea, formando a correspondente forma carboxilada. Apesar da forma carboxilada possuir solubilidade aquosa superior, é cerca de 10 vezes menos potente, explicando os resultados obtidos nos ensaios clínicos (HERTZBERG *et al.*, 1989; GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002). A abertura do anel lactônico da CPT e formação da forma carboxilada ocorre em um processo em que o equilíbrio entre as duas formas é altamente dependente do pH. Sob condições ácidas (pH < 4) a estrutura lactônica predomina, enquanto em valores de pH >10, a forma carboxilada está exclusivamente presente (Figura 4). No pH fisiológico, o equilíbrio favorece a formação da forma carboxilada, sendo também afetado pela ligação do fármaco à albumina. A diferença na afinidade pela albumina da forma carboxilada sobre a lactônica é cerca de 200 vezes maior, alterando significativamente o equilíbrio em favor da inativação do fármaco. Como resultado



final, 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 pH 7,4, o anel lactônico da camptotecina abre rapidamente e, 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).



**Figura 4.** Representação da conversão da forma lactônica da CPT em carboxilada.

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 limita a sua difusibilidade através da bicamada lipídica das células. Finalmente, experimentos em cultura de células evidenciaram que a abertura do anel resulta na atenuação da atividade do fármaco contra a Topoisomerase I. Estes fatores contribuem conjuntamente com a diminuição da atividade citotóxica da CPT (HATEFI e AMSDEN, 2002).

O interesse na utilização terapêutica da camptotecina foi retomado com a descoberta do mecanismo único para um alcalóide, envolvendo a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores. A topoisomerase I é uma enzima nuclear presente em virtualmente todas as 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 DNA espiralado, induzindo o corte na porção fosfodiéster de uma fita simples,

permitindo que a fita intacta passe através deste corte e religando, após, a fita de DNA. Durante o curso deste processo catalítico, uma ligação covalente é estabelecida entre um grupo tirosina do sítio ativo da Topo I e um grupo fosfato 3' presente ao longo da estrutura do ADN, formando o complexo de clivagem (SLICHENMYER *et al.*, 1990; SINHA, 1995). A camptotecina se liga covalentemente à Topo I, estabilizando o complexo DNA-enzima e inibindo fortemente a reação de religação, 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 da CPT pode ser então atribuída à interrupção da replicação pela estabilização do complexo DNA-enzima-fármaco, resultando no rompimento da dupla fita e, conseqüentemente, impedindo a síntese do RNA. A CPT é, portanto, um fármaco ciclo-celular específico da fase S (FASSBERG e STELLA, 1992; HERBEN *et al.*, 1998).

### 3.3.2 Sistemas de liberação de camptotecinas

A camptotecina é um alcalóide natural muito pouco solúvel em água, inviabilizando a preparação de soluções destinadas à administração intravenosa. Por esta razão, vários análogos têm sido sintetizados, na tentativa de manter as características essenciais da molécula para a citotoxicidade e produzir derivados solúveis em condições fisiológicas. 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). 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-lactama e 20-deoxi-camptotecina) demonstraram-se inativos (HERBEN *et al.*, 1998; ZUNINO *et al.*, 2002). Desta maneira, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos tem sido objeto de inúmeros estudos visando melhorar a eficácia terapêutica da camptotecina e seus derivados. Os diferentes sistemas de liberação estudados e os resultados de atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* serão descritos a seguir. Um resumo dos benefícios produzidos pela incorporação das

camptotecinas em sistemas de liberação é apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Melhorias das propriedades das camptotecinas proporcionada pelo emprego de sistemas de liberação.

	<b>Efeito benéfico relatado</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Referência</b>
<b>Microencapsulação</b>	Prolongamento da liberação, manutenção da forma lactônica, redução dos efeitos colaterais indesejáveis, aumento da citotoxicidade <i>in vitro</i>	10-HCPT	SHERENDOVA <i>et al.</i> (1997), MALLERY <i>et al.</i> (2001).
		CPT	ERTL <i>et al.</i> (1999), KUMAR <i>et al.</i> (2001), DORA <i>et al.</i> (2006), Aiping <i>et al.</i> (2006).
		CPT-11	NISHINOVA <i>et al.</i> (2006).
<b>Hidrogéis poliméricos</b>	Prolongamento da liberação, aumento da supressão do tumor	CPT	LIU <i>et al.</i> (2006)
		TPC	LALLO <i>et al.</i> (2006)
<b>Lipossomas e emulsões</b>	Manutenção da forma lactônica, aumento da citotoxicidade <i>in vitro</i> , aumento da internalização celular, redução da toxicidade	CPT	BURKE & MISHRA (1993), CORTESI <i>et al.</i> (1997), KOSHKINA & GILBERT (1999)
		CPT, 10-HCPT, SN-38	LUNDBERG (1998)
		9-NC	KNIGHT & KOSHKINA (1999), KNIGHT <i>et al.</i> (2002)
<b>Nanoencapsulação</b>	Alteração do perfil farmacocinético e da biodistribuição, aumento do tempo de permanência do fármaco na circulação sistêmica (nanopartículas revestidas com polímeros hidrofílicos), aumento da eficácia terapêutica <i>in vivo</i> , redução dos efeitos colaterais indesejáveis.	CPT	YANG <i>et al.</i> (1999a, 1999b), MIURA <i>et al.</i> (2004), TYNER <i>et al.</i> (2004), NECKEL <i>et al.</i> (2007), KUNNI <i>et al.</i> (2007).
		CPT-11	ONISHI <i>et al.</i> (2003)
		HCPT-1	ZHANG <i>et al.</i> (2004)
<b>Micelas poliméricas</b>	Acúmulo do fármaco no tumor, aumento da solubilidade aquosa, aumento da citotoxicidade <i>in vitro</i> , manutenção da forma lactônica, aumento da captura pelas células.	CPT	MU <i>et al.</i> (2005), KOO <i>et al.</i> (2005), KAWANO <i>et al.</i> (2006)
<b>Conjugados macromoleculares</b>	Aumento da estabilidade plasmática, prolongamento da retenção do fármaco no tumor.	CPT-polímero (pró-fármaco)	ZUNINO <i>et al.</i> (2002)

CPT: Camptotecina, HCPT: 10-hidroxicamptotecina, HCPT-1: 10-hidroxicamptotecina-10,20-diisobutil dicarbonato, TCP: topotecano, 9-NC: 9-nitrocampotecina, CPT-11: irinotecano (pró-fármaco), SN-38: produto de hidrólise do irinotecano (derivado ativo).

### 3.3.2.1 Microencapsulação

Dentre as estratégias testadas para o controle da liberação das camptotecinas, o prolongamento da liberação tem apresentado resultados promissores, especialmente com a microencapsulação de fármacos, utilizando polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Tal estratégia tem como objetivo encapsular sólidos e líquidos dentro de matrizes ou sistemas reservatórios, e oferecem inúmeras vantagens de emprego quando comparados as formas farmacêuticas convencionais, incluindo a melhoria na eficácia, redução da toxicidade, e melhoria do conforto e adesão do paciente ao tratamento. Com este objetivo, Sherendova e colaboradores (1997) prepararam microesferas de ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA) pela técnica de emulsão/evaporação do solvente, para prolongar a liberação da 10-hidroxicamptotecina (10-HCPT). 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. Quando administradas intraperitonealmente em camundongos inoculados com células de carcinoma de células escamosas oral humano, as microesferas conduziram ao aumento significativo da concentração intratumoral de 10-HCPT e à redução do tumor, contrastando com a ineficácia da administração do fármaco livre (MALLERY *et al.*, 2001).

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).

Recentemente, Dora e colaboradores (2006) demonstraram que microesferas de policaprolactona contendo camptotecina, quando administradas intraperitonealmente, inibiam o crescimento e a disseminação metastática pulmonar em camundongos tratados com células B16-F10 pela via intravenosa. Apesar das formulações de microesferas terem demonstrado eficácia similar àquela produzida pelo fármaco livre, os efeitos tóxicos dose-dependentes, notadamente a neutropenia, foram significativamente reduzidos em decorrência do prolongamento da liberação do fármaco. Os resultados podem ser relacionados ao fato das CPTs serem mais efetivas quando administradas em protocolos prolongados do que em altas doses em tratamentos de curta duração. Esta característica tem sido atribuída à atuação específica deste fármaco 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 que determina a resposta antitumoral é o tempo de exposição e não o aumento da dose (THOMPSON *et al.*, 1998). Estudos ainda relatam o controle da liberação do irinotecano a partir de microesferas de ácido poli (D,L-lactico) (NISHINOA *et al.*, 2005) e da camptotecina a partir de agregados de O-carboximetilquitosana (AIPING *et al.*, 2006).

### 3.3.2.2 Hidrogéis poliméricos

Hidrogéis poliméricos também têm sido considerados excelentes candidatos para o prolongamento da liberação da camptotecina, devido sua excelente biocompatibilidade e permeabilidade aquosa. Inicialmente, micelas de brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) foram usadas para solubilizar e imobilizar a camptotecina em formulações de hidrogéis de agarose. A presença de 50 mM de DTAB aumentou a solubilidade aquosa da CPT em cerca de 22 vezes, contribuindo para obtenção de uma distribuição mais homogênea e redução do coeficiente de

difusão do fármaco no hidrogel, sendo este último potencializado pela incorporação de  $\mu$ -carragenano (LIU, LI e CAI, 2006). Hidrogéis a base de polietilenoglicol reticulado com vinilsulfona foram usados para a incorporação de sistemas lipossomais contendo topotecano. A grande vantagem deste sistema reside no fato de ser injetado na forma líquida e se transformar imediatamente em um gel sólido após a injeção, evitando a necessidade de implantação cirúrgica. O controle da liberação *in vitro* e *in vivo* foi obtido com a utilização deste sistema de duas fases. Em estudos de atividade antitumoral, ratos inoculados com células de câncer de mama MAT B III singênico e tratados com a formulação de hidrogel contendo lipossomas de camptotecina demonstraram uma supressão do crescimento do tumor por um período mais prolongado e não exibiram perda de peso, quando comparado com grupos tratados com lipossomas e hidrogéis contendo topotecaco, separadamente (LALLO *et al.*, 2006).

### 3.3.2.3 Lipossomas e emulsões

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. 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. Neste trabalho, 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 elevada atividade antiproliferativa. LUNDBERG (1998) desenvolveu ésteres do ácido oleico da 10-HCPT e do SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), capazes de serem incorporados nas bicamadas dos lipossomas e emulsões lipídicas submicrônicas. As formulações lipídicas permitiram a estabilização dos fármacos frente à abertura do anel lactônico e a proteção frente à ligação com a albumina. Em termos de citotoxicidade, os ésteres associados aos vetores lipídicos demonstraram igual ou maior atividade contra células T-47D, uma

linhagem de células de câncer de mama, e contra células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2).

A aplicação da 9-nitrocampotecina (9-NC) na forma de um aerossol lipossomal foi testada no tratamento de camundongos xenotransplantados com cânceres de pulmão, cólon e mama (KNIGHT & KOSHKINA, 1999; KNIGHT, et al., 2002). Dando continuidade a este trabalho, Koshkina *et al* (1999) avaliaram as características farmacocinéticas e a distribuição tecidual da camptotecina lipossomal inalada. Neste estudo a liberação pulmonar da CPT demonstrou ser vantajosa em decorrência do mais baixo teor de albumina na superfície traqueo-bronquial e a mais rápida penetração do fármaco nos tumores, os quais contribuíram para a preservação da forma lactônica da molécula. Outras vantagens observadas no uso de lipossomas para liberação da CPT foram 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 aumentada, a necessidade de liberação sustentada em baixas doses por um longo período de tempo não foi atendida. A eliminação de lipossomas pelos macrófagos circulantes e a sua meia vida relativamente curta são as maiores desvantagens deste tipo de sistema de liberação.

#### 3.3.2.4 Nanopartículas e micelas poliméricas

Outra possível estratégia que visa melhorar a eficácia terapêutica das camptotecinas consiste na utilização de sistemas coloidais nanoparticulados. Yang e colaboradores (1999a, 1999b) prepararam nanopartículas sólidas lipídicas recobertas com poloxamer 188 pela técnica de homogeneização a quente. A concentração da CPT no sangue e em vários órgãos foi determinada após administração das nanopartículas pela via oral e pela via intravenosa em camundongos, 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 sistema de liberação prolongada promissor para a CPT, para administração oral. Por outro lado, a administração intravenosa das nanopartículas resultou no aumento da relação área sob a curva/dose e no 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 com diâmetro menor que 200 nm e revestidas com polímeros hidrofílicos apresentam a propriedade de escapar da captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear, sendo direcionadas a tecidos altamente permeáveis, resultando num fenômeno de vetorização passiva conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR; *do inglês enhanced permeability and retention effect*). Esta propriedade é decorrente da baixa adsorção de proteínas plasmáticas (opsonização), na qual é proporcionada por um efeito estérico e aumento do grau de hidrofilia da superfície das partículas, na presença do revestimento hidrofílico. A obtenção de partículas revestidas com polietilenoglicol foi empregada para melhorar as propriedades terapêuticas e reduzir a toxicidade do irinotecano (CPT-11), um pró-fármaco da 7-etilhidroxicamptotecina (SN-38). Em contraste à baixa eficácia observada após administração do CPT-11 em solução, a administração da suspensão de nanopartículas de ácido poli (D,L-láctico)/poli(etilenoglicol)-poli(propilenoglicol)-poli(etilenoglicol) (PLA/PEG-PPG-PEG) contendo este fármaco conduziu à supressão significativa do crescimento do tumor, no modelo de Sarcoma 180 em ratos. Este resultado foi relacionado à melhoria das propriedades farmacocinéticas do fármaco, visto que a concentração plasmática de CPT-11 foi mantida em níveis terapêuticos por um período maior quando administrado na forma de nanopartículas, permitindo um suprimento adequado da forma ativa ao tumor (ONISHI, MACHIDA e MACHIDA, 2003). Recentemente,



estudos demonstraram que as nanopartículas PLA/PEG-PPG-PEG contendo CPT conduziram ao prolongamento do tempo de residência plasmática do fármaco, sendo este liberado em grande extensão nos tecidos, em particular no fígado. As nanopartículas igualmente conduziram à maior redução da supressão do tumor, em relação ao fármaco livre, em modelo murino de Sarcoma 180 (KUNNI, ONISHI e MACHIDA, 2007).

Nanopartículas contendo a 10-hidroxicamptotecina-10,20-diisobutil dicarbonato (HCPT-1) foram preparadas a partir de policaprolactona-co-lactato-b-PEG-b-policaprolactona-co-lactato (PCLLA-PEG-PCLLA), apresentando unidades de polietilenoglicol com diferentes massas molares, 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 oferecem 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 sangüínea, mesmo 24 horas após a 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, que fornece um meio para que as partículas escapem da rápida captura pelos macrófagos teciduais (ZHANG *et al.*, 2004).

As propriedades antitumorais das nanopartículas de ácido poli láctico-co-metoxipolietilenoglicol contendo camptotecina, 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 sangüínea quando encapsulada nas nanopartículas. Em ratos inoculados com células de 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 da solução do fármaco. Além disso, a supressão total do tumor foi verificada no grupo tratado com as nanopartículas em 3 de 4 animais, 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.

As características de baixa solubilidade aquosa e baixa estabilidade em meio fisiológico tornam a camptotecina um excelente candidato para encapsulação em nanocápsulas poliméricas. As nanocápsulas destacam-se em relação aos sistemas matriciais pelo confinamento do fármaco na cavidade central das partículas, o que confere uma maior proteção do princípio ativo frente à degradação no meio biológico, permite a veiculação de moléculas hidrofóbicas, além de reduzir o efeito de liberação inicial (efeito burst) (COUVREUR *et al.*, 2002). A encapsulação da camptotecina em nanocápsulas convencionais e furtivas foi realizada, empregando o ácido poli (D,L-lático) (PLA) e copolímeros diblocos do ácido poli (D,L-lático) e polietilenoglicol (PLA-PEG 49kD e 66kD), respectivamente. A eficiência de encapsulação da CPT variou de 76 a 97 %, dependendo da formulação testada. A presença das cadeias de polietilenoglicol na superfície das nanocápsulas foi evidenciada pela redução de ambos diâmetro médio e potencial zeta das partículas. A liberação *in vitro* da CPT a partir das nanocápsulas não foi afetada pela natureza do polímero, mas a barreira polimérica retardou a liberação do fármaco (NECKEL e LEMOS-SENNA, 2005). Após administração intraperitoneal na dose de 0,5 mg/Kg, as suspensões de nanocápsulas de PLA-PEG 49 kD demonstraram ser mais efetivas na redução do número de metástases pulmonares em camundongos tratados com células de melanoma B16-F10, quando comparado com a administração do fármaco livre. A neutropenia, principal efeito tóxico da camptotecina, não foi verificada em nenhum dos grupos tratados com o fármaco, provavelmente em decorrência da baixa dose administrada. A maior eficácia das suspensões de nanocápsulas peguiladas foi atribuída à proteção do fármaco pela nanoencapsulação e à redução da captura das partículas pelos macrófagos dos linfonodos. Tal hipótese pode ser suportada pelos estudos *in vitro*, os quais evidenciaram que tanto as suspensões de nanocápsulas convencionais (PLA) como as furtivas (PLA-PEG) exibiram atividade citotóxica significativamente maior que o fármaco livre (NECKEL *et al.*, 2007).

Ainda, como novos sistemas de liberação, os nanobiohíbridos têm sido propostos para veicular a 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 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 sobrevida quando comparado com as células não tratadas ou incubadas na presença do tensoativo e do hidróxido de magnésio e alumínio. Além de aumentar a solubilidade aquosa da camptotecina em três vezes, os autores sugerem que a modificação da superfície das partículas fornece um meio promissor para a vetorização de fármacos em sítios específicos de ação.

Outra estratégia que tem sido empregada para melhorar as propriedades terapêuticas da camptotecina e seus análogos consiste em solubilizá-los no interior de micelas poliméricas. Micelas de pequeno tamanho (10-100 nm) são acumuladas em tecidos doentes cuja vascularização é mal formada, além de poderem ser esterilizadas por uma simples filtração em membranas de 0,2  $\mu\text{m}$ . Micelas mistas constituídas de D- $\alpha$ -tocoferol-succinato de polietilenoglicol 1000 (TPGS) e polietilenoglicol-fosfatidiletanolamina (PEG-PE), apresentando cerca de 12 nm, foram usadas para solubilizar a camptotecina. A citotoxicidade *in vitro* do CPT nas micelas foi avaliada em células de carcinoma pulmonar de Lewis murino, células de adenocarcinoma colórectal e células de adenocarcinoma de mama e, em todas as linhagens, as micelas mistas demonstraram maior citotoxicidade que o fármaco livre. Além do aumento da solubilidade da CPT, a manutenção da forma lactônica no interior hidrofóbico e a maior captura das micelas pelas células, foram os fatores que conduziram o aumento da citotoxicidade (MU *et al.*, 2005). Em um outro estudo, a camptotecina foi solubilizada em micelas de diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG2000), numa concentração cerca de 25 vezes maior que a solubilidade do fármaco em tampão acetato pH 5,0. A citotoxicidade do fármaco nas micelas mostrou-se semelhante a do fármaco livre em linhagem de

câncer de mama MCF-7, após 24 horas de incubação. Entretanto, após 96 horas, a citotoxicidade das micelas foi cerca de três vezes maior àquela do fármaco livre, em decorrência da melhoria da estabilidade do fármaco no meio de cultura e maior exposição do fármaco na fase S do ciclo celular. Do ponto de vista tecnológico, a liofilização das micelas sem a adição de crioprotetores e a reconstituição sem alteração das suas características iniciais foram ainda considerados aspectos vantajosos da utilização deste sistema na terapêutica (KOO *et al.*, 2005). A eficácia terapêutica de micelas constituídas do copolímero do poli (etilenoglicol) e poli(benzil aspartato-70) contendo a camptotecina foi avaliada em modelo de cólon-26 murino. O crescimento do tumor foi significativamente reduzido após administração de uma única administração de CPT na forma micelar na dose de 15 e 30 mg/Kg, sendo a inibição provocada comparável à administração de três doses consecutivas de 10 mg/kg/dia. O acúmulo do fármaco no tumor, devido ao efeito EPR, foi verificado quando a forma micelar foi administrada em camundongos (KAWANO *et al.*, 2006).

### 3.3.2.5 Conjugados de camptotecinas

Uma estratégia diferente emprega a utilização de pró-fármacos de CPTs ligados covalentemente a macromoléculas, apresentando ou não cargas. Entre os polímeros neutros, dois têm preenchido 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 espaçadores aminoácidos, com o objetivo de obter uma maior solubilidade aquosa. 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 xenógrafos, além de uma baixa toxicidade sistêmica. Resultados preliminares em ensaios clínicos de fase I indicaram um comportamento similar em humanos (ZUNINO *et al.*, 2002).

## 4. METODOLOGIA

## 4.1 MATERIAIS

### 4.1.1 Matérias-primas

- Camptotecina (Sigma-Aldrich Co., EUA);
- Lecitina S 75-3 N (SP Pharma, Brasil);
- Óleo de Oliva (Lipoid GmbH, Germany);
- Óleo de Soja (Lipoid GmbH, Germany);
- Óleo de Rícino (Lipoid GmbH, Germany);
- Pluronic F 68 (BASF Chemical Company, EUA);
- Poli (DL-ácido láctico)-co-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG 49 e 66,6 kD) (Alkermes Inc., EUA);
- Poli (DL-ácido láctico) (PLA, 90-120 kD) (Sigma-Aldrich, EUA).

### 4.1.2 Solventes e reagentes

Todos os solventes, com exceção dos utilizados na análise CLAE, possuíam grau de pureza para análise (P.A.)

- Acetona (Synth);
- Ácido fosfórico xaroposo concentrado (Vetec);
- Dimetilsulfóxido (Vetec);
- Fosfato monobásico de potássio anidro (Vetec);
- Metanol para CLAE (Vetec);
- Etanol (Vetec, Dinâmica).

### 4.1.3 Cultura de células

- Ácido clorídrico (Darmstat, Alemanha);
- Ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES) (Sigma,

USA);

- Brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT) (Sigma, EUA)
- Estreptomicina (Gibco, EUA);
- Isopropanol (Darmstat, Alemanha);
- Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab, Brasil);
- Penicilina (Gibco, EUA);
- Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- Tris(hidroximetil)aminometano (Darmstat, Alemanha);

#### **4.1.4 Equipamentos e materiais de consumo**

- Agitador magnético Are – Velp científica;
- Analisador Termogravimétrico, detector tipo TGA-50 (Shimadzu);
- Calorímetro diferencial de varredura, detector tipo DSC-50 (Shimadzu);
- Capela de fluxo laminar vertical Pachane;
- Centrifuga Sigma 2-15, rotor 12148;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A system equipado com LC-10AD bombas, SPD-10AV; Injetor 80665 para CLAE; Class-VP;
- Espectrofluorímetro F4500 HITACHI;
- Espectrofotômetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 10;
- Espectrofotômetro Ressonância Magnética Nuclear Bruker 400 MHZ (Varian Mercury Plus);
- Evaporador Rotatório Quimis Q-344B2;
- Instrumentos cirúrgicos inoxidáveis;
- Leitor de microplacas (Organon Teknika Microwell System Reader, Bélgica);
- Membrana Éster de Celulose Spectra/Por CE MWCO 10000;
- PH metro – pH meter model PHS-3B (Labmeter model pH 2);
- Spectra/Por Closerus;
- Ultrasson Ultrasonic Cleaner Unique 1400 USC;
- Viscosímetro Cannon Fenske AS 350 (Schott);

- Vortex Mixer, modelo VS-1300V
- Zetasizer 3000 HS Malvern Instruments.

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Caracterização dos materiais poliméricos

Os polímeros PLA de massa molecular entre 90 a 120 kD e PLA-PEG de massas moleculares 49 e 66,6 kD foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e ressonância magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H).

#### 4.2.1.1 Calorimetria exploratória diferencial

Cerca de 10,0 mg de cada amostra foram exatamente pesados em cápsula de alumínio, as quais foram seladas. As cápsulas foram então resfriadas a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  e aquecidas até  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  na velocidade de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , sob atmosfera de nitrogênio ( $50\text{ mL}/\text{min}$ ), em um aparelho DSC-50 (Shimadzu), calibrado com índio metálico ( $T_m$   $156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e zinco ( $T_m$   $419,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) foi obtida a partir do ponto médio entre as linhas de base antes e após a transição, e a temperatura de fusão ( $T_m$ ) foi obtida a partir do pico do sinal endotérmico.

#### 4.2.1.2 Termogravimetria

Cerca de 10,0 mg de cada amostra, exatamente pesadas, foram aquecidas em cápsula de platina na faixa de temperatura de  $10$  a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ , na velocidade de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , utilizando termobalança TGA-50 (Shimadzu), sob atmosfera de nitrogênio, calibrado com padrão de oxalato de cálcio.



#### 4.2.1.3 Ressonância magnética nuclear $^1\text{H}$

As amostras foram solubilizadas, separadamente, em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e os espectros de RMN- $^1\text{H}$  foram obtidos a 400 MHz usando um equipamento de ressonância magnética nuclear Bruker e tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

#### **4.2.2 Preparação e caracterização das suspensões coloidais de nanocápsulas brancas**

##### 4.2.2.1 Preparação das suspensões coloidais

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 e o óleo foram solubilizados em 2,0 mL de acetona e misturados a 10 mL de uma solução de lecitina (2,5 mg/mL) em acetona/etanol (60:40). Esta solução foi adicionada, com um auxílio de uma pipeta Pasteur, sob agitação magnética, em 26,0 mL de uma fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico ajustada a pH 5,0 com ácido fosfórico. As suspensões de nanocápsulas foram instantaneamente formadas e em seguida foram levadas à evaporação sob pressão reduzida para a eliminação do solvente orgânico e concentração até volume desejado. A composição das formulações testadas encontra-se demonstrada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Formulações testadas na seleção do óleo das suspensões de nanocápsulas brancas.

	Formulação								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Fase Orgânica</b>									
<b>Polímero (mg)</b>									
PLA-PEG (49 kD)	60	60	60						
PLA-PEG (66,6 kD)				60	60	60			
PLA							60	60	60
<b>Óleos (µL)</b>									
Oliva	250			250			250		
Rícino		250			250			250	
Soja			250			250			250
Solução de Lecitina									
2,5 mg/mL em acetona: etanol (60:40) (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>Fase Aquosa</b>									
Solução de Pluronic									
F68 0,375% (p/v) pH 5,0 (mL)	26	26	26	26	26	26	26	26	26

PLA-PEG: Poli (DL-ácido láctico)-co-polietilenoglicol

PLA: Poli (DL-ácido láctico)

#### 4.2.2.2. Caracterização físico-química das suspensões coloidais

##### 4.2.2.2.1 Avaliação das características macroscópicas

As suspensões de nanocápsulas foram visualizadas macroscopicamente e analisadas quanto à formação de agregados de partículas, presença de sedimentos e separação de fases, logo após a sua preparação (tempo zero) e após 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento.

#### 4.2.2.2.2 Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica das partículas

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das nanocápsulas foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica usando um Zetasizer Nano Series (M

#### 4.2.2.2.3 Determinação do potencial zeta

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. As medidas foram realizadas em um equipamento Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Reino Unido).

#### 4.2.2.2.4 Viscosidade cinemática

A viscosidade cinemática das suspensões coloidais de nanocápsulas foi determinada em Viscosímetro capilar Cannon-Fenske AVS 350 (Schott, Alemanha). Para tal, 7,0 mL de cada suspensão de nanocápsula foram transferidos para um capilar de número 100 (0,63mm), o qual foi mantido a temperatura constante de  $25 \pm 1$  °C em banho termostaticado. O tempo médio de escoamento de 10 medidas foi determinado e a viscosidade cinemática  $V$  foi calculada usando a seguinte equação:

$$V = k(t - \vartheta)$$

onde:  $V$  = viscosidade cinemática ( $\text{mm}^2/\text{s}$  ou cSt)

$k$  = constante relacionada ao capilar numero 100 ( $k = 001527 \text{ mm}^2/\text{s}$ )

$t$  = tempo de escoamento (s)

$\vartheta$  = fator de correção da energia cinemática (s)

### **4.2.3 Preparação e caracterização das suspensões coloidais de nanocápsulas contendo camptotecina**

#### 4.2.3.1 Determinação da solubilidade da camptotecina no componente oleoso das formulações

Uma quantidade de 5,0 mg de camptotecina foi adicionada em 10,0 mL dos óleos de soja, rícino e oliva e as misturas foram mantidas sob ultra-som durante 2 horas. Após repouso de 24 horas, as misturas foram centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram removidos, diluídos em metanol na proporção de 1:10 e analisados quanto ao teor de camptotecina por CLAE, segundo metodologia descrita em 2.3.2.1. Os óleos foram tratados e analisados da mesma maneira que os sobrenadantes para garantir ausência de interferência na quantificação do fármaco.

#### 4.2.3.2 Preparação das suspensões coloidais

Suspensões coloidais de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG (49 e 66,6 kD) contendo camptotecina foram preparadas pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação) descrita por FESSI e colaboradores (1989). Brevemente, o polímero, o óleo e uma solução de camptotecina (1,0 mg/mL em DMSO) foram solubilizados em 2,0 mL de acetona e misturados a 10 mL uma solução de lecitina (2,5 mg/mL) em acetona/etanol (60:40), com o mesmo solvente. Esta solução foi adicionada, com um auxílio de uma pipeta pasteur e sob agitação magnética, em 26 mL de uma fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico ajustada a pH 5,0 com ácido fosfórico. As suspensões de nanocápsulas foram instantaneamente formadas e em seguida foram levadas à evaporação sob pressão reduzida para a eliminação do solvente orgânico e concentração até volume desejado. As suspensões resultantes foram filtradas, após 24h de repouso, em unidade de filtração Millex AA 0,8 µm (Millipore, EUA).

#### 4.2.3.2.1 Delineamento estatístico

Um plano de experimentação fatorial do tipo  $3^3$  foi utilizado com o intuito de avaliar a influência de fatores da formulação (variáveis independentes) sobre o teor de fármaco nas nanocápsulas (variável dependente). Os dois fatores selecionados foram o tipo de polímero (fator A) e o tipo de óleo (fator B) empregados nas formulações. Estes fatores foram avaliados em três níveis, superior (+), intermediário (0) e inferior. Assim para o fator A os níveis estabelecidos foram PLA (+), PLA-PEG 49 kD (0) e PLA-PEG 66,6 kD (-) e para o fator B foram oliva (+), soja (0) e rícino(-). O plano de experimentação realizado encontra-se demonstrado na Tabela 3. Os experimentos foram realizados em triplicata e as formulações podem ser visualizadas na Tabela 4.

**Tabela 3.** Delineamento fatorial  $3^3$  empregado para avaliar a influência do tipo de polímero e de óleo sobre o teor de CPT nas suspensões de nanocápsulas.

Experimento	Fator A (tipo de polímero)	Fator B (Tipo de óleo)
1	+	+
2	+	0
3	+	-
4	0	+
5	0	0
6	0	-
7	-	+
8	-	0
9	-	-

**Tabela 4.** Formulações testadas na seleção do óleo das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina.

	Formulação								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Fase Orgânica</b>									
<b>Polímero (mg)</b>									
PLA-PEG (49kD)	60	60	60						
PLA-PEG (66kD)				60	60	60			
PLA							60	60	60
<b>Óleos (µL)</b>									
Oliva	250			250			250		
Rícino		250			250			250	
Soja			250			250			250
Solução de CPT 1,0 mg/mL em DMSO									
	500	500	500	500	500	500	500	500	500
(□L)									
<b>Solução de Lecitina</b>									
2,5 mg/mL em acetona: etanol (60:40) (mL)									
	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>Fase Aquosa</b>									
Solução de Pluronic F68 0,375% pH 5,0									
	26	26	26	26	26	26	26	26	26
(mL)									
PLA-PEG: Poli (DL-ácido láctico)-co-polietilenoglicol PLA: Poli (DL-ácido láctico) CPT: Camptotecina									

#### 4.2.3.3 Caracterização das suspensões coloidais contendo camptotecina

##### *4.2.3.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas*

##### **4.2.3.3.1.1 Determinação da concentração de camptotecina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

###### 4.2.3.3.1.1.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A incluindo uma bomba LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10AV, unidade controladora SCL-10Av, injetor de amostras Rheodyne 7125 e workstation Class VP. As análises foram realizadas em sistema de fase reversa e modo isocrático, nas seguintes condições: coluna Supercosil LC- 18 (15 cm x 4,6 mm ID, 5µm; (Supelco, EUA); fase móvel, metanol:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM (60:40, v/v) ajustada a pH 2,88 com ácido fosfórico; fluxo, 1,0 mL/min; volume de injeção, 20 µL e detecção no ultravioleta, 254 nm.

###### 4.2.3.3.1.1.2 Validação da metodologia analítica

Foram avaliados e determinados os seguintes parâmetros de desempenho analítico para a validação da metodologia de CLAE: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e robustez.

##### ***Especificidade***

A especificidade foi avaliada pelo grau de interferência dos componentes das suspensões de nanocápsulas na quantificação do fármaco. Suspensões de nanocápsulas brancas de PLA, PLA-PEG (kD 49) e PLA-PEG (kD 66) foram

preparadas e tratadas da mesma maneira que as amostras. As análises foram realizadas em triplicata.

### **Linearidade**

A linearidade foi verificada através da construção de uma curva de calibração na faixa de concentração de 0,5 a 3,0 µg/mL. Cerca de 10 mg de camptotecina, exatamente pesados, foram dissolvidos em 10,0 mL de DMSO, em balão volumétrico. Uma alíquota de 0,5 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com metanol. Esta solução foi diluída para obter soluções de camptotecina nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 µg/mL em metanol, em balão volumétrico. As soluções foram injetadas no cromatógrafo líquido 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 de regressão linear.

### **Precisão**

A precisão do método foi avaliada por meio da determinação da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (inter-dia), ambos expressos pelo coeficiente de variação percentual (CV%). A precisão foi avaliada pela contaminação com camptotecina nas suspensões de nanocápsulas brancas de PLA, PLA-PEG (49 kD) e PLA-PEG (66,6 kD) com uma solução padrão de CPT correspondendo a concentração final de 1,5 µg/mL. A repetibilidade foi obtida pela injeção de seis amostras de cada suspensão de nanocápsula no mesmo dia, sob as mesmas circunstâncias experimentais. A precisão intermediária foi analisada pela injeção das amostras em 3 dias diferentes.

### **Exatidão**

A exatidão foi investigada por meio da contaminação amostras de suspensões de nanocápsulas brancas de PLA, PLA-PEG (49 kD) e PLA-PEG (66,6 kD) com soluções de concentração conhecidas de CPT, correspondendo a concentrações finais de 0,75; 1,5 e 3,0 µg/mL. A recuperação (R %) do padrão adicionado foi determinada, em triplicata, e em cada nível conforme a equação:



$$R(\%) = \frac{C_{nc} - B_{nc}}{SP_{cpt}} \times 100$$

onde:

R (%) = recuperação

C<sub>nc</sub> = concentração de CPT nas suspensões de nanocápsulas contaminadas (µg/mL);

B<sub>nc</sub> = concentração de CPT nas suspensões de nanocápsulas brancas (µg/mL);

SP<sub>cpt</sub> = concentração de CPT das soluções padrões.

### **Limite de quantificação**

O limite de quantificação (LOQ) foi calculado a partir da curva de calibração. Este valor é definido como sendo a mais baixa concentração na curva de calibração que pode se medida, com aceitável precisão e exatidão. LOQ é calculado a partir da equação  $LOQ = \left( \frac{10\delta}{S} \right)$ , onde  $\delta$  é o desvio padrão do intercepto das três curvas lineares e S inclinação da curva média de calibração.

### **Robustez**

A robustez foi avaliada pela determinação da eficiência de encapsulação da CPT nas suspensões de nanocápsulas, sob pequenas variações nas condições cromatográficas, incluindo variação na proporção dos solventes da fase móvel, temperatura e fluxo.

#### **4.2.3.3.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas**

A concentração de camptotecina foi determinada após preparação das nanocápsulas e completa dissolução em 1,0 mL de DMSO seguido da diluição com metanol até volume de 10,0 mL (concentração total) e no sobrenadante obtido

após separação das partículas por ultrafiltração/centrifugação, empregando-se unidades Ultrafree-MC 300000 (Millipore), a 4500 rpm por 30 minutos (concentração do sobrenadante). As amostras foram analisadas por CLAE nas condições descritas em 2.3.2.1. 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 sobrenadante. O teor de fármaco nas suspensões foi expresso em concentração percentual (% p/v). A taxa de recuperação (%) de camptotecina foi calculada com sendo a diferença percentual entre a quantidade inicialmente adicionada e aquela encontrada nas suspensões.

#### *4.2.3.3.2 Determinação do diâmetro médio e potencial zeta*

O diâmetro médio e potencial zeta das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina foram determinados conforme descrito em 4.2.2.2.2 e 4.2.2.2.3, respectivamente.

### **4.2.4 Avaliação do perfil de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas**

#### 4.2.4.1 Determinação da concentração de camptotecina por espectrofluorimetria

##### *4.2.4.1.1 Condições fluorimétricas*

A análise da concentração de camptotecina no meio de liberação foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência F-4500 HITACHI. Os ensaios foram realizados sob as seguintes condições: (i) comprimentos de onda; excitação 360 nm e emissão, 370-540 nm, e (ii) slit, 5,0. Uma solução de tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% (p/v) de Tween 80 foi empregada como branco e a intensidade de fluorescência foi obtida no comprimento de absorção máximo (430,8 nm). Os dados

obtidos dos espectros de fluorescência foram exportados como arquivos ASCII e analisados usando o programa Origin versão 7.0.

#### 4.2.4.1.2 Linearidade

A linearidade foi verificada através da construção de uma curva de calibração na faixa de concentração de 0,06 a 0,30  $\mu\text{g/mL}$ . Cerca de 10 mg de camptotecina, exatamente pesados, foram dissolvidos em 10,0 mL de DMSO, em balão volumétrico. Uma alíquota de 0,5 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume completado com solução de tampão fosfato pH 7,4 contendo tween 2% (p/v). Esta solução foi diluída para obter soluções de camptotecina nas concentrações de 0,06; 0,10; 0,14; 0,22; 0,30  $\mu\text{g/mL}$ , em balão volumétrico. As soluções foram analisadas no fluorímetro, em triplicata, e as médias das áreas dos espectros de emissão das amostras 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.

#### 4.2.4.2 Ensaio de liberação

Uma alíquota de 2,0 mL de cada suspensão de nanocápsulas ou de uma solução de CPT a 20  $\mu\text{g/mL}$  foi adicionada no interior de saco de diálise (Spectra/Por CE MWCO 10000). O saco de diálise, devidamente fechado, foi colocado em béquer contendo 200 mL de uma solução tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% (p/v) de Tween 80, para assegurar as condições sink. Os sistemas foram mantidos sob agitação a 37 °C e alíquotas de 3,0 mL foram coletadas nos tempos 0; 0,33; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 72 e 96 horas. O volume da amostra retirada foi imediatamente repostado com o meio de liberação. As amostras foram analisadas por espectrofluorimetria conforme descrito em 4.2.4.1.1. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de camptotecina foi determinada através da equação da reta conforme obtido em 4.2.4.1.2. A partir dos resultados calculados, curvas de liberação da CPT (%) *versus* tempo (horas) foram plotadas.

## 4.2.5 Ensaio de citotoxicidade

### 4.2.5.1 Cultura de células

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas linhagens de células de leucemia linfoblástica aguda murina L1210 e de leucemia mielomonocítica murina WEHI-3B. As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM tampão HEPES pH 7.4, em estufa humidificada a 37°C e com 5% CO<sub>2</sub>. Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (0,5%).

### 4.2.5.2 Tratamento das células

Uma solução de camptotecina 1,0 mg/mL em DMSO e as suspensões coloidais de nanocápsulas de PLA, PLA-PE 49 kD e PLA-PEG 66,6 kD contendo camptotecina foram diluídas no meio de cultura de modo a obter concentrações de 0,001; 0,01 e 0,1 µg/mL de fármaco. As suspensões coloidais de nanocápsulas brancas foram diluídas da mesma maneira aquelas contendo fármaco.

### 4.2.5.3 Ensaio de viabilidade celular (teste do MTT)

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio) (VAN DE LOOSDRECHT *et al.*, 1991). Brevemente, 5 x 10<sup>4</sup> células leucêmicas L1210 e WEHI-3B foram incubadas com a camptotecina (fármaco livre), as suspensões coloidais de nanocápsulas contendo o fármaco, por 48 horas em placas com 96 poços. Após o tratamento, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Um novo meio de cultura e o MTT (0,25 mg/mL) foram então adicionados. Após incubação por 3 horas a 37°C, as placas foram centrifugadas novamente, e o sobrenadante removido. O precipitado de

formazan foi dissolvido com uma solução ácida de isopropano (álcool isopropílico, HCL 4N) e a absorvância da solução foi medida a 540 nm em leitor de microplacas (Organon Teknika Microwell System Reader, Bélgica). A densidade óptica obtida com o grupo controle, ou seja, das células sem tratamento, foi considerada como 100% de células viáveis. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.5.4 Análise estatística

Os resultados de citotoxicidade obtidos após o tratamento das células com o fármaco livre e as suspensões de nanocápsulas brancas e contendo camptotecina foram analisados e comparados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey, usando o software Graph Pad Prim (São Diego, USA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS POLIMÉRICAS

O poli (ácido lático) é um poliéster relativamente hidrofóbico, instável em condições úmidas e biodegradáveis a subprodutos atóxicos (ácido lático, dióxido de carbono e água), presentes no metabolismo dos animais e microorganismos. Por esta razão, este polímero tem sido material de escolha para a fabricação de inúmeros dispositivos implantáveis para aplicação médica e farmacêutica. Entretanto, devido ao seu caráter hidrofóbico, sua degradação *in vivo* ocorre predominantemente via processos celulares resultantes de reação inflamatória local (DRUMOND e WANG, 2004).

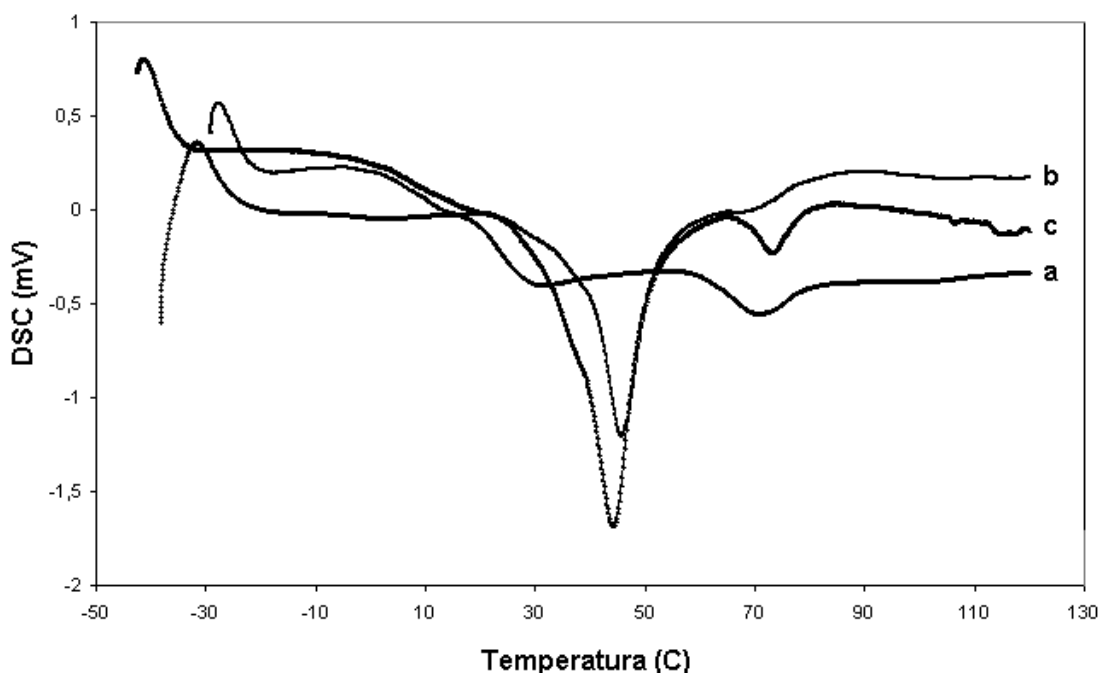
A sua elevada hidrofobicidade também é responsável pela rápida remoção de partículas submicrométricas ( $< 1 \mu\text{m}$ ) da circulação sistêmica, ocasionada pelo processo de opsonização (adsorção de proteínas plasmáticas), e reconhecimento e fagocitose pelas células do sistema fagocitário mononuclear (STOLNIK *et al.*, 1995). Por meio de modificação química do PLA com polietilenoglicol (PEG), um copolímero anfifílico em bloco é formado, o qual é mais suscetível a degradar por hidrólise, e apresenta menor potencial para adsorção de proteínas, sendo menos capaz de desencadear reações adversas. Além disso, nanopartículas de PLA-PEG podem permanecer no sistema circulatório por um período prolongado, em decorrência do caráter hidrofílico de sua superfície. Entretanto, a capacidade de escapar do reconhecimento e captura pelas células do SFM é altamente dependente do comprimento e da densidade das cadeias de PEG do copolímero (GREF *et al.*, 2000). Desta maneira, técnicas de análise térmica e de ressonância magnética nuclear foram realizadas para caracterizar os materiais poliméricos empregados na preparação das nanocápsulas e os resultados serão demonstrados a seguir.

### 5.1.1 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

A análise térmica engloba um grupo de técnicas nas quais uma propriedade da amostra é analisada em função do tempo ou temperatura, enquanto ela é aquecida ou resfriada, em uma atmosfera específica, numa proporção fixa de

mudança de temperatura ou temperatura constante. A aplicação de métodos térmicos de análise, em especial a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG) tem sido de fundamental importância na caracterização das matérias-primas e desenvolvimento de produtos farmacêuticos (GIRON, 2002).

A curva termoanalítica do PLA (Figura 5a) revelou uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de 23,85 °C, não apresentando evento endotérmico referente à fusão, caracterizando a sua natureza amorfa. O PLA é um polímero amorfo exibindo uma distribuição randômica de ambas formas isoméricas do ácido lático, sendo incapaz de se organizar em uma estrutura cristalina organizada. Esta forma permite, assim, uma dispersão mais homogênea do fármaco na matriz polimérica (MERKLI *et al.*, 1998).



**Figura 5.** Curvas de DSC dos polímeros (a) PLA, (b) PLA-PEG (49 kD) e (c) PLA-PEG 66,6 kD .

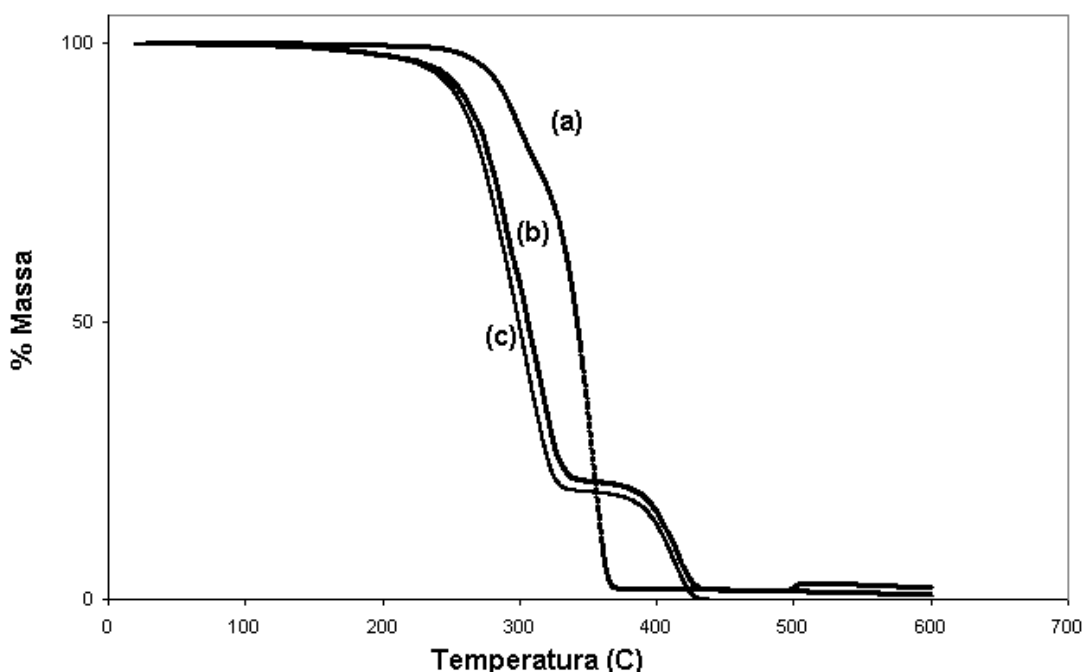
Os copolímeros em bloco PLA-PEG 49 kD e 66,6 kD (Figura 5b e 5c) evidenciaram uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de 7,97 e 6,43°C, respectivamente. O deslocamento da temperatura vítrea dos copolímeros, na ordem de 15°C, para uma temperatura inferior em relação ao PLA puro é descrito na literatura, sendo atribuído ao efeito plastificante do PEG sobre as cadeias do PLA (MARTIN *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2003; KULINSKI, *et al.*, 2005; PIORKOWSKA *et al.*,



2006). Como pode ser observado, na temperatura de aproximadamente 45°C ocorre um evento endotérmico tanto no copolímero PLA-PEG 49 kD quanto no PLA-PEG 66,6 kD sugerindo fusão do bloco PEG .

A curva termogravimétrica do PLA, como observado na Figura 6a, apresentou dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro na temperatura entre 116 a 314°C, com perda de massa de 22,80 %, e o segundo na temperatura entre 312 a 470 °C, com perda de massa de 76,38%. Estes eventos são atribuídos a decomposição térmica do polímero.

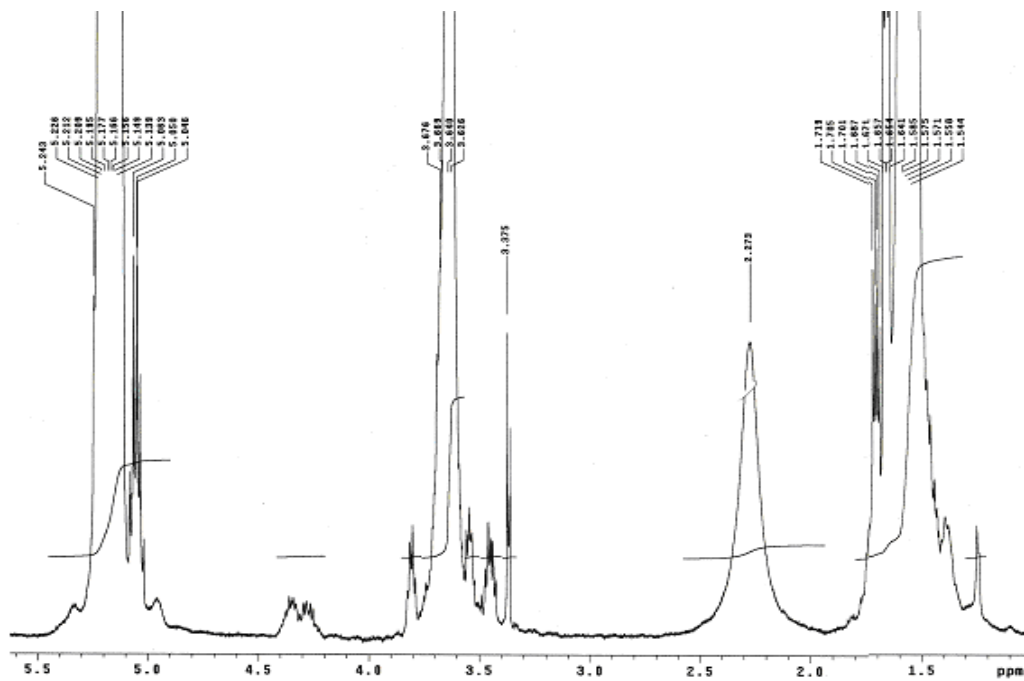
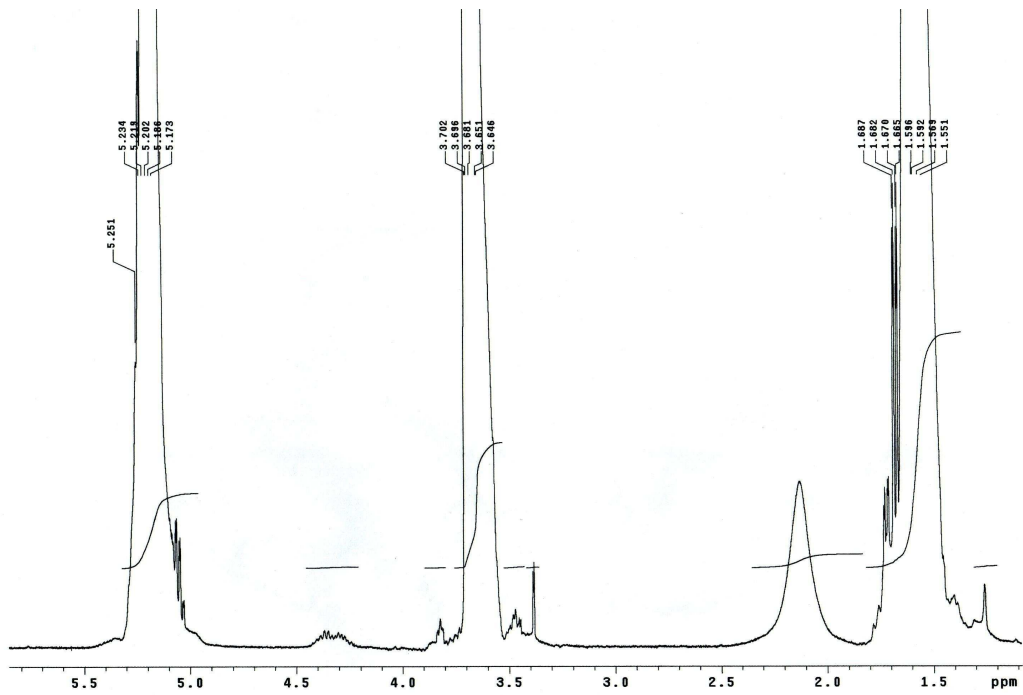
Nas curvas termogravimétricas dos copolímeros PLA-PEG 49 kD e 66,6 kD, (Figura 6b e 6c) dois estágios de degradação térmica podem ser observados, evidenciando a presença do copolímero. O copolímero PLA-PEG 49 kD apresentou perda de massa de 80,05% entre 110 a 347 °C, e de 19,78% entre 374 a 390°C. No copolímero PLA-PEG 66,6 kD, um perfil de decomposição semelhante pôde ser observado, com perda de massa de 78,51% entre 111 e 356 °C e de 20,04% entre 356 a 393 °C. O primeiro estágio tem sido atribuído à degradação a partir das terminações das cadeias do PLA e o segundo estágio, a alta temperatura, à cisão térmica da cadeia polimérica (DRUMOND e WANG, 2004).



**Figura 6.** Curvas de TG dos polímeros: (a) PLA, (b) PLA-PEG (49 kD) e (c) PLA-PEG (66 kD)

### 5.1.2 Ressonância magnética nuclear $^1\text{H}$ (RMN $^1\text{H}$ )

Análises de espectros de RMN- $^1\text{H}$  de copolímeros PLA-PEG permitem a caracterização da ligação entre PLA e PEG e a determinação da razão molar de ambos blocos nos copolímeros. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos copolímeros PLA-PEG 49 kD e 66,6 kD encontram-se demonstrados na Figura 7, e os valores de deslocamentos químicos observados estão de acordo com aqueles descritos na literatura (DU *et al.*, 1995). No espectro dos copolímeros, o multiplete em 4,1 - 4,3  $\delta$  é atribuído aos prótons metileno alfa terminais da cadeia do bloco PEG (PLA-COO-CH<sub>2</sub>) e aos prótons metinos finais de cadeia do bloco PLA. A presença deste multiplete é indicativo da ligação PLA-PEG. A razão molar PLA:PEG no copolímero foi estimada através do cálculo da razão entre a integração da área correspondente ao grupo metila do PLA (1,4-1,6  $\delta$ ) e a integração da área correspondente ao grupo metileno do PEG (3,4-3,7  $\delta$ ), multiplicado por 1,333 (DRUMOND e WANG, 2004). A razão molar calculada para os dois copolímeros analisados foi de aproximadamente 2,5; indicando que ambos copolímeros apresentam 20% de PEG na cadeia polimérica (Tabela 5).



**Figura 7.** Espectro de ressonância magnética nuclear RMN  $^1\text{H}$  dos copolímeros PLA-PEG 49 kD e (b) PLA-PEG 66,6 kD.

**Tabela 5.** Composição estimada de PLA:PEG nos copolímeros.

	LA <sup>a</sup> (1,4-1,6 δ)	OE <sup>a</sup> (3,4-3,7 δ),	Razão molar <sup>b</sup>
PLA-PEG 49 kD	52,97	28,66	2,46
PLA-PEG 66,6 kD	52,37	28,04	2,49

<sup>a</sup> Integração da área do pico correspondente ao grupo metila do PLA (LA) e metileno do PEG (OE), <sup>b</sup> Razão molar = (LA/OE) x 1,333.

## 5.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS BRANCAS (SEM FÁRMACO)

A técnica de nanoprecipitação, também denominada de método do deslocamento do solvente, foi primeiramente desenvolvida e patenteada por Fessi e colaboradores (1989). A nanoprecipitação ou nanodeposição é um processo simples, reproduzível e de fácil escalonamento, amplamente utilizado para obtenção de suspensões de nanopartículas (COUVRER *et al.*, 2002). Este método consiste na precipitação de um polímero previamente dissolvido em um solvente orgânico hidromiscível, como o etanol e a acetona, em uma fase aquosa contendo um estabilizante (MOSQUEIRA *et al.*, 2000). A formação das nanopartículas é instantânea e o procedimento inteiro é realizado em apenas uma etapa. A nanoprecipitação ocorre por meio de uma desolvatação rápida do polímero, quando a solução polimérica é adicionada à solução aquosa. O solvente orgânico difunde-se rapidamente na fase aquosa, e o polímero precipita, envolvendo o fármaco. A formação das nanopartículas é governada pelo efeito Marangoni, ou seja, o efeito da turbulência interfacial que ocorre entre a fase orgânica e a fase aquosa, causada por fenômenos de variações de fluxo e da tensão interfacial. A nanoprecipitação produz freqüentemente nanopartículas de pequeno tamanho e não requer grande velocidade de agitação, sonicação ou altas temperaturas, mas requer que o fármaco seja pouco solúvel em água, de modo a fornecer uma elevada taxa de encapsulação (BILATI *et al.*, 2004).

Quando a técnica de nanoprecipitação é usada na preparação de nanocápsulas, gotas submicrônicas 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 contra a coalescência. Misturas de surfactantes hidrofílico e lipofílico são freqüentemente requeridas para a redução do tamanho das partículas e aumento da estabilidade física da preparação (MOSQUEIRA *et al.*, 2000).

### **5.2.1 Avaliação das características macroscópicas das suspensões**

As características estruturais e físico-químicas das partículas, bem como a estabilidade das suspensões, têm demonstrado ser grandemente afetada pela composição das formulações. Assim, suspensões de nanocápsulas brancas foram preparadas utilizando os polímeros PLA e PLA-PEG 49 e 66,6 kD, e três diferentes óleos, rícino, soja e oliva, resultando em nove tipos de formulações. Todas as formulações testadas foram estabilizadas com Pluronic F68 (estabilizante hidrofílico) e lecitina (estabilizante hidrofóbico). O aspecto macroscópico das suspensões coloidais encontra-se resumido na Tabela 6. Como pode ser observado, suspensões leitosas e homogêneas são obtidas com todos os polímeros e óleos empregados. Entretanto, após 30 dias de armazenamento, a presença de agregados de partículas pôde ser observada na maioria das formulações testadas. O fenômeno de cremagem, decorrente da diferença de densidade entre fase dispersa e dispersante, foi observado em algumas formulações após 45-60 dias de armazenamento. Dentre as formulações testadas, aquelas contendo os polímeros PLA e PLA-PEG 49kD e óleo de rícino pareceram conduzir à obtenção de suspensões mais estáveis.

A natureza do óleo pode representar um importante fator na determinação das propriedades físico-química e estabilidade dos sistemas nanoparticulados (MOSQUEIRA *et al.*, 2000) além de influenciar, no caso das nanocápsulas, o diâmetro das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

**Tabela 6.** Características macroscópicas das suspensões de nanocápsulas brancas após a preparação (tempo zero) e após 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento.

Nanocápsulas		Aspecto Macroscópico				
		Tempo (dias)				
Polímero	Óleo	0	15	30	45	60
NC PLA	Oliva	+	+	+	++	+++
	Rícino	+	+	++	++	+++
	Soja	+	+	++	+++	+++
NC PLA-PEG (49 kD)	Oliva	+	+	++	++	++
	Rícino	+	+	+	+	++
	Soja	+	+	+	++	++
NC PLA-PEG (66 kD)	Oliva	+	++	++	++++	++++
	Rícino	+	+	++	++	+++
	Soja	+	++	++	++++	++++

+ = Homogênea, ++ = Agregado, +++ = Agregado com cremagem e ++++ = Separação de fases.

### 5.2.2 Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica das partículas

O diâmetro médio das nanocápsulas foi determinado por espectroscopia de correlação fotônica, conforme descrito em 4.2.2.2.2. 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, denominadobrowniano, 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, 2007).

Os resultados de diâmetro médio e índice de polidispersão das nanocápsulas, após preparo e 60 dias de armazenamento, encontram-se demonstrados na Tabela 7. Populações monodispersas de partículas foram obtidas com a utilização de PLA e PLA-PEG para os três óleos utilizados. Além disso, o baixo valor de diâmetro de partícula e de baixo índice de polidispersão foram considerados aceitáveis, não apresentando diferenças significativas entre as formulações testadas ( $p < 0,05$ ). Diversos autores têm relatado a redução do

diâmetro médio das partículas com a utilização de copolímeros em bloco, devido ao caráter anfifílico do mesmo (NECKEL & LEMOS-SENN, 2005). Entretanto, este efeito não foi observado neste estudo e provavelmente outros parâmetros de formulação foram preponderantes na obtenção do diâmetro das nanocápsulas. Por outro lado, após 60 dias de armazenamento, tanto as suspensões de nanocápsulas de PLA como de PLA-PEG 49 kD, preparadas com os diferentes óleos, exibiram um aumento considerável em ambos diâmetros médios e índices de polidispersão. Estes resultados corroboram com a formação de agregados observada na avaliação macroscópica das suspensões durante o armazenamento.

**Tabela 7.** Valores do diâmetro médio e índice de polidispersão (entre parêntesis) das nanocápsulas brancas.

Polímero	Óleo	Diâmetro médio iniciala (nm)	Diâmetro médio finalb (nm)
PLA	oliva	162 (0,15)	226 (0,26)
	ricino	167 (0,21)	256 (0,36)
	soja	166 (0,15)	266 (0,31)
PLA-PEG 49 Kd	oliva	193 (0,25)	233 (0,34)
	ricino	161 (0,22)	209 (0,41)
	soja	194 (0,26)	285 (0,40)
PLA-PEG 66,6 kD	oliva	260 (0,38)	Nd
	ricino	121 (0,18)	Nd
	soja	163 (0,23)	Nd

Diâmetros obtidos: <sup>a</sup>após à preparação (tempo zero) e após 60 dias de armazenamento. nd: não determinado

### 5.2.3 Determinação do potencial zeta

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, 2007).

Os fosfolipídeos (lecitinas), os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e de propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os poliésteres, como o PLA, e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que os poloxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (LEGRAND, 1999). Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SONVICO *et al.*, 2006).

Os valores de potencial zeta obtidos na caracterização das suspensões de nanocápsulas estão apresentados na Tabela 8 e estatisticamente não variaram (ANOVA,  $p < 0,05$ ) em função do tipo de polímero e óleo empregado. Além disso, todas as formulações apresentaram valores que propiciam boa estabilidade das suspensões. Alguns autores relatam que a presença de cadeias de PEG na superfície das partículas mascara os grupamentos carboxílicos terminais do PLA, levando à redução do potencial zeta (GREF *et al.*, 1999; NECKEL e LEMOS-SENNA, 2005). Este efeito não foi observado, indicando que a natureza do polímero não influenciou a carga de superfície. Neste caso, o potencial negativo observado em todas as formulações foi predominantemente conferido pela presença da lecitina, empregada como surfactante lipofílico, pois esta contém lipídeos, como o ácido fosfatídico, capazes de fornecer uma carga negativa líquida às partículas coloidais (ALONSO *et al.* 1997; AMELLER *et al.*, 2003). Com o uso da lecitina, a redução do potencial zeta tem ocorrido somente quando a densidade de PEG na superfície é elevada ou quando as cadeias de PEG são longas o bastante (AMELLER *et al.*, 2003; MOSQUEIRA *et al.*, 2001).



**Tabela 8.** Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas brancas

Óleo	Potencial Zeta (mV)		
	(M±δ; n = 3)		
	Polímero		
	PLA	PLA-PEG 49kD	PLA-PEG 66 kD
Oliva	-35,0 ± 0,6	-43,0 ± 3,3	-31,1 ± 0,2
Rícino	-37,4 ± 1,0	-34,5 ± 3,6	-34,6 ± 0,6
Soja	-38,3 ± 1,1	-37,9 ± 2,5	-42,2 ± 1,2

#### 5.2.4 Viscosidade das suspensões de nanocápsulas

Os resultados de viscosidade das formulações de PLA e PLA-PEG 49 e 66,6 kD, para os três óleos utilizados, encontram-se demonstrados na Tabela 9. Os valores de viscosidade variaram entre 1,14 e 1,32 cP e não pareceram diferir entre si. Apesar da influência da viscosidade do óleo sobre o diâmetro médio das partículas ter sido relatada na literatura (BOUCHEMAL et al., 2004), nenhuma correlação do tipo de óleo empregado com os resultados de tamanho de partícula e com a viscosidade final da preparação foi verificada, provavelmente devido à pequena quantidade de componente oleoso empregado nas formulações.

**Tabela 9.** Viscosidade das suspensões de nanocápsulas brancas.

Óleo	Viscosidade (cP)		
	(M±δ; n = 3)		
	Polímero		
	PLA	PLA-PEG 49kD	PLA-PEG 66 kD
Oliva	1,14 ± 0,01	1,19 ± 0,01	1,22 ± 0,02
Rícino	1,15 ± 0,00	1,15 ± 0,03	1,32 ± 0,06
Soja	1,15 ± 0,01	1,23 ± 0,01	1,25 ± 0,01

### 5.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE CONTENDO CAMPTOTECINA

#### 5.3.1 Determinação da solubilidade da camptotecina no componente oleoso das formulações

A incorporação de fármacos nas nanocápsulas tem demonstrado ser altamente dependente do seu grau de lipofilia, do pH da fase aquosa e, conseqüentemente, da afinidade do mesmo pelo óleo empregado na preparação. Em condições apropriadas, a eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos nas nanocápsulas pode alcançar 100% se as condições de preparação e a formulação forem otimizadas (RODRIGUES *et al.*, 1995; MARCHAIS *et al.*, 1998; CAUCHETIER *et al.*, 2003). Os critérios para a seleção do óleo utilizado na preparação das nanocápsulas são a ausência de toxicidade, solubilidade baixa deste no polímero e vice-versa, a ausência do risco de degradação do polímero e uma capacidade elevada de solubilizar o fármaco em questão (COUVREUR *et al.*, 2002; BLOUZA *et al.*, 2006). A porcentagem de encapsulação tem sido correlacionada com a solubilidade do fármaco no componente oleoso (GUTERRES *et al.*, 1995). Por esta razão, a solubilidade da camptotecina nos diferentes óleos foi avaliada e os resultados obtidos na encontram-se demonstrados na Tabela 10. Conforme pode ser observado, a CPT apresentou maior solubilidade no óleo de soja, sendo esta cerca de duas e cinco vezes maiores que as obtidas para os óleos de rícino e oliva, respectivamente.

**Tabela 10.** Solubilidade da camptotecina no componente oleoso.

Óleo	Solubilidade da CPT	
	( $\mu\text{g mL}^{-1} \pm \delta$ )	C.V (%)
Oliva	57,9 $\pm$ 1,23	2,12
Rícino	132,2 $\pm$ 4,25	3,22
Soja	281,5 $\pm$ 4,26	1,51

### **5.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação, do teor e taxa de recuperação da camptotecina nas suspensões de nanocápsulas**

As suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina foram preparadas conforme descrito em 4.2.3.2, empregando-se os polímeros PLA, PLA-PEG 49 kD e PLA-PEG 66,6 kD, e óleos de oliva, rícino e soja. Para a camptotecina, além da manutenção do anel lactônico ser fundamental para a atividade antitumoral, a molécula na forma lactônica é pouco solúvel em água e, portanto, a fase aquosa das formulações foi ajustada a valores de pH próximos a 5,0, para garantir a obtenção de elevados valores de eficiência de encapsulação. Um excesso de fármaco foi colocado nas formulações e as suspensões coloidais resultantes foram filtradas em membranas de 0,8  $\mu\text{m}$  para a remoção de eventuais cristais de camptotecina não encapsulados. A concentração de camptotecina nas formulações foi então determinada por uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência e os resultados serão descritos a seguir.

#### *5.3.2.1 Determinação da concentração de camptotecina por cromatografia líquida de alta eficiência*

Vários métodos têm sido descritos para a quantificação da camptotecina por CLAE, envolvendo a determinação de ambas formas (lactônica e carboxilada) ou da concentração total de fármaco, usando a absorção no ultravioleta ou fluorescência para a sua detecção (WALL e WANI, 1996; DEY e WARNER, 1996). 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 foi visualizado. Uma vez que as suspensões coloidais apresentavam pH ácido, a dissolução das partículas foi realizada sem o posterior ajuste do pH. O ácido fosfórico foi usado para controlar o pH da fase móvel e o metanol foi usado para controlar o tempo de retenção da forma lactônica da

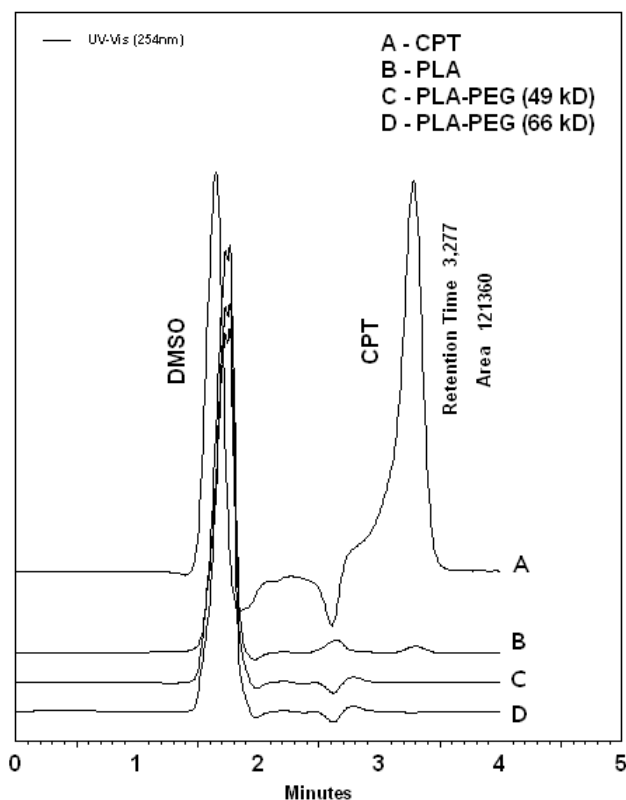
CPT. Após diversas tentativas, o melhor pico foi obtido quando a relação do volume de metanol e tampão fosfato (10mM) foi de 60:40 (v/v), e a fase móvel foi ajustada a pH 2,8. A acidificação da fase móvel tem demonstrado aumentar a sensibilidade de detecção, assim como melhorar a simetria do pico (LOH e AHMED, 1990).

#### *5.3.2.1.1 Validação da metodologia analítica*

O cromatograma da CPT mostrado na Figura 8. Este cromatograma apresenta um único e definido pico do fármaco em aproximadamente 3 minutos; o primeiro pico em aproximadamente 1,5 minuto corresponde ao solvente DMSO que foi usado para solubilizar a CPT.

Para garantir a especificidade do método empregado, suspensões de nanocápsulas brancas preparadas com óleo de rícino foram analisadas por CLAE. Os cromatogramas obtidos mostraram que o método foi específico e nenhuma interferência foi detectada em 254 nm, nas condições cromatográficas empregadas. Estes cromatogramas são mostrados na Figura 8. Com o propósito de assegurar que as outras suspensões de nanocápsulas, diferenciadas no preparo apenas pelo componente oleoso (soja ou oliva), pudessem ser analisadas pela mesma metodologia, amostras destes óleos foram preparadas e analisadas da mesma maneira. A alteração do componente oleoso da formulação não interferiu no pico da camptotecina, no comprimento de onda especificado, indicando que a metodologia de CLAE poderia ser utilizada para a determinação da eficiência de encapsulação de qualquer uma das formulações testadas.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 1996). A curva de calibração de CPT nas suspensões de nanocápsulas analisadas apresentou-se linear na faixa de concentração de 0,5 a 3,0 µg/mL com coeficiente de correlação de 0,9979. Na Tabela 11 encontram-se demonstrados as áreas dos picos obtidas para a camptotecina nas diferentes concentrações analisadas.



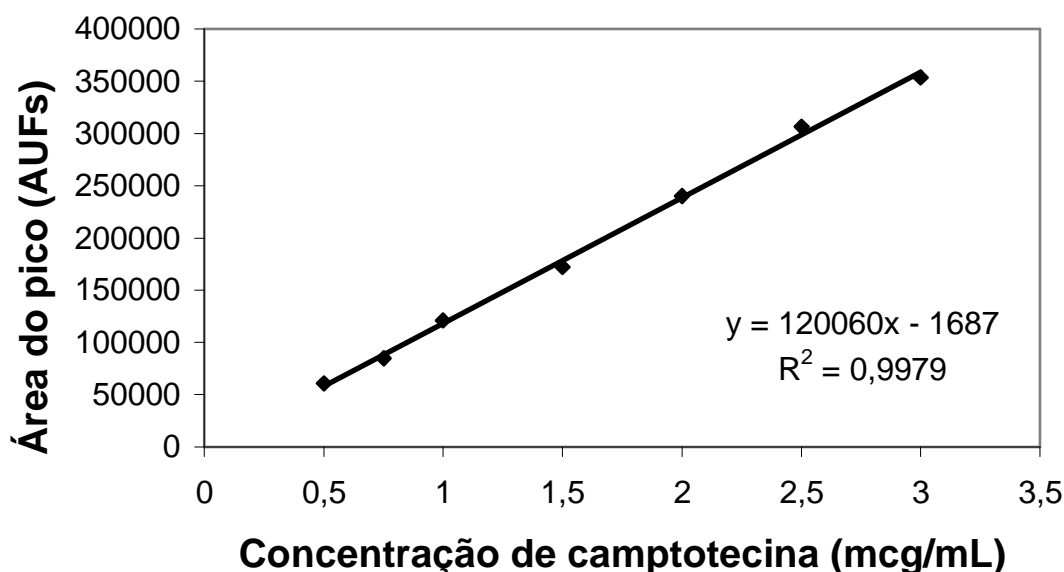
**Figura 8.** Cromatograma obtido após a injeção de: (A) Solução padrão de CPT  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (B) Suspensão de nanocápsula branca de PLA, (C) Suspensão de nanocápsula branca de PLA-PEG (49 kD) e (D) Suspensão de nanocápsula branca de PLA-PEG (66 kD).

**Tabela 11.** Áreas dos picos obtidos após análise das soluções de CPT padrão por CLAE.

Concentração de camptotecina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área do pico ( $M \pm \delta$ ; $n = 3$ )	C.V (%)
0,5	$60591,7 \pm 598,3$	0,9
0,75	$84925,9 \pm 1591,9$	1,8
1,0	$121298,3 \pm 1491,7$	1,2
1,5	$172101,9 \pm 1389,3$	0,8
2,0	$240082,9 \pm 172,0$	0,1
2,5	$306563,4 \pm 3100,0$	1,1
3,0	$353299,3 \pm 5020,5$	1,4

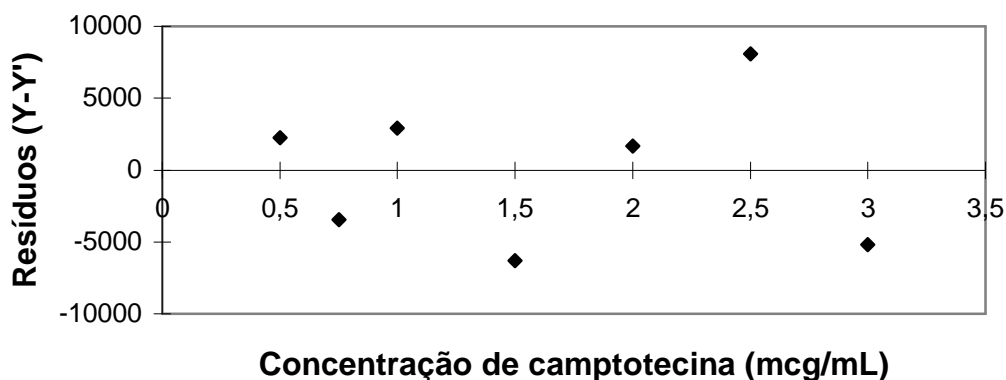
A equação da reta ( $n=3$ ) determinada através da regressão linear e a representação gráfica da curva de calibração encontram-se na Figura 9. Os desvios

padrão da inclinação e do intercepto foram  $\pm 4713,15$  e o  $\pm 5622,57$ , respectivamente. Os limites de confiança do intercepto calculados ficaram entre  $-13303,22$  a  $9929,23$ . 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). A validade do ensaio foi verificada pela análise de variância (ANOVA) e evidenciou a linearidade do método, na faixa de concentração testada ( $F_{\text{calculado}} = 2350,8 > F_{\text{crítico}} = 7,05$ ).



**Figura 9.** Representação gráfica da curva de calibração da camptotecina obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta.

A análise dos resíduos, definida como a diferença entre os valores das áreas dos picos calculados e os encontrados experimentalmente, também fornecem 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 (Figura 10) provando que a metodologia de CLAE utilizada mostrou-se satisfatória na faixa de concentração analisada.



**Figura 10.** Análise dos resíduos da curva de calibração da camptotecina obtida por CLAE.

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH,1996). Neste caso, o LOQ determinado foi de 0,35  $\mu\text{g/mL}$  (C.V = 3,2%), indicando que o método apresenta-se suficientemente sensível para quantificação da CPT.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1996). Para o método desenvolvido a precisão das amostras foi analisada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Estes parâmetros foram avaliados através do valor de coeficiente de variação percentual obtido durante análises quantitativas das amostras, mostrando-se satisfatórios para ambos os níveis, pois estes apresentaram-se inferiores a 5,0 % (Tabela 12). As quantidades de CPT analisadas nos três dias consecutivos foram equivalentes para as formulações desenvolvidas ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 12.** Resultados obtidos na avaliação da precisão do método

Amostras		Quantidade adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Quantidade doseada ( $\mu\text{g mL}^{-1} \pm \delta$ )	C.V (%) (n=3)
	Repetibilidade			
PLA	Dia 1 (n=6)	1,50	1,52 $\pm$ 0,03	2,3
	Dia 2 (n=6)	1,50	1,54 $\pm$ 0,02	1,7
	Dia 3 (n=6)	1,50	1,57 $\pm$ 0,05	3,2
	Intermediária (n=18)	1,50	1,54 $\pm$ 0,05	3,4
	Repetibilidade			
PLA-PEG (49 kD)	Dia 1 (n=6)	1,50	1,55 $\pm$ 0,07	4,5
	Dia 2 (n=6)	1,50	1,53 $\pm$ 0,02	1,4
	Dia 3 (n=6)	1,50	1,57 $\pm$ 0,03	2,7
	Intermediária (n=18)	1,50	1,55 $\pm$ 0,04	3,1
	Repetibilidade			
PLA-PEG (66 kD)	Dia 1 (n=6)	1,50	1,51 $\pm$ 0,04	3,2
	Dia 2 (n=6)	1,50	1,52 $\pm$ 0,03	1,5
	Dia 3 (n=6)	1,50	1,52 $\pm$ 0,04	3,1
	Intermediária (n=18)	1,50	1,52 $\pm$ 0,04	2,9

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 1996). A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). A exatidão do método foi avaliada utilizando as três suspensões de nanocápsulas desenvolvidas: PLA, PLA-PEG (49 kD) and PLA-PEG (66 kD). A recuperação foi determinada como a diferença percentual da concentração experimental média e a concentração teórica em três concentrações diferentes. Cada concentração foi analisada em triplicata. Os resultados estão demonstrados na Tabela 13 e evidenciam uma recuperação adequada para o método estudado.



**Tabela 13.** Recuperação de solução padrão de CPT adicionada nas amostras de suspensão de nanocápsulas.

Amostras	Quantidade de CPT		Recuperação (%)	C.V (%) (n=3)
	Concentração adicionada	Concentração Recuperada		
	( $\mu\text{g MI}^{-1}$ )	( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
PLA	0,75	0,77	97,3	0,5
	1,50	1,57	102,0	0,8
	3,00	3,06	100,6	1,6
PLA-PEG (49 kD)	0,75	0,77	102,6	0,4
	1,50	1,56	103,0	1,3
	3,00	3,1	103,0	1,7
PLA-PEG (66 kD)	0,75	0,79	104,0	1,2
	1,50	1,56	104,0	0,6
	3,00	3,15	105,0	0,5

Por último, a robustez do método foi investigada e os resultados encontram-se demonstrados na Tabela 14. Estes resultados estão expressos como eficiência de encapsulação de camptotecina, obtidas após análise das suspensões de nanocápsulas, preparadas usando o óleo de rícino como componente oleoso da formulação. Estes resultados serão discutidos mais adiante, mas foram colocados aqui para mostrar que ligeiras variações nas condições de análise (composição da fase móvel, temperatura e fluxo) não afetaram significativamente os ensaios analíticos, nem tampouco o desempenho cromatográfico, evidenciando a robustez do método e sua possível transposição para outros laboratórios.

**Tabela 14.** Resultados obtidos pelo estudo da robustez do método de CLAE.

Condições		Eficiência de Encapsulação (Média ± C.V)		
		PLA <sub>CPT</sub>	PLA-PEG (49 kD) <sub>CPT</sub>	PLA-PEG (66 kD) <sub>CPT</sub>
Fase móvel (Metanol: Tampão fosfato)	55:45	93,94 ± 0,1	96,47 ± 0,1	95,83 ± 0,1
	50:50	94,05 ± 0,1	96,60 ± 0,1	95,59 ± 0,3
Temperatura (° C)	41	94,17 ± 0,4	97,17 ± 0,1	94,79 ± 0,2
	39	94,36 ± 0,2	96,92 ± 0,8	96,68 ± 0,1
Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	1.1	94,84 ± 0,1	97,02 ± 0,1	96,22 ± 0,3
	0.9	94,91 ± 0,1	96,95 ± 0,1	97,12 ± 0,1

O método desenvolvido e validado provou ser específico, linear, exato, preciso e robusto. A confiabilidade do método de cromatografia líquida de fase reversa foi satisfatória para quantificação de CPT nas suspensões de nanocápsulas poliméricas.

### 5.3.2.2 Avaliação do efeito do tipo de polímero e de óleo sobre a encapsulação da camptotecina nas nanocápsulas

Após o desenvolvimento e validação da metodologia analítica, as suspensões de nanocápsulas foram analisadas e a eficiência de encapsulação e teor de fármaco foram estimados conforme descrito em 4.2.3.2.1.2. Os valores de eficiência de encapsulação da camptotecina, expressos como sendo a diferença percentual entre a concentração total e aquela encontrada no sobrenadante, assim como o teor de fármaco, podem ser visualizados na Tabela 15.

Conforme demonstrado, elevados valores de eficiência de encapsulação, variando de 66,3 a 97,3%, foram obtidos para todas as formulações testadas. Entretanto, o teor de fármaco variou consideravelmente em função do tipo de polímero e de óleo empregado.

**Tabela 15.** Valores de eficiência de encapsulação e teor de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas.

	Formulação		Eficiência de encapsulação (%) (M ± δ; n=3)	Teor de CPT (µg/mL) (M ± δ; n=3)
	Polímero	Óleo		
1	PLA-PEG 49 kD	oliva	97,03 ± 0,4	8,66 ± 0,4
2		rícino	87,3 ± 2,7	35,11 ± 0,8
3		soja	73,55 ± 1,8	8,44 ± 0,4
4	PLA-PEG 66 kD	oliva	95,89 ± 0,5	5,44 ± 0,2
5		rícino	92,08 ± 1,5	43,07 ± 0,5
6		soja	93,41 ± 0,8	24,75 ± 1,1
7	PLA	oliva	96,7 ± 1,6	26,70 ± 1,3
8		rícino	94,88 ± 1,1	34,38 ± 0,7
9		soja	66,3 ± 0,8	8,10 ± 0,2

A aplicação de planos de experimentação é freqüentemente utilizada para a otimização de formulações farmacêuticas, possibilitando avaliar diversos fatores e suas interações sobre uma determinada resposta, realizando um número mínimo de experimentos. Assim, um delineamento fatorial 3x3 foi realizado para determinar a influência do tipo de polímero e do componente oleoso sobre o teor de fármaco das nanocápsulas. O tipo de polímero foi designado como sendo fator A e o tipo de óleo como fator B. A análise de variância obtida após aplicação do delineamento estatístico fatorial pode ser visualizada na Tabela 16.

**Tabela 16.** Análise de variância realizada no estudo da influência dos fatores de formulação sobre os valores de teor de fármaco das nanocápsulas.

Causas de variação	GL	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F
Tipo de polímero (A)	2	3409,56	1704,5	2090,46*
Tipo de óleo (B)	2	249,29	124,65	152,87*
A x B	4	1221,48	305,37	374,52*
Tratamento	9	4880,34	610,04	
Resíduo	18	14,67	0,82	
Total	26	4895,02		

Tipo de polímero (A): PLA (+), PLA-PEG 49 kD (0) ou PLA-PEG 66 kD (-); Tipo de óleo (B): oliva (+), soja (0), rícino (-); A x B = interação entre os fatores; GL = graus de liberdade;  $F_{\text{tabelado}}$  (graus de liberdade = 8,26;  $\alpha = 0,05$ ) = 2,51; \*Significativo

Como pode ser observado, o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado ( $F_{8,26} = 2,51$ ) para ambos fatores estudados, indicando que tanto o tipo de polímero como o de óleo afetam significativamente o teor de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas. Além disso, a interação entre os dois fatores foi observada. O nível desta interação foi determinado pelo teste de TUKEY, que se baseia na determinação da diferença mínima significativa (d.m.s.) entre duas médias, conforme a equação:

$$d.m.s = qx \sqrt{\frac{QMR}{n}}$$

onde:

QMR é o quadrado médio do resíduo da análise de variância;

n é o número de repetições de cada um dos tratamentos;

q é o valor dado na tabela ao nível de significância estabelecida.

Nesta análise, duas médias são estatisticamente diferentes toda vez que o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou maior que a d.m.s. Neste caso, o valor de d.m.s., após aplicação do teste de Tukey, foi igual a 2,58, para um valor de q igual a 4,96. As diferenças entre as médias dos teores de fármaco para cada um dos tratamentos podem ser visualizadas na Tabela 17.

**Tabela 17.** Diferenças absolutas entre as médias dos teores de camptotecina obtidos em cada um dos tratamentos.

Diferença entre as médias	Fator A		
	PLA	PLA-PEG (49 kD)	PLA-PEG (66 kD)
Oliva – Soja	18,6*	17,1*	19,13*
Oliva – Rícino	7,68*	26,45*	37,63*
Soja – Rícino	26,28*	26,67*	18,31*

	Fator B		
	Oliva	Soja	Rícino
PLA - PLA-PEG (49 kD)	18,04*	0,34	0,73
PLA - PLA-PEG (66 kD)	21,26*	16,65*	8,69*
PLA-PEG (49 kD) - PLA-PEG (66 kD)	3,22*	16,31*	7,96*

\*Significativo (d.m.s = 2,58)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 17 e com os valores de teor de fármaco demonstrados na Tabela 15, pode-se concluir que a utilização do óleo de rícino aumentou significativamente o teor de camptotecina nas nanocápsulas, independente do tipo de polímero empregado. Por outro lado, a diferença não foi significativa somente quando o PLA foi substituído pelo PLA-PEG 49kD, para as formulações utilizando os óleos de soja e rícino como componente oleoso. Além disso, a interação entre o óleo de rícino e o polímero PLA-PEG 66 kD proporcionou um teor de fármaco significativamente maior que todos os valores obtidos nas demais formulações. Estes resultados podem estar relacionados ao modo de associação da camptotecina nas nanocápsulas. Mesmo que o fármaco seja preferencialmente dissolvido no núcleo interno oleoso, ele pode se encontrar disperso na camada polimérica ou ainda adsorvido na superfície das partículas.

### 5.3.3 Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina

Uma vez que os resultados de encapsulação da camptotecina nas nanocápsulas preparadas a partir do óleo de rícino foram mais promissores, os estudos subseqüentes foram realizados apenas com as formulações 2, 5 e 8. Assim, as suspensões de nanocápsulas de PLA, PLA-PEG 49 kD e PLA-PEG 66 kD,

preparadas com óleo de rícino, contendo camptotecina foram caracterizadas e comparadas com nanocápsulas brancas, quanto ao diâmetro médio de partícula e potencial zeta (Tabelas 18).

Os resultados de diâmetro médio e índice de polidispersão das suspensões demonstram que a adição do fármaco nas formulações não alterou significativamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ) o diâmetro médio das partículas, nem o potencial zeta das formulações.

**Tabela 18.** Valores de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das suspensões de nanocápsulas brancas e contendo CPT, preparadas a partir do óleo de rícino.

Formulação	Diâmetro médio* (nm)		Potencial Zeta (mV)	
	Nanocápsulas Brancas	Nanocápsulas contendo CPT	Nanocápsulas Brancas	Nanocápsulas contendo CPT
PLA	140,9 (0,21)	181,6 (0,30)	-29.0 ± 0,9	-28.1 ± 1,8
PLA-PEG (49 kD)	156,8 (0,24)	157,4 (0,19)	-26.2 ± 0,8	-30.1 ± 1,1
PLA-PEG (66 kD)	147,6 (0,25)	144,0 (0,30)	-31.5 ± 1,8	-23.6 ± 1,8

\*Entre parêntesis: índice de polidispersão.

### 5.3.4 Avaliação dos perfis de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas

#### 5.3.4.1 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, 1990). 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 absorvidade molar ( $19900 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) neste comprimento de onda. Esta molécula também exibe uma forte fluorescência com comprimento de onda máximo de 425 nm. Esta característica, aliada à rapidez na determinação do fármaco, levou a escolha da espectrofluorimetria direta para determinar o teor de camptotecina na avaliação do seu perfil de liberação a partir das nanocápsulas.

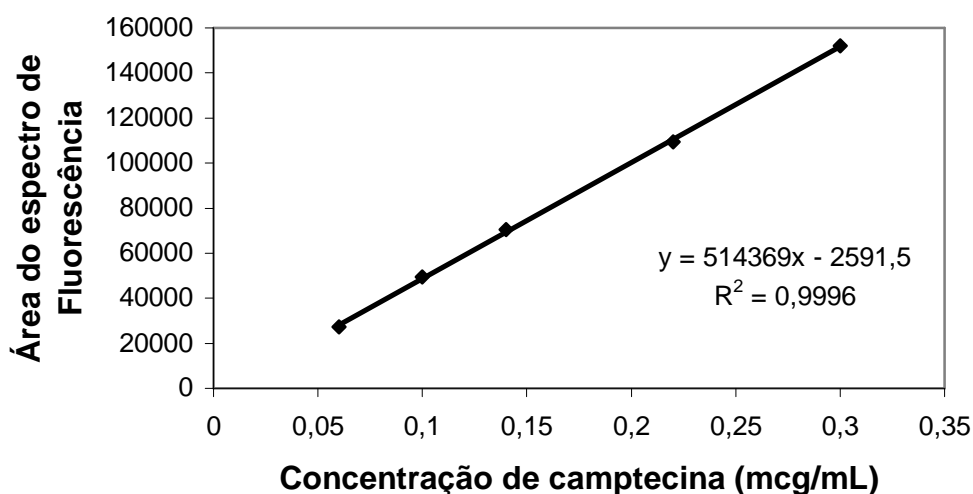
As características espectrais da camptotecina podem ser explicadas com base em sua estrutura. Devido à alta conjugação do anel quinolona, a molécula apresenta uma estrutura planar pelo qual tem-se atribuído o deslocamento do máximo de absorção, com o aumento da polaridade no solvente. A estrutura rígida 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, 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, alcançado um mínimo a pH 8,0; pois em 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.

A curva de calibração de CPT, obtida pela área dos espectros de fluorescência *versus* concentração do fármaco analisada, apresentou-se linear na faixa de concentração de 0,06 a 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com coeficiente de correlação de 0,9976. As áreas dos espectros obtidas nas faixas de concentração medidas encontram-se demonstrados na Tabela 19.

**Tabela 19.** Áreas dos espectros de fluorescência obtidas a partir da camptotecina após análises das soluções por espectrofluorimetria.

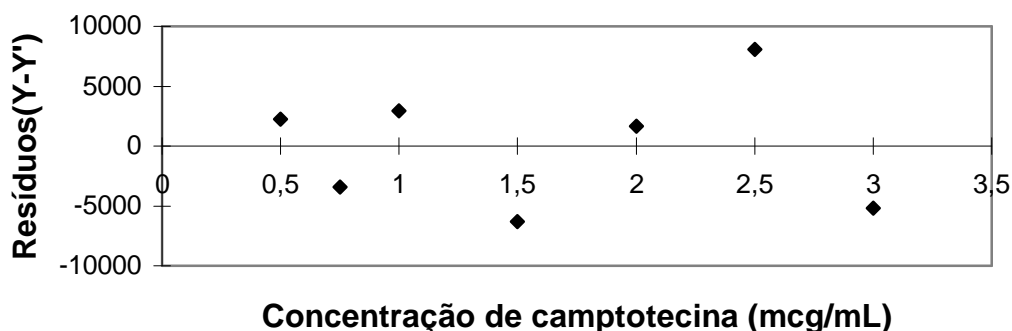
Concentração de camptotecina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área do espectro ( $M \pm \delta; n=3$ )	C.V (%)
0,06	27423,41 $\pm$ 867,9	3,1
0,1	49538,77 $\pm$ 857,2	1,7
0,14	70453,62 $\pm$ 2312,03	3,3
0,22	109309,2 $\pm$ 3524,7	3,2
0,3	152099,2 $\pm$ 5385,8	3,5

Na Figura 11 encontram-se a representação gráfica da curva de calibração e a equação da reta ( $n=3$ ) determinada através da regressão linear. Os limites de confiança do intercepto calculados ficaram entre - 6124,67 a 941,58; incluindo entre estes o valor zero indicando a ausência de erro sistemático constante. A validade do ensaio foi verificada pela análise de variância (ANOVA,  $\rho < 0,05$ ), na qual evidenciou a linearidade do método.

**Figura 11.** Curva de calibração da camptotecina obtida por espectrofluorimetria.

A análise dos resíduos, obtida 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 como observado na Figura 12.





**Figura 12.** Análise dos resíduos da curva de calibração da camptotecina obtida por espectrofluorimetria.

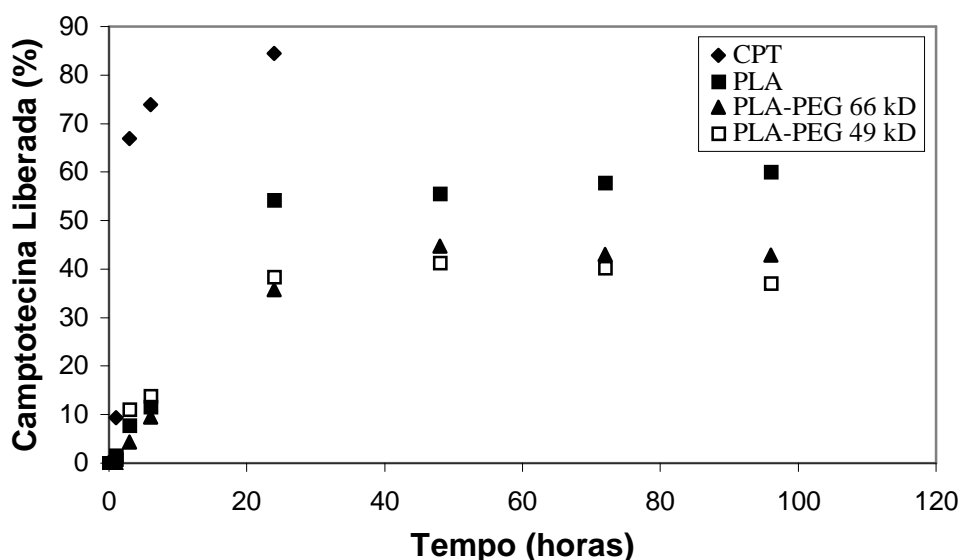
#### 5.3.4.2 Avaliação dos perfis de liberação

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 deva 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). Assim, 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% de Tween 80 como solubilizante. A solubilidade da camptotecina neste meio, determinada experimentalmente, foi de 79  $\mu\text{g/mL}$  (DORA, 2003).

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 as partículas, da solução onde o fármaco encontra-se dissolvido, com eficiência e rapidez, visto o tamanho reduzido destes carreadores (MAGENHEIN e BENITA, 1991). No método da membrana de difusão utilizado neste ensaio, o carreador é

suspenso em um pequeno volume de fase contínua e separado de um grande volume de fase *sink* por uma membrana de diálise permeável ao fármaco.

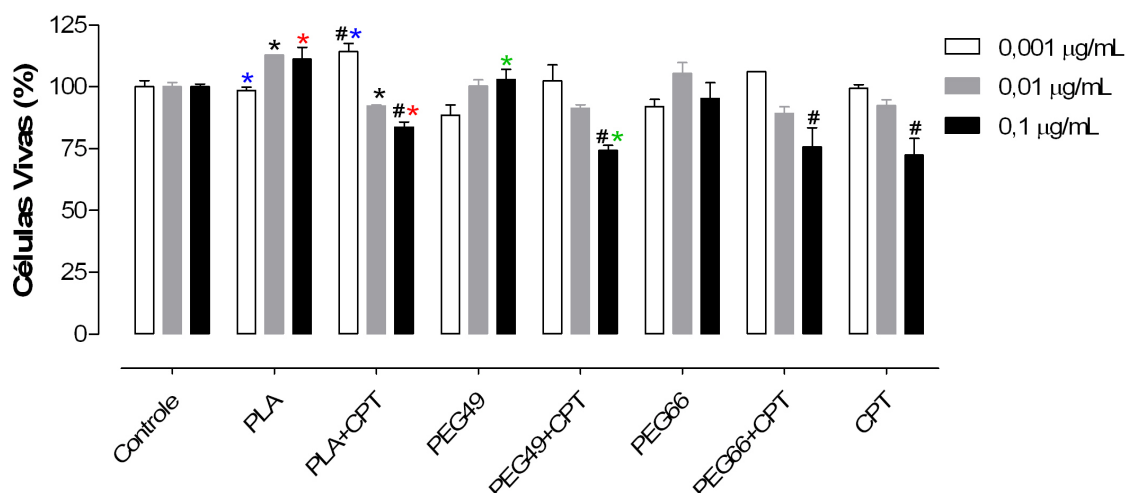
O estudo de liberação da camptotecina em suspensões de nanocápsulas (PLA e PLA-PEG) foi realizado e os resultados obtidos, expressos em porcentagem de fármaco liberado *versus* tempo (horas) podem ser visualizados na Figura 13. Para todas formulações testadas, a porcentagem de camptotecina liberada não ultrapassou mais de 60% da quantidade total de fármaco presente nas suspensões. Com o intuito de verificar se a membrana polimérica atuava como barreira, uma solução de CPT, numa concentração correspondente àquela das suspensões, foi colocada no interior do saco e diálise e a passagem do fármaco através da membrana foi avaliada nas mesmas condições. A rápida difusão da CPT para o meio de liberação, alcançando cerca de 70% nas primeiras 5 horas, indica que a presença da membrana polimérica retardou a liberação do fármaco. As porcentagens de liberação da CPT, em função do tempo, a partir das nanocápsulas preparadas com os diferentes polímeros foram analisadas estatisticamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ) e os perfis de liberação não apresentaram diferenças significativas em função do polímero utilizado ( $F$  crítico = 3,55 >  $F$  calculado = 0,45).



**Figura 13.** Perfil de Liberação da CPT a partir de nanocápsulas em tampão fosfato pH 7,4 contendo Tween 2% (p/v).

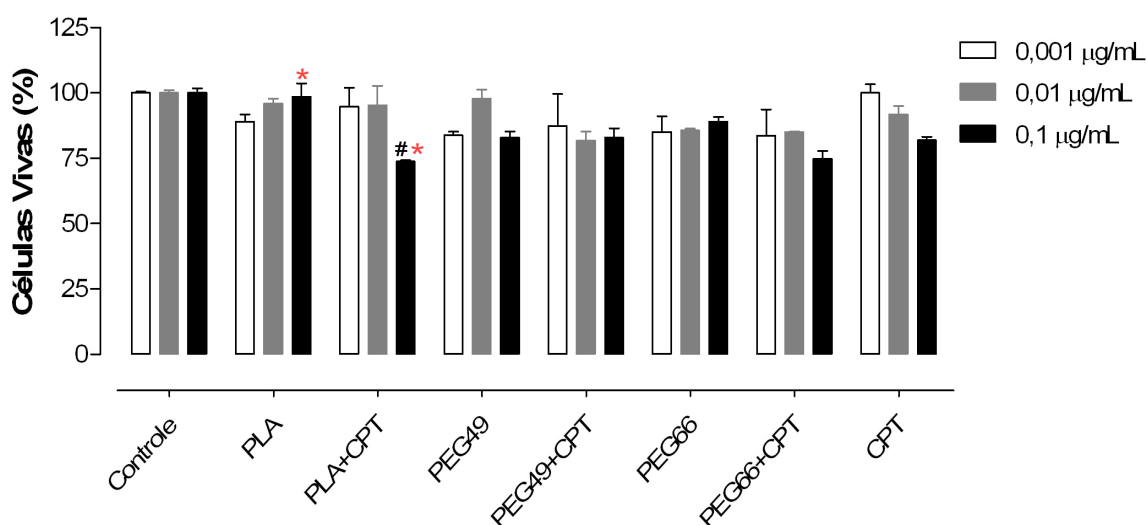
#### 5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO

A atividade citotóxica da camptotecina tem sido evidenciada em inúmeros estudos de viabilidade celular *in vitro* e de atividade antitumoral *in vivo*. Esta atividade está principalmente relacionada à inibição da topoisomerase I, uma enzima altamente expressa nos tumores, apesar deste fármaco também inibir o crescimento de células endoteliais humanas, exibindo, portanto, atividade antiangiogênica. Entretanto é consenso que a manutenção do anel lactônico da CPT é crucial para a atividade citotóxica. A instabilidade da forma lactônica em pH fisiológico e a sua baixa solubilidade aquosa foram as razões que levaram à incorporação da CPT em carreadores de fármacos nanoestruturados. Em particular, a incorporação nas nanocápsulas permitiria a solubilização do fármaco no núcleo interno oleoso, protegendo-o da hidrólise frente ao pH fisiológico. Por outro lado, o uso de sistemas furtivos forneceria a vantagem adicional de prolongar o tempo de residência das partículas na circulação sistêmica, aumentando a exposição do fármaco aos tumores. Tendo em vista que a CPT exibe elevada atividade antileucêmica, os estudos de atividade citotóxica foram conduzidos usando linhagens de células de leucemia linfoblástica murina L1210 e de leucemia mielomonocítica murina WeHi-3B. A atividade citotóxica da CPT livre e encapsulada em nanocápsulas convencionais e furtivas foi avaliada e comparada. Os resultados encontram-se demonstrados nas Figuras 14 e 15.



**Figura 14.** Efeito citotóxico da camptotecina livre (CPT), nanocápsulas brancas de PLA (PLA) e PLA-PEG (PEG49 e PEG66) e de nanocapsulas contendo camptotecina (PLA+CPT, PEG49+CPT e PEG66+CPT) sobre células leucêmicas L1210. \* $P < 0,05$  Nanocápsulas brancas comparadas com as nanocápsulas contendo CPT na mesma concentração; # $P < 0,05$  nanocápsulas contendo camptotecina comparada com o grupo controle.

Como pode ser observado na Figura 14, tanto o fármaco livre como encapsulado em nanocápsulas de PLA e PLA-PEG exibiram atividade citotóxica sobre a linhagem de células leucêmicas L1210, quando comparado com o grupo controle, na concentração de 0,1 µg/mL. Entretanto, não houve diferença significativa quando as células foram tratadas com as nanocápsulas contendo CPT, em comparação com o fármaco livre; o percentual de células viáveis variou entre 72,4 e 83,7%, para as formulações testadas. Quando as células WeHi 3B foram usadas, somente a CPT encapsulada em nanocápsulas de PLA, na concentração de 0,1 mg/mL, exibiu atividade citotóxica significativamente maior que o grupo controle e, nas outras concentrações testadas, tanto fármaco livre como encapsulado não demonstraram atividade citotóxica (Figura 15).



**Figura 15.** Efeito citotóxico da camptotecina livre (CPT), nanocápsulas brancas de PLA (PLA) e PLA-PEG (PEG49 e PEG66) e de nanocapsulas contendo camptotecina (PLA+CPT, PEG49+CPT e PEG66+CPT) sobre células leucêmicas We-Hi 3B. \* $P < 0,05$  Nanocápsulas brancas comparadas com as nanocápsulas contendo CPT na mesma concentração; # $P < 0,05$  nanocápsulas contendo camptotecina comparada com o grupo controle.

Os resultados obtidos neste estudo foram nitidamente diferentes daqueles observados por NECKEL e colaboradores (2007), na avaliação da citotoxicidade *in vitro* das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo CPT, em linhagem de células de melanoma B16F10. A incubação das células de melanoma B16F10 com as nanocápsulas de CPT conduziu à morte celular significativa, dependendo da concentração do fármaco. Além disso, na concentração de 0,1 mg/mL, as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG 49 kD exibiram efeito tóxico significativamente maior que o fármaco livre. Entretanto, numa concentração 10 vezes menor, ambas formas livre e encapsulada da camptotecina reduziram o número de células viáveis em cerca de 20%.

Por outro lado, a ausência de diferença significativa entre a atividade citotóxica da camptotecina livre e associada a carreadores coloidais, em cultura de células, tem sido descrita por alguns autores. Cortesi e colaboradores (1997) verificaram que lipossomas contendo camptotecina apresentavam atividade antiproliferativa similar àquela produzida pelo fármaco livre em cultura de células leucêmicas K562. Neste caso, os lipossomas permitiram a estabilização do anel lactônico da camptotecina na bicamada lipídica, servindo de veículo para o fármaco.

(CORTESI *et al.*, 1997; CORTESI E NASTRUZZI, 1999; EMERSON, 2000). As discrepâncias observadas nos resultados dos estudos de atividade citotóxica *in vitro* podem estar relacionadas ao tempo de incubação das células tratadas. Koo e colaboradores (2005) observaram uma citotoxicidade de micelas contendo CPT cerca de 3 vezes maior após 96 horas de incubação das células de câncer de mama MCF-7, quando comparado com o tempo de incubação de 24 horas. Isto tem sido atribuído ao fato da camptotecina agir na fase S do ciclo celular, fazendo com que o efeito da melhoria da estabilidade da forma lactônica com a encapsulação seja evidenciado com o aumento do tempo de exposição do fármaco frente à célula tumoral.

Finalmente, apesar de tais sistemas não terem demonstrado resultados promissores nos estudos de citotoxicidade *in vitro*, o efeito da nanoencapsulação sobre a atividade antileucêmica da camptotecina ainda necessita ser verificado *in vivo* para a obtenção de dados mais conclusivos. Mesmo assim, a nanoencapsulação já se torna vantajosa por permitir a administração deste fármaco pouco solúvel, pela via intravenosa, usando materiais biodegradáveis e não tóxicos. Ainda, espera-se que o uso de partículas furtivas altere o perfil de distribuição do fármaco, aumentando a seu índice terapêutico e reduzindo a sua toxicidade, conforme verificado por Neckel e colaboradores, no estudo de atividade antimetastática *in vivo*, após inoculação de células B16F10 em camundongos.

## **6. CONCLUSÕES**

- A técnica de nanoprecipitação utilizada na obtenção de suspensões de nanocápsulas brancas empregando os polímeros PLA e PLA-PEG 49 e 66,6 kD e três diferentes óleos, rícino, soja e oliva apresentou-se viável.
- Suspensões de nanocápsulas leitosas e homogêneas foram obtidas com todos os polímeros e óleos empregados, no entanto após o tempo de armazenamento algumas formulações apresentaram parâmetros de instabilidades como presença de agregados e cremagem. Dentre as formulações testadas, aquelas contendo os polímeros PLA e PLA-PEG 49kD e óleo de rícino pareceram conduzir à obtenção de suspensões mais estáveis.
- Populações monodispersas de partículas foram obtidas com a utilização de PLA e PLA-PEG para os três óleos utilizados. Além disso, o baixo valor de diâmetro de partícula e de baixo índice de polidispersão foram considerados aceitáveis, não apresentando diferenças significativas entre as formulações testadas ( $p < 0,05$ ).
- Os valores de potencial zeta obtidos na caracterização das suspensões de nanocápsulas brancas mantiveram-se na faixa de -31,1 mV e -43,0 mV e não variaram estatisticamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ) em função do tipo de polímero e óleo empregado. O potencial negativo observado em todas as formulações foi atribuído à presença da lecitina, empregada como surfactante lipofílico.
- Um método de quantificação de camptotecina nas suspensões de nanocápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi devidamente validado em termos de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e limite de quantificação. Os resultados obtidos permitiram concluir que o método proposto foi seguro e adequado para a quantificação do fármaco nos sistemas nanoestruturados.



- As suspensões de nanocápsulas contendo camptotecina preparadas pela técnica de nanoprecipitação apresentaram elevados valores de eficiência de encapsulação, variando de 66,3 a 97,3%. Entretanto, o teor de fármaco variou consideravelmente em função do tipo de polímero e de óleo empregado.
- Tanto o tipo de polímero e como o componente oleoso das formulações afetaram significativamente o teor de CPT das nanocápsulas. Além disso, a interação entre os dois fatores foi observada. O maior teor de CPT foi obtido com a utilização de óleo de rícino nas formulações.
- A liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas (PLA e PLA-PEG) variou entre 40 e 60% da quantidade total de fármaco presente nas suspensões, após 96 horas de ensaio. A rápida difusão de uma solução de CPT para o meio de liberação, alcançando cerca de 70% nas primeiras 5 horas, indicou que a presença da membrana polimérica retardou a liberação do fármaco. Os perfis de liberação não apresentaram diferenças significativas em função do polímero utilizado.
- A CPT livre e associada às nanocápsulas convencionais e furtivas exibiram atividade citotóxica frente à linhagem de células leucêmicas L1210, quando comparado com o grupo controle, na concentração de 0,1 µg/mL ( $p < 0,005$ ). Entretanto, não houve diferença significativa quando as células foram tratadas com as nanocápsulas contendo CPT, em comparação com o fármaco livre. Na linhagem de células leucêmicas WEHI-3B somente a CPT encapsulada em nanocápsulas de PLA, na concentração de 0,1 mg/mL, exibiu atividade citotóxica significativamente maior que o grupo controle ( $P < 0,005$ ).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALE. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br/doencas/leucemia/index.php?area=leucemia>>. Acesso em: junho de 2007.

AIPING, A.; JIANHON, L.; WENHUI, Y. Effective loading and controlled release of camptothecin by O-carboxymethylchitosan aggregates. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 89-96, 2006.

ALLEMANN, E.; LEROUX, J.; GURNY, R. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 34, p. 171–189, 1998.

ALLEN, T. M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 13, p. 285-309, 1994.

ALONSO, M. J.; CALVO, P.; REMUNAN, C.; VILA-JATO, J. L. Stabilization of colloidal systems by the formation of ionic lipid-polysaccharide complexes. EU Patent EP0771566(A1), 1997.

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; BARRAT, G.; RENOIR, J. M. Polyester-Poly(Ethylene glicol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization properties. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 7, p. 1063-1070, 2003.

BARAN, E. T.; ÖZER, N.; HAZIRCI, V. In vivo half life of nanoencapsuled L-asparinase. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 13, p. 1113-1121, 2002.

BARCELLOS, O. I.; KATIME, A. I.; SOLDI, V.; PIRES, N. T. A. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 10, p. 110-115, 2000.

BASSI, L.; PALLITI, F. Anti-topoisomerase drugs as potent inducers of chromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 1065-1069, 2000.

BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 24, p. 67-75, 2005

BLOUZA, L. I.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 325, p. 124–131, 2006.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 116, p.1-9, 1995.

BRASIL. Ministério da saúde. Resolução Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVS- RE nº 899, de 29 de maio de 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso: abril de 2007.

BURKE, G. T.; MI, Z. The Structural Basis of Camptothecin Interactions with Human. *J. Med. Chem*, v. 37, p. 40-46, 1994.

CALVO, M. P. S. *Desarrollo de nuevos sistemas coloidales y su aplicacion en 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 nanocapsule: influence of the nature the polymer on their in vitro characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, p. 273-281, 2003.

CLEMENT, M. K.; JONES, C. B.; CUMMING, M.; DAOUD, S. S. Antiangiogenic potential of camptothecin and topotecan. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, v. 44, p. 411-416, 1999.

CORTESI, R.; ESPOSITO, A.; MAIETTI, E.; NASTRUZZI, C. Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, v.159,n. 1, p. 95-103, 1997.

CORTESI, R.; NASTRUZZI; C. Liposomes, micelles and microemulsions as new delivery systems for cytotoxic alkaloids. *PSTT*. v. 2, n. 7, July 1999.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Therapeutic Carrier Systems*, v. 19,n. 2, p. 99-134, 2002.

CSABA, N.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M. J. PLGA: Poloxamer and PLGA: Poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 164–172, 2006.

DEY, J.; WARNER, M. I. 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.

DRUMOND, S. W.; WANG, H. S.; MOTHÉ, G. C. Síntese e caracterização do copolímero poli ( ácido láctico-b-glicol etilénico). *Polímeros: Ciência e tecnologia*, v.14 n.2, p.74-79 , 2004.

DU, J.Y.; LEMSTRA, J.P.; ATZE, J.; NIJENHUIS, J.A.; AERT, M.A.H.; BASTIAANSEN, C. ABA Type Copolymers of Lactide with Poly(ethylene glycol). Kinetic, Mechanistic, and Model Studies. *Macromolecules*, v. 28, p. 2124-2132, 1995.

EMERSON, D. L. Liposomal delivery of camptothecins. *PSTT*. v..3, n. 6 June 2000.  
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.

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.

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.

FUNCK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. Weinheim: VHC, 1992.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 68, p. 335-357, 2002.

GRAF, R.; DEVISSAGUET, J.; BARRAT, G. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: Effects of PEG chain Length and density. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 10, 2001.

GRAF, R.; MINATAKE, Y.; PERACCHIA, M. T.; TRUBETSKOY, V.; TORCHILIM, V.; LANGER, R. Biodegradable long-circulation 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, nº 11, p. 949-962, 1990.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v. 113, p.57-63, 1995a.

GUTERRES, S. S. ; MÜLLER, C. R. ; MICHALOWSKI, C. B. ; POHLMANN, A. R. ; COSTA, T. D. Gastrointestinal tolerance after oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *S T P Pharma Sciences*, v. 11, p. 229-233, 2001.

HATEFI, A.; AMSDEN, B. Camptothecin delivery methods. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n. 10, p. 1389-1399, 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.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human use: *Q2B-validation of Analytical procedures: methodology* 2000.

INCA – Ministério da Saúde, Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso: Junho 2007.

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, 1991.

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, 1991.

JUNG, T.; KAMM, W.; BREITENBACH, A.; KLEBE, G.; KISSELI, T. Loading of TetanusToxoid to Biodegradable Nanoparticles from Branched Poly(Sulfobutyl-Polyvinyl Alcohol)-g-(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles by Protein Adsorption: A Mechanistic Study. *Pharmaceutical Research*, v. 19, p. 1105-1113, 2002.

KAWATO, Y.; FURUTA, T.; AONUMA, M.; YASUOKA, M.; YOKOKURA, T.; MATSUMOTO, K. Antitumor activity of camptothecin derivate, CPT-11, against humor tumor xenografts in nude mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 28, p. 192-198, 1991.

KAWANO, K.; WATANABE, M.; YAMAMOTO, T.; YOKOYAMA, M.; OPANASOPIT, P.; OKANO, T.; MAITNI, Y. Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long circulating polymeric micelles. *Journal of Controlled Release*, v.112, p. 329-332,2006.

KNIGHT, V.; KOSHKINA, N.V. Anticancer effect of 9-nitrocamptothecin liposome aerosol on human cancer xenografts in nude mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 44, p. 177-185,1999.

KNIGHT, V.; KLEINERMAN, E.S.; WALDREP, J.C.; GIOVANELLA, B.C.; GILBERT, B.E.; KOSHKINA, N.V. 9-nitrocamptothecin liposome aerosol treatment of human cancer subcutaneous xenografts and pulmonary cancer metastases in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 922, p.151-163, 2002.

KOO, M. O.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: A novel nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 1, p. 77– 84, 2005.

KULINSKI, Z.; PIORKOWSKA, E. Crystallization, structure and properties of plasticized poly(L-lactide). *Polymers*, v. 46, p. 10290-10300, 2005.

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.

KUNNI, R.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 9-17, 2006.

LALOO, A.; CHAO, P.; HU, P.; STEIN, S.; SINKO, J. P. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of a novel in situ forming poly(ethylene glycol)-based hydrogel for the controlled delivery of the camptothecins. *Journal of Controlled Release*, v. 112, p. 333-342, 2006.

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.

LIU, J.; LI, L.; CAI, Y. Immobilization of camptothecin with surfactant into hydrogel for controlled drug release. *European Polymer Journal*, v. 42, p. 1767-1774, 2006.

LUNDBERG, B.B. Biologically active camptothecin derivatives for incorporation into liposome bilayers and 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.

MALVERN INSTRUMENTS. Disponível em:  
<<http://www.malvern.co.uk/LabEng/products/IWTM/iwtm.htm>>. Acesso: Julho 2007

MARTIN, O.; AVÉROUS, L. Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymers*, v. 42, p. 6209-6219, 2001.

MALLERY, S.R.; SHENREDOVA A.; PEI, P.; BEGUM, S.; CIMIMIERI, 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. 21p. 1713-1722, 2001

MIURA, H.; ONISHA, H.; SASATSU, M.; MACHIDA, Y. Antitumor characteristics of methoxypolyethylene glycol-poly(DL-lactic acid) nanoparticles containing camptotheci. *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 Chemother Rep*, v. 56, p 95-101, 1972.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. *Critical Reviews™ in The Therapeutic Carrier Systems*, v. 18, n. 6, p.527-550, 2001

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to Practice. *Pharmacological Reviews*, v. 53, p. 283-318, 2001.

MONTASSER, I.; BRIANÇOM, 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.; MORGAT, J.; VERT, M.; MYSIKINE, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J.; BARRAT, G. Biodistribution of long-circulation PEG-grafted nanocapsules in mice: Effects of PEG chain length and density. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 10, p. 1411-1419, 2001.

MOSQUEIRA, V.C.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRAT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, v. 22, p. 2967–2979, 2001.

MOSQUEIRA, V. C.; 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 process properties. *Journal of Pharmaceutics Sciences*, v. 89, n.5, p.614-626, 2000.

MU, L.; CHRASTINA, A.; LEVCHENKO, T.; TORCHILIN, P. V. Micelles from poly(ethylene glycol)-phosphatidyl ethanolamine conjugates (PEG-PE) as pharmaceutical carriers for poorly soluble drug camptothecin, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 1, p. 190–196 , 2005.

NECKEL, L. G. *Avaliação do potencial de utilização de nanocápsulas poliméricas na melhoria da resposta antitumoral de um alcalóide citotóxico, a camptotecina*. Florianópolis, 2004. Dissertação (mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina.

NECKEL, G.; LEMOS-SENN, E. Preparação e Caracterização de Nanocápsulas Contendo Camptotecina a partir do Ácido poli (D,L-lático) e de Copolímeros Diblocos do Ácido Poli (D,L-lático) e Polietilenoglicol. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 24, n. 4, p. 504-511, 2005.

NECKEL, G.; NEMEN, D.; PUHL, A.C.; FERNANDES, D.; STIMAMIGLIO, M.A.; SILVA, M.A.; HANGAI, M.; SILVA, M.C.S.; LEMOS-SENN, E. Stealth and non-stealth nanocapsules containing camptothecin: in vitro and in vivo activity on B16-F10 melanoma. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, p. 1-6, 2007.

NISHINO, S.; KISHIDA, V.; YOSHIZAWA, H. Morphology control of polylactide microspheres enclosing irinotecan hydrochloride with polylactide based polymer surfactant for reduction of initial burst. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 330, p 32-36, 2006.

O'LEARY, J.; MUGGIA, F.M. Camptothecins: a review of their development and schedules of administration. *European Journal of Cancer*, v. 34, p. 1500-1508, 1998.

ONISHI, H.; MACHIDA, Y.; MACHIDA, Y. Antitumor Properties of Irinotecan-Containing Nanoparticles Prepared Using Poly(DL-lactic acid) and Poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol). *Biol Pharm Bull*.v. 26, n. 1, p. 116-119, 2003.

PIORKOWSKA, E.; KULINSKI, Z.; GALESKI, A.; MASIREK, R. Plasticization of semicrystalline poly(L-lactide) with poly(propylene glycol). *Polymers*, v. 47, p. 7178-7188, 2006.

PRISTA, N. L.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. Tecnologia Farmacêutica. 5 *Biol. Pharm. Bull* ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1989.

PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. Vectorisation et vecteurs de médicaments. *S.T.P. Pharma*, v.5, n.2, p. 107-113, 1989.

PUISIEUX, I.; EVEN, J.; PANNETIER, C.; JOTEREAU, F.; FAVROT, F.; KOURILSKY, P. Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *Journal of Immunology*, v.153, p. 2807-2818, 1994.

QUINTANAR-GERRERO, 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, p. 1113-1128, 1998.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, JM. *Farmacologia*. 4<sup>a</sup> 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 Pharmaceutical*, v. 126, p. 253-260, 1995.

RUDDON, R. W. *Cancer Biology*. New York: Oxford University Press. 3<sup>a</sup> ed, 1995.

SCHAFFAZICK, R. S.; GUTERRES, S. S; FREITAS, L. L.; POHLMANN, R. A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, R. S.; POHLMANN, R. A.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, p. 562-569, 2006.

SHENDEROVA, A.; BURKE, T. G.; SCHWENDEMAN, S. O. 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 camptothecin analogues as antitumor agents. *Journal of the National Cancer Institute*, v.4, p. 271-291, 1993.

SOLIMANDO, D. A.; BRESSLER, L. R.; KINTZEL, P. E.; GERACI, M. C. *Drug Information Handbook for Oncology*. 2<sup>a</sup> ed. Hudson: Lexi-Comp, 2000.

SONVICO, F.; CAGNANI, A.; ROSSI, A.; MOTTA, S.; DI BARI M. T.; CAVATORTA, F.; ALONSO, M. J.; DERIU, A.; COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 324, p. 67-73, 2006.

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.

SOUZA, N. V. M. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova*, v. 27, p. 308-312, 2004.

STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. Long circulating microparticulate drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.16, p. 195-214, 1995.

TORCHILIN, V. P. Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 11, p. S81-S91, 2000.

TYNER, K.M.; SCHIFFMAN, S.R.; GIANNELIS, S.E.P. Nanobiohybrids as delivery vehicles for camptothecin. *Journal of Controlled Release*, v. 3, p 501-514, 2004.

USP28/NF23. United States Pharmacopeia & National Formulary. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005

VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; BEELEN, R. H.; LANGENHUIJSEN, M. M. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *Journal of Immunological Methods* , v. 141, n. 1, p. 15-22, 1991.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO M. Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 78, p. 15-24 , 2002

WALL, M. E.; WANI, M. E. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 239-254, 1996.

WASHINGTON, C. Drug releas from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 58,p. 1-12, 1990.

YANG, C. S.; LU, F. L.; CAI, Y.; ZHU, B. J.; LIANG, W. B. YANG, Z. C. 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.

ZAMBAUX, M. F., BONNEAUX, F., GREF, R., DELLACHERIE, E., VIGNERON, C. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 5, n. 60, p. 179-188, 1999.

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. *Currents Pharmaceutical Design*, v. 8, p. 2505-2520, 2002.

## 8. ANEXOS

**ANEXO A - Artigo científico aceito por Journal of AOAC INTERNATIONAL em  
07/10/2007.**

**Development and Validation of a HPLC Method to Quantify  
Camptothecin in Polymeric Nanocapsule Suspensions**

Andréa Granada<sup>1</sup>, Fabio S. Murakami <sup>2</sup>, Tatiane Sartori<sup>1</sup>, Elenara Lemos-Senna<sup>1\*</sup>,  
Marcos A.S. Silva<sup>2</sup>

Laboratório de Farmacotécnica<sup>1</sup>, Laboratório de Controle de Qualidade<sup>2</sup>,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina.  
Campus Universitário Trindade, Florianópolis, SC 88040-900.

\*Author correspondence: lemos@ccs.ufsc.br

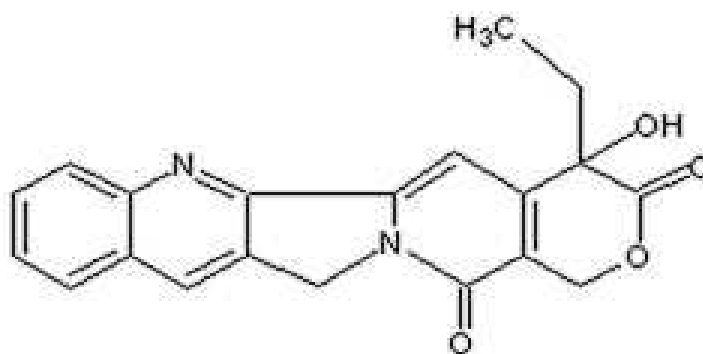
**Abstract**

A simple, rapid and sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method was developed and validated to quantify camptothecin (CPT) in polymeric nanocapsule suspensions. The chromatographic separation was performed on a Supelcosil LC-18 column (15 cm x 4.6 mm ID, 5  $\mu\text{m}$ ; Supelco) using a mobile phase constituted of methanol:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM (60:40, v/v; pH 2.8) at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and UV detection (254 nm). The calibration curve was linear ranging from 0.5 to 3.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  with a correlation coefficient of 0.9979, while the limit of quantification was 0.35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The assay recovery ranged from 97.3 to 105.0 %. The intra and inter-day relative standard deviation were lower than 5.0 % (R.S.D.). The validation results confirmed that the developed method is specific, linear, accurate and precise for its intended use. The current method was successfully applied to the evaluation of CPT entrapment efficiency and drug content in polymeric nanocapsule suspensions during the early stage of formulation development.



## Introduction

Camptothecin (CPT, Figure 1) belongs biogenetically to a family of modified monoterpenoid indole alkaloids. This drug has shown a high antitumor activity against a wide spectrum of malignances, in which the mechanism involves the inhibition of topoisomerase I, an enzyme entailed in the DNA replication, recombination and transcription process. CPT encloses in its structure a highly conjugated pentacyclic ring with a  $\alpha$ -hydroxylactone portion at carbon 12, which is essential for its *in vitro* and *in vivo* activity. However, the full utility of CPT has still not been achieved therapeutically, which is mainly due to its low water solubility and low stability in the physiological medium. After intravenous administration, CPT undergoes a fast non-enzymatic hydrolysis of the lactone ring, forming a less active and more toxic product known as carboxylate form (1). The decreasing of the cell membrane binding, membrane diffusibility, and intrinsic potency against the topoisomerase target has been connected with the reduction in cytotoxic activity that accompanies the lactone ring opening of camptothecin (2).



**Figure 1.** Chemical structure of camptothecin.

The development of a new controlled release strategy is greatly called for to promote a better clinical use for this drug (3). Over the past few decades, there has been considerable interest in the development of biodegradable nanoparticles as

effective drug delivery systems. These colloidal carriers have shown the following advantages: (i) drug protection against in vivo degradation; (ii) increase of the bioavailability of poorly water-soluble drugs; and (iii) ability to control the drug release (4). Nanoparticles also modify the kinetics and body distribution leading to the reduction of systemic toxicity of an associated drug (5).

A number of different polymers have been used to prepare nanoparticles as drug carriers; however, poly (D,L-lactide) (PLA) is by far the preferable, due to its biodegradation and biocompatibility characteristics. PLA nanoparticles are rapidly removed from systemic blood circulation by the cells of the mononuclear phagocyte system (MPS) following intravenous administration. The rapid removal of conventional nanoparticles from the bloodstream has limited the drug from arriving to other organs rather than the liver and the spleen. In this regard, particles that display hydrophilic surface coating, such as polyethyleneglycol, are designed to resist recognition and uptake by phagocytic cells, exhibiting long plasma residence after intravenous administration (6). In the case of CPT, drug delivery into nanocarriers may offer improved chemical stability of encapsulated drug association with prolonged drug exposure.

The methods that have been reported on the determination of CPTs analyze only water-soluble CPT derivatives (7-9). Furthermore, most of them have focused on biological samples and no one validated method to quantify CPT loaded nanoparticles has been described, despite of the many attempts to develop delivery systems for this insoluble drug (10-14). Polymeric nanocapsules prepared from PLA and PLA-PEG with different molecular weights have been explored in our research group with the aim to improve the stability and biological performance of CPT. As a support for formulation development and future pre-clinical studies, a specific and sensitive analytical method was developed and validated. Therefore, in this study we aimed at validating a RP-HPLC method to quantify CPT and at estimating the drug entrapment efficiency in naked-PLA and polyethylene glycol (PEG) surface modified nanocapsules.

## **Experimental**

### ***Chemicals and reagents***

Camptothecin and poly (D,L-lactide) (PLA, 90-120 kD) were purchased from Sigma-Aldrich (USA); methoxy polyethylene glycol-(D,L-lactide) (PLA-PEG 49 kD and 66 kD; 25% of polyethylene glycol) were provided by Alkermes Inc. (USA). The other excipients used to prepare the nanocapsule suspensions were soybean hydrogenated lecithin (LIPOID S 75-3N) and purified castor oil, which were obtained from Lipoid GmbH (Germany), and ethylene oxide/propylene oxide block copolymer (Pluronic F68), which was kindly donated by Basf Chemical Company (Germany). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q<sup>®</sup>Plus apparatus by Millipore (Billerica, USA). Except for the methanol used in the HPLC analysis (Vetec<sup>®</sup>, Brazil), all other reagents and solvents were of analytical grade.

### ***Chromatographic system and conditions***

The HPLC system consists of a Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japan) including a LC-10AD pump, a SPD-10AV variable-wavelength detector, a SCL-10Avp controller unit and a sample injection performed via Rheodyne 7125 valve with 20  $\mu$ L loop. The chromatographic separation was achieved using a Supelcosil LC-18 column (15 cm x 4.6 mm ID, 5  $\mu$ m; Supelco) with a mobile phase constituted of methanol:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM (60:40, v/v) adjusted at pH 2.8 with phosphoric acid, at the flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 20  $\mu$ L and the CPT was detected by UV absorption at 254 nm. The column was operated at 40  $\pm$  1 $^{\circ}$ C. Data acquisition was performed using CLASS\_VP software by measurement of detected peak areas.

### ***Preparation of stock and working solutions***

The stock solution of CPT was prepared by accurately dissolving weighted

25.0 mg in 25.0 mL of DMSO, resulting in a  $1.0 \text{ mg mL}^{-1}$  solution of the drug. From this solution, a working standard solution of  $50.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  was prepared in methanol. This solution was then diluted as needed to prepare different standard solutions: 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and  $3.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  in methanol.

### ***Preparation of nanocapsule suspensions***

Nanocapsule suspensions were prepared using the interfacial deposition process after a solvent displacement as described by FESSI et al., 1989 (15). Briefly, 60.0 mg of PLA or PLA-PEG (49 or 66.6 kD) was dissolved in acetone containing 0.250 mL of castor oil and 0.50 mg of CPT. The resulting solution was mixed with 25.0 mg of lecithin previously dissolved in an acetone:ethanol (60:40 v/v) solution and the final volume of the organic phase was adjusted to 12.0 mL. This organic phase was poured into an aqueous phase (26.0 mL) containing 0.375 % of Pluronic F 68 (w/v) pH 5.0, under magnetic stirring. Acetone and ethanol were then eliminated by evaporation under reduced pressure and the final volume of the suspension was adjusted to 10.0 mL. Finally, the colloidal suspensions were filtered through a  $0.8 \text{ } \mu\text{m}$  cellulose ester membrane (Millex AA, Millipore, USA) and were denoted as  $\text{PLA}_{\text{CPT}}$ ,  $\text{PLA-PEG}_{\text{CPT}}$  (49 kD) and  $\text{PLA-PEG}_{\text{CPT}}$  (66 kD). Unloaded-PLA, PLA-PEG (49 kD), and PLA-PEG (66 kD) nanocapsule suspensions (PLA, PLA-PEG 49 kD and PLA-PEG 66 kD, respectively) were prepared and treated in the same manner as the samples. The nanocapsule suspensions were injected into the chromatographic system after dissolution in methanol.

### ***Method validation***

The validation parameters evaluated were specificity, linearity and range, accuracy, precision, limit of quantification, and robustness. The validation process was based on the pharmaceutical regulatory guidelines ICH, USP, EP (16-18).

**(a) Specificity.-** The specificity of the chromatographic method was evaluated by

analyzing unloaded nanocapsule suspensions in order to verify that none of the excipients used in the formulation of CPT nanocapsules interfered with the quantitation of the drug. The samples were injected into the chromatographic system in triplicate.

**(b) Linearity and Range.**- Five standard solutions ranging from 0.5 to 3.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in concentration, in three replicates each, were injected into the HPLC system. The calibration curve was obtained by plotting the peak areas of the standard solutions against the theoretical standard concentrations. The linearity was evaluated by linear least-squares regression analysis.

**(c) Accuracy.**-The accuracy was investigated by spiking an unloaded nanocapsule suspensions with known concentrations of CPT standard solution at three different levels (lower, medium and upper concentration) corresponding to CPT final concentrations of 0.75, 1.5 and 3.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The analyses were carried out in triplicate. The recovery (R %) was estimated after the HPLC analysis following:

$$R (\%) = \frac{C_{\text{snc}} - C_{\text{nc}}}{C_{\text{ss}}} \times 100, \text{ in which R is the recovery, } C_{\text{snc}} \text{ is CPT concentration in}$$

spiked nanocapsule suspension,  $C_{\text{nc}}$  is CPT concentration in unloaded nanocapsule suspension, and  $C_{\text{ss}}$  is the CPT concentration in standard solution.

**(d) Precision.**- The precision of the method was determined by measuring the repeatability (intra-day precision) and the intermediate precision (inter-day precision), both expressed as relative standard deviation (RSD %). The precision was evaluated by assaying nanocapsule suspension samples of PLA, PLA-PEG (49 kD) and PLA-PEG (66 kD) with the same concentration of CPT (1.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The repeatability was evaluated injecting six samples of each nanocapsule suspensions on the same day under the same experimental conditions. The intermediate precision was evaluated by assaying each nanocapsule suspensions on three different days. The relative standard deviation was calculated.

**(e) LOQ determination.**- The limit of quantification value (LOQ) was calculated directly from the calibration plot. It is defined as the lowest concentration in the standard curve that can be measured, with acceptable accuracy and precision. LOQ

may be expressed as:  $LOQ = \left( \frac{10 \delta}{S} \right)$ , where  $\delta$  is the standard deviation of the

response and S is the slope of calibration curve.

**(f) Robustness.-** The robustness was assessed by analyzing entrapment efficiency of the nanocapsule suspensions under slightly variations on the method conditions, including variation of organic-to-aqueous in the mobile phase, temperature, and flow rate.

### ***Drug entrapment efficiency***

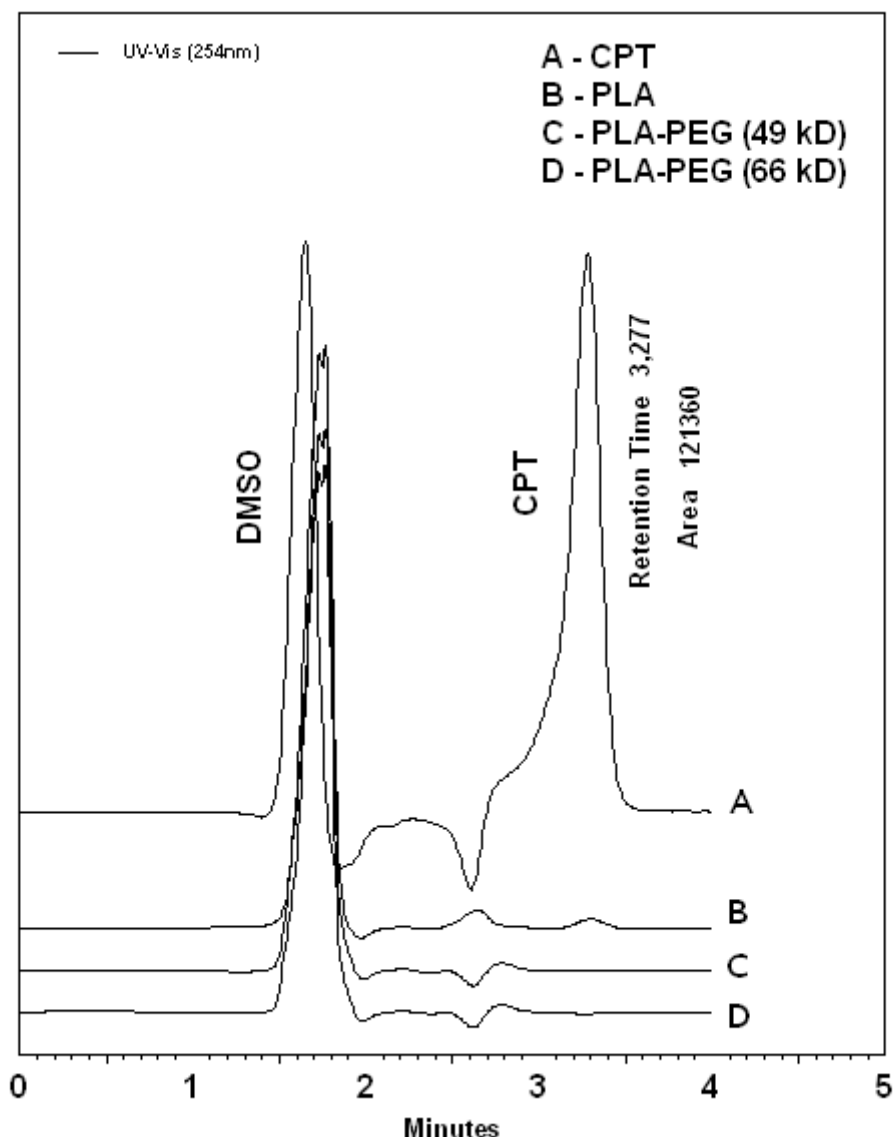
Entrapment efficiency and CPT content in the nanocapsule suspensions were determined using the developed RP-HPLC method. The entrapment efficiency (%) was estimated as being the difference between the total concentration of CPT found in the nanocapsule suspensions after their complete dissolution in methanol and the concentration of drug in the supernatant obtained by suspension ultrafiltration/centrifugation procedure using Ultrafree-MC® membranes (100000 NMWL; Millipore, USA). The drug content was expressed in micrograms of camptothecin per milliliter of suspension.

## **Results and discussion**

Each analytical procedure must be validated according to parameters which are relevant to its performance. It is the responsibility of the analyst to identify the critical performance parameters and design the validation study adequately (19). In the present study, a reversed phase HPLC method was employed to quantify CPT in polymeric nanocapsule suspensions. Since lactone is the active form of the CPT, a suitable analytical method to discriminate lactone from carboxylate forms would represent the major objective of quantitation methods. The pH-dependent structural conversion was found to be reversible; therefore, it is imperative that the pH of the sample mobile phase be kept at the same level to prevent structural conversion during sample preparation and assay. However, hydrolysis of the lactone ring may occur due improper storage conditions and during the handling of the samples, resulting in unreliable quantitation data.. In addition, since the pH of the external phase of the suspensions was adjusted to values lower than 5.0, it is supposed that

the lactone is the predominant form of CPT in the nanocapsule suspensions. Therefore, in order to determine only the total CPT, and, for practical purposes, the acidification of the mobile phase to pH 2.8 was carried out to evaluate the entrapment efficiency of the CPT into the nanocapsules. In this case, phosphoric acid was used to control the pH of the mobile phase and methanol was used to control the retention time of the lactone form of CPT. After several trials, the best peak performance was achieved when the volume ratio of methanol and phosphoric acid buffer 10mM was 60:40 (v/v).

A typical chromatogram of CTP is shown in Figure 2 A under the specified chromatographic conditions. A single and defined peak of the drug was observed in about 3 minutes; the first peak in approximately 1.5 minutes corresponds to the DMSO solvent which was used to dilute CPT. In order to reassure the specificity of the current method, unloaded nanocapsule suspensions containing the same concentration of polymer and other excipients were analysed. The chromatograms showed that the method is specific and no interference from the polymers and other excipients was detected at 254 nm in the employed chromatographic conditions. The chromatograms are shown in Figures 2 B, C and D.



**Figure 2.** Chromatograms obtained after injection of: (A) CPT standard solution  $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (B) unloaded-PLA nanocapsule suspensions, (C) unloaded-PLA-PEG 49 kD nanocapsule suspensions and (D) unloaded-PLA-PEG 66 kD nanocapsule suspensions

The calibration curve for CPT in polymeric nanocapsule was linear over the range of  $0.5 - 3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  with a correlation coefficient of 0.9979. The regression equation of the media calibration curve ( $n=3$ ) was  $y = 12006x - 1687$ . The slope and intercept standard deviation was  $\pm 4713.15$  and  $\pm 5622.57$ , respectively. The validity of the assay was verified by analysis of variance, which confirmed that the regression equation was linear ( $F_{\text{calculated}} = 2350.8 > F_{\text{critical}} = 7.05$ ;  $P = 5\%$ ). The LOQ of the method was extrapolated directly from the calibration curve as described in the current ICH guideline. LOQ was  $0.35 \mu\text{g mL}^{-1}$  (R.S.D. = 3.2 %), indicating that the method was sufficiently sensitive to be used for the drug entrapment evaluation.



The precision of the developed method is displayed in Table 1. The results showed that the intra- and inter-day relative standard deviations (R.S.D.) were lower than 5.0 %. The experimental values indicated a satisfactory intra-day and inter-day variability. The amounts of CPT found on the three different days were equivalent for all developed nanocapsules ( $P < 0.05$ ).

**Table 1.** Results obtained in the precision evaluation of the method

Sample		Experimental Amount ( $\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{SD}$ )	RSD (%)
PLA	Intra-day		
	Day 1 (n=6)	1.52 $\pm$ 0.03	2.3
	Day 2 (n=6)	1.54 $\pm$ 0.02	1.7
	Day 3 (n=6)	1.57 $\pm$ 0.05	3.2
	Inter-day (n=18)	1.54 $\pm$ 0.05	3.4
PLA-PEG (49 kD)	Intra-day		
	Day 1 (n=6)	1.55 $\pm$ 0.07	4.5
	Day 2 (n=6)	1.53 $\pm$ 0.02	1.4
	Day 3 (n=6)	1.57 $\pm$ 0.03	2.7
	Inter-day (n=18)	1.55 $\pm$ 0.04	3.1
PLA-PEG (66 kD)	Intra-day		
	Day 1 (n=6)	1.51 $\pm$ 0.04	3.2
	Day 2 (n=6)	1.52 $\pm$ 0.03	1.5
	Day 3 (n=6)	1.52 $\pm$ 0.04	3.1
	Inter-day (n=18)	1.52 $\pm$ 0.04	2.9

The accuracy of the method was evaluated using the three developed nanocapsule suspensions: PLA, PLA-PEG (49 kD) and PLA-PEG (66 kD). The recovery was determined as a percentage of the difference between the experimentally mean concentration and the theoretical concentration at three different levels. Each level was tested three times. The results are given in Table 2 and which provides evidence that good recoveries were obtained.

**Table 2.** Recovery of CPT standard solution added to nanocapsule suspension samples

Sample	Amount of CPT		Recovery (%) (n=3)	RSD (%)
	Added concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Measured concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
PLA	0.75	0.77	97.3	0.5
	1.50	1.57	102.0	0.8
	3.00	3.06	100.6	1.6
PLA-PEG (49 kD)	0.75	0.77	102.6	0.4
	1.50	1.56	103.0	1.3
	3.00	3.1	103.0	1.7
PLA-PEG (66 kD)	0.75	0.79	104.0	1.2
	1.50	1.56	104.0	0.6
	3.00	3.15	105.0	0.5

At last, the robustness was also investigated. Slightly variations on the method conditions had no significant effect on assayed data or on chromatographic performance, indicating the robustness of method and its suitability for other laboratories. The results from the robustness testing are presented in Table 3. The variations of mobile phase, temperature, and flow rate of the chromatographic conditions did not affect the entrapment efficiency, which was confirmed by analysis of variance ( $P < 0.05$ ).

**Table 3.** Results obtained from the study of method robustness

Conditions		Entrapment Efficiency (mean $\pm$ RSD)		
		PLA <sub>CPT</sub>	PLA-PEG (49 kD) <sub>CPT</sub>	PLA-PEG (66 kD) <sub>CPT</sub>
Mobile phase (Methanol:phosphate buffer)	55:45	93.94 $\pm$ 0.1	96.47 $\pm$ 0.1	95.83 $\pm$ 0.1
	50:50	94.05 $\pm$ 0.1	96.60 $\pm$ 0.1	95.59 $\pm$ 0.3
Temperature ( $^{\circ}$ C)	41	94.17 $\pm$ 0.4	97.17 $\pm$ 0.1	94.79 $\pm$ 0.2
	39	94.36 $\pm$ 0.2	96.92 $\pm$ 0.8	96.68 $\pm$ 0.1
Flow ( $\text{mL min}^{-1}$ )	1.1	94.84 $\pm$ 0.1	97.02 $\pm$ 0.1	96.22 $\pm$ 0.3
	0.9	94.91 $\pm$ 0.1	96.95 $\pm$ 0.1	97.12 $\pm$ 0.1

For all formulations, the entrapment efficiency values were higher than 90%. These high values were achieved by maintaining the poor water soluble lactone form of the camptothecin during the nanoencapsulation process, which was obtained adjusting the aqueous phase pH to values lower than 5.0. The drug content ranged from 34.38 to 43.07  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The higher drug content was obtained when the PLA-PEG 66 kD was used to prepare the nanocapsule suspensions. The results (table 4) suggest that the current method was successfully applied to determine CPT content and drug entrapment efficiency (EE) in polymeric nanocapsule suspensions.

**Table 4.** Entrapment efficiency and drug content results obtained after CPT quantification in the nanocapsule suspensions.

Polymer	Entrapment Efficiency (% $\pm$ RSD)	Drug content ( $\mu\text{g/mL} \pm$ RSD)
PLA <sub>CPT</sub>	94.88 $\pm$ 1.2	34.38 $\pm$ 0.7
PLA-PEG (49 kD) <sub>CPT</sub>	97.03 $\pm$ 0.3	35.11 $\pm$ 0.8
PLA-PEG (66 kD) <sub>CPT</sub>	95.98 $\pm$ 0.5	43.07 $\pm$ 0.4

## Conclusions

The developed and validated method proved to be specific, linear, accurate, precise and robust. The reliable isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatographic method was successful to quantify CPT in polymeric nanocapsule suspensions. Furthermore, the analytical method ensures the quantitation of the CPT nanocapsule suspensions, encouraging its application for quality evaluation.

## References

- [1] Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T., & Sim, G.A. (1966) *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3888-3890
- [2] Hateffi, A., & Amsden, B. (2002) *Pharm. Res.* **19**,1387-1397
- [3] Liu, J., Li, L., & Cai, Y. (2006) *Europ. Polym. J.* **42**, 1767-1774

- 
- [4] Caroline, L.B., Ruxandra, G., & Patrick, C. (2004) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 327-34.
- [5] Kayser, O., Lemke, A., & Hernandez-Trejo, N. (2005) *Curr. Pharm. Biotechnol.* **6**,3-5
- [6] Avgoustakis, K. (2004) *Curr. Drug Deliv.* (2004) **1**, 321-333
- [7] Derakhshandeha, K., & Dadashzadeha, S. (2005) *J. Chromatogr. B.* **818**, 199-204.
- [8] Xuana, T., Zhang, J. A., & Ahamad, I. (2006) *J. Pharm. Biom. Anal.* **41**, 582-588
- [9] Zhao, Y. X., Gaoa, J.Q., Qiao, H.L., Chena, H.L., & Liang, W.Q. (2006) *J. Pharm. Biom. Anal.* **41**, 1007-1010
- [10] Hatefi, A., & Amsden, B. (2002) *Pharm. Res.* **19**, 1389-1399
- [11] Shenderova, A., Burke, T., & Schwendeman, S. (1997) *Pharm. Res.* **14**, 1406-1414
- [12] Ertl, B., Platzer, P., Wirth, M. & Gabor, F. (1999) *J. Control. Release* **61**, 305-317
- [13] Zhang, J., Xuan, T., Parmar, M., Ma, L., Ugwu, S., Ali, S., & Ahmad, I. (2004) *Int. J. Pharm.* **270**, 93-107
- [14] Cortesi, R., Esposito, E., Maietti, A., Menegatti, E., & Nastruzzi, C. (1997) *Int. J. Pharm.* **159**, 95-103
- [15] Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989) *Int. J. Pharm.* **55**, 25-28
- [16] International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and Methodology, ICH-Q2(R1), November 2005, Geneva.
- [17] The United States Pharmacopeia 23, U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD (1995).
- [18] European Pharmacopeia (2003) Vol. I, Her Majesty's Stationary Office, London, UK.
- [19] Ermer, J. (2001) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**,55.