

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

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA
TERAPÊUTICA DE MICROESFERAS DE CAMPTOTECINA PREPARADAS A
PARTIR DA POLI-ε-CAPROLACTONA.**

CRISTIANA LIMA DORA

**FLORIANÓPOLIS
2003**

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

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA
TERAPÊUTICA DE MICROESFERAS DE CAMPTOTECINA PREPARADAS A
PARTIR DA POLI-ε-CAPROLACTONA.**

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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Alvarez Silva

CRISTIANA LIMA DORA

FLORIANÓPOLIS

2003

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. MATERIAIS E MÉTODOS

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. CONCLUSÕES

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

Aos meus pais,
Ana Maria e Luiz Gonzaga.

Agradecimentos

A Prof. Dra. Elenara Lemos Senna pela orientação, oportunidades e compreensão em todos os momentos dessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Marcio Alvarez Silva pela co-orientação e incentivo para realização dos ensaios *in vivo*.

A Prof. Dra. Ângela Campos, Prof. Dr. Anicleto Poli, Prof. Dr. Jamil Assreuy e Prof. Dr. Valdir Soldi pelos ensinamentos, contribuições e disponibilidade e ao Prof. Dr. Carlos Zanetti por ter tornado possível a utilização do biotério de camundongos.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas, em especial a Sandra, Nilson e Solange pela ajuda fornecida durante a realização dos ensaios.

Ao Aluísio e ao Marco pelo auxílio e amizade no decorrer do trabalho e ao Daniel, por ser meu anjo da guarda.

Aos amigos e colegas do mestrado e iniciação científica, especialmente a Taty, Geci, Dani e Robson, pelo companheirismo, colaboração e pelos bons momentos compartilhados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Leonardo, pelo amor, paciência e apoio irrestrito.

Aos meus pais, que mesmo não estando mais presentes, me ensinaram a lutar pelos meus sonhos e devem estar assistindo essa vitória.

A minha família, pelo amor e incentivo para que eu realizasse mais essa etapa importante da minha vida e aos meus padrinhos, Cely e Fuscaldo, por tudo.

Aos meus irmãos, por me ajudarem a vencer todos os momentos difíceis através do seu carinho, seu exemplo e sua coragem.

RESUMO

A camptotecina é um fármaco que apresenta uma considerável atividade antitumoral cujo mecanismo de ação envolve a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores. Entretanto, a administração intravenosa deste fármaco é limitada devido a sua baixa solubilidade aquosa em soluções apresentando baixos valores de pH, e a sua inativação, decorrente da abertura do anel lactônico, em pH fisiológico. Além disso, a administração de camptotecina em doses baixas e protocolos prolongados tem demonstrado ser mais efetiva para o tratamento do câncer do que o emprego de altas doses por um curto período de tempo, tornando este fármaco perfeitamente adaptável para a utilização em estratégias terapêuticas que visam a liberação prolongada. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi preparar microesferas de poli-ε-caprolactona (PCL) contendo camptotecina, visando à manutenção da integridade da molécula frente à inativação pelo pH fisiológico, o prolongamento da liberação do fármaco e a melhoria da eficácia terapêutica. As microesferas de PCL contendo camptotecina (CPT) foram preparadas pela técnica de emulsificação/extração do solvente. A influência da quantidade de CPT inicialmente adicionada (15, 30 e 60 mg) sobre a encapsulação do fármaco, bem como sobre as características das partículas foi avaliada. Após determinação da camptotecina por CLAE, a eficiência de encapsulação se manteve em torno de 81% em todas as preparações, mas o teor de fármaco aumentou proporcionalmente com o aumento da quantidade inicial de CPT. A obtenção de partículas esféricas apresentando superfície rugosa com tamanho em torno de aproximadamente 1-100µm foi verificada após visualização das microesferas por MEV, tendo sido a rugosidade relacionada à rápida eliminação do solvente orgânico da fase interna da emulsão proporcionada pela adição de etanol. Além disso, a presença de cristais de fármaco foi evidenciada na superfície das microesferas preparadas com 30 e 60 mg de CPT. Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados empregando-se como meio uma solução de tampão fosfato pH 7,4 a 37°C contendo Tween 80 2% (p/v). Para as microesferas preparadas com 15 e 30 mg de CPT foram obtidos percentuais de liberação em torno de 100% após 72 horas para ambas as formulações, sendo esta governada predominantemente por um fenômeno de difusão. No entanto o efeito *burst* variou sendo de 7% e 35% para as microesferas preparadas com 15 e 30 mg de CPT, respectivamente. Este resultado foi associado à presença de cristais de fármaco na superfície das partículas. A eficácia terapêutica das microesferas foi avaliada empregando-se o ensaio de metástase pulmonar, após a inoculação intraorbital de células B16-F10 em camundongos. Diferentes grupos de animais foram tratados com as microesferas e com o fármaco livre em intervalos de 3 ou 5 dias durante 24 dias. Após, os camundongos foram sacrificados, os pulmões foram removidos e o número de metástases foi contado. O sangue dos animais, previamente coletado por punção cardíaca, foi analisado para avaliação da toxicidade renal e hematológica. Neste ensaio, foi observado que todos os grupos tratados com a camptotecina conduziram à diminuição significativa do número de metástases pulmonares. No entanto, a presença de toxicidade foi verificada pela alta taxa de letalidade, perda significativa de peso e neutropenia, nos animais que receberam o fármaco livre. Nos grupos de camundongos tratados com as microesferas de camptotecina foi observada perda de peso significativa apenas naqueles que receberam o fármaco a cada 3 dias, mas não ocorreram óbitos nem neutropeunia. Desta maneira, as microesferas de camptotecina apresentaram eficácia terapêutica similar aquela do fármaco livre, mas com toxicidade significativamente reduzida. A administração de microesferas de CPT de liberação prolongada a cada 5 dias demonstrou ser mais segura, além de apresentar a vantagem de evitar o procedimento de perfusão intravenosa, geralmente incômodo ao paciente.

Palavras-chave: Camptotecina, microencapsulação, poli-ε-caprolactona, melanoma murino de alto poder metastático, células B16-F10.

ABSTRACT

Camptothecin is a drug which displays a considerable antitumoral activity whose action mechanism involves the inhibition of the topoisomerase I, enzyme found in high concentrations in tumors. However, the intravenous administration of this drug is limited due to its low aqueous solubility in acidic solutions and its inactivation in physiologic pH provided by the opening of the lactone ring. Moreover, the administration of camptothecin in lower doses and long protocols has shown to be more effective for the treatment of cancer than the use of higher doses in short period of time. By this reason camptothecin can be considered a good candidate to use prolonged release strategies. In view of this, the preparation of microspheres of poly- ϵ -caprolactone (PCL) containing camptothecin was realized in this work with the aim to maintain the integrity of the molecule, to prolongs the release of the drug and consequently to improve the therapeutic efficacy. The microspheres were prepared through the solvent emulsification/extraction technique. The influences of the amount of CPT initially added (15, 30 and 60 mg) on the encapsulation of the drug as well as on the characteristics of the particles were evaluated. After the determination of camptothecin by CLAE, the encapsulation efficiency was around 81% in all preparations, but the drug content increased proportionally with the increase of the initial amount of CPT. Spherical particles displaying rough surface with size varying between 1-100 μm were visualized in the micrographs obtained from microspheres by MEV. The formation of rougher particles was related to the faster elimination of the organic solvent of the internal phase of the emulsion provided by ethanol addition. Furthermore, the presence of the crystals of drug was verified in the surface of the microspheres prepared with 30 and 60 mg of CPT. The *in vitro* release studies were realized using buffer phosphate solution pH 7,4 containing Tween 80 2% (w/v) maintained at 37 $^{\circ}$ C as release medium. For the microspheres prepared with 15 and 30 mg of CPT, a total release was around 100% after 72 hours for both formulations. The linearization of release profiles demonstrated that the drug release is governed, predominantly, by a diffusion phenomenon. However, the *burst* effect varied and it was of 7% and 35% for the microspheres prepared with 15 and 30 mg of CPT, respectively. This result was associated to the presence of the crystals of drug in the surface of the particles. The therapeutic efficacy of microspheres was evaluated using a lung metastasis assay after the intraorbital inoculation of the B16-F10 cells in mice. Different groups of animals were treated with the microspheres and with the free drug in intervals of 3 to 5 days for 24 days. After that, the mice were sacrificed, the lungs were removed and the numbers of metastases were determined. The blood of the animals, previously collected by heart puncture, was analyzed for the evaluation of renal and hematological toxicity. It was observed that all of the groups treated with camptothecin had a significant decrease in the number of lung metastases. However, the presence of toxicity was verified by the high lethality, significant loss of weight and neutropenia in the animals that received the free drug. In the animals treated with camptothecin microspheres was observed significant weight loss only in those that received the drug every 3 days, but there were no deaths or neutropenia. Then, the camptothecin microspheres demonstrated similar therapeutic efficacy to those of the free drug but the toxicity was significantly reduced. The administration of prolonged release camptothecin microspheres has shown to be safer and presents the advantage of avoiding the perfusion procedures, which is generally uncomfortable to the patient.

Keywords: Camptothecin, microencapsulation, poly- ϵ -caprolactone, highly metastatic murine melanoma, B16-F10 cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	01
1.1 Introdução.....	02
1.2 Objetivo Geral.....	05
1.3 Objetivos Específicos.....	05
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07
2.1 Câncer.....	08
2.1.1 Aspectos gerais.....	08
2.1.2 Fisiopatologia do Câncer.....	09
2.1.3 Metástase.....	11
2.1.4 Quimioterapia.....	13
2.2. Camptotecina.....	14
2.2.1 Aspectos gerais.....	14
2.2.2 Atividade biológica e mecanismo de ação.....	15
2.2.3 Estabilidade.....	19
2.2.4 Derivados de camptotecina.....	21
2.2.5 Toxicidade e protocolos de administração das camptotecinas.....	25
2.3 Microencapsulação de fármacos.....	28
2.3.1 Definições e interesses da microencapsulação.....	28
2.3.2 Poli-ε-Caprolactona.....	30
2.4 Sistemas de liberação de camptotecinas.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Materiais.....	37
3.1.1 Matérias-primas.....	37
3.1.2 Reagentes e solventes.....	37
3.1.3 Cultura de células.....	38
3.1.4 Equipamentos.....	38
3.2 Metodologia.....	39
3.2.1 Preparação e caracterização das microesferas.....	39
3.2.1.1 Preparação das microesferas contendo camptotecina.....	39

3.2.1.2 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da camptotecina nas microesferas de poli- ϵ -caprolactona pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.....	40
3.2.1.2.1 Condições cromatográficas.....	40
3.2.1.2.2 Preparação da curva de calibração.....	41
3.2.1.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de camptotecina nas microesferas.....	41
3.2.1.3 Caracterização físico-química das microesferas.....	42
3.2.1.3.1 Avaliação da morfologia.....	42
3.2.1.3.2 Determinação do tamanho de partículas.....	42
3.2.1.3.3 Análise das microesferas por difração de Raios-X.....	42
3.2.2 Avaliação da velocidade de liberação.....	43
3.2.2.1 Determinação da concentração de camptotecina por espectrofluorimetria.....	43
3.2.2.1.1 Condições Fluorimétricas.....	43
3.2.2.1.2 Preparação da curva de calibração.....	43
3.2.2.1.3 Ensaios de liberação.....	44
3.2.3 Avaliação da eficácia terapêutica das microesferas em modelo de melanoma murino de alto poder metastático.....	44
3.2.3.1 Animais Experimentais.....	44
3.2.3.2 Preparação das células B16-F10.....	45
3.2.3.3 Estudos preliminares.....	46
3.2.3.3.1 Determinação do número de células inoculadas e do tempo dos ensaios <i>in vivo</i>	46
3.2.3.3.2 Determinação da dose de camptotecina e do protocolo de administração.....	46
3.2.3.4 Ensaios de metástase em pulmões.....	47
3.2.3.5 Ensaios de toxicidade.....	48
3.2.3.5.1 Hemograma.....	49
3.2.3.5.2 Dosagem de creatinina e ácido úrico.....	49

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Preparação e caracterização das microesferas.....	51
4.1.1 Preparação das microesferas contendo camptotecina.....	51
4.1.2 Caracterização físico-química das microesferas.....	55
4.1.2.1 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas microesferas de poli-ε-caprolactona.....	55
4.1.2.2 Avaliação da morfologia das microesferas.....	60
4.1.2.3 Determinação do tamanho de partículas.....	62
4.1.2.4 Difração de Raio-X.....	63
4.2 Avaliação da velocidade de liberação de camptotecina a partir das microesferas.....	64
4.5 Avaliação da eficácia terapêutica das microesferas de camptotecina...	75
4.5.1 Ensaio preliminares.....	76
4.5.2 Ensaio de metástase em pulmões.....	79
4.5.3 Ensaio de toxicidade.....	83
5. CONCLUSÕES	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	102
1. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animal.....	103

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
ARN	Ácido ribonucleico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
CPT	Camptotecina
CPT-11	Irinotecano
CPTs	Camptotecinas
CV	Coefficiente de variação
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico])
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
MB	Microesferas sem fármaco
MC15	Microesferas de poli-ε-caprolactona contendo 15 mg de CPT
MC30	Microesferas de poli-ε-caprolactona contendo 30 mg de CPT
MC60	Microesferas de poli-ε-caprolactona contendo 60 mg de CPT
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PCL	Poli-ε-caprolactona
PLGA	Poli-ácido-lático-co-glicólico
R ²	Coefficiente de regressão
SN-38	Metabólito do irinotecano
Topo I	Topoisomerase I
UV	Ultravioleta
9-AC	9-aminocamptotecina
9-NC	9-nitrocamptotecina
10-HCPT	10-hidroxycamptotecina

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Constituição dos grupos e do protocolo de administração do fármaco para o teste preliminar de metástase em pulmões.....	47
TABELA 2	Constituição dos grupos, modo de administração, protocolos e doses utilizadas do fármaco para ensaio de metástase em pulmões.....	48
TABELA 3	Áreas dos picos obtidas após análise das soluções de CPT padrão por CLAE.....	56
TABELA 4	Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração da CPT por CLAE.....	57
TABELA 5	Valores de eficiência de encapsulação e teor de fármaco nas microesferas de poli- ϵ -caprolactona.....	59
TABELA 6	Áreas dos espectros de fluorescência obtidas a partir da camptotecina após análise por Espectrofluorimetria.....	68
TABELA 7	Análise de dados regressão obtidos a partir da curva de calibração da camptotecina por espectrofluorimetria.....	69
TABELA 8	Dados de regressão obtidos após aplicação do modelo de Baker-Lonsdale.....	73
TABELA 9	Resultados obtidos na avaliação do tempo de duração do ensaio <i>in vivo</i> e do número de células B16-F10 a serem inoculadas.....	76
TABELA 10	Atividade antitumoral da CPT e MC30 em modelo de melanoma murino de alto poder metastático.....	81
TABELA 11	Valores de creatinina e ácido úrico obtidos após tratamento dos animais com CPT e MC30.....	84
TABELA 12	Resultados obtidos nos hemogramas após tratamento dos animais com CPT e MC30.....	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química da camptotecina.....	15
FIGURA 2	Ciclo catalítico da enzima topoisomerase I.....	17
FIGURA 3	Mecanismo de ação da camptotecina.....	19
FIGURA 4	Mecanismo de conversão da forma lactônica de CPT em carboxilada.....	20
FIGURA 5	Estruturas químicas dos derivados de camptotecina.....	23
FIGURA 6	Composição química da poli-ε-caprolactona.....	32
FIGURA 7	Esquema de preparação das microesferas.....	40
FIGURA 8	Micrografias obtidas por MEV a partir das partículas de PCL empregando-se como fase externa tampão fosfato pH 5,0 e tampão citrato pH 4,5 e solução aquosa de HPMC 0,25% e HPMC 0,5% (p/V).....	54
FIGURA 9	Curva de calibração de camptotecina por CLAE.....	57
FIGURA 10	Análise dos resíduos da curva de calibração da CPT obtida por CLAE.....	58
FIGURA 11	Micrografias obtidas por MEV das microesferas preparadas a partir de PCL contendo 15, 30 e 60 mg de CPT.....	61
FIGURA 12	Distribuição granulométrica das microesferas de PCL contendo CPT.....	63
FIGURA 13	Espectros de difração de Raios-X.....	64
FIGURA 14	Espectro de fluorescência obtido após análise de solução de camptotecina padrão e solução amostra de camptotecina.....	67
FIGURA 15	Curva de calibração de camptotecina obtida por Espectrofluorimetria.....	68
FIGURA 16	Análise dos resíduos da curva de calibração da CPT por espectrofluorimetria.....	69
FIGURA 17	Perfis de liberação da CPT a partir das microesferas de PCL em	

	tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% de Tween 80.....	70
FIGURA 18	Micrografias obtidas por MEV a partir das partículas de PCL após a realização dos ensaios de liberação <i>in vitro</i>	74
FIGURA 19	Resultados da avaliação do protocolo de administração e da dose de fármaco utilizados para o teste preliminar de metástase em pulmões.....	78
FIGURA 20	Fotografia dos pulmões de camundongos após o ensaio de metástase em pulmões.....	79
FIGURA 21	Avaliação da perda de peso dos camundongos tratados com o protocolo de administração a cada 3 dias durante o ensaio de metástase em pulmões.....	82
FIGURA 22	Avaliação da perda de peso dos camundongos tratados com o protocolo de administração a cada 5 dias durante o ensaio de metástase em pulmões.....	82

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem passado por um momento de mudanças no perfil de morbidade e mortalidade da população. A morbidade por doenças crônico-degenerativas passa a ter um peso cada vez maior. É a chamada polarização epidemiológica, que vem acontecendo devido ao envelhecimento progressivo da população e do advento de novas tecnologias de diagnóstico e de tratamento de saúde, contrastando com políticas de saúde públicas aquém da necessidade da população (SBOC, 2000). Entre as doenças crônico-degenerativas destaca-se o câncer, que compreende um grupo de patologias neoplásicas caracterizadas por uma proliferação celular anormal em algum local do organismo. Podem ser classificadas, segundo a sua capacidade de invadir e destruir os tecidos circundantes, em tumores benignos e tumores malignos (RUBIN e FARBER, 1994).

No Brasil, os dados de estimativas de mortalidade por neoplasias em homens e mulheres para o ano de 2003 totalizam aproximadamente 126960 óbitos (INCA, 2003), o que coloca o câncer no terceiro lugar das causas de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e para as causas externas. Entre os tipos de neoplasias que atingem a população destacam-se a neoplasia de traquéia, brônquios e pulmões, de estômago, de mama, de próstata, de cólon e reto (SBOC, 2000). Devemos ainda considerar a subnotificação nos óbitos por neoplasias, imputando um aumento considerável nos óbitos.

Entre os fármacos empregados para o tratamento do câncer encontram-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. Esta planta, empregada durante séculos pela medicina tradicional chinesa, foi redescoberta na década de cinqüenta, quando milhares de plantas foram estudadas em uma pesquisa que visava encontrar esteróides para a síntese da cortisona. Este fármaco demonstrou

atividade considerável no prolongamento da sobrevivência dos animais tratados com células leucêmicas L1210 ou P388, além de elevada atividade na inibição de tumores sólidos, incluindo o tumor de Walker WM.

Entretanto, a utilização da camptotecina na terapêutica foi limitada devido a sua escassa solubilidade aquosa em soluções apresentando baixos valores de pH, impossibilitando a sua utilização em perfusões intravenosas. Além disso, este fármaco é rapidamente inativado em pH fisiológico devido à abertura do grupamento α -hidroxi-lactona presente no anel pentacíclico da molécula, crucial para a atividade antitumoral. Estudos de estabilidade da camptotecina em tampão fosfato pH 7,4, indicaram que unicamente 13% do fármaco encontra-se na forma lactônica, apresentando um tempo de meio vida de apenas 10 minutos (EMERSON, 2000). Portanto, a inativação do fármaco ocorre rapidamente poucos minutos após a administração intravenosa. Adicionalmente, a inativação da camptotecina no plasma é favorecida pela ligação preferencial da forma carboxilada às proteínas plasmáticas deslocando assim o equilíbrio em direção à formação da forma carboxilada, menos ativa e mais tóxica.

A descoberta do seu mecanismo ação único, envolvendo a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores, trouxe um novo impulso às pesquisas científicas deste fármaco, incluindo a obtenção de derivados hidrossolúveis que permita a administração intravenosa na forma de soluções farmacêuticas (O'LEARY e MUGGIA, 1998). Por outro lado, estudos demonstraram que a utilização de protocolos de administração prolongada aumentava a eficácia terapêutica deste fármaco. Assim, a necessidade de exposição contínua e prolongada do tumor às camptotecinas, tornam estas moléculas perfeitamente adaptáveis para a utilização em estratégias terapêuticas que visam a liberação prolongada do fármaco.

Os sistemas de liberação prolongada oferecem inúmeras vantagens de emprego, quando comparados com as formas farmacêuticas convencionais, os

quais inclui, a melhoria da eficácia, redução da toxicidade e melhoria do conforto e da adesão do paciente ao tratamento. Entre as várias estratégias empregadas para prolongar a liberação de fármacos destaca-se a microencapsulação. Esta estratégia tem por objetivo encapsular sólidos ou líquidos dentro de matrizes ou sistemas vesiculares poliméricos (WATTS *et al.*, 1990). Sendo assim, fármacos que se mostravam limitados para a utilização terapêutica por apresentar características físico-químicas inadequadas à administração ou por serem facilmente degradados nos fluídos biológicos, como a camptotecina, são considerados fortes candidatos à microencapsulação. No que diz respeito à obtenção de micropartículas, polímeros biodegradáveis são claramente os materiais de escolha para administração de tais sistemas pela via parenteral. Os requisitos de segurança, biocompatibilidade e baixa toxicidade do polímero e de seus produtos de degradação devem ser considerados no desenvolvimento de formulações (WHATELEY, 1993). A poli- ϵ -caprolactona atende perfeitamente estes requisitos e foi empregada na obtenção das partículas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver sistemas de liberação de camptotecina que visam o prolongamento da liberação, a manutenção da integridade do fármaco, a redução dos efeitos colaterais e a melhoria da eficácia terapêutica. Para tal, a administração intraperitoneal de microesferas de liberação prolongada foi testada. A eficácia terapêutica destes sistemas foi avaliada em modelo de melanoma murino B16-F10 de alto poder metastático. Apesar do sucesso do prolongamento da liberação da camptotecina *in vitro* a partir de matrizes poliméricas biodegradáveis, bem como da manutenção da integridade da molécula durante as etapas de fabricação, armazenamento e administração das microesferas, estudos *in vivo* de atividade antitumoral que comprovem a melhoria da eficácia do tratamento após a administração de tais sistemas, jamais foram realizados.

1.2. OBJETIVO GERAL

- Desenvolver sistemas de liberação microparticulares da camptotecina, visando a manutenção da integridade da molécula frente à inativação pelo pH fisiológico, a melhoria da eficácia terapêutica e o prolongamento da liberação do fármaco.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar microesferas de camptotecina a partir da poli- ϵ -caprolactona;
- Avaliar a influência da quantidade inicial de fármaco sobre a eficiência de encapsulação e o teor de camptotecina nas microesferas;
- Avaliar os perfis de liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas em tampão fosfato pH 7,4;
- Avaliar a eficácia terapêutica das formulações em modelo de melanoma murino de alto poder metastático, através da determinação do número de metástases pulmonares formadas após administração intraperitoneal das microesferas em camundongos tratados com células B16-F10, comparando os resultados com aqueles obtidos após a administração da camptotecina não encapsulada;
- Comparar a eficácia terapêutica das formulações de microesferas e do fármaco não encapsulado quando administrados pela via intraperitoneal, utilizando diferentes protocolos de administração;

- Avaliar a toxicidade renal e hematológica da camptotecina administrada na forma de microesferas de liberação prolongada e de suspensões do fármaco não encapsulado.

2.1 CÂNCER

2.1.1 Aspectos Gerais

Câncer é a denominação genérica para as neoplasias malignas. Neoplasia, por sua vez, significa “crescimento novo” e define condições de proliferação celular anormal, encontrada nos tumores benignos e malignos. A terminologia “tumor” tem um sentido mais genérico, representando aumento regional de volume ou tumefação, podendo ser ou não de caráter neoplásico (NAKAGAWA e LOPES, 2000).

Atualmente o câncer, após as doenças cardiovasculares e as causas externas, é a terceira maior causa de morte no mundo, especialmente nos países desenvolvidos. Isto define a sua importância e o caracteriza como um problema de saúde pública. 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 (INCA, 2003).

As causas do câncer não estão claramente definidas, mas existem evidências de que as influências de fatores externos ambientais sejam as principais. Estas determinam direta ou indiretamente modificações centradas no material genético das células que resultam no câncer. Por exemplo, muitos cânceres de pulmão ocorrem devido a carcinogênese química, provocada pelo tabaco. Altas doses de radiação e benzeno são conhecidas por causar leucemia. Além disso, as alterações genéticas podem ser herdadas, como em algumas famílias de tumores hereditários, e transmitidas de uma geração para outra, aumentando muito as chances de câncer nos descendentes portadores deste defeito (ALBERTS, 1994; RUBIN e FARBER, 1994).

Dessa forma, pode-se dizer que todo câncer é originado por modificações genéticas, podendo ser herdadas ou adquiridas ao longo da vida em genes que

controlam o crescimento celular. Estes genes podem ser divididos em oncogenes, promotores de crescimento e genes supressores tumorais que produzem o efeito oposto, ou seja, inibem o crescimento celular (WOLF e RAMIREZ, 2001).

Existe ainda um terceiro grupo representado por genes responsáveis pelos reparos em erros de replicação. Entretanto, o conhecimento adquirido através do mapeamento das mutações genéticas ocorridas no desenvolvimento do câncer ainda encontra-se limitado (PARK *et al.*, 2000).

Portanto, é necessário o equilíbrio entre estes grupos de genes dentro de cada célula do organismo para que haja o controle de seu crescimento. Em alguns tecidos como nos epitélios existe uma alta taxa de proliferação, sem que, entretanto ocorra a manifestação de processos neoplásicos, visto que estes conjuntos de genes operam de modo integrado (ELLIS, *et al.*, 2000; ELLIS e CAPUCO, 2002).

2.1.2. Fisiopatologia do Câncer

O câncer é uma patologia que depende essencialmente da multiplicação celular, causando um crescimento desordenado que foge aos mecanismos de controle normal. No entanto, as células neoplásicas não proliferam, necessariamente, mais rápido que as normais. O crescimento tumoral depende de outros fatores, como o balanço entre taxa de crescimento (proporcional aos ciclos celulares) e a morte celular. Nos tecidos normais, esse balanço ocorre, enquanto nos tecidos tumorais o fator determinante para o crescimento é o fato de que há mais produção do que eliminação de células. Observa-se geralmente que os genes supressores são inativados, gerando o descontrole no crescimento celular (MC CORMICK *et al.*, 1999).

A semelhança estrutural das células do câncer com suas células de origem permitem diagnósticos específicos sobre a potencial origem e comportamento do tumor. Além disso, os tumores são classificados de acordo com o tecido ou tipo de

célula do qual se originam. Assim, cânceres provenientes de células epiteliais são chamados de carcinomas, de células musculares, sarcomas e de células hematopoiéticas, leucemias (INCA, 2003).

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

Algumas características histológicas que caracterizam tumores malignos incluem (i) anaplasia, que significa falta de diferenciação celular; (ii) atividade mitótica abundante, (iii) invasão, particularmente em vasos sanguíneos e linfáticos e (iv) metástases (PATHAK *et al.*, 2002).

Em geral, o crescimento tumoral é, na maioria das vezes, autônomo e persiste após a retirada do estímulo que o produziu. Além disso, os tumores são originados a partir de células que normalmente possuem capacidade de proliferação. Desta maneira, células terminalmente diferenciadas, tais como, neurônios maduros e miócitos cardíacos não são precursores comuns de câncer, havendo uma incidência clínica muito baixa (PATHAK, 2002).

A evolução da neoplasia pode ser relacionada à biologia tumoral que determina a velocidade de crescimento, agressividade, tendência à invasão local e a metástase. Além disso, o crescimento do câncer acarreta em um consumo do

organismo, pela competição por nutrientes e energia, resultando em estados de caquexia em fases mais avançadas. Este processo pode culminar em morte, quando não for interrompido por um tratamento eficaz e existir o comprometimento de órgãos vitais (PATHAK *et al.*, 2002; NAKAGAWA e LOPES, 2000).

Os sintomas do câncer são, na maior parte das vezes, referentes aos efeitos locais ocasionados pelo tumor primário ou metástases, mas podem ocorrer sintomas não atribuídos a invasão tumoral ou aos focos metastáticos, que são chamados de síndromes paraneoplásicas. O reconhecimento desses sintomas pode ser de grande importância, pois eles podem estar relacionados à primeira manifestação clínica do tumor maligno e neste caso, o câncer pode ser detectado cedo o bastante para permitir a cura. Entre os sintomas da síndrome paraneoplásica estão a febre de origem desconhecida, anorexia, perda de peso e caquexia, síndromes de origem endócrina, tais como antidiurese inapropriada, hiper ou hipocalcemia e hipoglicemia, síndromes neurológicas, síndromes hematológicas, como anemia e eritrocitose, além de síndromes gastrointestinais, renais e cutâneas (SOLIMANDO *et al.*, 2000).

2.1.3 Metástase

A formação de metástases é uma das principais características do câncer e pode ser definida como a capacidade que as células neoplásicas possuem de se soltarem do tumor primário e alcançarem a circulação sanguínea, linfática ou superfícies cavitárias, determinando a formação de um novo foco tumoral independente, à distância. É um indicativo de doença avançada e marca uma neoplasia maligna, sendo uma das principais causas de morte no paciente oncológico (FIDLER, 1989).

Com poucas exceções, todos os tumores malignos possuem capacidade de emitir metástases. Os tipos de disseminação podem ser divididos em hematogênica, linfática e implante em cavidades e superfícies do corpo. Os locais preferenciais de

metástase dependem do tipo de tumor e de sua localização anatômica (KAUFFMAN *et al.*, 2003).

Os dois sítios mais comuns de comprometimento por metástases hematogênicas são o fígado e o pulmão, pois praticamente todo o fluxo de sangue da veia porta é drenado para o fígado e da veia cava para os pulmões (BERMAN *et al.*, 2001). O implante por esfoliação de células tumorais em superfícies cavitárias também é freqüente em alguns tipos de tumores como, por exemplo, implantado de tumores de ovário na cavidade peritoneal e de tumores de pulmão na cavidade pleural (RUDDON, 1995).

As células neoplásicas originadas nos tumores invadem e ganham a circulação venosa sob a forma de células isoladas ou em grumos. Para a formação das metástases é necessário que as células sobrevivam dentro da circulação sanguínea ou linfática, onde são mais susceptíveis às defesas imunológicas do hospedeiro, tais como turbulência sanguínea, linfócitos e monócitos. Após, estas células devem se aderir nos capilares que irrigam tecidos distantes, invadir o novo sítio e iniciar um crescimento local. No entanto, um novo suplemento vascular é necessário e por esta razão muitos tumores secretam fatores de crescimento que estimulam o desenvolvimento de novas veias, tais como os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF), processo este conhecido como angiogênese (RUDDON, 1995).

No entanto, a invasão de células tumorais em outros tecidos não é tão simples, pois depende de fatores de defesa do organismo, que dificultam a instalação das mesmas e de fatores que favoreçam a sobrevivência na circulação e a instalação no novo sítio. Menos de 0,1% das células que caem na circulação sobrevivem por mais de 24 horas e podem originar um novo foco tumoral. Sendo assim, o aparecimento de células malignas no sangue não pode ser considerado sinônimo de metástase. Em linhas gerais, quanto mais agressivo e mais extenso o tumor primário, maior é a probabilidade de desenvolvimento de metástases. Assim,

quanto maior a expressão locorregional do tumor, maior é a chance de disseminação (KAUFFMAN *et al.*, 2003).

2.1.4 Quimioterapia

Historicamente, o conceito de quimioterapia das neoplasias tem suas origens há pelo menos 1500 anos. No entanto, foi a partir da segunda metade deste século que houve um grande desenvolvimento da mesma. O isolamento e desenvolvimento de agentes quimioterápicos efetivos associados ao sucesso da quimioterapia combinada foram fundamentais para que a oncologia clínica pudesse tornar as neoplasias malignas potencialmente curáveis.

Existem basicamente três modalidades de tratamento quimioterápico: (i) neoadjuvante, (ii) adjuvante e (iii) terapêutica (ANELLI e ANELLI, 2000; SOLIMANDO *et al.*, 2000).

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. Adicionalmente, o paciente pode estar mais apto a suportar a quimiotoxicidade, além de que os depósitos de doença microscópica metastática são menores e menos quimioresistente quando a doença é recentemente diagnosticada.

A quimioterapia adjuvante para o tratamento sistêmico da neoplasia é realizada após o tumor primário ter sido controlado por cirurgia ou radioterapia. Trata-se a neoplasia partindo-se do princípio de que não existe mais doença clinicamente avaliável.

A quimioterapia terapêutica é aquela que se destina a ser a principal arma do tratamento, principalmente quando a cirurgia e a radioterapia não são as melhores escolhas terapêuticas.

2.2. CAMPTOTECINA

2.2.1 Aspectos Gerais

A camptotecina (CPT) é o alcalóide protótipo extraído da casca, frutos e folhas da *Camptotheca acuminata*, uma árvore nativa da China que se desenvolve em regiões relativamente quentes do sudoeste deste país. Esta planta, empregada durante séculos pela medicina tradicional chinesa, foi redescoberta na década de cinquenta, quando milhares de plantas foram estudadas em uma pesquisa que visava encontrar esteróides para a síntese da cortisona (WALL e WANI, 1996; O'LEARY e MUGGIA, 1998).

Estruturalmente, as camptotecinas são caracterizadas por apresentar um anel pentacíclico, altamente insaturado, apresentando uma porção α -hidroxi-lactona (Figura 1). Este composto apresenta elevado ponto de fusão (264-267°C) e possui massa molar de 348,11, correspondente a fórmula $C_{20}H_{16}N_2O_4$. É opticamente ativo ($[\alpha] + 31,3^\circ C$) e produz uma intensa fluorescência azul sob luz ultravioleta (UV). Além disso, produz reações qualitativas negativas nos testes de identificação de fenóis e indóis, bem como nos testes de Dragendorff e Mayer (WALL e WANI, 1996; HATEFI e AMSDEN, 2002).

Este fármaco não reage com bicarbonato ou carbonato, mas pode ser quantitativamente convertido de maneira reversível ao sal sódico hidrossolúvel com hidróxido de sódio à temperatura ambiente. No entanto, o sal sódico é rapidamente relactonizado sob acidificação. O composto original, entretanto, é altamente insolúvel em água e em solventes orgânicos, com exceção do dimetilsulfóxido, mas solúvel em uma grande quantidade de óleos (WALL e WANI, 1996).

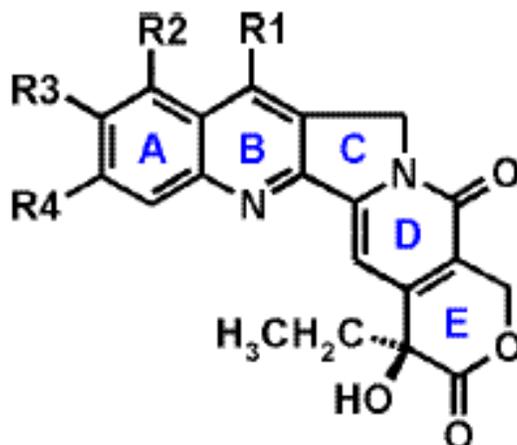


FIGURA 1. Estrutura química da camptotecina.

2.2.2 Atividade biológica e mecanismo de ação

Após o isolamento e a elucidação da estrutura da camptotecina e de seus análogos, 10-hidroxi- e 10-metoxi-camptotecina, foi demonstrado que estes fármacos inibiam a síntese de ADN e ARN. Em ensaios em camundongos, a camptotecina demonstrou uma considerável atividade no prolongamento da sobrevivência dos animais tratados com células leucêmicas L1210 ou células leucêmicas P388, quando doses entre 0,5 e 4,0 mg/kg foram administradas, bem como, na inibição de tumores sólidos, incluindo o tumor de Walker WM. O análogo 10-metoxi-camptotecina mostrou-se menos ativo, enquanto que o 10-hidroxicamptotecina foi o mais ativo dos três compostos desta série. Entretanto, este último é encontrado na natureza em quantidades muito pequenas (WALL e WANI, 1996).

Estudos clínicos foram realizados com sal sódico hidrossolúvel, uma vez que a baixa solubilidade aquosa da camptotecina limitava a utilização do fármaco pela via intravenosa. Estes estudos revelaram uma resposta anti-tumoral inferior à esperada além da presença de efeitos colaterais graves, incluindo neutropenia, trombocitopenia, cistite hemorrágica, mielotoxicidade e sintomas gastro-intestinais.

Estes resultados levaram a interrupção dos estudos clínicos com a camptotecina (MOERTEL *et al.*, 1972; MUGGIA *et al.*, 1972; O'LEARY e MUGGIA, 1998).

Estudos farmacocinéticos de CPT foram realizados em diversos ensaios pré-clínicos e clínicos de Fase I, sendo que métodos com detecção fluorimétrica foram utilizados para determinar a concentração sanguínea do fármaco.

Nestes estudos foi demonstrado que a camptotecina é amplamente distribuída no organismo, incluindo o sistema nervoso central, pulmões, fígado e intestinos. Apresenta volume de distribuição de 7 L/m², sendo que 98% do fármaco se liga às proteínas plasmáticas (POTMESIL, 1994; GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002). A taxa de recuperação renal de CPT foi de 23% em pacientes com função renal normal ocorrendo nas primeiras 12 horas. Embora a CPT tenha sido detectada na urina 12 dias após o tratamento em pacientes apresentando disfunção renal, o fármaco não foi identificado após 6 dias do término do tratamento nos pacientes com função renal normal. Apesar de que a camptotecina também tenha sido detectada no fluido ascítico 12 dias após o tratamento, este fármaco não foi identificado na bile, fluído cérebro-espinhal ou em amostras tumorais obtidas de 2 a 31 dias após o término da administração do medicamento (SLICHENMYER *et al.*, 1993; HSIANG *et al.*, 1985).

Simultaneamente, WALL e WANI (1996) evidenciaram que a camptotecina possui um anel pentacíclico altamente conjugado, apresentando uma porção α -hidroxi-lactona e que a manutenção do anel lactônico era crucial para sua atividade antitumoral, explicando, portanto, os resultados obtidos nos ensaios clínicos anteriores. Como a CPT foi administrada na forma de sal sódico, os pacientes foram expostos a altas concentrações da espécie carboxilada inativa, sendo grandes quantidades do fármaco excretadas na urina, onde o baixo pH favoreceu o fechamento do anel de lactona, ocasionando conseqüentemente cistite hemorrágica.

O interesse sobre o fármaco camptotecina só foi retomado na década de 80, após a descoberta de que o seu sítio de ação era a enzima topoisomerase I, altamente ativa em estágios avançados de câncer, mas não em tecidos normais (IYER e RATAIN, 1998).

A enzima topoisomerase I (Topo I) é um polipeptídeo monomérico presente em todas células somáticas que possui atividade na fase S do ciclo celular. Este último é tradicionalmente dividido em várias fases distintas, dentre as quais a mitose é uma das mais importantes por ser o processo de divisão celular propriamente dito. Esta fase pode ser chamada também de fase M e o período entre uma mitose e outra é conhecido como interfase. A fase S corresponde àquela onde ocorre a replicação do ADN nuclear e compreende apenas uma parte da interfase. Assim, a Topo I possui a atividade de produzir o relaxamento do ADN superespiralado durante os processos de replicação, recombinação e transcrição (Figura 2). O intervalo entre o fim da fase M ou mitose e o início da síntese de ADN ou fase S é chamado de fase G1 e o período entre o final da síntese e o começo da mitose é chamado de fase G2 (ALBERTS *et al.*, 1994; HSING, *et al.*, 1985).



FIGURA 2. Ciclo catalítico da enzima topoisomerase I.

Estudos evidenciaram que os níveis de Topo I em amostras tumorais diferem substancialmente dos níveis encontrados nos tecidos normais correspondentes. Em especial, as células encontradas nos cânceres de cólon contêm níveis de Topo I cinco vezes maiores que as células normais. Além disso, valores similares foram encontrados em tumores de esôfago e ovário (SLICHENMYER *et al.*, 1993).

A camptotecina estabiliza o complexo formado entre o ADN e a topoisomerase I, fazendo com que ocorra o rompimento da dupla fita do ADN e, conseqüentemente, a morte celular (Figura 3). No entanto, a atividade de CPT é muito específica, pois ela e seus análogos somente se ligam ao complexo formado pela ligação Topo I-ADN, e para isso é necessário que esteja acontecendo à síntese de ADN. Esta é uma implicação importante para o uso clínico desses agentes, porque para uma melhor eficácia terapêutica necessita-se uma exposição prolongada do tumor a concentrações mínimas de fármaco (GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002).

Adicionalmente, a atividade antiviral dos inibidores de topoisomerase I também tem sido avaliada. Uma vez que o mecanismo de ação desta enzima está envolvido na função da enzima transcriptase reversa do HIV, a inibição da Topo I pela CPT pode bloquear o crescimento de tumores comumente desenvolvidos em pacientes portadores de HIV, tais como o sarcoma de Kaposi e linfomas. Estudos demonstraram que a CPT pode inibir não somente o crescimento celular endotelial, mas igualmente a angiogênese. Esta atividade anti-angiogênica pode ter relevância clínica para o tratamento de outras patologias, tais como restenose e psoríase. Outra aplicação da camptotecina que tem sido explorada consiste na administração lipossomal deste fármaco para o tratamento da Leishmaniose. Após a administração os lipossomas seriam reconhecidos e capturados pelas células do sistema retículo endotelial, predominantemente pelos macrófagos do fígado e do baço, os quais servem de reservatório para os parasitas. Assim, o fármaco se acumularia no interior destas células melhorando a eficácia terapêutica do tratamento (PANTAZIS, 1996; HATEFI e AMSDEN, 2002).

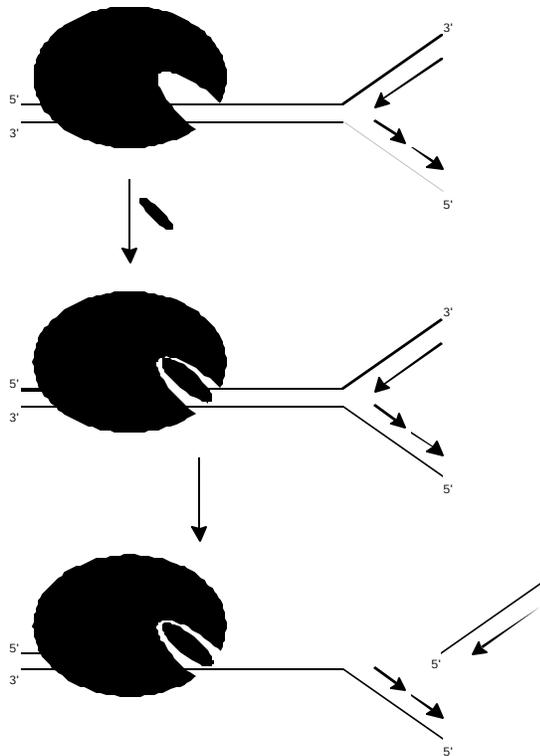


FIGURA 3. Representação esquemática do mecanismo de ação da camptotecina.

2.2.3 Estabilidade

Como foi visto anteriormente, a lactona localizada no anel E da camptotecina é essencial para interação com o complexo enzimático Topo I - ADN. Este anel lactônico é quimicamente instável e pode ser convertido por meio de uma reação de hidrólise reversível (Figura 4) na forma carboxilada (mais solúvel), a qual é desprovida de atividade inibitória sobre a enzima topoisomerase I, pois somente a forma lactona é capaz de difundir através das membranas celulares e exercer a atividade antitumoral (CORTESE e NASTRUZZI, 1999).

O equilíbrio entre as duas formas é dependente de vários fatores incluindo pH, concentração protéica e força iônica. Em condições ácidas (pH < 5), a estrutura lactônica é predominante e, em valores de pH maiores que 10, a molécula encontra-se na forma carboxilada. Adicionalmente, foi relatado que o aumento de temperatura também pode acelerar a taxa de interconversão (ZUFIA *et al.*, 2001).

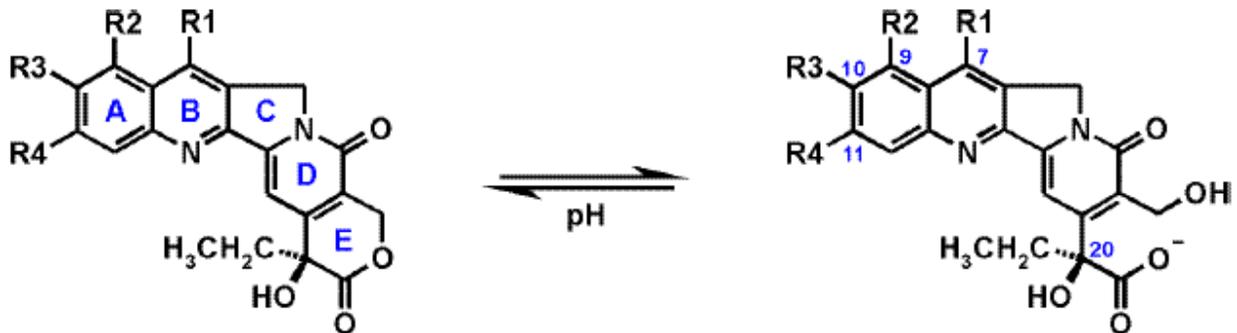


FIGURA 4. Mecanismo de conversão da forma lactônica de CPT em carboxilada.

Assim, em pH fisiológico, a maior parte do fármaco encontra-se na sua forma carboxilada enquanto valores de pH menores ou igual a 5,0 são essenciais para a manutenção da forma lactônica (SHENDEROVA, *et al.*, 1997; CORTESI e NASTRUZZI, 1999).

Mi (1995), relatou que a CPT na forma carboxilada apresenta afinidade de cerca de 200 vezes maior à albumina do que a molécula na forma lactônica, conduzindo assim o deslocamento do equilíbrio em favor da abertura do anel na presença desta proteína. Além disso, este equilíbrio pode ser afetado pela presença de substituintes na molécula. A substituição química nos anéis A e B pode modular substancialmente a afinidade de ligação às proteínas plasmáticas, resultando em um marcado efeito sobre as concentrações relativas das formas lactona e carboxilada no plasma, em equilíbrio. Por exemplo, a forma lactônica do metabólito do irinotecano (SN-38) (Figura 5) liga-se preferencialmente à albumina, deslocando assim o equilíbrio em favor da forma ativa deste composto (BURKE *et al.*, 1995).

A ligação preferencial da forma carboxilada na albumina é reduzida pela presença de outras proteínas sanguíneas como γ -globulina, fibrinogênio e hemoglobina. Em adição, a camptotecina demonstra maior estabilidade no sangue do que no plasma, devido à ligação deste composto às bicamadas lipídicas dos eritrócitos, localizando o anel lactônico em um ambiente hidrofóbico, protegido da hidrólise (ZUFIA *et al.*, 2001; GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002). Entretanto, como resultado final tem-se que na presença de níveis fisiológicos de albumina humana, a forma ativa da camptotecina apresenta um tempo de meia-vida muito curto, de aproximadamente 10 minutos. Nas duas horas seguintes à administração, praticamente todo o fármaco é convertido na sua forma carboxilada, caracterizada por ser biologicamente inativa e potencialmente tóxica (BURKE e MI, 1994). Conseqüentemente, a inativação do fármaco ocorre rapidamente poucos minutos após a administração intravenosa.

2.2.4 Derivados da Camptotecina

As camptotecinas são uma classe de agentes antitumorais que tem demonstrado significativa atividade clínica contra uma ampla faixa de doenças malignas. O entendimento de seus alvos moleculares e do seu mecanismo de ação tem levado ao desenvolvimento de análogos com propriedades físico-químicas e farmacológicas melhoradas.

A descoberta do mecanismo de ação exclusivo da camptotecina, envolvendo a inibição da Topo I, trouxe uma nova perspectiva quanto à utilização desta substância ativa na terapêutica.

Derivados hidrossolúveis da camptotecina têm sido obtidos por meio da modificação estrutural da molécula, visando contornar dificuldades em administrar este fármaco pela via intravenosa. Dois derivados foram aprovados para o uso em tumores sólidos: o topotecano e o irinotecano (CPT-11). Estes dois fármacos têm sido empregados em terapêutica isoladamente ou em associação com outros

quimioterápicos. Quatro outros análogos da camptotecina estão em desenvolvimento clínico: 9-amino-camptotecina (9-AC), 9-nitro-camptotecina (9-NC) e dois outros compostos denominados lurtotecan e DX-8951f (IYER e RATAIN, 1998).

Todas as camptotecinas apresentam uma estrutura pentacíclica, constituída por um anel de quinolona (anéis A e B), um anel piridona (anel D) e um anel terminal α -hidroxi- δ -lactona (anel E), que por sua vez, possui um centro quiral no carbono C20 (Figura 5). Esta estrutura de cinco anéis é essencial para sua atividade, uma vez que um análogo tetracíclico da camptotecina foi testado e considerado inativo (SLICHENMYER *et al.*, 1993; GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002).

Estudos de relação estrutura atividade demonstraram que o grupamento alfa-hidroxilactônico localizado no anel E, bem como a estereoquímica S no carbono 20, são essenciais para a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* das camptotecinas. O isômero R demonstrou ser inativo e a mistura racêmica apresentou apenas 50% da atividade demonstrada pelo isômero S (SLICHENMYER *et al.*, 1993; IYER e RATAIN, 1998; O'LEARY e MUGGIA, 1998).

Substituições nos carbonos C9 e C10 por grupos amino geraram compostos com elevada atividade *in vivo*. Os compostos 9-amino-20(S)-CPT, 10-amino-20(S)-CPT, 9-nitro-20(S)-CPT e 10-nitro-20(S)-CPT mostraram um aumento na atividade sobre a enzima topoisomerase I. Por outro lado, monosubstituições nos carbonos C11 e C12 levaram à diminuição da atividade e da potência dos derivados da camptotecina e substituições nos carbonos C10 e C11 por grupamentos metoxi resultaram na inativação do análogo. Entretanto, substituições nos carbonos C10 e C11 por dioxi-metileno no anel A da camptotecina levaram a uma notável melhora na atividade tanto *in vitro* como *in vivo*, porém o composto resultante é relativamente insolúvel (SLICHENMYER *et al.*, 1993; O'LEARY e MUGGIA, 1998; ZUFIA *et al.*, 2001).

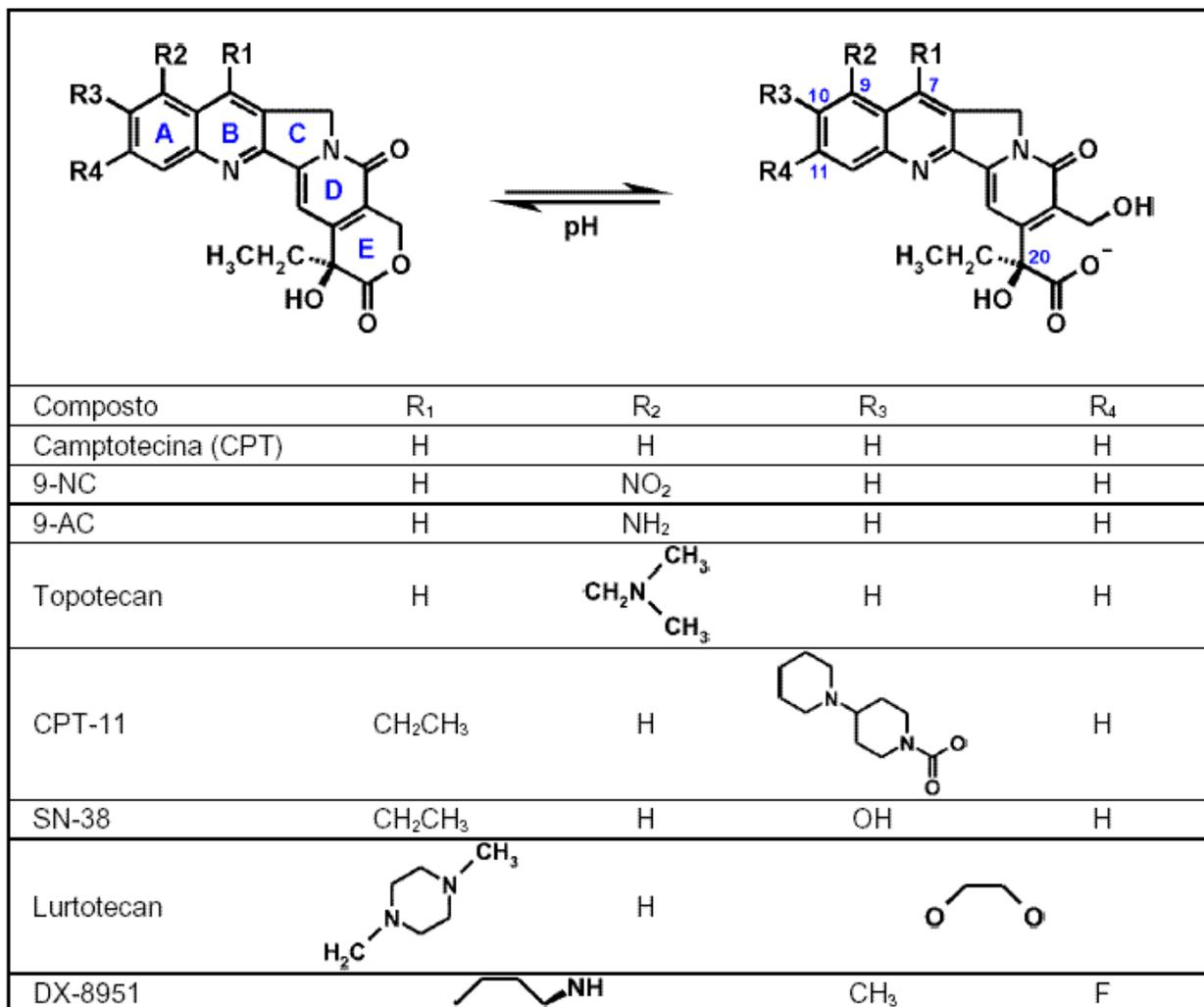


FIGURA 5. Estruturas químicas dos derivados de camptotecina (Adaptado de Kehrer *et al.*, 2001).

A introdução de um grupamento básico dimetilamina no carbono C9 (topotecano) e um grupamento carboniloxi biperidina na posição C10, para o irinotecano, conduzem à formação de derivados de maior solubilidade aquosa, o que permite a formulação desses compostos como sais hidroclicóricos; no entanto, a susceptibilidade frente à abertura do anel lactônico é mantida (ZUFIA *et al.*, 2001).

Com base nestes dados foi observado que, provavelmente, a camptotecina se liga ao complexo Topo I-ADN pela face mais próxima aos carbonos C11 e C12.

Assim, a introdução de grupamentos nessas posições pode causar interações estéricas ou eletro-estéricas desfavoráveis (O'LEARY e MUGGIA, 1998).

Por outro lado, substituições nos carbonos C9 e C10 são mais distantes desta região causando menor obstáculo estérico, desde que não sejam introduzidos grupamentos volumosos, pois estes podem interferir com o sítio ativo nos carbonos C11 e C12, resultando em diminuição da ligação do fármaco com o complexo Topo I-ADN.

Repulsões estéricas entre os dois grupamentos metoxi nas posições C10 e C11 conduzem à invasão do último na posição vizinha (C12), crítica para a atividade, levando à formação de um composto inativo. No composto 10,11-metilenodioxycamptotecina, os átomos substituídos nestas posições estão contidos em uma forma de anel coplanar que previne a sua invasão na região crítica do carbono C12 (O'LEARY e MUGGIA, 1998).

As duas formas farmacêuticas existentes no mercado são o topotecano e o irinotecano. Como a forma lactônica encontra-se predominantemente em meio ácido, estes dois compostos são comercializados em meio tamponado (EMERSON, 2000; MURAS e SANTOS, 2000).

O Topotecano [Cloridrato de (S)-9-dimetil-aminometil-10-hidroxi-camptotecina] é um derivado solúvel da camptotecina contendo uma cadeia lateral básica (dimetil-aminometil) ligada à posição nove do anel A da CPT (Figura 5) e está disponível comercialmente com o nome de Hycantim®. Este fármaco é comercializado na forma de pó, como cloridrato de topotecano e ácido tartárico, produzindo uma solução aquosa com pH de 2,5-3,5 quando ressuspensão, para infusão intravenosa. Tal solução é estável por 12 horas em temperatura ambiente, enquanto que o pó apresenta validade de dois anos (TAKIMOTO *et al.*, 1998).

Este fármaco tem sido empregado, principalmente, para o tratamento de carcinoma de ovário, mas igualmente apresenta atividade em câncer de pulmão de pequenas e de não pequenas células, tumores sólidos pediátricos, câncer de mama e de bexiga (IYER e RATAIN, 1998; SOLIMANDO *et al.*, 2000).

O nome comercial do irinotecano (CPT-11) é Camptosar®, sendo apresentado igualmente na forma de um pó do sal hidrolórico e tampão ácido láctico hidróxido de sódio, que após reconstituição produz uma solução com pH de 3,5-4,5. Esta solução é estável por 3 horas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz (TAKIMOTO *et al.*, 1998).

O irinotecano é um pró-fármaco solúvel que requer a clivagem da ligação éster em C10 por esterases para liberação do composto ativo SN-38, o qual possui atividade inibitória sobre a enzima Topo I cerca de mil vezes maior do que o composto de origem. A maior indicação terapêutica deste fármaco é para o tratamento de câncer coloretal, mas ele tem sido testado também contra câncer de pulmão de pequenas e não pequenas células, câncer de ovário e câncer cervical (GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002).

2.2.5 Toxicidade e protocolos de administração das camptotecinas

A toxicidade da camptotecina é dependente do protocolo e da via de administração utilizada. A mielossupressão foi o efeito tóxico dose limitante para a maioria dos protocolos administrados pela via intravenosa, mas muitos outros distúrbios, tais como cistite hemorrágica, toxicidade gastro-intestinal, alopecia, náuseas, vômitos e diarreia foram também observados. Após a administração oral, a toxicidade dose limitante foi à diarreia, observada em aproximadamente 60% dos pacientes (SLICHENMEYER e VON HOFF, 1990; POTMESIL, 1994; DEY e WARNER, 1997).

A importância dos protocolos de administração para as CPTs foi primeiramente avaliada por KAWATO e colaboradores (1991). Muitos protocolos têm sido testados com intuito de otimizar a dose e o intervalo de administração destes fármacos.

A atividade antitumoral dependente do protocolo de administração foi demonstrada num estudo no qual a 9-amino-camptotecina (9-AC) foi administrada em camundongos tratados com células HC1 de adenocarcinoma de cólon. Neste estudo, três grupos de camundongos foram utilizados, sendo que o primeiro grupo foi designado como grupo controle, o segundo recebeu o fármaco na dose diária de 1,5mg/Kg durante cinco dias, por três ciclos, repetidos a cada 21 dias e o terceiro recebeu a dose diária de 0,75mg/Kg durante 5 dias em duas semanas consecutivas por três ciclos, repetidos a cada 21 dias. A dose total de 9-AC administrada nos dois grupos foi 22,5 mg/Kg e os resultados mostraram que o protocolo de administração por 10 dias foi significativamente mais efetivo que aquele de cinco dias utilizando a mesma dose (THOMPSON *et al.*, 1998).

Num estudo com camundongos utilizando células L1210 e L5178Y, foi demonstrado o aumento da sobrevivência de animais quando a CPT foi administrada em protocolos intermitentes (dia 1,5 e 9), quando comparado com outros protocolos testados. Em adição, a incidência de toxicidade aumentou quando o fármaco foi administrado em uma dose diária (SLICHENMYER *et al.*, 1993 ; THOMPSON *et al.*, 1998).

A inibição do crescimento e a regressão do tumor foram observadas quando a dose diária de 4mg/Kg de CPT, 9-AC e 9-NC foi administrada semanalmente, durante duas semanas pela via intramuscular em camundongos tratados com células de melanoma BRO (PANTAZIS *et al.*, 1992). Este resultado foi igualmente observado quando o CPT-11 foi administrado na dose de 15 a 59 mg/Kg por quatro dias durante

três semanas por via intraperitoneal em camundongos tratados com células de neuroblastoma TNB9 (KOMURO *et al.*, 1994¹).

A exposição mínima diária também foi altamente efetiva ocasionando a completa regressão dos tumores, quando o topotecano foi administrado pela via intravenosa em camundongos inoculados com células de neuroblastoma na dose de 0,36-2 mg/Kg por cinco dias durante duas semanas consecutivas, por 3 ciclos (ZAMBONI *et al.*, 1998²).

HOUGHTON e colaboradores (1995)³ avaliaram a eficácia terapêutica do CPT-11 após a inoculação de células VRC5 em camundongos. A administração deste fármaco foi realizada em diferentes protocolos, onde grupos de animais receberam doses diárias de (a) 40mg/Kg durante 5 dias em duas semanas consecutivas, (b) 10mg/Kg durante 5 dias em duas semanas consecutivas, (c) 10mg/Kg durante 5 dias em duas semanas consecutivas e em três ciclos repetidos a cada 21 dias (dose total=300mg/Kg) e (d) 5mg/Kg durante 5 dias em duas semanas consecutivas em três ciclos, repetidos a cada 21 dias. Os autores observaram que, neste tipo de tumor de cólon, o aumento da dose diária não resulta na melhoria da atividade antitumoral. Em contraste, quando o protocolo utilizando ciclos repetidos de 5 mg/Kg por 8 semanas (dose total=150mg/Kg) foi empregado, os autores verificaram um aumento significativo da atividade antitumoral.

Os resultados acima apresentados têm demonstrado que a administração de camptotecinas em protocolos prolongados é mais efetiva contra o tumor, do que os correspondentes tratamentos com doses mais altas e de curta duração. Esta atividade antitumoral dependente do protocolo de administração pode ser explicada

¹ KOMURO, H. *et al.* Effects of CPT-11 (a unique DNA topoisomerase I inhibitor) on a highly malignant xeno-transplanted neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.*, v.23, p.487-492, 1994 *apud* THOMPSON, J., STEWART, C., HOUGHTON, P. Animal models for studying the action of topoisomerase I targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1400, p.301-319, 1998.

² ZAMBONI, W. *et al.* The relationship between topotecan systemic exposure and tumor response in human neuroblastoma xenografts. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.90, p. 505-511, 1998 *apud* THOMPSON, J., STEWART, C., HOUGHTON, P. Animal models for studying the action of topoisomerase I targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1400, p.301-319, 1998.

³ HOUGHTON, P. *et al.* Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan e irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, v. 36, p.393-403, 1995 *apud* THOMPSON, J., STEWART, C., HOUGHTON, P. Animal models for studying the action of topoisomerase I targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1400, p.301-319, 1998.

pelo fato de que as camptotecinas atuam especificamente na Fase S do ciclo celular. Assim, uma vez alcançado o nível de citotoxicidade necessário para atividade inibitória do fármaco sobre a enzima Topo-I, o parâmetro que determina a resposta antitumoral é o tempo de exposição e não o aumento da dose. Conseqüentemente, um protocolo de administração prolongada desse agente ciclo celular específico pode aumentar a atividade antitumoral. Além disso, também foi observado que os efeitos tóxicos das CPTs variam de acordo com o protocolo de administração (THOMPSON *et al.*, 1998).

2.3 MICROENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS

2.3.1 Definições e Interesses da Microencapsulação

A microencapsulação de fármacos implica na utilização de diversas técnicas e procedimentos que visam encapsular sólidos ou líquidos dentro de matrizes ou sistemas vesiculares poliméricos. Este princípio tem sido usado em uma série de aplicações farmacêuticas, tais como na melhoria da estabilidade de fármacos, na obtenção de sistemas de liberação controlada, diminuindo efeitos colaterais de medicamentos ou ainda na vetorização de substâncias ativas em sítios específicos de ação (WATTS *et al.*, 1990).

As micropartículas são partículas sólidas de natureza polimérica com diâmetros na faixa de um a algumas centenas de micrômetros, na qual o princípio ativo se encontra dissolvido ou disperso, podendo ser classificadas segundo a sua estrutura em microesferas e microcápsulas. São denominadas microesferas as partículas compactas constituídas por uma rede polimérica na qual a substância ativa encontra-se distribuída no seu estado sólido ou molecular, e microcápsulas, as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o fármaco, recoberto por uma camada de polímero de espessura variável (BATYCKY *et al.*, 1997; LINHARD, 1988).

Entre as técnicas de microencapsulação de fármacos, a emulsificação/evaporação do solvente tem sido freqüentemente empregada face à simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção das partículas e às possibilidades de modulação das características físicas e físico-químicas das mesmas, por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação. Esta técnica consiste em dispersar uma solução do polímero em um solvente volátil contendo o fármaco, previamente dissolvido ou suspenso, em uma segunda solução de um solvente não volátil contendo um estabilizante, no qual o primeiro é imiscível. Nesta técnica, o solvente da fase interna é removido segundo um processo que ocorre em duas etapas: (i) difusão do solvente para a fase dispersante e (ii) evaporação do mesmo a partir da fase externa na interface ar-líquido. Com a eliminação do solvente, as microesferas são formadas e, após, as partículas são recuperadas por centrifugação ou filtração, lavadas para a remoção completa do estabilizante e do fármaco não encapsulado, e secas em estufa sob pressão reduzida ou liofilizadas (WATTS *et al.*, 1990; BENOIT *et al.*, 1996).

Uma variação da técnica de emulsão-evaporação tem sido proposta com intuito de proporcionar uma eliminação mais rápida do solvente da fase dispersa da emulsão. Isto pode ser conseguido por meio do uso de grandes quantidades de fase dispersante em relação à fase dispersa ou pelo emprego de co-solventes que tenham elevada afinidade pela fase externa. O co-solvente pode atuar tanto como um agente extrator, por aumentar a solubilidade do solvente volátil na fase externa, como se difundir rapidamente para a mesma quando adicionado à fase interna da emulsão (SPROCKEL e PRAPAITRAKUL, 1990; BENOIT *et al.*, 1996).

A estrutura final e a composição das micropartículas são resultantes de uma complexa contribuição das características do polímero, fármaco e solventes da fase interna e da fase externa da emulsão. Tendo fármaco e o polímero sido selecionados, a escolha dos solventes torna-se um passo crucial para o processo de microencapsulação. Alguns critérios devem ser observados para a escolha do solvente da fase interna: (i) capacidade para dissolver o polímero e de preferência o

fármaco, (ii) imiscibilidade com o solvente da fase externa, (iii) baixo ponto de fusão e (iv) toxicidade. Por outro lado, o solvente da fase externa não deve dissolver o fármaco e o polímero e deve permitir a fácil recuperação e lavagem das partículas (WATTS *et al.*, 1990). Além disso, para a técnica de emulsão-extração do solvente é necessária a adição de um co-solvente miscível com ambas fases interna e externa. (BENOIT *et al.*, 1996). O diâmetro médio final das partículas obtidas por essa técnica depende da velocidade de agitação, do tipo de equipamento utilizado e da concentração de polímero na fase interna da emulsão (WATTS *et al.*, 1990). Em geral, a técnica de emulsificação/extração do solvente permite a obtenção de partículas de tamanho reduzido (KUMAR, 2000).

Geralmente o solvente da fase externa é aquoso, pois é econômico e resulta na formação de micropartículas bem individualizadas. O polímero é dissolvido em um solvente orgânico imiscível com a água, como diclorometano ou clorofórmio, sendo o método preferido para encapsulação de fármacos hidrofóbicos.

2.3.2 Poli- ϵ -Caprolactona

Na preparação de microesferas pela técnica de emulsificação/extração do solvente, muitos polímeros têm sido utilizados. Entre eles, podemos destacar a poli- ϵ -caprolactona (PCL), os homopolímeros do ácido láctico e glicólico, os copolímeros do ácido metacrílico e dos ésteres acrilados, além de vários polissacarídeos, como as quitosanas, os alginatos, a celulose e seus derivados (LINHARD, 1988, LACASSE *et al.*, 1997, FELT *et al.*, 1998).

A poli- ϵ -caprolactona, seus copolímeros com outros poli-hidroxiácidos, tais como o poli-ácido láctico e poli-ácido glicólico, bem como misturas físicas com outros polímeros têm sido utilizados no desenvolvimento de novas formas de liberação controlada. A capacidade de controle destas formas de dosificação é dependente do tipo e da composição do polímero formador de matriz e das características físico-químicas da molécula encapsulada. A grande permeabilidade da PCL, a possível

modulação do perfil de liberação do fármaco mediante a obtenção de copolímeros e de misturas físicas com outros polímeros, assim como sua biodegradabilidade e ausência de toxicidade, o tornam um excelente candidato para a elaboração de sistemas de liberação prolongada (WADE *et al.*, 1977; WU e GAN, 1998).

A poli- ϵ -caprolactona (Figura 6) é um poliéster alifático sintetizado a partir do monômero ϵ - caprolactona (2-metileno-1,3-dioxepano) (ELFICK, 2002).

A temperatura de fusão da PCL varia entre 50-64°C dependendo do grau de cristalinidade. Este polímero apresenta uma temperatura de transição vítrea baixa (T_g -62°C) e, conseqüentemente, em temperatura ambiente encontra-se no estado cristalino contribuindo para a permeabilidade de fármacos de massa molar inferior a 400 Da (LIN *et al.*, 1994). A poli- ϵ -caprolactona é solúvel em vários solventes apolares em temperatura ambiente, tais como clorofórmio, diclorometano, tolueno e ciclohexano, ligeiramente solúvel em acetona, acetato de etila e acetonitrila, e insolúvel em álcoois, éter de petróleo e éter etílico (PITT *et al.*, 1988).

A PCL é um polímero semicristalino cuja cristalinidade varia em função da sua massa molar. Sendo assim, polímeros apresentando massa molar superior a 100.000 Da possuem grau de cristalinidade de aproximadamente 40% e, naqueles apresentando massa molar inferior a 5.000 Da, este valor aumenta para 80%. A cristalinidade deste polímero afeta diretamente as suas características de permeabilidade e biodegradabilidade de matrizes poliméricas, pois, geralmente, a fase cristalina é inacessível à água. Portanto, o aumento na cristalinidade reduz a permeabilidade de matrizes de PCL, devido à diminuição da solubilidade do soluto e aumento da tortuosidade para que ocorra a difusão, e reduz a velocidade de biodegradação das mesmas devido à inacessibilidade do polímero ao ataque hidrolítico (PITT *et al.*, 1979; PITT *et al.*, 1981).

Adicionalmente, o tamanho das partículas e sua localização *in vivo* são fatores que afetam a sua velocidade de degradação. Sendo assim, a degradação de

partículas administradas pela via intravenosa difere daquelas implantadas ou administradas pela via intramuscular. Outros fatores que afetam a degradação, são a composição química do polímero, a massa molar e a presença de aditivos (THIES, 1989). Estudos metabólicos demonstraram que somente o ácido-hidroxicaproico é detectado como produto de degradação da PCL, sendo eliminado nas fezes, urina e ar expirado (PITT, 1990).

FIGURA 6. Composição química da poli-ε-caprolactona.

2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE CAMPTOTECINAS

Muitos esforços têm sido realizados com intuito de melhorar a eficácia terapêutica das camptotecinas, quer seja buscando a proteção do anel lactônico frente à hidrólise, quer seja pela otimização da velocidade e extensão com que estes fármacos atingem os tumores.

O potencial de utilização de microesferas de poli ácido-lático-co-glicólico (PLGA) na estabilização e liberação da 10-hidroxicamptotecina (10-HCPT) foi avaliado por SHENDEROVA e colaboradores (1997). Estes autores obtiveram microesferas que proporcionaram a liberação lenta e contínua da 10-HCPT por mais de dois meses, assegurando a manutenção da forma ativa nas partículas durante o mesmo período. O interesse da aplicação do PLGA para a estabilização de 10-HCPT também foi demonstrado em outro estudo realizado por MALLERY e colaboradores

(2001)⁴ em modelo de regressão de carcinoma de células escamosas orais humanas em camundongos.

O desenvolvimento de microesferas visando liberação prolongada da camptotecina foi igualmente realizado por Ertl e colaboradores (1999), empregando-se a técnica de emulsificação/evaporação do solvente para a preparação das mesmas. Nestes estudos, os autores empregaram um tipo especial do poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA), apresentando uma maior quantidade de grupamentos carboxílicos terminais. Quando hidrolisado, o PLGA é degradado em oligômeros e monômeros ácidos que produzem um ambiente ácido no interior das microesferas, mantendo a CPT na sua forma ativa, conseqüentemente, favorecendo a sua estabilização (HATEFI e AMSDEN, 2002). O perfil de liberação *in vitro* da camptotecina demonstrou ser bifásico e dependente do teor de fármaco nas partículas, sendo que 40 a 75 % do fármaco foi liberado após 160 horas de ensaio. A integridade da forma ativa da camptotecina foi mantida durante a preparação, o armazenamento e a liberação do fármaco.

MACHIDA e colaboradores (1998) desenvolveram microesferas de CPT-11 de liberação prolongada, usando o poli-ácido láctico ou poli-ácido láctico-co-glicólico para a obtenção da matriz polimérica. As microesferas obtidas exibiram marcada atividade antitumoral contra tumor ascítico após administração intraperitoneal, mas não foram significativamente efetivas no modelo de tumor sólido Sarcoma 180, implantado subcutaneamente. Uma vez que a eficácia do CPT-11 está relacionada ao nível plasmático de SN-38, estes autores investigaram, ainda, o perfil farmacocinético do pró-fármaco a partir das microesferas, bem como o aparecimento do seu metabólito ativo no sangue (MACHIDA *et al.*, 2000).

A viabilidade das nanopartículas lipídicas, a base de ácido esteárico, em prolongar a liberação da CPT e orientar este fármaco para sítios específicos após a

⁴ MALLERY, S. *et al.* Effects of 10-HCPT, delivered from locally injectable poly(lactide-co-glycolide) microspheres, in a murine human oral squamous cell carcinoma regression model. *Anticancer Research*, v.21, p.1713-1722, 2001 *apud* HATEFI, A. e AMSDEN, B. Camptothecin delivery methods. *Pharmaceutical Research*, v.19, p.1389-1399, 2002.

administração oral em camundongos, foi avaliada por YANG e colaboradores (1999). Neste estudo foi verificada a existência de dois picos de concentração no sangue, assim como no coração, fígado, baço, pulmões, rins e cérebro. O aparecimento do primeiro pico de concentração foi correlacionado à fração livre de CPT, rapidamente absorvida por via oral. A captura das partículas no intestino, a lenta degradação das mesmas por esterases ou ainda o fenômeno de translocação das nanopartículas lipídicas através do trato gastro-intestinal foram considerados responsáveis pelo aparecimento do segundo pico após três horas de administração.

Sistemas de liberação de natureza lipídica, tais como os lipossomas e as microemulsões, bem como as soluções micelares têm sido testados para veicular as camptotecinas, topotecano e lurtotecan. Estas formulações foram desenvolvidas primeiramente com o objetivo de assegurar a solubilidade destes fármacos em ambiente aquoso, manter a estabilidade do anel lactônico frente à abertura em pH fisiológico e reduzir a toxicidade relacionada à distribuição indiscriminada dos mesmos no organismo.

A análise da atividade antiproliferativa em cultura de células leucêmicas K562 demonstrou que os lipossomas, microemulsões e micelas contendo CPT exerceram efeito similar ou levemente aumentado, quando comparado com aquele produzido pelo fármaco livre. A utilização de lipossomas igualmente permitiu a estabilização do anel lactônico da camptotecina quando esta se encontrava inserida na bicamada lipídica, bem como de seus análogos solúveis, o topotecano e lurtotecan, quando estes se encontravam encapsulados no interior da cavidade aquosa do mesmo, mantida a pH levemente ácido. A encapsulação lipossomal de lurtotecan resultou em um maior tempo de residência plasmático, no aumento da liberação do fármaco nos tumores e conseqüentemente no aumento do seu índice terapêutico (SUGARMAN, 1996; CORTESI *et al.*, 1997; COLBERN *et al.*, 1998; CORTESI e NASTRUZZI, 1999; EMERSON, 2000; HATEFI e AMSDEN, 2002; SANTOS *et al.*, 2002).

Outra estratégia que tem sido utilizada para administrar a CPT consiste na formação de conjugados hidrossolúveis deste fármaco com um polímero carreador. Estes conjugados têm sido obtidos pela condensação da CPT com o ácido dicarboxílico do polietilenoglicol, resultando em ésteres mono ou disubstituídos da CPT, ou pela condensação do mesmo polímero utilizando aminoácidos como espaçadores bifuncionais que levam à formação de amidoésteres não-iônicos e solúveis em água. A ligação da CPT a polímeros tem-se mostrado vantajosa, pois o aumento da estabilidade do fármaco conduz ao acúmulo do mesmo nos tumores e possibilita a liberação prolongada da forma ativa. No entanto, dados de toxicidade de muitos conjugados e dos espaçadores, bem como estudos para avaliação das características farmacológicas e janelas terapêuticas destes compostos ainda são requeridos. Além disso, estas formulações ainda apresentariam como desvantagens a administração diária do medicamento e a falta de especificidade do conjugado pelo tumor (HATEFI e AMSDEN, 2002).

Finalmente, celulosas oxidadas contendo 7, 13 e 20% de unidades carboxílicas foram empregadas na preparação de microesferas de camptotecina por spray-drying. Os resultados obtidos nos estudos de citotoxicidade *in vitro* indicaram a maior eficácia das microesferas contra células leucêmicas mielóides THP-1 e células linfóides RPMI-8402, quando comparado com a eficácia com o fármaco livre. Este efeito foi atribuído ao aumento da dissolução da CPT a partir das microesferas (KUMAR *et al.*, 2001).

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias-primas

- Camptotecina (Sigma Chemical Company, USA);
- Hidroxipropilmetilcelulose (Methocel E4M Premium CR - Colorcon, SP);
- Poli- ϵ -caprolactona 65.000 Da (Sigma-Aldrich, USA);

3.1.2 Reagentes e solventes

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

- Acetonitrila para CLAE (Tedia);
- Ácido cítrico (Quimidrol).
- Ácido fosfórico concentrado (Vetec);
- Ácido Úrico (Bayer);
- Álcool etílico (Biotec);
- Auto Despro (Hemogram);
- Calibrador SETpoint (Bayer);
- Carboximetilcelulose sódica (Quimidrol);
- Citrato de sódio (Reagen, RJ);
- Cloreto de potássio (Vetec);
- Cloreto de sódio (Biotec);
- Controle QCS-1 e QCS-2 (Biorad);
- Creatinina (Bayer);
- Diclorometano (Vetec);
- Dimetilsulfóxido (Vetec);
- Dióxido de carbono (White Martins);
- Éter etílico (Vetec);

- Formaldeído (Reagen);
- Fosfato de potássio monobásico (Synth);
- Fosfato de sódio dibásico (Vetec);
- Hemoblank 2 (Hemogram);
- Hemolise DIFF(Hemogram);
- Hemoton (Hemogram);
- Hidróxido de sódio (Cinética Química LTDA);
- Metanol para CLAE (Tedia).
- Monoleato de sorbitano polioxyetilenado (Merck).

3.1.3 Cultura de células

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

3.1.4 Equipamentos

- Agitador magnético Fisatom, modelo 702 AC;
- Analisador Imunoquímico Bayer, modelo ADVIA 1650;
- Balança analítica Ohaus Corporation AS200S;
- Capela de fluxo laminar vertical Pachane;
- Capela de fluxo laminar vertical Vecco;
- Centrífuga Excelsa Baby Fanem;

- Contador Hematológico Serono Baker System 9000 e Hematology Analyser
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS SPD-10AV VP, workstation Class-VP;
- Difratorômetro de raios-X Rigaku Miniflex;
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-5B;
- Freezer Nuaire Ultralow.
- Incubadora de CO₂ Nuaire US Auto Flow;
- Liofilizador Micromodulyo E-C;
- Microscópio eletrônico de varredura Philips XL 30.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Preparação e caracterização das microesferas

3.2.1.1 Preparação das microesferas contendo camptotecina

As microesferas de poli- ϵ -caprolactona contendo camptotecina foram produzidas pela técnica de emulsificação/extração do solvente (WATTS *et al.*, 1990). Esta técnica consistiu em dispersar sob forma de finas gotículas, 15 mL de uma solução contendo 1% (p/V) de poli- ϵ -caprolactona e camptotecina em diclorometano (fase interna), em 100 mL de água previamente saturada com o solvente orgânico, contendo 0,25% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose como estabilizante (fase externa). Após a formação da emulsão, 5 mL de etanol foram adicionados e a mistura foi mantida sob agitação constante durante 5 horas em temperatura ambiente, até a completa evaporação do solvente da fase interna. As partículas formadas foram centrifugadas a 4.000 rpm, lavadas oito vezes com 14 mL de água destilada, congeladas a -80°C e liofilizadas (Figura 7). Foram preparadas três formulações tendo-se como variável a quantidade inicial de CPT (15, 30 ou 60 mg) acrescentada, a qual foi previamente solubilizada em dimetilsulfóxido (1-2 mL) para a preparação da fase interna. As microesferas preparadas com a adição prévia de 15, 30 e 60 mg de CPT foram denominadas

MC15, MC30 e MC60, respectivamente. Para a realização dos estudos *in vivo*, microesferas sem adição de fármaco foram preparadas, sendo designadas como microesferas brancas ou MB.

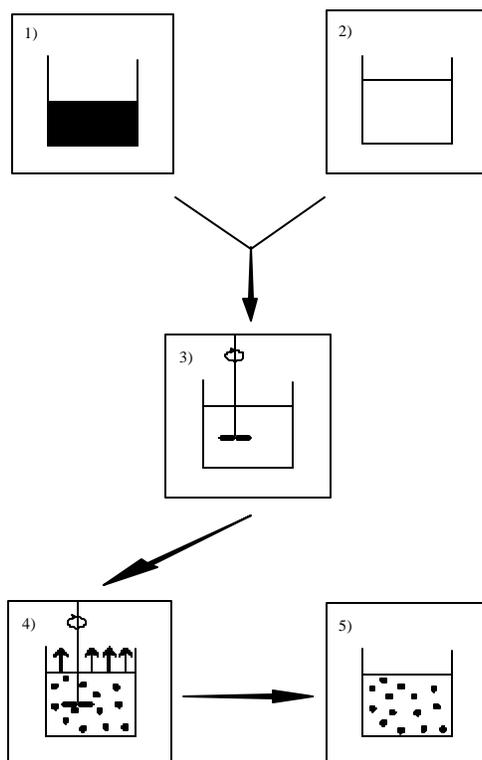


FIGURA 7. Esquema de preparação das microesferas.

3.2.1.2 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da camptotecina nas microesferas de poli-ε-caprolactona pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência

3.2.1.2.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu SLCA VP, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS APD-10AV VP e workstation Class-VP, utilizando sistema de fase reversa e modo

isocrático. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna Supelcosil LC-18 (15 cm x 4,6 mm ID, 5 μ m; Supelco, USA), fase móvel, metanol:KH₂PO₄ 10mM (50:50 v/v) ajustado a pH 2,8 com ácido fosfórico; fluxo, 1,0 mL/min; volume de injeção, 20 μ l e detecção no ultravioleta, 254 nm.

3.2.1.2.2 Preparação da curva de calibração

Cerca de 20 mg de camptotecina, exatamente pesados, foram dissolvidos em 20 mL de DMSO em balão volumétrico. Uma alíquota de 1,0 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com uma solução diluente constituída de acetonitrila:metanol:água (50:45:5,v/v/v), ajustada a pH 2,8. Esta solução foi diluída para obter soluções de camptotecina nas concentrações de 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 μ g/mL, no mesmo sistema solvente, as soluções foram então analisadas por CLAE como descrito no item 3.2.1.2.1. As soluções foram injetadas em triplicata e as médias das áreas referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise da regressão linear.

3.2.1.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de camptotecina nas microesferas

A eficiência de encapsulação e o teor de fármaco nas microesferas foram estimados após determinação da concentração de camptotecina nas soluções obtidas após dissolução das micropartículas. Exatamente cerca de 15 mg de microesferas, foram pesadas diretamente em um balão volumétrico de 10 mL, dissolvidas com 1 mL de diclorometano, 1 mL de DMSO e o volume final completado com a mistura acetonitrila:metanol:água (50:45:5,v/v/v; pH 2,8). As soluções resultantes foram analisadas por CLAE conforme descrito em 3.2.1.2.1. As soluções foram injetadas em triplicata e concentração de camptotecina foi determinada comparando-se as áreas dos picos correspondente ao fármaco nas

amostras com aquele obtido após a análise de uma solução padrão do mesmo, na concentração de 35 µg/mL, nas mesmas condições.

A eficiência de encapsulação (%) foi estimada correlacionando-se a quantidade de fármaco inicialmente adicionado nas formulações e aquele encontrado nas partículas. O teor de camptotecina foi estimado como sendo o peso percentual (%;p/p) de fármaco encontrado nas microesferas.

3.2.1.3 Caracterização físico-química das microesferas

3.2.1.3.1 Avaliação da morfologia

A análise morfológica das microesferas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura em microscópio Philips XL30. As amostras foram fixadas com fita dupla-face em suportes de alumínio, estes suportes foram recobertos com uma fina camada de ouro de 350 Å de espessura em um aparelho a vácuo Polaron E 5000. As micrografias foram obtidas em aumentos de 75 a 5000 vezes.

3.2.1.3.2 Determinação do tamanho das partículas

O tamanho das microesferas foi determinado após a medição, pelo diâmetro de Ferret, das partículas visualizadas nas micrografias ampliadas, obtidas por MEV.

3.2.1.3.3 Análise das microesferas por difração de Raios-X

O estado físico da camptotecina nas microesferas foi avaliado utilizando-se difratômetro de Raios-X da marca Rigaku, modelo Miniflex, equipado com tubo de cobre ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). A faixa angular investigada foi de $10^\circ \leq 2\theta \leq 100^\circ$ com passo de $0,05^\circ$ e tempo de 1 segundo.

3.2.2 Avaliação da velocidade de liberação

3.2.2.1 Determinação da concentração de camptotecina por espectrofluorimetria

3.2.2.1.1 Condições Fluorimétricas

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

3.2.2.1.2 Preparação da curva de calibração

Cerca de 20 mg de camptotecina, exatamente pesados, foram dissolvidos em 20 mL de DMSO em balão volumétrico. Uma alíquota de 0,1 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com uma solução de tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% (p/V) de Tween 80. Esta segunda solução foi diluída para obter soluções de camptotecina nas concentrações de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram então analisadas conforme descrito no item 3.2.2.1.1. As análises foram feitas em triplicata e as médias das áreas dos espectros de emissão referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear.

3.2.2.1.3 Ensaios de liberação

Microesferas em uma quantidade correspondente a 250µg de camptotecina foram exatamente pesadas e transferidas para frascos âmbar contendo 50 mL de meio de liberação. As misturas foram mantidas sob agitação a 37°C e no tempo zero e após 1, 2, 4, 6, 10, 24, 48, 72 horas, as respectivas misturas foram centrifugadas e analisadas por espectrofluorimetria conforme descrito em 3.2.2.2. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração das soluções foram determinadas se comparando as áreas dos espectros de emissão das amostras com aquelas obtidas a partir de uma solução padrão de CPT a 0,08 µg/mL, analisadas nas mesmas condições experimentais. Uma solução tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% (p/V) de Tween 80 foi empregada como branco para o cálculo da linha de base. A partir destes resultados, curvas de liberação camptotecina (%) *versus* tempo (horas) foram construídas.

3.2.3 Avaliação da eficácia terapêutica das microesferas em modelo de melanoma murino de alto poder metastático

3.2.3.1 Animais experimentais

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

3.2.3.2 Preparação das células B16-F10

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

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

Previamente aos ensaios, uma solução contendo tripsina:EDTA (0,05:0,03, p/V) foi acrescentada às células, e as mesmas foram submetidas à centrifugação. O sobrenadante foi descartado e 2,0 mL de tampão PBS pH 7,4 foi acrescentado sobre as células. Uma alíquota de 10µL da suspensão de células foi transferida para um eppendorf e diluída com 90µL de PBS pH 7,4. O número de células viáveis foi então avaliado em câmara de Neubauer para a determinação da quantidade de células necessárias para a realização dos ensaios.

3.2.3.3 Estudos preliminares

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

Para otimizar o tempo dos ensaios *in vivo* e o número de células a serem inoculadas, dois grupos de 15 camundongos cada foram inoculados por via intraorbital com células tumorais B16-F10, nas concentrações de 5×10^4 e 1×10^5 células por camundongo, previamente ressuspensas em PBS. Três camundongos de cada grupo foram sacrificados, em câmara de CO₂, nos dias 13, 15, 19, 22 e 24 após a inoculação das células. O número de metástases pulmonares foi determinado após a dissecação microscópica e os pulmões foram fixados com solução de formol a 10%.

3.2.3.3.2 Determinação da dose de camptotecina e do protocolo de administração

Seis grupos de camundongos contendo 4 animais cada foram inoculados com células tumorais B16-F10 por via intraorbital na concentração de 5×10^4 células/animal, previamente ressuspensas em solução salina balanceada. Após os 2º, 6º, 10º, 14º e 18º dias, seguido da administração das células, os animais foram tratados com as microesferas de CPT ou com o fármaco livre, conforme descrito na Tabela 1. As microesferas e o fármaco livre foram administrados após a dispersão das partículas em um veículo constituído de 0,3% (p/V) de carboximetilcelulose sódica e 0,2% (p/V) de Tween 80 em tampão PBS pH 7,4. Esta mesma solução foi utilizada como veículo, para a administração nos grupos controle negativo e positivo. Os animais foram sacrificados, em câmara de CO₂, no 22º dia após a inoculação das células. O número de metástases pulmonares foi determinado após a dissecação microscópica e os pulmões foram fixados com solução de formol a 10%.

Tabela 1. Constituição dos grupos e do protocolo de administração do fármaco para o teste preliminar de metástase em pulmões.

Grupos	Administração Intraperitoneal	Dose diária de CPT
Controle +	veículo	-
Controle -	veículo	-
Grupo 1	CPT livre	7 mg/Kg/dia
Grupo 2	CPT livre	10 mg/Kg/dia
Grupo 3	MC15	7 mg/Kg/dia
Grupo 4	MC30	7 mg/Kg/dia

3.2.3.4 Ensaio de metástase em pulmões

A partir dos resultados obtidos nos estudos preliminares e dos dados encontrados na literatura (CHIRIVI *et al.*, 1994; YOSHIKAWA *et al.*, 2003), foi realizado o ensaio de metástase em pulmões. Oito grupos de camundongos contendo 8 animais cada foram inoculados com células tumorais B16-F10 por via intraorbital na concentração de 5×10^4 células/camundongo, previamente ressuspensas em PBS. A constituição dos grupos, o modo de administração, os protocolos e as doses utilizadas encontram-se demonstrados na Tabela 2.

As microesferas e o fármaco livre foram administrados após a dispersão das partículas em um veículo constituído de 0,3% (p/V) de carboximetilcelulose sódica e 0,2% (p/V) de Tween 80 em tampão PBS pH 7,4. Esta mesma solução foi utilizada como veículo, para a administração nos grupos controle negativo e positivo. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, no 24º dia após a inoculação das células. O número de metástases pulmonares foi determinado após a dissecação microscópica e os pulmões foram fixados com solução de formol a 10%.

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

Grupos	Administração intraorbital	Administração Intraperitoneal	Protocolos de administração (dias)	Dose diária e total de CPT
Controle negativo	-	Veículo	2/6/10/14/18	-
Controle positivo	Células B16-F10	Veículo	2/6/10/14/18	-
Grupo 1	Células B16-F10	MB	2/6/10/14/18	-
Grupo 2	Células B16-F10	MB	2/8/14/20	-
Grupo 3	Células B16-F10	CPT livre	2/6/10/14/18	7mg/Kg/dia e 35mg/Kg
Grupo 4	Células B16-F10	CPT livre	2/8/14/20	7mg/Kg/dia e 28 mg/Kg
Grupo 5	Células B16-F10	MC30	2/6/10/14/18	7mg/Kg/dia e 35mg/Kg
Grupo 6	Células B16-F10	MC30	2/8/14/20	7mg/Kg/dia e 28mg/Kg

Os resultados obtidos com os camundongos tratados com fármaco livre, com o veículo e com o sistema de liberação desenvolvido foram comparados para os dois protocolos testados e analisados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo *posthoc* de Bonferoni.

3.2.3.5 Ensaios de toxicidade

Para a realização dos ensaios de toxicidade foi coletado sangue por punção cardíaca de quatro animais de cada grupo. Neste ensaio, foram avaliados os

parâmetros hematológico e renal, por meio da análise dos hemogramas e da dosagem de creatinina e ácido úrico. Os exames laboratoriais foram realizados no setor veterinário do Laboratório Santa Luzia.

3.2.3.5.1 Hemograma

Os hemogramas foram realizados através da técnica de citometria de fluxo, empregando-se contador hematológico Serono Baker System 9000 dotado de um Hematology Analyser. Este equipamento utiliza o princípio de contagem eletrônica e tipificação baseado na diferença da condutividade entre células sanguíneas e o diluente nas quais elas estão suspensas (impedância e condutividade) para contagem e determinação de tamanho. O teor de hemoglobina foi determinado usando células fotométrica com filtro de 540nm.

3.2.3.5.2 Dosagem de creatinina e ácido úrico

A dosagem de creatinina e ácido úrico foi realizada no analisador imunoquímico automático ADVIA-BAYER.

4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS

4.1.1 Preparação das microesferas contendo camptotecina

A camptotecina é um alcalóide citotóxico cuja utilização no tratamento do câncer foi quase abolida devido às limitações que apresenta para uma administração pela via intravenosa. Este fármaco possui escassa solubilidade aquosa em baixos valores de pH, o que impossibilita a sua administração na forma de soluções. O aumento do pH conduz ao aumento da solubilidade da camptotecina, mas esta é rapidamente inativada, sendo que em pH fisiológico unicamente 13% do fármaco encontra-se na sua forma ativa. Esta inativação decorre da abertura do anel lactônico da molécula, essencial para a atividade antitumoral, com conseqüente formação da forma carboxilada, mais tóxica, em um processo cujo equilíbrio entre as duas formas é pH dependente (SHENDEROVA, *et al.*, 1997; CORTESI e NASTRUZZI, 1999).

Entretanto, a descoberta do mecanismo de ação envolvendo a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores, trouxe um novo impulso às pesquisas científicas com este fármaco. Desde então, a molécula da camptotecina tem sido modificada, pela introdução de substituintes no seu anel pentacíclico, no intuito de obter derivados hidrossolúveis passíveis de serem administrados intravenosamente, na forma de soluções farmacêuticas. Apesar dos esforços que têm sido praticados para contornar o problema relacionado à baixa solubilidade aquosa da camptotecina, todos os derivados obtidos até o momento estão sujeitos à inativação pela abertura do anel lactônico (IYER e RATAIN, 1998).

Por outro lado, os resultados obtidos nos ensaios clínicos têm demonstrado que a exposição do tumor as camptotecinas em doses baixas e de modo contínuo é mais efetiva para o tratamento do que a utilização de doses elevadas em protocolos apresentando menores intervalos de tempo entre cada administração (O'LEARY e MUGGIA, 1998). Esta característica terapêutica, associada à baixa

solubilidade aquosa, bem como a instabilidade do anel lactônico, torna a camptotecina um potencial candidato para a microencapsulação. Além de proporcionar uma maior eficácia terapêutica, a liberação contínua do fármaco por períodos prolongados de tempo, a partir de depósitos de micropartículas, compensaria a sua rápida degradação no plasma, mantendo a concentração plasmática da forma ativa em níveis mais constantes.

Para a microencapsulação de fármacos, a técnica de emulsão seguida da evaporação do solvente tem sido amplamente empregada devido à simplicidade dos procedimentos envolvidos para a obtenção das partículas. Além disso, trata-se de uma técnica de preparação versátil, uma vez que permite a encapsulação de substâncias de natureza hidrofóbica ou hidrofílica, pela escolha dos solventes das fases interna e externa, como possibilita a modulação das características físicas e físico-químicas do produto final.

Para fármacos de baixa solubilidade aquosa como a camptotecina, os procedimentos que envolvem a sua solubilização em um solvente volátil contendo o polímero, seguida da emulsificação desta solução em uma fase aquosa, asseguram a obtenção de microesferas com elevados valores de eficiência de encapsulação. Assim, a encapsulação da camptotecina em microesferas de poli- ϵ -caprolactona foi testada, empregando-se o diclorometano e a água, como solventes das fases interna e externa respectivamente. A emulsão formada é classificada como sendo óleo em água (o/a) e a hidroxipropilmetilcelulose foi empregada como estabilizante.

Devido aos danos causados ao ADN, a camptotecina e seus derivados são considerados fármacos mutagênicos, capazes de induzir aberrações cromossômicas (O'LEARY e MUGGIA, 1998). Apesar de serem considerados fármacos de baixo poder irritante e classificados como sendo de baixo risco frente ao extravasamento, a manipulação e administração destes fármacos são potencialmente perigosas e requer cuidados como a utilização de equipamentos

de proteção e a manipulação em capela de fluxo laminar vertical. Os efeitos causados pela exposição as camptotecinas não são bem conhecidos, mas podem incluir náuseas, diarreia, vômitos e efeitos sobre a medula óssea, tal como a mielossupressão (AYOUB e FRIAS, 2000; SOLIMANDO *et al.*, 2000, GLAXO SMITHKLINE, 2002).

Assim, como a preparação das microesferas deveria ser realizada em capela de fluxo laminar, a utilização de procedimentos que permitissem a eliminação mais rápida do solvente e conseqüente redução do tempo de preparação das microesferas, pareceu ser um propósito interessante a ser alcançado. Para tal, uma modificação na técnica de emulsificação/evaporação do solvente foi adotada e consistiu na adição de etanol na fase externa após a formação da emulsão. A adição do etanol conduziu ao aumento da solubilidade do solvente volátil na fase aquosa, aumentando a velocidade de eliminação do mesmo a partir da fase interna e, conseqüentemente, diminuindo o tempo necessário para a obtenção das partículas. Esta técnica freqüentemente denominada emulsificação/extração do solvente também tem sido relacionada com a obtenção de partículas de tamanho reduzido, possibilitando o uso das mesmas pela via parenteral (KUMAR, 2000; SPROCKEL e PRAPAITRAKUL, 1990). Com a utilização desta técnica, as partículas foram formadas após 5 horas de agitação. As microesferas produzidas foram centrifugadas, lavadas com água e liofilizadas.

Com o objetivo de otimizar a eficiência de encapsulação da camptotecina e assegurar elevados teores deste fármaco nas microesferas, outros parâmetros de formulação foram testados. Para garantir a baixa solubilidade da camptotecina na fase aquosa, o pH da mesma foi primeiramente mantido em valores em torno de 4,5 a 5,0, com auxílio de tampões fosfato ou citrato. As concentrações de hidroxipropilmetilcelulose testadas foram 0,25% e 0,50% (p/V). Quando a fase externa da emulsão foi tamponada, as microesferas não foram formadas (Figura

8), possivelmente devido à precipitação do estabilizante ocasionada pela elevada concentração de sais na mesma.

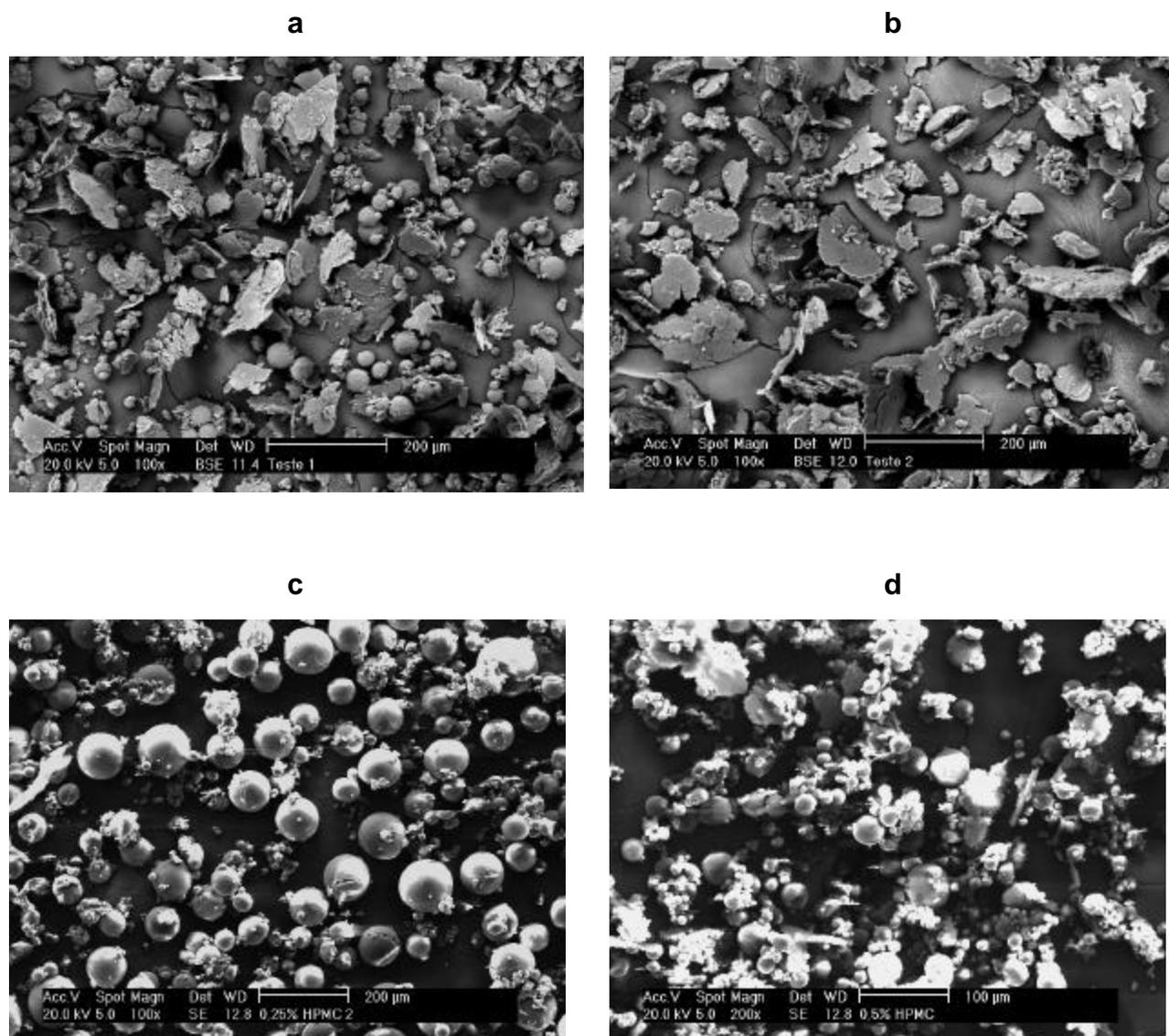


FIGURA 8. Micrografias obtidas por MEV a partir das partículas de poli-ε-caprolactona empregando-se como fase externa: (a) tampão fosfato pH 5,0 e (b) tampão citrato pH 4,5 contendo HPMC 0,25% (p/V); (c) solução aquosa de HPMC 0,25% e (d) HPMC 0,5% (p/V).

KUMAR e BANKER (1993) verificaram que, devido à natureza não-iônica da HPMC, soluções contendo este polímero são tolerantes a variações de pH e a

baixas concentrações de sais. Entretanto acima de certas concentrações, os sais competem com a água disponível causando a precipitação do polímero. Além disso, a presença de íons sulfato, carbonato e fosfato também podem influenciar na estabilidade das preparações, podendo levar a precipitação da hidroxipropilmetilcelulose (NETO e PETROVICK, 1997). Por outro lado, a utilização de soluções aquosas de HPMC a 0,25% e 0,5% (p/V) conduziu, em ambos os casos, à obtenção de partículas esféricas. Sendo assim, a concentração de 0,25% (p/V) de HPMC foi selecionada para a preparação das microesferas.

Finalmente, com o intuito de avaliar o efeito da quantidade de camptotecina inicialmente adicionada sobre a eficiência de encapsulação e teor de fármaco, as microesferas foram preparadas com 15, 30 ou 60 mg de fármaco, mantendo-se constantes todos os outros parâmetros de formulação. Os lotes resultantes foram denominados MC15, MC30 e MC60.

4.1.2 Caracterização físico-química das microesferas

4.1.2.1 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas microesferas de poli-ε-caprolactona

Várias metodologias de cromatografia líquida em fase reversa têm sido descritas na literatura para a determinação das formas lactônica e carboxilada da camptotecina nos fluidos biológicos, empregando-se a absorção no ultravioleta ou fluorescência para a detecção deste fármaco (LOH e AHMED, 1990, BEIJNEN *et al.*, 1993, TAKIMOTO *et al.*, 1994, WARNER e BURKE, 1997). De modo geral, é possível determinar ambas as formas pelo ajuste das condições cromatográficas. Quando soluções neutras de metanol e água são empregadas como fase móvel, a diminuição do pH das amostras para valores abaixo de 3 conduz ao aparecimento de um único pico correspondente a forma lactônica da molécula. Nas amostras com pH próximo da neutralidade observa-se o aparecimento de dois picos correspondentes à forma lactônica e carboxilada e em valores de pH acima de 10,

é possível visualizar somente o pico correspondente à forma carboxilada. Por outro lado, a acidificação da fase móvel conduz ao aumento do limite de detecção e da sensibilidade do método. Adicionalmente, a simetria do pico é melhorada quando fase móvel e amostras são acidificadas (LOH e AHMED, 1990).

Com intuito de determinar unicamente a camptotecina total nas formulações tanto a fase móvel quanto às amostras foram mantidas em pH ácido. A eficiência de encapsulação e o teor de camptotecina nas formulações foram determinados conforme descrito em 3.2.1.2. Para a elaboração da curva de calibração foram utilizadas soluções de camptotecina em acetonitrila:metanol:água (50:45:5, v/v/v; pH 2,8) em concentrações de 20 até 50 $\mu\text{g/mL}$. Na Tabela 3 encontra-se demonstrado as áreas dos picos obtidas para a camptotecina nas diferentes concentrações. A equação da reta obtida por regressão linear e o coeficiente de regressão podem ser visualizados na Figura 9. O tempo de retenção de CPT nas condições empregadas foi de 6,27 minutos.

TABELA 3. Áreas dos picos obtidas após análise das soluções de CPT padrão por CLAE.

Concentração de camptotecina (mg/mL)	Área do pico $\pm s$ (n=3)	CV(%)
20	1906670 \pm 2400,628	0,13
25	2368327 \pm 21035,72	0,88
30	2733797 \pm 19560,69	0,71
35	3265403 \pm 22839,40	0,69
40	3701301 \pm 10315,55	0,28
45	4212033 \pm 18273,15	0,43
50	4707801 \pm 24437,36	0,52

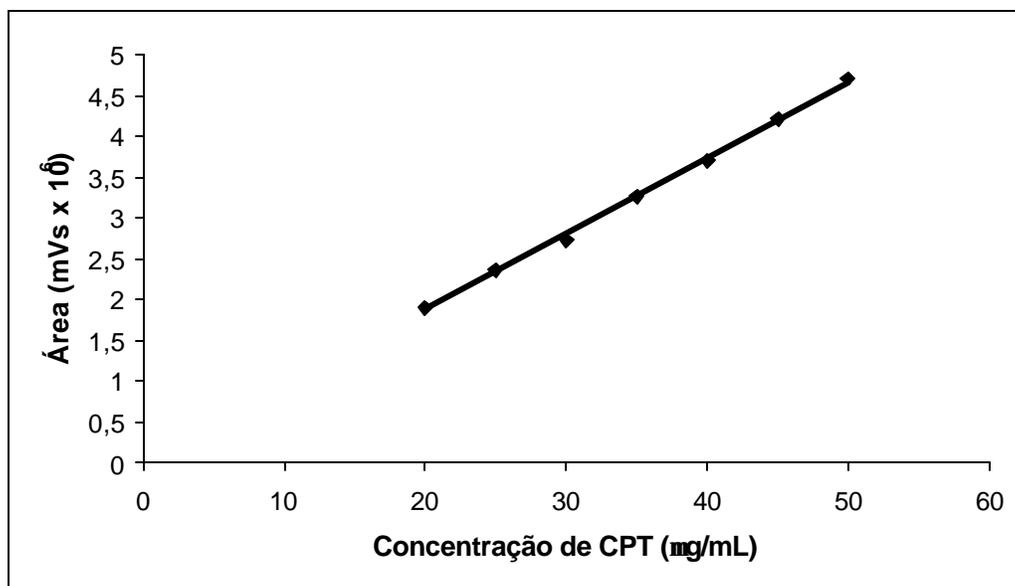


FIGURA 9. Curva de calibração de camptotecina obtida por CLAE.

A avaliação do coeficiente de regressão calculado evidenciou a existência de um comportamento linear significativo. A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança demonstraram a ausência de erro sistemático constante, onde o fator de variação é independente da concentração dos componentes analisados (FUNCK *et al.*, 1992). Uma vez que os limites de confiança incluem o valor zero, este tipo de erro não foi verificado com a metodologia de CLAE empregada (Tabela 4).

TABELA 4. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração da camptotecina por CLAE.

Parâmetros de Regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	6183,4 (-38176,1 a 50542,9)
Inclinação (intervalo de confiança)	93274 (89144,8 a 97403,2)
R ²	0,9984

A análise dos resíduos, que por sua vez pode ser definido como sendo a diferença entre os valores das áreas dos picos calculados e os encontrados

experimentalmente, também fornece informações sobre os dados. Um gráfico de concentração *versus* resíduo deve apresentar pontos que variam em torno do eixo das abscissas para descartar a presença de tendência dos resultados. A análise dos resíduos, realizada com os dados da curva de calibração da camptotecina, demonstrou pontos distribuídos em torno do eixo das abscissas, como pode ser visualizado na Figura 10. Assim, a metodologia de CLAE utilizada para a determinação do fármaco foi considerada satisfatória, na faixa de concentração testada.

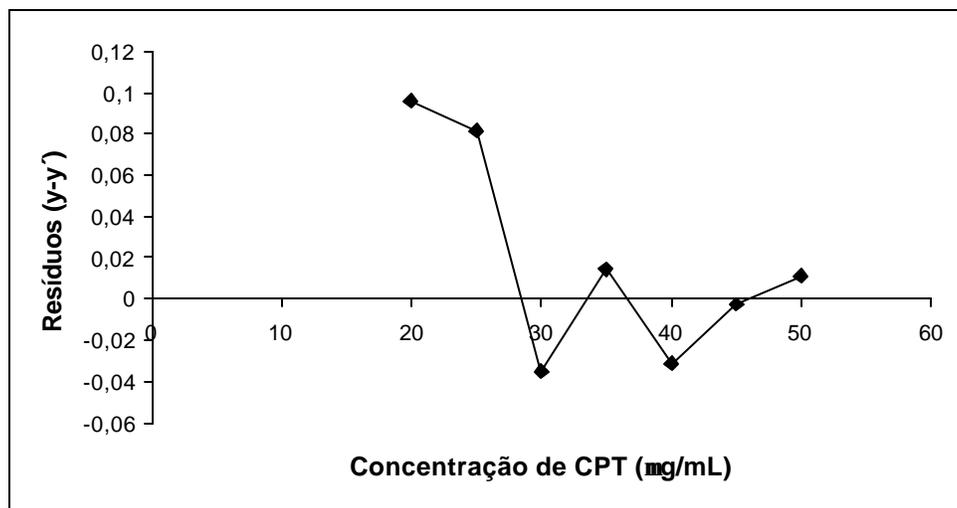


FIGURA 10. Análise dos resíduos da curva de calibração da camptotecina, obtida por CLAE.

Nas microesferas, a eficiência de encapsulação e o teor de fármaco foram estimados após determinação da concentração de camptotecina nas soluções obtidas após completa dissolução das partículas com dimetilsulfóxido e diclorometano, seguida da adição de uma solução de acetonitrila:metanol:água (50:45:5, v/v/v, pH = 2,8). As amostras foram analisadas por CLAE, empregando-se uma solução do fármaco na concentração de 35 $\mu\text{g/mL}$ como padrão externo. Os valores de eficiência de encapsulação e teor de camptotecina nas amostras encontram-se demonstrados na Tabela 5. A eficiência de encapsulação da CPT se manteve em torno de 81% em todas as preparações. Por outro lado, o teor de

fármaco nas microesferas aumentou proporcionalmente com o aumento da quantidade de camptotecina inicialmente adicionada às formulações.

De acordo com WATTS (1990), vários fatores podem interferir na eficiência de encapsulação do fármaco tais como, a natureza dos solventes da fase interna e externa, a relação fármaco:polímero e o tipo e concentração de estabilizante. De modo geral, elevados níveis de encapsulação são observados quando o coeficiente de partição do fármaco encontra-se em favor da fase interna da emulsão, sendo a fração não encapsulada freqüentemente eliminada nas operações de filtração e lavagem. Em vista disso, os elevados valores de eficiência de encapsulação podem estar relacionados à maior afinidade deste fármaco hidrofóbico pela fase interna da emulsão do que pela água. O fato de que o teor de fármaco aumenta e a eficiência de encapsulação permanece constante, com o aumento da quantidade inicial de CPT adicionada, sugere a existência de um efeito de partição da camptotecina entre as partículas e a água empregada na lavagem das microesferas.

TABELA 5. Valores de eficiência de encapsulação e teor de fármaco nas microesferas de poli-ε-caprolactona.

Quantidade inicial de CPT (mg; n=3)	Eficiência de encapsulação		Teor de CPT	
	(%)	M ± s	(%, p/p)	M ± s
MC15	91,69	81,49 ± 8,95	1,35	1,17 ± 0,15
	74,92		1,06	
	77,86		1,12	
MC30	84,89	81,66 ± 3,94	2,45	2,37 ± 0,08
	82,82		2,38	
	77,27		2,28	
MC60	76,24	81,70 ± 8,90	4,32	4,6 ± 0,41
	91,98		5,07	
	76,89		4,41	

4.1.2.2 Avaliação da morfologia das microesferas

A morfologia das microesferas foi analisada a partir de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) conforme descrito em 3.2.1.3.2. As micrografias obtidas por MEV das microesferas preparadas com diferentes quantidades de camptotecina podem ser visualizadas na Figura 11. Como pode ser observado nesta figura, a técnica de microencapsulação empregada conduziu à obtenção de partículas esféricas apresentando superfície rugosa. Segundo RADWAN e colaboradores (1995), quando a técnica de emulsão/evaporação do solvente é utilizada, a velocidade com que ocorre a eliminação do solvente da fase interna afeta as características de superfície das partículas. Geralmente, a rugosidade das microesferas aumenta com o aumento da velocidade de remoção do solvente durante o processo de microencapsulação. Sendo assim, a rugosidade observada na superfície das microesferas pode estar relacionada com a mais rápida eliminação do diclorometano da fase interna da emulsão, proporcionada pela adição do etanol, como agente extrator. Além disso, as micrografias demonstram partículas com diâmetro médio variando entre de 1 a 100 μm , sugerindo a obtenção de microesferas com ampla faixa de distribuição granulométrica e/ou a presença de mais de uma população de tamanhos de partícula.

Adicionalmente, o aumento da quantidade de fármaco inicial conduziu ao aparecimento de cristais grandes e retangulares na superfície das partículas. Em contraste com as microesferas obtidas com a adição de 15 mg de CPT, aquelas preparadas com 30 e 60 mg de fármaco demonstram a presença de cristais, sugerindo que, nestes casos, uma fração do mesmo encontra-se distribuída na forma sólida nas microesferas.

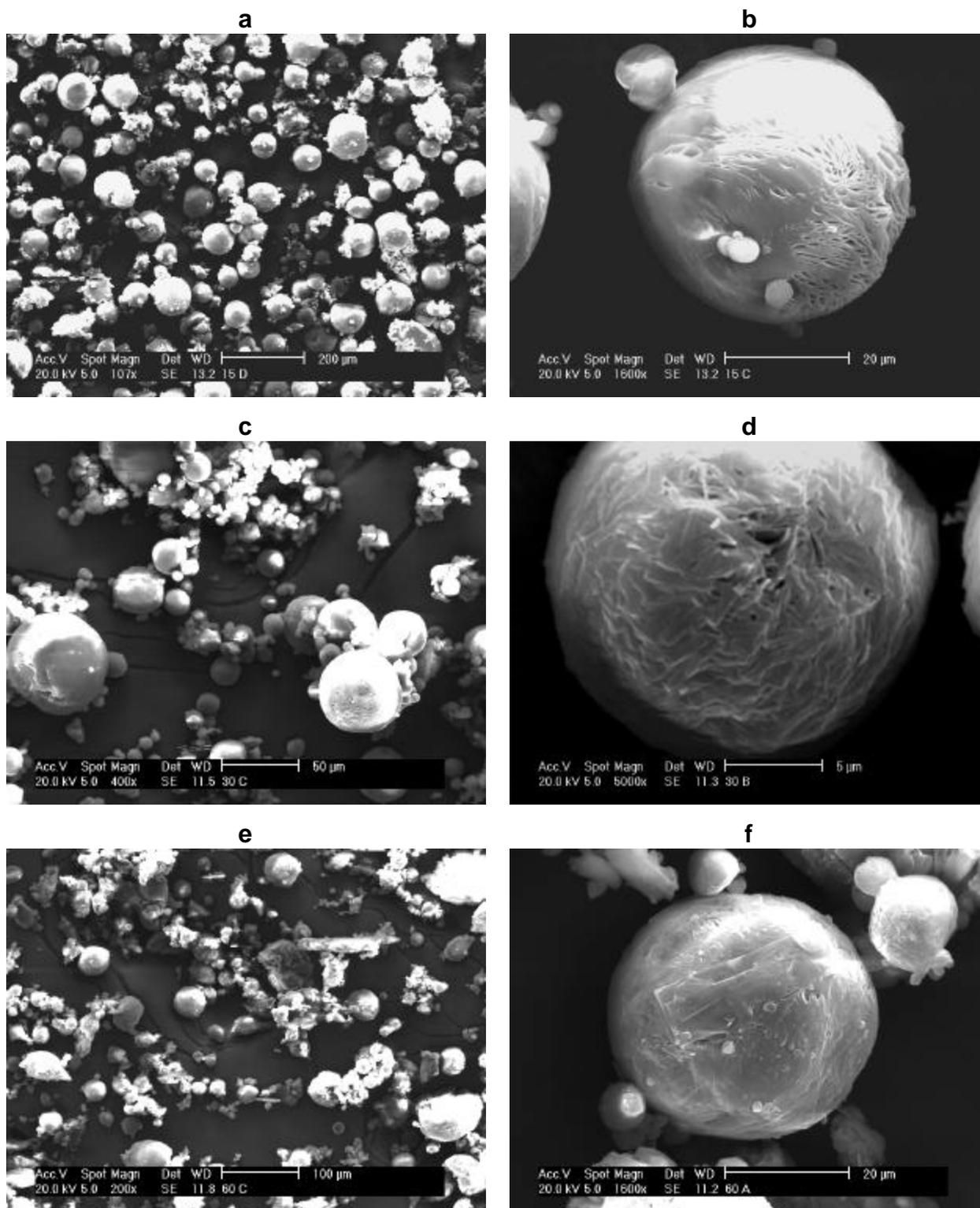


FIGURA 11. Micrografias obtidas por MEV das microesferas preparadas a partir de PCL: (a) e (b) MC15; (c) e (d) MC30; (e) e (f) MC60.

Esta cristalização provavelmente ocorreu após a evaporação do solvente, uma vez que para a obtenção da emulsão foi utilizada uma solução de CPT e do polímero como fase interna. Por outro lado, cristais de camptotecina não encapsulados foram visualizados nas preparações obtidas com a adição de 60 mg de fármaco na formulação. Isto poderia explicar os elevados valores de eficiência de encapsulação e teor de fármaco nas microsferas. O fármaco não encapsulado seria previamente solubilizado pela mistura de etanol e diclorometano presentes na fase externa durante a formação das partículas e, após a evaporação do solvente, o fármaco precipitaria. Uma vez sendo um fármaco pouco solúvel em água, os procedimentos empregados para a lavagem das microsferas não foram capazes de remover a fração não encapsulada do mesmo.

4.1.2.3 Determinação do tamanho de partículas

A distribuição granulométrica dos diferentes lotes de microsferas foi determinada após a medição do diâmetro de Ferret das partículas visualizadas nas micrografias obtidas por MEV e foi expressa como frequência percentual (%), conforme visualizado na Figura 12. Como pode ser observado, microsferas apresentando ampla faixa de distribuição de tamanhos foram obtidas, sendo que em torno de 50% das partículas apresentaram diâmetro inferior a 10 μm , para todas as formulações testadas. O diâmetro das partículas apresentando tamanho menor que 10 μm não pôde ser determinado devido a limitação da técnica de análise empregada. Assim, o diâmetro médio das microsferas não pôde ser determinado. Entretanto, não está descartada a possibilidade de obter preparações apresentando mais de uma população de tamanhos, como foi sugerido após a visualização das micrografias obtidas por MEV.

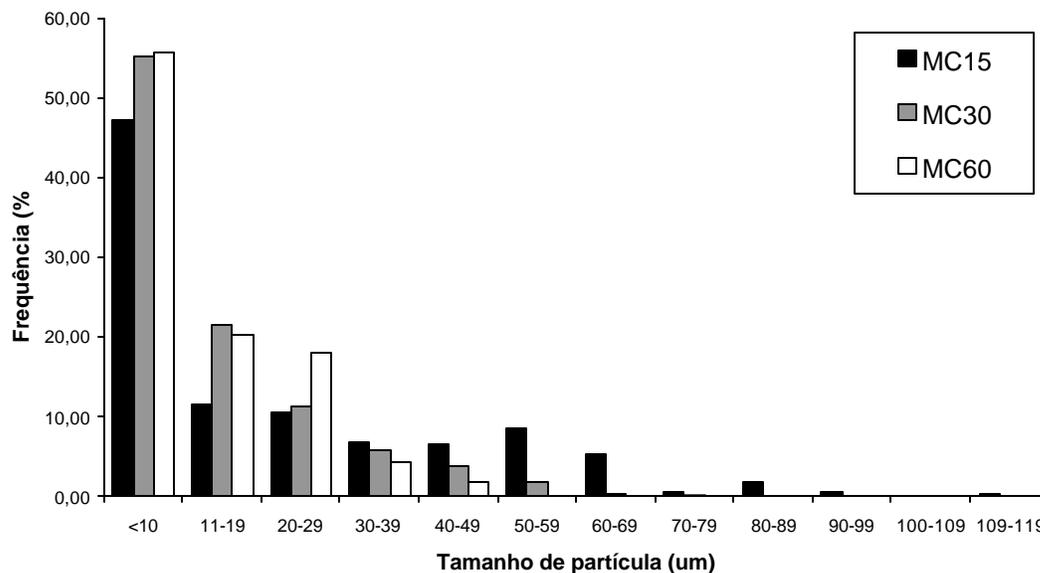


FIGURA 12. Distribuição granulométrica das microesferas de PCL contendo CPT.

4.1.2.4 Difração de Raio-X

A análise por difração de raios-X foi realizada com o objetivo de verificar a presença de cristais de camptotecina nos diferentes lotes de microesferas. Esta análise também permite verificar a presença de interações entre fármaco e polímero que podem influenciar na resposta terapêutica da forma farmacêutica final. Os espectros de difração de raios-X obtidos para as microesferas MB e para os lotes MC15, MC30 e MC60 encontram-se demonstrados na Figura 13.

Como pode ser observado, a PCL apresenta dois picos de difração característicos de sua forma semicristalina, conforme visualizado nas microesferas preparadas sem a adição de fármaco. Entretanto, não foi observada diferença nos espectros de difração das microesferas contendo camptotecina, quando comparados com aquele obtido para as microesferas de PCL puro. Apesar de ter sido evidenciada a presença de cristais de CPT nas microesferas MC30 e MC60, a baixa quantidade de fármaco em relação ao polímero não permitiu a visualização do seu modelo de difração nas partículas.

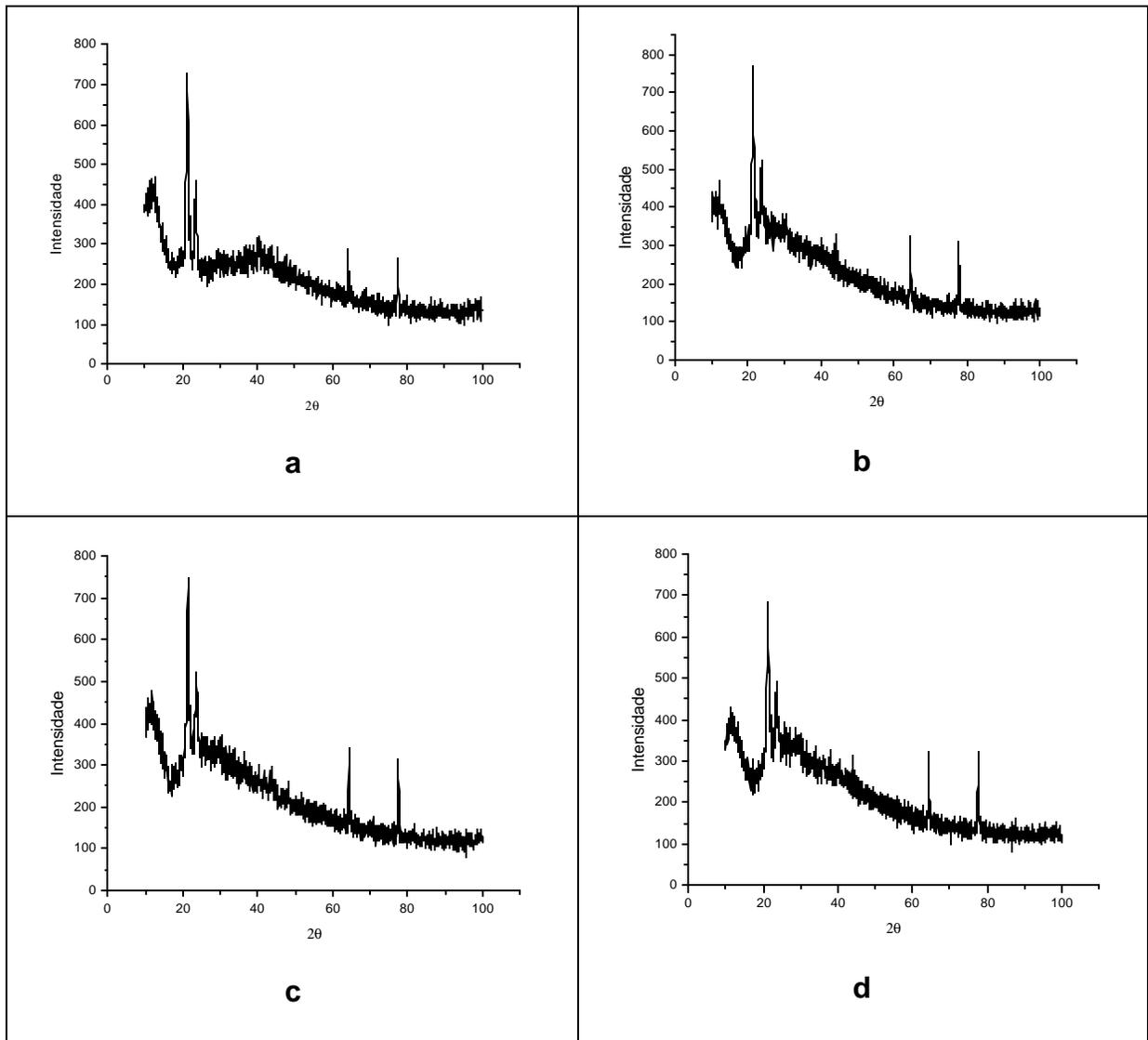


FIGURA 13. Espectros de difração de raios-x obtidos a partir das microesferas de PCL. (a) MB, (b) MC15, (c) MC30 e (d) MC60.

4.2. Avaliação da velocidade de liberação de camptotecina a partir das microesferas

A determinação da velocidade de liberação visa não somente controlar a qualidade do produto manufaturado, assegurando a constância do perfil de liberação, mas igualmente auxiliar na elucidação da estrutura do sistema, bem como dos mecanismos envolvidos, com possível predição da conduta do

medicamento *in vivo*. Para os sistemas matriciais tais como as microesferas, a liberação do fármaco consiste na combinação de várias etapas de transferência do mesmo entre os diferentes sítios das partículas. O fármaco se desloca através da microesfera por meio de um fenômeno de difusão pelos poros ou por entre as cadeias poliméricas alcançando a superfície até atravessar a camada interfacial em direção a fase contínua. Se disperso na matriz em forma de cristais, a substância ativa necessita ser previamente dissolvida, sendo a capacidade de hidratação da partícula importante nestas situações. Portanto, a velocidade de liberação determinada experimentalmente é o resultado do conjunto destes processos, embora apenas um seja considerado limitante. Para matrizes preparadas a partir de poli ésteres alifáticos, tais como a poli- ϵ -caprolactona, a liberação pode envolver fenômenos mais complexos uma vez que tais polímeros são biodegradáveis. Neste caso, a magnitude com que o fármaco é liberado pode ser resultante dos concomitantes processos de difusão do mesmo e erosão da matriz polimérica (WASHINGTON, 1990). Sendo assim, a liberação do fármaco é influenciada por uma série de fatores que são dependentes das características químicas e físico-químicas do polímero e do fármaco, bem como da composição e das propriedades estruturais das partículas. (VILA JATO, 1997).

Para fármacos apresentando baixa solubilidade aquosa, a concentração no meio de dissolução pode facilmente aproximar-se da concentração à saturação. Nestes casos, recorre-se à adição de agentes solubilizantes no meio de dissolução para a obtenção de condições *sink*. Nestas condições, a solubilidade do fármaco no meio não é um fator limitante para que ocorra a liberação, tornando possível a interpretação dos fenômenos envolvidos a partir dos dados experimentais.

Desta maneira, o perfil de liberação de camptotecina a partir das microesferas foi avaliado empregando-se como meio de dissolução uma solução tampão fosfato pH 7,4 contendo 2% (p/V) de Tween 80 como solubilizante. Tem-se preconizado que a concentração máxima de fármaco dissolvida na fase

contínua não deve exceder 10% da sua concentração de saturação (WASHINGTON, 1990). A solubilidade da camptotecina neste meio, determinada experimentalmente, foi de 79 $\mu\text{g/mL}$. Após a liberação da totalidade do fármaco contido nas microesferas, a quantidade no meio de dissolução correspondeu a 6,33% da sua concentração de saturação, tendo sido assim obtidas condições perfeitamente *sink*.

A camptotecina é caracterizada por apresentar uma forte absorção a 370 nm, como indicado pela sua alta absorvidade molar ($19900 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), sendo o máximo de absorção deslocado para comprimentos de onda mais curtos com o aumento da polaridade do solvente. Esta molécula também exibe forte fluorescência a aproximadamente 425 nm, entretanto, o espectro de fluorescência é levemente deslocado para comprimentos de onda mais longos na presença de solventes mais polares. Estas características espectrais da camptotecina têm sido explicadas com base na sua estrutura. Devido à alta conjugação do anel quinolona, a molécula apresenta uma estrutura planar pelo qual têm-se atribuído o deslocamento do máximo de absorção. Esta estrutura rígida também explica a alta absorvidade molar e o elevado rendimento quântico de fluorescência da molécula (DEY e WARNER, 1997).

Por outro lado, o espectro de fluorescência da camptotecina também é afetado pelo pH do meio. DEY e WARNER (1996) demonstraram que o máximo de fluorescência exibido pela molécula é deslocado para comprimentos de onda mais longos com o aumento do pH. Este efeito foi relacionado à formação da forma carboxilada da camptotecina, caracterizada por apresentar um menor rendimento quântico e maior tempo de vida, devido à perda parcial da rigidez da molécula ocasionada pela abertura do anel lactônico. A intensidade de fluorescência diminui gradualmente com o aumento do pH, alcançando um mínimo a pH 8,0, pois em valores acima deste o fármaco encontra-se predominantemente na sua forma carboxilada.

Portanto, na presença de tampão fosfato pH 7,4 a camptotecina se encontra em ambas as formas, tendo sido determinada a concentração total de fármaco liberado neste meio, empregando-se para isto os valores de áreas obtidos nos espectros de fluorescência. Para a elaboração da curva de calibração foram utilizadas soluções de camptotecina em tampão fosfato pH 7,4, contendo 2% de Tween 80 (p/V), nas concentrações de 0,02 até 0,35 $\mu\text{g/mL}$. Os espectros obtidos após a análise de uma solução padrão e amostra de camptotecina podem ser visualizados na Figura 14. Na Tabela 6 encontra-se demonstrado as áreas dos espectros obtidas para camptotecina nas diferentes concentrações. A curva de calibração da camptotecina e a equação da reta obtida pela análise da regressão linear podem ser visualizados na Figura 15.

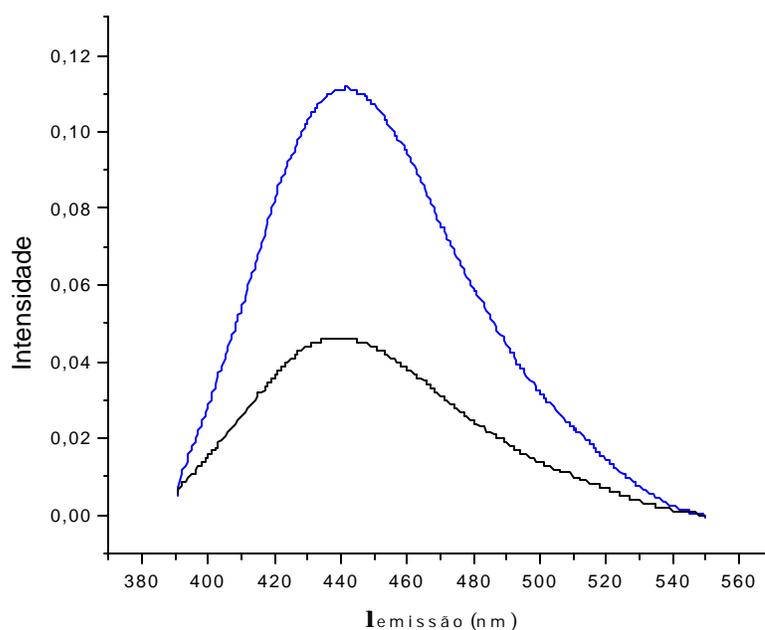
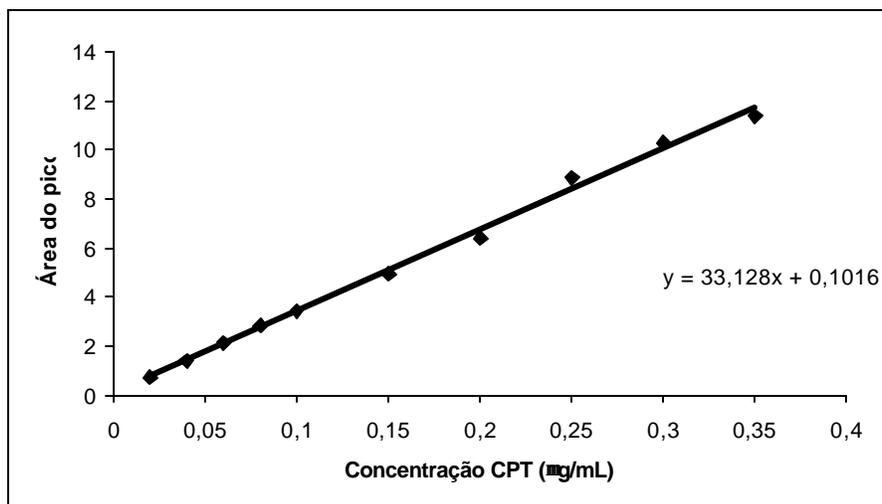


FIGURA 14. Espectro de fluorescência obtido após análise da solução de camptotecina padrão (preto) e amostra (azul) em tampão fosfato pH 7,4 contendo Tween 80 2% (p/V).

TABELA 6. Áreas dos espectros de fluorescência obtidas a partir da camptotecina após análise das soluções por espectrofluorimetria.

Concentração de camptotecina (mg/mL)	Área ± s (n = 3)	CV (%)
0,02	0,71 ± 0,010	1,99
0,04	1,42 ± 0,003	0,24
0,06	2,14 ± 0,004	0,20
0,08	2,82 ± 0,030	1,19
0,10	3,43 ± 0,007	0,20
0,15	4,94 ± 0,007	0,15
0,20	6,38 ± 0,002	0,04
0,25	8,84 ± 0,400	4,51
0,30	10,27 ± 0,120	1,16
0,35	11,39 ± 0,006	0,05

**FIGURA 15.** Curva de calibração de camptotecina obtida por espectrofluorimetria

Com objetivo de validar a curva de calibração, foi realizada a análise de regressão linear. Os parâmetros resultantes desta análise estão demonstrados na Tabela 7. Como pode ser observado nesta tabela, a avaliação do coeficiente de regressão calculado evidenciou a existência de um comportamento linear

significativo. A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança igualmente demonstraram a ausência de erro sistemático constante, uma vez que os valores incluíram o zero. A análise dos resíduos, realizada com os dados da curva de calibração da camptotecina também foi considerada satisfatória uma vez que os valores de resíduos variaram em torno do eixo das abcissas (Figura 16). Desta maneira, a metodologia de doseamento da camptotecina por espectrofluorimetria, adotada para a avaliação dos perfis de liberação, foi considerada aceitável, na faixa de concentração testada.

TABELA 7. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração da camptotecina por espectrofluorimetria.

Parâmetros de Regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	0,1016 (-0,087 a 0,29)
Inclinação da reta (intervalo de confiança)	33,128 (31,45 a 34,8)
Coefficiente de correlação (R^2)	0,9961

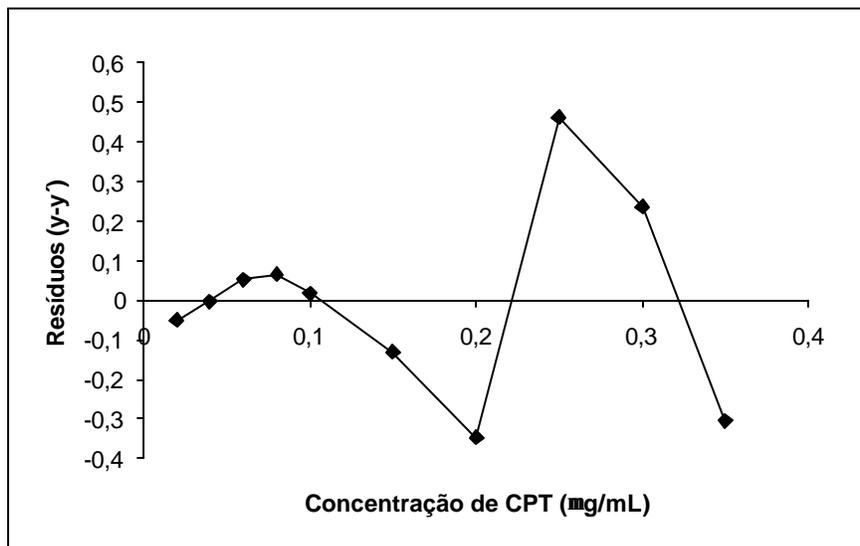


FIGURA 16. Análise dos resíduos da curva de calibração da camptotecina obtida por espectrofluorimetria.

O ensaio de liberação de CPT a partir das amostras foi realizado apenas com as microesferas preparadas com a adição de 15 e 30 mg de fármaco. Aquelas partículas obtidas com a adição de 60 mg de CPT não foram utilizadas para a continuidade do trabalho, devido à elevada quantidade de cristais de fármaco presentes na preparação na forma não encapsulada.

Os resultados obtidos no ensaio de liberação, expressos em percentagem de fármaco liberado *versus* tempo (horas), podem ser visualizados na Figura 17. Para ambas formulações, em torno de 100% do fármaco contido nas microesferas foi liberado após 72 horas de ensaio. No entanto, foram verificadas variações na quantidade de CPT inicialmente liberada, demonstrando um efeito de liberação inicial (efeito *burst*) de 7% e 35% para as microesferas preparadas com 15 mg e 30 mg de CPT, respectivamente.

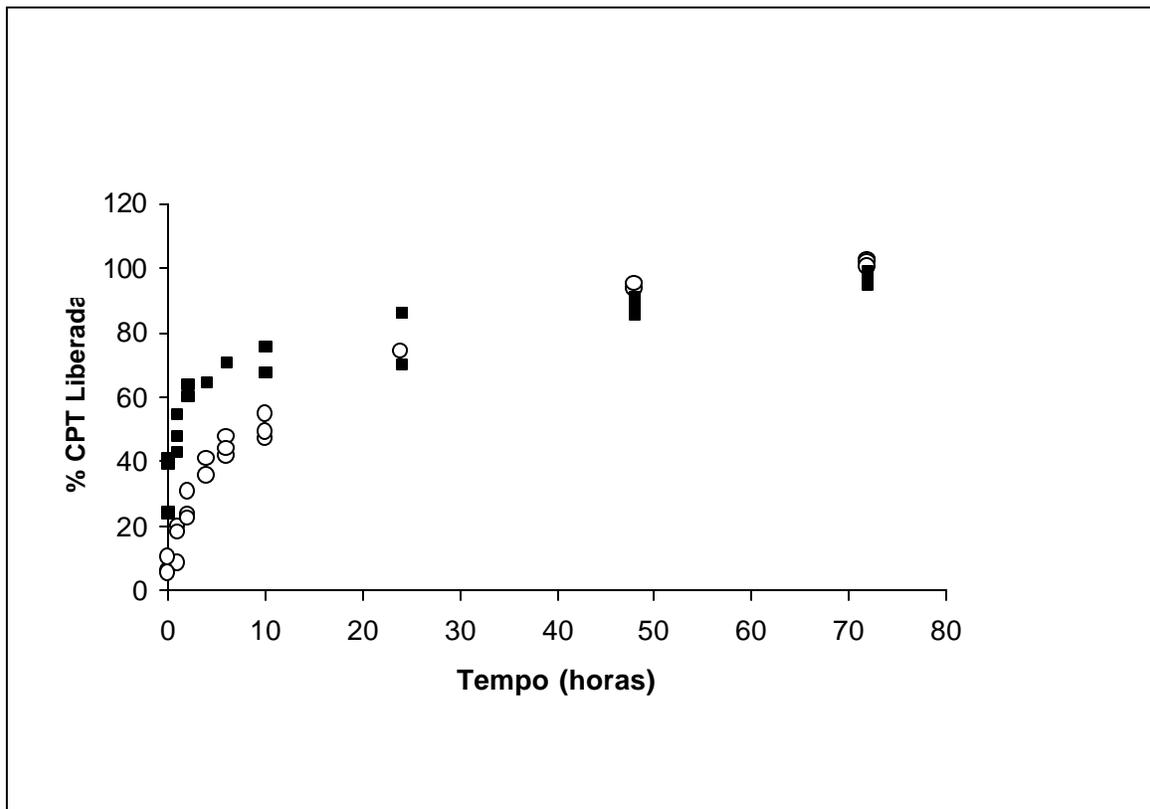


FIGURA 17. Perfis de liberação da CPT a partir das microesferas de PCL em tampão fosfato pH 7,4 contendo Tween 80 2% (p/V): (O) MC15 e (■) MC30.

O efeito *burst* pode ser visto como uma consequência negativa ou como um efeito desejável, principalmente quando há a necessidade da liberação inicial de elevadas concentrações de fármaco para a obtenção do efeito terapêutico. No entanto, uma das dificuldades deste fenômeno é que ele é imprevisível, e mesmo quando é desejável, a quantidade de fármaco liberado inicialmente não pode ser controlada (HUANG e BRAZEL, 2001; WANG *et al.*, 2002).

O aparecimento do efeito *burst* está relacionado a vários fatores. Uma fração do fármaco associado às partículas pode se encontrar na superfície das mesmas, sendo rapidamente dissolvida após o contato com o meio de liberação. Este fenômeno tem sido observado especialmente quando grandes quantidades de fármaco são encapsuladas (BODMEIER e MCGINTY, 1987; WASHINGTON, 1990), ou ainda quando a migração do mesmo para a superfície ocorre durante os procedimentos empregados na secagem das microesferas (HUANG e BRAZEL, 2001). Igualmente, as condições de preparação das micropartículas podem afetar a intensidade do efeito *burst*. Estudos recentes demonstraram que este efeito é mais pronunciado quando baixas quantidades de polímero são empregadas, devido à formação de partículas menos compactas, ou ainda quando eliminação do solvente orgânico da fase interna da emulsão é acelerada, pelo aumento da temperatura ou pela utilização de agentes de extração. Neste último caso, o aumento do efeito *burst* é decorrente do aumento da porosidade das microesferas (HUANG e BRAZEL, 2001).

Sendo assim, uma vez que todos os parâmetros de formulação permaneceram constantes, a maior percentagem de fármaco inicialmente liberada a partir das microesferas preparadas com a adição de 30 mg de CPT pode ser atribuída à presença de cristais de fármaco na superfície das partículas. Este resultado está de acordo com as características da superfície das microesferas visualizadas por MEV (Figura 11).

Segundo descrito na literatura, a PCL sofre um processo degradativo bifásico, de tal modo que na primeira fase se produz uma rápida diminuição do peso molecular deste polímero até um valor de 5000 Da, sem observar-se diminuição na massa da matriz polimérica. Durante essa fase, a degradação é realizada mediante um mecanismo hidrolítico não enzimático das uniões ésteres, autocatalizado pelo ácido carboxílico do grupo terminal. A segunda fase se caracteriza por uma diminuição na velocidade de degradação do polímero e o início da perda da massa da matriz. Esta perda de massa é atribuída à divisão das cadeias poliméricas com conseqüente formação de fragmentos de baixo peso molecular que podem ser solubilizados e se difundir, e à ruptura da matriz levando à formação de partículas de tamanho micrométrico que podem ser fagocitadas (PITT *et al.*, 1981). Foi constatado também que a degradação deste polímero aumenta com a diminuição da cristalinidade das micropartículas. Sendo assim o processo de degradação se localiza preferencialmente nos domínios amorfos e na superfície das mesmas (WOODWARD *et al.*, 1985; WU e GAN, 1998; CHEN e WANG, 2000).

A hidrólise da PCL também pode ser catalisada por ácidos ou por enzimas. Em um estudo verificou-se que em soluções extremamente ácidas, a taxa de erosão do polímero é diretamente proporcional à atividade do íon hidrônio no meio de dissolução. Nas soluções preparadas com ácido perclórico, o íon hidrônio demonstrou ter uma atividade muito maior quando comparada com uma solução de ácido hidrocloreto de mesmo pH (NGUYEN *et al.*, 1986). Por outro lado, estudos têm demonstrado que a taxa de degradação do polímero é aumentada na presença da enzima lipase, sendo em torno de 1000 vezes maior num meio contendo esta enzima do que num meio contendo unicamente água (CHEN e WANG, 2000, CHAWLA e AMIJI, 2002)

Uma vez que a liberação do fármaco a partir de matrizes de PCL pode ser governada tanto por um fenômeno de difusão quanto pela erosão da matriz polimérica, os perfis obtidos foram analisados matematicamente. Para caracterizar

o perfil de liberação dos fármacos a partir de sistemas de liberação, vários modelos matemáticos podem ser utilizados. O modelo de Baker-Lonsdale foi desenvolvido a partir do modelo de Higuchi e descreve a liberação de um fármaco a partir de uma matriz esférica heterogênea por um processo de difusão. Este modelo matemático tem sido utilizado para linearizar resultados de ensaios de liberação de microesferas e microcápsulas, pois estas são consideradas sistemas heterogêneos, uma vez que a cristalinidade da matriz geralmente varia em diferentes sítios da partícula e a presença de cristais de fármaco é freqüentemente visualizada (COSTA e LOBO, 2001; COSTA, 2002).

O modelo de Baker-Lonsdale é descrito como sendo:

$$3/2 [1 - (1 - F)^{2/3}] - F = Kt$$

onde:

F = é a fração de fármaco liberado no tempo t;

K = é a constante de Baker-Lonsdale = $(3DC_s / r^2 Co)$ onde:

D = é o coeficiente de difusão;

Cs = é a solubilidade do fármaco na matriz esférica;

r = raio da microesfera;

Co = concentração inicial do fármaco na matriz esférica.

A Tabela 8 demonstra os dados de regressão obtidos após a aplicação do modelo de Baker-Lonsdale nos perfis de dissolução da CPT.

Tabela 8. Dados de regressão obtidos após aplicação do modelo de Baker-Lonsdale nos perfis de liberação da CPT a partir das microesferas em tampão fosfato pH 7,4.

Formulação (n=3)	R ²	Inclinação da reta	Intercepto
MC15	0,9994	0,0069	0,0013
	0,9978	0,0070	-0,0059
	0,9981	0,0070	-0,0022
MC30	0,8804	0,0043	0,0724
	0,9343	0,0048	0,0519
	0,9120	0,0044	0,0726

Os coeficientes de correlação maiores que 0.99 obtidos para MC15 indicam que a liberação da camptotecina nestas microesferas em tampão fosfato pH 7,4 é governada predominantemente por um fenômeno de difusão. No entanto, baixos valores de coeficiente de correlação foram obtidos, quando o modelo de Banker-Lonsdale foi aplicado para avaliar os perfis de liberação da CPT a partir das microesferas preparadas com a adição de 30 mg de fármaco. Este resultado está provavelmente relacionado ao efeito *burst* mais pronunciado obtido com estas formulações. A liberação da CPT sendo governada por um fenômeno unicamente de difusão foi reforçada após visualização das micrografias obtidas por MEV das partículas, após serem submetidas ao ensaio de dissolução (Figura 18).

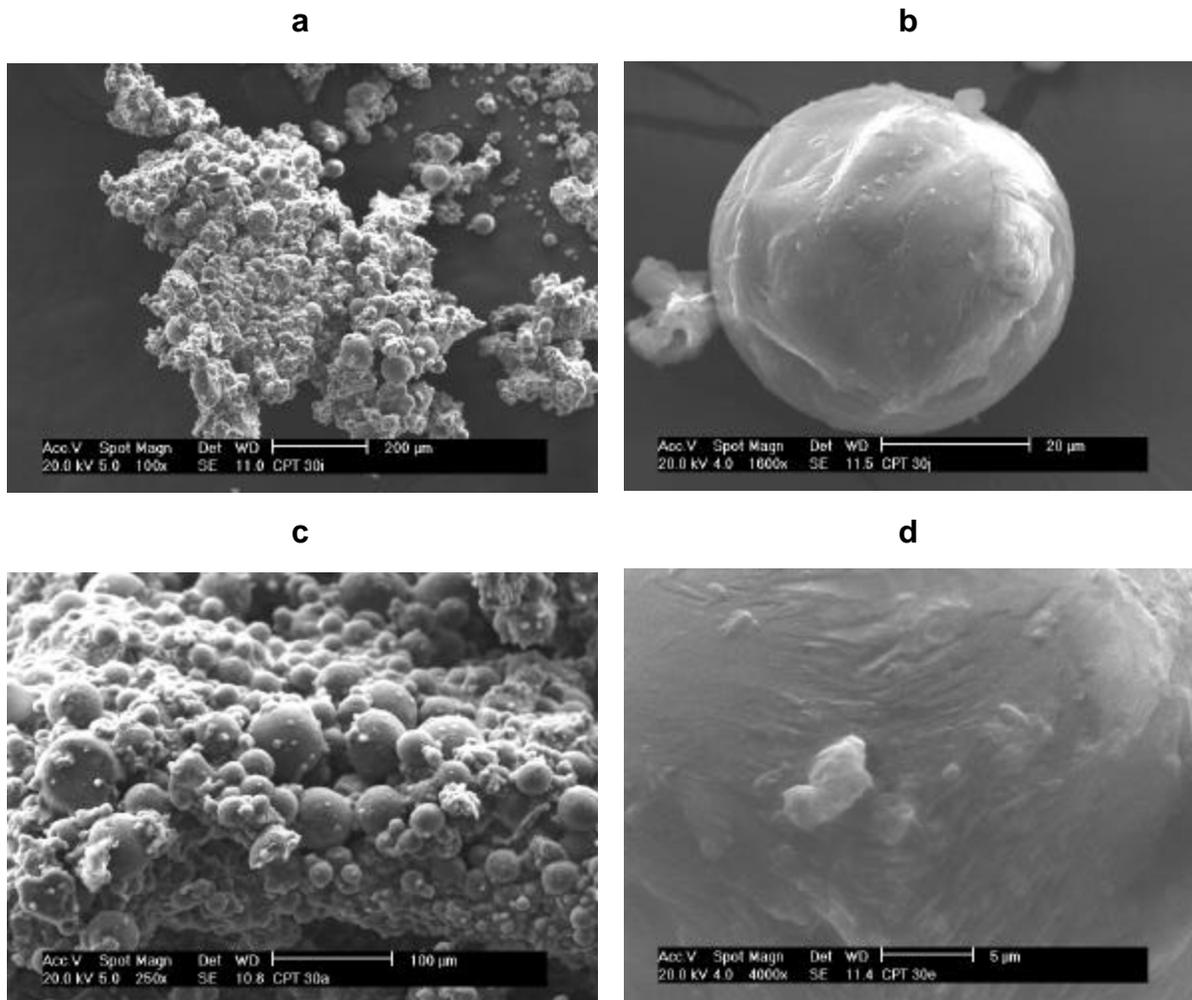


FIGURA 18. Micrografias obtidas por MEV a partir das partículas de poli-ε-caprolactona contendo CPT após a realização dos ensaios de liberação *in vitro*.

Como pode ser observado, as microesferas mantiveram a sua estrutura esférica intacta após 72 horas de ensaio de liberação em tampão fosfato pH 7,4. Entretanto não pode ser descartado o aumento da velocidade de liberação da CPT *in vivo* a partir das microesferas, produzido pela degradação do polímero na presença de enzimas

4.5 Avaliação da eficácia terapêutica das microesferas de camptotecina

A eficácia terapêutica das microesferas contendo camptotecina foi avaliada empregando-se um modelo de melanoma murino. Nestes ensaios, foi utilizada a linhagem de células B16-F10 de alto poder metastático, desenvolvida a partir das células B16-F0. Para a obtenção da linhagem B16-F10, as células de melanoma murino B16-F0 foram injetadas por via intravenosa em camundongos e, após 2 a 3 semanas, as colônias destas células presentes nos pulmões foram removidas, formando uma nova cultura denominada B16-F1. Este procedimento foi repetido sucessivamente até a formação das células B16-F10, capazes de produzir significativamente mais metástases pulmonares do que a linhagem inicial. Este aumento no número de metástases proporcionado pelas células B16-F10 está relacionado com a seleção de clones, que resultam num maior número de metástases pulmonares por célula de melanoma injetada do que as células B16-F1 (RUDDON, 1995).

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

Entretanto, devido à variação do número de células inoculadas por camundongo e dos diferentes períodos utilizados para a realização dos ensaios descritos na literatura, bem como a utilização de camundongos não isogênicos pelo biotério da UFSC, um estudo preliminar foi realizado para otimizar as condições dos ensaios *in vivo*. Além disso, a dose de camptotecina a ser administrada nos animais e a formulação de microesferas (MC15 ou MC30) foram previamente selecionadas.

4.5.1 Ensaio preliminares

Os resultados obtidos na avaliação preliminar do número de células a serem inoculadas e da duração dos experimentos, realizado conforme descrito em 3.2.3.2.1, podem ser observados na Tabela 9. Neste estudo, o número de metástases pulmonares produzidas foi determinado após a inoculação de duas concentrações de células e em função da duração do ensaio.

Tabela 9. Resultados obtidos na avaliação do tempo de duração do ensaio *in vivo* e do número de células B16-F10 a serem inoculadas.

Tempo (dias)	Número de metástases (média)	
	5 x 10 ⁴ (células)	1 x 10 ⁵ (células)
13	10	8
15	22	Nd**
19	31,5	Nd**
22	40	Nd**
25	63	Nd**

**Nd = não determinado

Conforme demonstrado na Tabela 9, com utilização de 1x10⁵ células, o número de metástases pulmonares não pode ser estimado, pois a partir do 15º dia, os pulmões apresentavam coloração escura e os pontos de metástases não puderam ser identificados, devido a uma necrose maciça, com focos

hemorrágicos, do tecido pulmonar. Com base nestes resultados, o número de células utilizadas para a realização dos ensaios *in vivo* posteriores, foi de 5×10^4 células por animal. Adicionalmente, entre o 22º e o 25º dia após a inoculação das células ocorreu à formação de um elevado número de metástases pulmonares, e por esta razão a duração dos ensaios foi mantida entre estes dias.

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

Uma vez que nos ensaios de liberação *in vitro*, foram observadas diferenças na quantidade de fármaco inicialmente liberada (efeito *burst*) a partir das microesferas preparadas com 15 mg e 30 mg de CPT, seria interessante avaliar se este efeito era desejável para a obtenção da atividade antitumoral. Assim, ambas formulações de microesferas foram previamente testadas. Além disso, nos estudos de liberação foi demonstrado que a camptotecina é quase que completamente liberada a partir das microesferas de PCL, após 72 horas. Assim, a dose de 7 mg/Kg foi selecionada, pois forneceria uma concentração plasmática terapêutica do fármaco durante três dias, após a administração das microesferas. A administração da CPT livre na dose de 10 mg/Kg foi igualmente testada no intuito de avaliar o efeito terapêutico desta concentração fármaco.

A Figura 19 demonstra os resultados obtidos nos ensaios preliminares para a seleção da dose da CPT, bem como da formulação de microesferas. Como pode ser visualizado nesta figura, houve uma diminuição no número de metástases em todos os grupos tratados, sendo que a eficácia terapêutica das microesferas

contendo camptotecina pareceu ser equivalente àquela do fármaco livre. Quando os resultados obtidos com as microesferas MC15 e MC30 são comparados, aparentemente não são observadas diferenças na capacidade de inibir a disseminação do tumor. Desta maneira, pode ser sugerido que o efeito *burst* observado nos estudos de liberação *in vitro* da camptotecina a partir de MC30 não produz melhorias na eficácia desta formulação. Entretanto o maior teor de CPT presente em MC30 justifica a sua escolha para a realização dos estudos *in vivo* posteriores.

A administração de camptotecina em doses de 7 mg/kg ou de 10 mg/kg conduziu à redução do número de metástases pulmonares, não tendo sido observado diferenças no efeito produzido quando os resultados são comparados. Além disso, no grupo que recebeu a dose mais alta de fármaco, um camundongo não sobreviveu até o final dos experimentos e outros três apresentaram um peso muito inferior em relação ao peso dos camundongos do grupo controle. Desta maneira, a mais elevada dose poderia estar sendo tóxica para os animais e por isso a administração de 7 mg/Kg pareceu ser mais adequada.

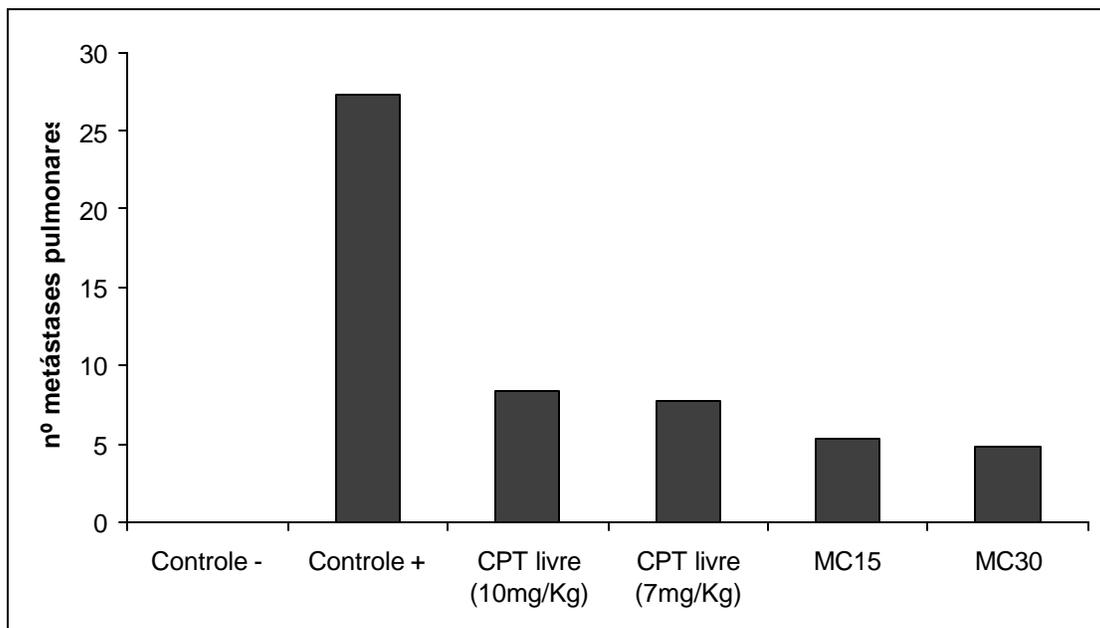


FIGURA 19. Resultados da avaliação do protocolo de administração e da dose de fármaco utilizado no teste preliminar de metástase em pulmões.

4.5.2 Ensaios de metástase em pulmões

O ensaio de metástase em pulmões foi realizado conforme descrito em 3.2.3.3. Este ensaio teve por objetivo comparar a eficácia terapêutica das microesferas de camptotecina com o fármaco livre, ambos administrados sob a forma de suspensões por via intraperitoneal, na dose de 7 mg/Kg. A duração do experimento foi de 24 dias.

Na Figura 20 encontra-se demonstrado a fotografia dos pulmões dos camundongos após a realização do ensaio de metástase em pulmões.

FIGURA 20. Fotografia dos pulmões dos camundongos após a realização do ensaio. (a) Controle negativo, (b) controle positivo, (c) MB protocolo a cada 3 dias, (d) MB a cada 5 dias, (e) CPT livre a cada 5 dias, (f) MC30 a cada 3 dias e (g) MC 30 a cada 5 dias.

Além disso, foram testados dois protocolos de administração para o fármaco livre e para as microesferas, sendo o primeiro, a cada 3 dias e o outro a cada 5 dias. A realização dos ensaios utilizando dois protocolos diferentes permitiria comparar o efeito produzido *in vivo* em função do intervalo de administração do medicamento. Se protocolos usando intervalos maiores entre cada administração pudessem ser seguidos, a dose total de fármaco seria mais baixa e, conseqüentemente, seria obtida uma redução dos efeitos colaterais indesejáveis.

Os resultados de atividade antitumoral obtidos após administração da camptotecina livre e encapsulada em microesferas de PCL, assim como o número de óbitos e a variação do peso do animal no final dos experimentos, podem ser visualizados na Tabela 10.

Conforme observado nesta tabela, o número de metástases pulmonares foi significativamente reduzido após a administração da CPT livre, quando esta foi administrada em intervalos de 5 dias, e após administração de MC30 em ambos protocolos, quando comparados com o número de metástases produzidas nos

animais utilizados como controle positivo. Além disso, a eficácia antitumoral foi similar nos grupos tratados com as microesferas, utilizando-se ambos protocolos de administração, bem como no grupo tratado com a CPT livre, administrada a cada 5 dias. Devido à toxicidade do fármaco, demonstrada pela alta taxa de mortalidade no grupo de camundongos que recebeu a CPT livre a cada 3 dias, não foi possível avaliar o número de metástases pulmonares nestes animais.

TABELA 10. Atividade antitumoral da CPT e MC30 em modelo de melanoma murino de alto poder metastático.

	Dose Total de CPT (mg/Kg)	Protocolo de administração	Número de metástases pulmonares (M ± s)	Número de óbitos ^(a)	Varição do peso (; M ± s) ^(b)
C -	-	-	0	0	103,26 ± 6,14
C +	-	-	22,38 ± 4,34	0	102,70 ± 9,48
MB	-	a cada 3 dias	20,35 ± 4,30	0	96,20 ± 5,86
MB	-	a cada 5 dias	18,63 ± 3,50	0	96,82 ± 7,31
CPT	35	a cada 3 dias	Nd ^(c)	8	Nd ^(c)
CPT	28	7 mg de CPT a cada 5 dias	7,50 ± 1,69 ^{i i i}	0	81,97 ± 8,40 ^{***}
MC30	35	7 mg de CPT a cada 3 dias	6,37 ± 1,77 ^{i i i}	0	85,49 ± 9,90 ^{***}
MC30	28	7 mg de CPT a cada 5 dias	6,50 ± 3,12 ^{i i i}	0	97,37 ± 4,09

A significância estatística foi avaliada pela ANOVA seguida do *posthoc* de Bonferoni: *** p < 0,001 vs controle positivo e negativo, p < 0,001^{i i i} vs controle positivo.

^(a) Número total de óbitos após 24 dias de tratamento.

^(b) Determinado em relação ao peso inicial do animal, após 24 dias de tratamento.

^(c) Nd - Não determinado devido ao óbito de todos os animais do grupo.

Uma vez que nos estudos preliminares foi visualizada uma redução no peso dos camundongos tratados com a CPT livre, o peso dos animais de todos os grupos testados foi determinado ao longo deste experimento. A variação de peso dos animais dos grupos controles, bem como dos grupos que receberam o fármaco livre e as microesferas MC30 encontra-se demonstrada nas Figuras 21 e 22. O percentual de variação de peso obtido no final dos ensaios pode ser observado na Tabela 10.

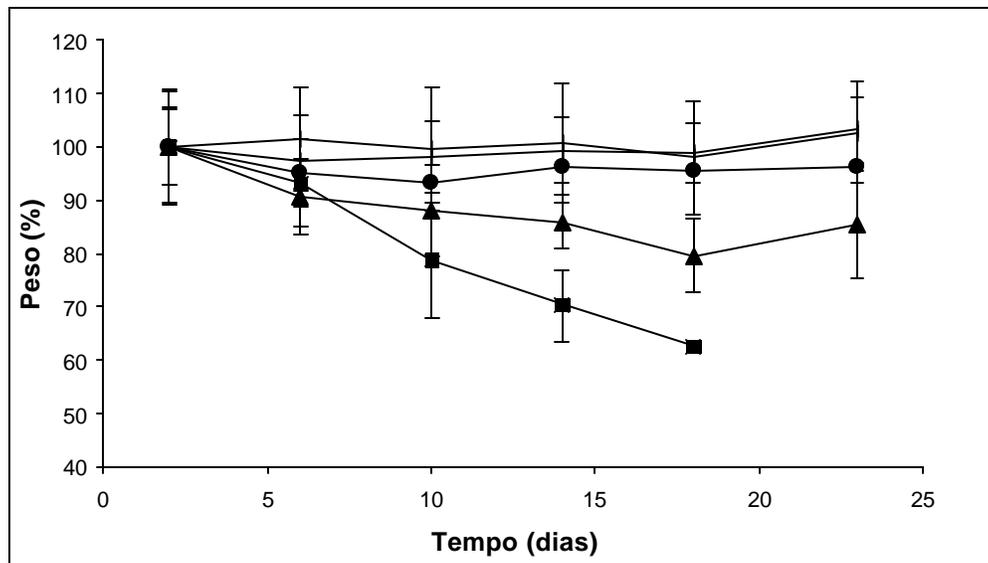


FIGURA 21. Avaliação da perda de peso dos camundongos tratados com o protocolo de administração a cada 3 dias durante o ensaio de metástase em pulmões. Controle negativo (◆), controle positivo (◇), microesferas brancas (●), camptotecina livre (■), microesferas MC30 (▲).

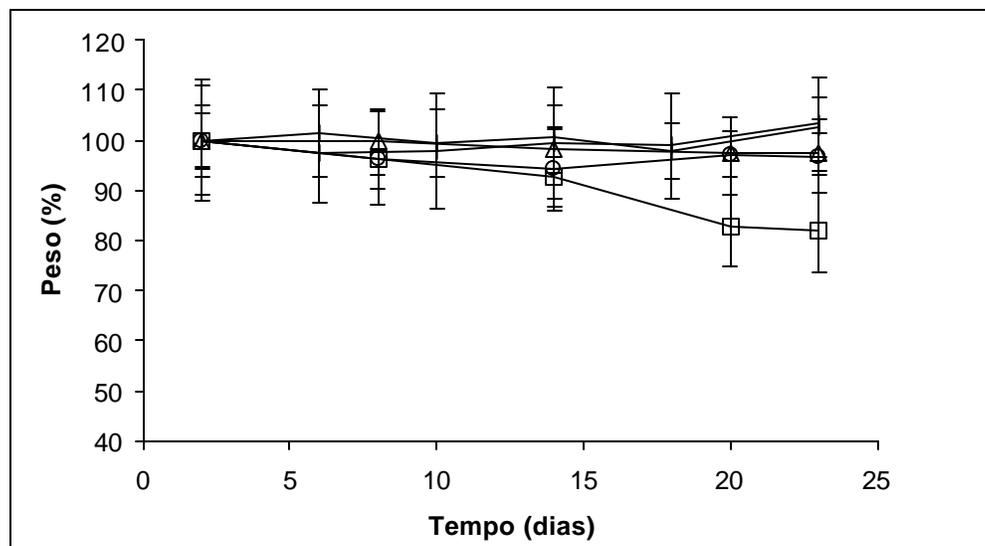


FIGURA 22. Avaliação da perda de peso dos camundongos tratados com o protocolo de administração a cada 5 dias durante o ensaio de metástase em pulmões. Controle negativo (◆), controle positivo (◇), microesferas brancas (◐), camptotecina livre (◻) e microesferas MC30 (△).

O peso dos animais dos grupos controles e daqueles que receberam as microesferas brancas (sem adição de CPT) não variou durante os ensaios, para ambos protocolos de administração. Os camundongos que receberam as microesferas de camptotecina (MC30) a cada 3 dias, bem como aqueles que receberam o fármaco livre a cada 5 dias tiveram uma perda de peso significativa, quando comparado com os grupos controles. Em contrapartida, a administração de MC30 em intervalos de 5 dias não provocou a perda de peso nos animais (Tabela 9). Adicionalmente, o grupo de camundongos que recebeu a camptotecina não encapsulada a cada três dias, apresentou um quadro de diarreia severa e não sobreviveu até o final dos ensaios.

Assim, o protocolo de administração a cada cinco dias pareceu ser menos tóxico para os animais. Além disso, mesmo que o peso dos animais tratados com as microesferas MC30 a cada 3 dias tenha diminuído significativamente, neste grupo não ocorreu nenhum óbito. Desta maneira, pode ser constatado que para ambos protocolos de administração há uma diminuição da toxicidade do fármaco quando este se encontra encapsulado nas microesferas de PCL.

4.5.3 Ensaios de toxicidade

Durante os ensaios *in vivo* foram observados casos de toxicidade, como perda de peso e diarreia, além da elevada mortalidade dos animais tratados com o fármaco livre. SLICHENMEYER e VON HOFF (1990) demonstraram que a toxicidade da camptotecina é dependente do protocolo e da via de administração do fármaco e evidenciaram que a mielossupressão ocasionada principalmente pela neutropenia severa foi o efeito tóxico dose limitante para a maioria dos protocolos testados, mas muitos outros distúrbios, tais como cistite hemorrágica, trombocitopenia e diarreia, foram também observados.

Com objetivo de comparar a toxicidade produzida pela administração da camptotecina na forma livre e encapsulada nas microesferas de PCL, foram realizados ensaios de toxicidade, conforme descrito em 3.2.3.4. Nestes estudos, a dosagem de ácido úrico e creatinina, bem como os hemogramas dos animais foram avaliados.

O ácido úrico e a creatinina são parâmetros que avaliam a atividade renal. A creatinina é eliminada do plasma por filtração glomerular e não é reabsorvida nos túbulos em grau significativo e o ácido úrico é filtrado pelos glomérulos e reabsorvido pelos túbulos em proporção de aproximadamente 90%. Uma elevação da taxa normal desses dois componentes tem particular interesse no prognóstico dos quadros de insuficiência renal (MILLER, 1984; NELSON e HENRY, 1999). A Tabela 11 demonstra os valores plasmáticos de ácido úrico e creatinina dos camundongos no último dia do ensaio de metástase em pulmões.

TABELA 11. Valores de creatinina e ácido úrico obtidos após tratamento dos animais com CPT e MC30.

Dose Total de CPT (mg/Kg)	Protocolo de administração	Creatinina (mg/dL; M ± s)	Ácido úrico (mg/dL; M ± s)
------------------------------	-------------------------------	------------------------------	-------------------------------

C -	-	-	0,40 ± 0,05	3,05 ± 0,68
C +	-	-	0,45 ± 0,06	2,17 ± 0,86
MB	-	a cada 3 dias	0,41 ± 0,02	2,40 ± 0,62
MB	-	a cada 5 dias	0,44 ± 0,04	3,60 ± 0,75
CPT	35	a cada 3 dias	Nd ^(a)	Nd ^(a)
CPT	28	7 mg de CPT a cada 5 dias	0,37 ± 0,04	2,92 ± 1,44
MC30	35	7 mg de CPT a cada 3 dias	0,35 ± 0,02	3,4 ± 0,26
MC30	28	7 mg de CPT a cada 5 dias	0,39 ± 0,06	3,32 ± 0,62
Valor Ref.			0,30 -1,0	-

A significância estatística foi avaliada pela ANOVA seguida do *posthoc* de Bonferroni.

^(a) Nd - Não determinado devido ao óbito de todos os animais do grupo.

Como podem ser observados, os valores de creatinina e ácido úrico obtidos tanto para o fármaco livre como para as microesferas MC30 nos dois protocolos testados, não diferiram significativamente dos valores obtidos para os animais dos grupos controles, indicando neste caso, que os camundongos não apresentaram insuficiência renal induzida pela camptotecina.

No hemograma, vários parâmetros são avaliados. As hemáceas ou eritrócitos são os mais numerosos elementos do sangue e servem como veículo para a hemoglobina que possui a função de transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos e dióxido de carbono no sentido inverso (FAILACE, 2003). O valor do hematócrito ou volume globular reflete a massa total de células na unidade de volume do sangue. Entre os índices eritrocíticos, o volume corpuscular médio (VCM) refere-se ao volume médio dos eritrócitos, sendo estimado a partir dos resultados obtidos no hematócrito e na contagem de eritrócitos, e a hemoglobina corpuscular média (HCM) corresponde ao conteúdo de hemoglobina do eritrócito médio e é calculado a partir da concentração de hemoglobina e do número de

eritrócitos. A concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) corresponde à concentração de hemoglobina num dado volume de eritrócitos compactados sendo calculada a partir da concentração de hemoglobina e do hematócrito e o RDW representa o coeficiente de anisocitose dos eritrócitos, ou seja, o coeficiente de variação do tamanho dos eritrócitos. Todos esses parâmetros estão classificados dentro da série vermelha do hemograma e são muito utilizados no estudo de todos os tipos de anemias (LEE, 1998; BEUTLER, 2001).

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

As plaquetas contribuem para a hemostasia, principalmente pela propriedade que possuem de aglutinar e aderir a rupturas vasculares, tamponando a ferida, ao mesmo tempo em que liberam substâncias de ação vasoconstritora. A deficiência do número de plaquetas é conhecida por trombocitopenia e caracteriza uma maior propensão a casos de hemorragias (LEE, 1998; BEUTLER, 2001).

Os resultados dos hemogramas dos animais estão demonstrados na Tabela 12. A diminuição significativa do número de hemácias, do teor de hemoglobina e do hematócrito nos grupos que receberam o fármaco livre e as microesferas MC30, conforme visualizado nesta tabela, parece estar relacionada com algum tipo de toxicidade induzida pela camptotecina e não pelo tumor, pois o controle positivo não apresentou uma redução desses elementos. Também foi observada, uma elevação do número de plaquetas (trombocitose) ao invés de uma

trombocitopenia, como era esperado após a administração de camptotecina. No entanto, a trombocitose também foi verificada após a administração das microesferas brancas, podendo ser sugerido que este efeito ocorreu devido à administração intraperitoneal do fármaco e das partículas em suspensão, com conseqüente produção de um processo inflamatório.

Por outro lado, o número de neutrófilos não diferiu estatisticamente em todos os grupos de camundongos, possivelmente devido a grande variação de dados encontrada para análise deste parâmetro. No entanto, se os valores obtidos forem comparados com o valor de referência, a neutropenia foi evidenciada apenas no grupo de camundongos tratado com a camptotecina livre. Nos grupos que receberam as microesferas MC30 este efeito não foi constatado, indicando uma diminuição da toxicidade hematológica quando as microesferas de camptotecina foram administradas. Essa diminuição está provavelmente relacionada com a liberação prolongada do fármaco proporcionada pelas microesferas. Estes sistemas de liberação possuem a característica de diminuir a flutuação dos níveis plasmáticos do fármaco, prevenindo desta maneira o desenvolvimento de efeitos secundários indesejáveis (BERROZPE e FERRER, 1998).

TABELA 12. Resultados obtidos nos hemogramas após tratamento dos animais com CPT e MC30.

	Valores de referência	Controle (-)	Controle (+)	MB ^(a)	MB ^(b)	CPT ^(a)	CPT ^(b)	MC30 ^(a)	MC30 ^(b)	
Eritrócitos										
Hemácias (milhões/mm ³)	7,0 -12,5	8,12 ± 0,53	8,21 ± 0,76	8,74 ± 0,30	8,51 ± 0,28	Nd ^(c)	7,15 ± 1,03*	7,25 ± 0,34*	6,96 ± 0,44*	
Hemoglobina (g/dL)	10,2 -16,6	13,73 ± 0,66	14,07 ± 0,79	14,46 ± 0,73	14,50 ± 0,66	Nd ^(c)	11,13 ± 1,20*	12,87 ± 0,57*	10,45 ± 2,04*	
Hematócrito (%)	39 - 49	40,96 ± 3,36	41,22 ± 3,80	42,73 ± 1,55	42,80 ± 2,80	Nd ^(c)	34,73 ± 4,62*	36,45 ± 1,80*	31,82 ± 4,28*	
VCM (fl)	-	50,43 ± 1,72	50,20 ± 0,74	48,87 ± 0,60	50,30 ± 2,78	Nd ^(c)	48,70 ± 0,89	50,32 ± 1,40	45,52 ± 3,64	
HCM (Pg)	-	16,90 ± 0,26	17,20 ± 0,87	16,53 ± 0,55	17,05 ± 1,16	Nd ^(c)	15,60 ± 0,62	17,80 ± 0,71	14,92 ± 2,38	
CHCM (g/dL)	-	33,60 ± 1,40	34,22 ± 1,77	33,87 ± 1,55	33,95 ± 1,99	Nd ^(c)	32,13 ± 0,80	35,32 ± 0,86	32,65 ± 3,17	
RDW (%)	-	22,03 ± 0,45	22,82 ± 1,05	22,57 ± 0,87	22,65 ± 0,39	Nd ^(c)	24 ± 1,65	24,72 ± 0,46	24,15 ± 2,59	
Leucócitos										
Leucócitos (mm ³)	6000 - 15000	10133,33 ± 1556,70	9100 ± 4573,11	9733,33 ± 2968,3	9675 ± 3525,50	Nd ^(c)	8266,67 ± 3074,63	10825 ± 5483,54	7112,50 ± 2172,7	
Neutrófilos (%)	10 -40	17 ± 7,07	15,75 ± 6,30	24,66 ± 13,58	25,50 ± 15,02	Nd ^(c)	2,33 ± 2,52	24,33 ± 10,41	13,25 ± 7,80	
Eosinófilos (%)	0 - 4	0	1	0	0	Nd ^(c)	0	0	0	
Linfócitos (%)	55 - 95	85,66 ± 8,02	82,25 ± 7,09	74,6 ± 14,15	73,75 ± 14,93	Nd ^(c)	97,33 ± 2,08	79,75 ± 12,58	86,50 ± 8,22	
Monócitos (%)	0,1 - 3,5	1,5 ± 0,7	2,33 ± 1,15	2	1	Nd ^(c)	1	1	1	
Plaquetas	Contagem (x10⁶, mm³)	0,8 - 1,1	1,01 ± 0,07	1,11 ± 0,13	1,49 ± 0,20	1,35 ± 0,22	Nd ^(c)	1,82 ± 0,23	1,7 ± 0,04	1,8 ± 0,16

A significância estatística foi avaliada pela ANOVA seguida do *posthoc* de Bonferoni: * p < 0,05 vs controle positivo

^(a) Protocolo de administração a cada 3 dias e dose total de 35 mg/Kg de CPT.

^(b) Protocolo de administração a cada 5 dias e dose total de 28 mg/Kg de CPT.

^(c) ND – Não determinado

- A preparação de microesferas de poli- ϵ -caprolactona contendo camptotecina, pela técnica de emulsificação/extração do solvente, mostrou-se viável empregando-se diclorometano e água como solventes da fase interna e externa, respectivamente e etanol como agente extrator;
- A técnica empregada conduziu a obtenção de partículas esféricas, com superfície rugosa, apresentando diâmetro entre alguns até uma centena de micrômetros para todas as formulações testadas.
- A presença de cristais foi visualizada na superfície das partículas, quando 30 e 60 mg de fármaco foram adicionados, sugerindo que, nestes casos, uma fração do mesmo encontra-se distribuída na forma sólida nas microesferas.
- A eficiência de encapsulação da CPT se manteve em torno de 81% em todas as preparações devido à maior afinidade deste fármaco hidrofóbico pela fase interna da emulsão do que pela água. Por outro lado, o teor de fármaco nas microesferas MC15, MC30 e MC60 de 1,17, 2,37 e 4,6 mg/100mg, respectivamente, demonstra um aumento de teor de fármaco nas microesferas proporcional ao aumento da quantidade de camptotecina inicialmente adicionada às formulações.
- Perfis de liberação da CPT demonstrou que em torno de 100% do fármaco contido nas microesferas de PCL foi liberado após 72 horas de ensaio. No entanto, foram verificadas variações na quantidade de CPT inicialmente liberada, demonstrando um efeito de liberação inicial (efeito *burst*) de 7% e 35% para as microesferas preparadas com 15 mg e 30 mg de CPT, respectivamente. O efeito *burst* pode ser associado à presença de cristais do fármaco na superfície das partículas.
- A aplicação do modelo de Banker-Lonsdale no perfil de liberação da CPT a partir de MC15, em tampão fosfato pH 7,4, indicou que a liberação deste

fármaco é governada predominantemente por um fenômeno de difusão. Entretanto um desvio deste modelo foi observado quando o perfil de liberação da CPT a partir de MC30 foi avaliado, tendo sido relacionado ao pronunciado efeito burst obtido com esta formulação. A liberação da CPT por difusão foi reforçada após visualização da estrutura esférica intacta das partículas, após a realização do ensaio de liberação, nas micrografias obtidas por MEV.

- A inoculação de 5×10^4 células nos camundongos e a duração do ensaio entre 22 e 25 dias foram consideradas satisfatórias para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, devido a produção de um número adequado de metástases pulmonares passíveis de serem contadas.
- Não foram observadas diferenças na capacidade de inibir a disseminação do tumor quando MC15 e MC30 foram administradas em camundongos, e, portanto, as diferenças observadas na intensidade do efeito *burst* não pareceram influenciar na obtenção do efeito terapêutico.
- A administração da camptotecina livre em intervalos de três dias e de MC30 em intervalos de três e de cinco dias conduziu à redução significativa do número de metástases pulmonares.
- Foi observada a perda de peso dos animais tratados com CPT livre em intervalos de três e cinco dias e com MC30 em intervalos de três dias. A perda de peso não foi observada nos animais que receberam MC30 a cada 5 dias. Adicionalmente, a percentagem de óbitos foi 100% e um quadro de diarreia foi observado nos animais que receberam a CPT livre a cada 3 dias. Entretanto, não ocorreram mortes de animais quando MC30 foi administrada em ambos protocolos. Estes resultados indicaram a menor toxicidade do fármaco quando este se encontra encapsulado nas microesferas.

- Não foi verificada insuficiência renal induzida pela camptotecina em todos os grupos de animais, através da avaliação do teor de creatinina e ácido úrico no plasma.
- A análise dos hemogramas dos camundongos evidenciou a presença de neutropenia apenas no grupo tratado com a camptotecina livre em intervalos de 5 dias, indicando a redução da toxicidade hematológica quando as microesferas de camptotecina foram administradas.
- A administração de microesferas de camptotecina demonstrou eficácia similar à do fármaco livre, mas foi mais segura devido à redução dos efeitos tóxicos. Estes resultados podem ser relacionados ao perfil liberação prolongada do fármaco nas microesferas.

- ALBERTS, B.(Ed). **Molecular Biology of the cell**. 3º ed. New York: Garland Publishing, 1994.
- ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. Undersulfation of proteoglycans reduces the proliferation of leukemia cell *in vitro*. **Brazilian Journal of Medical Research**, v. 29, p. 1239-1242, 1996.
- ANELLI, A.; ANELLI, T. Fundamentos em quimioterapia antineoplásica. In: AYOUB, A.; FRIAS, M.; BARROS, M.; KOBAYASHI, R. **Bases da Enfermagem em Quimioterapia**. São Paulo: LEMAR, 2000. p. 35-54.
- AYOUB, A.; FRIAS, M. Preparo e administração de drogas antineoplásicas. In: AYOUB, A.; FRIAS, M.; BARROS, M.; KOBAYASHI, R. **Bases da Enfermagem em Quimioterapia**. São Paulo: LEMAR, 2000. p.201-221.
- BATYCKY, R.P.; HANES, J.; LANGER, R.; EDWARDS, D.A. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 86, nº 2, p.1464-1477, 1997.
- BEIJNEN, J.H.; ROSING, H.; HUININK, W.; PINEDO, H. High-performance liquid chromatographic analysis of the antitumor drug camptothecin and its lactone ring-opened form in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 617, p. 111-117, 1993.
- BENOIT, J., MARCHAIS, H., ROLLAND, D. H., VELDE, V. Biodegradable microspheres: Advances in Production Technology. In: BENITA, S. **Microencapsulation methods and industrial applications**. New York: Marcel Dekker, INC, 1996.p. 35-73.
- BERMAN, R.S.; PORTERA, C.A.; ELLIS, L.M. Biology of liver metastases. **Cancer Treat. Res.**, v. 109, p. 183-206, 2001.
- BERROZPE, J. D.; FERRER, E. E. Preparados orales de cesión modificada: cinética. IN: BERROZPE, J.D.; LANAO, J. M.; DELFINA, J.M.P. **Biofarmácia y Farmacocinética**. v.2. Madrid: Editorial Síntesis S.A, 1998.
- BEUTLER, E. (Ed). **Williams Hematology**. 6º ed. New York:McGraw-Hill, 2001.
- BODMEIER, R.; MCGINTY, J.W. The preparation and evaluation of drug-containing poly(dl-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method. **Pharmaceutical Research**, v.4, p.465-471, 1987.
- BURKE, T. G.; MUNSHI, C. B.; MI, Z.; JIANG, Y. The important role of albumin in determining the relative human blood stabilities of the Camptothecin anticancer drugs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 84, p.518-519, 1995.
- BURKE, T. G.; MI, Z. The structural basis of camptothecin interactions with human serum albumin: Impact on drug stability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 40-46, 1994.

- CHAWLA, J.; AMIJI, M. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p.127-138, 2002.
- CHEN, D.; WANG, B. Policaprolactone microparticles and their biodegradation. **Polymer degradation and establiity**, v.67, p.455-459, 2000.
- CHIRIVI, R.; GAROFALO, A.; CRIMMIN, M. J.; BAWDEN, L.; STOPPACCIARO, A.; BROWN, P. D.; GIAVAZZI, R. Inhibition of the metastatic apread and Growth of B16-BL6 murine melanoma by Synthetic matrix mettalloproteinase inhibitor. **International Journal of Cancer**, v. 58, p. 460-464, 1994.
- COLBERN, G.T.; DYKES, D.J.; ENGBERS, C.; MUSTERER, R.; HILLER, A.; PEGG, E.; SAVILLE, R.; WENG, S.; LUZZIO, M.; USTER, P.; AMANTEA, M.; WORKING, P.K. Encapsulation of the topoisomerase I inhibitor GL147211C in STEALTH liposomes: pharmacokinetics and antitumor activity in HT29 colon tumor xenografts. **Clinical Cancer Research**, v. 4, p. 3077-3082, 1998.
- CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; MAIETTI., E.; MENEGATTI.; NASTRUZZI, C. Formulation study for antitumor drug camptothecin: lipossomes, micellar solutions and microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 159, p. 95-103, 1997.
- CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Lipossomes, micelles and microemulsions as new delivery systems for cytotoxic alkaloids. **PSTT**, v. 2, n° 7, p. 288-298, 1999.
- COSTA, P. Avaliação *in vitro* da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**, v. 38, p. 142-153, 2002.
- COSTA, P.; LOBO, J. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 13, p. 123-133, 2001.
- DEY, J.; WARNER, I.M. Excited state tautomerization of camptothecin in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.101, p.21-27, 1996.
- DEY, J.; WARNER, I.M. Spectroscopic and photophysical studies of the anticancer drug: Camptothecin. **Journal of Luminescence**, v. 71, p. 105-114, 1997.
- ELLIS S.; CAPUCO, A. Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. **Tissue Cell**, v. 34, p.155, 2002.
- ELLIS, S.; PURUP, S.; SEIRSEN, K.; AKERS, M. Growth and morphogenesis of epithelial cell organoids from peripheral and medial mammary parenchyma of prepubertal heifers. **J. Dairy Sci.**, v.83, p.952-961, 2000.
- ELFICK, A. Poli(ϵ -caprolactone) as a potencial material for a temporary joint spacer. **Biomaterials**, v. 23, p.4463-4467, 2002.

- EMERSON, D. L. Liposomal delivery of camptothecins. **PSTT**, v.3, p. 205-209, 2000.
- ERTL, B. 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.
- FAILACE, R. **Hemograma**. 4^o ed. Porto Alegre: ARTMED, 2003.
- FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, v.24, n^o 11, p.979-993, 1998.
- FIDLER, I.J. Origin and biology of cancer metastasis. **Cytometry**, v.10, p. 673-680, 1989.
- FUNCK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie**. Weinheim: VHC, 1992.
- GARCIA-CARBONERO, R.; SUPKO, J. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins, **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 641-661, 2002.
- GLAXO SMITHKLINE. **Material safety datasheet of HICANTIN invetable**. USA, 2002.
- HATEFI, A.; AMSDEN, B. Camptothecin delivery methods. **Pharmaceutical Research**, v.19, p.1389-1399, 2002.
- HSIANG, Y. –H.; HERTZBERG, R.; HECHT, S.; LIU, L. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 14873-14878, 1985.
- HUANG, X.; BRAZEL, C. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v.73, p. 121-136, 2001.
- INCA – Ministério da Saúde. Câncer. Disponível em:
<<http://www.inca.gov.br/cancer/cancer.html>>. Acesso: Março de 2003.
- IYER, L.; RATAIN, M. J. Clinical pharmacology of camptothecins. **Cancer Chemotherapeutic Pharmacology**, v. 42, p.31-43, 1998.
- KAUFFMAN, E.C. Metastasis suppression: the evolving role of metastasis suppressor genes for regulating cancer cell growth at the secondary site. **Journal Urology**, v. 169, p. 1122-1133, 2003.
- KAWATO, Y.; FURUTA, T.; AONUMA, M.; YASUOKA, M.; YOKOKURA, T.; MATSUMOTO, K. Antitumor activity of a camptothecin derivative, CPT-11, against tumor xenografts in nude mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 28, p. 192-198, 1991.

- KEHRER, D. F. S.; SOEPENBERG, O.; LOOS, W. J.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Modulation of camptothecin analogues in the treatment of cancer: a Review. **Anti-Cancer Drugs**, v.12, p.89-105, 2001.
- KUMAR, M. Nano e microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal Pharm Pharmaceutical Science**, v. 3, p.234-58, 2000.
- KUMAR, V.; BANKER, G. Chemically-modified cellulosic polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, p.1-31, 1993.
- KUMAR, V.; KANG, J.; HOHL, R. Improved dissolution and cytotoxicity of camptothecin incorporated into oxidized-cellulose microspheres prepared by spray drying. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 6, p.459-467, 2001.
- LACASSE, F. X., HILFGEN, P., PERODIN, J., ESCHER, E., PHILLIPS, N. e McMULLER, J.N. Improved activity of new angiotensin receptor antagonist by an injectable spray-dried polymer microspheres preparation. **Pharmaceutical Research**, v.14, p. 887-891, 1997.
- LEE, R.(Ed). **Wintrobe hematologia clínica**. São Paulo: Manole LTDA, 1998.
- LIN, W.; FLANAGAN, D.; LINHARDT, R. Accelerated degradation of poli-ε-caprolactone by organic amines. **Pharmaceutical Research**, v. 11, p.1030-1034, 1994.
- LINHARDT, R. Biodegradable polymers for controlled release of drugs. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: VCH Publisher Inc, 1988, p. 53-85.
- LOH, J. P.; AHMED, A.E. Determination of camptothecin in biological fluids using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 330, p.367-375, 1990.
- MACHIDA, Y.; ONISHI, H.; MORIKAWA, A; MACHIDA, Y. Antitumor characteristics of irinotecan-containing microspheres of poly-D,L-lactic acid or poly(D,L-lactic acid-co glycolic acid) co-polymers. **S.T.P. Pharma. Science**, v. 8, p. 175-181, 1998.
- MACHIDA, Y.; ONISHI, H.; KURITA, A.; HATA, H.; MORIKAWA, A.; MACHIDA, Y. Pharmacokinetics of prolonged-release CPT-11 loaded microspheres in rats. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 159-175, 2000.
- MC CORMICK C.; DUNCAN G.; TUFARO F. New perspectives on the molecular basis of hereditary bone tumours. **Mol Med Today**, v. 5, p.481-486, 1999.
- MI, Z. Reduced albumine binding promotes the stability and activity of topotecan in human blood. **Biochemistry**, v. 34, 13722-13728, 1995.
- MILLER, O.(Ed). **Laboratório para o clínico**. 5º ed. Rio de Janeiro:Livraria Atheneu, 1984.

- MOERTEL, C. G.; SCHUTT, A., J.; REITEMERER, R. G.; HAHN, R. G. Phase II study of camptotecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 56, p. 95, 1972.
- MUGGIA, F. M.; CREAVENT, P. J.; HANSON, H. H.; COHEN, M. C.; SELAWRY, O. S. Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptotecin (NCS- 100880): correlation and preclinical studies. **Biochemistry**, v. 56, p. 515-521, 1972.
- MURAS, A. G.; SANTOS, V. A. Descrição das Drogas Quimioterápicas In: AYOUB, A.; FRIAS, M.; BARROS, M.; KOBAYASHI, R. **Bases da Enfermagem em Quimioterapia**. São Paulo: LEMAR; 2000. p. 62-109.
- NAKAGAWA, W.T.; LOPES, A., Conceitos Básicos em Oncologia In: AYOUB, A.; FRIAS, M.; BARROS, M.; KOBAYASHI, R. **Bases da Enfermagem em Quimioterapia**. São Paulo: LEMAR; 2000. p.1-19.
- NELSON, D. A.; HENRY, J. B. Hematologia e coagulação. IN: HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais**. 19^o ed. São Paulo: Manole LTDA, 1999.
- NETO, L.; PETROVICK, P. A celulose na farmácia. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 19-23, 1997.
- NGUYEN, T.; HIMMELSTEIN, K.; HIGUCHI, T. Erosion of poly (ortho ester) matrices in buffered aqueous solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 4, p.9-16, 1986.
- O'LEARY, J.; MUGGIA, F. M. Camptothecins: a review of their development and schedules of administration. **European Journal of Cancer**, v. 34, n. 10, p. 1500-1508, 1998.
- PANTAZIS, P. Camptothecin: A Promising Antiretroviral Drug. **J. Biomed. Sci.**, v. 3, p.14-19, 1996.
- PANTAZIS, P.; HINZ, H.R.; MENDOZA, J.T.; KOZIELSKI, A.J.; WILLIAMS, L.J.; STEHLIN, J.S.; GIOVANELLA, B.C. Complete inhibition of growth followed by death of human malignant melanoma cells *in vitro* and regresión of human melanoma xenografts in immunodeficient mice induced by camptothecins. **Cancer Research**, v. 52, p. 3980-3987, 1992.
- PARK, C.; BISSEL, M.; BARCELLOS-HOFF, M. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. **Molecular Medicine Today**, v.6, p. 324-329, 2000.
- PATHAK, S. Organ- and tissue-specific stem cells and carcinogenesis. **Anticancer Res**, v. 22, p. 1353-1356, 2002.
- PATHAK, S.; MULTANI, A.S.; FURLONG, C.L.; SOHN, S.H. Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells, and cancer. **International Journal Oncology**, v. 20, n^o 3, p. 637-641, 2002.

- PITT, C. G.; GRATZL, M.M.; JEFFCOAT, A.R.; ZWEIDINGER, R.; SCHINDLER, A. Sustained drug delivery systems. II Factors affecting release rates from poly (ϵ -caprolactone) and related biodegradable polyesters. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.68, p.1534, 1979.
- PITT, C.G.; CHASALOW, F.I.; HIBIONADA, Y.M.; KLIMAS, D.M.; SCHINDLER, A. Aliphatics polyesters. I. The degradation of poly (ϵ -caprolactone) *in vivo*. **J. Appl. Polym. Science**, v.26, p.3779, 1981.
- PITT, C.G.; BAO, Y.T.; ANDRADY, A.L.; SAMUEL, P.N.K. The correlation of polymer-water coefficients: estimation of drug solubilities in polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 45, p. 1-7, 1988.
- PITT, C.G. Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers. IN: LANGER, R.; CHASIN, M. (Ed). **Biodegradable polymers as drug delivery systems**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.71.
- POSTE, G.; DOLL, J.; HART, I. R.; FIDLER, I. J. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. **Cancer Research**, v. 40, p. 1636-44, 1980.
- POTMESIL, M. Camptothecins: From bench research to hospital wards. **Cancer Research**, v.54, p.1431-1439, 1994.
- RADWAN, M.A.; PRICE, J.C.; TACKETT, R.L. In vitro release of disopyramide from cellulose acetate butyrate microspheres. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 12, p.1453-1462, 1995.
- RUDDON, R.W. **Cancer Biology**. New York:Oxford University Press. 3^o ed, 1995.
- RUBIN, E.; FARBER, J.L. Neoplasia In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Pathology**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 2^o ed, 1994.
- SANTOS, A.; MORAIS, J.; GROVES, M. Formulation of a submicron lipid emulsion for camptothecin stability and drug release studies. 4th World Meeting on Pharmaceuticeutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Florence. p.1461-1462, 2002.
- SBOC - Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. Projeto Câncer Brasil - Anuário, 2000. 267pp.
- SHENDEROVA, A.; BURKE, T.G.; SCHWENDEMAN, S.P. Stabilization of 10-hydroxycamptothecin in poly (lactide-co-glycolide) microspheres delivery vehicles. **Pharmaceutical Research**, v.14, n^o 10, p.1406-1414, 1997.
- SLICHENMYER, W.; ROWINSKY, E.K.; DONEHOWER, R.C.; KAUFMANN, S.H. The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. **Journal of the National Cancer Institute**, v.85, p.271-291, 1993.

- SLICHENMYER, W.; VON HOFF, D. New natural products in cancer chemotherapy. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.30, p.770-788, 1990.
- SOLIMANDO, D. A.; BRESSLER, L. R.; KINTZEL, P. E.; GERACI, M. C. **Drug Information Handbook for Oncology**. 2^o ed. Hudson: LEXI-COMP, 2000.
- SPROCKEL, O.; PRAPAITRAKUL, W. A comparison of microencapsulation by various emulsion techniques. **International Journal of Pharmaceutics**, v.58, p.123-127, 1990.
- SUGARMAN, S. M. Lipid-complexed camptothecin: formulation and initial biodistribution and antitumor activities studies. **Cancer Chemotherapeutical Pharmacology**, v. 37, p. 531-538, 1996.
- TAKIMOTO, C. H.; KLECKER, R.W.; DAHUT, W.L.; YEE, L.K.; STRONG, J.M.; ALLEGRA, C.J.; GREM, J.L. Analysis of the active lactone form of 9-aminocamptothecin in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 655, p. 97-104, 1994.
- TAKIMOTO, C. H.; WRIGHT, J.; ARBUCK, S. G. Clinical Applications of Camptothecins. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 1400, p.107-119, 1998.
- THIES, C. Dispersed systems for parenteral administration. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs, polymers and aggregate systems**. VCH Publishers, 1989.
- THOMPSON, J.; STEWART, C.; HOUGHTON, P. Animal models for studying the action of topoisomerase I targeted drugs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1400, p.301-319, 1998.
- VILA JATO, J. L.(Ed). **Tecnologia Farmacéutica volumen I. Aspectos fundamentals de los sistemas farmacéuticos y operaciones basicas**. Madrid:Editorial Síntesis S.A, 1997.
- WADE, C.W.R.; HEGYELI, A.F.; KULKARNI, R.K. Standards for *in vitro* and *in vivo* comparison and qualification of bioadsorbable polymers. **J. Test. Eval**, v. 5, p.397, 1977.
- WALL, M. E.; WANI, M. E. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254, 1996.
- WARNER, D.L.; BURKE, T.G. Simple and versatile high-performance liquid chromatographic method for simultaneous quantitation of the lactone and carboxylate forms of camptothecin anticancer drugs. **Journal of Chromatography B**, v. 691, p.161-171, 1997.
- WANG, J.; WANG, B. M.; SCHWENDEMAN, S. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. **Journal of Controlled Release**. v.82, p. 289–307, 2002.

- WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 1-12, 1990.
- WATTS, P. J.; DAVIES, M.C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using Emulsification/Solvent Evaporation: An Overview of Techniques and Applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.7, n^o 3, p. 235-259, 1990.
- WHATELEY, T. L. Biodegradable microspheres for controlled drug delivery. In: KARSA, D. R.; STEPHENSON, R. A. **Encapsulation and Controlled Release**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. p. 52-65.
- WOLF, J.K.; RAMIREZ, P.T. The molecular biology of cervical cancer. **Cancer Invest.**, v, 19, p. 621-629, 2001.
- WOODWARD, S.C.; BREWER, P.S.; MOATAMED, F.; SCHINDLER, A.; PITT, C.G. The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone). **J. Biomed. Mater. Res.** v. 19, p.437, 1985.
- WU, C.; GAN, Z. A novel method of studying polymer biodegradation. **Polymer Communications**, v.39, p.4429-4431, 1998.
- YANG, S. C.; LU, L. F.; CAI, Y.; ZHU, J. B.; LIANG, B. W.; YANG, C. Z. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. **Journal of Control Release**, v. 59, p. 299-307, 1999.
- YOSHIKAWA, N.; NAKAMURA, K.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Effect of PKC412, a selective inhibitor of protein kinase C, on lung metastasis in mice injected with B16 melanoma cells. **Life Sciences**, v. 72, p.1377-1387, 2003.
- ZUFIA, L.; ALDAZ, A.; GIRALDEZ, J. Separation methods for camptotecin and related compounds. **Journal of Chromatography B**, v.764, p. 141-159, 2001.

ANEXO 1. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.

