

# O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados

Granada, A.<sup>1</sup>; Nemen, D.<sup>1</sup>; Dora, C.L.<sup>1</sup>; Neckel, G.L.<sup>1</sup>; Lemos-Senna, E.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

Recebido 04/10/07 / Aceito 13/12/07

## RESUMO

As plantas têm sido utilizadas para a obtenção de um grande número de substâncias biologicamente ativas. Entretanto, muitos compostos naturais quando empregados sem qualquer modificação química não resultaram em medicamentos eficazes, por não apresentarem as características desejáveis para administração. Neste sentido, a melhoria das propriedades terapêuticas de compostos isolados de plantas por meio da sua incorporação em sistemas de liberação de fármacos consiste em uma importante estratégia na obtenção de novos medicamentos, na qual ainda existe muito a ser explorado. Tais sistemas são caracterizados por apresentar a capacidade de prolongar e controlar a liberação de substâncias ativas, proteger as moléculas frente à degradação no meio biológico, veicular fármacos hidrofóbicos e reduzir os efeitos colaterais indesejáveis. A camptotecina, um alcalóide proveniente do arbusto *Camptotheca acuminata* (Descaisne, Nyssaceae), é um fármaco que apresenta elevada atividade antitumoral, cujo mecanismo envolve a inibição da topoisomerase I, uma enzima altamente expressa nos tumores. Entretanto, a utilização deste fármaco na terapêutica foi limitada, durante anos, em virtude de suas características de baixa solubilidade aquosa, elevada instabilidade em meio fisiológico e elevada toxicidade. Neste artigo é realizada uma revisão sobre o potencial terapêutico da camptotecina e seus análogos no tratamento do câncer, dando ênfase aos estudos conduzidos com o intuito de contornar as limitações da administração destes fármacos e que resultaram na melhoria das propriedades terapêuticas. Estratégias como a microencapsulação, nanoencapsulação e solubilização em micelas poliméricas, entre outras, são discutidas e os principais resultados de atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* são apresentados.

*Palavras-chave:* camptotecina; sistemas de liberação de fármacos; atividade antitumoral

## INTRODUÇÃO

Produtos naturais de plantas, fungos, bactérias e outros microrganismos continuam sendo usados em preparações farmacêuticas na forma de compostos puros ou extratos. Em especial, as plantas têm sido utilizadas para a obtenção de um grande número de substâncias, as quais podem estar relacionadas com um amplo espectro de propriedades biológicas (Araújo & Leon, 2001). Entretanto, muitos produtos naturais biologicamente ativos, quando utilizados sem qualquer modificação, não resultaram em medicamentos eficazes, por não apresentarem as características desejáveis para uso terapêutico. Em muitos casos, o fracasso da utilização de fármacos de origem natural é atribuído à baixa concentração que alcança os alvos terapêuticos. A disponibilidade de fármacos aos alvos intracelulares, por exemplo, depende significativamente das suas características de polaridade, que devem permitir que eles sejam administrados e distribuídos no organismo e, ao mesmo tempo, que se difundam através das membranas celulares. Como consequência, a utilização da maioria dos fármacos é limitada pelas suas características físico-químicas, tais como o coeficiente de partição (log P). Outro fator importante que demonstrou afetar a biodisponibilidade dos fármacos de origem natural é a extensa metabolização *in vivo* pela microflora colônica, durante sua passagem pelo intestino, e pelo fígado, resultando na alteração significativa das espécies encontradas na circulação sistêmica (Soobrattee et al., 2005). Ainda, a suscetibilidade em sofrer hidrólise química em pH fisiológico foi demonstrada para substâncias naturais de elevada atividade biológica (Tonnesen, 2002).

Avanços consideráveis foram obtidos na área de produtos naturais, utilizando a estratégia de síntese associada ao crescente entendimento das rotas bioquímicas e terapêuticas. Estruturas encontradas na natureza como o paclitaxel, apoptolodina, e briostatina motivaram muitos pesquisadores na busca de novos fármacos que sejam menos tóxicos aos seres humanos e também efetivos para o

\*Autor correspondente: Elenara Lemos Senna - Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC - Campus Trindade - CEP: 88040-900 - Florianópolis - SC, Brasil - Telefone: (48) 3721-5067 - Fax: (48) 3721-9542 - e-mail: lemos@ccs.ufsc.br

tratamento de uma variedade de doenças (Wender et al., 2003). Entretanto, a melhoria das propriedades terapêuticas de compostos isolados de plantas por meio de sua incorporação em sistemas de liberação constitui-se outra estratégia importante na obtenção de novos medicamentos, na qual ainda existe muito a ser explorado. Os sistemas de liberação de fármacos apresentam inúmeras vantagens, entre elas a capacidade de prolongar e controlar a liberação da substância ativa, proteger as moléculas contra degradação no meio fisiológico, veicular fármacos hidrofóbicos pela via parenteral, e conduzir à redução dos efeitos colaterais indesejáveis decorrentes das flutuações plasmáticas causadas pela administração de várias doses diárias do medicamento ou da ampla distribuição do fármaco no organismo (Fonseca et al., 2002; Gupte & Ciftci, 2004).

Estudos epidemiológicos e testes pré-clínicos revelaram um grande potencial dos compostos fitoquímicos no combate ao câncer. Entre os fármacos de origem natural que apresentam atividade antitumoral destacam-se os alcalóides. A camptotecina é o alcalóide protótipo obtido da *Camptotheca acuminata*, uma árvore nativa da China que se desenvolve em regiões relativamente quentes do sudoeste deste país. 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. A CPT demonstrou atividade considerável no prolongamento da sobrevivência de animais tratados com células leucêmicas L1210 ou P388, além de elevada atividade na inibição de tumores sólidos, incluindo o tumor de Walker WM (Wall & Wani, 1996). Entretanto, a utilização da camptotecina na terapêutica foi praticamente banida devido à sua escassa solubilidade aquosa, impossibilitando a sua utilização em perfusões intravenosas. Além disso, este fármaco é rapidamente inativado em pH fisiológico em decorrência da abertura do grupamento  $\alpha$ -hidróxi-lactônico presente no anel pentacíclico da molécula, conduzindo à formação de uma forma carboxilada, menos ativa e mais tóxica. Estudos *in vitro* de estabilidade da camptotecina em tampão fosfato pH 7,4 indicaram que após atingir o equilíbrio, apenas 13% do fármaco encontra-se na forma ativa (Emerson, 2000).

Na década de 1980, a descoberta do mecanismo ação único para um alcalóide, envolvendo a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores, trouxe um novo impulso às pesquisas científicas com a CPT. Inicialmente, inúmeros derivados hidrossolúveis foram sintetizados como o objetivo de permitir a administração de soluções aquosas pela via intravenosa (O'Leary & Muggia, 1998). Entretanto, apesar da estratégia de síntese ter contornado os problemas inerentes à baixa solubilidade das camptotecinas, todos os derivados hidrossolúveis permaneceram suscetíveis à hidrólise e inativação em meio fisiológico, em maior ou menor extensão. Por outro lado, estudos demonstraram que a exposição contínua ao tumor, muito mais que a dose, aumentava a eficácia terapêutica destas moléculas. O sucesso da administração da CPT e de seus análogos passou a requerer,

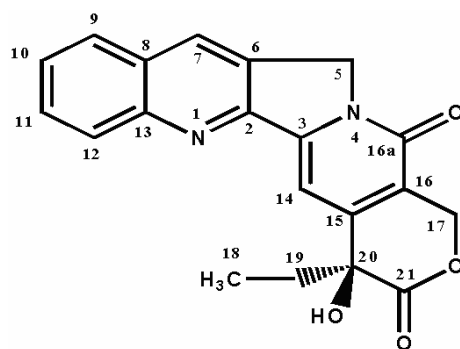
portanto: (i) a manutenção da forma lactônica da molécula durante todas as etapas de fabricação do medicamento, (ii) o alcance e a manutenção de concentrações efetivas da forma ativa nos tumores e (iii) a obtenção de preparações que conduzam à redução dos efeitos colaterais. Assim, a CPT e seus análogos tornaram-se, nas últimas décadas, objeto de inúmeros estudos visando o desenvolvimento de sistemas de liberação por diversos grupos de pesquisa no mundo todo. Neste artigo de revisão é realizada uma revisão sobre o potencial terapêutico da camptotecina, dando ênfase aos resultados de melhoria da eficácia terapêutica obtidos com a utilização de sistemas de liberação. Pretende-se, também, demonstrar através desta revisão, como o potencial terapêutico de fármacos de origem natural pode ser aproveitado, por meio da incorporação em sistemas de liberação, melhorando a performance dos medicamentos e abrindo novas perspectivas para a indústria farmacêutica.

## CAMPTOTECINA

Os alcalóides são substâncias isoladas de plantas de vários gêneros caracterizados por apresentar um nitrogênio heterocíclico. Tais substâncias constituem uma das mais importantes classes de fármacos antitumorais, sendo que os mais estudados pertencem a três gêneros: *Vinca* (Catharantus), *Taxus* e *Camptotheca* (Cortesi & Nastruzzi, 1999). A camptotecina (CPT) é um alcalóide proveniente do arbusto *Camptotheca acuminata* (Decaisne, Nyssaceae), uma planta que cresce em áreas relativamente quentes do sudoeste chinês, sendo tradicionalmente empregada na medicina chinesa na forma de chá. Estruturalmente, este fármaco é caracterizado por apresentar um anel pentacíclico altamente insaturado, constituído por uma porção pirrol [3,4-b] quinolina (anéis A, B e C), um anel piridona (anel D) e um anel -hidroxilactona terminal (anel E), apresentando um centro quiral no carbono 20 (C-20) (Figura 1). É importante ressaltar que, das duas formas enantioméricas da camptotecina, 20-(S) e 20-(R), apenas a forma 20-(S) apresenta atividade antitumoral (Hatefi & Amsden, 2002). A CPT apresenta-se como um pó amarelo, opaco e cristalino, de elevado ponto de fusão (264-267 °C) e peso molecular de 348,11, correspondente à fórmula  $C_{20}H_{16}N_2O_4$  (Wall & Wani, 1996).

A CPT foi isolada durante o período de 1950-1959, por ocasião de um meticoloso estudo que objetivava a obtenção de esteróides a partir da hidrocortisona. Após o isolamento e elucidação estrutural da CPT e seus análogos 10-hidroxi e 10-metoxi-camptotecina, foi demonstrado que estas substâncias inibiam a síntese de ADN e ARN. Os primeiros estudos *in vivo* realizados com este fármaco evidenciaram uma considerável atividade antitumoral em animais tratados com células leucêmicas L1210 ou P388, quando doses entre 0,5 e 4,0mg/kg eram administradas, além de uma elevada atividade na inibição de tumores sólidos, incluindo o tumor de Walker WM (Wall & Wani, 1996). Posteriormente, estudos demonstraram que a camptotecina inibia o crescimento das células endoteliais humanas *in vitro* e possuía atividade antiangiogênica *in vivo*, provocando uma

Sistemas de liberação para camptotecinas



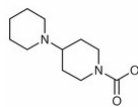
	C-7	C-9	C-10
<b>Camptotecina</b>	H	H	H
<b>9-aminocamptotecina</b>	H	NH <sub>2</sub>	H
<b>9-nitrocamptotecina</b>	H	NO <sub>2</sub>	H
<b>Irinotecano</b>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	
<b>Topotecano</b>	H	NCH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
<b>SN-38</b>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>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

Figura 1. Estrutura química da camptotecina e seus derivados.

inibição de cerca de 30% no crescimento vascular. Estas observações indicaram que além da atividade citotóxica, a CPT apresenta uma atividade antitumoral indireta, por meio da inibição da angiogênese (Clemente et al., 1999).

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

Estudos posteriores evidenciaram que a manutenção do anel lactônico da CPT era crucial para a atividade antitumoral. Entretanto, a porção lactônica da molécula é suscetível à hidrólise espontânea, formando a correspondente forma carboxilada. Apesar da forma carboxilada possuir solubilidade aquosa superior, é cerca de 10 vezes menos potente, explicando os resultados obtidos

nos ensaios clínicos (Hertzberg et al., 1989; Garcia-Carbonero & Supko, 2002). A abertura do anel lactônico da CPT e formação da forma carboxilada ocorre em um processo onde o equilíbrio entre as duas formas é altamente dependente do pH. Sob condições ácidas (pH < 4) a estrutura lactônica predomina, enquanto em valores de pH >10, a forma carboxilada está exclusivamente presente (Figura 2). No pH fisiológico, o equilíbrio favorece a formação da forma carboxilada, sendo também afetado pela ligação do fármaco à albumina. A diferença na afinidade pela albumina da forma carboxilada sobre a lactônica é cerca de 200 vezes maior, alterando significativamente o equilíbrio em favor da inativação do fármaco. Como resultado final, tem-se que na presença de níveis fisiológicos de albumina humana, a forma ativa da CPT apresenta um tempo de meia vida muito curto, de aproximadamente 10 minutos. No plasma humano, a 37° C e pH 7,4, o anel lactônico da camptotecina abre rapidamente e, no equilíbrio, unicamente 0,2% do fármaco encontra-se na sua forma ativa. No sangue total, a camptotecina mostra-se mais estável e cerca de 5,3% encontra-se na forma lactônica. Este aumento da estabilidade foi relacionado à associação do fármaco com a bicamada lipídica dos eritrócitos, permanecendo protegido frente à hidrólise (Mi & Burke, 1994; Burke & Mi, 1994; Burke et al., 1995; Herben et al., 1998; Zunino et al., 2002).

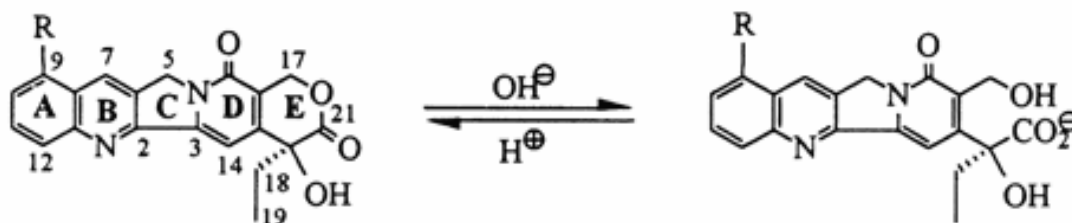


Figura 2. Representação da conversão da forma lactônica da CPT em carboxilada.

A perda da atividade da CPT é atribuída à abertura do anel lactônico por três razões. Primeiramente, a forma carboxilada apresenta uma associação reduzida com a membrana em cerca de duas vezes. A abertura do anel resulta numa alteração estrutural no fármaco que limita a sua difusibilidade através da bicamada lipídica das células. Finalmente, experimentos em cultura de células evidenciaram que a abertura do anel resulta na atenuação da atividade do fármaco contra a Topoisomerase I. Estes fatores contribuem conjuntamente com a diminuição da atividade citotóxica da CPT (Hatefi & Amsden, 2002). O interesse na utilização terapêutica da camptotecina foi retomado com a descoberta do mecanismo único para um alcalóide, envolvendo a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores. A topoisomerase I é uma enzima nuclear presente em virtualmente todas as células somáticas. Trata-se de um polipeptídeo monomérico com massa molar de 100 kD, codificado por um único gene. Similarmente às topoisomerasas, a topo I relaxa o ADN espiralado, induzindo o corte na porção fosfodiéster de uma fita simples, permitindo que a fita intacta passe através deste corte e religando, após, a fita de ADN. Durante o curso deste processo catalítico, uma ligação covalente é estabelecida entre um grupo tirosina do sítio ativo da topo I e um grupo fosfato 3' presente ao longo da estrutura do ADN, formando o complexo de clivagem (Slichenmyer et al., 1993; Sinha, 1995). A camptotecina se liga covalentemente à topo I, estabilizando o complexo ADN-enzima e inibindo fortemente a reação de religação, sem afetar a reação de clivagem. A interação entre CPT e topo I ocorre pelo ataque de um sítio nucleofílico sobre a enzima, na posição acila do anel E do fármaco. A citotoxicidade da CPT pode ser então atribuída à interrupção da replicação pela estabilização do complexo ADN-enzima-fármaco, resultando no rompimento da dupla fita e, conseqüentemente, impedindo a síntese do ARN. A CPT é, portanto, um fármaco ciclo-celular específico da fase S (Fassberg & Stella, 1992; Herben et al., 1998).

## SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE CAMPTOTECINAS

A camptotecina é um alcalóide natural muito pouco solúvel em água, inviabilizando a preparação de soluções destinadas à administração intravenosa. Por esta razão, vários análogos foram sintetizados, na tentativa de manter as características essenciais da molécula para a citotoxicidade e

produzir derivados solúveis em condições fisiológicas. Todos os análogos da CPT possuem estrutura similar. Vários derivados ativos deste fármaco foram obtidos com substituições diferentes em C-7, C-9, C-10, incluindo o irinotecano, topotecano, 9-amino-CPT e 9-nitro-CPT (Figura 1). Apesar da obtenção de derivados ativos apresentando solubilidade aquosa melhorada, a instabilidade do anel lactônico (E) frente à hidrólise foi mantida. Derivados de camptotecina com anéis E mais estáveis (21-S-lactama e 20-deoxi-camptotecina) demonstraram-se inativos (Herben et al., 1998; Zunino et al., 2002). Desta maneira, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos tem sido objeto de inúmeros estudos visando melhorar a eficácia terapêutica da camptotecina e seus derivados. Os diferentes sistemas de liberação estudados e os resultados de atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* serão descritos a seguir. Um resumo dos benefícios produzidos pela incorporação das camptotecinas em sistemas de liberação é apresentado na Tabela 1.

### Microencapsulação

Dentre as estratégias testadas para o controle da liberação das camptotecinas, o prolongamento da liberação tem apresentado resultados promissores, especialmente com a microencapsulação de fármacos, utilizando polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Tal estratégia tem como objetivo encapsular sólidos e líquidos dentro de matrizes ou sistemas reservatórios, e oferecem inúmeras vantagens de emprego quando comparados às formas farmacêuticas convencionais, incluindo a melhoria na eficácia, redução da toxicidade e melhoria do conforto e adesão do paciente ao tratamento. Com este objetivo, Sherendova et al. (1997) prepararam microesferas de ácido poli (lático-co-glicólico) (PLAGA) pela técnica de emulsão/evaporação do solvente, para prolongar a liberação da 10-hidroxicamptotecina (10-HCPT). Os autores observaram a manutenção da forma lactônica do fármaco no interior das partículas por mais de 10 semanas, num ambiente que simulava as condições fisiológicas. Quando administradas intraperitonealmente em camundongos inoculados com células de carcinoma de células escamosas oral humano, as microesferas conduziram ao aumento significativo da concentração intratumoral de 10-HCPT e à redução do tumor, contrastando com a ineficácia da administração do fármaco livre (Mallery et al., 2001).

*Sistemas de liberação para camptotecinas*

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

	Efeito benéfico relatado	Fármaco	Referência
Microencapsulação	Prolongamento da liberação, manutenção da forma lactônica, redução dos efeitos colaterais indesejáveis, aumento da citotoxicidade <i>in vitro</i>	10-HCPT	Sherendova et al. (1997), Mallery et al. (2001)
		CPT	Ertl et al. (1999), Kumar et al. (2001), Dora et al. (2006), Aiping et al. (2006)
		CPT-11	Yoshizawa et al. (2005), Nishino et al. (2007)
Hidrogéis poliméricos	Prolongamento da liberação, aumento da supressão do tumor	CPT	Liu et al. (2006)
		TPC	Laloo et al. (2006)
Lipossomas e emulsões	Manutenção da forma lactônica, aumento da citotoxicidade <i>in vitro</i> , aumento da internalização celular, redução da toxicidade	CPT	Burke & Mishra (1993), Cortesi et al. (1997), Koshkina & Gilbert (1999)
		CPT, 10-HCPT, SN-38	Lundberg (1998)
		9-NC	Knight & Koshkina (1999), Knigh et al. (2002)
Nanoencapsulação	Alteração do perfil farmacocinético e da biodistribuição, aumento do tempo de permanência do fármaco na circulação sistêmica (nanopartículas revestidas com polímeros hidrofílicos), aumento da eficácia terapêutica <i>in vivo</i> , redução dos efeitos colaterais indesejáveis	CPT	Yang et al. (1999a, 1999b), Miura et al. (2004), Tyner et al. (2004), Neckel et al. (2007), Kunii et al. (2007)
		CPT-11	Onishi et al. (2003)
		HCPT-1	Zhang et al. (2004)
Micelas poliméricas	Acúmulo do fármaco no tumor, aumento da solubilidade aquosa, aumento da citotoxicidade <i>in vitro</i> , manutenção da forma lactônica, aumento da captura pelas células	CPT	Mu et al. (2005), Koo et al. (2005), Kawano et al. (2006)
Conjugados macromoleculares	Aumento da estabilidade plasmática, prolongamento da retenção do fármaco no tumor	CPT-polímero (pró-fármaco)	Zunino et al. (2002)

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

Ertl et al. (1999) desenvolveram microesferas de CPT de liberação prolongada, empregando uma variante da metodologia de evaporação do solvente e o H-PLGA para a preparação das partículas. Este polímero contendo mais grupamentos carboxílicos terminais que o PLGA foi selecionado para criar um microambiente ácido que favorecesse a presença de CPT na sua forma ativa. Neste caso, a cinética de liberação do fármaco a partir das microesferas seguiu um modelo bifásico, com um efeito burst inicial variando entre 20 a 35% da quantidade de fármaco encapsulado. Na tentativa de melhorar a velocidade de dissolução e a citotoxicidade da CPT, este fármaco foi incorporado em microesferas de celulose oxidizada, usando a metodologia de secagem em torre de aspersão (*spray-drying*). As microesferas contendo CPT demonstraram ser mais efetivas do que o fármaco livre em estudos de citotoxicidade *in vitro* usando linhagens de células leucêmicas mielóides THP-1 e linfóide RPMI-8402. Entretanto, o tempo requerido para a liberação de 50% do fármaco variou entre 19 e 37 horas, não satisfazendo a necessidade de liberação prolongada do fármaco para uma atividade antineoplásica ótima *in vivo* (Kumar et al., 2001).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que microesferas de policaprolactona contendo camptotecina, quando administradas intraperitonealmente, inibiam o crescimento e a disseminação metastática pulmonar em camundongos tratados com células B16-F10 pela via intravenosa. Apesar das formulações de microesferas terem demonstrado eficácia similar àquela produzida pelo fármaco livre, os efeitos tóxicos dose-dependentes, notadamente a neutropenia, foram significativamente reduzidos em decorrência do prolongamento da liberação do fármaco (Dora et al., 2006). Os resultados foram relacionados ao fato das CPTs serem mais efetivas quando administradas em protocolos prolongados do que em altas doses em tratamentos de curta duração. Esta característica é atribuída à atuação específica deste fármaco na fase S do ciclo celular. Uma vez alcançado o nível de citotoxicidade necessário para a atividade inibitória sobre a enzima topo I, o parâmetro que determina a resposta antitumoral é o tempo de exposição e não o aumento da dose (Thompson et al., 1998). Estudos ainda relatam o controle da liberação do irinotecano a partir de microesferas de ácido poli (D,L-láctico) (Yoshizawa et al., 2005; Nishino et al., 2007) e da camptotecina a partir de agregados de O-carboximetilquitosana (Aiping et al., 2006).

### **Hidrogéis poliméricos**

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

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

### **Lipossomas e emulsões**

Sistemas lipídicos também foram testados para melhorar a estabilidade da CPT frente à hidrólise e aumentar a sua eficácia terapêutica. Burke & Mishra (1993) demonstraram que a CPT se liga às membranas intercalando-se entre as cadeias acilas da membrana fosfolipídica, permanecendo assim estável. Diferentes formulações de CPT foram desenvolvidas por Cortesi et al. (1997) com o objetivo de aumentar a solubilidade do fármaco e reduzir a toxicidade associada com a sua administração. Neste trabalho, a performance *in vitro* de lipossomas, emulsões e micelas contendo CPT foi avaliada em cultura de células leucêmicas K562. Os resultados demonstraram que as três formulações testadas foram capazes de liberar efetivamente a CPT, apresentando elevada atividade antiproliferativa. Lundberg (1998) desenvolveu ésteres do ácido oleico da 10-HCPT e do SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), capazes de serem incorporados nas bicamadas dos lipossomas e emulsões lipídicas submicrônicas. As formulações lipídicas permitiram a estabilização dos fármacos frente à abertura do anel lactônico e a proteção frente à ligação com a albumina. Em termos de citotoxicidade, os ésteres associados aos vetores lipídicos demonstraram igual ou maior atividade contra células T-47D, uma linhagem de células de câncer de mama, e contra células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2).

A aplicação da 9-nitrocamptotecina (9-NC) na forma de um aerossol lipossomal foi testada no tratamento de camundongos xenotransplantados com cânceres de pulmão, cólon e mama (Knight & Koshkina, 1999; Knight et al., 2002). Dando continuidade a este trabalho, Koshkina et al. (1999) avaliaram as características farmacocinéticas e a distribuição tecidual da camptotecina lipossomal inalada. Neste estudo a liberação pulmonar da CPT demonstrou ser vantajosa em decorrência do mais baixo teor de albumina na superfície tráqueo-bronquial e a mais rápida penetração do fármaco nos tumores, os quais contribuíram para a

preservação da forma lactônica da molécula. Outras vantagens observadas no uso de lipossomas para liberação da CPT foram a internalização intracelular aumentada do fármaco, a diminuição da toxicidade sistêmica e aumento da sua solubilidade nos fluidos biológicos. Apesar de todas estas vantagens, estes sistemas sofrem ausência de seletividade pelas células tumorais e embora a liberação do fármaco seja aumentada, a necessidade de liberação sustentada em baixas doses por um longo período de tempo não foi atendida. A eliminação de lipossomas pelos macrófagos circulantes e a sua meia-vida relativamente curta são as maiores desvantagens deste tipo de sistema de liberação.

### *Nanopartículas e micelas poliméricas*

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

Nanopartículas com diâmetro menor que 200 nm e revestidas com polímeros hidrofílicos apresentam a propriedade de escapar da captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear, sendo direcionadas a tecidos altamente permeáveis, resultando num fenômeno de vetorização passiva conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito *EPR*; *do inglês enhanced permeability and retention effect*). Esta propriedade é decorrente da baixa adsorção de proteínas plasmáticas (opsonização), na qual é proporcionada por um efeito estérico e aumento do grau de hidrofília da superfície das partículas, na presença do revestimento hidrofílico. A obtenção de partículas revestidas com polietilenoglicol foi empregada para melhorar as propriedades terapêuticas e reduzir a

toxicidade do irinotecano (CPT-11), um pró-fármaco da 7-etilhidroxicamptotecina (SN-38). Em contraste à baixa eficácia observada após administração do CPT-11 em solução, a administração da suspensão de nanopartículas de ácido poli (D,L-láctico)/poli(etilenoglicol)-poli(propilenoglicol)-poli(etilenoglicol) (PLA/PEG-PPG-PEG) contendo este fármaco conduziu à supressão significativa do crescimento do tumor, no modelo de sarcoma 180 em ratos. Este resultado foi relacionado à melhoria das propriedades farmacocinéticas do fármaco, visto que a concentração plasmática de CPT-11 foi mantida em níveis terapêuticos por um período maior quando administrado na forma de nanopartículas, permitindo um suprimento adequado da forma ativa ao tumor (Onishi et al., 2003). Recentemente, estudos demonstraram que as nanopartículas PLA/PEG-PPG-PEG contendo CPT conduziram ao prolongamento do tempo de residência plasmática do fármaco, sendo este liberado em grande extensão nos tecidos, em particular no fígado. As nanopartículas igualmente conduziram à maior redução da supressão do tumor, em relação ao fármaco livre, em modelo murino de sarcoma 180 (Kunii et al., 2007).

Nanopartículas contendo a 10-hidroxicamptotecina-10,20-diisobutil dicarbonato (HCPT-1) foram preparadas a partir de policaprolactona-co-lactato-b-PEG-b-policaprolactona-co-lactato (PCLLA-PEG-PCLLA), apresentando unidades de polietilenoglicol com diferentes massas molares, pela técnica de nanoprecipitação. Fatores tais como a composição e concentração do co-polímero e a quantidade inicial de fármaco demonstraram afetar o tamanho da partícula, eficiência de encapsulação e liberação do HCPT-1 *in vitro*, indicando que tais sistemas oferecem ampla flexibilidade para a obtenção de uma resposta terapêutica adequada. Além disso, estudos de biodistribuição realizados após administração intravenosa das nanopartículas indicaram que a concentração do fármaco permaneceu elevada na corrente sanguínea, mesmo 24 horas após a injeção. A concentração do fármaco também foi alta nos pulmões e baço, tendo sido este resultado atribuído ao efeito de filtração de partículas ou agregados grandes pela rede capilar. Por outro lado, a concentração do fármaco foi baixa no fígado, o principal órgão do sistema retículo-endotelial, decorrente, provavelmente, da estabilização estérica proporcionada pelo revestimento de polietilenoglicol, que fornece um meio para que as partículas escapem da rápida captura pelos macrófagos teciduais (Zhang et al., 2004).

As propriedades antitumorais das nanopartículas de ácido poli láctico-co-metoxipolietilenoglicol contendo camptotecina, preparadas pela técnica de emulsão/evaporação do solvente, foram avaliadas por Miura et al. (2004). Após a administração pela via intravenosa na dose de 0,5mg de CPT/kg, a CPT permaneceu por um período maior na circulação sanguínea quando encapsulada nas nanopartículas. Em ratos inoculados com células de sarcoma 180, a administração de uma ou de duas doses de camptotecina nanoencapsulada, na concentração de 2,5mg/kg, demonstrou ser muito mais efetiva quando comparada

com a administração da solução do fármaco. Além disso, a supressão total do tumor foi verificada no grupo tratado com as nanopartículas em três de quatro animais, quatro semanas após a primeira administração, sem a diminuição significativa no peso dos animais. A melhoria na eficácia terapêutica do fármaco foi atribuída à melhoria no seu perfil farmacocinético, quando este se apresentava nanoencapsulado.

As características de baixa solubilidade aquosa e baixa estabilidade em meio fisiológico tornam a camptotecina um excelente candidato para encapsulação em nanocápsulas poliméricas. As nanocápsulas destacam-se em relação aos sistemas matriciais pelo confinamento do fármaco na cavidade central das partículas, que confere maior proteção do princípio ativo frente à degradação no meio biológico, permite a veiculação de moléculas hidrofóbicas, além de reduzir o efeito de liberação inicial (efeito burst) (Couvreur et al., 2002).

A encapsulação da camptotecina em nanocápsulas convencionais e furtivas foi realizada em nosso laboratório, empregando o ácido poli (D,L-lático) (PLA) e copolímeros diblocos do ácido poli (D,L-lático) e polietilenoglicol (PLA-PEG 49kD e 66kD), respectivamente. A eficiência de encapsulação da CPT variou de 76 a 97 %, dependendo da formulação testada. A presença das cadeias de polietilenoglicol na superfície das nanocápsulas foi evidenciada pela redução de ambos diâmetro médio e potencial zeta das partículas. A liberação *in vitro* da CPT a partir das nanocápsulas não foi afetada pela natureza do polímero, mas a barreira polimérica retardou a liberação do fármaco (Neckel & Lemos-Senna, 2005). Após administração intraperitoneal na dose de 0,5 mg/kg, as suspensões de nanocápsulas de PLA-PEG 49 kD demonstraram ser mais efetivas na redução do número de metástases pulmonares em camundongos tratados com células de melanoma B16-F10, quando comparado com a administração do fármaco livre. A neutropenia, principal efeito tóxico da camptotecina, não foi verificada em nenhum dos grupos tratados com o fármaco, provavelmente em decorrência da baixa dose administrada. A maior eficácia das suspensões de nanocápsulas peguadas foi atribuída à proteção do fármaco pela nanoencapsulação e à redução da captura das partículas pelos macrófagos dos linfonodos. Tal hipótese pode ser suportada pelos estudos *in vitro* também realizados por nosso grupo, que evidenciaram que tanto as suspensões de nanocápsulas convencionais (PLA) como as furtivas (PLA-PEG) exibiram atividade citotóxica significativamente maior que o fármaco livre (Neckel et al, 2007).

Ainda, como novos sistemas de liberação, os nanobiohíbridos foram propostos para veicular a camptotecina (Tyner et al., 2004). Neste caso, a camptotecina foi primeiramente encapsulada em micelas de tensoativos aniônicos. As micelas carregadas negativamente foram, então, encapsuladas em nanopartículas de hidróxido de magnésio e alumínio de dupla camada, por um processo de troca iônica. Neste caso, o complexo formado é neutro e pode ser disperso em meio aquoso. Tal sistema demonstrou

ser capaz de liberar rapidamente a camptotecina, dentro de 10 minutos em ambos meios com pH 4,8 e 7,2. Após a inoculação em cultura de células de glioma, os nanobiohíbridos contendo camptotecina resultaram na diminuição significativa do tempo de sobrevida quando comparado com as células não tratadas ou incubadas na presença do tensoativo e do hidróxido de magnésio e alumínio. Além de aumentar a solubilidade aquosa da camptotecina em três vezes, os autores sugerem que a modificação da superfície das partículas fornece um meio promissor para a vetorização de fármacos em sítios específicos de ação.

Outra estratégia que tem sido empregada para melhorar as propriedades terapêuticas da camptotecina e seus análogos consiste em solubilizá-los no interior de micelas poliméricas. Micelas de pequeno tamanho (10-100 nm) são acumuladas em tecidos doentes cuja vascularização é mal-formada, além de poderem ser esterilizadas por filtração em membranas de 0,2  $\mu\text{m}$ . Micelas mistas constituídas de D- $\alpha$ -tocoferol-succinato de polietilenoglicol 1000 (TPGS) e polietilenoglicol-fosfatidiletanolamina (PEG-PE), apresentando cerca de 12 nm, foram usadas para solubilizar a camptotecina. A citotoxicidade *in vitro* do CPT nas micelas foi avaliada em células de carcinoma pulmonar de Lewis murino, células de adenocarcinoma coloretal e células de adenocarcinoma de mama e, em todas as linhagens, as micelas mistas demonstraram maior citotoxicidade que o fármaco livre. Além do aumento da solubilidade da CPT, a manutenção da forma lactônica no interior hidrofóbico e a maior captura das micelas pelas células, foram os fatores que conduziram o aumento da citotoxicidade (Mu et al., 2005). Em um outro estudo, a camptotecina foi solubilizada em micelas de diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG2000), numa concentração cerca de 25 vezes maior que a solubilidade do fármaco em tampão acetato pH 5,0. A citotoxicidade do fármaco nas micelas mostrou-se semelhante à do fármaco livre em linhagem de câncer de mama MCF-7, após 24 horas de incubação. Entretanto, após 96 horas, a citotoxicidade das micelas foi cerca de três vezes maior àquela do fármaco livre, em decorrência da melhoria da estabilidade do fármaco no meio de cultura e maior exposição do fármaco na fase S do ciclo celular. Do ponto de vista tecnológico, a liofilização das micelas sem a adição de crioprotetores e a reconstituição sem alteração das suas características iniciais foram ainda considerados aspectos vantajosos da utilização deste sistema na terapêutica (Koo et al., 2005). A eficácia terapêutica de micelas constituídas do copolímero do poli (etilenoglicol) e poli(benzil aspartato-70) contendo a camptotecina foi avaliada em modelo de cólon-26 murino. O crescimento do tumor foi significativamente reduzido após administração de uma única administração de CPT na forma micelar na dose de 15 e 30mg/kg, sendo a inibição provocada comparável à administração de três doses consecutivas de 10 mg/kg/dia. O acúmulo do fármaco no tumor, devido ao efeito EPR, foi verificado quando a forma micelar foi administrada em camundongos (Kawano et al., 2006).



### Conjugados de camptotecinas

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

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A camptotecina e seus análogos constituem bons exemplos de fármacos cujas propriedades físico-químicas e, portanto, as propriedades terapêuticas foram benéficamente alteradas com a incorporação em sistemas de liberação. Particularmente, o aumento da solubilidade da camptotecina e proteção deste fármaco e seus derivados frente à abertura do anel lactônico foram considerados cruciais para a melhoria da eficácia terapêutica. Entretanto, o aumento da concentração de fármaco nos tumores, pelo emprego de sistemas nanoestruturados de prolongada circulação sistêmica e o aumento do tempo de exposição dos fármacos aos tumores, mais que a dose, demonstraram também ser importantes para o sucesso da quimioterapia. Cabe ressaltar, que independente das particularidades das camptotecinas, o uso destes sistemas oferece oportunidades para a melhoria das propriedades terapêuticas de outros fármacos de origem natural, cujo potencial terapêutico ainda não tenha sido completamente aproveitado.

### ABSTRACT

*Drug delivery systems as a way to improve the therapeutic properties of natural drugs: the example of camptothecin and its derivatives*

**Plants have been used as the source of a great number of biologically active molecules. However, many natural products employed without any chemical modification, have not resulted in effective drugs, owing to their undesirable physicochemical properties. In this situation, the improvement of the therapeutic properties of isolated plant compounds by means of their incorporation in drug delivery systems is an important way of obtaining new medicines, which could be further exploited. Drug**

**delivery systems possess the ability to prolong and control drug release, to protect molecules against degradation in biological fluids, to transport hydrophobic drugs, and to reduce the undesirable side effects of active substances. Camptothecin, an alkaloid obtained from *Camptotheca acuminata* (Descaine, Nyssaceae), is a drug that displays high antitumor activity, and its mechanism entails the inhibition of topoisomerase I, an enzyme highly expressed in tumors. Nevertheless, its use in therapy has been limited by its low water solubility, low stability in physiological medium, and high toxicity. In this paper, a review of the therapeutic properties of camptothecin and its derivatives is presented, and emphasis is placed on studies carried out with the aim of overcoming the problems that hinder the administration of these drugs. Approaches such as microencapsulation, nanoencapsulation, and solubilization in polymer-based micelles are discussed and the main *in vitro* and *in vivo* antitumor activity results are presented.**

*Keywords:* camptothecin; drug delivery systems; antitumor activity.

### REFERÊNCIAS

- Aiping A, Jianhon L, Wenhui Y. Effective loading and controlled release of camptothecin by O-carboxymethylchitosan aggregates. *Carbohydr Polym* 2006; 63(1):89-96.
- Araújo C, Leon L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96:723-8.
- Burke GT, Mi Z. The structural basis of camptothecin interactions with human serum albumin: impact on drug stability. *J Med Chem* 1994; 37(1):40-6.
- Burke TG, Mishra AK. Lipid bilayer partitioning and stability of camptothecin drugs. *Biochem* 1993; 32(20):5352-64.
- Burke TG, Munshi CB, Mi Z, Jiang Y. The important role of albumin in determining the relative human blood stabilities of the camptothecin anticancer drugs. *J Pharmac Sci* 1995; 84:518-9.
- Clement MK, Jones CB, Cumming M, Daoud SS. Antiangiogenic potential of camptothecin and topotecan. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44(5):411-6.
- Cortesi R, Esposito A, Maietti E, Nastruzzi C. Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsion. *Int J Pharm* 1997; 159(1):95-103.
- Cortesi R, Nastruzzi C. Liposomes, micelles and microemulsions as new delivery systems for cytotoxic alkaloids. *PSTT* 1999; 2(7):288-98.
- Couvreur P, Barrat G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Ther Drug Car Syst* 2002; 19:99-134.

- Dora LC, Alvarez-Silva M, Trentin GA, Faria JT, Fernandes D, Costa R, Stimamiglio M, Lemos-Senna E. Evaluation of antimetastatic activity and systemic toxicity of camptothecin-loaded microspheres in mice injected with B16-F10 melanoma cells. *J Pharm Pharm Sci* 2006; 9(1):22-31.
- Emerson DL. Liposomal delivery of camptothecins PSTT 2000; 3(6):205-9.
- Ertl B, Platzer P, Wirth M, Gabor F. Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery and stabilization of camptothecin. *J Control Release* 1999; 61(3):305-17.
- Fasseberg J, Stella VJ. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. *J Pharm Sci* 1992; 81(7):676-84.
- Fonseca C, Simões S, Gaspar R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro antitumor activity. *J Cont Release* 2002; 83:273-86.
- Garcia-Carbonero R, Supko JG. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clin Cancer Res* 2002; 8:641-61.
- Gupte A, Ciftci K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU micrispheres. *Int J Pharm* 2004; 276:93-106.
- Hatefi A, Amsden B. Camptothecin delivery methods. *Pharm Res* 2002; 19(10):1389-99.
- Herben VMM, Huinink WWB, Schellens JHM, Beijnen, JH. Clinical pharmacokinetics of camptothecin topoisomerase I inhibitors. *Pharm World Sci* 1998; 20(4):161-72.
- Hertzberg RP, Caranfa MJ, Holden, KG, Jakas DR, Gallagher G, Mattern MR, Mong S M, Bartus JO, Johnson RK, Kingsbury WD. Modification of hydroxyl lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem* 1989; 32(2):715-20.
- Kawano K, Watanabe M, Yamamoto T, Yokoyama M, Opanasopit P, Okano T, Maitani Y. Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long circulating polymeric micelles. *J Control Release* 2006; 112:329-32.
- Knight V, Koshkina NV. Anticancer effect of 9-nitrocamptothecin liposome aerosol on human cancer xenografts in nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44:177-85.
- Knight V, Kleinerman ES, Waldrep JC, Giovanella BC, Gilbert BE, Koshkina NV. 9-nitrocamptothecin liposome aerosol treatment of human cancer subcutaneous xenografts and pulmonary cancer metastases in mice. *Ann NY Acad. Sci* 2002; 922:151-63.
- Koo MO, Rubinstein I, Onyuksel H. Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: A novel nanomedicine. *Nanomedicine* 2005; 1(2):77-84.
- Koshkina NV & Gilbert BE. Distribution of camptothecin after delivery as a liposome aerosol o following intramuscular injection in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44:187-92.
- Kumar V, Kang J, Hohl R. Improved dissolution and cytotoxicity of camptothecin incorporated into oxidized-cellulose microspheres prepared by spray drying. *Pharm Dev Technol* 2001; 6(3):459-67.
- Kunii R, Onishi H, Machida Y. Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67(1):9-17.
- Laloo A, Chao P, Hu P, Stein S, Sinko JP. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of a novel in situ forming poly(ethylene glycol)-based hydrogel for the controlled delivery of the camptothecins. *J Control Release* 2006; 112(3):333-42.
- Liu J, Li L, Cai Y. Immobilization of camptothecin with surfactant into hydrogel for controlled drug release. *Eur Polym J* 2006; 42(8):1767-74.
- Lundberg BB. Biologically active camptothecin derivatives for incorporation into liposome bilayers and lipid emulsions. *Anticancer Drug Des* 1998; 13(5):453-61.
- Mallery SR, Sherendova A, Pei P, Begum S, Ciminieri JR, Wilson RF, Casto BC, Schuller DE, Morse MA. Effects of 10-HCPT, delivered from locally injectable poly(lactide-co-glycolide) microspheres, in a murine human oral squamous cell carcinoma regression model. *Anticancer Res* 2001; 21:1713-22.
- Mi Z, Burke TG. Differential interactions of camptothecin lactone and carboxylate forms with human blood components. *Biochemistry* 1994; 33:12540-5.
- Miura H, Onisha H, Sasatsu M, Machida Y. Antitumor characteristics of methoxypolyethylene glycol-poly(DL-lactic acid) nanoparticles containing camptotheci. *J Control Release* 2004; 97(1):101-13.
- Moertel CG, Schutt AJ, Reitemerer RG, Hahn RG. Phase II study of camptotecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother Rep* 1972; 56(1):95-101.
- Mu L, Chrastina A, Levchenko T, Torchilin PV. Micelles from poly(ethylene glycol)-phosphatidyl ethanolamine conjugates (PEG-PE) as pharmaceutical carriers for poorly soluble drug camptothecin, *J Biomed Nanotechnol* 2005; 1:190-6.
- Muggia FM, Creaven, PJ, Hansen HH, Cohen, MH, Selawry, OS. Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies. *Cancer Chemother Rep* 1972; 56:515-21.
- Neckel G, Lemos-Senna E. Preparação e Caracterização de Nanocápsulas Contendo Camptotecina a partir do Ácido poli

- (D,L-lático) e de Copolímeros Diblocos do Ácido Poli (D,L-lático) e Polietilenoglicol. *Acta Farm Boerense* 2005; 24(4):504-11.
- Neckel G, Nemen D, Puhl AC, Fernandes D, Stimamiglio MA, Silva MA, Hangai M, Silva MCS, Lemos-Senna E. Stealth and non-stealth nanocapsules containing camptothecin: in vitro and in vivo activity on B16-F10 melanoma *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(10):1359-64.
- Nishino S, Kishidab V, Yoshizawa H. Morphology control of polylactide microspheres enclosing irinotecan hydrochloride with polylactide based polymer surfactant for reduction of initial burst *Int J Pharm* 2007; 330(1-2):32-6.
- O'Leary J & Muggia FM. Camptothecins: a review of their development and schedules of administration. *Eur J Cancer* 1998; 34(10):1500-8.
- Onishi H, Machida Y, Machida Y. Antitumor Properties of Irinotecan-Containing Nanoparticles Prepared Using Poly(DL-lactic acid) and Poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol). *Biol Pharm Bull* 2003; 26(1):116-9.
- Shenderova A, Burke TG, Schwendeman SO. Stabilization of 10-hydroxycamptothecin in poly (lactide-co-glycolide) microspheres delivery vehicles. *Pharm Res* 1997; 14(10):1406-14.
- Sinha BK. Topoisomerase inhibitors. a review of their therapeutic potential in cancer. *Drugs* 1995; 49(1):11-9.
- Slichenmyer WJ, Rowinsky EK, Donehover RC, Kaufmann SH. The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(4):271-91.
- Slichenmyer WJ, Von Hoff DD. New natural products in cancer chemotherapy. *J Clin Pharmacol* 1990; 30:770-8.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat Res* 2005; 579:200-13.
- Thompson J, Stewart CF, Houghton PJ. Animals models for studying the action of topoisomerase I targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400:301-19.
- Tonnensen H, Masson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm* 2002; 244:127-35.
- Tyner KM, Schiffman SR, Giannelis SEP. Nanobiohybrids as delivery vehicles for camptothecin. *J Control Release* 2004; 95(3):501-14.
- Wall E, Wani ME. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J Ethnopharmacol* 1996; 51(1):239-54.
- Wender PA, Baryza JL, Brenner SE, Clarke MO, Gamber GG, Horan JC, Jessop TC, Kan C., Pattabiraman K, Williams T. Inspirations from nature. New reactions, therapeutic leads, and drug delivery systems. *Pure Appl Chem* 2003; 75:143-55.
- Yang CS, Lu FL, Cai Y, Zhu BJ, Liang WB, Yang ZC. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J Control Release* 1999a; 59:299-307.
- Yang CS, Lu FL, Cai Y, Zhu BJ, Liang WB, Yang ZC. Body distribution of camptothecin of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *J Control Release* 1999b; 59(3):299-307.
- Yoshizawa H, Nishino S, Shiomori K, Natsugoe S, Aiko T, Kitamura Y. Surface morphology control of polylactide microspheres enclosing irinotecan hydrochloride. *Int J Pharm* 2005; 296(1-2):112-6.
- Zhang L, Hu Y, Jian X, Yang C, Lu W, Yang YH. Camptothecin derivative-loaded poly(caprolactone-co-lactide)-b-PEG-b-poly(caprolactone-co-lactide) nanoparticles and their biodistribution in mice. *J Control Release* 2004; 96:135-48.
- Zunino F, Dallavalle S, Laccabue D, Beretta G, Merlini L, Pratesi G. Current status and perspectives in the development of camptothecins. *Curr Pharm Des* 2002; 8(27):2505-20.