



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE CÁPSULA GELATINOSA MOLE DE
 β -LAPACHONA PARA TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS EM HUMANOS**

GEISIANE MARIA CAVALCANTE ALVES

RECIFE – 2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE CÁPSULA GELATINOSA MOLE DE
 β -LAPACHONA PARA TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS EM HUMANOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas com área de concentração em Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

GEISIANE MARIA CAVALCANTE ALVES
Mestranda

PROF.º Dr. PEDRO J. ROLIM NETO
Orientador

RECIFE – 2004



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 18 de Fevereiro de 2004.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 18 de Fevereiro de 2004 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: 

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: 

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo (Departamento de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba).

Assinatura: 

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Geraldo José Marques Pereira

PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Celso Pinto de Melo

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Silvana Cabral Maggi

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Davi Pereira de Santana

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dalci José Brondani

Dedico este trabalho aos amores da minha vida: meu marido Oscar, meus pais Roseane e Manoel, meu irmão Geison, e a meus avós Gilderto e Aureni (*in memorian*) que me fazem lembrar todos os dias como é bom viver. Obrigada por serem exatamente como são.

AGRADECIMENTOS

Eis, talvez, a parte mais difícil de ser escrita ao se concluir um trabalho como este, foram tantas as pessoas que ajudaram para sua realização que torna difícil relacionar nomes.

À minha família pela capacidade de sempre estarem perto, apesar da distância física que nos separa, em todos os momentos de minha vida.

Ao meu marido Oscar por ser como um anjo em minha vida durante todo esse tempo que estamos juntos.

Ao Prof. Dr. Pedro Rolim pelo acolhimento, orientação e confiança.

À minha amiga Flávia por todo apoio, ensinamento e colaboração nos momentos de dificuldade e de alegria.

Ao Departamento de antibióticos pelo fornecimento da β -Lapachona, em especial a Prof^a. Janete Magali, ao técnico Manoel e a Irapuan, sempre tão prestativo.

A todos que fazem o LAFEPE pelo carinho e convivência. Um abraço especial a Lene, Rosali, Rui, Paulinho, Amanda, Elcy, Luciana, Rose, Graça, Joab e ao pessoal da Coordenadoria de Informática, Paulinho, Luciano, Geovani e Cristiano.

Ao Prof. Davi Santana pela disponibilidade e confiança na utilização dos equipamentos e espaço físico de seu laboratório, e a todos que fazem o NUDFAC.

Ao NCQMC pela permissão em utilizar os equipamentos complementares e a todos que lá trabalham pelo carinho, especialmente à Prof^a. Miracy, Rute e Rosário.

Aos professores Dalcy e Ana Cristina pela colaboração e confiança depositados em mim, e a todos que fazem o LABSINFA.

Ao Prof. Samuel pela ajuda nas análises microscópicas.

A todos da Bioequivalência, em especial a Renato sempre tão atencioso.

À UFRN pela colaboração no ensaio granulométrico, em especial ao Prof. Túlio.

À UFPB pela realização dos ensaios de análise térmica, especial ao Prof. Rui Macedo e a Ticiano pelo acolhimento e boa vontade.

À Prof^a. Fernanda Pimentel pela colaboração nos tratamentos estatísticos.

À Relthy Laboratórios pela parceria, em especial a Ricardo pela atenção e disponibilidade.

Ao professor Lothar pelo conhecimento fornecido na etapa de purificação da matéria-prima, e a todos que trabalham com ele.

À toda equipe do LTM pela colaboração.

Um agradecimento especial a Chico, que se mostrou sempre tão atencioso e prestativo.

As minhas amigas Juliana, Líbia, Flávia e Elisângela pelo apoio, companheirismo e amizade sincera.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente, para que esta etapa de minha vida me trouxesse crescimento profissional e pessoal.

À CAPES pelo incentivo financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
Introdução.....	12
Objetivos.....	14
Revisão da Literatura.....	15
Artigo I:.....	24
Purificação e Caracterização da β-Lapachona e Estudo de Estabilidade dos Cristais em diferentes condições de armazenamento	
Artigo II:.....	38
Análise de pureza da β-Lapachona utilizando Cromatografia em camada delgada e Análise térmica por Calorimetria exploratória diferencial	
Artigo III:.....	45
Validação da metodologia analítica para doseamento e avaliação de pureza da β-Lapachona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	
Artigo IV:.....	56
Desenvolvimento de Cápsula Gelatinosa Mole de β-Lapachona	
Conclusões.....	68
Perspectivas.....	69
Referências Bibliográficas.....	70
Anexos.....	75
Espectro de RMN ¹ H da α -Lapachona	
Espectro de IVTF da α -Lapachona	
Espectro de Ultravioleta da β -Lapachona	
Espectro de IVTF da β -Lapachona	
Espectro de RMN ¹ H da β -Lapachona	
Espectro de RMN ¹³ C da β -Lapachona	
Espectro de Massa da β -Lapachona	
Espectro de RMN ¹ H da β -Lapachona exposta a luz	
Espectro de RMN ¹³ C da β -Lapachona exposta a luz	
Espectro de IVTF da β -Lapachona exposta a luz	
Resumos Apresentados em Congressos	

LISTA DE TABELAS

Artigo I: Purificação e Caracterização da β -Lapachona e Estudo de Estabilidade dos Cristais em diferentes condições de armazenamento

Tabela 01 - Interpretação do Índice de Carr (1967) para fluxo de pós.....	29
Tabela 02 – Resultados, em $\mu\text{g/mL}$, do estudo de estabilidade dos cristais de β -Lapachona em diferentes condições de armazenamento.....	36
Tabela 03 - Tratamento estatístico por análise de variância two-way do estudo de estabilidade dos cristais de β -Lapachona.....	36

Artigo III:

Validação da metodologia analítica para doseamento e avaliação de pureza da β -Lapachona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Tabela 01 - Resultados da robustez.....	49
Tabela 02 - Resultados da análise de variância one-way da robustez.....	50
Tabela 03 - Tempos de retenção da robustez.....	50
Tabela 04 - Resultados da ANOVA da linearidade.....	51
Tabela 05 - Resultados das Precisões Intermediárias.....	51
Tabela 06 - Tratamento estatístico das precisões intermediárias.....	52
Tabela 07 - Resultados da reprodutibilidade.....	52
Tabela 08 - Resultados da exatidão.....	54

Artigo IV:

Desenvolvimento de Cápsula Gelatinosa Mole de β -Lapachona

Tabela 1 - Resultados da solubilidade da β -Lapachona em diferentes solventes.....	63
Tabela 2 - Resultados da dissolução da CG e β -Lapachona em diferentes meios.....	63

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 01 - Estruturas químicas do Lapachol, α -Lapachona e β -Lapachona.....	16
--	----

Artigo I:

Purificação e Caracterização da β -Lapachona e Estudo de Estabilidade dos Cristais em diferentes condições de armazenamento

Figura 01 - Foto da CCD da β -Lapachona padrão secundário e lotes 103, 402 e 702..	30
Figura 02 - Microscopia Óptica dos cristais de β -Lapachona na Objetiva 4x.....	31
Figura 03 - Gráfico da análise granulométrica.....	31
Figura 04 - Cromatograma da β -Lapachona pura.....	32
Figura 05 - Fotos A (25°C), B (148°C), C (151°C), D (153°C), E (154°C), F (156°C), G (230°C) e H Curvas TG/DSC da β -Lapachona.....	33
Figura 06 – Foto da CCD das amostras: Padrão Secundário, Temperatura Ambiente, Dessecador, Refrigerador, Câmara Climática e Exposta a Luz ultravioleta.....	35

Artigo II:

Análise de pureza da β -Lapachona utilizando Cromatografia em camada delgada e Análise térmica por Calorimetria exploratória diferencial

Figura 01 - Curvas de DSC da β -Lapachona lotes 702, 402, 103 e padrão secundário	41
Figura 02 - Curvas de DSC da β -Lapachona lotes 702, 402, 103 e padrão secundário destacando o processo de fusão.....	41
Figura 03 - Fotos do DSC-fotovisual das β -Lapachonas.....	42
Figura 04 - Foto da CCD da β -Lapachona padrão secundário e lotes 103, 402 e 702..	42

Artigo III:

Validação da metodologia analítica para doseamento e avaliação de pureza da β -Lapachona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Figura 01 - Estruturas do Lapachol, α -Lapachona e β -Lapachona.....	47
Figura 02 - Cromatograma da β -Lapachona pura.....	52
Figura 03 - Cromatograma da β -Lapachona contaminada por α -Lapachona.....	53
Figura 04 - Cromatograma da fotodegradação da β -Lapachona em metanol.....	53

Artigo IV:

Desenvolvimento de Cápsula Gelatinosa Mole de β -Lapachona

Figura 01 - Gráfico da estabilidade de longa duração do conteúdo da CGM.....	65
Figura 02 - Gráfica da estabilidade acelerada do conteúdo da CGM.....	65

RESUMO

A β -Lapachona ($C_{15}H_{14}O_3$, MM 242,3), conhecida quimicamente por (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona), é uma ortonaftoquinona de ocorrência natural isolada do ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellandae* Lor), da família Bignoneaceae. Pesquisas recentes têm demonstrado seu excelente potencial antineoplásico, atuando por um mecanismo particular de apoptose contra diversos tipos de câncer humano, em especial neoplasias de ciclo celular muito lento como é o caso de algumas linhagens de próstata refratárias aos tratamentos convencionais. O desenvolvimento de uma forma farmacêutica que produza uma melhor disponibilidade do fármaco para a realização de ensaios clínicos em humanos e a comprovação da eficácia da β -Lapachona em terapias antineoplásicas consiste em um passo de grande interesse para a oncologia clínica. Este estudo propôs o desenvolvimento da forma farmacêutica cápsula gelatinosa mole à base de β -Lapachona, seguindo procedimentos e normas preconizadas pelas Boas Práticas de Fabricação e Controle, a partir de uma planificação qualitativa e quantitativa de excipientes, visando sua incorporação em protocolos de tratamentos quimioterápicos. A etapa inicial foi à caracterização físico-química e farmacotécnica do princípio ativo onde ficou comprovada a importância de se obter uma matéria-prima com alto grau de pureza, sem a presença de seu isômero α -Lapachona. Neste trabalho foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por CLAE (coluna C_{18} , fase móvel acetonitrila:ácido acético 0,25% (1:1), fluxo de 2mL/min, detector a λ 254nm), seguindo os parâmetros descritos na Resolução 899 da ANVISA, que permite quantificar a matéria-prima e o produto acabado, além de impurezas e produtos de degradação. Estudos de estabilidade do princípio ativo demonstraram que a β -Lapachona sofre degradação física em presença de luz fluorescente. Lotes em escala semi-industrial estão sendo realizados para a otimização da formulação desenvolvida de cápsula mole e estabilidade do produto frente a diferentes constituintes de invólucros. Na seqüência será realizada a transposição para escala industrial.

Palavras-Chave: β -Lapachona, caracterização, purificação, validação por CLAE, estabilidade, cápsula gelatinosa mole.

ABSTRACT

The β -Lapachone ($C_{15}H_{14}O_3$, MM 242,3), designated chemically as (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione), is an o-naphthoquinone isolated from the lapacho tree (*Tabebuia avellandae*), of the family Bignoniaceae. Recent researches have been demonstrating its excellent antineoplastic potential, acting against several types of human cancer by a peculiar apoptosis mechanism, especially the ones of very slow cellular cycle, as the case of some prostate lineages resistant to the conventional treatments. The development of a new pharmaceutical form leading to improved drug bioavailability, intending the accomplishment of clinical rehearsals in humans and proving the effectiveness of the β -Lapachone in antineoplastic therapies are subjects of great interest for the clinical oncology. This study proposed the development of β -Lapachone soft gelatin capsules, following the procedures and norms preconized by the Good Manufacturing Practices and Control, starting from a qualitative and quantitative planning of the excipients, regarding its incorporation in quimiotherapeutic treatment protocols. The initial stage consisted into the physicochemical characterization and pharmacotecnics of the active, proving the importance of obtaining a raw material with high degree of purity, without the presence of its isomer α -Lapachone. In this work a HPLC analytical methodology was developed and validated (column C_{18} , mobile phase acetonitrile:acetic acid 0,25% (1:1), flow 2mL/min, detector λ 254nm), following the parameters described at the Resolution number 899 from ANVISA, which allows quantifying the raw material and the finished product, besides impurities and degradation products. Stability studies of the active demonstrated that the β -Lapachone suffers physical degradation in the presence of fluorescent light. Batch in semi-industrial scale are being accomplished for the optimization of the developed soft capsule formulation and stability of the product taking in account different involucre. After that, the transposition to the industrial scale will be performed.

Word-key: β -Lapachone, characterization, purification, validation for hplc, stability, soft gelatin capsules.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Novas drogas provenientes de extratos vegetais são isoladas e identificadas a cada dia e, muitas vezes, servem de modelos para alterações moleculares que resultam em compostos mais eficazes (FÁVARO/1990). Alguns compostos com estruturas químicas já elucidadas podem ser testados quanto à utilização em novos tratamentos, revelando-se agentes com eficácia terapêutica comprovada.

O Lapachol é um fármaco de origem vegetal o qual sua estrutura química e rota de síntese foram estabelecidas por Hooker, em 1896 (D'ALBUQUERQUE/1968), embora novas rotas continuem sendo investigadas (ALVES/1999). Pode ser extraído de diversas plantas (JACOME/1999, KHAN/1999), sendo mais abundante numa árvore tropical conhecida como ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellandae* Lor), da família Bignoneaceae, de ocorrência muito comum no Brasil, que é utilizada inclusive na ornamentação de ruas e praças. Partindo-se do Lapachol chega-se a um derivado semi-sintético, uma quinona conhecida como β -Lapachona, de nome químico 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona. A β -Lapachona pode ser obtida por uma termorreação controlada ou por hidrólise ácida do Lapachol (D'ALBUQUERQUE/1972).

A β -Lapachona tem demonstrado numerosos efeitos farmacológicos, sendo bastante conhecidas suas atividades antibacteriana (D'ALBUQUERQUE/1972), antifúngica (GUIRAUD/1994), antitripanossômica (BOVERIS/1978) e antiviral (FÁVARO/1990). Estudos recentes, demonstrando seu excelente potencial antineoplásico contra o crescimento celular de várias linhagens, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (em modelos animais), estimularam a pesquisa clínica para sua utilização como um quimioterápico antineoplásico (DI GIANNI/1997). Mesmo assim, a β -Lapachona nunca chegou a ser comercializada devido à dificuldade de obtenção de uma forma farmacêutica estável.

As neoplasias têm etiologia ainda pouco conhecida, surgindo quando algumas células de determinado tecido ou órgão começam a se proliferar em velocidade muito superior que a normal, gerando uma massa desordenada que constitui os tumores, benignos ou malignos. O tratamento do câncer depende da localização do tumor, da linhagem de células envolvida e do estágio de desenvolvimento da doença, podendo ser realizado através de cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. A quimioterapia destaca-se por ser, dentre os três, o único método capaz de eliminar as células cancerosas que sofreram metástase (ROBBINS/1996).

Introdução

Os mecanismos de ação dos fármacos envolvidos na terapia antineoplásica ainda não estão totalmente elucidados, não sendo diferente no caso da β -Lapachona. Diversos estudos demonstram a efetividade da β -Lapachona contra câncer de próstata, ovário, mama, pulmão, cólon, pâncreas e alguns tipos de leucemias e linfomas, inclusive algumas linhagens tumorais que se mostraram refratárias às drogas comuns, foram sensíveis à β -Lapachona. Seu modo de ação é diferente do empregado pela maioria das drogas antineoplásicas atualmente disponíveis no mercado. Sabe-se que inibe a DNA Topoisomerase I, inibindo a replicação de células cancerígenas através do bloqueio do ciclo celular nas fases G_0/G_1 e que induz a apoptose, morte celular programada de células cancerígenas, por um mecanismo particular, independente da expressão das proteínas p53, p21 e da super expressão ectópica da proteína bcl-2 (LI/1995, PLANCHON/1995). Estudos recentes propõem um novo mecanismo de ação onde o alvo principal seria a inibição catalítica irreversível da Topoisomerase II por induzir a religação e dissociação da enzima com o DNA na presença de adenosina trifosfato (ATP) (KRISHNAN & BASTOW/2000).

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica necessária para o aprofundamento dos ensaios toxicológicos e clínicos para a comprovação da eficácia da β -Lapachona em terapias antineoplásicas consiste em um passo de grande interesse para a oncologia clínica, por tratar-se de uma nova alternativa terapêutica.

Este trabalho, portanto possibilitou a obtenção da forma farmacêutica cápsula gelatinosa mole à base de β -Lapachona. Foi realizada a caracterização físico-química e farmacotécnica do princípio ativo, onde ficou comprovada a necessidade de investigação da presença de seu isômero α -Lapachona através de algumas técnicas analíticas como cromatografia em camada delgada, análise térmica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Por isso foi desenvolvida e validada, uma metodologia por CLAE que permite quantificar a matéria-prima e o produto acabado, além de impurezas e produtos de degradação. Foi realizado um estudo de estabilidade para determinação das condições de armazenamento do princípio ativo.

Uma vez desenvolvida a forma farmacêutica cápsula gelatinosa mole, esta possivelmente representará além de um avanço no tratamento de alguns tipos de câncer, um impacto na indústria farmacêutica nacional, tendo em vista uma possível comercialização pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco S/A (LAFEPE), o qual já produz seu precursor Lapachol.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O projeto visa o desenvolvimento de cápsula gelatinosa mole à base de β -Lapachona para sua utilização em terapias antineoplásicas em humanos.

Objetivos Específicos

- Caracterização do ativo;
- Purificação e determinação de pureza;
- Estudo da estabilidade do princípio ativo sob diferentes condições de armazenamento;
- Validação de metodologia analítica seletiva para doseamento da matéria-prima;
- Desenvolvimento da tecnologia de obtenção de cápsula gelatinosa mole;
- Definição das especificações de produto acabado;
- Estudo de estabilidade de produto acabado;
- Transposição de escala de produção para lotes semi-industrial.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Características Químicas

As naftoquinonas são compostos orgânicos que possuem como principal característica a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C. Apresentam-se geralmente com estrutura cristalina de cor amarela a vermelha, são amplamente distribuídas na natureza e podem ser extraídas principalmente das famílias Bignoniaceae, Juglandaceae, Ebenaceae, Droseraceae, Boraginaceae, entre outras (JACOME/1999, KHAN/1999, SIMÕES/2000). No Brasil, a família prevalecente é a Bignoniaceae, sobretudo os gêneros *Tabebuia* e *Tecoma*, tendo como nome popular pau-d'arco ou ipê roxo, também conhecido em países latino-americanos como "lapacho" (PIO CORRÊA/1984, OLIVEIRA/1990).

O Lapachol conhecido como 2-hidroxi-3-(3-metil-2butenil)-1,4naftoquinona foi a primeira naftoquinona descrita em 1882 por Paternó (PATERNÓ/1882 *apud* MORRISSON/1970). Sua rota de síntese foi estabelecida por HOOKER em 1896, embora novas rotas continuem sendo desenvolvidas (ALVES/1999).

Em 1956 GONÇALVES DE LIMA, observou que havia uma progressiva diminuição de atividade antibiótica à medida que aumentava o grau de pureza da substância Lapachol, obtida do cerne do ipê roxo (*Tabebuia spp*). Orientados por essa observação chegaram enfim a isolar um dos compostos responsáveis pela maior atividade do Lapachol bruto, a β -Lapachona, dando início a várias pesquisas sobre essa nova descoberta. Mais tarde foi evidenciado que após a absorção gastrintestinal, por administração oral em ratos, o Lapachol é rapidamente metabolizado e grande parte transformado em β -Lapachona, o que impulsionou ainda mais as pesquisas direcionadas para este novo fitofármaco (NAYAK/1968).

A β -Lapachona ($C_{15}H_{14}O_3$, MM 242,3), é uma ortonaftoquinona isômera do Lapachol, conhecida quimicamente por (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona) que apresenta forma cristalina laranja-avermelhada com ponto de fusão característico em 154,5-155,5°C e é estruturalmente estável em pH de 3-9 (SILVA/1997). Por estar presente em pequenas quantidades *in natura*, ela pode ser obtida através de uma semi-síntese do Lapachol através de ação controlada do calor (D'ALBUQUERQUE/1968) ou hidrólise a frio com ácido sulfúrico p.a. (GONÇALVES DE LIMA/1962, D'ALBUQUERQUE/1972). No processo de obtenção por hidrólise ácida tem que

se ter cuidado, pois é comum acontecer contaminações pelo seu isômero paranaftoquinona α -Lapachona conhecida por (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[2,3-b]pirano-5,10-diona). Embora quimicamente estes dois compostos se assemelhem bastante por serem isômeros, a α -Lapachona não apresenta atividade biológica significativa *in vitro* nem *in vivo* (GONÇALVES DE LIMA/1962, SANTANA/1968, LOPES/1978; DOCAMPO/1978) (Figura 01).

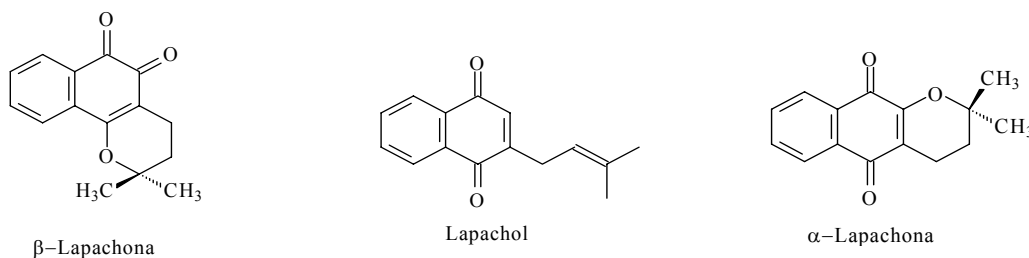


Figura 01 - Estruturas químicas do Lapachol, α -Lapachona e β -Lapachona.

2. Atividades Farmacológicas gerais da β -Lapachona

Diversos estudos vêm atribuindo alguns efeitos farmacológicos a β -Lapachona e tentando esclarecer seus mecanismos de ação.

Os primeiros estudos foram em relação a sua atividade antimicrobiana, relevante principalmente contra alguns Gram-positivos, como *B. subtilis* e *S. aureus*, e Gram-negativos, como os do gênero *Brucella* (GONÇALVES DE LIMA/1962). Em experimentos descritos por D'ALBUQUERQUE em 1968 e 1972, a β -Lapachona demonstrou uma excelente atividade contra diversas cepas tais como *B. subtilis* 9 e 27, *S. aureus* W e ATCC, *Str. Hemolyticus*, *B. anthracis*, *M. citreus*, *Sar. lutea*, *Br. melitensis* ATCC, *Br. Abortus* ATCC e *Br. Suis* ATCC. Já no caso das espécies como *E. coli* N, *K. pneumoniae*, *S. typhosa*, *Sh. P. dysenteriae* e *Ps. aeruginosa* não houve atividade significativa.

Diferente dos resultados obtidos por GONÇALVES DE LIMA em 1962 que não constatou atividade antifúngica significativa para a β -Lapachona, foi comprovado por GUIRAUD em 1994, que os fungos são mais sensíveis à β -Lapachona que as bactérias, demonstrando ser mais eficiente que o cetoconazol utilizado como padrão. Para 9 das 10 espécies estudadas (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum*, *Tricophyton interdigitatum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*) a β -Lapachona apresentou MFC

(Mínima Concentração Fungicida) menor que o cetoconazol e com exceção do *Epidermophyton floccosum*, ela também foi mais eficiente que o Lapachol. Para a *Torulopsis glabrata*, o valor de MFC foi igual, 128 $\mu\text{g/mL}$, para a β -Lapachona, Lapachol e cetoconazol. Segundo o autor essas variações dos resultados encontrados são atribuídas a diferença na parte experimental, particularmente na composição do meio de cultura utilizado nos primeiros experimentos, pois poderia ter inativado as moléculas estudadas, já que estas diferenças de resultados também foram detectadas em relação a outros compostos (CAMPOS-TAKAKI/1992 *apud* GUIRAUD/1994).

DOCAMPO em 1977 em pesquisas *in vitro* sobre epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* verificou que células tratadas com a β -Lapachona apresentavam-se com a cromatina arranjada de forma anormal, além de observações de alterações das membranas citoplasmáticas, nuclear e mitocondrial, com inchaço nas mitocôndrias. Estes resultados sugerem uma ação da β -Lapachona nas membranas biológicas, como também uma redução na taxa respiratória e inibição da oxidação da glucose e do piruvato. A partir destes estudos preliminares foi iniciada a pesquisa da β -Lapachona para o tratamento da infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi*, devido ao seu mecanismo relacionado ao ciclo redox, na tentativa de introduzi-la como um quimioterápico antichagásico (BOVERIS/1978). Foi então observada a capacidade da β -Lapachona de gerar oxi-radicais, induzindo a liberação de O^{2-} (ânion superóxido) e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), pelas células infectadas, que são responsáveis pela desestabilização das membranas dos epimastigotas que em contato com a β -Lapachona promove uma significativa peroxidação de lipídeos. (DOCAMPO/1978 e PAHN/1988). Porém DUBIN em 1990 encontrou resultados diferentes, verificando que a β -Lapachona em concentrações micromolares inibe a peroxidação de lipídeos em microsossomos de fígado de rato catalizadas pelo citocromo P-450. A β -Lapachona possui a capacidade em desarranjar as cromátides do *Trypanosoma cruzi*, provocando degradações de DNA, RNA e proteínas, irreversíveis ou não, dependendo da concentração utilizada (GOIJMAN/1985).

Foi demonstrado por MOLLINA-PORTELA em 1996 que a β -Lapachona cataliza *in vitro* a oxidação da dihidrolipoamida, um agente redutor de quinonas, gerando radicais livres, ocasionando a inibição respiratória celular em parasitos das espécies *Crithidia fasciculata* e *Leptomonas seymouri*.

A β -Lapachona demonstrou ser um inibidor potente, *in vitro*, da atividade da enzima transcriptase reversa dos vírus mieloblástico de avícola e da leucemia de Rauscher, interagindo diretamente com os grupos tiol (-SH) de algumas proteínas enzimáticas, como é o caso das DNA polimerases (SCHUERCH/1978). Estes resultados foram comprovados *in vivo* por SCHAEFFNER-SABBA em 1984, quando foi observado um prolongamento no tempo de sobrevivência de camundongos Balb/c, infectados com o vírus da leucemia de Rauscher tratados com 125mg/Kg via oral de β -Lapachona durante 5 dias por 4 semanas, ao inibir a replicação do RNA. Também foram avaliadas galinhas infectadas pelo sarcoma-vírus de Rous, as quais também apresentaram um prolongamento no tempo de sobrevivência após a administração de β -Lapachona com doses de 31,3 ou 15,6mg/Kg de peso.

Estudos *in vitro* mostram que a β -Lapachona bloqueia a transcrição do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) através de um mecanismo do bloqueio seletivo da expressão gênica da repetição longa terminal viral (LTR) (LI/1993).

3. Câncer x β -Lapachona

Nos organismos multicelulares a taxa de proliferação celular é controlada com precisão por um sistema altamente integrado que permite a replicação apenas dentro dos estreitos limites, que mantêm a população normal em níveis homeostáticos. Como na grande maioria dos tecidos e órgãos há uma divisão celular contínua, através de uma série de eventos bioquímicos conhecidos como ciclo celular, para restaurar as perdas decorrentes do processo de envelhecimento das células, a replicação celular é uma atividade essencial. Porém, essa replicação deve seguir um controle rígido imposto ao sistema, pois se feita para mais ou para menos ocorre uma quebra do equilíbrio. Uma das características principais das neoplasias é justamente a proliferação celular descontrolada. Contudo as neoplasias são proliferações anormais de células que têm crescimento autônomo e tendem a perder sua diferenciação (BRASILEIRO/1998, FUCHS/1998, HARVEY/1998).

Embora as células neoplásicas tendam a apresentar a mesma constituição básica das células normais de origem, pode haver diferenças importantes. As principais características das neoplasias malignas são: morfologia celular menos diferenciada; crescimento ilimitado (alto índice mitótico) insensível aos mecanismos de controle normais que limitam o crescimento e divisões celulares em tecidos diferenciados; menor

adesividade entre as células apresentando uma motilidade considerável podendo se deslocar com facilidade e infiltrar os tecidos adjacentes, penetrar em vasos sanguíneos e linfáticos. Este é o primeiro passo para a sua disseminação à distância com tendência a propagar-se metastaticamente em regiões remotas do organismo, esta invasão de tecidos normais e crescimento entre células normais é o que torna o câncer letal (ROBBIS/96).

A função primária do ciclo celular gira em torno da síntese do DNA para duplicação cromossômica e metas subseqüentes. Como a doença neoplásica maligna é caracterizada por proliferação celular descontrolada, o alvo lógico da quimioterapia é o DNA. A maioria das drogas interferem em sua biossíntese e quebra de estrutura de proteínas vitais associadas com a divisão celular ou produzem danos químicos na molécula, capazes de alterar sua replicação (D'ANGIA/1995, FUCHS/1998, CAMARGO/2000). O mecanismo exato pelo qual esses danos levam à morte celular não é claro. Em algumas células, a exposição a agentes antineoplásicos desencadeia o processo de apoptose (morte celular programada), ao passo que em outras a morte decorre diretamente do dano molecular causado pela droga (D'ANGIA/1995, BRASILEIRO/1998, FUCHS/1998, SILVA/1998, CAMARGO/2000).

A diferença na suscetibilidade de células normais e malignas às drogas citotóxicas associa-se ao fato de que as primeiras, em proporção maior, encontram-se na fase não replicativa do ciclo celular (G_0), onde se mostram menos sensíveis às lesões. Além disso, existem evidências de que células cancerígenas não dispõem de mecanismo de controle (*checkpoints*) do ciclo celular, os quais, em condições normais, favorecem a reparação de lesões causadas por quimioterapia, como quebras em hélices do DNA, deleção de bases e outras. A maioria dos antineoplásicos atua sobre células contidas no ciclo celular que compreende as fases G_1 (pré-sintética), S (síntese e duplicação do DNA), G_2 (pós-sintética) e M (mitose). (RAMOS JÚNIOR/1984, ROBBINS/1996, FAUCI/1998).

No Brasil, o câncer constitui na segunda causa de morte por doença, ficando atrás apenas das doenças do aparelho circulatório, sendo em 2000 responsável por 12,73% dos 946.392 óbitos registrados.

O câncer de próstata é a sexta ocorrência mais freqüente de casos novos de neoplasia maligna no mundo, e a terceira causa de morte mais freqüente entre os homens, representando 9,7% das neoplasias malignas. No Brasil, o câncer de próstata é a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo câncer do pulmão. O aumento observado tanto nas taxas de incidência como nas de mortalidade

pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela dosagem de substâncias produzidas pela próstata: a fração prostática da fosfatase ácida (FAP) e o antígeno prostático específico (PSA); e ao aumento da expectativa de vida da população. Em Pernambuco a taxa estimada é de 26,34 casos de câncer de próstata para cada 100.000 homens (Instituto Nacional do Câncer - INCA).

As causas ainda permanecem obscuras, porém vários estudos mostram que homens com história familiar de câncer de próstata de pai ou irmão antes dos 60 anos de idade pode aumentar o risco de vir ter a doença em 3 a 10 vezes em relação à população em geral. Hábitos alimentares e fatores ambientais também estão relacionados com o surgimento da doença (INCA, ROBBINS/1996, FAUCI/1998).

Na maioria dos casos, o tumor apresenta um crescimento lento, de longo tempo de duplicação, levando cerca de 15 anos para atingir 1 cm³ e acometendo homens acima de 50 anos de idade, o que torna o tratamento mais difícil pois geralmente não se detecta a doença na fase inicial. Por isso é necessária a prevenção através dos exames laboratoriais de homens assintomáticos (INCA, ROBBINS/1996, FAUCI/1998).

Em 1968, SANTANA e cols. verificaram atividade antineoplásica na β -Lapachona, apresentando inibição de crescimento tumoral em tumores experimentais induzidos em ratos. As linhagens testadas foram Carcino-sarcoma de Walker 256 e Sarcoma de Yoshida na dose de 7mg/Kg, via oral, apresentando uma inibição de 33,54% e 16,2 %, respectivamente. O aumento da dose não proporcionou aumento significativo da ação antineoplásica e sim elevação de sinais de toxicidade. Novos estudos foram realizados para avaliação da ação antineoplásica da β -Lapachona em Sarcoma de Yoshida, dessa vez por via intra-peritonal, nas concentrações de 10mg/Kg e 11,5mg/Kg, inibindo 50 e 62% dos tumores, respectivamente (D'ALBUQUERQUE/1972).

BOOTHMAN e cols. em 1987 observaram um sinergismo entre a β -Lapachona e radiosensibilizadores de halogenados de pirimidina em células de carcinoma epidermóide de laringe humano (HEp-2), por inibição do reparo do DNA aumentando assim a letalidade das células. Em 1989, o mesmo autor, utilizando a mesma linhagem de células e células de melanoma maligno humano radioresistente (U1-Mel), tentou definir o mecanismo da inibição do reparo do DNA pela β -Lapachona descobrindo que havia uma ativação da Topoisomerase I das células eucarióticas sem alterar as atividades da Topoisomerase II eucariótica, DNA ligase I e II, ou intercala-se com o DNA. Foi verificado um aumento da sensibilidade dessas células neoplásicas aos Raios

X, semelhante ao que acontece com a Camptotecina, que é um inibidor específico da Topoisomerase I (BOOTHMAN/1989).

FÁVARO e cols. em 1990 realizaram estudos *in vitro* utilizando linhagem celular KB, para avaliação da β -Lapachona, solubilizada em DMF (dimetilformamida), obtendo resultados satisfatórios com DI_{50} de 0,22 $\mu\text{g/mL}$ (dose capaz de inibir o crescimento celular em 50%).

Como o mecanismo de ação da β -Lapachona ainda não era totalmente conhecido, DEGRASSI e cols. em 1993 acreditando que a β -Lapachona era um ativador da Topoisomerase I, investigaram suas ações cromossomais em diferentes estágios do ciclo celular de uma linhagem de células de ovário de Hamster chinês. Os efeitos da β -Lapachona foram dependentes do ciclo celular da célula, onde foi observado na fase S e na fase G_2 , levando a crer que seu mecanismo de ação é muito semelhante ao da Camptotecina, um inibidor da Topoisomerase I. Foi então que Li e cols. no mesmo ano sugeriram que na verdade a β -Lapachona inibe esta enzima, o que foi posteriormente comprovado.

Sabendo que a β -Lapachona inibe a Topoisomerase I, enzima envolvida no processo de replicação celular, e que os inibidores da Topoisomerase I são conhecidos por causarem reações apoptóticas, PLANCHON e cols. em 1995, investigaram a possibilidade da β -Lapachona mediar a apoptose em linhagens de células humanas de próstata, leucemia promielocíticas (HL-60) e de câncer de mama (MCF-7:WS-8). Nas células de câncer mamário, as concentrações utilizadas não resultaram em apoptose detectável. Com as células de câncer de próstata e de leucemia promielocítica resultou no bloqueio do ciclo celular nas fases G_0/G_1 , confirmando a não dependência da expressão de p53 para a apoptose celular mediada pela β -Lapachona, diferentemente do que ocorre no tratamento com topotecam ou camptotecina, que também causam apoptose, mas com bloqueio na fase S do ciclo celular.

A β -Lapachona em concentrações inferiores a $8\mu\text{M}$ induz a morte de células com características apoptóticas, *in vitro*, em linhagem de células de câncer de próstata humano (PC-3, DU145 e LNCaP) e em uma linhagem de células humanas de leucemia promielocítica (HL-60), agindo como um novo inibidor do DNA Topoisomerase I. A indução a apoptose da β -Lapachona é independente da expressão das proteínas nucleares p53 e p21 e da super expressão ectópica da proteína bcl-2, ou seja, por um mecanismo diferente da radiação ionizante e quimioterapia convencional, o que pode

significar maior dificuldade para que estas células desenvolvam resistência ao tratamento com β -Lapachona. Entre outras linhagens de células humanas de carcinoma e adenoma testados, os carcinomas de mama e ovário humanos mostraram sensibilidade ao efeito citotóxico da β -Lapachona sem manifestar sinais de apoptose. Estes resultados sugerem que a β -Lapachona é um composto potencial para ser somada à quimioterapia de câncer, particularmente para câncer de próstata (LI/95).

WUERZBERGER e cols. em 1998 realizaram um estudo comparativo *in vitro* com células de câncer de mama MCF-7:WS8 tratadas com camptotecina (CTP) ou β -Lapachona. Ficou claro que embora ocorresse uma resposta no tratamento com CTP devido a um aumento dos níveis das enzimas nucleares p53/p21, responsáveis por desencadear a apoptose, o percentual de morte celular alcançado foi muito baixo, possivelmente devido à ocorrência de um “checkpoint” no ciclo. A β -Lapachona por sua vez, eliminou as células cancerosas MFC-7, exclusivamente através de apoptose celular, sem induzir uma resposta das enzimas nucleares p53/p21.

A quimioterapia antineoplásica combinada consiste no emprego de dois ou mais fármacos no tratamento do câncer, com diferentes mecanismos de ação, baseia-se no conceito do sinergismo terapêutico. O objetivo principal é evitar o aparecimento precoce de resistência. O uso de associações de antineoplásicos resulta em maior taxa de resposta quando comparado a monoterapia. (FUCHS/1998, HARVEY/1998, SILVA/1998). A associação *in vitro* de β -Lapachona nas concentrações de 2 a 4 μ M, ao taxol nas concentrações de 0,1 e 0,2 μ M, reduziu drasticamente a sobrevivência de uma variedade de células de câncer humano (mama, cólon, pulmão, próstata, pâncreas, melanoma e ovário). Quando utilizadas isoladamente, nas mesmas concentrações, as drogas foram menos efetivas. Ao serem testadas *in vivo*, a β -Lapachona isolada na dose 25-50mg/Kg, via intraperitoneal, reduziu o número de tumores em camundongos imonodeprimidos inoculados com células de câncer de ovário humano. Quando administrada associada ao taxol, os resultados foram mais satisfatórios, observando a ausência quase que total dos nódulos tumorais (LI/1999).

As primeiras comprovações sobre o alvo intracelular da β -Lapachona em células tumorais propõe que sua toxicidade deve-se à expressão da enzima NAD(H):quinona oxidoreductase (NQO1), que atua ativando a cisteína protease (PINK/2000a). No mesmo ano a mesma equipe de pesquisadores afirmou que a β -Lapachona pode induzir pelo menos dois mecanismos apoptóticos diferentes em células de câncer de mama

dependendo da concentração. Em baixas concentrações, a β -Lapachona atua um mecanismo mediado pela caspase, similar a outros inibidores da Topoisomerase I; porém em concentrações mais altas, supõe a existência de um outro mecanismo apoptótico cálcio-dependente, que pode vir a se tornar uma forma de direcionar o tratamento clínico do câncer de mama. Estes resultados podem justificar as diferentes respostas obtidas quando diferentes linhagens são testadas quanto à resposta com a β -Lapachona (PINK/2000b).

KRISHNAN & BASTOW, em 2000 propuseram, *in vitro*, um novo mecanismo de ação para β -Lapachona onde o alvo principal seria a inibição catalítica irreversível da Topoisomerase II por induzir a religação e dissociação da enzima com o DNA na presença de adenosina trifosfato (ATP). Em 2001, os mesmos autores utilizando, *in vitro*, células de tumor de nasofaringe, reafirmaram a ação da β -Lapachona sobre o Topoisomerase II (KRISHNAN & BASTOW/2001).

CHAU em 1998 com o objetivo de demonstrar que a morte e diferenciação da célula induzida pela β -Lapachona tinha um envolvimento do *stress* oxidativo, realizaram estudos em células de leucemia humana (HL-60) comprovando uma elevação considerável de H_2O_2 que em contato com antioxidantes como a N-acetil-L-cisteína preveniu a apoptose induzida, sugerindo que a geração de H_2O_2 intracelular tem um papel crucial na morte celular induzida pela β -Lapachona. O mesmo grupo de pesquisadores em 2001 realizou estudos utilizando células de câncer de próstata humano onde mostraram que a β -Lapachona induz a apoptose independente do *stress* oxidativo na morte celular, sugerido que o dano causado no DNA ocorre por indução da expressão das cinases de proteína dependente de ciclina (com expressões gênicas p21 e p27), com subsequente estimulação de caspase-7 (DON/2001).

Como podemos perceber, apesar de tantas pesquisas ainda há muito para se esclarecer em relação ao exato mecanismo de ação da β -Lapachona e seu alvo intracelular. Tornam-se necessárias pesquisas mais aprofundadas *in vivo* para que seja possível a definição posológica nos tratamentos com β -Lapachona, pois é indiscutível o potencial terapêutico desse novo fitofármaco.

ARTIGO I

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA β -LAPACHONA E ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS CRISTAIS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Geisiane Maria Cavalcante Alves¹, Ana Cristina Lima Leite², Dalci José Brondani², Lothar W. Bieber³, Francisco Jaime B. Mendonça Júnior⁴, Flávia Patrícia Morais de Medeiros^{1,5}, Pedro José Rolim Neto^{1,5}

¹LTM - Dept^o de Ciências Farmacêuticas / UFPE, ² LABSINFA - Dept^o de Ciências Farmacêuticas / UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, CEP: 50740-52; ³ Dept^o de Química Fundamental; ⁴Departamento de Antibióticos / UFPE; ⁵Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos Recife-PE, Brasil, CEP: 52171-010.
e-mail: geisiane_al@hotmail.com, prolim@ufpe.com

- Resumo

A β -Lapachona é um produto obtido do Ipê Roxo que tem demonstrado excelente potencial antineoplásico, agindo por um mecanismo particular de apoptose contra diversos tipos de câncer. O presente trabalho propõe a determinação da carta de identidade da β -Lapachona através da sua caracterização físico-químico e farmacotécnica. Foi realizado um processo de purificação e isolamento de um contaminante onde ficou comprovado tratar-se da α -Lapachona. Através de um estudo de estabilidade foi possível determinar as condições de armazenamento ideais para a β -Lapachona matéria-prima, princípio ativo de interesse para os estudos de pré-formulação para obtenção de diferentes formas farmacêuticas.

- **Palavras Chave:** β -Lapachona; α -Lapachona; Caracterização.

1. Introdução

A β -Lapachona (C₁₅H₁₄O₃, MM 242,3) conhecida quimicamente por 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona, é uma ortonaftoquinona de ocorrência natural isolada do ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellandae* Lor), da família Bignoneaceae, crescente principalmente no Brasil [1-4]. É um produto vegetal simples que tem demonstrado excelente potencial antineoplásico, agindo por um mecanismo particular de apoptose contra diversos tipos de câncer, em especial algumas linhagens de próstata refratárias aos tratamentos convencionais [5-8]. Está sendo desenvolvido

pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco LAFEPE, como parte integrante de seu elenco oncológico, um medicamento a base de β -Lapachona na forma farmacêutica cápsula gelatinosa mole.

Para isso é de suma importância a caracterização físico-química do princípio ativo, pois dessa forma se permite estabelecer a carta de identidade do produto, sendo possível sua padronização e avaliação de pureza, tornando-se adequado para realização de estudos de pré-formulação, principalmente por se tratar de um produto vegetal novo oriundo de uma semi-síntese.

Este trabalho relata métodos específicos para a determinação de pureza da β -Lapachona e sua caracterização físico-química e farmacotécnica, por diversas metodologias.

2. Métodos Experimentais

2.1. Equipamentos

Na purificação dos lotes 402 e 702 de β -Lapachona foram utilizados uma estufa de secagem Fanem[®] Modelo 315/3 e luz ultravioleta Spectroline[®] Modelo ENF-240C para revelação das placas cromatográficas de camada delgada.

Para os testes analíticos realizados na caracterização da β -Lapachona lote 103 foram utilizados os seguintes equipamentos: análises microscópicas - microscópio óptico Zeiss Axiolab[®] com câmara acoplada MC 80; ponto de fusão - fusiômetro Polax[®] WRS-1; umidade por perda por incineração - balança Metter Toledo[®] HB43 Hologen Moisture Analyzer, e por Karl Fischer - Mettler[®] DL-18; análise granulométrica - microscópio óptico Lieka - Leitz Bimed[®] com objetiva de 40x.

O sistema cromatográfico utilizado para o doseamento consiste num cromatógrafo líquido de alta eficiência HP (Hewlett-Packard[®]) Série 1100 equipado com sistema de bombas quaternário, degaseificador por ultra-som, detector UV-VIS e injetor automático, acoplado a um integrador de dados HP 3395 (Hewlett-Packard[®]). A coluna utilizada foi uma Shim-pack 100 CLC(M) ODS (C₁₈) de fase reversa, com 46mm x 25cm e partículas esféricas de 5 μ m de diâmetro (Shimadzu[®]).

As curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC convencional) foram obtidas num calorímetro Shimadzu[®] modelo DSC-50 interligado aos softwares Shimadzu[®] TA-60WS/TA-50WS. O sistema de DSC-fotovisual foi constituído pelo

mesmo equipamento utilizado no DSC convencional acoplado a um microscópio Olympus[®] conectado a uma câmara fotográfica Sanyo[®] de alta resolução modelo VCC-D520, com imagem interligada ao software Intel Smart[®] Vídeo Record II. As curvas de Termogravimetria (TG) foram obtidas numa termobalança Shimadzu[®] modelo TGA-50H.

Os espectros de Infravermelho (IVTF) foram realizados em Espectrofotômetro de IVTF Bruker[®] modelo IFS66 (Fourier Transform-FT) utilizando pastilhas de KBr. O espectro de varredura no Ultravioleta foi obtido em Espectrofotômetro Shimadzu[®] UV-VIS 2401 PC. As Ressonâncias Magnéticas Nucleares Protônicas (RMN¹H) e de carbono 13 (RMN¹³C) foram realizadas em Espectrômetro Varian[®], modelo Unity plus-300MHz, utilizando clorofórmio deuterado (Tedia[®]) como solvente. Para a Espectrometria de Massa (EM) foi utilizado um Espectrômetro Finnigan GCQ Mat tipo quadrupolo íon-trap, acoplado a um cromatógrafo a gás HP[®] 5890 Series II.

Para o estudo de estabilidade dos cristais foi utilizada uma câmara climática Fanem[®] modelo 345, dessecador Satelit[®] HS 320 e refrigerador Electrolux[®] modelo R130.

2.2. Materiais

Foram utilizados dois lotes β -Lapachona matéria-prima, produzidos pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), L. 402 e L. 702, e um lote produzido através da purificação dos dois lotes anteriores, L. 103. Foi utilizado também um Padrão Secundário de β -Lapachona produzido pela UFPE, padronizado a partir do padrão primário Sigma[®] Lote 31K1558.

Na etapa de purificação foram utilizados etanol P.A., acetato de etila e tolueno (Merck[®]) e placas cromatográficas pré-fabricadas com camada adsorvente de dióxido de silício poroso sintético e sílica gel 60 F₂₅₄, depositada em uma lâmina de alumínio (Merck[®]).

Acetonitrila, grau HPLC (Tedia[®]), água ultrapurificada pelo sistema Milli-Q[®] Plus (Millipore[®]) e ácido acético glacial (Merck[®]) foram utilizados para preparação da fase móvel, amostras e curva controle, na realização dos doseamentos.

Membranas tipo HV com 47mm de diâmetro e 0,45 μ m de diâmetro do poro (Supelco[®]) e unidades filtrantes Millex[™] tipo HV com 13mm de diâmetro e 0,45 μ m de diâmetro do poro (Millipore[®]), foram utilizadas para filtração da fase móvel e das

amostras, respectivamente. Papel de filtro quantitativo com $125,0 \pm 1,0$ mm também foi utilizado no preparo das amostras (Framex[®]).

2.3. Processo de Purificação

Os dois lotes de β -Lapachona contaminados, L. 402 e L. 702, foram utilizados para obtenção de um terceiro lote puro, L. 103. Os lotes contaminados foram solubilizados a quente no solvente utilizado no processo de semi-síntese da β -Lapachona, etanol PA. Após recristalização os cristais formados foram filtrados a vácuo e colocados em estufa até completa secagem a 80°C. A pureza foi verificada através da análise de cromatografia em camada delgada (CCD). A fase móvel utilizada foi composta de Tolueno:Acetato de etila (9:1). A revelação das placas foi realizada através de luz ultravioleta a 254nm.

O contaminante foi isolado por cromatografia em coluna de sílica gel, 70-230 mesh, 60 Å (Aldrich Chemical[®]) utilizando o mesmo sistema eluente da CCD e foi identificado por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN¹H) e de Infravermelho (IVTF).

2.4. Caracterização

Toda a caracterização foi realizada com o lote 103 purificado, seguindo as especificações para cada método.

2.4.1. Condições cromatográficas utilizadas para o doseamento

O doseamento foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase móvel foi obtida realizando uma mistura de acetonitrila:ácido acético 0,25% (50:50, v/v). A razão do fluxo da fase móvel foi de 2mL/min, o volume de injeção foi de 20 μ L utilizando um comprimento de onda fixado em 254nm. A coluna deve ser mantida a uma temperatura de 25°C. As amostras de β -Lapachona foram preparadas em acetonitrila com posterior diluição em fase móvel obtendo uma concentração final de 5 μ g/mL.

Para cada corrida cromatográfica realizada, foi feita uma curva de calibração, para obtenção das concentrações das amostras do dia. Inicialmente foi preparada uma solução mãe de β -Lapachona padrão secundário em acetonitrila obtendo-se uma

concentração de $10\mu\text{g/mL}$. Posteriores diluições em fase móvel foram feitas para obtenção das seguintes concentrações: 0,125; 1 e $8\mu\text{g/mL}$.

2.4.2. Estudo Calorimétrico

Antes de iniciar as análises de DSC e DSC-fotovisual o equipamento foi calibrado, em relação à temperatura, com os padrões índio ($156,6^\circ\text{C} \pm 0,2$) e zinco ($419,5^\circ\text{C} \pm 0,3$) através de seus pontos de fusão. O fluxo de calor e entalpia foram calibrados com o calor de fusão do índio ($28,58\text{J/g} \pm 0,30$) usando as mesmas condições das amostras. O fator de correção foi calculado de acordo com os procedimentos e especificações da Shimadzu[®].

A curva de DSC convencional foi obtida com uma atmosfera de nitrogênio de $50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, numa faixa de temperatura de $25 - 400^\circ\text{C}$. As amostras foram colocados em uma célula de alumínio fechada com massa de $2\text{mg} \pm 0,03$. As fotos do DSC-fotovisual foram obtidas com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, numa faixa de temperatura variando $25^\circ\text{C} - 240^\circ\text{C}$, com célula de alumínio aberta.

A curva TG foi obtida em atmosfera de ar sintético com fluxo de $20\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, na razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, numa faixa de temperatura de $25 - 900^\circ\text{C}$, utilizando os softwares Shimadzu TA-60WS / TA-50WS. A amostra foi empacotada numa célula de alumina com massa de 5,12 mg.

2.4.3. Caracterização Farmacotécnica

As propriedades de compactação da β -Lapachona foram obtidas através da determinação da capacidade de compactação, densidade aparente (d_{AP}) e densidade de compactação (d_{CP}). Este ensaio foi realizado com 100g de β -Lapachona em um compactador automático (desenvolvimento local) provido de uma proveta normatizada. O equipamento promove uma compactação do pó através de movimentos verticais repetidos na proveta. O volume inicial (V_0) ocupado pelo produto foi medido, com posterior medição após 10 compactações, necessárias para acomodação do pó (V_{10}), 500 compactações (V_{500}) e 1250 compactações (V_{1250}). Ao final das compactações foi possível a determinação da capacidade de compactação pela subtração de $V_{10} - V_{1250}$, onde valores acima de 20mL são considerados inadequados para manipulação de formas sólidas, pois dificultaria o enchimento de câmaras ou de cápsulas. A relação entre a

massa de β -Lapachona e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação determinou as densidades aparente e de compactação, respectivamente [9].

O Índice de Carr exprime em forma percentual a capacidade de compactabilidade e compressibilidade de um pó ou granulado, é dado pela equação [10]:

$$I_{CARR} (\%) = (d_{CP} - d_{AP}) * 100 / d_{CP}$$

Equação 01 – Determinação do Índice de Carr.

Tabela 01 - Interpretação do Índice de Carr (1967) para fluxo de pós

Índice de Carr (%)	Fluxo
5-15	Excelente
12-16	Bom
18-21	Razoável
23-35	Pobre
33-38	Muito Pobre
>40	Péssimo

Um índice similar, de interpretação mais simples, foi proposto por Hausner (1967):

$$I_{HAUSNER} = d_{CP} / d_{AP}$$

Equação 02 – Determinação do Índice de Hausner

Onde valores menores que 1,25 indicam bom fluxo; valores maiores que 1,5 indicam fluxo ruim; valores entre 1,25 e 1,5 exigem a adição de lubrificantes para melhorar o escoamento [10].

Estes índices são determinações pontuais, exprimindo apenas o potencial de compactação/compressão, e não a facilidade ou velocidade com que estas ocorrem. Para este tipo de avaliação temos o ângulo de repouso e o tempo de escoamento [10].

O ângulo de repouso é um parâmetro que tem como finalidade avaliar a dificuldade que um pó tem para fluir livremente através de um orifício para uma superfície livre. Deixando um pó fluir livremente através de um orifício sobre uma superfície plana, será formado um cone, onde o ângulo da base desse cone é chamado de ângulo de repouso, ou seja, é a relação entre a altura (h) e o raio (r) do cone formado. Considera-se que um pó tem boas propriedades de escoamento quando possui ângulo de repouso igual ou inferior a 30°. Ângulos superiores a 40° sugerem difícil fluxo [9]. Foi determinado pelo cone resultante do escoamento de 100g de pó em um funil normatizado, cuja abertura de

saída encontrava-se a 20 cm de altura, sobre uma folha de papel milimetrado. Foi calculado o valor médio de três determinações. Paralelamente ao ângulo de repouso, foi determinado o tempo de escoamento, onde resultados acima de 10 segundos são considerados com tempo de escoamento infinito.

2.5. Estudo de Estabilidade dos Cristais

Os cristais de β -Lapachona foram colocados em cinco condições de armazenamento diferentes com o propósito de monitorar as instabilidades ocorridas em cada condição: temperatura ambiente protegido da luz, temperatura ambiente exposto à luz fluorescente, dessecador, refrigerador com temperatura de $2 \pm 2^\circ\text{C}$ e câmara climática com temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 5\%$, com o objetivo de aumentar a velocidade de degradação química e modificações físicas.

Os tempos de análises do estudo foram de 0, 30, 60, 90 e 180 dias onde foram realizadas avaliações macroscópicas, microscópicas, por CCD e por CLAE, com os mesmos parâmetros utilizados anteriormente [11].

3. Resultados e Discussão

3.1. Processo de Purificação

Na análise de CCD foi possível verificar a diferença de pureza entre as amostras antes e após o processo de purificação, através da observação da presença de contaminação pelo isômero α -Lapachona, originado no processo de semi-síntese não padronizado da droga, que foi identificado por espectroscopia de RMN¹H e de IVTF estando de acordo com a literatura (ANEXOS 01 e 02) [12, 13]. Foram necessários três ciclos de recristalização para obtenção de uma matéria-prima livre de α -Lapachona quando analisadas por CCD (Figura 01).

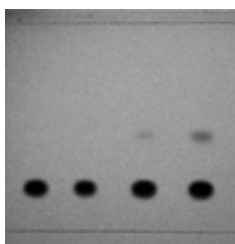


Figura 01 - Foto da CCD da β -Lapachona padrão secundário e lotes 103, 402 e 702.

Propriedades Físicas dos Espectros da α -Lapachona:

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz / δ ppm): 1,43(s, 6H), 1,82(t, j=6,59Hz, 2H), 2,62(t, j=6,59Hz, 2H), 7,65(t,d, j=7,49Hz e j=1,79Hz, 1H), 7,69(t,d, j=7,49Hz e j=1,79Hz, 1H), 8,06(d,d, j=7,19Hz e j=1,79Hz, 1H), 8,09(d,d, j=7,19Hz e j=1,79Hz, 1H)

IVTF (KBr/cm⁻¹): ν C-H (Ar) 2967,3 cm⁻¹, ν C-H (Alif) 2901,0 cm⁻¹, ν C-O-C(Assim.) 1303,7 cm⁻¹, ν C-O-C(Sim.) 1107,0 cm⁻¹, ν C=C 1590,0 cm⁻¹, ν C=O 1650 cm⁻¹

3.2. Caracterização

A β -Lapachona se caracteriza com forma bem definida de cristais aciculares, laranja-avermelhado, visíveis a olho nu (figura 02).



Figura 02 - Microscopia Óptica dos cristais de β -Lapachona na Objetiva 4x.

Os cristais observados no microscópio óptico para análise granulométrica tinham um tamanho praticamente uniforme originando um tamanho médio de 233,1 μ m como observado na Figura 03.

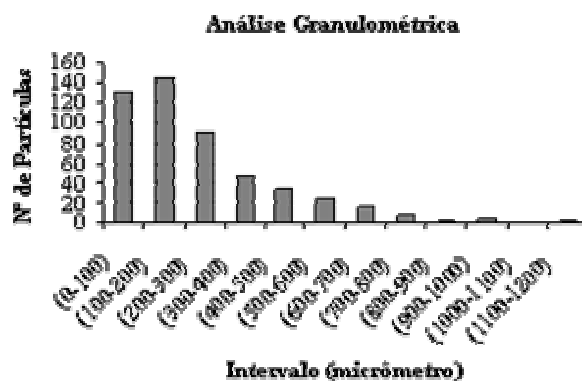


Figura 03 - Gráfico da análise granulométrica.

A umidade residual encontrada no Karl Fischer foi de 0,4247%, enquanto que a encontrada pela perda por dessecação foi de 0,36%. Esses resultados indicam que a β -Lapachona possui uma boa proteção contra alterações que possam ser provenientes de uma higroscopicidade elevada como é o caso de hidrólises.

O teste de metais pesados foi realizado seguindo os métodos gerais da F. Bras. IV estando de acordo com a especificação colorimétrica [14].

O doseamento por CLAE comprovou mais uma vez a pureza da substância obtendo um cromatograma com apenas o pico característico da β -Lapachona, com um teor de 100,77% (Figura 04).



Figura 04 - Cromatograma da β -Lapachona pura.

A curva de DSC mostrou um pico endotérmico característico de fusão em 155,46°C, com um calor de fusão de 91,01J/g e pureza de 99,67% demonstrando uma boa qualidade do processo de purificação da droga. Houve duas etapas de perda de massa detectadas pela curva da TG, a primeira com perda percentual de 70,6% e a segunda com 26,8%. Em seguida ocorreu um processo de decomposição iniciado a 191°C e finalizado em 250°C, confirmado pelo DSC-fotovisual. A faixa de fusão da droga também foi confirmada pelo DSC-fotovisual nas temperaturas de 154,0°C a 156,0 °C, estando de acordo com a literatura e com a análise realizada em fusiômetro que apresentou valores de 154,5°C - 155,4°C [13].

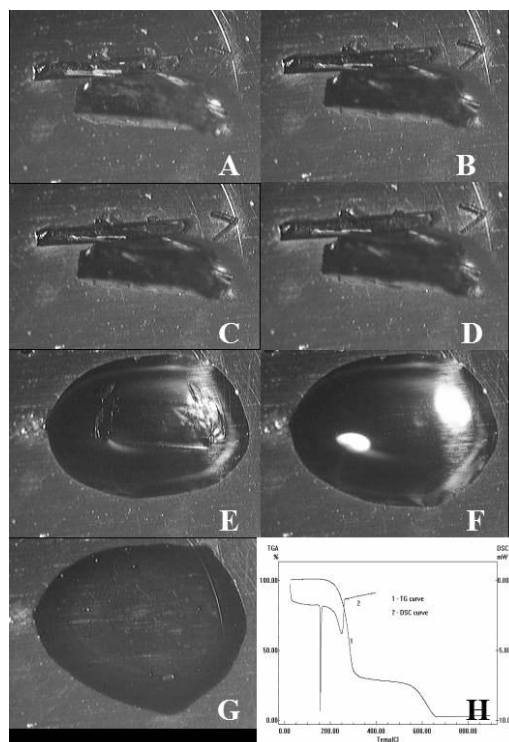


Figura 05 - Fotos A (25°C), B (148°C), C (151°C), D (153°C), E (154°C), F (156°C), G (230°C) e H Curvas TG/DSC da β -Lapachona

As análises da β -Lapachona por Espectroscopia de Infravermelho (IVTF), de Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN¹H) e de Carbono 13 (RMN¹³H) e Espectrometria de Massa (EM) e Ultravioleta confirmaram a pureza e estrutura do composto através de seus picos, absorções e fragmentações características.

O espectro de IVTF da amostra β -Lapachona apresentou banda de absorção característica de deformação axial de C-H aromático e alifático na região de 2977 cm^{-1} e 2909 cm^{-1} respectivamente. Verificou-se a presença de harmônicas de combinação entre 2000 e 1800 cm^{-1} e de banda em 1591 referente a deformação axial C=C do anel. Podem ainda ser destacadas, duas bandas na região de 1313,7 e 1117,0 cm^{-1} correspondentes as respectivas deformações axial assimétrica e simétrica de C-O-C. Foi observado também o sinal na região de 1694 cm^{-1} atribuído a banda de deformação axial de C=O; esta banda de absorção situada numa frequência menor pode ser explicada pela forte influência do ângulo de ligação do anel que contem a carbonila. No caso da β -Lapachona o ângulo é menor que 120 graus [12, 13].

A partir da análise de RMN¹H da amostra foi observado um singlete em 1,448 ppm corresponde aos dois grupos metila. Os prótons dos dois grupos metilênicos do éster cíclico são encontrados na forma de tripleto em 1,84ppm e 2,554 ppm respectivamente.

Os prótons referentes ao anel aromático são encontrados como duplo duplete em 8,034 ppm (mais desblindado pela proximidade com a carbonila), 7,988 ppm, 7,63 ppm e 7,488 ppm.

O espectro de Massa da amostra de β -Lapachona analisado revela o pico do íon molecular (M^+) em m/e 243, com 14% de abundância relativa. O pico de base m/z 159, fragmento iônico proveniente da abertura e rearranjo do ciclo com perda da parte alifática e de C=O.

A varredura espectrofotométrica por absorção Ultravioleta mostrou um espectro idêntico ao obtido na literatura, com pico de absorção máxima em 256,00nm [15] (ANEXO 03).

Propriedades Físicas:

IVTF.(KBr/cm⁻¹): ν C-H (Ar) 2977,3 cm⁻¹, ν C-H (Alif) 2909,3 cm⁻¹, ν C-O-C(Assim.) 1313,7 cm⁻¹, ν C-O-C(Sim.) 1117,0 cm⁻¹, ν C=C 1591,0 cm⁻¹, ν C=O 1694,5 cm⁻¹ (ANEXO 04).

RMN¹H (CDCl₃, 300MHz / δ ppm): δ 1,455ppm(s, 6H), δ 1,841ppm(t, j=6,5598Hz, 2H), δ 2,554ppm(t, j=6,5598Hz, 2H), δ 8,038ppm(d,d, j=7,798Hz e j=1,49Hz, 1H), δ 7,798ppm(d,d, j=7,798Hz e j=1,49Hz, 1H), δ 7,63ppm(t,d, j=7,798Hz e j=1,49Hz, 1H), δ 7,48ppm(t,d, j=7,798Hz e j=1,49Hz, 1H) (ANEXO 05).

RMN¹³C (CDCl₃/ δ ppm): 16,04(CH₂), 26,64(2CH₃), 31,44(CH₂), 79,20(CH), 112,56(CH), 123,98(C), 128,39(CH-ar), 129,95(CH-ar), 130,55(C-ar), 132,47(CH-ar), 134,71(CH-ar), 161,96(C-ar), 178,42(C=O), 179,74(C=O) (ANEXO 06).

ES (m/z, intensidade relativa): 243 (14, M⁺), 227 (10,86, [M⁺-CH₃]⁺), 214 (55,17 [M⁺-C₂H₄]⁺), 159 (100 [C₁₀O₂H₇]⁺), 131 (24 [base - C=O]⁺), 102 (97,35 [C₈H₆]⁺), 91(9 [C₇H₇]⁺), 76 (48,5[C₆H₄]⁺), 50 (42,15 [C₄H₂]⁺) (ANEXO 07).

A β -Lapachona demonstrou uma capacidade de compactação de 6mL, com densidade aparente e de compactação de 0,54 e 0,57 g/mL, respectivamente. Em relação a determinação do Índice de Carr e do Índice de Hausner os valores obtidos foram I_{CARR} = 5,26% e I_{HAUSNER} = 1,06. O resultado encontrado para tangente entre altura e raio

formados pelo escoamento do pó formou um ângulo de $28,73^\circ$ com um tempo de escoamento de 7,66 segundos. Estes valores indicam que apesar da forma cristalina a β -Lapachona apresenta propriedades de fluxo e compactação adequadas para desenvolvimento farmacotécnico.

3.3. Estudo de Estabilidade dos Cristais

Foi verificada uma instabilidade dos cristais expostos à luz fluorescente com mudança da cor de laranja para vinho logo com 30 dias de estudo. Essa coloração se intensificou com o passar do tempo. Ao atingir 180 dias de estudo foram realizadas análises de RMN¹H, RMN¹³C e IVTF, ANEXO 08, 09 e 10, onde ficou comprovado que havia ocorrido apenas uma alteração física de cor, sem alterações químicas detectável pelos métodos utilizados. Os cristais submetidos as outras condições de armazenamento não sofreram alterações visíveis.

Microscopicamente não houve diferença entre a morfologia dos cristais nas condições de armazenamento do estudo realizado nos tempos avaliados.

Através da análise de CCD foi possível perceber que em todas as condições estudadas não houve degradação das amostras em qualquer outra substância capaz de ser identificada através do sistema utilizado, apresentando somente uma mancha com fluorescência laranja característica da β -Lapachona (Figura 06).

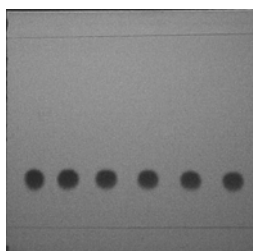


Figura 06 – Foto da CCD das amostras: Padrão Secundário, Temperatura Ambiente, Dessecador, Refrigerador, Câmara Climática e Exposta a Luz ultravioleta.

As análises realizadas por CLAE demonstraram que não houve diferenças significativas entre as condições de armazenamento e os tempos avaliados, quando tratadas estatisticamente por análise de variância two-way, pois o F calculado foi menor que o F crítico com um intervalo de confiança de 95% (Tabelas 2 e 3). Não houve diferença entre os cromatogramas das análises por CLAE, apresentando apenas o pico característico da β -Lapachona como demonstrado no doseamento.

Tabela 02 – Resultados do estudo de estabilidade dos cristais de β -Lapachona em diferentes condições de armazenamento.

Tempo/Condições	Temp. Ambiente ($\mu\text{g/mL}$)	Dessecador ($\mu\text{g/mL}$)	Refrigerador ($\mu\text{g/mL}$)	Câmara Climática ($\mu\text{g/mL}$)	Exposto a Luz ($\mu\text{g/mL}$)
T0	5,003	5,091	5,039	5,086	5,031
T30	5,045	5,056	5,046	5,060	5,042
T60	5,026	5,046	5,088	5,075	5,074
T90	5,070	5,065	5,045	5,021	5,049
T180	5,022	5,060	4,988	4,988	5,034

Tabela 03 - Tratamento estatístico por análise de variância two-way do estudo de estabilidade dos cristais de β -Lapachona.

Fonte de variação	MQ	F calculado	F crítico
Tempo	0,001327	1,18837	3,007
Condições	0,002496	0,8857	3,007
Residual	0,000705		

Conclusão

Os resultados obtidos mostram que o método de purificação utilizado é satisfatório para a obtenção de uma matéria-prima com alta qualidade de pureza, comprovada através da CCD que possibilita a separação do isômero α -Lapachona um contaminante para a amostra em estudo. Dependendo da concentração de contaminação torna-se necessário à repetição do processo para a obtenção de uma matéria-prima pura. O sistema eluente utilizado possibilitou a separação das duas substâncias, sendo possível a identificação do contaminante como α -Lapachona. A matéria-prima purificada apresentou-se com padrões de qualidade para ser utilizada no processo de obtenção de uma forma farmacêutica. O estudo de estabilidade dos cristais de β -Lapachona mostrou que não houve diferença entre as condições avaliadas, com exceção da amostra submetida a exposição à luz que causou uma instabilidade física de coloração, devendo-se assim recomendar manter o produto sempre armazenado em frasco âmbar para evitar este desvio de qualidade.

Referências

- [1] R. Docampo, J.N. Lopes, F.S. Cruz & W.De Souza. *Exp. Parasitol.* 42(1997)142-49.
- [2] S. C. Hooker. *J. Amer. Chem. Soc.* 58 (1936) 1168-73.
- [3] F. S. Cruz, R. Docampo, & W.DeSouza. *Acta Trop.*, 35 (1978) 35-40.
- [4] T. J. Schmidt, A. Miller-Diener & G. Litwack. *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 9536-43.
- [5] J. Li Chiang, et al. *Cancer Research*, 55 (1995) 3712-15.
- [6] B. Frydman et al. *Cancer Research*, 57 (1997) 620-27.
- [7] D.A. Boothman, D.K. Trask & A.B. PARDEE. *Cancer Research*, 49 (1989) 605-12.
- [8] S. M. Phanchon et al *Cancer Research*, 55 (1995) 3706-11.
- [9] L. N. Prista; A. C. Alves & R. Morgado. Tecnologia Farmacêutica. 5^a edição, Editora Calouste Gulbenkian, Vol. I, Porto, (1995) 290-97.
- [10] J. I. WELLS Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances. Chichester: John Wiley & Sons, (1988) 209-14.
- [11] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução 560, de 2 de abril de 2002, Guia para Realização de Estudos de Estabilidade, Diário Oficial da União, Brasília, Brasil, 03/04/2002.
- [12] O. G. Lima, et al. *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife*, 4 (1962) 3-17.
- [13] I. L. D'Albuquerque. *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife*, 12 (1972) 31-40.
- [14] *Farmacopéia Brasileira*, 4^a ed. Atheneu. São Paulo, 1988.
- [15] I. L. D'Albuquerque. *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife*, 8 (1968) 73-87.

ARTIGO II

ANÁLISE DE PUREZA DA β -LAPACHONA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA E ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

Geisiane Maria Cavalcante Alves¹, Ticiano G. Nascimento², Rui Oliveira Macêdo², Flávia Patrícia Morais de Medeiros^{1,3}, Pedro José Rolim Neto^{1,3}

¹LTM - Deptº de Ciências Farmacêuticas / UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, CEP: 50740-52; ²UDEM - Deptº de Ciências Farmacêuticas / UFPB, Campus I, João Pessoa-PB, Brasil, CEP: 58059-900; ³Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos Recife-PE, Brasil, CEP: 52171-010.
e-mail: geisiane_al@hotmail.com, prolim@ufpe.com

- Resumo

A β -Lapachona é um produto vegetal simples que tem demonstrado excelente potencial antineoplásico, agindo por um mecanismo particular de apoptose contra diversos tipos de câncer. O presente trabalho propõe a avaliação de pureza em diferentes lotes de β -Lapachona através da sua caracterização térmica e por cromatografia em camada delgada (CCD). Os estudos de DSC apresentaram curvas com picos endotérmicos de fusão diferentes dependendo do grau de pureza da matéria-prima. Os dados foram confirmados por DSC-fotovisual. O método de CCD possibilitou a separação do isômero α -Lapachona, que é um contaminante para a amostra em estudo.

- **Palavras Chave:** β -Lapachona, CCD, DSC-Photovisual

1. Introdução

A β -Lapachona (C₁₅H₁₄O₃, MM 242,3), é uma ortonaftoquinona de ocorrência natural isolada do ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellandae* Lor), da família Bignoneaceae, crescente principalmente no Brasil, ou pode ser obtida por hidrólise ácida a partir do seu isômero Lapachol, de ocorrência natural mais abundante [1-3]. Devido ao seu mecanismo particular de apoptose contra diversos tipos de câncer, em especial algumas linhagens de próstata refratárias aos tratamentos convencionais, a β -Lapachona tem sido alvo de diversos estudos [4-6].

Por se tratar de um fitofármaco obtido por um processo de semi-síntese, torna-se essencial a determinação da pureza, pois é comum a contaminação do produto com seu isômero α -Lapachona [7].

O estudo calorimétrico é uma ferramenta poderosa no ensaio de pureza e determinação de estabilidade de produtos [8-10]. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é um método onde se mede a diferença de energia absorvida ou liberada a uma substância e um material de referência em função de uma programação controlada de temperatura, verificando as variações das propriedades físico-químicas do produto. O sistema de DSC-fotovisual é uma técnica auxiliar capaz de verificar as variações que ocorrem na amostra durante a exposição a temperaturas elevadas, que não são possíveis de serem detectados só utilizando a técnica de DSC convencional [11-17]. Há poucos estudos térmicos relatados com substâncias naturais isoladas de plantas [18,19].

A cromatografia em camada delgada é uma técnica rápida e prática muito utilizada para separação de compostos, o que depende dos sistemas de solventes e das afinidades diferentes dos solutos pelo adsorvente da placa. Essa afinidade está relacionada com a polaridade. Sob condições constantes qualquer soluto desloca-se com uma razão constante em relação a frente de solvente. Esta razão é conhecida como R_f (frente relativa) [20].

O presente trabalho utilizou técnicas de DSC, DSC-photovisual e CCD como metodologias analíticas para determinação de pureza em diferentes lotes de β -Lapachona.

2. Experimental

Foram utilizados dois lotes β -Lapachona matérias-primas, produzidos pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE): lotes 402 e 702, e outro lote obtido através de um processo de purificação dos lotes anteriores, lote 103. Foi utilizado também um Padrão Secundário de β -Lapachona produzido pela UFPE, padronizado a partir do padrão primário Sigma[®] Lote 31K1558.

2.1. Estudo Calorimétrico

O DSC foi calibrado, em relação à temperatura, com os padrões índio ($156,6^\circ\text{C} \pm 0,2$) e zinco ($419,5^\circ\text{C} \pm 0,3$) através de seus pontos de fusão. O fluxo de calor e entalpia foram calibrados com o calor de fusão do índio ($28,58\text{J/g} \pm 0,30$) usando as mesmas

condições das amostras. O fator de correção foi calculado de acordo com os procedimentos e especificações da Shimadzu®.

As curvas de DSC convencional foram obtidas num calorímetro Shimadzu® modelo DSC-50, com atmosfera de nitrogênio de 50mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, numa faixa de temperatura de 25 - 400°C, interligado aos softwares Shimadzu® TA-60WS / TA-50WS. As amostras foram colocadas em uma célula de alumínio fechada com massa de 2mg \pm 0,03. O sistema de DSC-fotovisual foi constituído pelo mesmo equipamento utilizado no DSC convencional acoplado a um microscópio Olympus® conectado a uma câmara fotográfica Sanyo® de alta resolução modelo VCC-D520, com imagem interligada ao software Intel Smart® Vídeo Record II, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, numa faixa de temperatura variando 25°C - 240°C, com célula de alumínio aberta.

2.2. Cromatografia em Camada Delgada

As análises de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram realizadas usando placas cromatográficas pré-fabricadas da Merck®, com camada adsorvente de dióxido de silício poroso sintético e sílica gel 60 F₂₅₄, depositada em uma lâmina de alumínio. A fase móvel utilizada foi composta de Tolueno:Acetato de etila (9:1) (Merck®). A revelação das placas foi realizada através de luz ultravioleta a 254nm (Spectroline® Modelo ENF – 240C)

3. Resultados e Discussão

3.1. Estudos calorimétricos

As curvas de DSC dos lotes fornecidos e padrão secundário de β -Lapachona avaliados, mostram diferentes picos endotérmico para fusão, que varia dependendo do grau de pureza do produto.

O lote 103, considerado com maior grau de pureza, 99,67%, apresentou um ponto de fusão em 155,46°C com calor de fusão de 91,01 J/g, enquanto que o padrão secundário com pureza de 99,26%, apresentou um ponto de fusão em 156,07°C com calor de fusão de 85,60 J/g, o que demonstra a boa qualidade no processo de purificação da droga. Os dois outros lotes, 402 e 702, contaminados pelo isômero α -Lapachona [7], apresentaram pureza de 98,45%, ponto de fusão em 154,99°C com calor de fusão de 77,51 J/g e

96,99%, ponto de fusão em 153,17°C com calor de fusão de 76,75 J/g, respectivamente (Figure 01 e 02).

Os picos de fusão para as matérias-primas avaliadas estão de acordo com a faixa descrita na literatura [1, 7], com exceção do lote 702 que se apresentou abaixo por consequência de seu grau de contaminação.

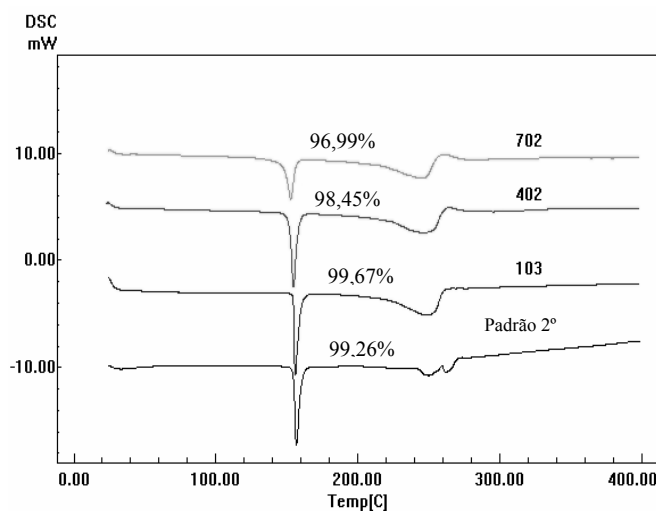


Figura 01 - Curvas de DSC da β -Lapachona lotes 702, 402, 103 e padrão secundário.

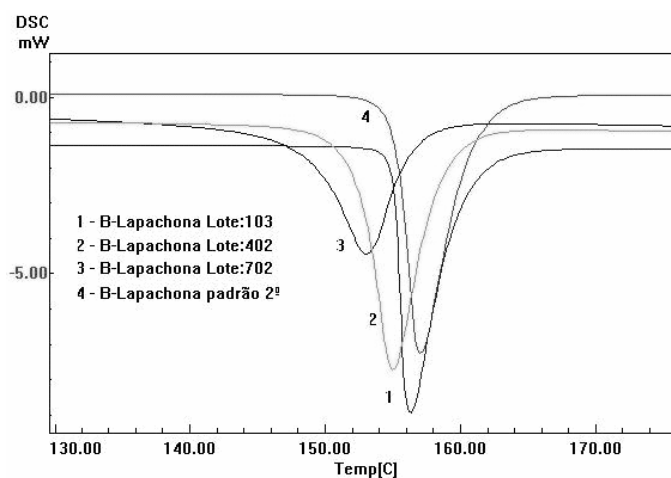


Figura 02 - Curvas de DSC da β -Lapachona lotes 702, 402, 103 e padrão secundário, destacando o processo de fusão.

O DSC acoplado ao sistema fotovisual confirmou os pontos de fusão dos diferentes lotes e padrão secundário de β -Lapachona, sendo possível a visualização da faixa de fusão, que se torna mais extensa a medida que aumenta o grau de impureza. Posteriormente, foi verificada a decomposição do tipo líquido-gás da droga restando somente resíduos carboxilados (Figura 03).

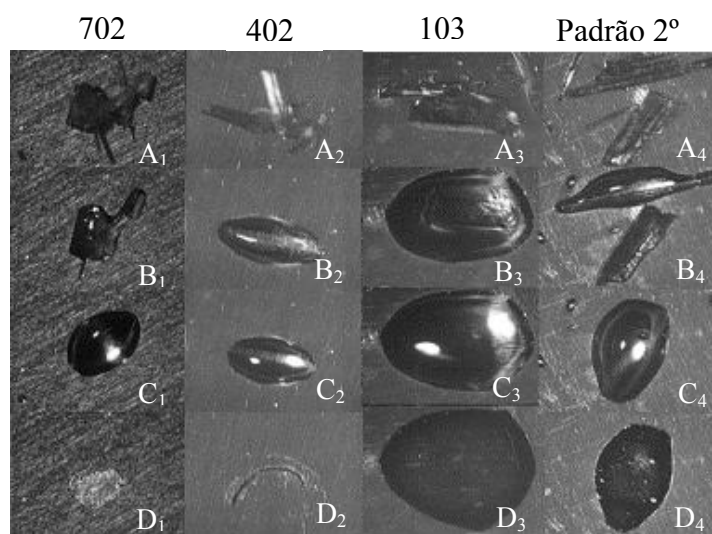


Figura 03 - Fotos do DSC-fotovisual das β -Lapachonas – (A_x) temperatura ambiente, (B_x a C_x) faixa de fusão e (D_x) decomposição. 702: (B₁ a C₁) 150,0°C a 156,0°C e (D₁) 206,0°C - 402: (B₂ a C₂) 151,0°C a 156,0°C e (D₂) 206,0°C - 103: (B₃ a C₃) 155,0°C a 156,0°C e (D₃) 230,0°C - Padrão Secundário: (B₄ a C₄) 154,0°C a 156,0°C e (D₄) 230,0°C.

3.2. Cromatografia em Camada Delgada

A revelação da placa cromatográfica mostra uma boa separação de dois compostos nas amostras com menor grau de pureza, 402 e 702, respectivamente. O primeiro composto apresentou fluorescência laranja, quando observado em lâmpada ultravioleta de 254nm, característico da β -Lapachona com um R_f de 0,25. O segundo composto trata-se de uma contaminação pelo isômero α -Lapachona apresentando uma fluorescência amarela característica, com um R_f de 0,50 [7].

A amostra 103 e padrão secundário apresentaram apenas a mancha característica da β -Lapachona, comprovando a qualidade e pureza do produto (Figura 04).

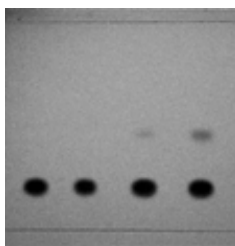


Figura 04 - Foto da CCD da β -Lapachona padrão secundário e lotes 103, 402 e 702.

4. Conclusão

O DSC é um método quali e quantitativo, rápido e confiável na determinação do grau de pureza de fármacos, onde se determina a curva de fusão da amostra originando o percentual de pureza. Quanto maior a concentração de impurezas na amostra, o pico de fusão será mais largo e o calor latente para essa fusão é reduzido. Os dados são confirmados de forma mais clara por DSC-fotovisual.

O método de CCD possibilita a separação do isômero α -Lapachona, que é um contaminante para a amostra em estudo, originado durante o processo de semi-síntese não padronizado [7]. Apesar de apresentar algumas vantagens é um método mais qualitativo para avaliação de pureza.

Os resultados obtidos demonstraram a importância das três análises para a determinação da pureza da matéria-prima e qualidade do produto acabado, que está em fase de desenvolvimento no LAFEPE, na forma farmacêutica de cápsula gelatinosa mole.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM/UFPE), Unidade de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos (UDEM/UFPE), Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos (LABSINFA/UFPE) e ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE/PE).

Referências

- [1] I. L. D'Albuquerque, et al. Rev. Inst. de Antibióticos, Recife, Vol.12 (1972) 31-40.
- [2] A.R. Schuerch and W. Wehrli, Eur J Biochem , 84 (1978) 197-205.
- [3] V.L. Glen, et al, J. Chromatogr. B, 692 (1997) 181-186.
- [4] J. Li Chiang, et al. Cancer Research 55, September 1, (1995) 3712-15.
- [5] C.C. Lai et al. Histo Histopathol, 13 (1998) 89-97.
- [6] B. Frydman, et al. Cancer Res., 57 (1997) 620-27.
- [7] G. O. Lima, et al. Rev. Inst. de Antibióticos, Recife, Vol.4 (1962) 3-17.
- [8] R. O. Macêdo, et. al. J. Thermal Analysis and Cal., 49 (1997) 937-41.
- [9] R. O. Macedo, et. al. Anais da Assoc. Brasileira de Química, 1998.
- [10] R. O. Macêdo, et. al. J. Thermal Analysis and Cal., 56 (1999) 1323-27.
- [11] R. C. Mackenzie. Thermochem. Acta, 28 (1979) 1.

- [12] J. L. Ford, et al. *Pharmaceutical Thermal Analysis Techniques and Applications* (1989) 313.
- [13] D. Giron. *Acta Pharm.*, 40 (1990) 95-157.
- [14] D. Giron. *Reserch Focus*, v. 1, nº 5 (1998) 191-99.
- [15] D. Giron. *Reserch Focus*, v. 1, nº 6 (1998) 262-68.
- [16] L. C. A. Comune. *Lecta Bragança Paulista*, v. 17, nº 2 (1999) 87-94.
- [17] J. Canotilho, et al. *Rev. Portuguesa de Farmácia*, Lisboa, v. 42, nº4 (1992) 5-12.
- [18] R. O. Macêdo, et. al. *J. Thermal Analysis and Cal.*, 59 (2000) 657-61.
- [19] R. O. Macêdo, et. al. 28th Natas - Annual Meeting, Orlando, FL, 2000.
- [20] R. C. Denney. *A dictionary of Chromatography*, 2and edn. Macmillan, London (1982) 161.

ARTIGO III

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO E AVALIAÇÃO DE PUREZA DA β -LAPACHONA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Geisiane Maria Cavalcante Alves¹, Marcílio Sérgio da Cunha Filho¹, Elisângela Afonso de Moura¹, Flávia Patrícia Morais de Medeiros^{1,2}, Pedro José Rolim Neto^{1,2}

¹LTM - Deptº de Ciências Farmacêuticas / UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, CEP: 50740-52; ²Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil, CEP: 52171-010.

e-mail: geisiane_al@hotmail.com, prolim@ufpe.com

- Resumo

A β -Lapachona é uma ortonaftoquinona que tem demonstrando excelente potencial antineoplásico. Estudos na área de tecnologia farmacêutica necessitam do desenvolvimento de um método analítico para quantificação da β -Lapachona. Foi desenvolvido um método de doseamento, por cromatografia líquida de alta eficiência, rápido, exato, preciso e seletivo; o qual foi validado segundo parâmetros descritos pela *International Conference on Harmonization (ICH) Q2b* e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE 899. Um processo de validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. O método desenvolvido consistiu em uma coluna ODS (C_{18}) de fase reversa, com 46mm x 25cm e partículas esféricas de 5 μ m de diâmetro, tendo como fase móvel o sistema acetonitrila-ácido acético 0.25% (50:50; v/v) (pH* 3.61) com fluxo de 2ml/min, detector UV num comprimento de onda 254nm, volume de injeção de 20 μ l e temperatura de 25°C, apresentando um tempo de retenção de 6.9 min. Desta forma, o método demonstrou possuir requerimentos de qualidade, podendo ser incorporado à rotina dos laboratórios de controle, possibilitando um avanço para produção industrial deste fármaco promissor na oncologia.

- **Palavras Chave:** β -Lapachona; α -Lapachona; HPLC; Validação.

1. Introdução

A β -Lapachona ($C_{15}H_{14}O_3$, MM 242,3) é uma ortonaftoquinona com estrutura química diferente das drogas antineoplásicas atuais. De ocorrência natural podendo ser prontamente isolada da planta conhecida popularmente como ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellandae* Lor.), da família Bignoneaceae crescente principalmente no Brasil, ou é facilmente sintetizada do lomatiol, isolada de sementes de lomatiol crescente na Austrália [1-3]. Porém por estar presente em pequenas quantidades *in natura*, é comum a realização de uma semi-síntese do seu isômero Lapachol em β -Lapachona, através de uma termorreação controlada [4] ou hidrólise com ácido sulfúrico a frio [5-7]. (Figura 01).

A β -Lapachona tem demonstrado ter uma variedade de efeitos farmacológicos como agente antiviral [4, 6], antifúngico [4, 7, 8], antiparasitário [9] e uma excelente atividade antineoplásica, especialmente em tumores refratários aos tratamentos convencionais, em particular neoplasias de ciclo celular muito lento, como é o caso do câncer de próstata, cólon e alguns tipos de ovário e mama. Embora o mecanismo exato de sua ação antineoplásica ainda seja obscuro, estudos reportaram que a β -Lapachona possui um modo de ação diferente do empregado pela maioria das drogas antineoplásicas atualmente disponíveis. Atua por inibição da DNA Topoisomerase 1 impedindo a replicação de células cancerosas nas fases G_0/G_1 do ciclo celular e que induz a apoptose, morte celular programada de células cancerígenas, por um mecanismo particular, independente da expressão das proteínas p53, p21 e bcl-2. [2, 5, 10, 11, 12, 13].

Seu isômero α -Lapachona embora quimicamente semelhante a β -Lapachona não apresenta atividade biológica significativa *in vitro* nem *in vivo* [14, 15], e pode ser um contaminante da semi-síntese [7].

Neste trabalho reportamos um método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com fase reversa para determinar a concentração e pureza da β -Lapachona baseado em estudos anteriores relatados por Awang [16]. O método foi validado seguindo os parâmetros descritos nos Compêndios Oficiais, como *International Conference on Harmonization* (ICH) Q2A e Q2b e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE 899 [17, 18, 19].

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais fornecendo evidências documentadas, que o método atenda às exigências das aplicações

analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados [19, 20]. Todos os parâmetros avaliados foram tratados estatisticamente por análise de variância, Teste t de Student e a linearidade pelo método dos mínimos quadrados [21].

Na realização do estudo de estabilidade da β -Lapachona em solução degaseificada contendo álcoois observa-se que quando exposta à luz, a β -Lapachona pode ser reduzida a um radical semiquinona [3].

Sendo assim, os resultados dessa validação mostram que a β -Lapachona pode ser identificada usando a metodologia por CLAE com seletividade para os compostos de degradação e contaminante α -Lapachona, além de apresentar um tempo de retenção curto e viável para a indústria farmacêutica.

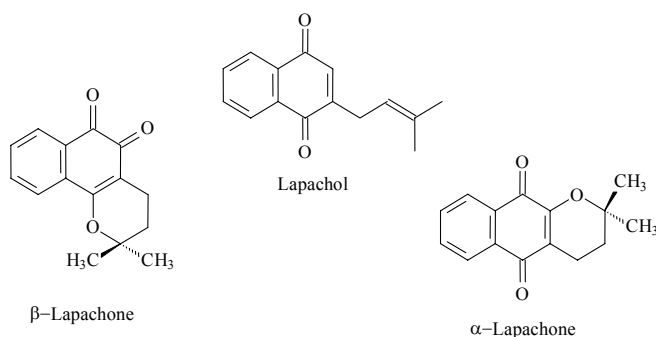


Figura 01 - Estruturas do Lapachol, α -Lapachona e β -Lapachona.

2. Materiais e Métodos

2.1. Equipamentos

O sistema cromatográfico consiste num cromatógrafo líquido de alta eficiência HP (Hewlett-Packard[®]) Série 1100 equipado com sistema de bombas quaternário, degaseificador por ultra-som, detector UV-VIS e injetor automático, acoplado a um integrador de dados HP 3395 (Hewlett-Packard[®]). A coluna utilizada foi uma Shim-pack 100 CLC(M) ODS (C₁₈) de fase reversa, com 46mm x 25cm e partículas esféricas de 5 μ m de diâmetro (Shimadzu[®]).

Para a reprodutibilidade foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] equipado com sistema de bombas quaternário modelo LC - 10AD_{VP}, degaseificador a gás hélio modelo DGU - 2A, detector UV-VIS modelo SPD - 10A_{VP}, forno modelo CTO - 10AS_{VP}, injetor automático modelo SIL - 10ADVP e controlador modelo SCL - 10AVP. Os dados foram tratados através do software Shimadzu[®] Class

VP – V6.12 SP1. A coluna utilizada foi uma LiChrospher 100 RP-18 de fase reversa, com 40mm x 25cm e partículas esféricas de 5 μ m de diâmetro (Merck[®]).

2.2. Materiais

Foram utilizados dois lotes β -Lapachona matéria-prima, um produzido pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) lote 702 (contaminada com α -Lapachona) e outro obtido através da purificação desse lote, lote 103. Para construção da curva controle foi utilizado um Padrão Secundário de β -Lapachona produzido pela UFPE, padronizado a partir do padrão primário Sigma[®] Lote 31K1558.

Acetonitrila, grau HPLC (Tedia[®]), água ultrapurificada pelo sistema Milli-Q[®] Plus (Millipore[®]) e ácido acético glacial (Merck[®]) foram utilizados para preparação da fase móvel, amostras e curva controle.

Membranas tipo HV com 47mm de diâmetro e 0.45 μ m de diâmetro do poro (Supelco[®]) e unidades filtrantes Millex[™] tipo HV com 13mm de diâmetro e 0.45 μ m de diâmetro do poro (Millipore[®]), foram utilizadas para filtração da fase móvel e das amostras, respectivamente.

2.3. Condições Cromatográficas

A fase móvel foi obtida realizando uma mistura de acetonitrila-ácido acético 0.25% (50:50, v/v) (pH* 3.61). A razão do fluxo da fase móvel foi de 2ml/min, o volume de injeção foi de 20 μ l utilizando um comprimento de onda fixado em 254nm. A coluna deve ser mantida a uma temperatura de 25°C.

2.4. Preparação das Amostras

As amostras de β -Lapachona foram preparadas em acetonitrila com posterior diluição em fase móvel obtendo uma concentração final de 5 μ g/ml.

2.5. Construção da Curva de Calibração

Para cada parâmetro avaliado no processo de validação foi feita uma curva de calibração, para obtenção das concentrações das amostras do dia. Inicialmente foi preparada uma solução mãe de β -Lapachona padrão secundário em acetonitrila obtendo-

se uma concentração de 10 μ g/ml. Posteriores diluições em fase móvel foram feitas para obtenção das seguintes concentrações: 0.125, 1 e 8 μ g/ml.

3. Resultados e Discussões

No processo de validação desta metodologia analítica foram avaliados os seguintes parâmetros: robustez, linearidade, precisão, especificidade e seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. A confiabilidade dos parâmetros pode ser observada pelo coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas. Para os estudos realizados foi estipulado um CV % inferior a 2% [19].

3.1. Robustez

Foram analisadas amostras, em triplicata, para os parâmetros: proporção da fase móvel (F.M.), observando a variação do pH, além do fluxo da F.M., pois poderiam resultar em variações deliberadas sobre a resposta do método (Tab. 01).

Tabela 01 - Resultados da Robustez.

Proporção da Fase Móvel	Média (μ g/ml)	CV (%)
Acetonitrila:Ácido Acético 0,25% (55:45) (pH*3.5)	5.0452	0.1193
Acetonitrila:Ácido Acético 0,25% (50:50) (pH*3.61)	5.0374	0.1360
Acetonitrila:Ácido Acético 0,25% (45:55) (pH*3.71)	5.0384	0.2130
Fluxo (ml/min)		
1.5	5.0247	0.0795
2.0	5.0166	0.0925
2.5	5.0261	0.0707

Os valores foram tratados estatisticamente por análise de variância one-way para os dois parâmetros. Nos dois casos o F calculado foi menor que o F crítico mostrando que não há diferenças estatisticamente significativas, num intervalo de confiança de 95%, evidenciando a robustez do método para as condições estudadas (Tab. 02).

Tabela 02 - Resultados da Análise de Variância one-way da Robustez.

Fonte de variação	MQ		F calculado		F crítico
	Proporção da F. M.	Fluxo da F. M.	Proporção da F. M.	Fluxo da F. M.	
Entre grupos	0.0000546	0.0000797	0.826	4.768	5.143
Dentro dos grupos	0.0000661	0.0000167			

Houve um deslocamento esperado do tempo de retenção (T_R) da β -Lapachona quando se variou a proporção da fase móvel devido a mudança da polaridade, quanto mais apolar a fase móvel maior a afinidade da β -Lapachona, sendo menor o T_R . O mesmo aconteceu quando se variou o fluxo da fase móvel, quanto menor o fluxo da fase móvel maior o tempo de interação com a fase estacionária, sendo maior o T_R (Tab. 03).

Tabela 03 - Tempos de Retenções da Robustez.

Proporção da Fase Móvel	T_R (min)
Acetonitrila:Ácido Acético 0,25% (55:45)	5.10
Acetonitrila:Ácido Acético 0,25% (50:50)	6.90
Acetonitrila:Ácido Acético 0,25% (45:55)	9.40
Fluxo (ml/min)	
1.5	9.02
2.0	6.90
2.5	5.40

3.2. Linearidade

A faixa de variação do estudo foi de 2.5% a 160%. O ensaio foi realizado com a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de quatro curvas autênticas contendo 7 pontos nas concentrações de 0.125, 0.250, 0.500, 1, 2, 4 e 8 $\mu\text{g/ml}$.

A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação muito próximo da unidade, R^2 0.99995, afirmando que há correlação linear entre as variáveis X e Y, o que significa que 99,99% da variação total em torno da média é explicada pela regressão, restando 0,01% para ser explicado pelos resíduos. Apresentou coeficiente angular (a) $474284,3 \pm 3215,445$ e coeficiente linear (b) de $6728,509 \pm 11226,34$ com 95% de intervalo de confiança.

A análise de variância dos resultados (ANOVA) esta agrupada na Tab. 04, onde se comprovou a razão linear e o ajuste da curva.

Tabela 04 - Resultados da ANOVA da Linearidade.

Fonte	SQ	GL	MQ	F calculado	F crítico	Conclusões
Modelo	4.43826E+13	1	4.43826E+13	91927.06	4.225	Regressão significativamente representativa
Residual	12552851367	26	482801975.7			
Falta de ajuste	2044115950	5	408823190	0.816967	2.685	Não há falta de ajuste
Erro puro	10508735417	21	500415972.2			
Total	4.43951E+13	27	1.64426E+12			

3.3. Precisão

A precisão foi analisada em três níveis:

- Repetibilidade (precisão intra-corrída): A repetibilidade do método foi verificada pela determinação de 6 amostras autênticas, apresentando uma média de 5.0458 μ g/ml e um CV de 0.4012%.
- Precisão intermediária (P.I.) (precisão inter-corrídas): Para sua determinação foram realizadas análises em 2 dias diferentes com analistas diferentes e os resultados estão descritos na Tab. 05.

Tabela 05 - Resultados das Precisoões Intermediárias.

Precisão Intermediária 1	Média (μ g/ml)	CV (%)
Analista 1	5.0056	0.8284
Analista 2	5.0455	0.1678
Precisão Intermediária 2		
Analista 1	5.0427	0.6811
Analista 2	5.0481	0.5043

Foi realizado tratamento estatístico pelo Teste t de Student entre os analistas e dias, sabendo que a precisão dos analistas era a mesma calculada pelo teste F, para verificar se havia diferença entre as médias. Como t calculado foi menor que o t crítico, observa-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos analistas em dias diferentes, para o mesmo intervalo de confiança (Tabela 06).

Tabela 06 - Tratamento Estatístico da Precisão Intermediária.

Comparações	t calculado	t crítico
Comparação entre o Analista 1 e 2 do 1º dia	0,309	
Comparação entre o Analista 1 e 2 do 2º dia	0,038	
Comparação entre o Analista 1 nos dois dias	0,233	2,776
Comparação entre o Analista 2 nos dois dias	0,024	
Comparação entre o Analista 1 do 1º dia com o Analista 2 do 2º dia	0,285	
Comparação entre o Analista 2 do 1º dia com o Analista 1 do 2º dia	0,023	

- **Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial):** Foi realizada em triplicata comparando os resultados obtidos no Laboratório Farmacêutico da Estado de Pernambuco (LAFEPE) e no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os resultados e o tratamento estatístico por análise de variância one-way estão descritos na Tab. 07, os quais demonstraram que não há diferença entre as análises em laboratórios e equipamentos diferentes, pois F calculado foi menor que o F crítico com um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 07 - Resultados da Reprodutibilidade.

Laboratório	Média ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)	
LAFEPE	5.0105	0.1349	
UFPE	5.0306	0.3054	
Fonte de variação	MQ	F calculado	F crítico
Entre grupos	0.0006073	4.312	7.709
Dentro dos grupos	0.0001408		

3.4. Especificidade e Seletividade

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade foi determinada, em triplicata, pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco) contaminadas com o isômero α -Lapachona e amostras puras, demonstrando que o resultado do teste não foi afetado (Figuras 02 e 03).

Figura 02 - Cromatograma da β -Lapachona pura.



Figura 03 - Cromatograma da β -Lapachona contaminada por α -Lapachona.

Foram realizados também ensaios de fotodegradação da β -Lapachona em metanol, na concentração de $4\mu\text{g/ml}$ por 30 dias de exposição a luz fluorescente, onde ficou claro a separação de um produto de degradação, que segundo a literatura seria a transformação da β -Lapachona em um radical semiquinona [3], o que não aconteceu em amostras na ausência de luz (Figura 04).

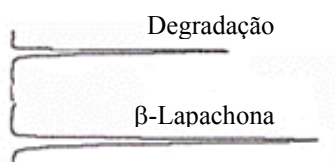


Figura 04 - Cromatograma da fotodegradação da β -Lapachona em metanol.

3.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pela razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares (b) das quatro curvas de calibração dos ensaios de linearidade pelas médias dos coeficientes angulares (a) das respectivas curvas multiplicado por 3 e 10, respectivamente. De acordo com o tratamento descrito os valores de LD e LQ obtidos foram 0.0212 e $0.0707\mu\text{g/ml}$, respectivamente, mostrando que o método é bastante sensível a β -Lapachona.

3.6. Exatidão

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa (50% - $2.5\mu\text{g/ml}$), média (100% - $5.0\mu\text{g/ml}$) e alta (150% - $7.5\mu\text{g/ml}$), com 3 (três) replicatas cada, apresentando-se com média em torno de 100% . Foi realizado tratamento

estatístico pelo Teste t de Student com comparação entre uma média e um valor padrão para cada concentração o que comprovou a exatidão do método com intervalo de confiança de 95% (Tab. 08).

Tabela 08 - Resultados da Exatidão.

Concentração (%)	Recuperação (%) \pm CV (%)	t Calculado	t Crítico
50	99.24 \pm 0.4421	2,959	
100	100.26 \pm 0.1337	0,200	4,303
150	100.04 \pm 0.0295	2,064	

4. Conclusão

O método apresentado é considerado método de escolha para dar continuidade aos estudos realizados com este ativo, visto que os resultados obtidos mostraram que o método atende aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação e Controle, apresentando sensibilidade, especificidade, precisão, robustez, linearidade (faixa de trabalho) e exatidão, o que demonstra a confiabilidade requerida para um método analítico, tão necessário à rotina de análises da Indústria Farmacêutica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM/UFPE), ao Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC /UFPE) e ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE/PE).

Referências

- [1] S.C. Hooker, J Am Chem Soc, 58 (1936) 1181-1190.
- [2] A.R. Schuerch and W. Wehrli, Eur J Biochem , 84 (1978) 197-205.
- [3] V.L. Glen, et al, J. Chromatogr. B, 692 (1997) 181-186.
- [4] I.L. D'Albuquerque, Rev. Inst. de Antibióticos, Recife-UFPE, 8 (1968) 73-87.
- [5] C.J. Li, C. Wang; A.B. Pardee, Cancer Research, 55 (1995) 3712-15.
- [6] I.L. D'Albuquerque, et al, Rev. Inst. Antibióticos, Recife-UFPE, 12 (1972) 31-40.
- [7] O. Gonçalves de Lima, et al, Rev. Inst. Antibióticos, Recife-UFPE, 4 (1962) 3-17.
- [8] P. Guiraud, et al, Letters, In: Planta Med., 60 (1994) 373-374.

- [9] E.M. Pahn, M.P. Molina Portela & A.O.M., *Rev. Argentina Microb.*, 20, n. 3 (1988) 107-118.
- [10] D.A. Boothman, D.K. Trask, A.B. Pardee, *Cancer Research*, 49 (1989) 605-612.
- [11] S.M. Planchon, et al, *Cancer Research*, 55 (1995) 3706-3711.
- [12] D.A. Boothman, S. Greer, A.B. Pardee. *Cancer Research*, 47, (1993) 263-267.
- [13] C.J. LI, L. Averboukh, A.B. Pardee, *The J. Biol. Chem.*, v. 268, n. 30 (1993b) 22463-22468.
- [14] C.F. Santana, et al, *Rev. Inst. Antibióticos, Recife-UFPE*, 8 (1968) 3-17.
- [15] R. Docampo, et al, *Parasitology Research*, v. 57, n. 3 (1978) 189-198.
- [16] D.V.C. Awang, D. Kindack, B.A. Dawson, *J. Chromatogr.*, 368 (1986) 439-443.
- [17] ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Q2A: "Text on Validation of Analytical Procedures" (1994). (<http://www.ifpma.org/ich5q.html#Validation>, Acesso em: 07/01/04).
- [18] ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Q2B: "Validation of Analytical Procedures: Methodology" (1996). (<http://www.ifpma.org/ich5q.html#Validation>, Acesso em: 07/01/04).
- [19] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003, Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Brasil, junho de 2003 .
- [20] U.S. Pharmacopoeia, 25rd U.S. Pharmacopoeia Convention, Rockville, 2002, p.2256-2259.
- [21] B. de Barros Neto, et al. *Como fazer experimentos*. São Paulo: Unicamp, 2001.

ARTIGO IV

DESENVOLVIMENTO DE CÁPSULA GELATINOSA MOLE DE β -LAPACHONA

Geisiane Maria Cavalcante Alves¹, José Ricardo Domingues², Flávia Patrícia Moraes de Medeiros^{1,3}, Pedro José Rolim Neto^{1,3}

¹LTM - Deptº de Ciências Farmacêuticas / UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, CEP: 50740-52; ²Relthy Laboratórios, Av. José Vieira, 446, Distrito Industrial D. Giomi Cx Postal 2200, Indaiatuba-SP, Brasil, CEP: 13347-360; ³Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil, CEP: 52171-010.

e-mail: geisiane_al@hotmail.com, prolim@ufpe.com

- Resumo

A β -Lapachona ($C_{15}H_{14}O_3$, MM 242,3), é uma ortonaftoquinona de ocorrência natural, que também pode ser obtida por hidrólise ácida a partir do Lapachol, isolado do ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellandae* Lor), da família Bignonaceae. Pesquisas recentes têm demonstrado que a β -Lapachona tem excelente potencial antineoplásico. Devido a β -Lapachona se tratar de um princípio ativo com características lipofílicas, a tecnologia para o desenvolvimento de uma formulação estável é um ponto fundamental para a continuidade das pesquisas deste princípio ativo. A forma farmacêutica aqui desenvolvida trata-se de uma cápsula gelatinosa mole de β -Lapachona seguindo procedimentos e normas preconizadas para Boas Práticas de Fabricação na indústria farmacêutica, a partir de uma planificação quanti e qualitativa, visando sua incorporação em protocolos de tratamentos quimioterápicos em pacientes portadores de linhagens de câncer de próstata refratárias, cujo tratamento é dificultado devido ao seu crescimento celular muito lento.

Palavras Chave: β -Lapachona, Cápsulas Gelatinosa Mole, Estabilidade.

1. Introdução

A β -Lapachona ($C_{15}H_{14}O_3$, MM 242,3) é uma ortonaftoquinona, obtida com pequeno rendimento dos extratos alcoólicos e acetônicos da *Tabebuia avellandae* Lor, popularmente conhecida como ipê roxo [1-3]. Uma outra via de obtenção mais eficaz é sua semi-síntese a partir da hidrólise ácida do seu isômero Lapachol, encontrado em maior quantidade naturalmente [4,5]. A natureza lipofílica da β -Lapachona é

responsável por sua baixa solubilidade na água e compostos polares, tornando-se facilmente solúvel em compostos apolares e oleosos [6].

Recentes estudos comprovam a excelente atividade antineoplásica da β -Lapachona, principalmente para as linhagens de câncer refratárias aos tratamentos convencionais, como o câncer de próstata, agindo por um mecanismo diferente dos apresentados por drogas antineoplásicas utilizadas em esquemas terapêuticos. Sabe-se que ela inibe a DNA Topoisomerase I impedindo a replicação de células cancerosas nas fases G_0/G_1 do ciclo celular e que induz a apoptose por um mecanismo particular, independente da expressão das proteínas p53, p21 e bcl-2. Esta inibição provavelmente é mediada por uma interação direta de β -Lapachona com a DNA Topoisomerase 1 no lugar da estabilização de um complexo [7-13].

Apesar de todas as comprovações de seu excelente potencial antineoplásico através dos estudos já divulgados, não há na literatura relatos sobre o desenvolvimento de formas farmacêuticas a base de β -Lapachona.

Esse trabalho vem mostrar o desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida, cápsula gelatinosa mole, que tem como característica principal para sua escolha a possibilidade de seu conteúdo ser constituído por substâncias oleosas, melhor forma de veiculação da β -Lapachona devido as suas propriedades físico-químicas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Equipamentos

Os testes de dissolução das cápsulas gelatinosas foram realizados no Dissolutor Erweka[®] DT 80.

O sistema cromatográfico utilizado consiste num cromatógrafo líquido de alta eficiência HP (Hewlett-Packard[®]) Série 1100 equipado com sistema de bombas quaternário, degaseificador por ultra-som, detector UV-VIS e injetor automático, acoplado a um integrador de dados HP 3395 (Hewlett-Packard[®]). A coluna utilizada foi uma Shim-pack 100 CLC(M) ODS (C_{18}) de fase reversa, com 46mm x 25cm e partículas esféricas de 5 μ m de diâmetro (Shimadzu[®]).

Para o estudo de estabilidade do conteúdo da cápsula mole foi utilizada uma câmara climática Fanem[®] modelo 345, nas condições de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa (UR).

As análises microscópicas foram realizadas em microscópio óptico Zeiss Axiolab[®] com câmara acoplada MC 80.

2.2. Materiais

β -Lapachona purificada lote 103 foi utilizada para a realização de todo o trabalho. Para construção da curva controle, quando necessário a realização de doseamento, foi utilizado um Padrão Secundário de β -Lapachona produzido pela UFPE, padronizado a partir do padrão primário Sigma[®] Lote 31K1558.

Para a preparação das soluções tampões utilizadas na determinação da solubilidade da β -Lapachona foram utilizados os seguintes reagentes: ácido clorídrico, hidróxido de sódio, biftalato de potássio, fosfato de potássio monobásico, cloreto de potássio, ácido bórico, ácido acético glacial e acetato de sódio (Merck[®]). Também para o teste de solubilidade foram utilizados álcool isopropílico, metanol, etanol, acetonitrila diclorometano e clorofórmio (Merck[®]). Também foi utilizado lauril sulfato de sódio (Nuclear[®]) como tensoativo no meio de dissolução.

Acetonitrila, grau HPLC (Tedia[®]), água ultrapurificada pelo sistema Milli-Q[®] Plus (Millipore[®]) e ácido acético glacial (Merck[®]) foram utilizados para preparação da fase móvel, amostras e curva controle, na realização dos doseamentos.

Membranas tipo HV com 47mm de diâmetro e 0,45 μ m de diâmetro do poro (Supelco[®]) e unidades filtrantes Millex[™] tipo HV com 13mm de diâmetro e 0,45 μ m de diâmetro do poro (Millipore[®]), foram utilizadas para filtração da fase móvel e das amostras, respectivamente. Papel de filtro quantitativo com 125,0 \pm 1,0mm também foram utilizados no preparo das amostras (Framex[®]).

Na preparação dos pilotos das cápsulas foram utilizados os seguintes excipientes: Amido 1500 (Colorcon[®]), Sorbitol 70% (Getec[®]), Óleo de amendoim e Óleo de girassol (Gerbras[®]), Óleo de rícino (SMC Pharma Nova[®]), Óleo de rícino hidrogenado (A. Azevedo[®]), Polietilenglicol 400 e Propilenoglicol (Dinalab[®]), Crospovidona 30 (ISP Technologies[®]), Álcool etílico p.a. (Merck[®]), Óleo de soja (Sigma[®]), Óleo de rícino etoxilado 35 e 50 (Croda[®]), Gelatina Farmacêutica Bovina (Gelita do Brasil[®]), Glicerina Bidestilada (Essencial Produtos Químicos Ltda/SP[®]), Metilparabeno e Propilparabeno (MCHEM[®]), Dióxido de Titânio (Sachtleben[®]), Corante Vermelho Ponceau e Corante Amarelo Crepúsculo (Warner Jenkinson[®])

2.3. Condições cromatográficas

A fase móvel foi obtida realizando uma mistura de acetonitrila:ácido acético 0,25% (50:50, v/v). A razão do fluxo da fase móvel foi de 2mL/min, o volume de injeção foi de 20 μ L utilizando um comprimento de onda fixado em 254nm. A coluna deve ser mantida a uma temperatura de 25°C.

2.4. Construção da Curva de Calibração

Para cada corrida cromatográfica realizada foi feita uma curva de calibração, para obtenção das concentrações das amostras do dia. Inicialmente foi preparada uma solução mãe de β -Lapachona em acetonitrila obtendo-se uma concentração de 10 μ g/mL. Posteriores diluições em fase móvel foram feitas para obtenção das seguintes concentrações: 0,125; 1 e 8 μ g/mL.

2.5. Solubilidade

Soluções tampões foram preparadas seguindo a U.S. Pharmacopoeia, 25rd U.S.(2002), para a realização da solubilidade da β -Lapachona: tampões de ácido clorídrico pH de 1,2 a 2,2; tampões de ácido ftalato pH de 2,4 a 4,0; tampões de ftalato neutralizado pH de 4,2 a 5,8; tampões fosfato de potássio monobásico pH de 6,0 a 8,0; tampões borato alcalino pH de 8,2 a 10,0; tampões acetato de sódio pH de 4,5 a 5,5 (Merck[®]) [14]. Foi determinada a solubilidade também numa solução de água:álcool isopropílico (1:1), além dos solventes orgânicos: metanol, etanol, acetonitrila, diclorometano e clorofórmio (Merck[®]).

Para cada solvente foram preparadas amostras em triplicata no solvente estudado, em temperatura ambiente, sonicando por 15 minutos obtendo uma concentração de 500 μ g/mL. Foi realizada uma filtração em papel de filtro quantitativo com posterior diluição em fase móvel obtendo uma concentração final de 5 μ g/mL. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

2.6. Cápsula Gelatinosa (CG)

Com o objetivo de veicular a β -Lapachona numa forma farmacêutica sólida, melhorando sua solubilidade em soluções aquosas foi desenvolvido um piloto de CG contendo 250mg de β -Lapachona e 125mg de amido de milho, com o intuito de se obter

um revestimento dos cristais do ativo, com o agente hidrofílico, aumentando sua molhabilidade [15].

Testes de dissolução foram realizados utilizando como meios de dissolução água, ácido clorídrico (HCl) 0,1N e tampão fosfato de potássio monobásico pH 5,8 e pH 7,4. Para cada meio foram realizados também dissoluções do princípio ativo isolado como objetivo de avaliar a eficiência da formulação em questão. Os parâmetros do teste de dissolução foram 900mL de meio, aparato 2 (pá), 100rpm, $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 60 minutos.

Após a observação dos resultados foi realizado mais um teste de dissolução utilizando como meio água com 1% de lauril sulfato de sódio (LSS) objetivando a diminuição da tensão superficial existente entre o ativo e o meio, aumentando o teor dissolvido de princípio ativo. Os parâmetros do teste foram os mesmos citados acima.

Todas as amostras dos testes de dissolução foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com diluição em fase móvel para atingir a concentração de $2,77\mu\text{g/mL}$.

Mais uma vez após a análise dos resultados pesquisou-se tecnologicamente uma maneira de incrementar o percentual dissolvido da β -Lapachona. Iniciou-se o estudo com uma forma farmacêutica a qual permitisse ter o princípio ativo administrado já dissolvido, sem fugir da forma sólida, motivo para a escolha da forma farmacêutica cápsula gelatinosa mole.

2.7. Cápsula Gelatinosa Mole (CGM)

2.7.1. Desenvolvimento da Cápsula Gelatinosa Mole

Inicialmente foram avaliados alguns compostos oleosos ou que poderiam ser usados como solventes. A concentração de β -Lapachona utilizada variou de 1,0 a 4,0%, onde se observou a solubilidade, formação de cristais ou turvação. Todos os experimentos foram realizados a temperatura de $70 \pm 3^\circ\text{C}$, com o intuito de acelerar a solubilização tendo cuidado para não ocorrer degradação da β -Lapachona.

Foram testados: sorbitol 70%, glicerina, óleo de amendoim, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de rícino, óleo de rícino hidrogenado, óleo de rícino etoxilado 50, óleo de rícino etoxilado 35, propilenoglicol e polietilenoglicol 400.

Após a análise dos resultados foram realizados estudos binários de pré-formulação com modificações quali e quantitativas dos componentes. Foi utilizado como veículo o polietilenoglicol 400 e como solvente e estabilizante da formulação óleo de ricino com grau de etoxilação diferente (35 ou 50), alterando quantitativamente a concentração de β -Lapachona entre 2,0 e 2,5%.

2.7.2. Estudo de Estabilidade do Conteúdo da Cápsula Gelatinosa Mole

Foram avaliados dois tipos de estudo de estabilidade preliminares com o conteúdo da cápsula gelatinosa mole contendo 2,0% de β -Lapachona: 1- Estudo de Estabilidade Acelerada realizado em câmara climática com o objetivo de aumentar a velocidade de degradação química e modificações físicas, usando condições forçadas de armazenamento de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR; 2- Estudo de Estabilidade de Longa Duração realizado a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 5\%$ de UR com o propósito de monitorar as instabilidades nas condições reais de armazenamento [16].

Os tempos de análises para os dois estudos foram de 0, 30, 60, 90 e 180 dias da data de manipulação do conteúdo, onde foram avaliados macroscopicamente e por cromatografia líquida de alta eficiência. As amostras foram preparadas, em triplicata, em acetonitrila e posterior diluição em fase móvel obtendo uma concentração final de $5\mu\text{g/mL}$.

2.3.3. Manipulação da Cápsula Gelatinosa Mole

Após o término dos estudos de estabilidade preliminares com o conteúdo da cápsula, foram realizadas a produção de dois lotes em escala piloto de CGM contendo uma solução oleoso com 2,0% de β -Lapachona em seu conteúdo, com modificações quanti e qualitativas do invólucro. As formulações utilizadas foram desenvolvidas através de uma parceria do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos LTM/UFPE, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco LAFEPE e Relthy Laboratórios Indaituba/SP.

No lote piloto I o invólucro foi composto de gelatina farmacêutica bovina, glicerina como plastificante, conservantes metil e propilparabeno, opacificante dióxido de titânio, corantes vermelho ponceau e amarelo crepúsculo e água destilada.

A preparação da gelatina foi feita sob efeito de vácuo e aquecimento (80°) em reator de aço inoxidável AISI-316 polido e posteriormente armazenada em recipiente de aço

AISI-316, equipado com um termostato para a manutenção das condições ideais de temperatura a 47°C.

O conteúdo foi composto de β -Lapachona, óleo de rícino etoxilado 50 e polietilenoglicol 400. Durante todo o processo de manipulação a temperatura foi mantida em $70 \pm 3^\circ\text{C}$, pois temperaturas superiores podem levar a uma degradação da β -Lapachona. Após a manipulação a solução foi resfriada até atingir 50°C.

O processo de encapsulação foi realizado por gravidade do invólucro e do conteúdo. O invólucro passa por um dispositivo dosador chamado de caixa de espalhamento, responsável por controlar o escoamento da gelatina para os boxes, onde sofre um resfriamento ficando com a temperatura em torno de $5 - 6^\circ\text{C}$, formando fitas de gelatina com espessura controlada 0,9mm. As fitas de gelatina passam por um banho de óleo lubrificante, guiadas pelos rolos orientadores, caindo entre o cunho de injeção e as matrizes rotativas.

O conteúdo a ser encapsulado, por gravidade, cai numa bomba de pistão que bombeia a quantidade adequada a ser encapsulado para o cunho de injeção e as matrizes rotativas. No cunho de injeção é aquecida a $37 - 41,5^\circ\text{C}$ para que ocorra a selagem da cápsula, por pressão e temperatura. Após a manipulação as cápsulas foram transferidas para área de secagem que mantém a temperatura entre $16 - 27^\circ\text{C}$ e umidade de $20 - 80\%$.

O mesmo procedimento foi utilizado para a manipulação do lote piloto II, inclusive a composição do conteúdo da CGM, havendo apenas alteração na composição do invólucro, diminuindo o percentual de água e modificando quali e quantitativamente o plastificante para propilenoglicol.

3. Resultados e Discussões

3.1. Solubilidade

Os resultados da solubilidade estão descritos na Tabela 01 e confirmam a natureza lipofílica da β -Lapachona que é responsável por sua baixa solubilidade em compostos polares, sendo altamente solúvel em compostos apolares.

Não foi possível a determinação da solubilidade nos tampões ftalato pH de 2,4 a 4,0 e ftalato neutralizado pH de 4,2 a 5,8, pois o biftalato de potássio possui o mesmo tempo de retenção que a β -Lapachona interferindo na determinação da área.

Tabela 01 - Resultados da Solubilidade da β -Lapachona em diferentes solventes.

<i>SOLVENTES</i>	<i>TEOR DISSOLVIDO</i>
▪ Tampões USP 25	
- Ácido Clorídrico pH de 1,2 a 2,2	3,00 – 3,75%
- Acetato pH de 4,5 a 5,5	1,25 – 1,5%
- Fosfato pH de 6,0 a 8,0	1,5 – 1,75%
- Borato Alcalino pH de 8,2 a 10,0	2,25%
▪ H ₂ O	0,75%
▪ HCl 0,1N	1,75%
▪ H ₂ O:Álcool Isopropílico	1,5%
▪ Metanol, Etanol, Acetonitrila, Diclorometano e Clorofórmio	100,25 – 101,50%

3.2. Cápsula Gelatinosa

Não houve diferenças significativas entre os meios de dissolução inicialmente avaliados. Com o acréscimo do amido de milho podemos verificar que o teor dissolvido praticamente duplicou em todos os meios avaliados, porém permanecendo um valor inaceitável para uma forma farmacêutica. Quando adicionado LSS ao meio de dissolução obteve-se um teor dissolvido de aproximadamente 45% (Tabela 02). A análise dos dados foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 02 - Resultados da Dissolução da CG e β -Lapachona em diferentes meios.

Meio de dissolução	β -Lapachona (Teor dissolvido)	Cápsula (Teor dissolvido)
Água destilada	7,1%	15,3%
HCl 0,1N	8,0%	14,7%
Tampão Fosfato pH 5,8	7,0%	14,9%
Tampão Fosfato pH 7,4	6,9%	14,3%
Água + 1% de LSS	-	44,20%

3.3. Cápsula Gelatinosa Mole

3.3.1. Desenvolvimento da Cápsula Gelatinosa Mole

A β -Lapachona na concentração de 2,0% não foi solúvel nos seguintes solventes: sorbitol 70%, glicerina, óleo de amendoim, óleo de girassol e óleo de soja. No

propilenoglicol após o resfriamento da solução houve formação de cristais. Já no óleo de rícino hidrogenado ocorreu uma solidificação da solução após o resfriamento.

No óleo de rícino, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0% de β -Lapachona, não houve formação de cristais, formou cristais com 3 dias e formou cristais imediatamente o resfriamento, respectivamente. No polietilenoglicol 400, nas concentrações de 2,0; 3,0 e 4,0% de β -Lapachona, houve formação de cristais com 15 dias, 3 dias e imediatamente o resfriamento, respectivamente. Nos óleos de rícino etoxilados 35 e 50, na concentração de 2,0%, houve formação de cristais com 5 e 15 dias, respectivamente.

Foram avaliadas seis formulações todas utilizando polietilenoglicol 400 como veículo. Em quatro dessas formulações foram variados a concentração de β -Lapachona, o grau de etoxilação do óleo de rícino e concentração desse óleo. As duas formulações onde se utilizou o óleo de rícino etoxilado 35 houve uma separação de fases. Por isso foi escolhido o óleo de rícino etoxilado 50 para prosseguir com os estudos, pois com ele não houve turvação, separação de fases, nem formação de cristais, na formulação com 2,0% de β -Lapachona.

Com o objetivo de aumentar a concentração da β -Lapachona, na formulação com óleo de rícino etoxilado 50, foi utilizado álcool p.a. como co-solvente, porém houve formação de cristais com 3 dias. Foi utilizada a crospovidona 30 na tentativa de melhorar a estabilidade da formulação, porém ela não foi solúvel.

Ficou definido que a formulação ideal para dá início aos estudos de estabilidades do conteúdo da CGM seria a composta de polietilenoglicol 400 como veículo, óleo de rícino etoxilado 50 como solvente e estabilizante e β -Lapachona como o ativo na concentração de 2,0%.

3.3.2. Estudo de Estabilidade do Conteúdo da Cápsula Gelatinosa Mole

Não houve instabilidade macroscópica nos dois modelos de estabilidade realizados nos tempos avaliados, permanecendo uma solução límpida de cor laranja forte, sem apresentar turvação, separação de fases ou cristalização.

Foi observado um decaimento acentuado no teor de β -Lapachona com 60 dias na câmara climática (modelo acelerado), porém com 90 dias ocorreu a mesma perda de teor na condição ambiente de armazenamento (modelo de longa duração) (Figuras 01 e 02).

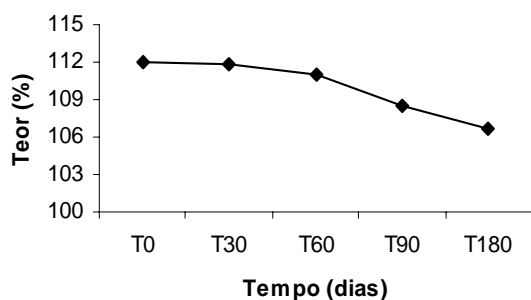


Figura 01 - Gráfico da Estabilidade de Longa Duração do Conteúdo da CGM.

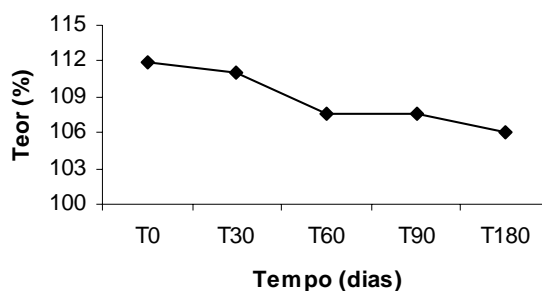


Figura 02 - Gráfico da Estabilidade Acelerada do Conteúdo da CGM.

Ao final do estudo de estabilidade acelerada foi possível verificar uma perda de 5,28% do teor de β -Lapachona e 4,72% na estabilidade de longa duração, o que leva a crer que o produto está apto a ser colocado em escala semi-industrial e industrial para desenvolvimento da CGM.

3.3.3. Manipulação da Cápsula Gelatinosa Mole

Antes de iniciar o processo de encapsulação, o conteúdo da cápsula foi analisado microscopicamente, apresentando-se como uma solução límpida e viscosa com cor laranja forte.

Após o processo de encapsulação do lote piloto I observou-se, macro e microscopicamente, a formação de cristais de β -Lapachona no conteúdo da CGM. Os cristais se apresentaram com a forma original da β -Lapachona em tamanho menor. Esse processo de cristalização deve-se provavelmente a uma instabilidade física ocorrida entre o conteúdo e o invólucro da cápsula, devido ao elevado teor de água da composição do invólucro que no momento da manipulação passa para o conteúdo, além da baixa solubilidade da β -Lapachona na glicerina.

No lote piloto II, devido as alterações do invólucro, não houve instabilidade no processo de encapsulação, originando uma cápsula gelatinosa mole oblonga tamanho 22 de cor laranja opaca, que encontrasse em fase de otimização.

4. Conclusão

O teste de dissolução de formas farmacêuticas sólidas reflete *in vitro* o processo de absorção *in vivo*. Devido sua forma lipofílica a β -Lapachona apresenta uma baixa solubilidade em compostos aquosos o que afeta sua dissolução quando veiculada na forma de cristais levando a uma dificuldade de absorção, impossibilitando a manipulação de uma CG.

Por outro lado sua solubilidade em óleo facilita o desenvolvimento de Cápsula Gelatinosa Mole que tem como característica apresentar em seu conteúdo substâncias não aquosas, normalmente composto por óleos ou outra substância viscosa, como os polietilenoglicóis, se tornando uma maneira prática, precisa e segura de se obter uma forma farmacêutica sólida a partir de uma composição líquida. Porém, tem-se que levar em consideração também o invólucro, pois dependendo de sua composição pode ser fonte de instabilidade da forma farmacêutica final.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE/PE), ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM/UFPE), ao Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC /UFPE) e a Relthy[®] Laboratórios (Indaiatuba/SP).

Referências Bibliográficas

- [1] Hooker S.C., et al. (1936). J Am Chem Soc. 58: 1181-90.
- [2] Gonçalves de Lima, O., et al. (1956) An. Soc. Biol. PE. v. XIV, n. 1/2: 136-40.
- [3] Schaffner-Sabba, K., et al. (1984) J. Med. Chem. 27: 990-4.
- [4] D'Albuquerque, I.L.; et al. (1972) Rev. Inst. Antibiótico, Recife-UFPE. 12: 31-40.
- [5] Gonçalves de Lima O., et al. (1962) Rev. Inst. Antibióticos, Recife-UFPE. 4: 3-17.
- [6] Glen, V.L. et al. (1997) J Chromatogr. B. 692: 181-6.
- [7] Li, C.J., C. Wang & A.B. Pardee. (1995). Cancer Research. 55: 3712-15.
- [8] Li, C.J., L. Averboux & A.B. Pardee. (1993). J. Biol. Chem. 268: 22463-8.
- [9] Planchon, S.M., et al. (1995). Cancer Research. 55: 3706-11.
- [10] Boothman, D.A., S. Greer & A.B. Pardee. (1993) Cancer Research. 47: 263-7.
- [11] Boothman, D.A., D.K. Trask & Pardee, A.B. (1989) Cancer Research. 49: 605-12.
- [12] Wuerzberger, S.M., et al. (1998) Cancer Research. 58: 1876-85.

- [13] Meng, R.D. & El-Deiry, W.S. (2001) *Experimental Cell Research*. 262: 154-69.
- [14] U.S. Pharmacopoeia, 25rd U.S. Pharmacopoeia Convention, Rockville, 2002: 2340-41.
- [15] Alves, F.C. Desenvolvimento de Formas Farmacêuticas de β -Lapachona para Utilização em Terapias Antineoplásicas. 2002. 142 páginas. Dissertação (Mestrado) - UFPE, Recife.
- [16] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução 560, de 2 de abril de 2002, Guia para Realização de Estudos de Estabilidade, Diário Oficial da União, Brasília, Brasil, 03/04/2002.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O método de purificação utilizado foi satisfatório para a obtenção de uma matéria-prima com alta qualidade de pureza, comprovada através da cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e análise térmica por calorimetria exploratória diferencial convencional e acoplada ao sistema fotovisual.

Foi realizada a separação do contaminante da amostra em estudo por cromatografia em coluna utilizando o sistema eluente tolueno:acetato de etila (9:1). Sendo possível sua identificação como o isômero α -Lapachona por ressonância magnética nuclear protônica e de carbono e por infravermelho.

A matéria-prima purificada apresentou-se com padrões de qualidade para ser utilizada no processo de obtenção de uma forma farmacêutica, onde foi estabelecida a carta de identidade deste novo princípio ativo.

O estudo de estabilidade dos cristais de β -Lapachona em diferentes condições de armazenamento mostrou que quando exposta à luz a β -Lapachona sofre uma instabilidade física com mudança de coloração, devendo-se assim recomendar manter o produto sempre armazenado em frasco âmbar para evitar este desvio de qualidade. Por outro lado, a β -Lapachona foi estável em temperaturas de 2°C, 40°C com 75% de umidade relativa, em condições ambientes e em dessecador.

O método analítico de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido e validado atendeu aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação e Controle, apresentando sensibilidade, especificidade, precisão, robustez, linearidade (faixa de trabalho) e exatidão propostas pela ICH e ANVISA.

Devido sua característica lipofílica a β -Lapachona apresenta uma baixa solubilidade em compostos aquosos o que afeta sua dissolução. Por outro lado, possui uma boa solubilidade em óleo, o que possibilitou o desenvolvimento de Cápsulas Gelatinosas Mole que se encontra em fase de otimização.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

- Otimização da Cápsula mole, com modificação na composição do invólucro;
- Validação da metodologia analítica de doseamento para produto acabado;
- Realização de estudo de estabilidade acelerado e de longa duração do produto acabado a partir de diferentes composições de invólucros;
- Transposição de escala de produção para lote industrial;
- Estudo de pré-formulação de uma solução injetável de pequeno volume a base de β -Lapachona;
- Desenvolvimento, validação e estabilidade da metodologia bioanalítica para estudo de biodisponibilidade em plasma da β -Lapachona;
- Realização de ensaios clínicos em humanos portadores de câncer de próstata, em estados avançados não respondendo mais a terapias convencionais. Serão selecionados pacientes do Hospital Sírio-Libanês em São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C. G. B.; LOPES, R. S. C.; LOPES, C. C.; SNIECKUS, V. Two expedient synthesis of beta-Lapachone. *Synthesis- Stuttgart*. v.11, n.11, p. 1875-1877. Nov,1999.
- BOOTHMAN, D.A.; TRASK, D.K. & PARDEE, A.B. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by β -Lapachone, na activator of Topoisomerase I. *Cancer Research*. 49:605-612. Feb, 1989.
- BOVERIS, A.; et. al. Superoxide anion production and trypanocidal action of naftoquinones on *Trypanossoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol*. v. 61, p. 327-329. 1978.
- BOVERIS, A.; STOPPANI, A. O. M.; DOCAMPO, R. & CRUZ, F. Superoxide anion production and trypanocidal action of naftoquinones on *trypanossoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol*. 61:327-329. 1978.
- BRASILEIRO, Geraldo Filho. Bogliolo Patologia Geral. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, cap. 08.
- CAMARGO, Beatriz de & LOPES, Luiz Fernando. Pediatria Oncologica: noções fundamentais para a pediatria. São Paulo: Lemar, 2000, caps. 02, 03, 04, 08, 11 e 15.
- CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STEIMAN, R.;SEIGLE-MURANDI, F.;SILVA, A.A.; BIEBER, L. Rev. Microbiol. São Paulo, 23 (1992) 106-11. *apud* GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; TAKAKI, G. M. C.; MURANDI, F. S. & BUOCHBERG, M. S. Comparison of antibacterial and antifungal activities of Lapachol and β -Lapachone. Letters, In: *Planta Med*. 60: 373-4. 1994.
- CHAU, Y.P.; SHIAH, S.G.; DON, M.J.; KUO, M.N. Involvement of hydrogen peroxide in Topoisomerase inhibitor β -Lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radical Biology & Medicine*. V.24, nº4 (1998) 660-70
- D'ALBUQUERQUE, I. L. Termorreação da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. *Rev. Inst. Antibiótico. Recife/UFPE*. 8 (1/2): 73-87. Dez, 1968.
- D'ALBUQUERQUE, I. L.; MACIEL, M. C. N.; SCHULER, A. R. P.; ARAÚJO, M. C. M.; MACIEL, G. M.; CAVALCANTI, M. A. B.; MARTINS, D. G. & LACERDA, A. L. Preparação e primeiras observações sobre as atividades antibióticas e

Referências Bibliográficas

- antineoplásicas das naftoquinonas homólogas inferiores da série da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (Lapachol). *Rev. Inst. Antibiótico. Recife/UFPE*. 12 (1/2): 31-40. Dez, 1972.
- D'ANGIA, GIULIO, et al. Pediatria Oncológica Prática, Tradução comentada e adaptada pelo Departamento de Pediatria do Hospital A. C. Camargo. Rio de Janeiro: Revinter, 1995, caps. 03, 16, 33 e 35.
- DEGRASSI, F.; DE SALVIA, R.; BERGHELLA, L. The production of chromosomal alterations by β -Lapachone, an activator of Topoisomerase I. *Mutation Research*. V. 288, p. 263-267. 1993.
- DI GIANNI, P.; FRANCO, M.; BUSTUOABAD, O. D. & RUGGIERO, R. β -Lapachona: una naftoquinona com actividad antitumoral *in vivo*. *Bol. Acad. Nac. Med. B. Aires*. 75(1): 145-52. 1997.
- DOCAMPO, R.; et al. Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naftoquinones in different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Z. Parasitenkunde – Parasitology Research*. v. 57, n. 3, p. 189-198. 1978.
- DOCAMPO, R.; LOPES, J.N.; CRUZ, F.S.; SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by β -Lapachone. *Experimental Parasitology*. V. 42, nº1, (1977) 142-49.
- DON, MING-JAW; CHANG, YEN-HWA; CHEN, KUANG-KUO; HO, LI-KANG & CHAU, YAT-PANG. Induction of CDK Inhibitors (p21^{waf1} and p27^{Kip1}) and Bak in the β -Lapachone-Induced Apoptosis of Human Prostate Cancer Cells. *Molecular Pharmacology*. V.59 (2001) 784-94.
- FAUCI, Anthony S.; BRAUNWALD, Eugene; ISSELBACHER, Kurt J.; WILSON, Jean D. & MARTIN, Joseph B. Harrison, Medicina Interna. Guanabara Koogan. 14ªed. Rio de Janeiro, Vol. 1 (1998), caps. 81 a 87 e 97.
- FÁVARO, O. C. N.; OLIVEIRA, M. M.; ROSSINI, M. M. A.; KAMAKURA, C. R.; PINTO, A. V. & PINTO, M. C. F. R. Seleção por meio de células KB de substâncias e extratos potencialmente ativos em quimioterapia do câncer. *An. Acad. Bras. Ci.* 62(3): 217-24. 1990.
- FUCHS, Flávio Danni & WANNMACHER, Lenita. Farmacologia Clínica – Fundamentos da Terapêutica Racional. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

Referências Bibliográficas

- GOIJMAN, S. G.; FRASCH, A. C. C. & STOPPANNI, A. O. M. Inducción de alteraciones en el DNA del *Trypanosoma cruzi* por agentes tripanocidas. *Revista Argentina de Microbiologia*. 16: 75-86.1984.
- GOIJMAN, S.G.; STOPPANI, A.O. Effects of beta-Lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* V.240, nº1, (1985) 273-80.
- GONÇALVES DE LIMA, O.; et al. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores – Comunicação XX: Atividade antimicrobiana de alguns derivados do Lapachol em comparação com a xiloidona, nova orto-naftoquinona natural isolada de extratos do cerne do “Pau d’Arco” roxo, *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife-UFPE*. v. 4 n. 1-2, p. 3-17. Dez,1962.
- GONÇALVES DE LIMA, O.; et al. Uma nova substância isolada do “ Pau d’arco”, *Tabebuia* sp. *An. Soc. Biol. PE*. v. xiv, n. 1-2, p. 136-140. 1956.
- GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; TAKAKI, G. M. C.; MURANDI, F. S. & BUOCHBERG, M. S. Comparison of antibacterial and antifungal activities of Lapachol and β -Lapachone. *Letters, In: Planta Med.* 60: 373-4. 1994.
- HARVEY, RICHARD & CHAMPE, PAMELA. Farmacologia ilustrada. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1998.
- HOOVER, S. C., The constitution of Lapachol and its derivatives: The structure of the anilene chain. *J. Chem. Soc.* v. 69, p.1356. 1896.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), em: <http://www.inca.gov.br> Última atualização em 08.04.2003. Acesso em 05/02/2004.
- JACOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MULLER, A.; WAGNER, H. Analysis of naphotoquinones in *Zeyheria montana* crude extracts (bolsa-de-pastor). *Química Nova*. 22:3. Mar-Apr, 1999.
- KHAN, R. M.; MLUNGWANA, S. M. 5-hydroxyLapachol: A cytotoxic agent from *Tectona grandis*. *Phytochemistry*. 50:4. Feb,1999.
- KRISHNAN, P. & BASTOW, K.F. Novel mechanisms of cellular DNA Topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinane derivatives α -Lpachone and β -Lapachone. *Cancer Chemother Pharmacol.* V. 47 (2001) 187-98.
- KRISHNAN, P. & BASTOW, K.F. Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase II Inhibition by Pyranonaphthoquinane Derivatives – Eleutherin, α -Lpachone and β -Lapachone. *Biochemical Pharmacology*. V. 60 (2000) 1367-79.

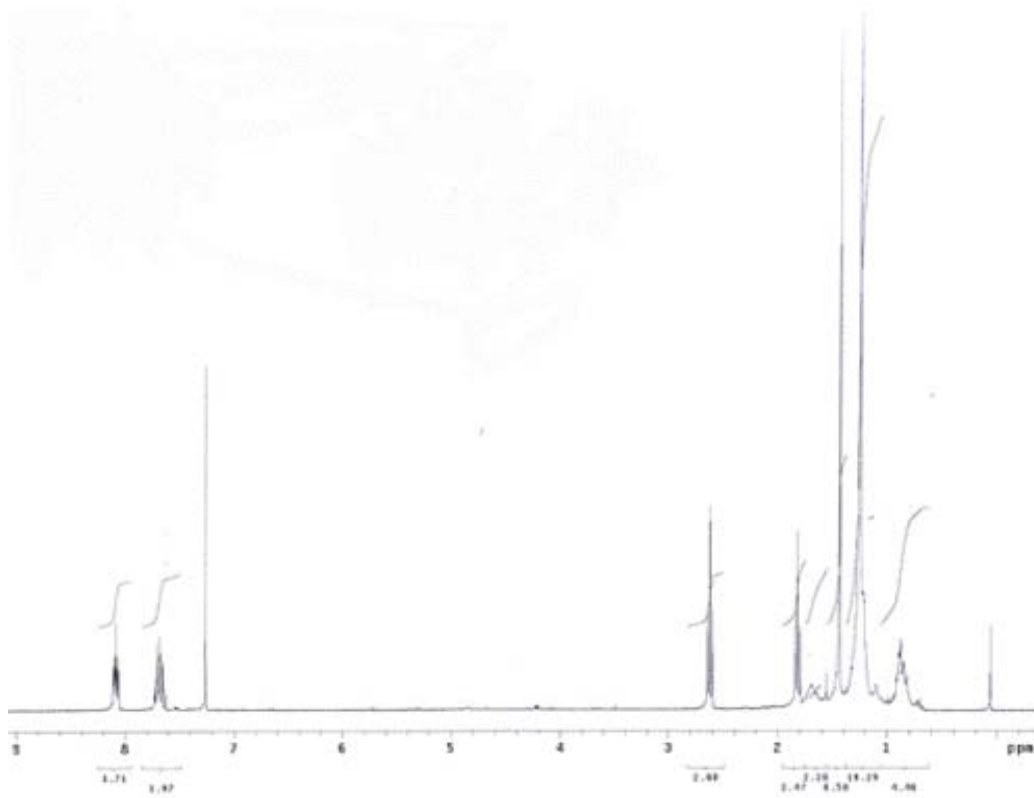
Referências Bibliográficas

- LI, C. J. et al. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *PNAS - Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 90, p. 1839-1842. March, 1993.
- LI, C. J.; LI, Y.; PINTO, A. V. & PARDEE, A. B. Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by β -Lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. *PNAS.* 96:13369-74. Nov, 1999.
- LI, C. J.; WANG, C. & PARDEE, A. B. Induction of apoptosis by β -Lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Research.* 55:3712-15. Sept, 1995.
- LOPES, J. N.; et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* v. 72, n. 6, p. 523-31. 1978.
- MOLLINA-PORTELA, M.P.; STOPPANI, A.O.M. Redox cycling of β -Lapachone and related o-naphthoquinones in the presence of dihydrolipoamide and oxygen. *Biochemical Pharmacology.* V.51 (1996) 275-83.
- MORRISON, R. K.; BRONW, D. E. OLESON, J. J. & CONEY, D. A. Oral toxicology studies with Lapachol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 17: 01-11. 1970.
- NAYAK, P.K.; MOLINS, D.; CARLETON, F.J.; MORRISON, R.K. Absorption, tissue distribution and excretion of Lapachol in animals. *Proceedings of Federation of American Societies for experimental Biology.* 27(1) p.1774 (1968).
- OLIVEIRA, A.B. et al. Estruturas químicas e atividade biológica de naftoquinonas de Binoniáceas brasileiras. *Química Nova,* v. 13, nº4, p. 302-07, 1990.
- PAHN, E. M.; MOLINA PORTELA, M. P. & STOPPANI, A. O. M. Efecto de quinonas e nitrofuranos sobre *Trypanosoma mega* y *Crithidia fasciculata*. *Revista Argentina de Microbiologia.* v. 20, n. 3, p. 107-118. 1988.
- PATERNÔ, E. Ricerche sull acido lapacico. *Gazz. Chim. Ital.* v.12, p. 337-392. 1882. *apud:* MORRISON, R. K.; et al. Oral toxicology studies with Lapachol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 17, p. 01-11. 1970.
- PINK, J. J.; et al. Activation of a cysteine protease in MC-7 and T47D breast cancer cells during β -Lapachone-mediate apoptosis. *Experimental Cell Research.* v. 255, p. 144-155. 2000a.
- PINK, J. J.; et al. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β -Lapachone cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry.* v. 275, n. 8, p. 5416-5424. 2000b.

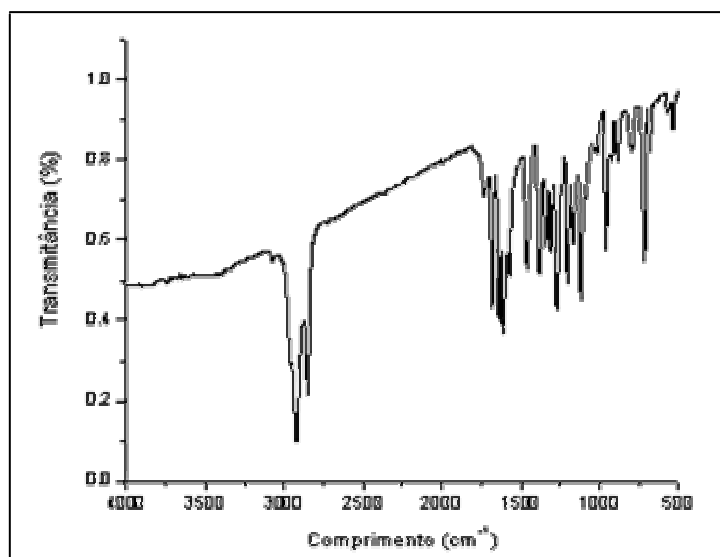
Referências Bibliográficas

- PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, 1984. 6V.
- PLANCHON, S. M.; WUERZBERGER, S.; FRYDMAN, B. WITIAK, D. T.; HUTSON, P.; CHURCH, D. R.; WILDING, G. & BOOTHMAN, D. A. β -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic Leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: A p53-independent response. *Cancer Research*. 55: 3706-3711. Sept, 1995.
- RAMOS JÚNIOR, J. Oncologia Clínica. 2ed. São Paulo: Sarvier, 1984.
- ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. , KUMAR, V. Patologia - Estrutural e Funcional. 5^a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. & KUMAR, V. Patologia - Estrutural e Funcional. Guanabara Koogan. 5^aed. Rio de Janeiro, (1996), caps. 2, 7 e 22.
- SANTANA, C. F.; et al. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do Pau d'Arco (*Tabebuia avellanadae*). *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife-UFPE*. v. 8, n. 1-2, p. 3-17. Dez,1968.
- SCHAEFFNER-SABBA, K.; et al. β -Lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J. Med. Chem.* v. 27 n. 8, p. 990-994. 1984.
- SCHUERCH, A. R.; WEHRLI, W. β -Lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polimerase- α . *Eur. J. Biochem.* v. 84, p. 197-205. 1978.
- SILVA, Penildon. Farmacologia. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, cap. 112.
- SILVA, R. P. *Estudos da ação da β -Lapachona sobre as membranas biológicas e artificiais*. 1997. 52 folhas. Dissertação (Mestrado em Biofísica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SIMÕES, C.M.O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da Universidade – UFRS, 2^oed, Porto Alegre, 2000.
- WUERZBERGER, S. M.; et al. Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by β -Lapachone. *Cancer Research*. v. 58, p. 1876-1885. May, 1998.

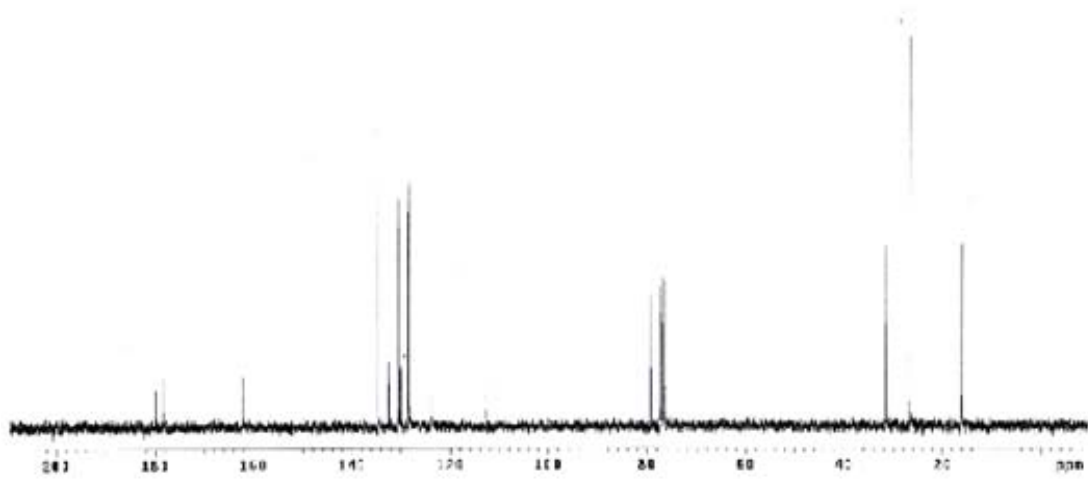
ANEXOS



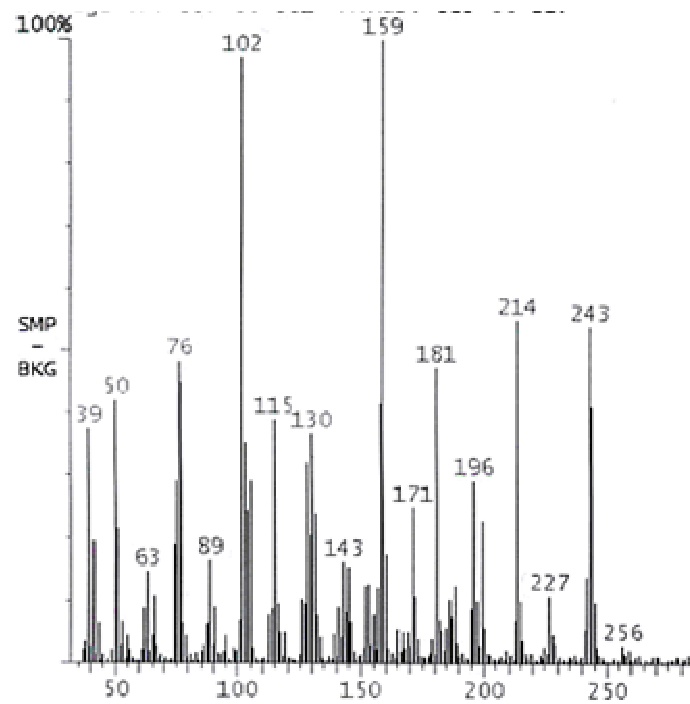
ANEXO 01 – Espectro de RMN¹H da α -Lapachona.



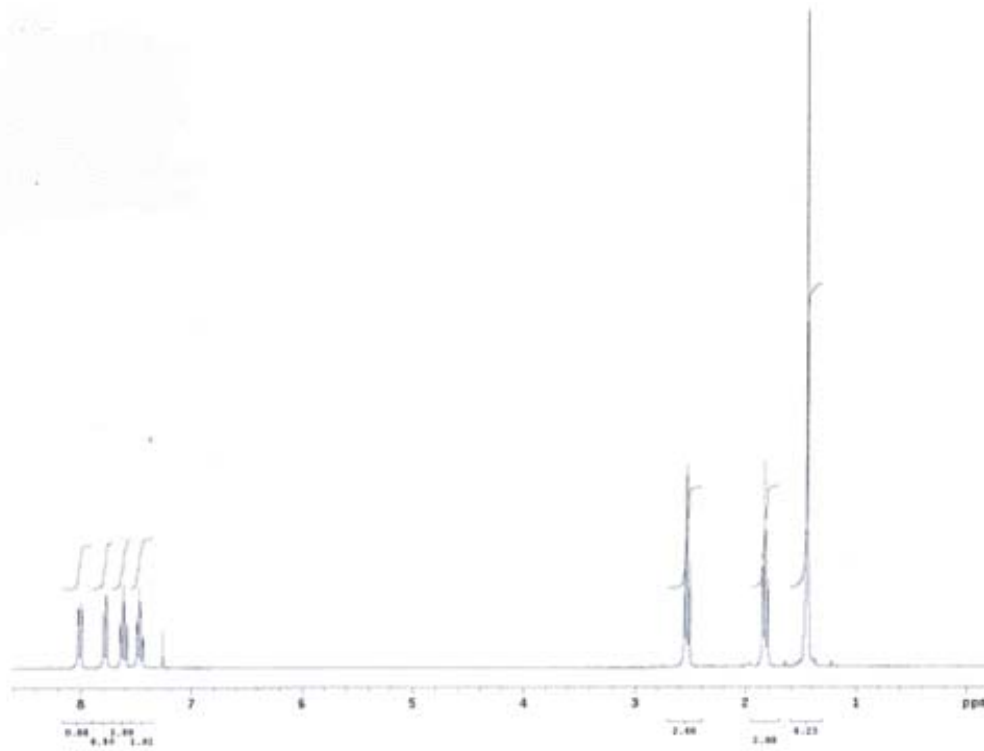
ANEXO 02 – Espectro de IVTF da α -Lapachona.



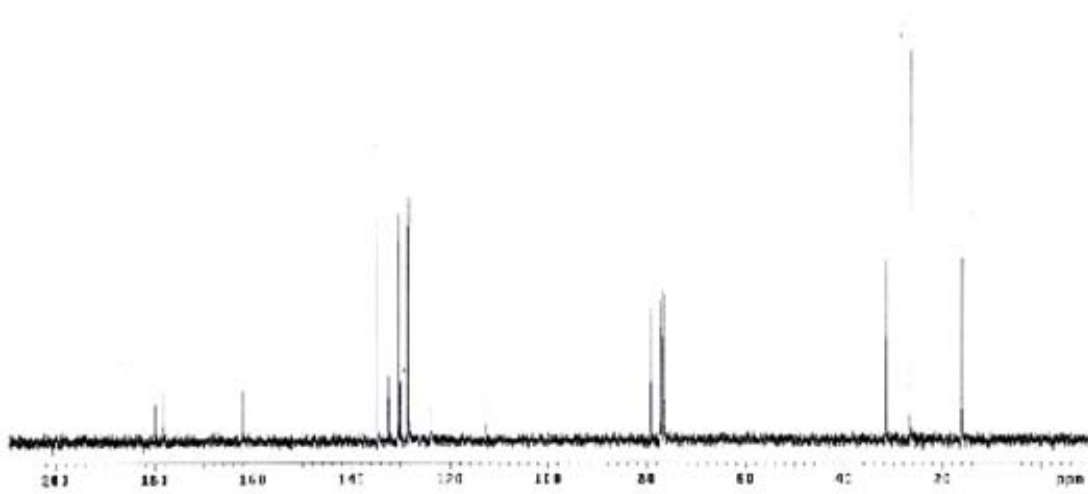
ANEXO 06 – Espectro de RMN^{13}C da β -Lapachona.



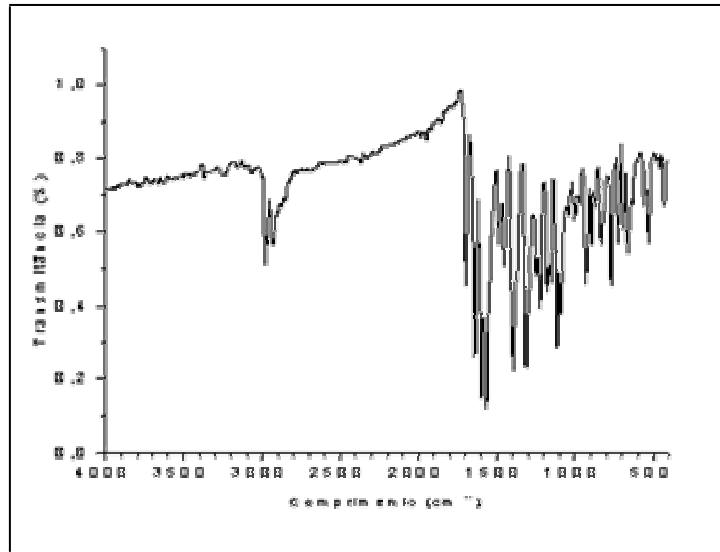
ANEXO 07 - Espectro de Massa da β -Lapachona.



ANEXO 08 – Espectro de RMN^1H da β -Lapachona exposta a Luz.



ANEXO 09 – Espectro de RMN^{13}C da β -Lapachona exposta a Luz.



ANEXO 10 – Espectro de IVTF da β -Lapachona exposta a Luz.

METODOLOGIA DE PURIFICAÇÃO DA BETA-LAPACHONA E AVALIAÇÃO DE PUREZA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Fábio Henrique Cavalcanti de Oliveira, Geisiane Maria Cavalcante Alves, Flávia Patrícia Moraes de Medeiros, Ana Cristina Lima Leite, Dalcly José Brondani, Marcellio Sérgio Soares da Cunha Filho, Leomar W. Bieber, Pedro José Polim Neto
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEP)

(beta-Lapachona, alfa-Lapachona, Purificação, Cromatografia em camada Delgada)

Objetivo: Obter uma matéria-prima com alto grau de pureza, sem a presença de seu isômero alfa-Lapachona, adequado para realização de estudos de pré-formulação de cápsula de gelatina mole e injetável de pequeno volume que será realizado pelo LAFEP.

Metodologia: Foram utilizados dois lotes de beta-Lapachona contaminados, L. 402 e L. 702, para obtenção de um terceiro lote puro, L. 103. Os lotes contaminados foram solubilizados a quente no solvente utilizado no processo de semi-síntese da beta-Lapachona, etano:PA:Merck. Após recristalização os cristais formados foram filtrados a vácuo e colocados em estufa até completa secagem a 80°C. A pureza foi verificada através da análise de cromatografia em camada delgada (TLC) utilizando placas cromatográficas pré-labradas da Merck®, com camada adsorvente de dióxido de silício poroso sintético e sílica gel 60 F₂₅₄, depositada em uma lâmina de alumínio. A fase móvel utilizada foi composta de Tolueno:Acetato de etila (9:1). A revelação das placas foi realizada através de luz ultravioleta a 254nm.

Resultados e Discussão: Na análise de TLC foi possível verificar a diferença de pureza entre as amostras antes e após o processo de purificação, através da observação da presença de contaminação pelo isômero alfa-Lapachona, originado no processo de semi-síntese não padronizado da droga (Fig. 1)



Fig. 1 Placa de TLC, padrão secundário, L. 103, L. 402 e L. 702, respectivamente

Conclusão: Os resultados obtidos mostram que o método de purificação utilizado é satisfatório para a obtenção de uma matéria-prima pura, comprovada através da TLC que possibilita a separação do isômero alfa-Lapachona, um contaminante para a amostra em estudo. Dependendo da concentração de contaminação torna-se necessário a repetição do processo para a obtenção de uma matéria-prima pura.

Referências Bibliográficas:

Chiang J. L. et al. Cancer Research 55, 3712-3715, September 1, 1995. Lima, G. O. et al. Revista do Instituto de Antibióticos, Recife, Vol. 4, N. 1/2, Dez. 1962.

Categoria: Tecnologia de Medicamentos
Responsável: Fábio Henrique C. de Oliveira
Telefone: (81) 3461-1330
Correio eletrônico: fabio_hco@ig.com.br

74

XXVI Encontro Nacional dos Estudantes de Farmácia

O Estudante de Farmácia Construindo um Brasil Melhor

20 a 26 de julho de 2003

Cuiabá - MT

ANAIIS



VII PHARMATECH
IV ENEQC

INTERNATIONAL CONFERENCE ON
PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND QUALITY CONTROL

CERTIFICADO

Qc006

Certificamos que **ALVES, G.M.C.*** participou do VII PHARMATECH

IV ENEQC, realizado no período de 06 a 09 de agosto de 2003, no Centro de Convenções do Tropical Hotel

Também João Pessoa Paraíba, Brasil na qualidade de AUTORES DO TRABALHO:

Análise de pureza da β -Lapachona utilizando Cromatografia em camada delgada e Análise térmica por Calorimetria exploratória diferencial

F. CUNHA FILHO, M.S.S. MEDEIROS, P.P.M. MONTEIRO, D.B., NASCIMENTO, T.G., MACEDO, R.O., ROLIM NETO,
P.J. LEBRE, A.C.F. & BRONDANI, D.J.

Rui Oliveira Macêdo
Rui Oliveira Macêdo
Presidente da Comissão Organizadora

Eduardo de Jesus Oliveira
Eduardo de Jesus Oliveira
Coordenador da Comissão Científica

PURITY ANALYSIS OF β -LAPACHONE USING THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND THERMAL ANALYSIS FOR DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY (DSC)

ALVES, G.M.C.^{1,3}; CUNHA FILHO, M.S.S.¹, MEDEIROS, F.P.M.^{1,3}; MONTEIRO, D.B.¹; NASCIMENTO, T.G.²; MACEDO, R.O.²; ROLIM NETO, P.J.^{1,3}, LEITE, A. C. L¹, BRONDANI, D.J.¹

¹Dept^o de Ciências Farmacêuticas-LTM-UFPE, Rua Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-52; ² Dept^o de Ciências Farmacêuticas UDEM -UFPB, Campus I, João Pessoa-PB; ³LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, 1117, Dois Irmãos Recife-PE, Cep: 52171-010. e-mail: geisiane_al@hotmail.com, prolim@ufpe.br

Introduction: β -lapachone (C₁₅H₁₄O₃, MW 242,3) is an orthoquinone naturally found in the red ipe or the red pau d'arco (*Tabebuia avellandae* Lor), from the family *Bignoneae*. It is found principally in Brazil but may be obtained by acidic hydrolysis from its isomer lapachol, found naturally in greater abundance. Recent research has demonstrated an excellent anti-neoplastic potential through apoptosis of a variety of types of cancer, particularly some forms of prostate cancer resistant to conventional treatments (1).

Aim: The aim of this was to determine the purity of different batches of β -Lapachone using thin layer chromatography and thermal analysis.

Methods: Four raw materials were used and a second standard, all from the same supplier. These were submitted to thermal analysis using Differential scanning calorimetry (DSC) and Thin-layer chromatography (TLC). The DSC studies were performed using the Shimadzu model DSC-50, with a nitrogen atmosphere of 50ml/min and a heating ratio of 10C/min, in a temperature range of 25-400C, connected to the Shimadzu TA-60WS/TA-50WS softwares. The samples were coupled in an hermetically sealed aluminum cell with a mass of 2mg \pm 0.03. The TLC analysis was performed using pre-fabricated chromatographic plates (Merck), with an absorbent layer of synthetic porous silicon dioxide and silica gel 60 F254, deposited in an aluminum lamina. The mobile phase was composed of Toluene:Ethyl acetate (9:1). The plates were developed using ultraviolet light (254nm).

Results: From the analyses it was possible to determine differences in purity between the different samples. The percentage purity in the DSC was determined using sample fusion

(fig 1). In the TLC contamination with the isomer α -Lapachona originating from the semi-synthesis of the drug, was observed (2), with a greater intensity as the purity diminished (fig 2).

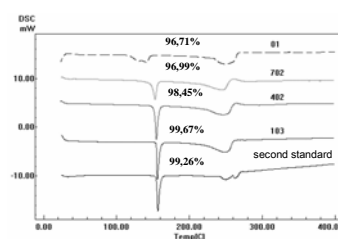


Fig. 1 –DSC. β -Lapachones

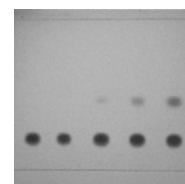


Fig. 2 – TLC, second standard, 103, 402, 702 e 01.

Conclusion: The DSC is a method that is quantitative, rapid and reliable in the determination of drug purity, where the sample fusion curve determines the percentage purity.

As the concentrations of impurities increases so the fusion peak becomes smaller and wider, and the latent heat for the fusion is reduced. The TLC method enables the separation of the isomer α -Lapachona, that is a contaminant for the current study, originating during the non-standardized semi-synthetic process. Despite presenting some advantages it is a qualitative method to evaluate purity. The results obtained demonstrate the importance of the two analyses for the determination of the purity of the raw material and the final product. The product is in the development phase at LAFEPE, in the soft capsule form and small volume solution for injection forms.

Acknowledgements. This work was supported by a Grant from CAPES / LAFEPE.

[1]. Chiang J. Li, et al. Cancer Research 55, 3712-3715, September 1, 1995. [2]. Lima, G. O. et al. Revista do Instituto de Antibióticos, Recife, Vol.4 N.1/2, Dez, 1962.