



Caracterização físico-química do potencial agente antineoplásico β -lapachona

José Lourenço de Freitas Neto¹; Geisiane Maria Alves Presmich¹; Larissa Araújo Rolim¹; Lariza Darlene Santos Alves¹; Miracy Muniz de Albuquerque¹; Pedro José Rolim Neto^{1,*}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica- Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife – PE, Brasil.

RESUMO

A β -lapachona tem inspirado uma série de trabalhos científicos, tendo em vista os inúmeros estudos farmacológicos relatados na literatura, que comprovam suas atividades antibacteriana, antifúngica, antitripanossômica, antiviral, anti-inflamatória e antineoplásica. Devido a sua potente atividade anticancerígena, este fármaco encontra-se, atualmente, em estudo clínico de fase II para o tratamento de câncer pancreático. O objetivo deste estudo foi determinar as propriedades físico-químicas deste ativo com o emprego de diversas ferramentas analíticas, como, difração de Raios X, infravermelho, análises térmicas, microscopia eletrônica de varredura e ensaio de dissolução. Os resultados obtidos na difração de raios X revelaram o padrão policristalino do fármaco; o infravermelho identificou os principais grupos funcionais da β -lapachona; os dados das análises térmicas apresentaram características de um produto cristalino e de alta pureza; a eletromicrografia demonstrou sua forma cristalina, como cristais acidulares bem definidos de tamanho regular, corroborando com os dados do difratograma. No estudo de dissolução comprovamos que a β -lapachona é praticamente insolúvel em água, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias tecnológicas destinadas a melhorar a sua solubilidade em meio aquoso. Dessa forma, a determinação das principais características físico-químicas da β -lapachona será extremamente útil na identificação de problemas que possam vir a surgir durante a formulação e auxiliará no desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficazes e com qualidade. *Palavras-chave:* β -lapachona. Caracterização físico-química. Antineoplásico.

INTRODUÇÃO

Antes do desenvolvimento de uma forma farmacêutica é fundamental a caracterização físico-química do fármaco, pois suas propriedades são de extrema importância para o delineamento racional das etapas envolvidas no desenvolvimento da formulação farmacêutica, determinantes da garantia de sua qualidade (Aulton, 2005).

A caracterização físico-química de um fármaco tem duas finalidades: a identificação e a avaliação da pureza do material a ser analisado. Estas informações, quando presentes em compêndios oficiais, permitem criar a sua carta de identidade, possibilitando sua padronização e avaliação de sua pureza, essenciais para o desenvolvimento de estudos de pré-formulação. Diversas ferramentas analíticas são utilizadas para caracterizar um fármaco, entre as quais, podemos citar difração de raios X, técnica espectroscópica vibracional no infravermelho, análises térmicas - calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise térmica diferencial (DTA), termogravimetria (TG), microscopia eletrônica de varredura, avaliação do perfil de dissolução, dentre outras.

A β -lapachona, conhecida quimicamente como 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b] pirano-5,6-diano (Figura 1), é uma ortonaftoquina com significativo potencial terapêutico de ocorrência natural, isolada do ipê roxo, ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor), da família Bignoneaceae (Do Campo et al., 1977).

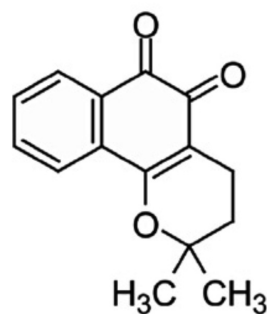


Figura 1. Estrutura química da β -lapachona.

Nos últimos anos, a β -lapachona vem sendo exaustivamente estudada devido ao seu excelente potencial terapêutico frente a algumas doenças. Inúmeros estudos publicados na literatura comprovam as suas atividades antibacteriana (Pereira et al., 2006), antifúngica (Medeiros et al., 2010), antitripanossômica (Ferreira et al., 2008) antiviral (Fávaro et al., 1990), anti-inflamatória (Moon et al., 2007), e particularmente a anticancerígena (Ough et al., 2005). Com relação a esta última ação, a β -lapachona exibe, *in vitro*, variados tipos de atividades contra diferentes linhagens de células, principalmente células malignas humanas dos cânceres de melanoma, leucemias, pâncreas, pulmão, mama e próstata (Ough, 2005; Bentle, 2006; Pink, 2000; Bey, 2007).

Devido a sua importância farmacológica e presença de estudos clínicos de fase II para o tratamento do câncer no pâncreas, é de extrema relevância o conhecimento de suas características físico-químicas, visto que, este aspecto está intimamente relacionado à possibilidade de veiculação da β -lapachona em uma forma farmacêutica com eficácia terapêutica (Ough et al., 2005). Essa caracterização é ainda mais importante quando se leva em consideração a sua solubilidade aquosa, que se apresenta como um fator determinante, já que segundo o sistema de classificação biofarmacêutica, a β -lapachona é classificada como classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade). Dessa forma, apresenta-se como um fármaco fracamente solúvel em água e fluidos aquosos, levando a uma absorção limitada devido à baixa velocidade de dissolução (Cunha-Filho et al., 2007).

Diante disso, baseando-se no contexto apresentado e na ausência da monografia da β -lapachona em compêndios oficiais, este estudo pretende caracterizar a β -lapachona, quanto à avaliação das propriedades físico-química.

MATERIAL E MÉTODOS

A β -lapachona matéria-prima, lote 103, foi semi-sintetizada e doada pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Difração de raios X

O difratograma foi obtido no difratômetro SIEMENS® (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com anodo de cobre. A amostra foi analisada no intervalo de ângulo 2θ de 5-50°.

Infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TF)

O espectro de absorção na região do infravermelho médio foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400), com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. A análise foi realizada com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} na região compreendida entre 4000 a 650 cm^{-1} .

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curva de DSC da β -lapachona foi obtida em Calorímetro de Varredura Shimadzu® DSC-60 interligado

ao software Shimadzu® TA-60WS (Kyoto, Japão) com atmosfera de nitrogênio de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de 10°C $\cdot\text{min}^{-1}$, numa faixa de temperatura de 25 a 350°C. A amostra foi colocada em cadinho de alumínio hermeticamente fechado com massa de 2 $\text{mg} \pm 0.2$. Utilizou-se Índio (99.98%, mp 156.65°C, Aldrich®, Milwaukee, USA) para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia. Para determinar a pureza da β -lapachona foram realizadas três análises utilizando as mesmas condições acima, na faixa de 25 a 180°C e razão de aquecimento de 2°C $\cdot\text{min}^{-1}$.

Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

As curvas TG, DTG e DTA da β -lapachona foram obtidas mediante a termobalança modelo DTG-60H Shimadzu®, na faixa de temperatura entre 30 e 600°C, sob atmosfera dinâmica de N_2 a um fluxo de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, numa razão de aquecimento de 10°C $\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando cadinho de platina e massa da amostra de 5 $\text{mg} \pm 0.2$.

O estudo cinético não-isotérmico da decomposição térmica da β -lapachona foi realizado sob as mesmas condições apresentadas anteriormente, mas em diferentes razões de aquecimento (β) 2.5°C, 5.0°C, 7.5°C e 10.0°C. A seleção do modelo cinético para o cálculo da energia de ativação (E_a), constante de velocidade (k) e ordem da reação, foi realizado por simulação computacional utilizando o método de OZAWA do TA-60H.

A termobalança foi previamente calibrada com uma amostra de oxalato de cálcio monohidratado (Merck®) com pureza de 99.999%.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A amostra de β -lapachona foi montada em *stub*, fixada em fita dupla face de carbono e metalizada com ouro por cinco minutos (Metalizador Desk II/Denton Vacuum®). A morfologia da amostra foi verificada em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol® 5600 LV, onde foi obtida a eletromicrografia em uma câmara com tensão de excitação de 10KV com fatores de aumento de 20 vezes.

Ensaio de Dissolução

A cinética de liberação da β -lapachona foi avaliada pelo perfil de dissolução, *in vitro*, realizado segundo as especificações do Food and Drug Administration (CDER, 1997) para fármacos pouco solúveis em água, de acordo com o método preconizado pela Farmacopéia Americana. Tal estudo foi realizado em dissolutor Varian® VK 7010 (United States Pharmacopeia, 2010).

O ensaio foi realizado a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, utilizando 900 mL da água purificada como meio de dissolução com aparato 2 (pá) e velocidade de rotação de 75 rpm. Além deste, foi realizado outro ensaio nas mesmas condições com acréscimo de 1 % de lauril sulfato de sódio (LSS) ao meio de dissolução.

Com a finalidade de manter as condições sink, foram usadas amostras de 25 mg de β -lapachona. Em intervalos

de tempo predefinidos de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min as amostras foram coletadas, filtradas em membranas de 0.45 μm e posteriormente diluídas para quantificação de β -lapachona dissolvida por espectrofotometria no UV a 256 nm, utilizando metodologia validada (Espectrômetro Varian®, Unity plus-300MHz) (Presmich, 2009). Os ensaios foram efetuados em quadruplicata, com reposição do meio. Os perfis de dissolução foram avaliados e comparados em relação à percentagem de fármaco dissolvido em 60, 90 e 120 min ($Q_{60\text{min}}$, $Q_{90\text{min}}$ e $Q_{120\text{min}}$).

RESULTADOS

Difração de raios X

O resultado do perfil difratográfico da β -lapachona apresenta uma série de picos de difração intensos e bem definidos, revelando o típico padrão de um produto policristalino com pico principal em 9.5° (2θ) e picos secundários em 12.95, 16.30, 19.03, 26.40 e 34.98° (2θ) (Figura 2).

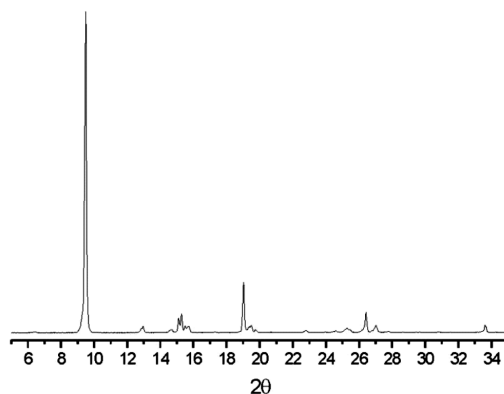


Figura 2. Difração de raios-X da β -lapachona.

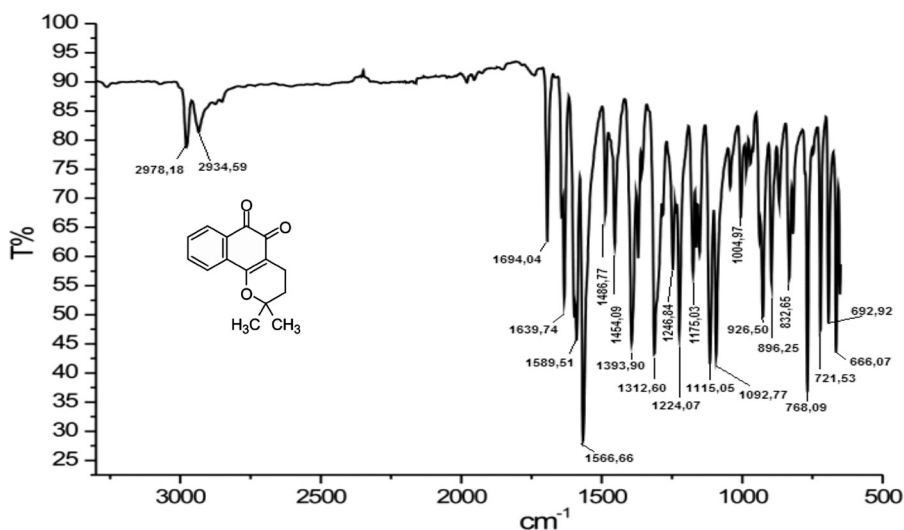


Figura 3. Espectrograma da β -lapachona no FTIR-MID.

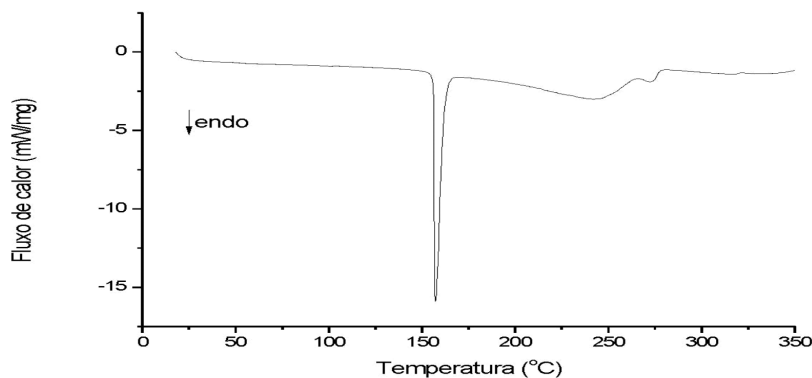


Figura 4. DSC da β -lapachona na razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Infravermelho por Transformada de Fourier

O espectro de absorção da β -lapachona, na região do infravermelho médio (FTIR-MID), foi obtido na região entre 4000 a 450 cm^{-1} (Figura 3). As bandas de absorção observadas no espectro FTIR-MID são concordantes com as descritas na literatura, confirmando a sua identidade química (Alves et al., 2008).

Calorimetria Exploratória Diferencial

Na figura 4 observa-se a curva DSC da β -lapachona, obtida a uma razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e numa faixa de temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ a 350 $^{\circ}\text{C}$. Na curva DSC

observa-se um pico endotérmico característico do processo de fusão do fármaco, numa faixa de 154.0 a 156.0 $^{\circ}\text{C}$, com temperatura *end set* de 156.46 $^{\circ}\text{C}$ e elevada energia envolvida no processo ($\Delta H = 91.01 \text{ J/g}$).

A figura 5 apresenta a curva DSC, em que se determina a porcentagem de pureza da β -lapachona, numa razão de aquecimento de 2.0 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Baseando-se nesta curva, pode-se inferir que a faixa de fusão da β -lapachona tem início em 156.07 $^{\circ}\text{C}$, com consumo de energia de 121.91 J/g. A pureza deste fármaco foi calculada através da equação de Van't Hoff do evento de fusão, realizada em triplicata. O lote sintetizado pelo Departamento de Antibióticos da UFPE apresentou elevada pureza, estimada em torno de 99.85% \pm 0.05%, com um fator de correção calculado para impureza de 9.03% (Figura 6).

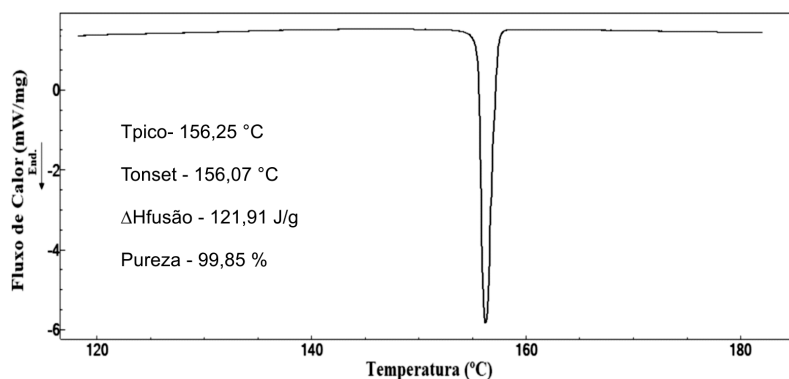


Figura 5. Curva DSC da β -lapachona obtida a 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

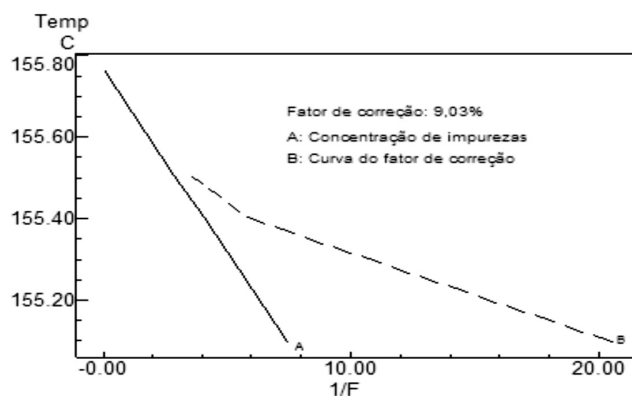


Figura 6. Gráfico de linearização de Van't Hoff obtido a partir da curva DSC da β -lapachona.

Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial

O fármaco β -lapachona foi submetido a um programa de temperatura com razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 600 $^{\circ}\text{C}$ com atmosfera de nitrogênio, a fim de verificar o comportamento de perda de massa e diferença de temperatura desprendida.

As curvas TG, DTG e DTA da β -lapachona podem ser vistas na figura 7. A curva termogravimétrica da β -lapachona indica que a forma cristalina deste fármaco foi termicamente estável até 186.4 $^{\circ}\text{C}$ e o processo de decomposição térmica ocorreu em único evento. Ao

analisar as curvas TG/DTG, observa-se que o perfil de perda de massa ocorreu entre 186.4 e 328.7 $^{\circ}\text{C}$, com perda de 64.9% de compostos orgânicos. Na curva DTA do fármaco, foram observados dois eventos térmicos. No primeiro evento, observa-se um pico endotérmico em 156.9 $^{\circ}\text{C}$, com ΔT (156.4 – 159.3 $^{\circ}\text{C}$) e energia desprendida de ΔH 138.6 J/g, que corresponde ao processo de fusão do composto. Já o segundo, apresentou um pico exotérmico em 256.3 $^{\circ}\text{C}$, com ΔT (244.8 – 281.7 $^{\circ}\text{C}$) e ΔH 69.4 J/g, referente à decomposição do fármaco, concordante com a perda de massa observada pela curva TG.

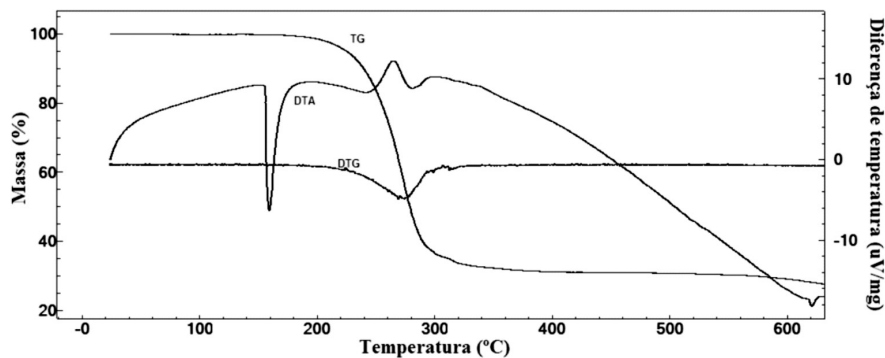


Figura 7. Curvas TG, DTG e DTA da β -lapachona.

Estudo cinético de Decomposição da β -lapachona

Para o estudo da cinética de decomposição não-isotérmica da β -lapachona foi empregado o método de Ozawa. Neste método é necessária a obtenção de, no mínimo, três curvas TG sob diferentes razões de aquecimento. A sobreposição das curvas TG da β -lapachona sob diferentes

razões de aquecimento ($2.5; 5; 7.5; 10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) são mostradas na figura 8. No método de Ozawa, a energia de ativação é obtida a partir da plotagem do logaritmo A das diferentes razões de aquecimento, em função do inverso da temperatura ($1/T$), em que a inclinação da reta determinará o valor da energia de ativação, que de acordo com a figura 9 foi de 77.22kJ/mol .

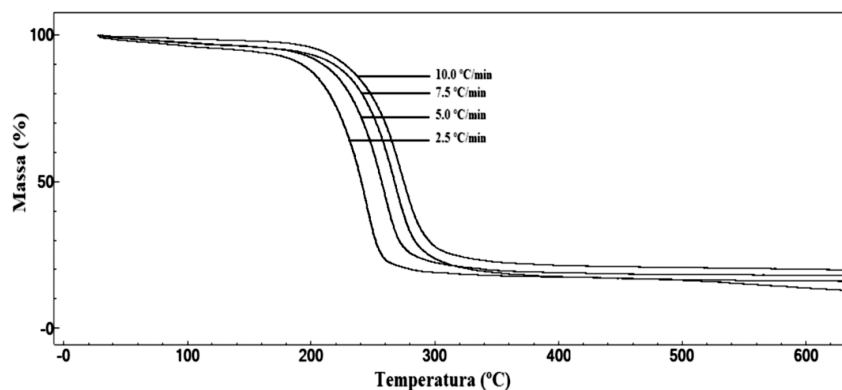


Figura 8. Curvas TG da β -lapachona obtidas em diferentes razões de aquecimento ($2.5; 5.0; 7.5; 10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

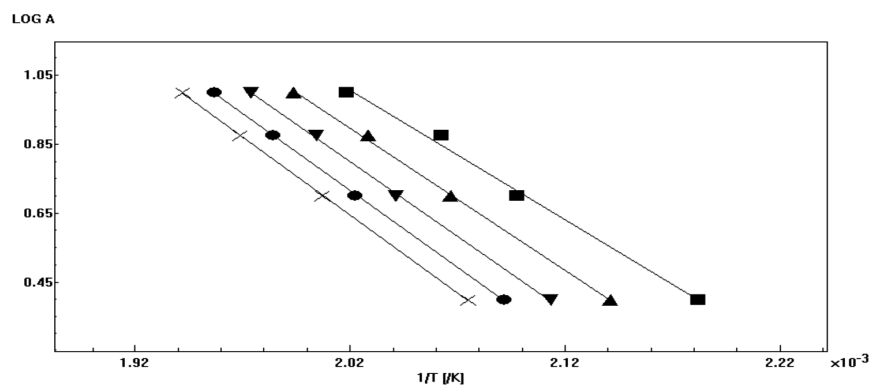


Figura 9. Gráfico do método de Ozawa para determinação da E_a da decomposição térmica da β -lapachona.

O gráfico da função $G(X)$ do inverso da temperatura em função do tempo demonstra uma boa correlação entre as quatro razões de aquecimento das curvas TG da β -lapachona (Figura 10). Ao analisar a figura, observa-se

que a primeira etapa de decomposição da β -lapachona teve uma energia de ativação de 77.22kJ/mol , com ordem da reação zero e fator de frequência de $4.376 \times 10^6\cdot\text{min}^{-1}$.

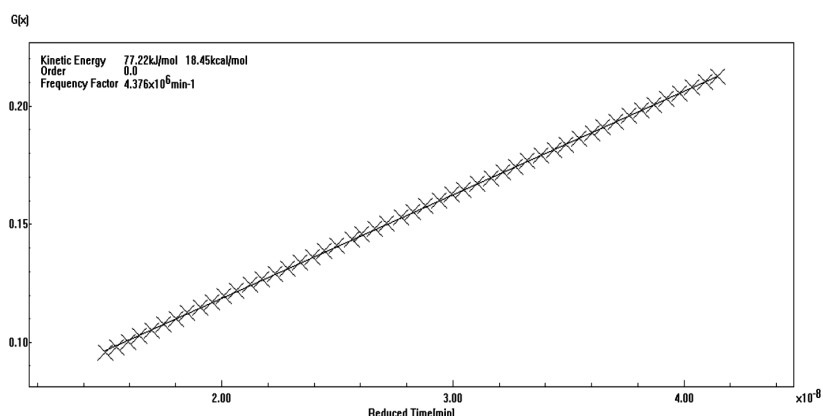


Figura 10. Parâmetros cinéticos da decomposição térmica da β -lapachona de acordo com o método de Ozawa.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise da β -lapachona por MEV facilitou a observação das estruturas cristalinas, comprovando as características de um composto com arranjo estrutural organizado (Figura 11).

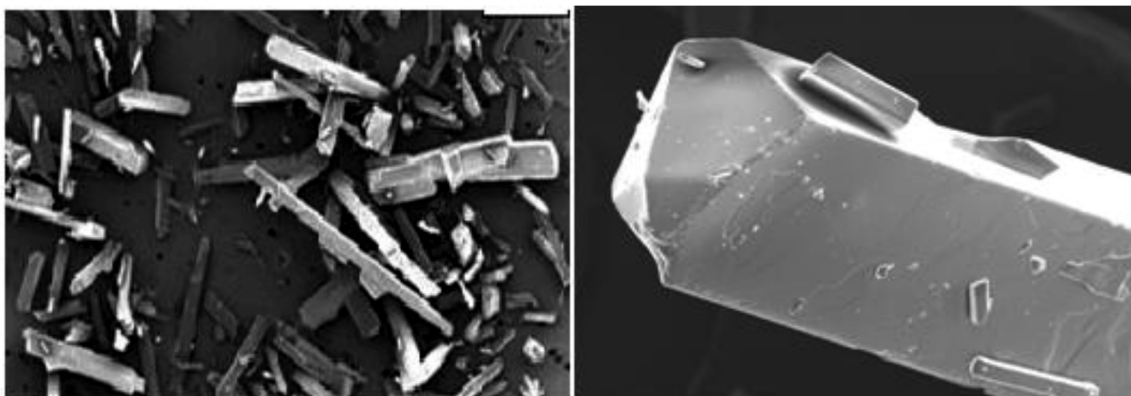


Figura 11. Detalhe morfológico das partículas cristalinas da β -lapachona com um aumento de 20 e 270 vezes, respectivamente.

Ensaio de dissolução

A tabela 1 apresenta o percentual de β -lapachona dissolvida em função do tempo, na presença de dois meios (água purificada e solução LSS 1%). Ao analisar os dados, observa-se que o fármaco possui uma baixa solubilidade em água.

Tabela 1. Percentagem de β -lapachona dissolvida após 60, 90 e 120 minutos.

Forma estrutural/Meio de dissolução	Q _{60min}	Q _{90min}	Q _{120min}
crystal/água purificada	4,87 ± 1,89	5,80 ± 2,29	7,31 ± 1,76
crystal/LSS 1 %	8,81 ± 1,56	9,32 ± 2,03	9,98 ± 1,43

DISCUSSÃO

A caracterização físico-química do fármaco é um requisito básico para o desenvolvimento de uma forma

farmacêutica e indispensável para garantir a sua qualidade. A inobservância dos critérios relativos à qualidade das matérias-primas pode afetar a segurança e eficácia da formulação.

Os resultados caracterização da β -lapachona mostram claramente que a β -lapachona apresenta uma estrutura cristalina, com elevado grau de pureza e baixa solubilidade em água.

Difração de raios X

A difratometria de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos. Esta ferramenta analítica é capaz de determinar a característica física de um composto. Os ângulos de difração e as intensidades dos picos são resultados diretos das suas diferentes estruturas cristalinas.

A figura 2 mostra o difratograma da β -lapachona com a presença de picos intensos e definidos, característicos de substâncias com padrão cristalino. Levando-se em consideração o estado cristalino da β -lapachona, pode-se

determinar que esta característica influencie diretamente o seu perfil de dissolução e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. Isso porque o seu arranjo cristalino diminui a superfície de contato do fármaco, o que poderá vir a reduzir a sua solubilidade (Brandão et al., 2008).

Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho constitui hoje uma das principais ferramentas analíticas para identificação e elucidação estruturais de substâncias orgânicas. Na área farmacêutica, suas principais aplicações encontram-se no controle de qualidade de matérias primas e excipientes, caracterização de fármacos, identificação de polimorfismos, entre outras. Além disso, constitui uma técnica valiosa para a identificação de grupos funcionais das estruturas analisadas (Burns, 2001).

Na figura 3, observam-se as bandas características da β -lapachona. A presença das bandas de absorção de média intensidade em 2978 e 2934 cm^{-1} são características das deformações axiais assimétricas e simétricas, respectivamente, da ligação C(sp³)-H da metila. A região entre 2000 e 1800 cm^{-1} corresponde às bandas fracas de combinação e de harmônicas, características das estruturas aromáticas. As bandas em 1589 e 1566 cm^{-1} correspondem às vibrações C=C do anel aromático. A presença da banda de forte intensidade na região de 1694 cm^{-1} , refere-se à vibração do estiramento da carbonila. Já a ligação C-O-C apresenta bandas de deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente, nas regiões de 1115 e 1092 cm^{-1} . Os dados espectrais observados no espectro FTIR-MID são concordantes com os descritos na literatura (Alves et al., 2008).

Além de ser considerada uma identificação importante na caracterização de ativos e excipientes, esta técnica é vastamente utilizada na verificação da formação de complexos de inclusão utilizando ciclodextrinas com fármacos hidrofóbicos (Lyra et al., 2010).

Calorimetria Exploratória Diferencial

Número elevado de eventos químicos e físicos pode ser observado utilizando-se técnicas térmicas, como o DSC, TG e DTA. Conforme pode ser observado na figura 4, a β -lapachona apresenta um pico de fusão a 154,06 °C, com entalpia associada de 91,01 J/g. Este evento confirma a natureza cristalina do fármaco, pois este evento endotérmico é característico de compostos com arranjo estrutural organizado.

Após a etapa de fusão, observa-se que há dois processos endotérmicos correspondentes a degradação do fármaco. Esse fenômeno foi confirmado a partir da curva termogravimétrica, onde foi detectada uma perda de massa de 64,9 %.

Outra aplicabilidade do DSC é a determinação da pureza. Esta técnica vem sendo bastante utilizada para materiais farmacêuticos e apresenta como vantagens, rapidez, exatidão, precisão e facilidade de execução, sem a necessidade de utilizar padrões certificados (Storpiertis, 2009).

A avaliação da pureza de um fármaco ocorre através da aplicação da equação de Van't Hoff, na qual é possível determinar a fração molar de impurezas contidas no material. A determinação da pureza por DSC pode ser explicada pela teoria da não linearidade, ou seja, a área onde normalmente é iniciado o evento decorrente da fusão das impurezas, justificando o processo não linear (Rodrigues et al., 2005).

Ao analisar a figura 5, observa-se que o lote da β -lapachona apresentou elevada pureza, estimada em 99,85 \pm 0,05%.

Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial

O resultado da curva TG mostrou que a β -lapachona apresentou boa estabilidade térmica até 186,4 °C. A partir deste evento, inicia-se o processo de degradação que ocorre em uma única etapa, com perda de massa de 64,9 %. Ao analisar a curva DTG, observa-se que o início e o término da decomposição térmica da β -lapachona são concordantes com a sua variação de massa. A curva DTA apresenta dois eventos característicos: o primeiro corresponde ao ponto de fusão, evidenciado por um pico endotérmico bem definido em 156,4 °C. O segundo evento corresponde à decomposição do fármaco em 256,3 °C, concordante com a perda de massa do TG.

O ponto de fusão observado no DTA confirma a estrutura cristalina do composto, pois este evento endotérmico é característico de compostos com arranjo estrutural organizado.

Estudo cinético de Decomposição da β -lapachona

Há na literatura inúmeros estudos cinéticos baseados em termogravimetria (TG) com o intuito de elucidar mecanismos de reação no estado sólido, como: decomposição térmica, oxidação, cristalização (Rodrigues et al., 2005). Uma das técnicas empregadas é o método não-isotérmico, que é muito utilizado para determinar a energia de ativação e a ordem da reação de decomposição no estado sólido. Os resultados da figura 8 demonstram que o início da decomposição da β -lapachona é deslocado para uma maior temperatura à medida que se aumenta a razão de aquecimento. Após a obtenção das curvas TG, foi aplicado o método de OZAWA, para a determinação da energia de ativação (E_a) no início do primeiro evento de perda de massa, que corresponde à etapa de decomposição térmica na faixa de 186,4 a 328,7 °C (Figura 9).

Ao analisar a figura 10, observa-se que a primeira decomposição da β -lapachona ocorre numa cinética de ordem zero, com energia de ativação de 77,22 kJ/mol.

Microscopia Eletrônica de Varredura

O uso desta técnica vem se tornando mais frequente, na aplicação farmacêutica, por fornecer informações detalhada, com aumentos de até 300.000 vezes, do arranjo estrutural do fármaco. O conhecimento detalhado da microestrutura dos materiais permite o entendimento e, em muitos casos, até a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos (Ribeiro et al., 2008).

A eletromicrografia obtida da β -lapachona demonstra sua forma cristalina, visível macroscopicamente, como cristais aciculares bem definidos de tamanho regular (Figura 11), confirmando os resultados obtidos com a difração de raios X, DSC e DTA. Além disso, o aspecto cristalino observado contribui na compreensão dos resultados dos estudos de dissolução, já que a cristalinidade e o tamanho de partícula estão diretamente relacionados ao perfil de dissolução e solubilização apresentada pelo fármaco.

Ensaio de dissolução

Substâncias cristalinas, como a β -lapachona, nas quais apresentam suas moléculas dispostas em um arranjo cristalino definido, são caracterizadas por propriedades peculiares no que diz respeito a sua solubilização, sendo possível correlacionar à estrutura do retículo cristalino com o ponto de fusão e a velocidade de dissolução (Aulton, 2005).

Para os perfis de dissolução da β -lapachona obtidos, observa-se que há um leve incremento do teor dissolvido do fármaco em água e em solução com LSS 1%, que pode ser explicado com base na redução tensão interfacial e molhabilidade entre a β -lapachona e o meio de dissolução, proporcionado pela característica surfactante do LSS (Tabela 1). Para estudos de dissolução, o uso do LSS é justificado, pois para fármacos da classe II, como β -lapachona, recomenda-se o uso de surfactantes com o objetivo de atingir a condição sink (CDER, 1997). Contudo, a escolha do meio deve ser realizada de forma criteriosa, já que há alguns meios que são claramente não fisiológicos, o que pode ser aceitável para controle de qualidade, mas não quando se deseja fazer alguma inferência sobre o comportamento *in vivo*.

Levando-se em consideração a percentagem dissolvida do fármaco, observamos que o mesmo apresenta-se como insolúvel em meio aquoso, sendo esta característica intrínseca da molécula a qual é determinada de acordo com sua forma no estado sólido. Para fármacos com alta faixa de fusão, como a potencial β -lapachona, o processo de dissolução requer um grande consumo de energia para a remoção das suas moléculas, devido à presença de um retículo cristalino rígido. Logo, a solubilidade e consequentemente a dissolução do fármaco, torna esse aspecto extremamente crítico, já que a dissolução nos fluidos gastrintestinais é um pré-requisito para que ocorra a absorção e distribuição do fármaco na circulação sistêmica, influenciando diretamente sua ação terapêutica.

Assim, a avaliação do perfil de dissolução da matéria prima a ser utilizada na manipulação de produtos farmacêuticos, tem papel fundamental na garantia de qualidade do produto final devendo, portanto, ser realizada adequadamente, durante o processo de controle de qualidade (Stegemann et al., 2007).

Com base nos resultados, pode-se observar através do estudo de solubilidade, que será necessário a implementação de tecnologias farmacêuticas, como a formação de complexo de inclusão, na tentativa de aumentar a sua biodisponibilidade em vista a estrutura cristalina rígida da β -lapachona, que corrobora para a sua baixa solubilidade em água. Este arranjo estrutural foi comprovado através das análises de MEV e difração

de raios-X. Paralelamente, a análise térmica por DSC e o infravermelho comprovam a pureza do fármaco, requerida para a obtenção de uma forma farmacêutica com altos padrões de qualidade.

ABSTRACT

Physicochemical characterization of the anticancer drug β -lapachone

A series of scientific papers on β -lapachone has been inspired by the numerous pharmacological reports in the literature that demonstrate its antibacterial, antifungal, antitrypanosomal, antiviral, anticancer and anti-inflammatory activities. Owing to its potent anticancer activity, this drug is currently undergoing phase II clinical trials for the treatment of pancreatic cancer. The aim of this study was to determine the physicochemical properties of this drug by means of several analytical tools, such as X-ray diffraction (XRD), infrared (IR) spectroscopy, thermal analysis, scanning electron microscopy (SEM) and dissolution test. The XRD patterns showed the polycrystalline state of the drug; IR spectroscopy identified the main functional groups of β -lapachone; the data from thermal analysis showed characteristics of a crystalline product of high purity and the SEM micrographs showed the crystalline form as well-defined acidulated crystals of regular size, corroborating the XRD patterns. In the dissolution test we found that β -lapachone is practically insoluble in water, necessitating the development of technological strategies to improve its solubility in aqueous media. Thus, the determination of the main physicochemical characteristics of β -lapachone will be extremely useful in identifying problems that may arise during the design and in the development of more effective and higher quality pharmaceutical forms of this drug.

Keywords: β -lapachone. Physicochemical characterization. Anticancer drug.

REFERÊNCIAS

- Alves GMC, Rolim LA, Rolim Neto PJ, Leite ACL, Brondani DJ, Medeiros FPM, Bieber LW, Mendonça-Junior FJB. Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. *Quim Nova*. 2008;31(2):413-6.
- Aulton ME. Pré-formulação farmacêutica. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- Bentle MS, Bey EA, Dong Y, Reinicke KE, Boothman DA. New tricks for old drugs: the anticarcinogenic potential of DNA repair inhibitors. *J Mo Hist*. 2006;37(5-7):203-18.
- Bey EA, et al. An NQ01-and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by β -lapachone. *Proc Natl Aca Sci*. 2007;104(28):11832-7.
- Brandão FC, Tagiari MP, Silva MAS, Berti LF, Stulzer HK. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control. *Pharmac Che J*. 2008;42(6):368-76.

- Burns DA, Ciurczak EW. Handbook of near-infrared analysis. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2001.
- Center for Drug Evaluation and Research - CDER. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Dissolution Testing of Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms [Internet]. Rockville: US Department of Health and Human Services; 1997.
- Cunha-Filho MSS, Dacunha-Marinho B, Torres-Labandeira JJ, Martinez-Pacheco R, Landín M. Characterization of β -Lapachone and Methylated β -Cyclodextrin Solid-state Systems. AAPS PharmaSciTech. 2007;8(3): E60.
- Do Campo R, Lopes JN, Cruz FS, Souza W. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by beta-lapachone. Exp Parasitol. 1977;42(1): 142-9.
- Fávoro OCN, Oliveira MM, Rossini MAA, Kamakura CR, Pinto AV, Pinto MCFR. Seleção por meio de células KB de substâncias e extratos potencialmente ativos em quimioterapia do câncer. Anais Acad Bras Ciênc. 1990;62(3):217-24.
- Ferreira JG. Estudo de compostos quinônicos com potencial atividade contra doença de Chagas. [Tese]. São Carlos: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2008.
- Lyra MAM, Alves LSD, Fontes DAF, Soares-Sobrinho JL, Rolim Neto PJ. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2010;31(2):117-24.
- Medeiros CS, Pontes-Filho NT, Camara CA, Lima-Filho JV, Oliveira PC, Lemos SA, Leal AFG, Brandão JOC, Neves RP. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. Braz J Med Biol Res. 2010;43(4):345-9.
- Moon DO, Choi YH, Kim ND, Park YM, Kim GY. Anti-inflammatory effects of beta-lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. Int immunopharmacol. 2007;7(4):506-14.
- Ough M, Lewis A, Bey EA, Gao J, Ritchie JM, Bornmann W, Boothman DA, Oberley LW, Cullen JJ. Efficacy of beta-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. Cancer Biol Ther. 2005;4(1):95-102.
- Pereira EM, Machado TB, Leal ICR, Jesus DM, Damaso CRA, Pinto AV, De-Marval MG, Kuster RM, Santos KRN. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006;5(5):1-7.
- Pink JJ, Wuerzberger-Davis S, Tagliarino C, Planchon SM, Yang X, Froelich CJ, Boothman DA. Activation of cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone mediated apoptosis. Exp Cell Res. 2000;255(2):144-55.
- Presmich GMA. Incremento da solubilidade/dissolução da β -lapachona utilizando tecnologias de dispersões sólidas e complexo de inclusão. [Tese]. Recife: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco; 2009.
- Ribeiro A, Figueiras A, Santos D, Veiga F. Preparation and Solid-State Characterization of Inclusion Complexes Formed Between Miconazole and Methyl- β -Cyclodextrin. AAPS PharmSciTech. 2008;9(4):1102-9.
- Rodrigues PO, Cardoso TFM, Silva MAS, Matos JR. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). Acta Farmac Bonaer. 2005;24(3):383-7.
- Stegemann S, Leveiller F, Franchi D, Jong H, Linden H. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. Eur J Pharm Sci. 2007;31(5):249-61.
- Storpiritis S, Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. Biofarmacotécnica, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2009.
- United States Pharmacopeia – USP. 33th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2010.

Recebido em 23 de novembro de 2011

Aceito para publicação em 04 de outubro de 2012

