



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



**TESE DE DOUTORADO**

**INCREMENTO DA SOLUBILIDADE/DISSOLUÇÃO DA  $\beta$ -LAPACHONA UTILIZANDO  
TECNOLOGIAS DE DISPERSÕES SÓLIDAS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO.**

**M. Sc. GEISIANE MARIA ALVES PRESMICH**

Recife, dezembro de 2009.

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

**TESE DE DOUTORADO**

**INCREMENTO DA SOLUBILIDADE/DISSOLUÇÃO DA  $\beta$ -LAPACHONA UTILIZANDO  
TECNOLOGIAS DE DISPERSÕES SÓLIDAS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO.**

Tese de doutorado 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 Doutora em Ciências Farmacêuticas com área de concentração em Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

**M Sc. GEISIANE MARIA ALVES PRESMICH**

**PROF<sup>o</sup>. Dr. PEDRO JOSÉ ROLIM NETO**

Orientador

Recife, dezembro de 2009.

Presmich, Geisiane Maria Alves

Incremento da solubilidade / dissolução da  $\beta$ -lapachona utilizando tecnologias de dispersões sólidas e complexas de inclusão / Geisiane Maria Alves Presmich.

– Recife : O Autor, 2009.

167 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Farmacotécnica. 2.  $\beta$ -lapachona. 3. Ciclodextrinas.  
4. Polietilenoglicol. 5. Polivinilpirrolidona. I. Título.

615.014  
615.4

CDU (2.ed.)  
CDD (20.ed.)

UFPE  
CCS2010-016

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

## **REITOR**

Profº Drº Amaro Henrique Pessoa Lins

## **VICE-REITOR**

Profº Drº Gilson Edmar Gonçalves e Silva

## **PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Profº Drº Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

## **DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profº Drº José Thadeu Pinheiro

## **VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profº Drº Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

## **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Profº Drº Dalci José Brondani

## **VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Profº Drº Antônio Rodolfo de Faria

## **COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Profº Drº Pedro José Rolim Neto

## **VICE-COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Profª Drª Beate Sagesser



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

Recife, 22 de dezembro de 2009.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 22 de dezembro de 2009 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto**  
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Ana Cristina Lima Leite**  
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

**SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Maria do Carmo Alves de Lima**  
(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: \_\_\_\_\_

**PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Luiz Alberto de Lira Soares**  
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

**SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Teresinha Gonçalves Silva**  
(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dedico este trabalho aos amores da minha vida: meu marido Oscar, meus pais Roseane e Manoel, meu irmão Geison, e aos meus avós Gilderto (*in memorian*) e Aurení (*in memorian*). Obrigada por fazerem parte de minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

Foram tantas as pessoas que ajudaram para sua realização deste trabalho que torna difícil relacionar nomes. Mas, não tem como não agradecer...

Ao meu marido Oscar pelo companheirismo, carinho, compreensão, incentivo e por ter sido como um anjo em minha vida durante todo esse tempo que estamos juntos.

À minha família, minha mãe Roseane, meu irmão Geison, minha cunhada Dani e meu pai Manoel pelo amor, compreensão e presença constante em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. Pedro Rolim, meu “pai científico”, pelo carinho, aprendizado e confiança.

À minha querida amiga Larissa Rolim, pelo carinho, companhia, dedicação e ajuda.

A todos que fazem o LTM pela ajuda e convivência. Um agradecimento especial para Lourenço, Lariza, Otávio, Keyla, Fabiana, Jeckson e Francimary.

Ao Prof. Dr. Francisco Veiga, da Universidade de Coimbra - Portugal, pelo convite e acolhimento em seu laboratório para o desenvolvimento dos complexos de inclusão.

À Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo, Nêna, do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de antibióticos da UFPE pela disponibilidade e confiança na utilização dos equipamentos e espaço físico de seu laboratório para o desenvolvimento das dispersões sólidas.

À Prof<sup>a</sup>. Miracy do NCQMC da UFPE pela permissão em utilizar os equipamentos complementares, um agradecimento especial à Rute.

Ao Prof. Marcelo Zaldine e a Boaz Galdino, do Laboratório de Química Teórica Medicinal da UFPE pela parceria nos estudos computacionais de modelagem molecular.

Ao Ricardo Oliveira da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, sempre tão simpático e prestativo na realização dos estudos de infravermelho.

Ao Sérgio dos Santos Silva do LIKA da UFPE pela atenção, disponibilidade e ajuda na realização dos estudos de microscopia eletrônica de varredura.

Ao João Carlos do Departamento de Física da UFPE pela realização dos estudos de difração de raios-x.

À Prof<sup>a</sup>. Teresinha Gonçalves Silva pela parceria que tornou possível a realização dos estudos preliminares *in vivo*.

Um agradecimento especial a minha amiga de todas as horas, Silvana Maciel, uma irmã, uma companheira para sempre.

As minhas amigas Camile, Andreza e Cristina do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo apoio, acolhimento, companheirismo e amizade sincera, sem vocês teria sido bem mais difícil em Portugal.

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

## SUMÁRIO

<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>IX</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>XII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>16</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>20</b>
Objetivo Geral.....	21
Objetivos Específicos.....	21
<b>Artigo I.....</b>	<b>22</b>
Propriedades, avanços e aplicações no desenvolvimento de dispersões sólidas para obtenção de medicamentos.	
<b>Artigo II.....</b>	<b>50</b>
Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhora a biodisponibilidade de fármacos.	
<b>Artigo III.....</b>	<b>57</b>
Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação da $\beta$ -lapachona por espectrofotometria no ultravioleta.	
<b>Artigo IV.....</b>	<b>71</b>
Melhora da solubilidade aquosa da $\beta$ -lapachona em dispersão sólida com polivinilpirrolidona k-30 e polietilenoglicol 4000.	
<b>Artigo V.....</b>	<b>108</b>
Caracterização físico-química dos complexos de inclusão desenvolvidos com $\beta$ -lapachona e $\beta$ -ciclodextrinas natural e quimicamente modificadas	
<b>Ensaio Biológico.....</b>	<b>140</b>
Estudos preliminares da influência dos complexos $\beta$ -lapachona:HP $\beta$ CD e $\beta$ -lapachona:PVP K-30 no tratamento de camundongos com tumor sólido de Ehrlich.	
<b>Conclusão.....</b>	<b>151</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>153</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>155</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>160</b>

## LISTA DE TABELAS

### Artigo II:

**Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhora a biodisponibilidade de fármacos.**

**Tabela 1.** Medicamentos contendo as principais ciclodextrinas derivadas..... 52

### Artigo III:

**Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação da  $\beta$ -lapachona por espectrofotometria no ultravioleta.**

**Tabela 1.** ANOVA *one-way* para o tipo e tempo de agitação..... 65

**Tabela 2.** Precisão Intermediária..... 67

**Tabela 3.** Reprodutibilidade..... 68

### Artigo VI:

**Melhora da solubilidade aquosa da  $\beta$ -lapachona em dispersão sólida com polivinilpirrolidona k-30 e polietilenoglicol 4000.**

**Tabela 1.** Energias totais (E) e de interação ( $\Delta E$ ) para os complexos  $\beta$ -lapachona...PVP usando cálculos semi-empíricos AM1..... 81

**Tabela 2.** Percentagem de  $\beta$ -lapachona dissolvido após 60, 90 e 120 minutos e eficiência de dissolução em 60 e 120 minutos obtidas a partir da  $\beta$ -lapachona isolada e dos sistemas binários com PEG 4000 e PVP K-30..... 99

### Artigo V:

**Caracterização físico-química dos complexos de inclusão desenvolvidos com  $\beta$ -lapachona e  $\beta$ -ciclodextrinas natural e quimicamente modificadas.**

**Tabela 1.** Constantes de Estabilidade..... 119

**Tabela 2.** Percentagem de  $\beta$ -lapachona dissolvido após 60, 90 e 120 minutos e eficiência de dissolução em 60 e 120 minutos obtidas a partir da  $\beta$ -lapachona isolada e dos sistemas binários com  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD..... 135

### Ensaio Biológico:

**Estudos preliminares da influência dos complexos  $\beta$ -lapachona:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lapachona:PVP K-30 no tratamento de camundongos com tumor sólido de Ehrlich.**

**Tabela 1.** Valores hematológicos..... 147

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

**Figura 1.** Estrutura química do lapachol e  $\beta$ -lapachona..... 17

### Artigo I: Propriedades, avanços e aplicações no desenvolvimento de dispersões sólidas para obtenção de medicamentos.

**Figura 1.** Representação esquemática do aumento da biodisponibilidade de fármacos pouco hidrossolúveis através de DS..... 27

**Figura 2.** Representação da estrutura monomérica do PVP e a formação da ligação entre fármaco (M) e o polímero..... 33

**Figura 3.** Estrutura química do monômero de PEG..... 35

**Figura 4.** Estrutura química do monômero de HPMC..... 36

### Artigo II: Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhora a biodisponibilidade de fármacos.

**Figura 1.** Log do número de publicações relacionadas com ciclodextrinas (barras brancas) e aplicações farmacêuticas envolvendo solubilização (barras pretas) por ciclodextrinas, como indicado no *SciFinder* (ACS,COLUMBUS,OH) em Março, 2007..... 52

**Figura 2.** Representação da  $\beta$ -ciclodextrina e seus grupos hidroxílicos assinalados..... 52

**Figura 3.** Edições de patentes associadas com HP- $\beta$ -ciclodextrina (n) e SBE-biciclodextrina (p) usadas entre os anos 2000 e 2006 (SCIFINDER, COLUMBUS, OH)..... 53

**Figura 4.** Diagrama de solubilidade de fases para fármaco e ciclodextrina (HIGUCHI & CONNORS, 1965)..... 53

**Figura 5.** Efeito da complexação fármaco-ciclodextrina sobre a biodisponibilidade após a administração não parenteral. (Adaptado de LOFTSSON & et al., 2005)..... 54

### Artigo III: Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação da $\beta$ -lapachona por espectrofotometria no ultravioleta.

**Figura 1.** Espectro de absorção da  $\beta$ -lapachona em solução alcoólica..... 65

### Artigo VI: Melhora da solubilidade aquosa da $\beta$ -lapachona em dispersão sólida

**com polivinilpirrolidona K-30 e polietilenoglicol 4000.**

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da molécula $\beta$ -lapachona e das unidades monoméricas do PVP e PEG.....	<b>82</b>
<b>Figura 2.</b> Geometrias dos complexos mais estáveis $\beta$ -lapachona··PVP (2), $\beta$ -lapachona··PEG (2), $\beta$ -lapachona··PVP (3) e $\beta$ -lapachona··PEG (3), obtidos dos cálculos semi-empíricos AM1. Os valores próximos às linhas tracejadas representam as distâncias intermoleculares mínimas em Angstroms.....	<b>82</b>
<b>Figura 3.</b> Eletromicrografias de MEV: (A) $\beta$ -lapachona, (B) PVP K-30, (C) MF 20% $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (D) DS 10% $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (E) DS 20% $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (F) DS 30% $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (G) DS 40% $\beta$ -lapachona+PVP K-30, (H) DS 50% $\beta$ -lapachona+PVP K-30.....	<b>85</b>
<b>Figura 4.</b> Eletromicrografias de MEV: (A) $\beta$ -lapachona, (B) PEG 4000, (C) MF 20% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (D) DS 10% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (E) DS 20% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (F) DS 30% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (G) DS 40% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (H) DS 50% $\beta$ -lapachona+PEG 4000.....	<b>86</b>
<b>Figura 5.</b> Curvas termoanalíticas: (A) $\beta$ -lapachona; (B) Polímero; (C) MF 20% $\beta$ -lapachona; (D) DS 10% $\beta$ -lapachona, (E) DS 20% $\beta$ -lapachona, (F) DS 30% $\beta$ -lapachona, (G) DS 40% $\beta$ -lapachona, (H) DS 50% $\beta$ -lapachona.....	<b>89</b>
<b>Figura 6.</b> Difrátogramas: (A) $\beta$ -lapachona, (B) Polímero, (C) MF 20% $\beta$ -lapachona, (D) DS 10% $\beta$ -lapachona, (E) DS 20% $\beta$ -lapachona, (F) DS 30% $\beta$ -lapachona, (G) DS 40% $\beta$ -lapachona e (H) DS 50% $\beta$ -lapachona.....	<b>92</b>
<b>Figura 7.</b> Espectro de FTIR: (A) $\beta$ -lapachona, (B) PVP K-30, (C) MF 20% $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (D) DS 10% $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (E) DS 20% $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (F) DS 30% $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (G) DS 40% $\beta$ -lapachona+PVP K-30, (H) DS 50% $\beta$ -lapachona+PVP K-30.....	<b>95</b>
<b>Figura 8.</b> Espectros de FTIR: (A) $\beta$ -lapachona, (B) PEG 4000, (C) MF 20% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (D) DS 10% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (E) DS 20% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (F) DS 30% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (G) DS 40% $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (H) DS 50% $\beta$ -lapachona+PEG 4000.....	<b>95</b>
<b>Figura 9.</b> Solubilidade em água: (A) $\beta$ -lapachona; (B) MF 20% $\beta$ -lapachona; (C) DS 10% $\beta$ -lapachona, (D) DS 20% $\beta$ -lapachona, (E) DS 30% $\beta$ -lapachona, (F) DS 40% $\beta$ -lapachona, (G) DS 50% $\beta$ -lapachona.....	<b>97</b>
<b>Figura 10.</b> Perfis de dissolução da $\beta$ -lapachona e binários com PVP K-30 (A) e	

PEG 4000 (B).....	99
-------------------	----

**Artigo V: Caracterização físico-química dos complexos de inclusão desenvolvidos com**

**$\beta$ -lapachona e  $\beta$ -ciclodextrinas natural e quimicamente modificadas.**

<b>Figura 1.</b> Diagrama de solubilidade de fases dos sistemas $\beta$ -lap: $\beta$ CD, $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e $\beta$ -lap:M $\beta$ CD em água purificada.....	118
--	-----

<b>Figura 2.</b> Eletromicrografias de MEV. (A) Binários com $\beta$ CD, (B) Binários com HP $\beta$ CD e (C) Binários com M $\beta$ CD: (a) $\beta$ -lapachona; (b) Ciclodextrinas, (c) Mistura física, (d) Malaxado, (e) Co-evaporado e (f) <i>Spray-drying</i> .....	122
---	-----

<b>Figura 3.</b> Curvas de DSC: (A) $\beta$ -lapachona; (B) Ciclodextrina; (C) Mistura física; (D) Malaxado, (E) Co-evaporado, (F) <i>Spray-drying</i> .....	125
--	-----

<b>Figura 4.</b> Difractogramas: (A) $\beta$ -lapachona; (B) Ciclodextrina; (C) Mistura física; (D) Malaxado, (E) Co-evaporado, (F) <i>Spray-drying</i> .....	127
---	-----

<b>Figura 5.</b> Espectros de FTIR com $\beta$ CD: (A) $\beta$ -lapachona; (B) $\beta$ CD; (C) Mistura física; (D) Malaxado, (E) Co-evaporado, (F) <i>Spray-drying</i> .....	129
--	-----

<b>Figura 6.</b> Espectros de FTIR com HP $\beta$ CD: (A) $\beta$ -lapachona; (B) HP $\beta$ CD; (C) Mistura física; (D) Malaxado, (E) Co-evaporado, (F) <i>Spray-drying</i> .....	130
--	-----

<b>Figura 7.</b> Espectros de FTIR com M $\beta$ CD: (A) $\beta$ -lapachona; (B) M $\beta$ CD; (C) Mistura física; (D) Malaxado, (E) Co-evaporado, (F) <i>Spray-drying</i> .....	130
--	-----

<b>Figura 8.</b> Solubilidade em água: (A) $\beta$ -lapachona; (B) Misturas Físicas; (C) Malaxados, (D) Co-evaporados e (E) <i>Spray-drying</i> .....	132
---	-----

<b>Figura 9.</b> Perfis de dissolução da $\beta$ -lapachona e binários.....	134
---	-----

**Ensaio Biológico:**

**Estudos preliminares da influência dos complexos  $\beta$ -lapachona:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lapachona:PVP K-30 no tratamento de camundongos com tumor sólido de Ehrlich.**

<b>Figura 1.</b> Perfis de dissolução dos sistemas $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e $\beta$ -lap:PVP K-30.....	146
--	-----

<b>Figura 2.</b> Massa tumoral: 1) Controle negativo; 2) Dispersões sólida; 3) Controle positivo e 4) Complexo de inclusão.....	147
---	-----

<b>Figura 3.</b> Peso absoluto dos tumores.....	148
---	-----

## *Resumo*

A  $\beta$ -lapachona é uma ortonaftoquinona de ocorrência natural no ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor), da família Bignonaceae. Também pode ser obtida pelo processo de semi-síntese a partir de seu isômero lapachol. É um produto vegetal simples com uma estrutura química diferente dos fármacos atuais e tem demonstrado excelente potencial antineoplásico atuando por um mecanismo particular de apoptose em diversos tipos de câncer, em especial algumas linhagens de próstata, mama, ovário e leucemias refratárias aos tratamentos convencionais, o que tem incentivado estudos tecnológicos com este princípio ativo, ainda não disponível em uma forma farmacêutica devido à dificuldade no desenvolvimento farmacotécnico. Por se tratar de um princípio ativo com baixa solubilidade em água, a tecnologia para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica a base de  $\beta$ -lapachona que proporcione biodisponibilidade favorável é um ponto fundamental para a continuidade das pesquisas. Neste estudo a  $\beta$ -lapachona foi complexada na forma de dispersões sólidas e complexos de inclusão. As dispersões sólidas foram obtidas pelo método de evaporação do solvente de solubilização com os polímeros hidrossolúveis PVP-K30 e PEG 4000 nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50% de  $\beta$ -lapachona. As ciclodextrinas  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD foram utilizadas para obtenção dos complexos de inclusão pelos métodos de malaxagem, co-evaporação e secagem por atomização. Estes sistemas foram obtidos pela conversão da mistura fármaco/carreador no estado líquido para o estado sólido, onde o produto final,  $\beta$ -lapachona complexada que obtiver o maior aumento da solubilidade do fármaco com melhor estabilidade, será utilizado como matéria-prima para o desenvolvimento de formas farmacêuticas, realização de estudos em modelos animais para definição de dose terapêutica e avaliação da eficácia e toxicidade do fármaco complexado. Um estudo comparativo entre os produtos isolados, misturas físicas e binários complexados foi realizado através da caracterização por microscopia eletrônica de varredura e calorimetria exploratória diferencial. Para as dispersões sólidas foram realizados ainda os ensaios de metodologia computacional, solubilidade aquosa e dissolução. Para a quantificação de rotina da  $\beta$ -lapachona foi desenvolvida e validada uma metodologia de doseamento por espectrofotometria no UV. Os produtos que apresentaram uma caracterização físico-química com maior índice de perda de cristalinidade e melhores perfis de dissolução,  $\beta$ -lapachona:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lapachona:PVP K-30, foram utilizados em um estudo preliminar *in vivo* para avaliação de toxicidade e atividade antineoplásica na concentração de 20 mg/Kg de  $\beta$ -lapachona.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -lapachona, Complexo de Inclusão, Ciclodextrinas, Dispersões Sólidas, Polietilenoglicol, Polivinilpirrolidona, Solubilidade.

## *Abstract*

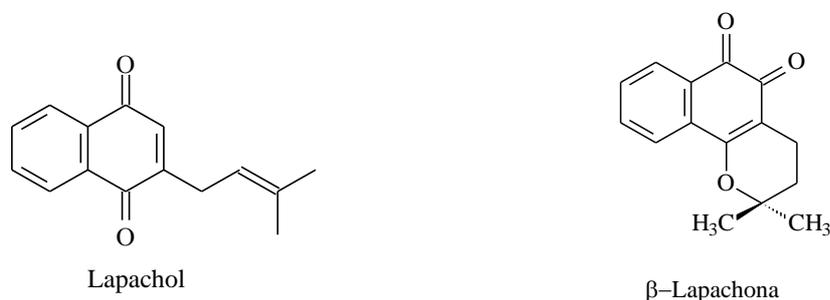
The  $\beta$ -lapachone is an orthonaftoquinona naturally occurring in “ipe roxo” or “pau d'arco roxo” (*Tabebuia avellanadae* Lor), family Bignonaceae. Can also be obtained by the process of semi-synthesis from its isomer lapachol. It is a simple plant product with a different chemical structure of drugs today and has shown excellent potential as antineoplastic due to by a particular mechanism of apoptosis in various types of cancer, especially some strains of prostate, breast, ovary and leukemia refractory to conventional treatments, which has encouraged technological studies with this active principle, not yet available in a dosage form due to the difficulty in technological developing. In the case of an active principle with low solubility in water, the technology for the development of a pharmaceutical form the basis of  $\beta$ -lapachone providing favorable bioavailability is a key point for the continuity of research. In this study,  $\beta$ -lapachone was complexed in the form of solid dispersions and inclusion complexes. The solid dispersions were obtained by the method of evaporation of the solvent solubilization with the water soluble polymers PVP-K30 and PEG 4000 at concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50% of  $\beta$ -lapachone. The cyclodextrins  $\beta$ CD, M $\beta$ CD and HP $\beta$ CD were used to obtain the inclusion complex of the methods of kneaded, co-evaporation and spray-drying. These systems were obtained by converting the mixture drug / carrier in the fluid to the solid state, where the final product,  $\beta$ -lapachone complexed who obtains the highest increase in solubility of the drug with better stability, will be used as raw material for the development of pharmaceutical forms, study in animal models for the development of therapeutic dose and evaluate the efficacy and toxicity of the complexed drug. A comparison between the products alone, physical mixtures and binary complex was achieved by the characterization using scanning electron microscopy and differential scanning calorimetry. For the solid dispersions were also conducted tests of computational methods, aqueous solubility and dissolution. For routine quantification of  $\beta$ -lapachone was developed and validated a methodology for determination by the UV spectrophotometer. The products showed a physicochemical characterization with greater loss of crystallinity and better dissolution profiles,  $\beta$ -lapachone: HP $\beta$ CD and  $\beta$ -lapachone: PVP K-30 were used in a preliminary study to evaluate in vivo toxicity and antineoplastic activity at a concentration of 20 mg / kg of  $\beta$ -lapachone.

**Keywords:**  $\beta$ -lapachone, Inclusion Complex, Cyclodextrin, Solid Dispersions, Polyethyleneglycol, Polyvinylpyrrolidone, Solubility.

## ***Introdução***

## Introdução

Novos fármacos provenientes de extratos vegetais são isolados e identificados a cada dia e, muitas vezes, servem de modelos para alterações moleculares que resultam em compostos mais eficazes. Porém, estas alterações modificam também as características químicas do produto, como é o caso do lapachol, fármaco de origem vegetal que teve sua estrutura química e rota de síntese estabelecidas em 1936, embora novas rotas continuem sendo investigadas.<sup>1,2,3</sup> A ciclização da molécula do lapachol, através de termorreação controlada ou por hidrólise ácida origina um isômero semi-sintético, uma quinona, conhecido como  $\beta$ -lapachona, 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>, MM 242,3) (Figura 1).<sup>2,4</sup> A  $\beta$ -lapachona também pode ser extraída com pequeno rendimento diretamente de diversas plantas, sendo mais abundante numa árvore tropical conhecida como ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor), da família Bignoneaceae, de ocorrência muito comum no Brasil.<sup>5,6</sup>



**Figura 1.** Estrutura química do lapachol e  $\beta$ -lapachona.

A  $\beta$ -lapachona tem demonstrado numerosos efeitos farmacológicos, sendo bastante conhecidas suas atividades antibacteriana<sup>4</sup>, antifúngica<sup>7</sup>, antitripanossômica<sup>8</sup> e antiviral<sup>9</sup>. Estudos 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 antineoplásico.<sup>10-14</sup> Diversos estudos demonstram a efetividade da  $\beta$ -lapachona contra câncer de próstata, ovário, mama, pulmão, cólon, pâncreas e alguns tipos de leucemias e linfomas, inclusive algumas linhagens tumorais que se

## *Introdução*

mostraram refratárias às drogas comuns. O mecanismo de ação da  $\beta$ -lapachona ainda não está totalmente elucidado. Seu modo de ação é diferente da maioria das drogas antineoplásicas atualmente disponíveis no mercado.<sup>15-20</sup> Sabe-se que ela age interagindo diretamente e inibindo a DNA topoisomerase I, ao invés de agir estabilizando o complexo no DNA substrato, inibindo a replicação de células cancerígenas através do bloqueio do ciclo celular nas fases  $G_0/G_1$  e que induz a apoptose, morte programada de células cancerígenas, por um mecanismo particular, independente da expressão das proteínas p53, p21 e da super expressão ectópica da proteína bcl-2, com posterior estimulação da ativação da caspase-7.<sup>12, 13, 16, 18, 19, 21-</sup>  
<sup>25</sup> Outros estudos 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).<sup>17, 26</sup>

Estudos da literatura definem valores distintos para a toxicidade da  $\beta$ -lapachona. Quando determinada em ratos albinos após a administração por via intraperitoneal de uma suspensão em veículo não citado, na dose de 7mg/Kg, demonstrou uma  $DL_{50}$  de 80mg/Kg.<sup>27</sup> Em outro estudo a  $DL_{50}$  determinada pela mesma via de administração e com os mesmos modelos animais, utilizando  $\beta$ -lapachona suspensa em óleo de oliva foi definida como 204mg/Kg.<sup>28</sup> Ao usar uma solução hidroalcoólica à 20mg/Kg de  $\beta$ -lapachona num ensaio de atividade com a mesma via e espécie animal, observou a morte de 80% dos animais, sendo necessária a mudança da dose para 8mg/Kg durante 7 dias.<sup>29</sup>

Apesar de vários estudos comprovarem as diversas ações terapêuticas da  $\beta$ -lapachona ela nunca chegou a ser comercializada devido à dificuldade de obtenção de uma forma farmacêutica estável, como é o caso das formas farmacêuticas clássicas já desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco para veiculação da  $\beta$ -lapachona: suspensão oral, cápsula gelatinosa dura, cápsula gelatinosa mole e solução injetável.<sup>30-32</sup>

### *Introdução*

Este trabalho, portanto, viabilizou a obtenção e caracterização físico-química da  $\beta$ -lapachona complexada, visando maior estabilidade e maior teor de dissolução do fármaco, que poderá ser posteriormente utilizada para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica. A complexação foi obtida sob a forma de dispersões sólidas com os polímeros hidrossolúveis PVP K-30 e PEG 4000 e de complexos de inclusão com as ciclodextrinas  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD. A avaliação da toxicidade e atividade antitumoral dos produtos complexados com melhor desempenho na avaliação físico-química foi realizada através de um estudo preliminar em camundongos.

A tecnologia das dispersões sólidas é caracterizada pela dispersão de um ou mais fármacos em um carreador farmacologicamente inerte, no geral são utilizados polímeros hidrossolúveis, ambos no estado sólido, com o objetivo de alterar suas propriedades físico-químicas, em especial a velocidade e extensão da dissolução de fármacos com baixo coeficiente de solubilidade.<sup>33, 34</sup> Os complexos de inclusão são obtidos através de interações entre o fármaco e as ciclodextrinas, oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose, onde a presença das hidroxilas livres na parte externa confere a essas moléculas um caráter hidrofílico. As ciclodextrinas apresentam um arranjo estrutural com orientação cíclica que estabelece um formato de tronco de cone, hidrofílico no exterior e lipofílico no interior. A complexação ocorre quando a molécula “hospede”, fármaco, preenche completamente ou parcialmente a cavidade interna da ciclodextrina, que é relativamente apolar em relação à água, o que propicia a formação de complexos de inclusão com compostos orgânicos.<sup>35-37</sup>

## ***Objetivos***

### **Objetivo geral**

Obtenção e caracterização da  $\beta$ -lapachona complexada através dos métodos de dispersões sólidas e complexos de inclusão com a finalidade de aumentar a solubilidade e a taxa de dissolução.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar físico-quimicamente os polímeros e ciclodextrinas selecionados para o desenvolvimento das dispersões sólidas e dos complexos de inclusão, com ênfase no estudo de solubilidade e determinação da faixa de fusão;
- Analisar a compatibilidade físico-química do princípio ativo com os polímeros utilizando os solventes selecionados para preparação das dispersões sólidas;
- Co-validar metodologia analítica de doseamento para  $\beta$ -lapachona complexada;
- Realizar uma planificação quali-quantitativa, através de ensaios de solubilidade de fases, entre as ciclodextrinas e a  $\beta$ -lapachona para a obtenção dos complexos de inclusão;
- Preparar misturas físicas entre os polímeros e ciclodextrinas com a  $\beta$ -lapachona;
- Obter as dispersões sólidas binárias com a  $\beta$ -lapachona e os polímeros selecionados;
- Obter os complexos de inclusão binários com a  $\beta$ -lapachona e as ciclodextrinas selecionadas;
- Realizar estudo comparativo através da caracterização físico-química entre os produtos isolados, misturas físicas, dispersões sólidas e complexos de inclusão, visando demonstrar a diferença na taxa de dissolução da  $\beta$ -lapachona.
- Realizar estudo preliminar *in vivo* em camundongos para avaliar a eficácia e toxicidade dos produtos obtidos.

*Artigo I*

**Propriedades, avanços e aplicações no desenvolvimento de dispersões sólidas para obtenção de medicamentos.**

(Submetido para publicação na Revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)

## **PROPRIEDADES, AVANÇOS E APLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DE DISPERSÕES SÓLIDAS PARA OBTENÇÃO DE MEDICAMENTOS**

### **RESUMO**

Dispersões sólidas não cristalinas são amplamente utilizadas como estratégia na melhoria da biodisponibilidade de compostos pouco hidrossolúveis. No entanto, existem poucos relatos da aplicação desta técnica em medicamentos, demonstrando a necessidade do conhecimento aprofundado com relação às principais e mais recentes técnicas de obtenção utilizadas em escala laboratorial e industrial. Além das principais características físico-químicas dos polímeros hidrofílicos mais utilizados, relacionando suas vantagens e desvantagens, assim como as possibilidades de aplicação. Nesta revisão, pretende-se discutir os recentes avanços na área das dispersões sólidas e sua utilização em sistemas multicomponentes.

**Palavras-chave:** carreadores, dispersão sólida, métodos de obtenção, solubilidade.

### **ABSTRACT**

Amorphous solid dispersions are used as a strategy to improve the bioavailability of poorly water-soluble compounds. However, there are few reports of this technique in finished products, demonstrating the need of deep knowledge of the main and recent techniques of production used in laboratory and industrial scale. Beyond the main physicochemical characteristics of the most widely used hydrophilic polymers, listing their advantages and disadvantages, as well as the possibilities of application. In this review, it is intended to discuss the recent advances related on the technical of solid dispersions and their use in multicomponent systems.

**Keywords:** carriers, solid dispersion, methods to obtain, solubility.

## **INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, diversos sistemas de administração de fármacos surgiram com a finalidade de modelar a cinética de liberação, melhorar a absorção e aumentar a estabilidade de fármacos. A partir disto, levantaram-se as principais dificuldades no que diz respeito ao desenvolvimento e atividade terapêutica de diversos medicamentos, que resultam em grande parte, da baixa solubilidade aquosa dos fármacos. Das novas entidades químicas, de 35 a 45% possuem essa característica, o que conduz a uma baixa taxa de incorporação do ativo ou de sua liberação incompleta (SALTÃO; VEIGA, 2001; KARAVAS *et al.*, 2007).

A solubilidade aquosa de um fármaco constitui requisito prévio à absorção e obtenção de resposta clínica, para a maioria dos medicamentos administrados por via oral (RAMA *et al.*, 2006). Fármacos pouco solúveis são lentamente absorvidos quando comparados aos que possuem alta solubilidade em água (PATEL *et al.*, 2008).

Algumas técnicas são aplicadas para o incremento da solubilidade de fármacos, independente de sua estrutura química e dimensão molecular espacial (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2005). Devido à promessa de incremento de hidrossolubilidade, o emprego de dispersões sólidas (DS) tornou-se uma das mais ativas áreas de pesquisas no campo farmacêutico. Esta técnica produz uma significativa redução no tamanho da partícula do fármaco, com um aumento da uniformidade e superfície de contato, propiciando uma dissolução e absorção mais rápida (BIKIARIS *et al.*, 2005).

Os problemas que limitavam os estudos pioneiros para aplicação comercial das DS envolviam: seu método de preparação; reprodutibilidade de suas propriedades físico-químicas; dosagem na formulação; processo de fabricação em grande escala e estabilidade química do fármaco e do veículo. Contudo, a utilização desse sistema em algumas formulações, como por exemplo, no desenvolvimento de tecnologias para enchimento direto de DS em cápsulas de gelatina dura, renovaram o interesse desse sistema para o uso pré-

clínico, clínico e desenvolvimento comercial, em grande escala, de produtos farmacêuticos (SERAJUDDIN, 1999).

No entanto, apesar dos avanços alcançados, existem poucos relatos da aplicação desta técnica em medicamentos (LEONARDI *et al.*, 2007), demonstrando a necessidade do conhecimento aprofundado com relação às possibilidades de aplicações, de forma a se obter medicamentos que garantam a eficácia terapêutica desejada, utilizando uma técnica simples e de baixo custo para as indústrias farmacêuticas.

## **AVANÇOS E APLICAÇÕES DAS DISPERSÕES SÓLIDAS**

As dispersões sólidas são obtidas através de distintos processos tecnológicos que consistem em dispersar um componente farmacologicamente ativo em um carreador ou matriz no estado sólido, a fim de melhorar a solubilidade, aumentar a taxa de dissolução, modular a ação terapêutica e a permeabilidade do fármaco através das membranas absortivas (JANSSENS *et al.*, 2008a; LIMA *et al.*, 2008). Também tem sido utilizado para aumentar a estabilidade química de fármacos em solução ou suspensão (SETHIA; SQUILLANTE, 2003).

A primeira geração de DS foi preparada empregando carreadores cristalinos, a partir da década de 60. Estes carreadores incluem uréia e açúcares, que possuem como desvantagens a formação de DS cristalinas, que por serem mais estáveis termodinamicamente, não liberam o fármaco com a rapidez desejada (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

Ao final dessa década, observou-se que a obtenção de DS poderia ser mais eficaz quando obtida no estado não cristalino. Iniciou-se então, a segunda geração das DS, caracterizada pela preparação de sistemas onde o fármaco encontra-se molecularmente disperso de forma irregular num carreador não cristalino (VILHELMSSEN *et al.*, 2005).

Esses carreadores foram relatados em 1971 por Chiou, demonstrando que polímeros hidrofílicos poderiam ser utilizados para melhorar a solubilidade e o grau de dissolução de

fármacos pouco hidrossolúveis. Como exemplos desses polímeros, podemos citar os sintéticos que incluem a polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG); e os derivados celulósicos naturais, como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), etilcelulose e hidroxipropilcelulose (CIRRI *et al.*, 2004).

Embora o fármaco no estado não cristalino possua uma dissolução mais rápida quando comparada a sua estrutura cristalina, a primeira não é fisicamente estável, sendo possível a recristalização do produto obtido durante o período de vida útil de sua utilização, facilmente verificada através da técnica de difração de raios-X (KIMURA *et al.*, 2000).

Com o intuito de contornar esse problema, estudos realizados demonstraram que o perfil dissolução das DS poderia ser melhorado através da adição de surfactantes ou de agentes com propriedade emulsionante. Iniciou-se assim a terceira geração das DS. Esta foi desenvolvida, com o objetivo de alcançar o mais elevado grau de biodisponibilidade dos fármacos pouco solúveis e de estabilizar as DS, evitando a recristalização dos fármacos (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

Estes sistemas são capazes de reduzir o tamanho de partícula do fármaco quase a nível molecular, a fim de proporcionar uma melhor molhabilidade e dispersibilidade pelo carreador, pela formação de uma estrutura não cristalina do fármaco e carreador (KARATAS; YÜKSEL; BAYKARA, 2005). Nestas DS, a dissolução do carreador ou misturas deles determina o perfil de libertação do fármaco (OHARA *et al.*, 2005).

Liu & Wang (2007) utilizaram o surfactante Polissorbato 80 como terceiro componente na preparação da DS contendo ácido oléico e PVP K-30, que exerceu um importante incremento na taxa de dissolução, quando comparado ao sistema bifásico contendo apenas o polímero e o fármaco.

As vantagens relacionadas às DS quando comparadas as formulações convencionais de cápsulas e comprimidos convencionais (Figura 1), é de que o fármaco carreado é liberado na

forma de partículas coloidais de tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$  quando dissolvido, enquanto que em formulações convencionais o tamanho de partícula é superior a 5  $\mu\text{m}$  (SERAJUDDIN, 1999; BIKIARIS *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Representação esquemática do aumento da biodisponibilidade de fármacos pouco hidrossolúveis através de DS.

Além disso, as transformações do fármaco no estado sólido cristalino para o estado não cristalino é um dos principais motivos que leva ao aumento na sua solubilidade aparente, melhorando o contato entre o fármaco e o meio de dissolução, reduzindo a formação de agregados e aglomerados e favorecendo a estabilidade das dispersões (JANSSENS *et al.*, 2008a; JANSSENS *et al.*, 2008b).

A maior absorção no estado não cristalino baseia-se no fato da energia de solvatação envolvida no processo de dissolução, pois em um sólido não cristalino as moléculas são arranjadas ao acaso. Portanto, baixa energia de solvatação é requerida para separá-las e homogeneizá-las ao meio, conseqüentemente a dissolução é mais rápida. Assim, o

desenvolvimento de formulações contendo o fármaco na forma não cristalina é frequentemente benéfico nos termos de dissolução e biodisponibilidade (STULZER *et al.*, 2007).

A dissolução do fármaco contido na DS é influenciada por vários outros fatores, dentre eles podemos citar o método empregado na obtenção, proporção e características do carreador utilizado, pH do meio de dissolução, temperatura e características da superfície das partículas resultantes da DS (OZKAN *et al.*, 2000). Dentre as influências citadas, as mais relevantes na determinação das propriedades das DS são os métodos de preparação e os tipos de carreadores utilizados.

## **MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS**

Investigações aprofundadas sobre as propriedades físico-químicas realizadas demonstram que as características inerentes das DS obtidas através dos diferentes métodos de preparação estão diretamente relacionadas. Este fato se estabelece como pré-requisito no desenvolvimento de DS mais eficientes com relação à dissolução observada no produto final e dos cuidados com relação à estabilidade do mesmo nas condições de armazenamento (BIKIARIS *et al.*, 2005).

Os métodos de obtenção das dispersões comumente utilizados são o método de fusão, solvente, fusão-solvente, e malaxagem (PATEL *et al.*, 2008). Contudo, já estão sendo citados outros métodos, dentre eles de fluido supercrítico e *spray dried*, que são comumente utilizados como método de obtenção de complexos de inclusão utilizando ciclodextrinas, mas estão sendo empregadas com sucesso para a preparação de DS.

### ***Método de solvente***

Neste método, também conhecido com método de co-evaporação, o fármaco e o carreador são solubilizados em solvente orgânico comum, em seguida evapora-se o solvente sob agitação constante, obtendo-se um resíduo seco e sólido. Esse método muitas vezes é confundido com o de co-precipitação, no entanto, neste caso o fármaco e o polímero são dissolvidos em solvente, e posteriormente são precipitados pela adição de um co-solvente. A principal desvantagem desse método é a utilização de solventes orgânicos e a formação de resíduos, apesar de ser um método simples, de baixo custo e muito utilizado em escala laboratorial (SETHIA; SQUILLANTE, 2003).

### ***Método de fusão***

Devido à toxicidade e aos problemas ecológicos associados ao uso de solventes orgânicos, a utilização do método por fusão representa um meio vantajoso na preparação das DS quando o fármaco apresenta estabilidade térmica. Contudo, seu uso é inadequado quando ocorre polimorfismo, devido à transição que pode ocorrer durante a fusão entre as formas polimórficas (ZAJC *et al.*, 2005).

Neste método, o carreador e o fármaco são aquecidos à temperatura ligeiramente superior ao seu ponto de fusão, e o fármaco é incorporado ao carreador fundido. O sistema permanece sob aquecimento, até obtenção de uma solução homogênea, macro e microscopicamente. Posteriormente o sistema é resfriado sob agitação constante, havendo maior probabilidade da quebra do estado cristalino de fármacos para o estado não cristalino, devido a utilização de temperaturas elevadas, porém há possibilidade de miscibilidade incompleta entre fármaco e carreador devido à alta viscosidade do polímero no estado fundido e degradação de fármacos termolábeis (HASEGAWA, *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006).

Quando o fármaco tem um alto grau de solubilidade no carreador, ele pode permanecer “dissolvido” no estado sólido, originando o que é conhecido como solução sólida. Sob estas condições a redução no tamanho das partículas provê um nível máximo de dispersão molecular do fármaco no carreador (JUPPO *et al.*, 2003).

### ***Método fusão-solvente***

Neste método, o polímero é aquecido à temperatura ligeiramente superior ao seu ponto de fusão e o fármaco, previamente solubilizado em solvente orgânico, é incorporado ao carreador fundido. Posteriormente o sistema é resfriado sob agitação constante, e seco por liofilização, quando necessário. Este método torna-se útil para fármacos que tenham elevado ponto de fusão ou termolábeis (FERNANDEZ *et al.*, 1992). No entanto, é um método pouco relatado na literatura.

### ***Método de malaxagem***

Neste método, o polímero e o fármaco são misturados por diluição geométrica. A mistura é malaxada com a adição de mínima quantidade de solvente (equivalente a 30% do peso dos pós) para obter uma consistência inicial de pasta. Industrialmente, a mistura de componentes é efetuada em uma malaxadora. A secagem do material pode ser feita em estufa ou diretamente na malaxadora acompanhada de pulverização para uniformizar o tamanho de partícula. Devido à simplicidade, ao elevado rendimento e à facilidade de transposição de escala, este método é um dos mais utilizados na indústria farmacêutica (LIMA *et al.*, 2008).

### ***Método de spray dried***

Embora a técnica por *spray dried* seja uma tecnologia que necessita de elevados investimentos em instalações e operações, muitas são as razões pelas quais a mesma é

amplamente utilizada, apesar do custo. Esta vem sendo recentemente utilizada, principalmente no incremento da biodisponibilidade de fármacos da classe biofarmacêutica II (reduzida solubilidade e elevada permeabilidade), resultando em produtos com melhores propriedades funcionais, tais como tamanho de partícula, compactação e taxa de dissolução (CHAUHAN; SHIMPI; PARADKAR, 2005; CORRIGAN; HEALY; CORRIGAN, 2002). Para os fármacos dessa classe, a solubilidade é o fator limitante da absorção e os dados e estudos *in vitro* podem ser úteis (RAMA *et al.*, 2006).

As vantagens relacionadas a essa técnica incluem a produção de partículas de qualidade consistente, a facilidade em relação ao uso contínuo, a aplicabilidade da técnica em materiais tanto sensíveis quanto resistentes ao aquecimento e capacidade de processar vários tipos de matéria prima, produção de sistemas de liberação prolongada, além de aumentar a hidrossolubilidade de fármacos (STULZER *et al.*, 2007).

A obtenção de DS a partir desse método se dá a partir da solubilização de fármaco e carreador em solvente orgânico comum, em seguida, evapora-se o solvente. Esse processo produz DS de partículas com tamanhos reduzidos e não cristalinas, com alta taxa de dissolução, com mínimo resíduo de solvente nos sistemas, além da possibilidade de transposição industrial (CHAUHAN; SHIMPI; PARADKAR, 2005).

### ***Método por fluido supercrítico***

O processo de fluido supercrítico vem emergindo como um método alternativo ao método de solvente, formando co-precipitados de pequeno tamanho de partícula e com baixo teor de resíduo orgânico, apresentando também melhor escoamento. O dióxido de carbono é atualmente utilizado por essa técnica, devido às vantagens associadas ao seu uso, por ser um gás não tóxico, não inflamável, barato, e de baixa temperatura crítica, tornando-se atraente no processamento de fármacos sensíveis ao calor, sendo o processo remoção do solvente

extremamente controlado (SETHIA; SQUILLANTE, 2003). Apesar dos resultados promissores descritos na literatura, ainda é uma técnica experimental e que apresenta um custo inicial bastante elevado (AL-MARZOUQI *et al.*, 2007).

## **AGENTES CARREADORES UTILIZADOS NAS DISPERSÕES SÓLIDAS**

Na preparação de DS, muitas substâncias podem ser utilizadas, dentre elas podemos citar os polióis (manitol e sorbitol); ácidos orgânicos (ácido cítrico); uréia; poloxamer; quitosana e glicerídeos poliglicosilados. Contudo, os polímeros hidrofílicos são os mais citados e utilizados como carreadores de substâncias sólidas para as dispersões (BROMAN; KHOO; TAYLOR, 2001).

As propriedades dos polímeros estão diretamente relacionadas com a natureza química dos monômeros, o peso molecular e a estrutura macromolecular (LOFTSSON; MASSON; BREWSTER, 2004). Combinações de polímeros ou de polímeros e surfactantes têm sido propostos na tentativa de adequar as propriedades físico-químicas dos polímeros ao sistema de dispersão sólida (JANSSENS *et al.*, 2008b). Além disso, a escolha dos carreadores poliméricos pode determinar a inibição ou o período que o fármaco disperso possa vir a se recristalizar, sendo este fator dependente do grau de miscibilidade do fármaco no polímero em determinada umidade (VASANTHAVADA *et al.*, 2005).

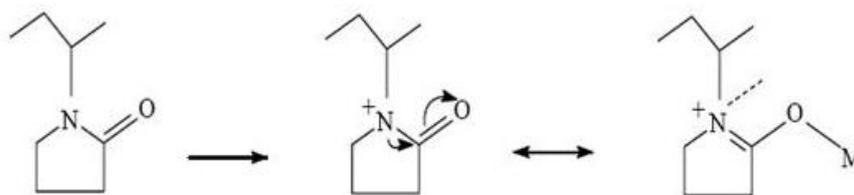
Dentre os polímeros hidrofílicos mais relatados na literatura para preparação das DS temos o PEG, PVP e HPMC. Ambos os polímeros são freqüentemente empregados em diversas formulações farmacêuticas, devido à baixa toxicidade, taxa de solidificação rápida, alta solubilidade aquosa, disponibilidade em vários pesos moleculares, custo econômico, e fisiologicamente toleráveis (PATEL *et al.*, 2008; LIU; WANG, 2007).

### **Polivinilpirrolidona (PVP)**

O PVP, também chamado de povidona, é um homopolímero de N-vinil-2-pirrolidona, capaz de formar ligações de hidrogênio com outras moléculas por conter grupos elétrons doadores como nitrogênio e oxigênio. Apresenta-se como um pó branco não cristalino de fluxo livre e seu peso molecular é frequentemente relatado por K, valor de Fikentscher, derivado da viscosidade de uma solução. Para as DS, o PVP K-12 e K-30 (PM 2500-50.000) são os mais utilizados. Acima de 50.000 a solubilidade aquosa de PVP diminui e a viscosidade é diretamente aumentada, o que pode ser utilizado para liberação controlada de fármacos. De natureza higroscópica e com variação de peso molecular de 10.000 a 700.000, apresenta uma ampla faixa de aplicações na indústria farmacêutica (VALERO *et al.*, 2003; SETHIA; SQUILLANTE, 2003; PATEL *et al.*, 2008).

Uma das abordagens clássicas em termos de aumento da dissolução de fármacos pouco hidrossolúveis está na maximização da estrutura porosa de uma matriz polimérica solúvel em água, como é o caso do PVP. O objetivo do recurso é aumentar a superfície de contato do fármaco com o meio dissolutor (DORNELAS *et al.*, 2008).

O PVP apresenta um anel lactâmico como parte da unidade monomérica. A alta polaridade do anel pode ser atribuída à forte estabilização de ressonância, mostrada na Figura 2, facilitada pela geometria planar do anel, contribuindo na ligação com fármacos pouco hidrossolúveis (M) através de ligações de hidrogênio, possibilitando o processo de formação das DS (KARAVAS *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Representação da estrutura monomérica do PVP e a formação da ligação entre fármaco (M) e o polímero.

Em geral, a temperatura de transição vítrea do PVP é elevada, para o PVP K-30 é de 163° C. Por esta razão, o PVP tem aplicação limitada para a preparação de DS pelo método de fusão. Devido à sua boa solubilidade em uma ampla variedade de solventes orgânicos, é particularmente adequado para a preparação pelo método de solvente (BROMAN; KHOO; TAYLOR, 2001).

### ***Polietilenoglicol (PEG)***

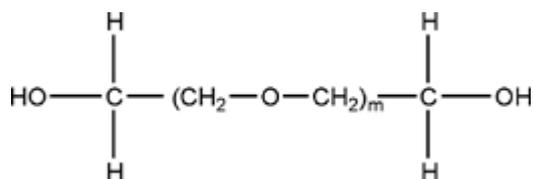
A utilização do PEG, polímero de oxido etileno, caracterizado pelas unidades (- CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-) de repetição, torna-se vantajosa na obtenção de DS, devido suas propriedades físico-químicas. Dentre elas, a presença de grupamentos hidroxila (-OH) como doadores de elétrons (Figura 3); responsáveis pela interação com compostos hidrofóbicos, biocompatibilidade, características inodoras, neutro e não-irritante, baixa toxicidade *in vivo* e solubilidade em diversos solventes orgânicos e em água, proporcionando uma liberação rápida do fármaco disperso e facilitando o processo de obtenção pelo método solvente (LEAO; SYU, 2009; PATIL; GAIKWAD, 2009; MA *et al.*, 2009).

Os limites da aplicação do PEG podem ser estendidos pela biodegradabilidade em resposta aos fatores específicos tais como o aumento na temperatura ou pH (LEUNER; DRESSMAN, 2000; KOO *et al.*, 2009).

O PEG apresenta diversos PM e diferentes temperaturas de fusão, sendo isto um dos motivos por serem bastante utilizados em muitas aplicações industriais que envolvem aquecimento. Seu peso molecular varia de 200 a 300.000 (PATEL *et al.*, 2008). Comumente, na preparação de DS e de soluções, são utilizados PEGs com PM entre 1500 e 20.000. Com o aumento do peso molecular do PEG, há a elevação da sua viscosidade e de seu ponto de fusão. Nas estruturas de PM de até 600, os PEGs são fluidos; na escala entre 800-1500

apresenta maior consistência; entre 2000 a 6000 apresentam aspectos cerosos e aqueles com PM acima de 20000, são em forma de cristais frágeis à temperatura ambiente.

A variação dos PF dos PEGs encontra-se inferior a 65 °C, por exemplo, o PEG 1000 é 30-40 °C, PEG 4000 é 50-58 °C e o PEG 20000 é 60-63 °C (WANG *et al*, 2009). Estas baixas temperaturas de PF são vantajosas para a obtenção de DS pelo método de fusão (LEUNER; DRESSMAN, 2000).



**Figura 3.** Estrutura química do monômero de PEG

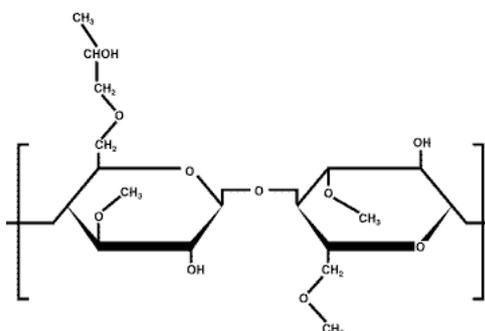
### ***Hidroxiopropilmetilcelulose (HPMC)***

Dentre os materiais poliméricos, os derivados da celulose são bastante populares, principalmente a HPMC. Este polímero é descrito pela farmacopéia européia como uma parte da celulose orto-metilada e da celulose orto-2-hidroxiopropilada (Figura 4). Classifica-se com um éter de celulose onde os hidrogênios e grupos hidroxilas da celulose foram parcialmente substituídos por grupos alquila, substituídos para modificar as características da celulose nativa (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

A popularidade do HPMC está associada à natureza não tóxica, biocompatível e biodegradável, à pequena influência das variáveis de processamento sobre a liberação do fármaco e sua facilidade de compressão. Uma das características mais importantes deste polímero hidrofílico linear é a sua capacidade de solubilização de fármacos de baixa solubilidade em comparação a outros polímeros hidrossolúveis (LYRA *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2008). Além do fato de que o seu emprego previne ou retarda o efeito de nucleação que leva a recristalização do fármaco, podendo ser associado a outros polímeros em

distintas formulações; e de acordo com a viscosidade do tipo de HPMC escolhido, possibilita uma liberação prolongada (KAPSI; AYRES, 2001).

O HPMC é bastante solúvel em água, misturas hidroalcoólicas e solventes clorados, não sendo solúvel em etanol puro (KUSHIDA *et al.*, 2002). Usualmente é relatada a preparação de DS com HPMC utilizando misturas de solventes com diclorometano pelo método de solvente (YAMASHITA *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Estrutura química do monômero de HPMC

As propriedades físico-químicas deste polímero são fortemente afetadas por modificações nos grupamentos metoxi (OCH) e hidroxipropoxi (OCH-CH (CH) OH), e pelo peso molecular. A USP distingue quatro diferentes tipos de HPMC: HPMC 1828, HPMC 2208, HPMC 2906 e HPMC 2910. Os dois primeiros números indicam a percentagem de grupos metoxi, os dois últimos números, a percentagem de grupos hidroxipropoxi, determinados após secagem a 1058°C por 2 h. (SIEPMANNA; PEPPAS, 2001). Na obtenção de DS é relatada a utilização dos diferentes tipos de HPMC, não havendo um predomínio de um determinado tipo, demonstrando que a escolha é realizada de acordo com a finalidade pretendida.

### ***Novos carreadores***

A utilização de carreadores anfifílicos constituídos de lipídios como agentes solubilizantes como o Gelucire<sup>®</sup> e a Vitamina E TPGS (TPGS), tem atraído recente interesse nos estudos de incremento de solubilidade de fármacos.

Gelucires<sup>®</sup> são glicerídeos saturados poliglicosilados constituídos de mono-, di-, e triglicerídeos e de mono- e di- ésteres de ácido graxo de polietilenoglicol. Quando em contato com os fluidos aquosos, essa substância forma uma fina emulsão, que possibilita a solubilização da substância ativa. Além disso, suas propriedades permitem o controle da liberação do fármaco na formulação. As substâncias com baixo equilíbrio hidrolipídico podem ser empregadas para diminuir a velocidade de dissolução de fármacos e as com alto EHL são utilizadas para uma rápida liberação (KARATAS; YÜKSEL; BAYKARA, 2005).

O TPGS é um derivado da vitamina E solúvel em água que consiste em um grupo polar hidrofílico de polietilenoglicol e uma cauda lipofílica, constituída de tocoferol succinato, resultando um tensoativo de propriedades anfifílicas (EHL~13). Assim como o Gelucires<sup>®</sup>, o TPGS apresenta a vantagem de formar espontaneamente emulsões, facilitando a solubilização de fármacos lipofílicos quando em meio aquoso, por apresentar uma baixa concentração micelar crítica, garantindo o incremento da absorção gastrointestinal (KHOO; PORTER; CHARMAN, 2000).

A utilização da associação do Gelucires<sup>®</sup> e do TPGS em formulações com PVP mostrou-se eficiente na redução na taxa de cristalização, evento comum quando se utiliza carreadores com baixo ponto de fusão. Sendo, contudo, o aumento da biodisponibilidade a maior vantagem oferecida por estas formulações à base de lipídios (KHOO; PORTER; CHARMAN, 2000).

O Labrasol<sup>®</sup>, um tensoativo da mesma natureza química como Gelucires<sup>®</sup>, também vem sendo extensivamente explorado para aumentar a solubilidade e permeabilidade intestinal e

biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água. Apresentando-se como um líquido transparente e com valor de EHL de 14 (KARATAS; YÜKSEL; BAYKARA, 2005; KOGA *et al.*, 2006).

Apesar de não ser um tensoativo, os polaxamers, conhecidos comercialmente como Lutrol<sup>®</sup>, também vem sendo relatados na preparação de DS, devido a sua propriedade emulsionante nesse sistema. Sua constituição intercalar de unidades de copolímero hidrofílicas e hidrofóbicas possibilita sua ampla utilização como agentes solubilizadores, molhantes e estabilizadores de suspensão. Como exemplo dessa classe tem-se o Poloxamer 188, que é um copolímero composto de duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno ligadas por uma cadeia hidrofóbica de polioxipropileno, que vem sendo frequentemente selecionado como carreador na dissolução de fármacos pouco solúveis em água (SHAH *et al.*, 2007).

## **DISPERSÕES SÓLIDAS EM SISTEMAS MULTICOMPONENTES COM CICLODEXTRINAS**

As ciclodextrinas (CDs) constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos utilizado com sucesso pela indústria, conhecidas principalmente por formar complexo de inclusão com uma variedade de moléculas de baixa hidrossolubilidade, tanto em solução como no estado sólido (RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2003).

Devido sua estrutura tronco-cônica, formada por moléculas de D-glicose, possui capacidade de complexação molecular através da substituição das moléculas de água encontradas no meio e no interior da cavidade, que possuem elevada entalpia, por moléculas hóspedes com características hidrofóbicas. Trata-se de um processo energeticamente viável por promover uma alteração favorável de entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, fatores que contribuem para o aumento da estabilidade do complexo formado. Interações eletrostáticas de *Van der Waals*, interações hidrofóbicas, ligações de

hidrogênio, também contribuem para formação e estabilização dos complexos de inclusão (GUEDES *et al.*, 2008).

No entanto, a eficiência de complexação de CDs muitas vezes pode se apresentar baixa, levando conseqüentemente a utilização de significantes quantidades de CDs para solubilizar pequenas proporções de moléculas hidrofóbicas. Logo, apesar dos avanços no campo farmacêutico resultantes da utilização de CD na melhora da solubilidade nem sempre são suficientes, sendo necessário o contínuo esforço em tentar melhorar formulações contendo complexos fármaco-CD (ASBAHR *et al.*, 2009).

Com essa finalidade, vem-se propondo a obtenção de complexos ternários entre fármaco, CD e um terceiro componente. Dentre as substâncias que vem sendo utilizadas adicionalmente na formação desse sistema podemos citar os hidróxi-ácidos e polímeros hidrossolúveis (RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2003); seguido, em geral, de um tratamento térmico que promove a formação de complexos poliméricos, também denominados de co-complexos ou sistemas/complexos multicomponentes. Essa associação tem sido de interesse relevante aos conhecimentos científicos e tecnológicos devido as características físicas, químicas e biológicas dos fármacos que são otimizados juntamente com essa associação (RIBEIRO *et al.*, 2005; VALERO *et al.*, 2003).

Essa técnica provoca um efeito sinérgico na solubilidade, estabilidade e capacidade de complexação do princípio ativo, o que permite diminuir as quantidades de CDs presentes na formulação, inclusive em soluções aquosas (LOFTSSON; MASSON; BREWSTER, 2004). Para os polímeros, que são mais utilizados, demonstrou-se que o efeito solubilizante das CD é adicionalmente potencializado pelo uso dos mesmos em baixas concentrações (PETRY; BORGHETTI; BASSANI, 2007).

As principais classes de polímeros hidrossolúveis empregados na obtenção de sistemas multicomponentes de complexação são: (1) Polímeros semi-sintéticos derivados da celulose:

metilcelulose (MC), hidroxietilcelulose (HEC), hidroxipropilcelulose (HPC), HPMC, hidroetilmetilcelulose (HEMC) e carboximetilcelulose sódica (Na-CMC). (2) polissacarídeos naturais ou polipeptídeos: inulina, pectina, alginato de sódio, ágar, caseína, carragenina, quitosana, escleroglucano e mucina. (3) polímeros sintéticos do tipo polivinilo ou copolímeros de ácido acrílico e outros polímeros (polímeros neutros ou com carga iônica): PVP, álcool polivinílico (PVA) e brometo de hexadimetrina (HDMB) (ASBAHR *et al.*, 2009).

As interações entre polímeros e CD têm sido intensamente estudadas. Num desses estudos, verificou-se que entre diversos polímeros, a  $\alpha$ -CD se complexa de forma mais eficiente com o PEG. Outros polímeros como o polipropilenoglicol e poliisobutileno, formam melhores complexos com a  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (WULFF; ALDÉN, 1995).

Contudo, também foi relatado que em soluções aquosas os polímeros tanto podem aumentar como diminuir a complexação com CDs. Como exemplo disto, temos o propilenoglicol, que reduz a complexação de alguns fármacos, agindo como um concorrente da molécula hóspede, enquanto a adição de PVP aumenta significativamente as constantes de estabilidade de alguns complexos fármaco-CD, provavelmente pela formação de complexos ternários ou co-complexos (WULFF, ALDÉN, 1995). Como verificado no complexo formado entre a hidrocortisona e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), onde evidenciou-se um aumento na constante de associação do complexo de 890 para 1070 M<sup>-1</sup>, na presença de 0.25% (p/v) de PVP (BIBBY; DAVIES; TUCKER, 2000).

A avaliação do incremento da solubilidade aquosa obtida através dessas interações é realizada através de caracterizações físico-químicas por distintas técnicas analíticas. Ribeiro *et al.* (2005), confirmaram a formação de complexos multicomponentes da vimpocetina com ácido tartárico, polímeros hidrossolúveis como HPMC e PVP K-30 e sulfabutiléter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), no estado sólido, através da microscopia eletrônica de Varredura (MEV), análises térmicas, difração de raios-X, espectroscopia de infra-vermelho com

transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear. Essas caracterizações demonstram quanto a caracterização dos complexos formados são importantes na avaliação do incremento de solubilidade alcançado e da estabilidade dos mesmos, possibilitando o desenvolvimento racional desses sistemas.

## CONCLUSÃO

Diante das técnicas aplicadas para o incremento de solubilidade de fármaco pouco hidrossolúvel, o emprego de DS tem se destacado como um dos avanços nas áreas de pesquisas no campo farmacêutico. Diversos polímeros hidrofílicos têm sido utilizados com esta finalidade. Além desses, a adição de agentes surfactantes com propriedade emulsionante também vem sendo utilizados. Bem como a associação de DS à ciclodextrinas na formação de sistemas multicomponentes. Portanto, mesmo com os vários métodos de obtenção e diferentes tipos de agentes carreadores, investigações têm sido aprofundadas no desenvolvimento de DS mais eficientes frente às melhorias observadas na dissolução dos fármacos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MARZOUQI, A. H.; JOBE, B.; DOWAIDAR, A.; MAESTRELLI, F.; MURA, P. Evaluation of supercritical fluid technology as preparative technique of benzocaine-cyclodextrin complexes-Comparison with conventional methods. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 43, n.2, p.566-74, 2007.
- ASBAHR, A. C. C.; FRANCO, L.; BARISON, A.; SILVA, C. W. T.; FERRAZ, H. G.; RODRIGUES, L. N. C. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HP $\beta$ CD and polymers: Preparation and characterization. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2718-2723, 2009.

- BIBBY, D. C.; DAVIES, N. M.; TUCKER, I. G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 197, p. 1–11, 2000.
- BIKIARIS, D.; PAPAGEORGIOU, G. Z.; STERGIU, A.; PAVLIDOU, E.; KARAVAS, E.; KANAZE, F.; GEORGARAKIS, M. Physicochemical studies on solid dispersions of poorly water-soluble drugs Evaluation of capabilities and limitations of thermal analysis techniques. **Thermochimica Acta**, v. 439, p. 58–67, 2005.
- BROMAN, E.; KHOO, C.; TAYLOR, L. S. A comparison of alternative polymer excipients and processing methods for making solid dispersions of a poorly water soluble drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, n. 1, p. 139-151, 2001.
- CHAUHAN, B.; SHIMPI, S.; PARADKAR, A. Preparation and evaluation of glibenclamide-polyglycolized glycerides solid dispersions with silicon dioxide by spray drying technique. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 219–230, 2005.
- CIRRI, M.; MURA, P.; RABASCO, A. M.; GINES, J.M.; MOYANO, J. R.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. L. Characterization of ibuprofen binary and ternary dispersion with hydrophilic carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n.1, p. 65-74, 2004.
- CORRIGAN, D. O.; HEALY, N. M.; CORRIGAN, O. I. The effect of spray drying solutions of polyethylene glycol (PEG) and lactose/PEG on their physicochemical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p.193–205, 2002.
- DORNELAS, C. B.; RESENDE, D. K.; TAVARES, M. I. B.; CABRAL, A. S. G. L. M. Preparação e Avaliação Reacional de Nanocompósitos de PVP K-30 – Montmorilonita (Natural e Organicamente Modificada) por Difração de Raios X. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 187-192, 2008.

FERNANDEZ, M., RODRIGUEZ, I. C., MARGARIT, M. V., CERESO, A. Characterization of solid dispersions of piroxicam/polyethyleneglycol 4000. **International Journal of Pharmaceutics**, v.84, p. 197-202. 1992.

GUEDES, F. L.; ALVES, G. M. C.; SANTOS, F. L. A.; LIMA, L. F.; ROLIM, L. A.; ROLIM NETO, P. J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n. 3, p. 220-225, 2008.

GUIMARÃES, G. G.; KATSUKI, G. I.; ZANARDO, N. D.; RIBEIRO, D. A.; CAVALCANTI, O. A. Avaliação da pectina-HPMC no processo de revestimento por compressão. I - Estudo da propriedade de intumescimento em núcleos revestidos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 136-141, 2008.

HASEGAWA, S.; HAMAURAA, T.; FURUYAMA, N.; KUSAI, A.; YONEMOCHI, E.; TERADA, K. Effects of water content in physical mixture and heating temperature on crystallinity of troglitazone-PVP K30 solid dispersions prepared by closed melting method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, p. 103–112, 2005.

JANSSENS, S.; DENIVELLE, S.; ROMBAUT, P.; MOOTER, P. G. Influence of polyethylene glycol chain length on compatibility and release characteristics of ternary solid dispersions of itraconazole in polyethylene glycol/hydroxypropylmethylcellulose 2910 E5 blends. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, p. 203–210, 2008a.

JANSSENS, S.; ARMAS H. N.; AUTRY W. D.; SCHEPDAEL, A. V; MOOTER, G. V. Characterization of ternary solid dispersions of Itraconazole in polyethylene glycol 6000/polyvidone-vinylacetate 64 blends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 1114–1120, 2008b.

- JUPPO, A. M.; BOISSIER C.; KHOO C. Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 2, p. 385-440, 2003.
- KAPSI, S. G.; AYRES, J. W. Processing factors in development of solid solution formulation of itraconazole for enhancement of drug dissolution and bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 229, p. 193–203, 2001.
- KARATAS, A.; YÜKSEL, N.; BAYKARA, T. Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol. **Il Farmaco**, v. 60, n. 9, p. 777–782, 2005.
- KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, E.; SIGALAS, M. P.; AVGOUSTAKIS, K.; BIKIARIS, D. Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug–polymer interactions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 3, p. 334-347, 2007.
- KHOO, S. M.; PORTER, C. J. H.; CHARMAN, W.N. The formulation of halofantrine as either non-solubilising PEG 6000 or solubilising lipid based solid dispersions: physical stability and absolute bioavailability assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 205, p. 65–78, 2000.
- KIM, E. J.; CHUN, M. K.; JANG, J. S.; LEE, I. H.; LEE, K. R.; CHOI, H. K. Preparation of a solid dispersion of felodipine using a solvent wetting method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 200–205, 2006.
- KIMURA, K.; HIRAYAMA, F.; ARIMA, H.; UEKAMA, K. Effects of aging on the crystallization, dissolution and absorption characteristics of an amorphous tolbutamide/2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, p. 646–650, 2000.
- KOGA, K.; KUSAWAKE, Y.; ITO, Y.; SUGIOKA, N.; SHIBATA, N.; TAKADA, K. Enhancing mechanism of Labrasol on intestinal membrane permeability of the hydrophilic

- drug gentamicin sulfate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 82–91, 2006.
- KOO, H.; JIN, G.; KANGA, H.; LEEB, Y.; NAMA, H. Y.; JANGC, H.; PARKA, J. S. A new biodegradable crosslinked polyethylene oxide sulfide (PEOS) hydrogel for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, p. 58–65, 2009.
- KUSHIDA, I.; ICHIKAWA, M.; ASAKAWA, N. Improvement of dissolution and oral absorption of ER-34122, a poorly water-soluble dual 5-lipoxygenase/ cyclooxygenase inhibitor with anti-inflammatory activity by preparing solid dispersion. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.91, n.1, p. 258-266, 2002.
- LEAO, Y. C.; SYU, M. J. Effects of poly(ethylene glycol) and salt on the binding of  $\alpha$ -amylase from the fermentation broth of *Bacillus amyloliquefaciens* by  $\text{Cu}^{2+}$  - $\beta$ -CD affinity adsorbent. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 344–350, 2009.
- LEONARDI, D.; BARRERA, M. G.; LAMAS, M. C.; SALOMÓN, C. J. Development of Prednisone:Polyethylene Glycol 6000 Fast-Release Tablets From Solid Dispersions: Solid-State Characterization, Dissolution Behavior, and Formulation Parameters. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n.4, p. E1-E8, 2007.
- LEUNER, C.; DRESSMAN J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 47-60, 2000.
- LIMA, A. N.; SOBRINHO, J. L. S.; CORRÊA JUNIOR, R. A. C.; ROLIM NETO, P. J. Alternative Technologies to Improve Solubility of Poorly Water Soluble Drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n.5, p.789-97, 2008.
- LIU, L.; WANG, X. Improved Dissolution of Oleanolic Acid with Ternary Solid Dispersions. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 4, p. E1-E5, 2007.

- LOFTSSON, T.; MASSON, M.; BREWSTER, M. E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 5, p. 1091-1099, 2004.
- LOFTSSON, T., HREINSDÓTTIR, D., MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, p. 18-28, 2005.
- LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n.5, p. 784-793, 2007.
- MA, J.; LI, Y. G.; ZHANG, Z. M.; WU, Q.; WANG, E. B. A polyethylene-glycol-functionalized ring-like isopolymolybdate cluster. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, p. 2413–2417, 2009.
- OHARA, T.; KITAMURA, S.; KITAGAWA, T.; TERADA, K. Dissolution mechanism of poorly water-soluble drug from extended release solid dispersion system with ethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, n. 1-2, p. 95-102, 2005.
- OZKAN, Y.; DOGANAY, N.; DIKMEN, N.; ISIMER, A. Enhanced release of solid dispersions of etodolac in polyethylene glycol. **Fármaco**, v. 55, p. 433-438, 2000.
- PATEL, R. P.; PATEL, D. J.; BHIMANI, D. B.; PATEL, J. K. Physicochemical Characterization and Dissolution Study of Solid Dispersions of Furosemide with Polyethylene Glycol 6000 and Polyvinylpyrrolidone K-30. **Dissolution Technologies**, p. 17-25, 2008.
- PATIL, M. P.; GAIKWAD, N. J. Preparation and characterization of gliclazide-polyethylene glycol 4000 solid dispersions. **Acta Pharmaceutical**, v. 59, p. 57–65, 2009.

PETRY, M.; BORGHETTI, J. S.; BASSANI, V. L. Influência de Ciclodextrinas e Polímero Hidrofílico sobre a Hidrossolubilidade de Diferentes Formas Polimórficas de Quercetina.

**Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 831-836, 2007.

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M.

Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, 2006.

RIBEIRO, L. S.S; FERREIRA, D. C.; VEIGA, F. J. B. Physicochemical investigation of the

effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 253–266, 2003.

RIBEIRO, L.; CARVALHO, R. A.; FERREIRA, D. C.; VEIGA, F. J. B. Multicomponent

complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p.1–13, 2005.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira**

**de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2001.

SERAJUDDIN, A. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises,

subsequent problems, and recent breakthroughs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 1058–1066, 1999.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid dispersion: revival with greater possibilities and

applications in oral drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**. v. 20, n. 2-3, p. 215-247. 2003.

- SHAH, T. J.; AMIN, A. F.; PARIKH, J. R.; PARIKH, R. H. Process Optimization and Characterization of Poloxamer Solid Dispersions of a Poorly Water-soluble Drug. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, p. E1-E7, 2007.
- SIEPMANNA, J.; PEPPAS, B. N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.
- STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M. C. M. Desenvolvimento, avaliação e caracterização físico-química de micropartículas constituídas de aciclovir/quitosana desenvolvidas pela técnica de *Spray-drying*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 866-871, 2007.
- VALERO, M.; PÉREZ-REVUELTA, B. I.; RODRÍGUEZ, L. J. Effect of PVP K-25 on the formation of the naproxen:  $\beta$ -ciclodextrin complex. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 253, p. 97–110, 2003.
- VASANTHAVADA, M.; TONG, W. Q.; JOSHI, Y.; KISLALIOGLU, M. S. Phase Behavior of Amorphous Molecular Dispersions II: Role of Hydrogen Bonding in Solid Solubility and Phase Separation Kinetics. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 3, p. 440-448, 2005.
- VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discov Today**, v. 12, n. 23-24, p.1068-1075, 2007.
- VILHELMSSEN, T.; ELIASSEN, H.; SCHAEFER, T. Effect of a melt agglomeration process on agglomerates containing solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, p. 132–142, 2005.
- YAMASHITA, K.; NAKATE, T.; OKIMOTO, K.; OHIKE, A.; TOKUNAGA, Y.; IBUKI, R.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Establishment of new preparation method for solid,

dispersion formulation of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 267, p. 79–91, 2003.

WANG, W.; YANG, X.; FANG, Y.; DING, J.; YAN, J. Preparation and thermal properties of polyethylene glycol/expanded graphite blends for energy storage. **Applied Energy**, v. 86, p. 1479–1483, 2009.

WULFF, M.; ALDÉN, M. Phase equilibria in drug-polymer-surfactant systems. **Thermochimica Acta**, v. 256, p. 151-165, 1995.

ZAJC, N.; OBREZA, A.; BELE, M.; SRCIC, S. Physical properties and dissolution behaviour of nifedipine/mannitol solid dispersions prepared by hot melt method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 291, p. 51–58, 2005.

*Artigo II*

**Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para  
melhora a biodisponibilidade de fármacos.**

**(Publicado na Revista Brasileira de Farmácia)**

# Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos

## Cyclodextrins: as a technological adjuvant to improve drugs' bioavailability

Francimary de Lima Guedes, Geisiane Maria Cavalcante Alves, Fabiana Lícia Araújo dos Santos, Larissa Fantini de Lima, Larissa Araújo Rolim & Pedro José Rolim Neto

**RESUMO** – O uso de ciclodextrinas (CDs) em aplicações farmacêuticas envolvendo solubilização, tem se expandido exponencialmente a cada década. Isto se deve ao fato das ciclodextrinas possuírem propriedades complexantes capazes de promoverem o aumento da solubilidade, dissolução e biodisponibilidade de fármacos poucos solúveis. Derivados estruturais das ciclodextrinas naturais, com maior capacidade de inclusão, têm despertado o interesse farmacêutico, estando presentes na composição dos medicamentos hoje comercializados na Europa, Japão e Estados Unidos. As vantagens de aplicação das ciclodextrinas justificam o seu uso atual nas diferentes formas farmacêuticas. A formação dos complexos de inclusão está condicionada a diversos fatores limitantes, como forma, tamanho e polaridade das moléculas hóspedes. É necessário ter condições ideais para se obter a efetiva encapsulação molecular. Isso significa dizer que, nem toda molécula, com limitações de solubilidade, seja complexada. Entretanto, artifícios mais recentes de complexação envolvendo sistemas ternários ou quaternários, conhecidos como multicomponentes, têm obtido sucesso na eficiência da complexação, onde a aplicação dos sistemas binários (Fármaco-CD), não era efetiva ou vantajosa.

**PALAVRAS-CHAVE** – Ciclodextrinas; complexos de inclusão; solubilidade aquosa; biodisponibilidade; complexos multicomponentes.

**SUMMARY** – The cyclodextrins use in pharmaceutical applications involving solubilization has exponentially expanded at every decade. This happens because cyclodextrins possesses complexing properties which are capable as providing an increase in solubility, dissolution and bioavailability of low soluble drugs. Structural natural cyclodextrins derivatives with higher inclusion capability have stimulated pharmaceutical interest, being present in the drugs composition which are actually sale in Europe, Japan and in the United States. The cyclodextrins advantages and application justify its actual use in different pharmaceutical forms. The formation in inclusion complexes is subject to various limited factors, as form, size, and host molecules polarity. Ideal conditions are necessary to obtain an effective molecular encapsulation. This means that not all molecules with limited solubility will be complexed. However, recent complexing mechanisms involving ternary and quaternary systems, known as multiple components, have obtained successful results in the complexation efficiency, where the binary system application was neither nor effective advantageous.

**KEYWORDS** – Cyclodextrins; inclusion complexes; water solubility; bioavailability; multicomponent complexes.

## INTRODUÇÃO

Aproximadamente há 117 anos, foram descobertas as primeiras ciclodextrinas (CDs), isoladas por A. Villiers, em 1891, a partir de produtos de degradação de amido. Entretanto, uma abordagem mais detalhada desses oligossacarídeos cíclicos, envolvendo sua preparação, isolamento e caracterização, foram realizados, posteriormente, por Franz Schardinger, em 1903 e 1911 (DOUCHÈNE & *et al.*, 1986).

A estrutura química das ciclodextrinas, suas propriedades físico-químicas e suas habilidades em formar complexos de inclusão, foram confirmadas no período entre 1935 a 1955, por Freudenberg, French, Cramer e colaboradores (UEKAMA, 1999). Freudenberg, em

1939, propôs o mecanismo de formação das CDs por ação da enzima ciclodextrina- $\alpha$ -glicosiltransferase (CGTase) sobre o amido (CLARKE, & *et al.*, 1988). Porém, as pesquisas sobre CDs chamaram atenção a partir de 1950, particularmente, com os estudos de Cramer, que descobriu sua atividade catalítica em algumas reações (NAKAMURA & HORIKOSHI, 1977).

Devido ao baixo grau de pureza, elevados custos de produção, as CDs eram produzidas em quantidades muito pequenas até 1970, inviabilizando sua aplicação industrial. Avanços biotecnológicos na descoberta da sequência e clonagem da maioria dos genes das CGTase ocorridos após esta data, disponibilizaram essas enzimas a reduzido custo, promovendo um dramático aumento na produção das ciclodextrinas naturais

( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD) contribuindo, decididamente, para a produção de CDs em larga escala, com alta pureza e, consequentemente, para a expansão das suas aplicações a nível farmacêutico (LOFTSSON & MÁSSON, 2001).

Na indústria farmacêutica, as CDs têm sido particularmente usadas devido às suas propriedades complexantes, por aumentar: a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis, sua biodisponibilidade e estabilidade, diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, diminuir ou eliminar odores ou sabores desagradáveis, prevenir interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes (SZEJTLLI, 1994).

Esta revisão se propõe a relatar de forma geral, as atualidades que envolvem o uso de ciclodextrinas como excipientes farmacêuticos, fazendo uma abordagem sobre seus principais derivados químicos, o mecanismo da complexação, suas implicações biofarmacêuticas e toxicológicas. Aplicações em sistemas multicomponentes também foram abordadas.

**Evolução científica e tecnológica em ciclodextrinas**

Todos os anos, as CDs originam a publicação de aproximadamente 1.000 artigos e resumos científicos, com aplicações farmacêuticas (SZEJTLLI, 2004). Mais de 30% das 200 novas patentes relacionadas à CDs, publicadas anualmente no *Chemical Abstracts*, destinam-se a aplicações farmacêuticas (ZHANG & REES, 1999).

O número de publicações e patentes tem se expandido exponencialmente a cada década. Das 39.679 publicações, até março de 2007, uma parte significativa está dedicada ao uso farmacêutico das CDs como solubilizantes (BREWSTER & LOFTSSON, 2007). (Figura 1).

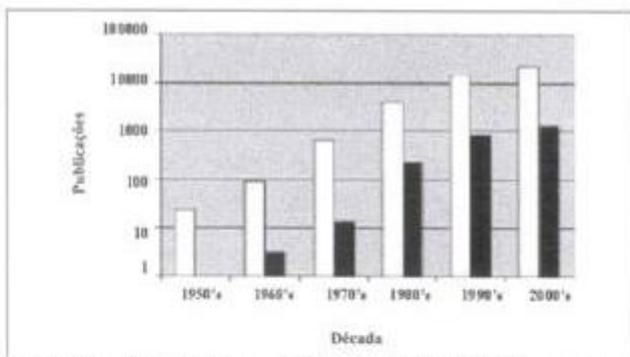


FIG. 1 - Log do número de publicações relacionadas com ciclodextrinas (barras brancas) e aplicações farmacêuticas envolvendo solubilização (barras Pretas) por ciclodextrinas, como indicado no SciFinder (ACS,COLUMBUS,OH) em Março, 2007.

**Derivação química das ciclodextrinas**

O uso farmacêutico das ciclodextrinas naturais ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD) vem sendo gradativamente substituído, ao longo dos anos, pelos seus derivados semi-sintéticos que oferecem maior capacidade de inclusão, solubilidade aquosa, estabilidade e menor toxicidade, devido às alterações das suas propriedades físico-químicas originais

Embora a  $\beta$ CD tenha aplicação muito freqüente nas formulações comerciais disponíveis atualmente, ela apresenta uma solubilidade aquosa muito limitada (1,85% m/v a 25°C) devido à estrutura rígida resultante da formação de pontes de hidrogênio intramoleculares

entre seus grupos hidroxilicos secundários C<sub>2</sub>OH e C<sub>3</sub>OH das unidades de glicose (FROMMING & SZEJTLLI, 1994). (Figura 2).

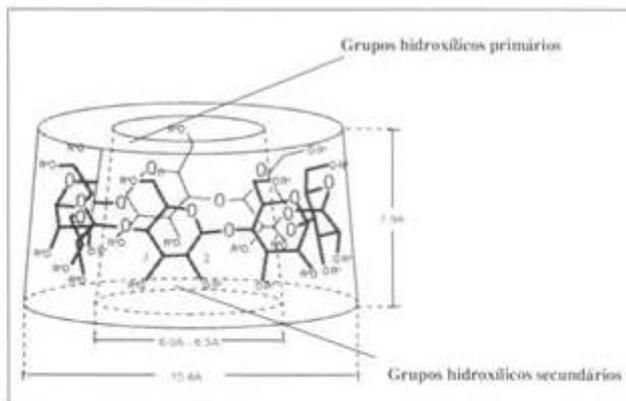


FIG. 2 - Representação da  $\beta$ -ciclodextrina e seus grupos hidroxilicos assinalados.

As modificações químicas das CDs localizam-se, basicamente, nos grupos hidroxilico primário e/ou secundário por ligações de diferentes grupos funcionais (Tabela I). A derivatização dos grupos hidroxilicos ligados aos átomos de carbono C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub> das unidades de glicose, torna impossível o estabelecimento de ligações de hidrogênio intramoleculares, alterando assim, as propriedades físico-químicas das CDs naturais (LOFTSSON & BREWSTER, 1997). A introdução de diferentes substituintes ao nível dos grupos hidroxilicos da  $\beta$ CD, têm resultado num aumento significativo da sua solubilidade aquosa (SZEJTLLI, 1991).

TABELA I Medicamentos contendo as principais ciclodextrinas derivadas

Fármaco/CDs	Nome Comercial	Forma Farmacêutica	Companhia (País)
<b>2-Hidroxi-propil-<math>\beta</math>-ciclodextrina (HP<math>\beta</math>CD)</b>			
<i>R = -CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub></i>			
Cisaprida	Propulsid	Supositório	Janssen (Europa)
Hidrocortisona	Dexocort	Solução	Actavis (Europa)
Indometacina	Indocid	Solução oftálmica	Chauvin (Europa)
Itraconazol	Sporanox	Solução oral e i.v.	Janssen (Europa)
Mitomicina	Mitozytrex	Infusão i.v.	Novartis (Europa)
<b>Sulfobutil-éter <math>\beta</math>-ciclodextrina sal sódico (SBE<math>\beta</math>CD)</b>			
<i>R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>3</sub> Na<sup>+</sup></i>			
Aspirazol	Ability	Solução	Otsuka Pharm. (USA)
Voriconazole	Vfend	Solução i.v.	Pfizer (USA, Europa, Japan)
<b>Randômica metilada <math>\beta</math>-ciclodextrina (RM<math>\beta</math>CD)</b>			
<i>R = -CH<sub>3</sub></i>			
17 $\beta$ -Estradiol	Aerodiol	Spray nasal	Sevier (Europa)
Cloranfenicol	Clorocil	Solução oftálmica	Oftalder (Europa)
Insulina		Spray nasal	Spain
<b>2-Hidroxi-propil-<math>\gamma</math>-ciclodextrina (HP<math>\gamma</math>CD)</b>			
<i>R = -CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub></i>			
Diclofenaco sal sódico	Voltaren	Solução oftálmica	Novartis (Europa)
Tc-99 Teoboroxime	Cardio Tec	Solução i.v.	Bracco (USA)

Atualmente, existem centenas de derivados, mas apenas alguns são de maior interesse farmacêutico. Entre eles, os derivados hidroxialquilados, isto é, os derivados hidroxipropil da  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD (HP $\beta$ CD e HP $\gamma$ CD, que derivam da substituição dos grupos hidroxilicos em C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub> por substituintes 2-hidroxipropil); os metilados da  $\beta$ CD, como, por exemplo, 2,3,6-metil- $\beta$ CD, derivado metilado aleatório na posição C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> ou C<sub>6</sub>, cuja designação anglo-saxônica é *randomly methylate  $\beta$ -cyclodextrin* (RM $\beta$ CD) e as sulfobutil-éter  $\beta$ CD

(SBE $\beta$ CD), poli-aniônica, cuja substituição em R =  $-(CH_2)_4SO_3Na^+$  poderá complexar moléculas neutras, não somente pela inclusão na cavidade das CDs, mas também, por interação com as cadeias alquila dos substituintes (OKIMOTO, 1996; THOMPSON, 1997; ZIA, & *et al.*, 2001; MOSHER & THOMPSON, 2002).

Esses derivados destacam-se pela maior aplicação em tecnologia farmacêutica como excipientes (Tabela I) e pela sua produção em larga escala. A derivatização das ciclodextrinas naturais oferece eficiências de complexação, geralmente superiores, devido ao prolongamento do espaço hidrofóbico da cavidade das CDs, promovido pela introdução dos substituintes (MOSHER & THOMPSON, 2002; VEIGA, & *et al.*, 2006).

A HP $\beta$ CD foi recentemente incorporada à farmacopéia européia e americana, além de ser citada na lista de excipientes farmacêuticos considerados inativos pelo FDA e, uma monografia sobre a SBE $\beta$ CD, pode ser encontrada na última edição do *Handbook* de excipientes farmacêuticos (AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, 2006).

Esses dois mais importantes derivados das CDs estão presentes na maioria das patentes publicadas na última década. (Figura 3) (UEKAMA, & *et al.*, 2006).

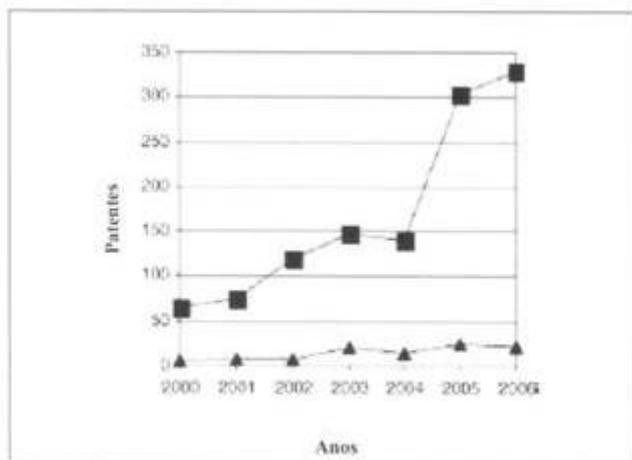


FIG. 3 - Edições de patentes associadas com HP- $\beta$ -ciclodextrina (■) e SBE- $\beta$ -ciclodextrina (▲) usadas entre os anos 2000 e 2006 (SCIFINDER, COLUMBUS, OH).

### Mecanismo da complexação e sua dissociação

#### • Fatores que influenciam a formação do complexo de inclusão

O ambiente lipofílico da cavidade interna das ciclodextrinas propicia condições favoráveis para a formação de complexos de inclusão (fármaco-CD) com compostos hidrofóbicos quando se encontram numa solução aquosa, pela formação de uma matriz micro-heterogênea nesse solvente polar (FROMMING & SZEJTLI, 1994).

Ligações não covalentes são formadas e quebradas durante a formação dos complexos, e em solução aquosa, esses complexos são rapidamente dissociados. A taxa de formação e dissociação dos complexos é muito próxima, sendo sua semi-vida de apenas alguns milésimos de segundo, o que significa que os complexos fármaco-CD estão continuamente sendo formados e dissociados (STELLA, & *et al.*, 1999).

Fatores estereoquímicos relacionados com a forma e tamanho das moléculas hóspedes, sua compatibili-

dade geométrica com a cavidade da CD hospedeira e, também sua polaridade, condicionam o processo de inclusão (VEIGA & *et al.*, 2006).

A encapsulação molecular consiste na substituição das moléculas de água, que possuem elevada entalpia, por moléculas hóspedes adequadas. Trata-se de um processo energeticamente viável por promover uma alteração favorável de entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, fatores que contribuem para o aumento da estabilidade do complexo formado (SAENGER, 1980; SZEJTLI, 1998). Interações eletrostáticas de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, também contribuem para formação e estabilização dos complexos de inclusão.

Esse equilíbrio termodinâmico estabelecido entre o complexo formado e os respectivos componentes no estado livre, pode ser quantitativamente descrito, através da constante de estabilidade ou constante de dissociação ( $K_c$ ) (LOFTSSON & *et al.*, 1999).

Os valores de  $K_c$  são freqüentemente encontrados entre 50 a 2000  $M^{-1}$  com valores médios de 130, 490 e 350  $M^{-1}$  para as  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD, respectivamente (RAO & STELLA, 2003).

A determinação da constante de dissociação ( $K_c$ ) pode ser extraída por diferentes métodos, entre eles, estão o diagrama de solubilidade de fases, métodos espectroscópicos e espectrofotométricos, valores de pKa e tempo de retenção em HPLC (CHADHA, & *et al.*, 2004).

#### • Diagrama de solubilidade de fases

O método de solubilidade de fases desenvolvido pioneiramente por HIGUCHI & CONNORS, em 1965, é habitualmente utilizado na determinação da constante de estabilidade ou constante de dissociação ( $K_c$ ), assim como, também na determinação da estequiometria de equilíbrio da complexação.

Segundo essa teoria, existem dois tipos de perfis: A e B (Figura 4).

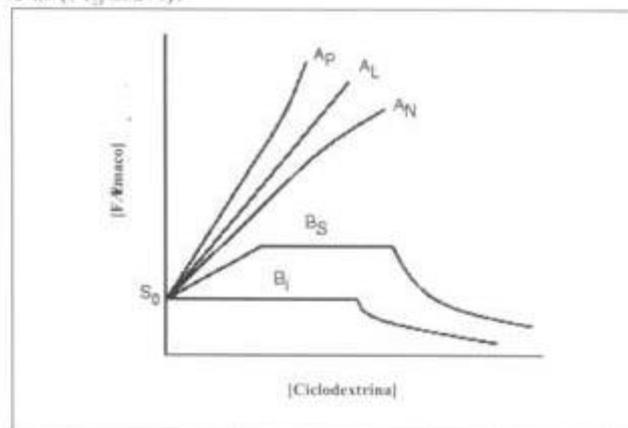


FIG. 4 - Diagrama de solubilidade de fases para fármaco e ciclodextrina (HIGUCHI & CONNORS, 1965).

Três subtipos de A:

Perfil  $A_L$ , onde há um aumento linear da solubilidade do fármaco em função do aumento da concentração de ciclodextrina;

O perfil  $A_p$ , quando a solubilidade obtida possui um desvio positivo da linearidade, isto é, a solubilização é mais efetiva proporcionalmente em altas concentrações e

$A_N$ , onde há o desvio negativo da linearidade, indi-

cando que a CD é proporcionalmente menos efetiva em altas concentrações (BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Os perfis do tipo B ( $B_s$  e  $B_i$ ) indicam a formação de complexos com limitada solubilidade aquosa, tradicionalmente observada nas ciclodextrinas naturais, especialmente na  $\beta$ CD e, em alguns casos, a solubilidade chega a ser inferior à da molécula hóspede, precipitando à medida que ocorre a encapsulação (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007).

#### O efeito biofarmacêutico da complexação

##### • Biodisposição

O aumento da biodisponibilidade de fármacos através da complexação com CDs é obtido devido ao incremento de solubilidade, dissolução, molhabilidade e permeabilidade que estes complexos promovem indiretamente ao fármaco hóspede, uma vez que, a presença das hidroxilas livres na parte externa das CD's confere a essas moléculas, um caráter hidrofílico, permitindo a "dissolução" em meio aquoso de compostos (hóspedes) de baixa solubilidade (BRITO & *et al.*, 2004).

Em outras palavras, as CDs funcionam como transportadores moleculares, carregando as moléculas hidrofóbicas hóspedes em solução até as membranas celulares lipofílicas (para qual apresentam maior afinidade), facilitando sua absorção (Figura 5).

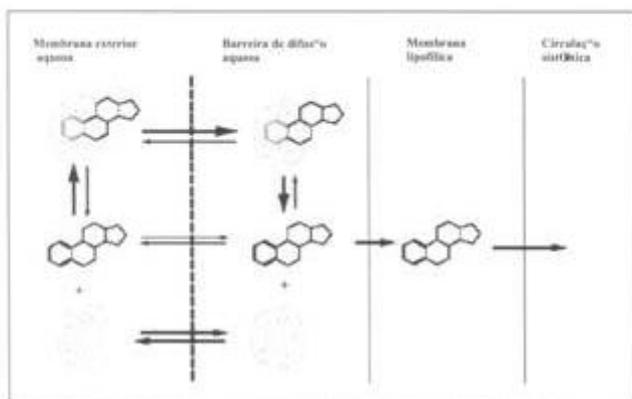


FIG. 5 - Efeito da complexação fármaco-ciclodextrina sobre a biodisponibilidade após administração não parenteral. (Adaptado de LOFTSSON & *et al.*, 2005).

A absorção das CDs pelas membranas celulares é insignificante, devido ao seu elevado tamanho (massa molecular de quase 1000 para mais de 2000) e superfície hidrofílica (RAJEWSKI & STELLA, 1996; LOFTSSON & MÁSSON, 2001; LOFTSSON & *et al.*, 2003).

A metabolização das CDs ocorre no cólon e os produtos da degradação, especialmente as CDs naturais, são absorvidos tais como os produtos resultantes da degradação do amido e excretados sob forma de dióxido de carbono e água (GERLOCZY & *et al.*, 1986).

As CDs quimicamente modificadas (derivadas) possuem maior resistência à hidrólise enzimática, sendo excretadas nas fezes, principalmente, na sua forma intacta, não metabolizada (IRIE & UEKAMA, 1997).

##### • Toxicidade oral e parenteral

Estudos de toxicidade demonstram que a administração oral das CDs não oferece risco de intoxicação, sendo praticamente atóxicas, mesmo em elevadas do-

ses, devido à limitada absorção gastrointestinal (IRIE & UEKAMA, 1997; THOMPSON, 1997; HIRAYAMA & UEKAMA, 1999; AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, 2006).

As ciclodextrinas naturais  $\alpha$ CD e  $\beta$ CD, juntamente com um grande número de derivados alquilados, apresentam nefrotoxicidade e atividade hemolítica, por remoção de colesterol, fosfolípidios e proteínas após administração parenteral. Isto acontece devido à precipitação das CDs nos rins (pela sua solubilidade limitada) e formação de complexos com o colesterol (IRIE & UEKAMA, 1997; STELLA & RAJESWSKI, 1997; DAVIS & BREWSTER, 2004). Por essa razão, a utilização dessas duas ciclodextrinas em formulações injetáveis é muito restrita.

Por outro lado, estudos toxicológicos comprovam a segurança na administração, ainda que por via parenteral, das CDs HP $\beta$ CD, SBE $\beta$ CD, G, $\beta$ CD,  $\gamma$ CD e  $\beta$ CD sulfatadas (IRIE & UEKAMA, 1997; HIRAYAMA & UEKAMA, 1999).

#### Aplicações das ciclodextrinas em formas farmacêuticas

##### • Formas farmacêuticas sólidas

A aplicação das CDs em formas farmacêuticas sólidas promove o aumento da velocidade e extensão de dissolução dos fármacos, por conseqüência, do aumento da solubilidade, molhabilidade e alteração no estado cristalino (VEIGA, & *et al.*, 2006). A complexação diminui a irritação local proveniente de alguns fármacos e modifica o tempo de liberação durante o trânsito gastrointestinal (STELLA & RAJESWSKI, 1997).

##### • Formas farmacêuticas líquidas

A complexação promove o controle da natureza tixotrópica das suspensões, atenua sabores e odores desagradáveis, melhora a estabilidade química e solubilidade. Entretanto, existem casos onde a complexação potencializa a degradação, por promover reações de hidrólise nos fármacos complexados por ataque nucleofílico dos grupos hidroxílicos da CD (LOFTSSON & BREWSTER, 1996).

##### • Formas farmacêuticas semi-sólidas

Aplicações de CDs nesses sistemas favorecem o aumento da liberação do fármaco, sua permeação, além de promover sua estabilização na formulação e diminuição da irritação tópica (MATSUDA & ARIMA, 1999).

##### • Formas farmacêuticas parentéricas

Redução da irritação muscular induzida por alguns fármacos no sítio de aplicação, estabilização de fármacos instáveis em ambiente aquoso, preparação de suspensões para utilização parentérica, com redução do tamanho de partícula dos fármacos nos complexos de inclusão, especialmente, pela utilização de técnicas de preparação, tais como, a secagem por pulverização (VEIGA & *et al.*, 2006).

#### Estratégias atuais no aumento da eficácia da complexação

A indústria farmacêutica que investe milhões de euros em pesquisas, e é parceira da química fina na busca de novos ativos farmacológicos, depara-se hoje, com o fato das novas entidades químicas que surgem como potenciais fármacos, apresentarem, cada vez mais, problemas de solubilidade. Um problema que, por vezes, não é solucionado com a complexação em sistemas binários (fármaco-CDs).

Diante desse fato, a tecnologia farmacêutica atual lança mão de novas estratégias de complexação que suplantam os sistemas binários, dando lugar à formação de complexos multicomponentes.

#### • Complexos multicomponentes com polímeros

Em determinadas situações, a eficiência da complexação com CDs é baixa, exigindo quantidades inviáveis (para o uso nas formas farmacêuticas sólidas ou líquidas) do agente complexante. A eficiência da complexação das CDs é aumentada por adição mínima de polímeros hidrossolúveis. O aumento da solubilidade se dá por um efeito sinérgico, onde a CD é considerada como agente complexante e, o polímero, como co-complexante (LOFTSSON & FRIARIKSDÓTTIR, 1998).

Polímeros hidrossolúveis têm vasta aplicação como excipientes farmacêuticos e são capazes de interagir com os fármacos, com as CDs (HLADON & CWITERNIA, 1994) e também com os complexos binários fármaco-CD (VALERO & *et al.*, 2003).

Vários autores tem demonstrado a possibilidade de uso dos polímeros na formação de complexos multicomponentes (RIBEIRO & *et al.*, 2003; LOFTSSON & MÁSSON, 2004).

Segundo LOFTSSON, existem três categorias de polímeros usados para obtenção de sistemas ternários de complexação, a saber: polímeros semi-sintéticos derivados da celulose; polissacarídeos naturais ou polipeptídeos e os polímeros sintéticos, tipo polivinilo ou co-polímeros de ácido acrílico (LOFTSSON, 1995).

Complexos quaternários são também descritos na literatura, envolvendo o fármaco, a CD, o polímero e um quarto componente, que pode ser ácido tartárico (RIBEIRO & *et al.*, 2005) ou íons magnésio (YAMAKAWA & NISHIMURA, 2003).

#### • Complexos multicomponentes com hidróxi-ácidos

Geralmente são formados a partir de um fármaco de caráter básico, a CD e um hidróxi-ácido. Aqui, o aumento da eficiência da complexação resulta da formação de um sal do fármaco básico com um hidróxi-ácido complexados pela CD. O superior incremento da solubilidade alcançado nesses complexos, evidencia o aumento da eficiência da complexação (PIEL & *et al.*, 1999).

Os sais de fármaco formados com contra-íons, com potencial tensoativo, que estão complexados pelas CD e a capacidade de formar micelas, explicam o aumento sinérgico da solubilidade dos fármacos em sistemas multicomponentes deste tipo. Tais informações foram elucidadas por ressonância magnética nuclear dos complexos nos trabalhos de FAUCCI & REDENTI (FAUCCI & *et al.*, 2000; REDENTI & *et al.*, 2000).

#### • Complexos multicomponentes com aminoácidos

Fármacos com caráter ácido podem ser complexados num sistema multicomponentes com aminoácidos que possuem caráter básico. Estes interagem com as CDs por ligações de hidrogênio e com os fármacos por formações de sais, resultando num aumento de solubilidade sinérgico, devido à formação de um complexo multicomponente (MORA & *et al.*, 2003; MURA & *et al.*, 2003).

## CONCLUSÃO

A grande maioria das novas entidades químicas, candidatas a fármacos, apresenta limitações de solubi-

lidade e, conseqüentemente, de dissolução. Isso se agrava quando se sabe que muitos dos fármacos existentes no mercado farmacológico e farmacêutico, necessitam de novas formulações visando melhorias.

Dentro desse contexto, o emprego das ciclodextrinas assume um impacto significativamente benéfico no sentido de ser uma opção viável para contornar tais problemas de solubilidade dos fármacos, sua respectiva dissolução, absorção e biodisponibilidade desejada.

Muito se sabe hoje das peculiaridades desses compostos. Entretanto, desafios freqüentes impostos pela acelerada tecnologia contemporânea, sinalizam um caminho vasto à investigação onde talvez a aplicação das ciclodextrinas atuais seja apenas o topo de um "iceberg" tecnológico que, ainda está por vir, na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, a partir de fármacos, seus processos otimizados e formas farmacêuticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical Press. 2006 (5): 918p
2. BREWSTER, E.M & LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007.
3. BRITO, M.A.F.O.; JÚNIOR, C.S.N & SANTOS, H.F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. *Química Nova* 2004. (6): 882-888.
4. CHADHA, R.; KASHID, N & SAINI, A. Account of analytical techniques employed for the determination of thermodynamics of inclusion complexation of drugs with cyclodextrins. *J. Sci. Ind. Res.* 2004. 211-229.
5. CLARKE, R.; TIPSON, R & HORTON, D. Inclusion complexes of the cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins). In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 1968. 205-249.
6. CUNHA-FILHO, M.S.S & SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007. (1):1-9.
7. DAVIS, M.E & BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2004. 1023-35.
8. DOUCHÈNE, D.; GLOMOT, F & VAUTHION, C. *Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. Cyclodextrins and their industrial uses*. 1986. 211-257.
9. FAUCCI, M.T.; MELANI, F & MURA, P.H. NMR and molecular modelling techniques for the investigation of the inclusion complexes of econazole with  $\alpha$ -cyclodextrin in the presence of malic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000. 25-31.
10. FROMMING, K.H & SZEJTLI, J. *Cyclodextrins in Pharmacy*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 1994.
11. GERLOCZY, A.; FONAGY, A.; KERESZTES, P.; PERLAKY, L & SZEJTLI, J. Absorption, distribution, excretion and metabolism of universally labelled 14C- $\beta$ -cyclodextrin in rat after per os administration. *Gums and Stabilisers for the Food Industry*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 503-510.
12. HIGUCHI, T & CONNORS, K. Phase-solubility techniques. In: *Advances in analytical chemistry and instrumentation*. 1965. p. 134-140.
13. HIRAYAMA, F & UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999. 125-141.
14. HLADON, T & CWITERNIA, B. Physical and chemical interactions between cellulose ethers and  $\beta$ -cyclodextrins. *Pharmazie*. 1994. 497-500.
15. IRIE, T & UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 3 Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* 1997. 147-162.
16. LOFTSSON, T. *Cyclodextrins complexation*. United States Patent. 1995. 5,472,954.
17. LOFTSSON, T & BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 1996. 1017-1025.
18. LOFTSSON, T & BREWSTER, M.E. Cyclodextrins as pharmaceutical excipients. *Pharm. Tech. Eur.* 1997. 26-34.
19. LOFTSSON, T & FRIARIKSDÓTTIR, H. The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of  $\beta$ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 1998. 115-121.
20. LOFTSSON, T.; MÁSSON, M & SIGURJÓNSDÓTTIR, J.F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. *S. T.P. Pharma Sci.* 1999. 237-242.
21. LOFTSSON, T & MÁSSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.* 2001. 15-30.

22. LOFTSSON, T.; SIGFÚSSON, S.D.; SIGURSSON, H.H & MÁSSON, M. The effects of cyclodextrins on topical delivery of hydrocortisone: The aqueous diffusion layer. *STP Pharma Sci.* 2003. 125-131.
23. LOFTSSON, T & MÁSSON, M. The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs. *J. Drug Del. Sci. Tech.* 2004. 35-43.
24. LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D & MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm., Amsterdam* 2005; 302: 18-28.
25. MATSUDA, H & ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999. 81-99.
26. MORA, C.P.; CIRRI, M.; ALLOLIO, B.; CARLI, F & MURA, P. Enhancement of dehydroepiandrosterone solubility and bioavailability by ternary complexation with  $\beta$ -cyclodextrin and glycine. *J. Pharm. Sci.* 2003. 2177-2184.
27. MOSHER, G & THOMPSON, D.O. Complexation and cyclodextrins. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 2002. 531-558.
28. MURA, P.; MAESTRELLI, F & CIRRI, M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and aminoacids. *Int. J. Pharm.* 2003. 293-302.
29. NAKAMURA, N & HORIKOSHI, K. Production of Schardinger beta-dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology and Bioengineering*. 1977. (New York): 87-99.
30. OKIMOTO, K. The interaction of charged and uncharged drugs with neutral hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and anionically charged sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrins. *Pharm. Res.* 1996. 258-264.
31. PIEL, G.; EVRARD, B.; VAN HEES, T.; LLABRES, G & DELATTRE, L. Development of a parenteral and of an oral formulation of albendazole with cyclodextrins. *S. T. P Pharma Sci.* 1999. 257-260.
32. RAJEWSKI, R.A & STELLA, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 1996. 1142-69.
33. RAO, V.M & STELLA, V.J. When can cyclodextrins be considered for solubilizing purposes? *J. Pharm. Sci.* 2003. 927-932.
34. REDENTI, E., SZENTE, L & SZEJTLI, J. Drug/Cyclodextrin/Hydroxy Acid Multi-component Systems. Properties and Pharmaceutical Applications. *J. Pharm. Sci.* 2000. 1-8.
35. RIBEIRO, L.; LOFTSSON, T.; FERREIRA, D & VEIGA, F. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin binary and ternary complexes. *Chem. Pharm. Bull.* 2003. 914-922.
36. RIBEIRO, L.; CARVALHO, R.; FERREIRA, D & VEIGA, F. Multicomponentes complexes formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005. 1-13.
37. SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and laboratory. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1980. 344-362.
38. STELLA, V.J & RAJESWSKI, R.A. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.* 1997. 556-567.
39. STELLA, V.; RAO, V.; ZANNOU, E & ZIA, V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999. 3-16.
40. SZEJTLI, J. Cyclodextrins in drug formulations: Part I. *Pharm. Tech. Int.* 1991. 15-22.
41. SZEJTLI, J. Medicinal application of cyclodextrins. *Med. Res. Rev.* 1994. 353-386.
42. SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 1998. 1743-1753.
43. SZEJTLI, J. Why is the increase in number of marketed drug/CD formulations so slow? *Cyclodextrin News*. 2004. 99-103.
44. THOMPSON, D.O. Cyclodextrins-Enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. *Crit. Rev. Therap. Drug Carr. Syst.* 1997. 1-104.
45. UEKAMA, K. Cyclodextrins in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999.
46. UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F & ARIMA, H. Recent aspects of cyclodextrin based drug delivery systems. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2006. 3-8.
47. VALERO, M.; PÉREZ-REVUELTA, B.I & RODRÍGUEZ, L.J. Effect of PVP K-25 on the formation of the naproxen:  $\beta$ -cyclodextrin complex. *Int. J. Pharm.* 2003. 97-110.
48. VEIGA, F.J.B.; PECORELLI, C.C.M.F & RIBEIRO, S.S.L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacéutica. 2006. p 21-26, 140-143.
49. YAMAKAWA, T & NISHIMURA, S. Liquid formulation of a novel non-fluorinated topical quinolone, T-3912, utilizing the synergic solubilizing effect of the combined use of magnesium ions and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Control Release* 2003. 101-113.
50. ZHANG, M & REES, D.C. A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery. *Exp. Opin. Ther. Patents.* 1999. 1697-1717.
51. ZIA, V.; RAJEWSKI, R.A & STELLA, V.J. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: Comparison of sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin to hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Pharm. Res.* 2001. 668-673.

*Artigo III*

**Desenvolvimento e validação de um método analítico  
para quantificação da  $\beta$ -lapachona por  
espectrofotometria no ultravioleta.**

**(Aceito para publicação no Latin American Journal of Pharmacy)**

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA $\beta$ -LAPACHONA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA

### RESUMO

A  $\beta$ -lapachona é uma ortonaftoquinona natural extraída de plantas da família Bignoniaceae, como o Ipê Roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor), árvore nativa do Brasil, ou sintetizada a partir de seu isômero lapachol. A  $\beta$ -lapachona têm demonstrado uma série de ações farmacológicas incluindo antibacteriana, antifúngica, tripanossomicida, antiviral e antineoplásica. Não há relatos na literatura de um método analítico espectrofotométrico para a quantificação de  $\beta$ -lapachona. Assim, o presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método simples, econômico, rápido e preciso por espectrofotometria para a quantificação deste fármaco. O método desenvolvido consiste na solubilização da  $\beta$ -lapachona em álcool etílico com posterior diluição no sistema de solventes álcool etílico:água para quantificação em ultravioleta ( $\lambda=256\text{nm}$ ). O método foi validado segundo parâmetros descritos pela *International Conference on Harmonization (Q2A/Q2B)* e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE 899/03. Os resultados da validação mostram que o método é robusto, linear, sensível, preciso e exato dentro dos parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -lapachona, Espectroscopia, Oncologia, Quantificação, Validação.

### ABSTRACT

The  $\beta$ -lapachone is a natural ortonaftoquinona extract of the Bignoniaceae plants, as Ipê Roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor), tree native to Brazil, or can be synthesized from its isomer lapachol. The  $\beta$ -lapachone has demonstrated a range of pharmacological activities including antibacterial, antifungal, trypanocidal, antiviral and anticancer. There are no reports in the literature of a spectrophotometric method for quantification of  $\beta$ -lapachone. The present

research describes the development of a simple, economical, fast and accurate for the quantification of this drug. The method developed is the solubilization of  $\beta$ -lapachone in absolute ethanol with subsequent dilution in the solvent system of absolute ethyl alcohol: purified water for quantification by UV detector. The method was validated according International Conference on harmonization (ICH Q2A /ICH Q2B) and National Health Surveillance Agency of Brazil (RE 899/03) parameters. The results show that the validation method is robust, linear, sensitive, precise and accurate within the parameters assessed.

**Keywords:**  $\beta$ -lapachone, oncology, quantification, spectroscopy, Validation.

## INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -lapachona, 3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b]pirano-5,6-diona, é um fitofármaco obtido principalmente do Ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*) da família Bignoniaceae, ou pode ser facilmente sintetizada do lomatiol, que é isolado das sementes de *Lomatia* crescente na Austrália.<sup>1-4</sup> Porém, por estar presente em pequenas quantidades *in natura*, é comum a semi-síntese da  $\beta$ -lapachona de seu isômero lapachol através de uma termorreação controlada ou hidrólise com ácido sulfúrico a frio.<sup>3,4</sup>

A  $\beta$ -lapachona tem demonstrado uma variedade de efeitos farmacológicos como agente antiviral, antifúngico, antiparasitário e uma excelente atividade antineoplásica.<sup>5-12</sup> Através de estudos *in vitro* e *in vivo*, tem apresentado resultados bastante satisfatórios para o tratamento de diversas linhagens de câncer humano, especialmente naquelas refratárias aos tratamentos convencionais, como leucemias e em particular neoplasias de ciclo celular muito lento, como é o caso do câncer de próstata, cólon e alguns tipos de ovário e mama.<sup>12-20</sup>

O mecanismo de ação da  $\beta$ -lapachona em células cancerígenas não está completamente definido, pois o entendimento deste mecanismo é dificultado devido sua ação ser direcionada sobre múltiplos alvos biológicos. Sabe-se que ela age de forma diferente de outros

antineoplásicos por interagir diretamente inibindo a DNA topoisomerase I e II $\alpha$ , impedindo a replicação de células cancerígenas e promovendo a capacidade de apoptose celular por um mecanismo particular, com posterior estimulação da ativação da caspase-7, ao invés de agir estabilizando o complexo no DNA substrato como a grande parte dos anti-neoplásicos existentes no mercado.<sup>12-20</sup> Além disso, o tratamento com  $\beta$ -lapachona aumenta a sensibilidade das células tumorais aos agentes causadores de danos ao DNA, como radiações ionizantes, e interrompe o ciclo celular da célula cancerígena.<sup>21,22</sup>

Alguns métodos por cromatografia líquida de alta eficiência já foram descritos na literatura para a quantificação da  $\beta$ -lapachona quanto matéria-prima.<sup>23,24</sup> Para a quantificação de rotina, o desenvolvimento de um método por espectrofotometria de ultravioleta (UV) e sua validação analítica apresenta vantagens sobre os métodos já existentes: simplicidade, rapidez, sensibilidade adequada, conveniência operacional e baixo custo relativo de equipamentos e reagentes. O método é baseado na medição da absorvância máxima a um comprimento de onda que caracteriza a substância com adequação nas condições operacionais. Uma relação linear entre a absorvância medida e a concentração do princípio ativo deve ser verificada.

Um método validado deve certificar que a metodologia analítica seja precisa, exata e reprodutível ao longo do intervalo especificado para a amostra que será analisada, assegurando, através de estudos experimentais, os requisitos da sua aplicação analítica, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos no uso rotineiro da metodologia em um laboratório.<sup>25</sup>

Este trabalho visou o desenvolvimento e validação de um método simplificado por espectrofotometria de UV para quantificação da  $\beta$ -lapachona de acordo com os parâmetros de robustez, linearidade, intervalo, limites estimados de detecção e quantificação, precisão e exatidão, estabelecidos na literatura e compêndios oficiais.<sup>25-28</sup>

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Reagentes e Matéria-Prima***

No desenvolvimento e validação da metodologia analítica utilizou-se:  $\beta$ -lapachona matéria-prima lote 103 (validade 02/2010), produzida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE - Recife, Pernambuco, Brasil); Padrão Secundário de  $\beta$ -lapachona produzido pela UFPE (lote: PS01; validade: 12/2010; pureza: 99,26%), padronizado a partir do padrão primário Sigma<sup>®</sup> Lote 31K1558; água purificada (Osmose Reversa Gehaka<sup>®</sup>); acetonitrila (Merck<sup>®</sup>); álcool metílico (Merck<sup>®</sup>); álcool etílico absoluto (Vetec<sup>®</sup> e Merck<sup>®</sup>).

### ***Equipamentos***

Balança Analítica Bioprecisa<sup>®</sup>; Espectrofotometro UV-Vis B582 Micronal<sup>®</sup>; Ultra-som Marconi<sup>®</sup>. Para a reprodutibilidade foram utilizados os seguintes equipamentos: Balança Analítica Mettler<sup>®</sup>, Espectrofotometro UV-Vis com Varredura Varian<sup>®</sup>, Ultra-som Torthon<sup>®</sup>.

### ***Desenvolvimento do método***

Devido às características químicas da  $\beta$ -lapachona, que lhe proporcionam uma baixa solubilidade, e baseado no método cromatográfico relatado na literatura foram escolhidos para o desenvolvimento do método como solventes de solubilização da  $\beta$ -lapachona a acetonitrila, álcool metílico e álcool etílico.<sup>24,29</sup>

Foram realizadas comparações entre amostras obtidas pelas técnicas de agitação por ultrassonicação e por agitação magnética, variando também o tempo da forma de agitação (5, 10 e 15 min).

Um sistema de solventes contendo o solvente inicial de solubilização e água purificada foi adotado para a realização da diluição da amostra para a leitura espectrofométrica. A

proporção deste sistema foi determinada de acordo com a estabilidade da  $\beta$ -lapachona em permanecer solúvel por 48h em repouso após sua completa solubilização. As proporções avaliadas no estudo foram 50:50, 55:45, 60:40 e 65:45 de álcool etílico absoluto:água purificada (v/v), respectivamente. Procedeu-se varredura no espectrofotômetro na faixa de 200 a 400 nm para escolher o melhor comprimento de onda.

#### ***Preparação da solução amostra e solução padrão***

As amostras de  $\beta$ -lapachona foram preparadas em álcool etílico absoluto na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , com 10 minutos de agitação por ultrasonicação e posterior diluição com o sistema de solventes álcool etílico absoluto:água purificada (60:40, v/v) obtendo uma concentração final de 4  $\mu\text{g/mL}$ . A solução padrão foi preparada da mesma forma que a solução amostra, obtendo-se a mesma concentração final.

#### ***Preparação da Curva Analítica***

Após a definição da metodologia analítica foi realizado o estudo teórico para elaboração volumétrica da curva analítica, nas mesmas condições analíticas das amostras, que será utilizada durante o processo de validação em cada parâmetro avaliado para a obtenção das concentrações das amostras do dia.

Foi preparada uma solução mãe de  $\beta$ -lapachona com o padrão secundário em álcool etílico absoluto com 10 minutos de agitação por ultrasonicação na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriores diluições volumétricas desta solução mãe foram efetuadas, utilizando o sistema de solventes álcool etílico absoluto:água purificada (60:40, v/v), para constituição da curva de calibração com as concentrações de 5  $\text{ng/mL}$ , 1, 2, 4, 8, 10 e 12  $\mu\text{g/mL}$ .

### ***Validação do método analítico***

Após o desenvolvimento do método avaliou-se alguns aspectos na validação como: robustez, linearidade, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão, de acordo com as normas estabelecidas pela *International Conference on Harmonization* (ICH Q2A e ICH Q2B) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE 899/03.

A confiabilidade dos parâmetros estudados pode ser observada pelo coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo de uma série de medidas. Para os estudos realizados, foi determinado um coeficiente de variação menor 5%.<sup>25</sup> Para cada parâmetro avaliado foram realizadas análises estatísticas dos resultados obtidos.

***Robustez:*** Foram analisadas amostras em triplicata para cada parâmetro de variação estudado: composição do sistema de solventes (58:42, 60:40 e 62:38 de álcool etílico absoluto:água purificada (v/v), respectivamente) e fabricante do solvente (Vetec<sup>®</sup> e Merck<sup>®</sup>).

***Linearidade e Intervalo:*** Este ensaio foi realizado com a análise estatística regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de três curvas autênticas com sete pontos de concentrações de 5 ng/mL, 1, 2, 4, 8, 10 e 12  $\mu$ g/mL. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação é de 0,99. A variação média do estudo foi realizada no intervalo de 12,5% a 300%.

***Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ):*** Os limites de detecção e de quantificação foram calculados pela razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicadas por 3 e 10, respectivamente.

***Precisão:*** A precisão foi determinada através dos métodos de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade do método foi verificada por seis determinações autênticas a 100% da concentração do teste; a precisão intermediária foi

realizada em dois dias por dois analistas diferentes e a reprodutibilidade foi realizada em dois laboratórios diferentes em triplicata de amostras.

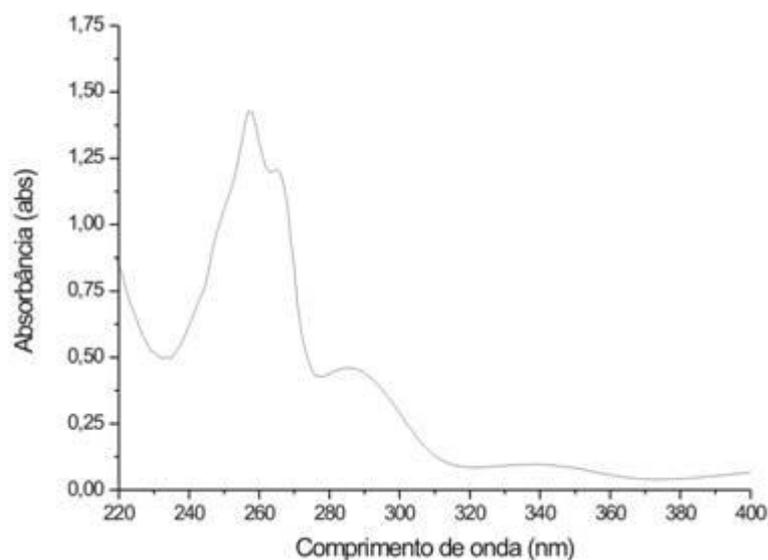
**Exatidão:** A exatidão foi verificada a partir de amostras obtidas com a matéria-prima de  $\beta$ -lapachona nas concentrações de 2, 4 e 8  $\mu\text{g/mL}$ , em triplicata para cada concentração, comparando com o valor obtido pela mesma análise realizada com o padrão secundário.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***Desenvolvimento do método***

Não houve alterações dos perfis espectrofotométricos por absorção UV da  $\beta$ -lapachona entre as varreduras de amostras solubilizadas com acetonitrila, álcool metílico ou álcool etílico. Todos os espectros de absorção, exemplificado na figura 1, apresentaram-se de acordo com o relatado na literatura com máximo de absorção no comprimento de onda de  $\lambda=256\text{nm}$ .<sup>4,30</sup> Devido apresentar menor toxicidade, menor custo e por ser um solvente de uso mais freqüente nos laboratórios de controle de qualidade das indústrias farmacêuticas, o álcool etílico foi escolhido como solvente de solubilização da  $\beta$ -lapachona para o método aqui desenvolvido.

De acordo com as análises efetuadas foi possível definir o tipo e o tempo de agitação mais eficiente para o método, sendo padronizada a ultrassonicação por 10 minutos e como método alternativo a agitação magnética por 15 minutos, por não ter havido diferença estatisticamente significativa entre os dois parâmetros quando avaliados por análise de variância one-way com probabilidade estatística de  $p<0,05$ , pois o F calculado foi menor que o F crítico (Tabela 1).



**Figura 1.** Espectro de absorção da  $\beta$ -lapachona em solução alcoólica.

**Tabela 1.** ANOVA One-Way para o tipo e tempo de agitação.

Tipo e tempo de agitação	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Desvio padrão	CV
Ultrasonicação (10 min)	101,68%	101,30%	101,76%	101,58%	0,244	0,241%
Agitação magnética (10 min)	96,36%	96,21%	96,82%	96,46%	0,317	0,328%
Média quadrática dentro do grupo = 0,080			F calculado = 491,712			
Média quadrática entre os grupos = 39,337			F crítico (0,95; 1;4) = 7,709			
Ultrasonicação (10 min)	101,68%	101,30%	101,76%	101,58%	0,244	0,241%
Agitação magnética (15 min)	101,08%	99,78%	99,10%	99,99%	1,004	1,004%
Média quadrática dentro do grupo = 0,534			F calculado = 7,165			
Média quadrática entre os grupos = 3,826			F crítico (0,95; 1;4) = 7,709			
Ultrasonicação (10 min)	101,68%	101,30%	101,76%	101,58%	0,244	0,241%
Ultrasonicação (5 min)	99,86%	99,94%	100,09%	99,97%	0,116	0,116%
Média quadrática dentro do grupo = 0,037			F calculado = 106,730			
Média quadrática entre os grupos = 3,949			F crítico (0,95; 1;4) = 7,709			

Houve instabilidade das soluções, após 48h em repouso, com formação de microcristais da  $\beta$ -lapachona e conseqüente turvação, nas concentrações de 50:50 e 55:45 de álcool etílico absoluto:água purificada (v/v). As soluções de 60:40 e 65:45 mantiveram-se

estáveis após as 48h de avaliação, sendo admitida como concentração de escolha para o método a concentração de 60:40 de álcool etílico absoluto:água purificada (v/v).

### ***Preparação da Curva Analítica***

A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação muito próximo da unidade,  $R^2$  0.9998, demonstrando que há correlação linear entre as variáveis X e Y. Apresentou coeficiente angular de  $0.1126 \pm 0.00142$  e coeficiente linear de  $0.0018 \pm 0.0097$  com 95% de intervalo de confiança.

### ***Robustez***

Para o parâmetro composição do sistema, verificou-se estatisticamente através da ANOVA One-Way, presumindo variâncias equivalentes, que não há diferença significativa entre os resultados admitindo-se um nível de 95% de intervalo de confiança entre a média das concentrações, apresentando o F calculado de 1,425 e um F crítico de 5,143. Para o parâmetro fabricante do solvente verificou-se através da ANOVA One-Way que também não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados admitindo-se um nível de 95% de intervalo de confiança entre a média das concentrações, apresentando o F calculado de 2,398 e um F crítico de 7,709.

### ***Linearidade***

O intervalo das concentrações estudadas (0.5, 1, 2, 4, 8, 10 e 12  $\mu\text{g/mL}$ ) mostrou-se linear após as análises estatísticas pelo método dos mínimos quadrados. Foram obtidas curvas com equações de retas  $y = 0.111 (\pm 0.002) x + 0.002 (\pm 0.011)$  um bom coeficiente de correlação ( $R^2 = 0.9998$ ) e que através da ANOVA evidenciou-se que não há falta de ajuste

mostrando a capacidade do método de gerar resultados proporcionais às concentrações estudadas com intervalo de 95% de confiança.

### ***Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)***

De acordo com a estimativa dos limites de detecção e quantificação o método apresentou sensibilidade para identificar e quantificar a  $\beta$ -lapachona, diferenciando as leituras dos ruídos do equipamento, com valores de 0,054  $\mu\text{g/mL}$  e 0,180  $\mu\text{g/mL}$  para o limite de detecção e limite de quantificação, respectivamente.

### ***Precisão***

O método desenvolvido demonstrou ser preciso nos três níveis avaliados, repetibilidade; precisão intermediária e reprodutibilidade.

Na repetibilidade os resultados obtidos apresentaram um desvio padrão de 0,324 e coeficiente de variação de 0,320%, abaixo do valor máximo especificado.

Na precisão intermediária foi provado que o método é preciso para análises feitas por analistas diferentes dentro de um mesmo dia e em dias diferentes, pois através do tratamento estatístico utilizando ANOVA One-Way com probabilidade estatística de  $p < 0,05$  os F calculados para as análises foram menores do que o F crítico (Tabela 2)

**Tabela 2.** Precisão Intermediária.

<b>Analista</b>	<b>Dia I</b>	<b>Dia II</b>	
Analista 1	102,159%	100,153%	<b>Teste F dia</b>
Analista 2	102,344%	99,174%	F calculado dia = 19,770
			F crítico (0,95; 1; 1) = 161,4
			<b>Teste F analista</b>
			F calculado = 0,466
			F crítico (0,95; 1; 1) = 161,4

O método foi reprodutivo quando avaliado em laboratórios diferentes, utilizando equipamentos diferentes, pois o F calculado foi menor que o F crítico pela ANOVA One-Way com probabilidade estatística de  $p < 0,05$  (Tabela 3).

**Tabela 3.** Reprodutibilidade.

Laboratório	1	2	3	Média	Desvio padrão	CV)
Laboratório 1	101,38%	100,85%	101,38%	101,20%	0,307	0,304%
Laboratório 2	101,25%	101,48%	101,35%	101,35%	0,120	0,118%
Média quadrática dentro do grupo = 0,054			F calculado = 0,630			
Média quadrática entre os grupos = 0,034			F crítico (0,95; 1;4) = 7,709			

### **Exatidão**

Os resultados de exatidão do método evidenciaram uma concordância entre os valores de absorbância das médias obtidas para cada concentração com a matéria-prima (MP) e com o padrão secundário (PS). A análise estatística através do teste t de Student comprovou a similaridade dos resultados em um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostram que t calculados, 2,066; 1,684 e 0,925 para as concentrações de 2, 4 e 8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, forma inferiores ao t tabelado (2,776).

### **CONCLUSÃO**

O método desenvolvido atende as exigências legais para a validação de uma metodologia analítica, apresentando-se robusto, linear, sensível, preciso e exato garantindo a qualidade da análise e assim as boas práticas de laboratório e fabricação, segundo a legislação vigente do ICH e ANVISA, quando utilizado na indústria farmacêutica. Desta forma, o método de quantificação da  $\beta$ -lapachona por espectrofotometria de UV apresentado neste trabalho torna-se um instrumento importante para as subseqüentes etapas do desenvolvimento

dos estudos tecnológicos para um novo medicamento com este princípio ativo de grande potencial oncológico. O novo método permitirá uma análise quantitativa rápida, de baixo custo, com qualidade e segurança estatística desejáveis.

## REFERÊNCIAS

1. Hooker, S.C. (1936) *J. Americ. Chem. Soc.* **58**:1181-1190.
2. Schuerch, A.R. & W. Wehrli (1978). *Eur. J. Biochem.* **84**:197-205.
3. Lima, O.G., I. Albuquerque, C.G. Lima, & M.H. Maia (1962). *Rev. Inst. Antibióticos Recife/UFPE* **4**:3-17.
4. D'Albuquerque, I.L. (1968) *Rev. Inst. Antibióticos Recife/UFPE*, **8**:73-87.
5. D'Albuquerque, I.L., M.C.N Maciel, A.R.P. Schuler, M.C.M. Araújo, G.M. Maciel, M.A.B Cavalcanti, D.G. Martins & A.L. Lacerda (1972) *Rev. Inst. Antibióticos Recife/UFPE*, **12**:31-40.
6. Li, C.J., C. Wang & A.B. Pardee (1995) *Cancer Res.* **55**:3712-3715.
7. Docampo, R., F.S. Cruz, A. Boveris, R.P. Muniz & D.M. Esquivel (1979) *Biochem. Pharmacol.* **28**:723-728.
8. Guiraud, P., R. Steiman, G.M.C. Takaki, F.S. Murandi & M.S. Buochberg (1994) *Planta Med.* **60**:373-374.
9. Schaffner-Sabba, K., K.H. Schmidt-Ruppin, W. Wehrli, A.R. Schuerch & J.W. Wasley (1984). *J. Med. Chem.* **27**:990-994.
10. Goncalves, A.M., M.E. Vasconcellos, R. Docampo, F.S. Cruz, W. De Souza & W. Leon (1980) *Mol. Biochem. Parasitol.* **1**:167-176.
11. Pahn, E.M., M.P. Molina & A.O.M. Stoppani (1988) *Rev. Argent. Microbiol.* **20**:107-118.
12. Boothman, D.A., S. Greer & A.B. Pardee (1987) *Cancer Res.* **47**:5361-5366.
13. Boothman, D.A., D.K. Trask & A.B. Pardee (1989). *Cancer Res.* **49**:605-612.
14. Li, C.J., L. Averboukh & A.B. Pardee (1993) *J. Biol. Chem.* **268**:22463-22468.
15. Lai, C.C., T.J. Liu, L.K. Ho, M.J. Don & Y.P. Chau (1998) *Histol. Histopathol.* **13**:89-97.
16. Li, C.J., Y.Z. Li, A.V. Pinto & A.B. Pardee (1999) *P.N.A.S. USA* **96**:13369-13374.
17. Planchon, S.M., S. Wuerzberger, B. Frydman, D.T. Witiak, P. Hutson, D.R. Church, G. Wilding & D.A. Boothman (1995) *Cancer Res.* **55**:3706-3711.
18. Chau, Y.P., S.G. Shiah, M.J. Don & M.L. Kuo (1998) *Free Radical Biol. Med.* **24**:660-670.
19. Don, M.J., Y.H. Chang, K.K. Chen, L.K. Ho & Y.P. Chau (2001) *Mol. Pharmacol.* **59**:784-794.

20. Frydman, B., L.J. Marton, J.S. Sun, K. Neder, D.T. Witiak, A.A. Liu, H.M. Wang, Y. Mao, H.Y. Wu, M.M. Sanders & L.F. Liu (1997) *Cancer Res.* **57**:620–627.
21. Boorstein, R.J. & A.B. Pardee (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**:30–36.
22. Boothman, D.A. & A.B. Pardee (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4963–4967.
23. Cunha-Filho, M.S.S., F.C. Alves, G.M.C. Alves, D.B. Monteiro, F.P.M. Medeiros & P.J. Rolim-Neto (2005) *Rev. Bras. Farm.* **86**(1):39-43.
24. Presmich G.M.A., M.S.S. Cunha-Filho, L.A. Rolim, M.M. Albuquerque & P.J. Rolim Neto (2009) *Phytochem Anal. (aceito para publicação)*
25. Brasil, Resolução RE nº 889 de 29 de Maio de 2003, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
26. United States Pharmacopeia, Validation of Compendial Methods, 31th edition, Pharmacopoeial Convention Inc., Rockville, MD, 2007, pp. 96
27. ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guideline for Industry - ICH Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures, 1995. [<http://www.fda.gov/cder/guidance/ichq2a.pdf>] acesso em 15 de novembro de 2009.
28. ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Guideline for Industry - ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996. [<http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf>] acesso em 15 de novembro de 2009.
29. Presmich, G.M.A., L.A. Rolim, F.P.M. Medeiros, M.M. Albuquerque, P.J. Rolim-Neto (2009.) *Lat. Am. J. Pharm.*
30. Alves, G.M.C., L.A. Rolim, A.C.L. Leite, D.J. Brondani, F.P.M. Medeiros, L.W. Bieber, F.J.B. Mendonça-Júnior & P.J. Rolim-Neto (2008) *Quím. Nova.* **31**(2):413-416.

*Artigo IV*

**Melhora da solubilidade aquosa da  $\beta$ -lapachona em  
dispersão sólida com polivinilpirrolidona k-30 e  
polietilenoglicol 4000.**

**MELHORA DA SOLUBILIDADE AQUOSA DA B-LAPACHONA EM DISPERSÃO SÓLIDA COM  
POLIVINILPIRROLIDONA K-30 E POLIETILENOGLICOL 4000**

**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi aumentar a solubilidade em água da  $\beta$ -lapachona através da formação de dispersões sólidas constituídas pelo fármaco e os polímeros hidrossolúveis polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30) e Polietilenoglicol 4000 (PEG 4000). Os sistemas binários foram obtidos pelo método de evaporação do solvente de solubilização, em álcool metílico e clorofórmio, respectivamente, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50% de  $\beta$ -lapachona (p/p) para cada polímero. Misturas físicas contendo 20% de  $\beta$ -lapachona e cada polímero foram preparadas para a realização de um ensaio comparativo. As possíveis interações com os polímeros estudados foram avaliadas através de metodologia computacional. Os componentes isolados, misturas físicas e dispersões sólidas foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, calorimetria exploratória diferencial, difração de raios-x, espectroscopia vibracional no infravermelho, determinação da solubilidade aquosa e ensaio de dissolução. Os resultados sugerem uma melhor interação ocorrida entre a  $\beta$ -lapachona e os polímeros na proporção com 20% do fármaco. A dispersão sólida com PVP K-30 apresentou melhor resultado devido às interações e alterações sofridas pelo fármaco na formação de uma dispersão sólida verdadeira, com a perda da forma cristalina da  $\beta$ -lapachona e incremento de aproximadamente 460% em sua solubilidade aquosa atingindo mais de 80% de teor dissolvido em 60 minutos.

**Palavras-Chave:**  $\beta$ -lapachona; Dispersões sólidas; Polivinilpirrolidona K-30; Polietilenoglicol 4000; Solubilidade.

## INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pirano-5, 6-diona) ( $C_{15}H_{14}O_3$ , MM 242,3) é uma ortonaftoquinona natural isolada do ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor) de ocorrência principalmente no Brasil (América do Sul). Outra forma de obtenção deste fármaco é a ciclização por semi-síntese de seu isômero lapachol, que apresenta melhor rendimento quando obtido diretamente do cerne das plantas [1-5]. Pesquisas *in vitro* e *in vivo* demonstram que a  $\beta$ -lapachona apresenta diversas propriedades farmacológicas como antiinflamatória, antiviral, antiparasitária, antifúngica e em particular um excelente potencial antineoplásico. A maioria destas atividades está ligada à capacidade de formação de espécies reativas de oxigênio [6-14]. Como anticancerígeno a  $\beta$ -lapachona atua por um mecanismo particular de apoptose contra diversos tipos de câncer, em especial algumas linhagens de próstata, ovário, colón, mama, pulmão e alguns tipos de leucemias refratários aos tratamentos convencionais [8,9,12,13,15-25].

O mecanismo de ação da  $\beta$ -lapachona em células cancerígenas é bastante complexo devido sua ação ser direcionada sobre múltiplos alvos biológicos. A  $\beta$ -lapachona inibe a transcriptase reversa e a DNA topoisomerase I e II sensibilizando as células tumorais. Alguns estudos demonstram que a  $\beta$ -lapachona age diretamente no alvo da DNA topoisomerasas inibindo a sua atividade, o que resulta na citotoxicidade. Este seu modo inibitório é distinto dos outros inibidores típicos da topoisomerase, pois com a inibição pela  $\beta$ -lapachona não é formado o complexo de estabilidade do DNA substrato. A  $\beta$ -lapachona é bioativada pela enzima NQO1 [NAD(P)H:quinona oxidoreductase], encontrada na maioria das células eucarióticas. Devido à alta expressão de NQO1 em células cancerígena de alguns tumores o uso da  $\beta$ -lapachona proporciona uma terapia seletiva com toxicidade mínima às células saudáveis [15-28]. O tratamento com  $\beta$ -lapachona aumenta a sensibilidade das células tumorais aos agentes causadores de danos ao DNA, como radiações ionizantes, e interrompe o

ciclo celular da célula cancerígena, característica importante para o uso sinérgico com outras alternativas terapêuticas [25-28].

Apesar da potência terapêutica a forma cristalina com caráter lipofílico da  $\beta$ -lapachona compromete sua solubilidade em água afetando sua dissolução e conseqüentemente sua absorção [29, 30].

As dispersões sólidas tem sido utilizadas no desenvolvimento tecnológico de produtos farmacêuticos com o objetivo de melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis. O termo dispersão sólida é aplicado para descrever um grupo de produtos nos quais o fármaco está disperso em um carreador biologicamente inócuo, com o objetivo de melhorar a sua biodisponibilidade no trato gastrointestinal. Estes sistemas geralmente são obtidos pela conversão da mistura fármaco/carreador no estado fluído para o estado sólido [31]

O conceito de dispersão sólida foi originalmente proposto no início dos anos 60, onde o fármaco é normalmente disperso molecularmente em uma matriz polimérica e liberada em forma coloidal de partículas após a exposição a um meio aquoso, aumentando bastante a velocidade de dissolução por aumento da superfície de contato. [32] As dispersões sólidas geram partículas sólidas micronizadas do fármaco juntamente com o polímero hidrossolúvel em uma única etapa. Porém, o número de produtos comercializados como dispersões sólidas ainda é pequeno devido a questões limitantes dos métodos de preparação, em especial a baixa reprodutibilidade, bem como a fraca estabilidade físico-química do produto formado. [33, 34]

Polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG) tem sido amplamente utilizados como carreadores na obtenção das dispersões sólidas por serem matérias prima de uso frequente nas indústrias farmacêuticas, possuírem um baixo custo, alta solubilidade aquosa e tamanho molecular favorável para a formação de soluções sólidas intersticiais [35-42].

O principal objetivo deste trabalho foi investigar a possibilidade de melhorar a solubilidade da  $\beta$ -lapachona através da obtenção de dispersão sólida com PVP K-30 e PEG

4000. Várias técnicas são utilizadas, de forma complementares, a fim de caracterizar uma dispersão sólida [35-46]. As técnicas aqui utilizadas foram realizadas após avaliação das possíveis interações entre o fármaco e os polímeros por metodologia computacional de modelagem molecular. Foram elas: microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios-X, espectroscopia vibracional no infravermelho com transformadas de *Fourier* (FTIR), determinação da solubilidade aquosa e ensaio de dissolução.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Substâncias e Reagentes**

A  $\beta$ -lapachona (lote: 103) produzida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Pernambuco, Brasil), foi utilizada na realização do trabalho. O polímero hidrossolúvel polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30) foi adquirido da ISP<sup>®</sup> do Brasil. O polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) foi cedido pela Oxiteno<sup>®</sup>. Como solventes para a obtenção das dispersões sólidas foram utilizados álcool metílico da Cinética<sup>®</sup> (Jand Química Indústria e Comércio de Produtos Químicos, Brasil) e clorofórmio da Merck<sup>®</sup>.

Para a construção da curva analítica, quando necessário a realização de doseamento, foi utilizado um padrão de trabalho de  $\beta$ -lapachona também produzido pela UFPE (lote: PS01; 99,26%), padronizado a partir do padrão primário Sigma<sup>®</sup> (lote: 31K1558). Foi utilizado álcool etílico absoluto (Dinâmica<sup>®</sup>, Brasil) e água purificada pelo sistema de osmose reversa (Gehaka<sup>®</sup>) na preparação das amostras para a análise de doseamento.

### **Preparação das Misturas Físicas (MF)**

Foram preparadas misturas físicas com a  $\beta$ -lapachona e os polímeros PVP K-30 e PEG 4000, exatamente pesados, contendo 20% de ativo (p/p) em cada mistura. O método de

diluição geométrica foi utilizado de forma a garantir a homogeneidade do produto com posterior tamisação em malha de 250  $\mu\text{m}$  para uniformização do tamanho das partículas. As misturas físicas foram acondicionadas em frascos-ampola hermeticamente fechados e armazenadas em dessecador de vidro sob vácuo.

### **Preparação das Dispersões Sólidas (DS)**

Dispersões sólidas contendo  $\beta$ -lapachona com PVP K-30 e  $\beta$ -lapachona com PEG 4000 foram preparadas através do método de evaporação do solvente de solubilização nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50% de  $\beta$ -lapachona (p/p) para cada polímero (Evaporador rotativo Fisatom<sup>®</sup>, 802). A  $\beta$ -lapachona e os polímeros, nas devidas proporções, foram separadamente dissolvidos em quantidades mínimas dos solventes orgânicos álcool metílico, para as dispersões com PVP K-30, e clorofórmio para as dispersões com PEG 4000. As soluções contendo  $\beta$ -lapachona foram vertidas nas soluções contendo os polímeros e homogeneizadas. Os solventes foram removidos lentamente através de evaporação sob temperatura controlada ( $55^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) e pressão reduzida ( $-800\text{mbar} \pm 20\text{mbar}$ ) com agitação contínua de  $90 \pm 3\text{rpm}$ , havendo uma precipitação da  $\beta$ -lapachona juntamente com os polímeros. As dispersões resultantes foram congeladas a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 5 dias, e os solventes aderidos à superfície da partícula co-precipitada, foram removidos pelo processo de liofilização (pressão de 80 a 150  $\mu\text{Hg}$ ; temperatura  $-40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ; vácuo  $220 \pm 2\text{ Vca}$ ) (Liofilizador L101 Liobras<sup>®</sup> com bomba acoplada para alto vácuo de 2 etapas IP 21 Liobras<sup>®</sup>). Após a secagem as dispersões foram pulverizadas, misturadas em gral de porcelana com auxílio de pistilo e tamisadas em malha de 250  $\mu\text{m}$  para uniformizar o tamanho das partículas. Posteriormente as dispersões sólidas foram acondicionadas em frascos-ampola hermeticamente fechados e armazenadas em dessecador de vidro sob vácuo.

## **METODOLOGIA COMPUTACIONAL DE MODELAGEM MOLECULAR**

As estruturas dos complexos de hidrogênio  $\beta$ -lapachona...PVP e  $\beta$ -lapachona...PEG foram otimizadas em nível de teoria semi-empírico AM1. Todos os cálculos foram executados pelo programa GAUSSIAN versão 03. Os valores das energias de interação ( $\Delta E$ ) foram determinados pela aproximação da supermolécula, pela qual é permitido subtrair as energias dos monômeros ( $\beta$ -lapachona, PVP e PEG) da energia do complexo ( $\beta$ -lapachona...PVP ou  $\beta$ -lapachona...PEG). A aplicação dos cálculos em nível AM1 teve como objetivo prever a estabilização relativa dos complexos  $\beta$ -lapachona...PVP e  $\beta$ -lapachona...PEG, pois é bem conhecido que o polímero PVP normalmente forma estruturas intermoleculares mais estáveis do que aquelas com o PEG. Adicionalmente, o método AM1 tem gerado resultados bastante satisfatórios com relação à determinação de intensidades relativas de interações intermoleculares [47].

## **CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS**

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As amostras de  $\beta$ -lapachona isolada, polímeros isolados, misturas físicas e dispersões sólidas foram montadas em stub, fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 5 minutos (Metalizador Desk II/Denton Vacuum). A morfologia das amostras foi verificada em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol<sup>®</sup> 5600 LV, onde foram obtidas as eletromicrografias em uma câmara com tensão de excitação de 10KV com fatores de aumento de 20x para a  $\beta$ -lapachona isolada, 270 a 500x para os compostos com PVP K-30 e 100 a 450x para os compostos com PEG 4000.

### **Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As curvas termoanalíticas dos produtos isolados e sistemas binários foram obtidos em Calorímetro de Varredura Shimadzu<sup>®</sup> DSC-50 interligado ao software Shimadzu<sup>®</sup> TA-60WS/TA-50WS com atmosfera de nitrogênio de 20 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>, numa faixa de temperatura de 25 - 250°C. As amostras foram colocadas em células de alumínio hermeticamente fechadas com massa de 2 mg  $\pm$  0,2. Foi utilizado Índio para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

### **Difração de Raios X**

Os difratogramas dos produtos isolados e binários foram obtidos num difratômetro SIEMENS (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com anodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo 2 $\theta$  de 5-50°.

### **Espectroscopia vibracional no Infravermelho (FTIR)**

Os espectros de FTIR foram obtidos em um espectrômetro Burker FT-IR / IFS 66 por análise de amostras preparadas em pastilhas de KBr, contendo 1mg do produto a ser analisado para 100 mg de KBr. A região espectral estudada foi de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>.

### **Determinação da solubilidade aquosa**

Quantidade em excesso da  $\beta$ -lapachona matéria-prima, misturas físicas e dispersões sólidas foram colocadas em frascos âmbar hermeticamente fechados contendo 5 mL de água purificada e deixadas sob agitação ininterruptamente durante 48h com temperatura controlada (27  $\pm$  2°C) (Banho Maria Agitador Dubnoff 304/D). Após este período de agitação as amostras permaneceram em repouso por 1h, para favorecer o equilíbrio da suspensão, antes de

serem filtradas em filtro de 0,45 $\mu$ m. Para a leitura das amostras foi utilizada a metodologia descrita na literatura de doseamento por espectrofotômetro com absorção em ultravioleta em  $\lambda=256$ nm. (Espectrômetro Varian<sup>®</sup>, Unity plus-300MHz) [48].

### **Ensaio de dissolução**

As cinéticas de liberação da  $\beta$ -lapachona em dispersão sólida foram avaliadas pelos perfis de dissolução *in vitro* realizados segundo as especificações do FDA (Food and Drug Administration) para drogas pouco solúveis utilizando o método preconizado pela Farmacopéia Americana em dissolutor Varian VK 7010 [49, 50].

Os ensaios foram realizados a  $37 \pm 0,5$  °C, utilizando 900 mL da água purificada como meio de dissolução com aparato 2 (pá) e velocidade de rotação de 75 rpm. Foi realizado ainda um estudo de dissolução com a  $\beta$ -lapachona matéria-prima na forma de cristais, pó pulverizado e atomizado nas mesmas condições dos produtos binários para serem utilizados como parâmetros comparativos de incremento da solubilidade do fármaco na forma de dispersão sólida.

Com a finalidade de manter as condições *sink* foram pesadas quantidades de pó equivalentes a 25 mg de  $\beta$ -lapachona da matéria-prima, misturas físicas e dispersões sólidas. Nos intervalos de tempo predefinidos de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos as amostras foram coletas, filtradas em filtro de membrana 0,45  $\mu$ m e devidamente diluídas para posterior quantificação do teor dissolvido de  $\beta$ -lapachona por espectroscopia no UV a 256 nm utilizando metodologia anteriormente validada (Espectrômetro Varian<sup>®</sup>, Unity plus-300MHz) [48]. Foi efetuada a reposição do meio de dissolução com o mesmo volume de cada alíquota retirada. Todos os ensaios foram efetuados em quadruplicata.

Os perfis de dissolução foram avaliados e comparados em relação à percentagem de fármaco dissolvido em 60, 90 e 120 minutos ( $Q_{60min}$ ,  $Q_{90min}$  e  $Q_{120min}$ ) e à eficiência de

dissolução aos 60 e 120 min ( $ED_{60\text{min}}$  e  $ED_{120\text{min}}$ ) calculada a partir da área sob a curva de dissolução do produto no intervalo de tempo compreendido entre zero e 60 minutos ( $ASC_{0-60\text{minutos}}$ ) e zero e 120 minutos ( $ASC_{0-120\text{minutos}}$ ), de acordo com o método de Khan. A determinação da ED permite avaliar não apenas a quantidade de fármaco liberada no meio de dissolução após determinado tempo, mas a própria cinética de liberação ao longo de todo o tempo em questão [51].

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **METODOLOGIA COMPUTACIONAL DE MODELAGEM MOLECULAR**

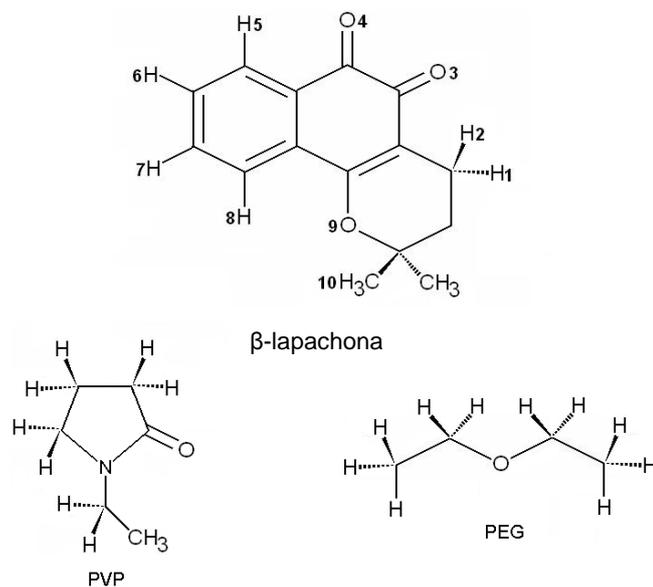
É importante ressaltar que a  $\beta$ -lapachona (Figura 1) não apresenta centros tipicamente doadores de ligação de hidrogênio, enquanto os monômeros PVP e PEG apresentam grupos aceitadores de ligações de hidrogênio bastante característicos. Desta forma, uma vez que ligações de hidrogênio típicas (átomos de N ou O como aceitadores e grupos N-H ou O-H como doadores) não são possíveis na interação entre estes sistemas, foi feita uma varredura nas possibilidades de interação intermolecular entre  $\beta$ -lapachona e PVP ou PEG, no intuito de identificar geometrias possíveis que permitam a interação mais estável entre estas moléculas. Os resultados mais estáveis encontrados para estes complexos durante a varredura são destacados na Figura 2. Na tabela 1 são listados os valores das energias de interação ( $\Delta E$ ) dos complexos  $\beta$ -lapachona...PVP e  $\beta$ -lapachona...PEG utilizando resultados dos cálculos semi-empíricos AM1. Analisando o modelo da molécula  $\beta$ -lapachona ilustrado na Figura 1, pode-se distinguir entre os principais sítios de interação dos os sistemas  $\beta$ -lapachona e PVP/PEG. Inicialmente, podemos observar que todos os complexos formados por PVP são mais estáveis do que os formados por PEG, onde em muitos casos a diferença energética varia na faixa de 5 Kcal.mol<sup>-1</sup>. Isto está em total concordância com os resultados apresentados na literatura [43, 52], como por exemplo, de complexos envolvendo a molécula felodipina e os polímeros

PVP/PEG, calculados em nível de teoria B3LYP. Desta forma, pode-se avaliar que os resultados do método AM1 aqui apresentados estão em ótima concordância com dados calculados com níveis de teoria de mais alta demanda computacional, como o B3LYP/6-311++G(d,p). Conforme os valores das energias de estabilização ( $\Delta E$ ) listados na Tabela 1, pode-se perceber que (2) e (3) são as configurações mais estáveis. De acordo com a Figura 2, onde são apresentadas as geometrias mais estáveis a nível AM1 para os complexos  $\beta$ -lapachona...PVP  $\beta$ -lapachona...PEG, as estruturas (2), por sua vez, apresentam distâncias intermoleculares mínimas menores do que as calculadas para as estruturas (3), cujos valores são 2,68 Å e 2,82 Å, e 2,71 Å e 3,03 Å para os complexos com PVP e PEG, respectivamente. Estas distâncias de interação estão corroborando com os resultados obtidos para as energias de estabilização ( $\Delta E$ ), onde menores distâncias intermoleculares no complexo  $\beta$ -lapachona...PVP mostram que este sistema é mais estável do que os formados por PEG, ou seja, o complexo  $\beta$ -lapachona...PEG.

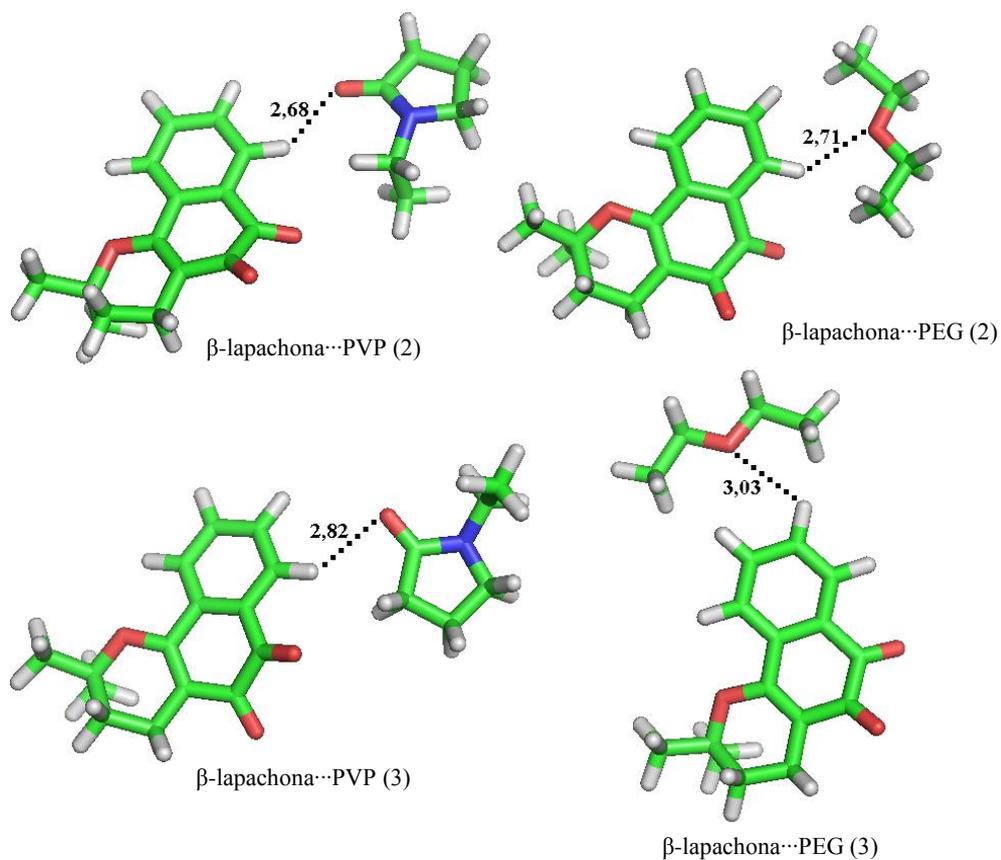
**Tabela 01.** Energias totais (E) e de interação ( $\Delta E$ ) para os complexos  $\beta$ -lapachona...PVP usando cálculos semi-empíricos AM1.

Complexos	Parâmetros energéticos	
	E	$\Delta E$
$\beta$ -lapachona...PVP (1)	-115,30	-6,53
$\beta$ -lapachona...PEG (1)	-132,46	-1,66
$\beta$ -lapachona...PVP (2)	-115,90	-7,13
$\beta$ -lapachona...PEG (2)	-132,93	-2,13
$\beta$ -lapachona...PVP (3)	- 116,00	-7,23
$\beta$ -lapachona...PEG (3)	-132,34	-1,54
$\beta$ -lapachona...PVP (4)	-114,83	-6,06
$\beta$ -lapachona...PEG (4)	-132,35	-1,56
$\beta$ -lapachona...PVP (5)	-114,37	-5,60
$\beta$ -lapachona...PEG (5)	-132,00	-1,20

\* Todos os valores estão em Kcal.mol<sup>-1</sup>.



**Figura 1.** Representação esquemática da molécula  $\beta$ -lapachona e das unidades monoméricas do PVP e PEG.



**Figura 2.** Geometrias dos complexos mais estáveis  $\beta$ -lapachona ...PVP (2),  $\beta$ -lapachona ...PEG (2),  $\beta$ -lapachona ...PVP (3) e  $\beta$ -lapachona ...PEG (3), obtidos dos cálculos semi-empíricos AM1. Os valores próximos às linhas tracejadas representam as distâncias intermoleculares mínimas em Angstroms.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise de MEV tem grande importância, pois permite avaliar a morfologia dos diferentes produtos isolados e em compostos binários, podendo desta forma fazer uma correlação entre a estrutura morfológica e o tamanho das partículas com os demais resultados obtidos em outras análises realizadas na investigação da formação de uma dispersão sólida com o aumento da solubilidade de fármacos. As eletromicrografias da  $\beta$ -lapachona, PVP K-30 e dos sistemas binários (misturas físicas e dispersões sólidas) estão relatadas na Figura 3. Os produtos obtidos com PEG 4000 estão relatados na figura 4.

A eletromicrografia da  $\beta$ -lapachona demonstra sua forma cristalina, visível macroscopicamente, com cristais aciculares bem definidos de tamanho regular. O PVP K-30 é composto por partículas não cristalinas esféricas enquanto o PEG 4000 apresenta partículas cristalinas grandes com tamanho bastante irregular.

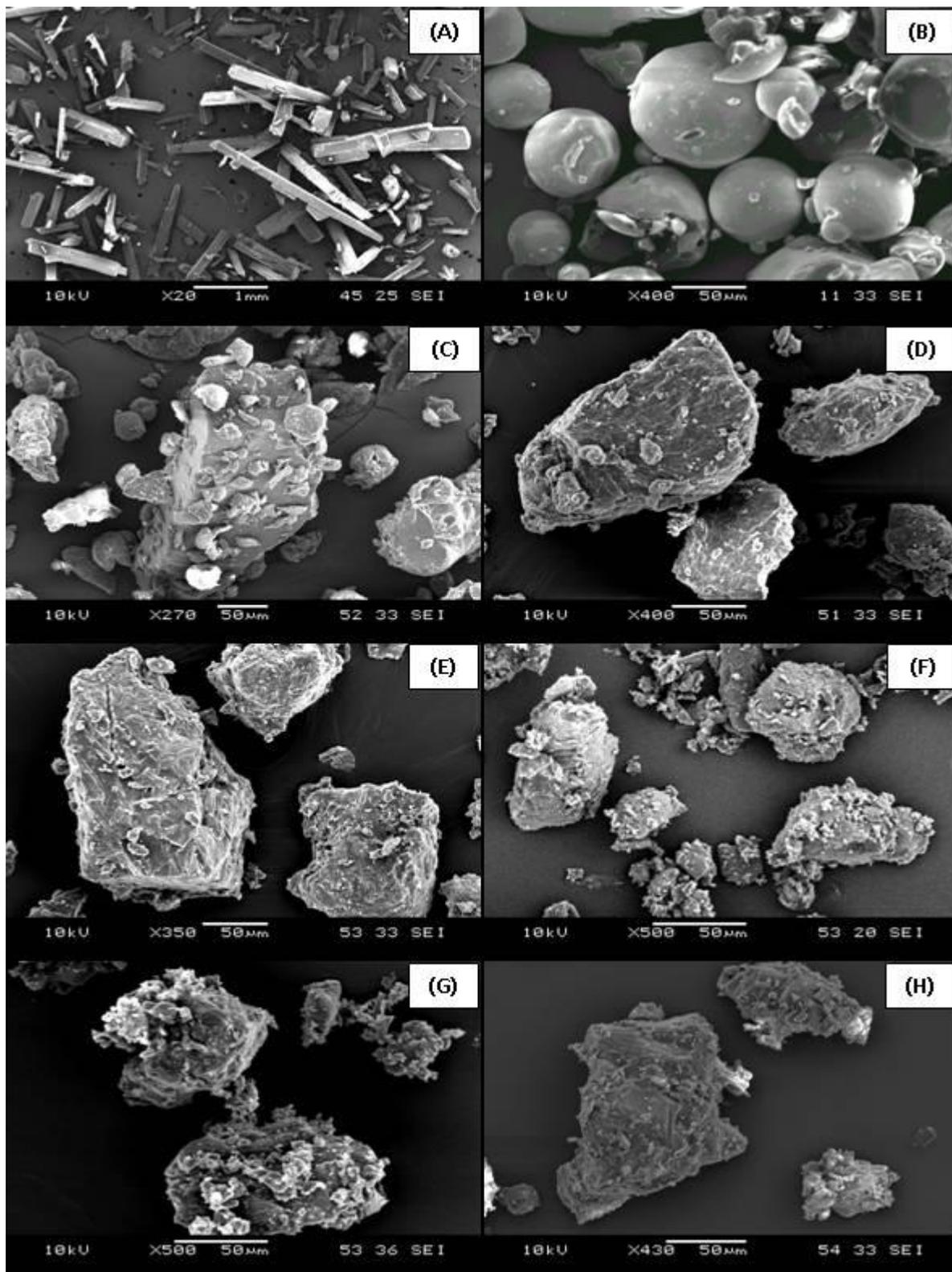
Nas misturas físicas foi observada a presença de cristais de  $\beta$ -lapachona com tamanho reduzido, devido à pulverização e tamisação do processo de obtenção, misturados com os polímeros ou com partículas dos carreadores adsorvidos em sua superfície. Este fato demonstra a aparente inexistência de interações entre a  $\beta$ -lapachona e os polímeros no estado sólido nas misturas.

Nas eletromicrografias das dispersões sólidas com PVP K-30 não foi visualizada a morfologia cristalina original da  $\beta$ -lapachona havendo também uma drástica mudança no aspecto do polímero. Os sistemas dispersos apresentaram-se como pequenos agregados de pedaços não cristalinos de partículas não sendo possível a separação visual do fármaco e polímero. No entanto, a drástica mudança da forma e do aspecto das partículas nas dispersões, sugerem a formação de uma nova fase sólida, que pode ser devido à simples consequência de uma mudança repentina do estado cristalino desses sistemas binários, levando a existência de uma única fase, ou a uma real sugestão da conversão do estado cristalino ao estado não

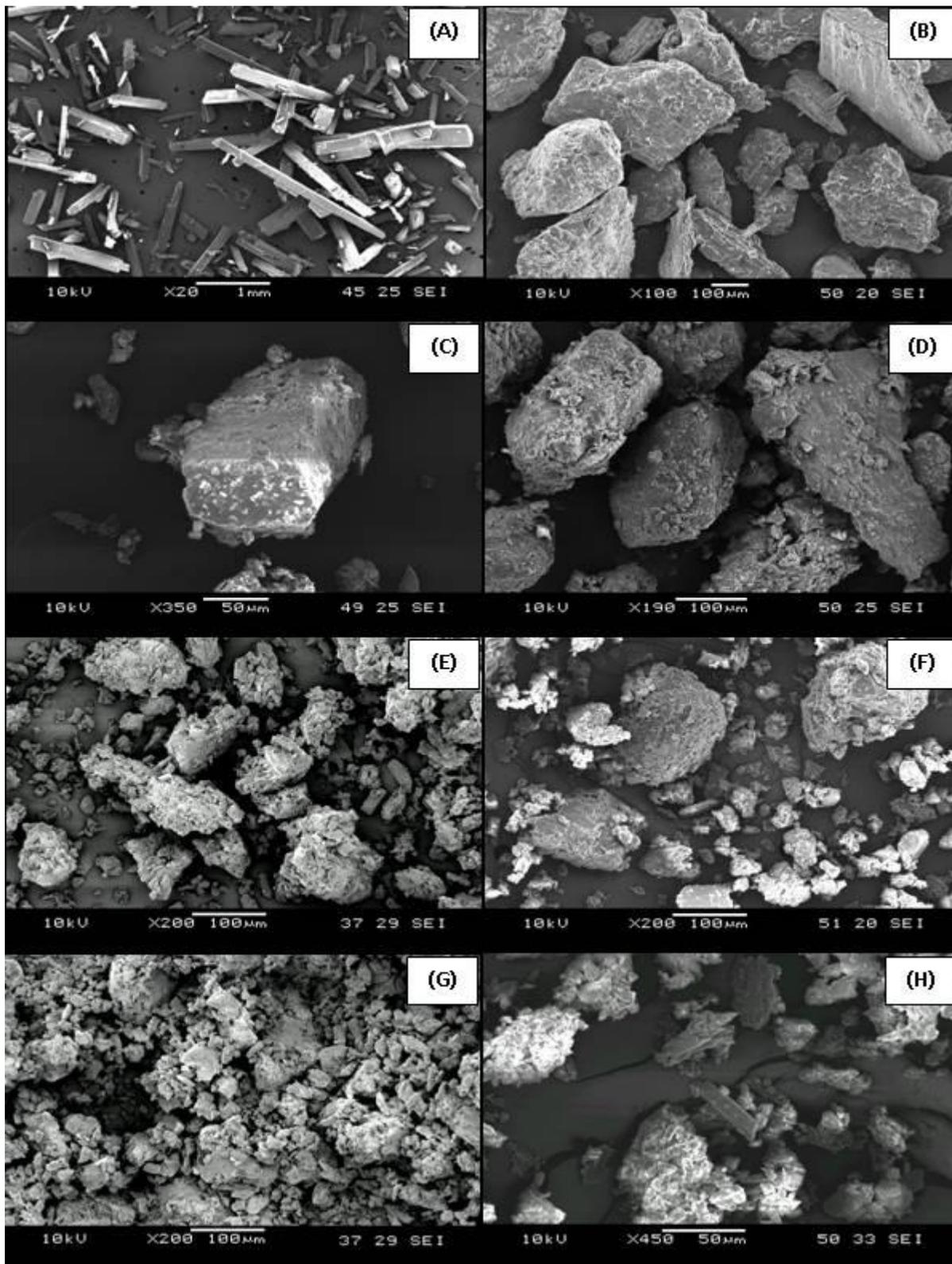
crystalino devido às possíveis interações químicas ocorridas entre o polímero e o ativo no processo de obtenção das dispersões sólidas.

A dispersão 10% com PEG 4000 apresentou morfologia semelhante a do polímero, fato ocorrido provavelmente devido à pequena quantidade de  $\beta$ -lapachona, não sendo possível afirmar se houve interação entre o fármaco e o polímero. Nas dispersões 30 e 50 % os cristais de  $\beta$ -lapachona estão presentes em sua forma original de agulha em quantidades significativamente reduzidas quando comparado com a mistura física, apesar das dispersões apresentarem maiores quantidade do fármaco em sua composição, sugerindo que houve mudança, mesmo que parcial, da forma cristalina da  $\beta$ -lapachona. Não foi visualizada a morfologia cristalina original da  $\beta$ -lapachona nas dispersões sólidas com 20 e 40% com PEG 4000, apresentando apenas pequenos agregados de pedaços não cristalinos com tamanho uniforme de partículas não sendo possível a separação visual do ativo e polímero utilizado, indicando a formação de uma nova fase sólida. Estas dispersões apresentaram uma morfologia bastante divergente das originais dos produtos isolados, sugerindo que houve uma maior interação entre a  $\beta$ -lapachona e o PEG 4000.

Embora esta técnica não seja conclusiva para avaliar a existência da formação de uma dispersão verdadeira no estado sólido, pode ser útil para provar a homogeneidade dos sistemas e a inexistência do princípio ativo em sua forma cristalina original, que por se só já facilita sua solubilidade.



**Figura 3.** Eletromicrografias de MEV: (A)  $\beta$ -lapachona, (B) PVP K-30, (C) MF 20%  $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (D) DS 10%  $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (E) DS 20%  $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (F) DS 30%  $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (G) DS 40%  $\beta$ -lapachona+PVP K-30, (H) DS 50%  $\beta$ -lapachona+PVP K-30.



**Figura 4.** Eletromicrografias de MEV: (A)  $\beta$ -lapachona, (B) PEG 4000, (C) MF 20%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (D) DS 10%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (E) DS 20%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (F) DS 30%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (G) DS 40%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (H) DS 50%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000.

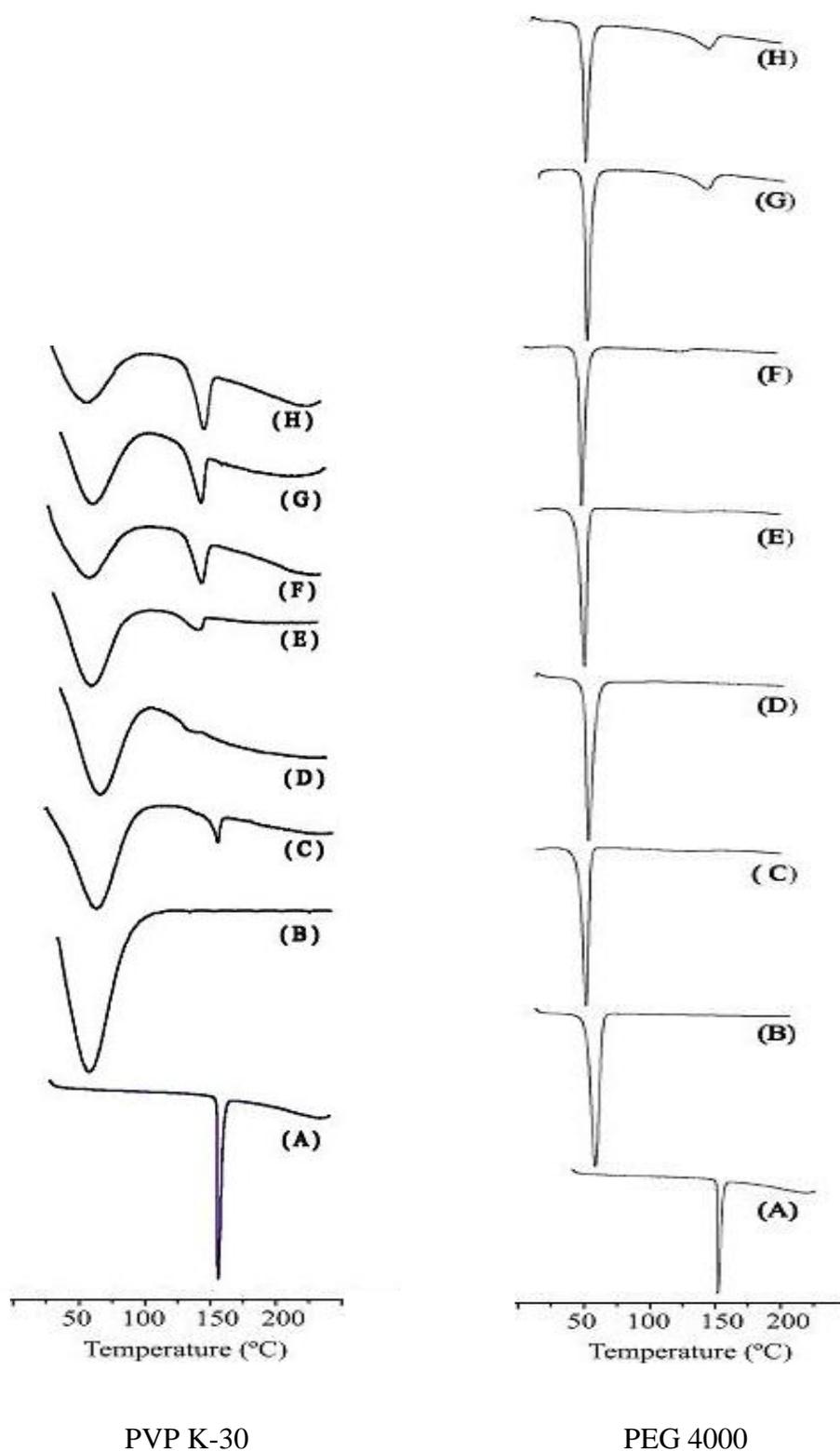
### **Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

A figura 5 mostra as curvas termoanalíticas dos produtos isolados e compostos binários de  $\beta$ -lapachona com PVP K-30 e PEG 4000. O perfil térmico da  $\beta$ -lapachona isolada é característico de um composto cristalino, com pico endotérmico intenso e bem definido referente à fusão em 156,46°C. Durante a varredura do PVP K-30 isolado foi verificado um amplo efeito endotérmico entre 75-123°C indicando uma grande perda de água devido à natureza extremamente higroscópica deste polímero. A análise do PEG 4000 isolado mostrou um único pico endotérmico afilado em 54,45°C correspondente a fusão.

A mistura física com PVP K-30 apresentou a combinação sobreposta dos compostos com o pico de fusão da  $\beta$ -lapachona em 156,66°C e um amplo efeito endotérmico devido à presença de água do PVP K-30 entre 70-115°C, comprovando a não interação entre o fármaco e o polímero. As dispersões sólidas nas concentrações de 10 e 20 % de  $\beta$ -lapachona com PVP K-30 apresentaram um comportamento peculiar com um discreto efeito endotérmico deslocado termicamente (135°C), um pouco mais pronunciado na dispersão a 20% devido a maior concentração do fármaco, ao invés do pico característico da fusão da  $\beta$ -lapachona. Esta ausência de um pico definido indica que o fármaco não está presente como um material completamente cristalino, mas foi convertido ao estado não cristalino ou está em uma solução sólida dentro da matriz formada pelo PVP K-30 que é capaz de inibir a cristalização de drogas em dispersões sólidas formadas. A inibição desta cristalização é atribuída a dois fatores que podem ocorrer isolados ou sinergicamente: interações de ponte de hidrogênio entre o fármaco e o polímero e/ou encarceramento das moléculas da droga na matriz polimérica durante a evaporação do solvente que é removido durante a preparação das dispersões sólidas aumentando a viscosidade do sistema muito rapidamente levando para uma diminuição da mobilidade das moléculas da droga, que após a evaporação completa do solvente são fixadas na matriz polimérica formada [37, 53]. O pico endotérmico da  $\beta$ -lapachona pode ser

observado com um deslocamento térmico para 144-145°C nas dispersões contendo 30, 40 e 50% da droga com PVP K-30, com intensidades proporcionais as concentrações, indicando a presença de cristalinidade do fármaco com influência de possíveis interações físicas entre a  $\beta$ -lapachona e o polímero consequente da ativação mecânica do processo de obtenção.

Os termogramas da mistura física e dispersões sólidas 10 e 20% com PEG 4000 não apresentaram o pico correspondente a fusão da  $\beta$ -lapachona, havendo apenas um pico endotérmico referente ao polímero em aproximadamente 55°C. No entanto, não é possível dizer que este fato se deve a ausência da forma cristalina na amostra, pois de acordo com MEV a mistura física apresenta cristais do fármaco bem definidos. Provavelmente, este fenômeno está relacionado à dissolução da  $\beta$ -lapachona, que está em pequena concentração em relação à quantidade do polímero, no carreador fundido durante o aquecimento, característica que vem sendo observada por outros investigadores quando se utiliza alguns contratipos de PEG [54-58]. A dispersão 30% apresentou uma discretíssima depressão com deslocamento químico para 130°C referente à presença da  $\beta$ -lapachona, sugerindo uma prevalência da forma não cristalina deste composto. As demais dispersões estudadas, 40 e 50%, mostraram a presença da  $\beta$ -lapachona de forma mais nítida, pouco mais pronunciado na dispersão 50% devido à maior concentração do fármaco. Ao invés do pico característico da fusão da  $\beta$ -lapachona, houve um deslocamento térmico para 135,04°C e 138,10°C, respectivamente. Estas características indicam que o fármaco não foi molecularmente disperso por completo na matriz polimérica formando um sistema heterogêneo composto pela forma não cristalina do fármaco em dispersão e por interações físicas entre a  $\beta$ -lapachona na forma cristalina e o polímero consequente da ativação mecânica do processo de obtenção.



**Figura 5.** Curvas termoanalíticas (A)  $\beta$ -lapachona, (B) Polímero, (C) MF 20%  $\beta$ -lapachona, (D) DS 10%  $\beta$ -lapachona, (E) DS 20%  $\beta$ -lapachona, (F) DS 30%  $\beta$ -lapachona, (G) DS 40%  $\beta$ -lapachona e (H) DS 50%  $\beta$ -lapachona.

## **Difração de Raios X**

O estudo de difração de raios X foi realizado para verificar a cristalinidade dos diferentes sistemas em relação aos produtos isolados. Os difratogramas de raios X deste estudo estão apresentados na Figura 6.

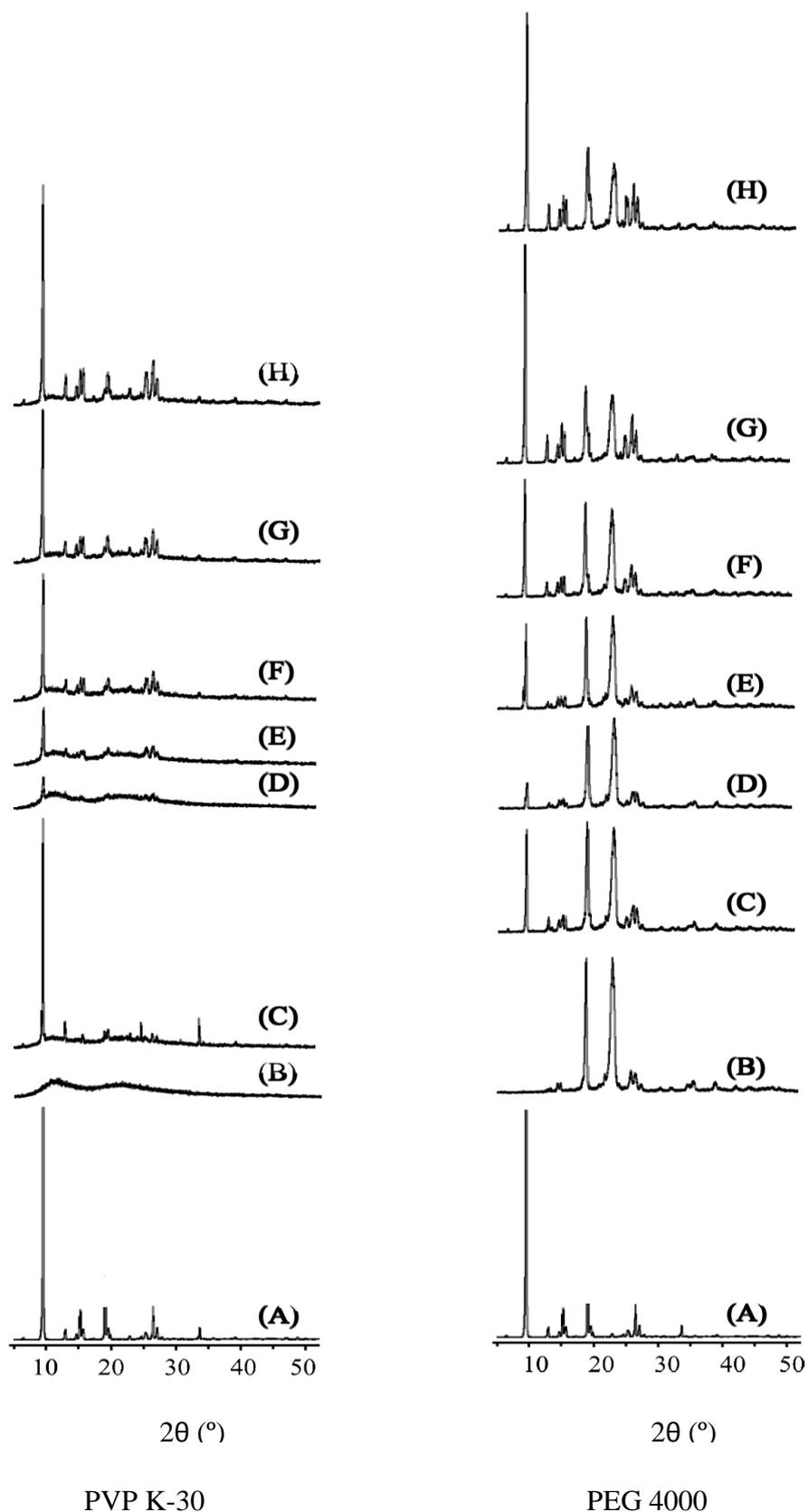
O perfil difratográfico da  $\beta$ -lapachona apresenta uma série de picos de difração intensos e bem definidos revelando o típico padrão de um produto policristalino com pico principal de  $9,5^\circ$  ( $2\theta$ ) e picos secundários em  $12.95$ ,  $16.30$ ,  $19.03$ ,  $26.40$  e  $34.98^\circ$  ( $2\theta$ ). A ausência de picos no difratograma do PVP K-30 demonstrou sua natureza não cristalina. O PEG 4000 como é um produto cristalino apresentou dois picos principais em  $19.17$  e  $23.33^\circ$  ( $2\theta$ ) e picos secundários em  $14.86$ ,  $26.59$ ,  $35.73$  e  $39.74^\circ$  ( $2\theta$ ).

As misturas físicas de  $\beta$ -lapachona com PVP K-30 e PEG 4000 apresentaram-se como a simples sobreposição dos difratogramas obtidos para cada um dos compostos isolados, indicando que não ocorreu a formação de uma nova estrutura.

Os binários obtidos com o PEG 4000 apresentaram padrões de difração muito semelhantes entre si e com a mistura física. Todos demonstraram um certo grau de cristalinidade com intensidades proporcionais à concentração de  $\beta$ -lapachona, além da presença das características cristalinas do polímero, sugerindo que não houve formação de um composto completamente não cristalino em nenhuma das proporções.

Em todos os binários com PVP K-30 houve uma redução no número de picos de difração. A dispersão a 20% de  $\beta$ -lapachona foi o produto que apresentou resultados mais pronunciados, uma vez que quando comparada com a mistura física, que está na mesma concentração de fármaco deste sistema, a diferença entre os produtos é nítida tanto no que diz respeito ao desaparecimento de picos como na diminuição das intensidades dos picos presentes, sugerindo uma perda parcial da forma cristalina original da  $\beta$ -lapachona. Como a intensidade do pico é diretamente proporcional a quantidade de fármaco na amostra este

parâmetro não pode ser levado em consideração para comparação dos outros sistemas binários com a mistura física. No entanto, quando comparados os produtos obtidos nas concentrações de 30 e 40% é verificado que apesar do binário de 40% possuir uma maior quantidade proporcional de fármaco, os difratogramas deste dois produtos são bastante semelhantes, sugerindo uma menor cristalinidade no binário com 40% de  $\beta$ -lapachona em relação ao de 30%. A concentração de 10% por possuir uma quantidade pequena de fármaco apresentou discreta interferência das características cristalinas da  $\beta$ -lapachona não sendo possível definir se houve perda de cristalinidade do fármaco.



**Figura 6.** Difratomogramas: (A)  $\beta$ -lapachona, (B) Polímero, (C) MF 20%  $\beta$ -lapachona, (D) DS 10%  $\beta$ -lapachona, (E) DS 20%  $\beta$ -lapachona, (F) DS 30%  $\beta$ -lapachona, (G) DS 40%  $\beta$ -lapachona e (H) DS 50%  $\beta$ -lapachona.

### **Espectroscopia vibracional no Infravermelho (FTIR)**

A espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier é uma metodologia analítica que pode ser utilizada para avaliação de ocorrência de interações entre diferentes moléculas no estado sólido. As principais mudanças ou alterações de intensidade, mesmo que sutis, nas bandas características da  $\beta$ -lapachona devem ser consideradas para comprovação de interações entre o fármaco e os polímeros.

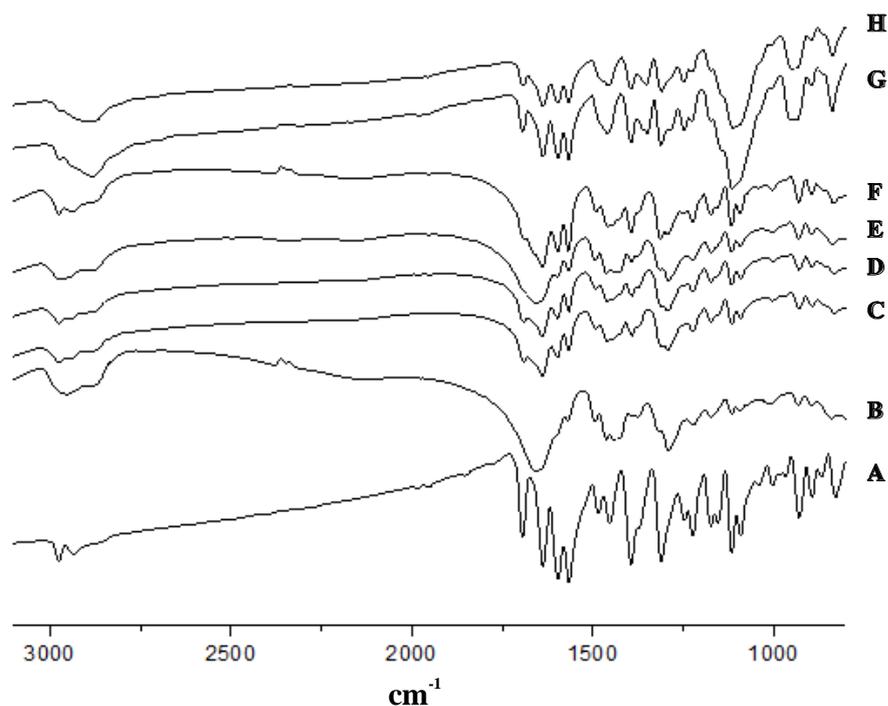
Em todos os espectros dos compostos formados, tanto com PVP K-30 como com PEG 4000, não surgiram novas bandas de absorção, o que indica que não se estabeleceu ligações do tipo covalente entre a  $\beta$ -lapachona e os polímeros nos novos produtos formados. Os espectros de FTIR dos compostos binários com PVP K-30 e PEG 4000 estão apresentados na figura 7 e 8, respectivamente, juntamente com os espectros dos polímeros isolados e  $\beta$ -lapachona.

Os compostos contendo 20% e 50% de  $\beta$ -lapachona com PVP K-30, e 10%, 20% e 30% de  $\beta$ -lapachona com PEG 4000 apresentaram quase que total desaparecimento da banda em  $2977\text{ cm}^{-1}$  característica de deformação axial de C-H aromático, sítio de interação mais estável de acordo com os estudos de modelagem molecular entre a  $\beta$ -lapachona e os polímeros. Nos demais compostos obtidos com PVP K-30 houve uma diminuição significativa de intensidade desta banda.

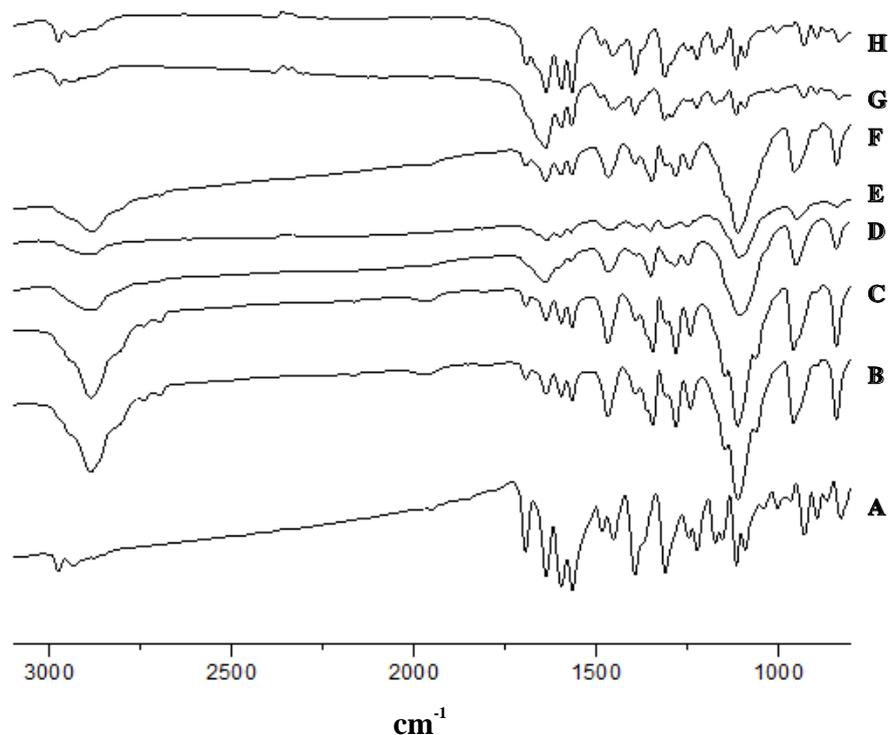
O sinal na região  $1694\text{ cm}^{-1}$  atribuído à banda de deformação axial de C=O não foi observado no composto com 20% de fármaco com PVP K-30, bem como nos compostos à 10%, 20% e 40% com PEG 4000. Houve ainda redução da intensidade desta banda com deslocamento para  $1690\text{ cm}^{-1}$  no composto contendo 30% de  $\beta$ -lapachona com PVP K-30.

A banda em  $1591\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial C=C do anel também não foi observada na concentração 20% de  $\beta$ -lapachona com PVP K-30 e 10% e 20% com PEG 4000.

Houve alargamento da banda, com falta de definição, na região de  $1313,7\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação axial assimétrica de C-O-C para os compostos com PVP K-30 e para os compostos à 10% e 40% com PEG 4000. Esta banda não foi visualizada para o composto a 20% com PEG 4000. A banda correspondente a deformação axial simétrica de C-O-C em  $1117,0\text{ cm}^{-1}$  apresentou-se similar as misturas físicas e compostos a 10%, 20% e 30% com PVP K-30, havendo um alargamento significativo nas concentrações a 40 e 50% de  $\beta$ -lapachona com o mesmo polímero. Para os compostos obtidos com PEG 4000 foi possível verificar este alargamento nos produtos a 10%, 20% e 30%, com diminuição de intensidade no composto a 20%.



**Figura 7.** Espectros de FTIR: (A)  $\beta$ -lapachona, (B) PVP K-30, (C) MF 20%  $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (D) DS 10%  $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (E) DS 20%  $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (F) DS 30%  $\beta$ -lapachona + PVP K-30, (G) DS 40%  $\beta$ -lapachona+PVP K-30, (H) DS 50%  $\beta$ -lapachona+PVP K-30.



**Figura 8.** Espectros de FTIR: (A)  $\beta$ -lapachona, (B) PEG 4000, (C) MF 20%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (D) DS 10%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (E) DS 20%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (F) DS 30%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (G) DS 40%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000, (H) DS 50%  $\beta$ -lapachona+PEG 4000.

### **Determinação da solubilidade aquosa**

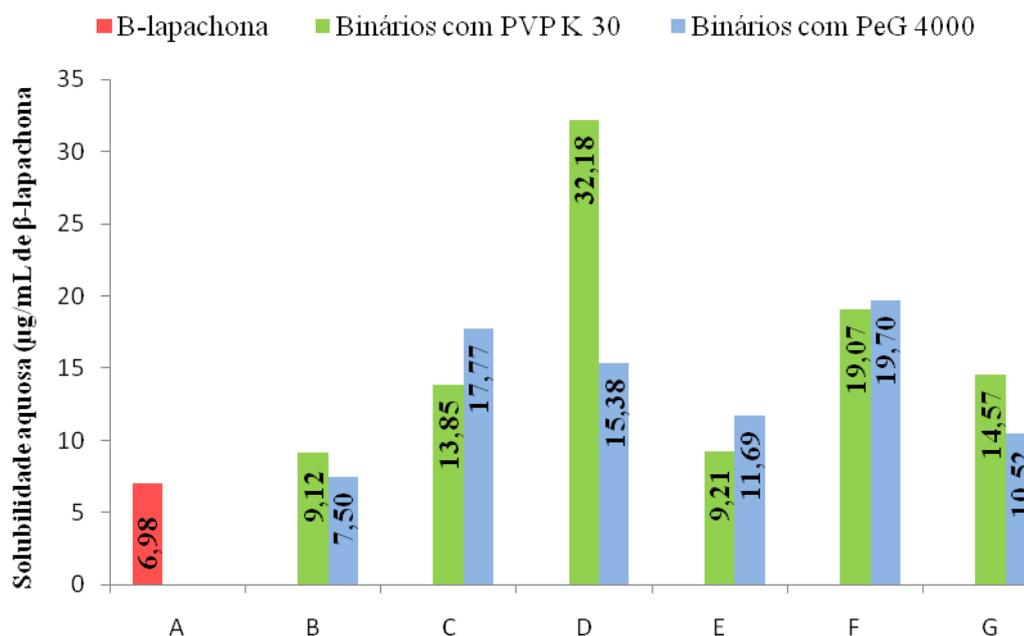
A solubilidade aquosa máxima da  $\beta$ -lapachona isolada e nos sistemas binários contendo PVP K-30 e PEG 4000 está apresentada na Figura 9. Esta solubilidade corresponde à concentração de equilíbrio na presença de quantidades em excesso do fármaco ou respectivo sistema binário não dissolvido. A solubilidade da  $\beta$ -lapachona isolada (6,98 $\mu$ g/mL) foi utilizada como referência para avaliar a influência do carreador nos demais produtos.

As misturas físicas apresentaram discreto aumento na solubilidade devido à diminuição do tamanho e revestimento das partículas de  $\beta$ -lapachona pelos polímeros hidrossolúveis.

A concentração de 30% de  $\beta$ -lapachona com PVP K-30 apresentou um resultado semelhante à da mistura física sugerindo que não há interação entre o fármaco e o polímero nesta concentração. Apesar das dispersões sólidas com 40 e 50% de  $\beta$ -lapachona com PVP K-30 apresentarem indícios de cristalinidade no DSC e difração de raios-X, houve um incremento da solubilidade que possivelmente se deu devido a um enovelamento das moléculas do fármaco pelo polímero na precipitação das partículas durante o processo de secagem do solvente, melhorando a molhabilidade e conseqüentemente a solubilidade da  $\beta$ -lapachona. O mesmo fenômeno ocorreu durante a obtenção da dispersão a 10% devido a elevada concentração de PVP K-30 com parcial perda da forma cristalina do fármaco. O aumento expressivo da solubilidade aquosa da  $\beta$ -lapachona na dispersão sólida 20% (32,18 $\mu$ g/mL) pode ser explicado como consequência da formação de uma dispersão verdadeira com interação química e física entre o polímero e o fármaco, como sugerem as análises de MEV, DSC e difração de raios-X, com ausência ou diminuição dos sinais que indicam a presença da forma cristalina da  $\beta$ -lapachona na amostra.

Os resultados da solubilidade da  $\beta$ -lapachona com PEG 4000 encontrados para todas as dispersões sugerem que houve interações entre o fármaco e o polímero, seja ela física ou química. As dispersões 30 e 50% foram beneficiadas com a formação das dispersões sólidas,

porém, conforme indicado no MEV, DSC e difração de raios-X há a presença da forma cristalina da  $\beta$ -lapachona, não havendo a formação completa de uma forma não cristalina estável. Apesar da dispersão sólida com 40% de  $\beta$ -lapachona apresentar indícios de cristalinidade no DSC e difração de raios-X, houve o maior incremento da solubilidade (19,70 $\mu$ g/mL) que possivelmente se deu devido a interações químicas e físicas formadas com um enovelamento das moléculas do fármaco pelo PEG 4000 na precipitação das partículas durante o processo de secagem do solvente, originando uma forma não cristalina prevalente, conforme foi verificado na eletromicrografia de MEV. As dispersões a 10 e 20% com PEG 4000 também tiveram um significativo incremento da solubilidade, decorrente da perda parcial da forma cristalina da  $\beta$ -lapachona.



**Figura 9.** Solubilidade em água: (A)  $\beta$ -lapachona; (B) MF 20%  $\beta$ -lapachona; (C) DS 10%  $\beta$ -lapachona, (D) DS 20%  $\beta$ -lapachona, (E) DS 30%  $\beta$ -lapachona, (F) DS 40%  $\beta$ -lapachona, (G) DS 50%  $\beta$ -lapachona.

### **Ensaio de dissolução**

Os perfis de dissolução da  $\beta$ -lapachona e dos sistemas binários com PVP K-30 e PEG 4000 em água purificada estão apresentados na Figura 10. É notório o incremento do teor dissolvido dos sistemas binários, inclusive das misturas físicas, quando comparados a matéria-prima isolada em água, independente da forma física, cristal ou pó, que ela se apresenta. Este incremento no teor dissolvido de  $\beta$ -lapachona e na velocidade de dissolução dos diferentes produtos pode ser explicado com base na redução da cristalinidade do fármaco com prevalência do estado não cristalino, menor tensão interfacial entre a  $\beta$ -lapachona e o meio de dissolução, bem como a dissolução induzida pela hidrossolubilidade dos polímeros utilizados na formação dos binários.

Os perfis de dissolução encontrados para os produtos avaliados estão em concordância com os resultados dos estudos de caracterização físico-química descrito neste trabalho, sendo a dispersão com 20% de  $\beta$ -lapachona com PVP K-30 o produto com melhor resultado, foi o único produto que atingiu mais de 80% de teor dissolvido em 60 minutos e 100% após os 120 minutos decorridos no ensaio de dissolução. Os melhores perfis para os binários com PEG 4000 foram observados para as dispersões com 20 e 40% de  $\beta$ -lapachona com teor dissolvido de acima de 80% após o tempo total do ensaio (Tabela 2).

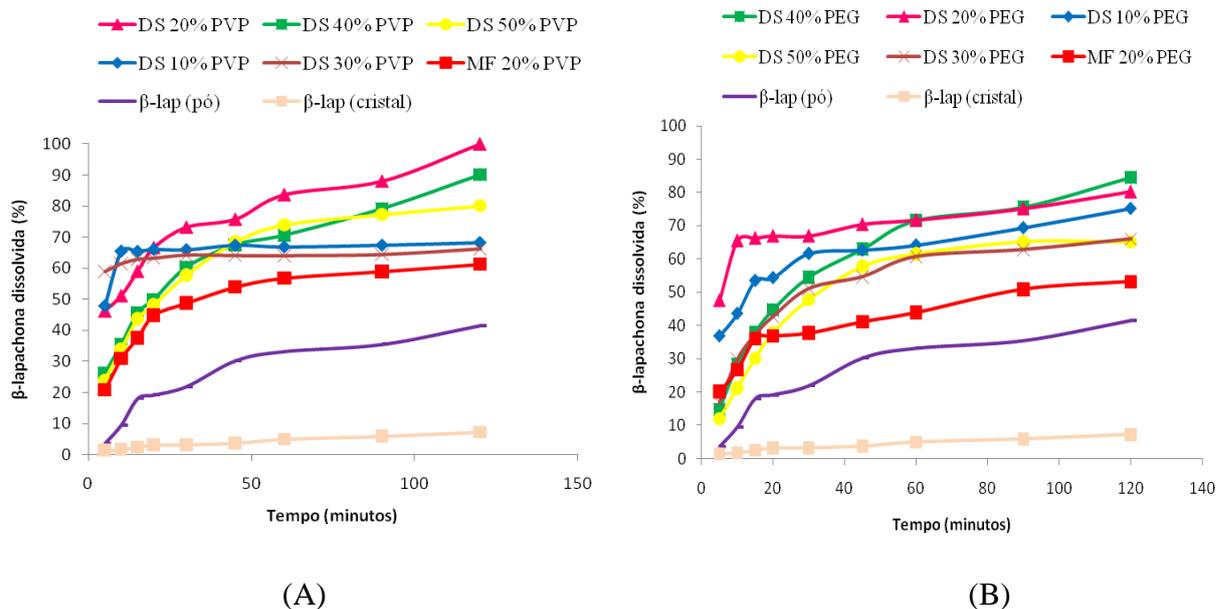


Figura 10. Perfil de dissolução da  $\beta$ -lapachona e binários com PVP K-30 (A) e PEG 4000 (B).

Tabela 2. Percentagem de  $\beta$ -lapachona dissolvido após 60, 90 e 120 minutos e eficiência de dissolução em 60 e 120 minutos obtidas a partir da  $\beta$ -lapachona isolada e dos sistemas binários com PEG 4000 e PVP K-30.

Produto	Q <sub>60min</sub>	Q <sub>90min</sub>	Q <sub>120min</sub>	ED <sub>60min</sub>	ED <sub>120min</sub>
$\beta$ -lapachona (cristal)	4,94 ± 6,54	5,88 ± 8,41	7,21 ± 6,41	3,07	4,52
$\beta$ -lapachona (pó)	33,21 ± 8,67	35,49 ± 3,10	41,56 ± 4,09	21,25	28,85
<b>PVP K-30</b>					
Mistura física	46,82 ± 3,99	58,98 ± 2,80	61,27 ± 3,30	43,83	51,42
Dispersão 10%	66,88 ± 2,13	67,42 ± 3,10	68,25 ± 0,34	62,11	64,80
Dispersão 20%	83,65 ± 9,96	88,02 ± 9,04	100,00 ± 6,54	66,65	80,46
Dispersão 30%	64,06 ± 2,42	64,43 ± 0,54	66,25 ± 1,62	60,61	62,70
Dispersão 40%	70,66 ± 3,11	79,22 ± 0,64	90,13 ± 1,66	53,48	66,64
Dispersão 50%	73,98 ± 0,73	77,34 ± 1,95	80,13 ± 0,75	52,89	65,04
<b>PEG 4000</b>					
Mistura física	43,89 ± 3,03	50,89 ± 3,25	53,18 ± 3,81	35,12	42,42
Dispersão 10%	64,23 ± 2,42	69,45 ± 2,42	75,29 ± 1,79	54,52	62,06
Dispersão 20%	71,65 ± 6,16	75,07 ± 3,11	80,19 ± 0,87	63,77	69,63
Dispersão 30%	60,66 ± 3,23	62,77 ± 6,61	65,97 ± 1,85	44,20	53,63
Dispersão 40%	71,53 ± 2,47	75,58 ± 2,33	84,56 ± 2,02	48,36	62,59
Dispersão 50%	61,49 ± 2,31	65,2 ± 2,22	65,12 ± 1,95	42,09	53,17

Cada valor de Q representa a média (%) ± coeficiente de variação. ED (%).

Os valores obtidos da eficiência de dissolução ( $ED_{60min\%}$ ) (Tabela 2) para a primeira hora de ensaio possibilitam inferir que os melhores perfis de dissolução seguem a seguinte ordem: DS 20% > DS 10% > DS 30% > DS 40% > DS 50% > MF >  $\beta$ -lapachona (pó) >  $\beta$ -lapachona (cristal), para os produtos obtidos com PVP K-30 e DS 20% > DS 10% > DS 40% > DS 30% > DS 50% > MF >  $\beta$ -lapachona (pó) >  $\beta$ -lapachona (cristal), para os produtos obtidos com PEG 4000.

O aumento dos parâmetros de percentual dissolvido e eficiência de dissolução observados nas dispersões a 10 e 30% com PVP K-30, nas dispersões a 30 e 50% com PEG 4000 e principalmente nas misturas físicas podem ser explicados principalmente pela ação solubilizante local dos polímeros que confere um aumento da solubilidade e/ou molhabilidade do fármaco e a uma rápida formação de compostos solúveis no meio de dissolução devido a interações físicas entre a molécula do polímero e do fármaco decorrente do processo de obtenção das dispersões sólidas, já que ficou comprovado pelas outras análises que o grau de cristalinidade do fármaco é elevado nestas amostras.

## **CONCLUSÃO**

Como a  $\beta$ -lapachona não possui grupamento livre doador de elétrons as interações fortes entre o ativo e os polímeros são difíceis de ocorrer, havendo com maior facilidade interações secundárias que dependem da concentração dos componentes e da estrutura química do polímero. Mesmo estas interações secundárias, teoricamente não são fáceis de ocorrerem principalmente quando utilizado o PEG devido à instabilidade intrínseca deste polímero na formação deste tipo de interação. A utilização da tecnologia de obtenção de dispersões sólidas, para proporcionar o aumento da solubilidade da  $\beta$ -lapachona, é um fato inédito no ramo científico. Os resultados obtidos indicam que o uso do PVP K-30 e PEG 4000, polímeros hidrofílicos, como carreadores, através da técnica de dispersões sólidas, melhora a

solubilidade em água da  $\beta$ -lapachona e teor dissolvido, podendo melhorar sua biodisponibilidade por reduzir o tamanho das partículas, aumentar a área superficial de contato, melhorar a molhabilidade e originar um composto com forma não cristalina. De acordo com as análises realizadas a melhor opção para a formação de uma dispersão sólida com interações químicas e físicas entre a  $\beta$ -lapachona e o PVP K-30 e alteração completa da forma cristalina do fármaco ocorreu na concentração de 20% de  $\beta$ -lapachona, o que foi confirmado através do ensaio de dissolução. Quando utilizado o PEG como carreador a concentração 20% de  $\beta$ -lapachona também foi a dispersão que apresentou melhor resultado por ter originado um composto não cristalino sem indícios de cristalinidade com o menor aporte total do produto para atingir uma determinada concentração terapêutica para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica com este composto binário.

## **REFERÊNCIAS**

1. Schaffner-Sabba K, Schmidt-Ruppin KH, Wehrli W, Schuerch AR, Wasley JW. 1984.  $\beta$ -Lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J Med Chem* 27:990-994.
2. Hooker, SC. 1936. Lomatiol. Part II. Its Occurrence, Constitution, Relation to and Conversion into Lapachol. Also a Synthesis of Lapachol. *J Am Chem Soc* 58:1181-1190.
3. Schuerch AR, Wehrli W 1978.  $\beta$ -lapachone, an Inhibitor of Oncornavirus Reverse Transcriptase and Eukaryotic DNA Polymerase- $\alpha$ . *Eur J Biochem* 84:197-205.
4. Lima OG, Albuquerque I, Lima CG, Maia MH. 1962. 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 avellanadae* Lor. ex Griseb. *Rev Inst Antibióticos Recife/UFPE* 4:3-17.
5. D’Albuquerque IL. 1968. Termorreação da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. *Rev Inst Antibióticos Recife/UFPE* 8:73-87.

6. Goncalves AM, Vasconellos ME, Docampo R, Cruz NS, Souza WR, Leon W. 1980. Evaluation of the toxicity of 3-ally-beta-lapachone against Trypanosoma cruzi bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol* 1:167–176.
7. Pahn EM, Molina MP, Stoppani AOM. 1988. Efecto de quinonas e nitrofuranos sobre Trypanosoma mega y Crithidia fasciculata. *Rev Argent Microbiol* 20:107-118.
8. Pardee AB, Li YZ, Li CJ. 2002. Cancer therapy with beta-lapachone. *Curr Cancer Drug Targets* 2:227–242.
9. Li CJ, Averboukh L, Pardee AB. 1993. Beta-lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem* 268:22463–22468.
10. Guiraud P, Steiman R, Campos-Takaki GM, Seigle-Murandi F, Simen De Buochberg M. 1994. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and beta-lapachone. *Planta Med* 60:373–374.
11. Moon D-O, Choi YH, Kim N-D, Park Y-M, Kim G-Y. 2007. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *International Immunopharmacology* 7: 506–514.
12. Planchon SM, Wuerzberger S, Frydman B, Witiak DT, Hutson P, Church DR. 1995.  $\beta$ -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. *Cancer Res* 55:3706–3711.
13. Shiah SG, Chuang SE, Chau YP, Shen SC, Kuo ML. 1999. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res* 59:391–8.
14. Tzeng H-P, Ho F-M, Chao K-F, Kuo M-L, Lin-Shiau S-Y, Liu S-H. 2003.  $\beta$ -Lapachone Reduces Endotoxin-induced Macrophage Activation and Lung Edema and Mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 168:85–91.
15. Li YZ, Li CJ, Pinto AV, Pardee AB. 1999. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. *Mol Med* 5:232–239.

16. Chau YP, Shiah SG, Don MJ, Kuo ML. 1998. Involvement of hydrogen peroxide peroxide in topoisomerase inhibitor  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radic Biol Med* 24:660–670.
17. Boothman DA, Greer S, Pardee AB. 1987. Potentiation of halogenated pyrimidine radiosensitizers in human carcinoma cells by beta-lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione), a novel DNA repair inhibitor. *Cancer Res* 47:5361–5366.
18. Boothman DA, Trask DK, Pardee AB. 1989. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by  $\beta$ -lapachone, an activator of Topoisomerase I. *Cancer Res* 49:605-612.
19. Lai CC, Liu TJ, Ho LK, Don MJ, Chau YP. 1998. Beta-Lapachone induced cell death in human hepatoma (HepA2) cells. *Histol Histopathol* 13:89–97.
20. Li CJ, Li YZ, Pinto AV, Pardee AB. 1999. Potent inhibition of tumor survival in vivo by B-lapachone plus Taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13369–13374.
21. Don MJ, Chang YH, Chen KK, Ho LK, Chau YP 2001. Induction of CDK Inhibitors (p21WAF1 and p27Kip1) and Bak in the  $\beta$ -Lapachone-Induced Apoptosis of Human Prostate Cancer Cells. *Mol Pharmacol* 59:784–794.
22. Frydman B, Marton LJ, Sun JS, Nader K, Witiak DT, Liu AA, Wang HM, Mao Y, Wu HY, Sanders MM, Liu LF 1997. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by beta-lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Res* 57:620–627.
23. Krishnan P, Bastow KF. 2001. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives alaphapachone and beta-lapachone. *Cancer Chemother Pharmacol* 47:187–198.
24. Liu SH, Tzeng HP, Kuo ML, Lin-Shiau SY. 1999. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by  $\beta$ -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. *Br J Pharmacol* 126:746–750.
25. Klim EJ, Ji I-M, Ahn K-J, Choi EK, Park H-J, Lim BU, Song CW, Park HJ. 2005. Synergistic Effect of Ionizing Radiation and  $\beta$ -lapachone against RKO Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res Treat.* 37(3):183-190.

26. Boorstein RJ, Pardee AB 1983. Coordinate inhibition of DNA synthesis and thymidylate synthase activity following DNA damage and repair. *Biochem Biophys Res Commun* 117:30–36.
27. Bey EA, Bentle MS, Reinicke KE, Dong Y, Yang CR, Girard L, Minna JD, Bornmann WG, Gao J, Boothman DA. 2007. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by  $\beta$ -lapachone. *PNAS* 104(28):11832-11837.
28. Boothman DA, Pardee AB. 1989. Inhibition of radiation-induced neoplastic transformation by beta-lapachone. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4963–4967.
29. Presmich GMA, Rolim LA, Medeiros FPM, Albuquerque MM, Rolim Neto PJ. 2009. Cápsulas gelatinosas à base de  $\beta$ -lapachona para terapias antineoplásicas. *Lat. Am. J. Pharm.* (Artigo aceito em fase de correção)
30. Alves GMC, Rolim LA, Leite ACL, Brondani DJ, Medeiros FPM, Bieber LW, Mendonça Júnior FJB, Rolim Neto PJ. 2008. Purificação e Caracterização da  $\beta$ -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. *Quím Nova* 31(2):413-416.
31. Chiou W, Reigelman S. 1971. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J Pharm Sci* 60:1281–1302.
32. Sekiguchi K, Obi N. 1961. Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man. *Chem Pharm Bull* 9:866–872.
33. Serajuddin ATM. 1999. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J Pharm Sci* 88:1058–1066.
34. Leuner C, Dressman J. 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Euro J of Pharm and Biopharm* 50:47-60.
35. Li-Ping Ruan, Bo-Yang Yu, Guang-Miao Fu, Dan-ni Zhu. 2005. Improving the solubility of ampelopsin by solid dispersions and inclusion complexes. *J of Pharm and Biom Analy* 38:457–464.
36. Tantishaiyakul V, Kaewnopparat N, Ingkatawornwong S. 1999. Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone. *J Pharm* 181:143–151.

37. Van dem Mooter G, Wuyts M, Blaton N, Busson R, Grobet P, Augustijns P, Kinget R. 2001. Physical stabilisation of amorphous ketoconazole in solid dispersions with polyvinylpyrrolidone K25. *Eur J Pharm Sci* 12:261–269.
38. Hasegawa S, Hamaura T, Furuyama N, Kusai A, Yonemochi E, Terada K. 2005. Effects of water content in physical mixture and heating temperature on crystallinity of troglitazone-PVP K30 solid dispersions prepared by closed melting method *Inter J of Pharm* 302:103–112
39. Franco M, Trapani G, Latrofa A, Tullio C, Provenzano MR, Serra M, Muggironi M, Biggio G, Liso G. 2001. Dissolution properties and anticonvulsant activity of phenytoin-polyethylene glycol 6000 and polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions. *Inter J of Pharma*. 225: 63–73.
40. Guyot M, Fawaz F, Bildet J, Bonini F, Laguény AM. 1995. Physicochemical characterisation and dissolution of norfloxacin/cyclo-dextrin inclusion compounds and PEG solid dispersions. *Int J Pharm*. 123: 53–63.
41. Kanaze FI, Kokkalou E, Niopas I, Georgarakis M, Stergiou A, Bikiaris D. 2006. Novel drug delivery systems for flavonoid compounds with enhanced solubility based on solid dispersions with polyvinylpyrrolidone and polyethyleneglycol. *J Appl Polym Sci* 102: 460–471.
42. Vasanthavada M, Tong WQ, Kislalioglu MS. 2005. Phase behaviour of amorphous molecular dispersions. II. Role of hydrogen bonding in solid solubility and phase separation kinetics. *Pharm Res* 22: 440–448.
43. Karavas E, Georgarakis M, Docoslis A, Bikiaris D. 2007. Combining SEM, TEM, and micro-Raman techniques to differentiate between the amorphous molecular level dispersions and nanodispersions of a poorly water-soluble drug within a polymer matrix. *Inter J of Pharm*. 340:76–83
44. Karavas E, Georgarakis E, Bikiaris D. 2006b. Felodipine nanodispersions as active core for predictable pulsatile chronotherapeutics using PVP/HPMC blends as coating layer. *Int J Pharm* 313:189–197.

45. Zhang X, Sun N, Wu B, Lu Y, Tianzheng G, Wu W. 2008. Physical characterization of lansoprazole/PVP solid dispersion prepared by fluid-bed coating technique. *Powd Technol.* 182:480–485.
46. Sun N, Wei X, Wu B, Chen J, Lu Y, Wu W. 2007. Enhanced dissolution of silymarin/polyvinylpyrrolidone solid dispersion pellets prepared by a onestep fluid-bed coating technique. *Powd Tech.* 179:196–204.
47. Joshi SS, Mebel AM. 2007. Computational modeling of biodegradable blends of starch amylose and poly-propylene carbonate. *Polymer* 48(13):3893-3901
48. Presmich GMA, Rolim LA, Cavalcanti ORBR, Silva KER, Rolim-Neto PJ. 2009. Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação da  $\beta$ -lapachona por espectrofotometria no ultravioleta. (Aceito para publicação na revista *Latin American Journal of Pharmacy*).
49. US Department of Health and Human Services. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, August 1997. Available at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/1713bp1.pdf>. Accessed: Juny, 2009.
50. United States Pharmacopeia Convention Validation of Compendial Methods. In: *US Pharmacopeia*, 29. ed., Rockville, 2006. cap. 1225
51. Khan, KA. 1975. The concept of dissolution efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.* 28: 48-49.
52. Teberkidis V, Sigalas MP. 2007. Theoretical study of hydrogen Bond interactions of felodipine with polyvinylpyrrolidone and polyethyleneglycol. *J of Molec Struct: Theochem.* 803:29-38.
53. Matsumoto T, Zografi G. 1999. Physical Properties of Solid Molecular Dispersions of Indomethacin with Poly(vinylpyrrolidone) and Poly(vinylpyrrolidone-co-vinyl-acetate) in Relation to Indomethacin Crystallization. *Pharm Res.* 16(11):1722 -1728.
54. Van den Mooter G, Augustijns P, Blaton N, Kinget R. 1998. Physicochemical characterization of solid dispersions of temazepam with polyethylene glycol 6000 and PVPK30. *Int J Pharm.* 164: 67–80.

55. Wang, W., Yang, X., Fang, Y., Ding, J., Yan, J. 2009. Preparation and thermal properties of polyethylene glycol/expanded graphite blends for energy storage. *Applied Energy*. 86: 1479–1483.
56. Craig DQM, Newton JM. 1991. Characterisation of polyethylene glycols using differential scanning calorimetry. *Int J Pharm*. 74: 33-41.
57. Damian F, Blaton N, Naesens L, Balzarini J, Kinget R, Augustijns P, Van den Mooter G. 2000. Physicochemical characterization of solid dispersions of the antiviral agent UC-781 with polyethylene glycol 6000 and Gelucire 44/14. *Eur. J. Pharm. Sci*. 10: 311–322.
58. Ahuja N, Katare OP, Singh. B. 2007. Studies on dissolution enhancement and mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water-soluble carriers. *Eur J of Pharm and Biopharm* 65: 26–38.

*Artigo V*

**Caracterização físico-química dos complexos de  
inclusão desenvolvidos com  
 $\beta$ -lapachona e  $\beta$ -ciclodextrinas natural e  
quimicamente modificadas**

**(Submetido para publicação na Revista International Journal of Pharmaceutics)**

## CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DESENVOLVIDOS COM $\beta$ -LAPACHONA E $\beta$ -CICLODEXTRINAS NATURAL E QUIMICAMENTE MODIFICADAS

### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização das propriedades físico-químicas de complexos de inclusão de  $\beta$ -lapachona com as ciclodextrina  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD no estado sólido. Os complexos de inclusão foram preparados pelas técnicas de malaxagem, co-evaporação e secagem por atomização, utilizando uma estequiométrica de 1:1 (mol:mol) definida no ensaio de solubilidade de fases realizado em água purificada. Uma mistura física na mesma proporção estequiométrica foi obtida para a avaliação das interações ocorridas entre a  $\beta$ -lapachona e as ciclodextrinas em um estudo comparativo. Foi comprovada através das análises de caracterização físico-química, a perda da forma cristalina da  $\beta$ -lapachona nos complexos obtidos por secagem por pulverização com todas as ciclodextrinas estudadas, além dos complexos co-evaporados com HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD. O incremento no teor dissolvido de  $\beta$ -lapachona mais acentuado foi observado no composto obtido por secagem por atomização com HP $\beta$ CD, atingindo praticamente 100% de teor dissolvido após o término do ensaio realizado.

**Palavras-Chave:**  $\beta$ -lapachona; Complexo de Inclusão;  $\beta$ -ciclodextrina; Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, Metil- $\beta$ -ciclodextrina.

### INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -lapachona ( $C_{15}H_{14}O_3$ , MM 242,3) é uma ortonaftoquinona, obtida com pequeno rendimento dos extratos alcoólicos e acetônicos da *Tabebuia avellanedae* Lor, popularmente conhecida como ipê roxo. Outra via de obtenção mais eficaz por obter um maior rendimento é

sua semissíntese a partir da hidrólise ácida do seu isômero lapachol, encontrado de forma mais abundante na natureza [1-5].

Através de pesquisas *in vitro* e *in vivo* foi comprovado que a  $\beta$ -lapachona apresenta diversas propriedades farmacológicas como antiinflamatória, antiviral, antiparasitária, antifúngica e em particular um excelente potencial antineoplásico. A maioria destas atividades está ligada à capacidade de formação de espécies reativas de oxigênio [6-14]. Diferentes estudos em ratos albinos, camundongos e culturas de células comprovam a excelente atividade antineoplásica da  $\beta$ -lapachona, principalmente para as linhagens de câncer refratárias aos tratamentos convencionais, como o câncer de próstata, mama, ovário, leucemias e colón agindo por um mecanismo diferente dos apresentados por drogas antineoplásicas utilizadas em esquemas terapêuticos atuais [15-21].

O primeiro alvo intracelular da  $\beta$ -lapachona em células tumorais definido foi devido a sua bioativação pela expressão da enzima NAD(H):quinonaoxidoreductase (NQO1), que atua ativando a cisteína protease. Sabe-se que ela inibe a transcriptase reversa e a DNA topoisomerase I e II impedindo a replicação de células cancerosas 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  $\beta$ -lapachona com a DNA topoisomerase no lugar da estabilização de um complexo [22-26].

Apesar de todas as comprovações de seu excelente potencial antineoplásico, através dos estudos já divulgados a natureza lipofílica da  $\beta$ -lapachona é responsável por sua baixa solubilidade na água e compostos polares, tornando-se facilmente solúvel em compostos apolares e oleosos, característica que dificulta o desenvolvimento farmacotécnico industrial [27,28]. Com o intuito de melhorar o teor de dissolução da  $\beta$ -lapachona o presente trabalho vem mostrar o desenvolvimento de complexos de inclusão com ciclodextrinas.

As Ciclodextrinas são moléculas hospedeiras típicas obtidas da hidrólise enzimática do amido que resulta em oligossacarídeos cíclicos constituídos por várias unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose (glicose) unidas por ligações  $\alpha$ -(1,4) [29,30]. Devido à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas por causa da conformação em cadeia das unidades de glicose, as ciclodextrinas apresentam uma forma peculiar tronco-cônica formando um microambiente heterogêneo com características hidrófilas em sua superfície externa e cavidade central hidrófoba, decorrente da densidade eletrônica relativamente elevada [31-35]. Esta estrutura molecular permite a inclusão completa ou parcial de fármacos apolares, designados de moléculas hóspedes, em sua cavidade central, com formação de complexos de inclusão fármaco/ciclodextrina, sem o estabelecimento de ligações covalentes, que originam determinadas modificações nas propriedades físicas, químicas e biológicas da molécula incluída, melhorando a dissolução em meio aquoso de compostos de baixa solubilidade [29-38].

Para a obtenção dos complexos de inclusão com a  $\beta$ -lapachona as ciclodextrinas utilizadas neste trabalho foram  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) e a 2-O-metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) por diferentes técnicas de obtenção.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Substâncias e Reagentes**

As ciclodextrinas  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD; Kleptose<sup>®</sup>, MM = 1135), 2-Hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD; Kleptose<sup>®</sup>HP, MM = 1390) e 2-O-Metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD; CRYSMEB<sup>®</sup>, MM = 1190 e DS = 0,5) foram gentilmente doadas pela Roquette<sup>®</sup> (Lestrem, França). A  $\beta$ -lapachona ( $\beta$ -lap; lote: 103; MM = 242,3) utilizada foi produzida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Pernambuco, Brasil). Como solventes foram utilizados álcool etílico absoluto da Merck<sup>®</sup> (Portugal) e água

purificada pelo sistema de osmose reversa. Todos os reagentes (produtos químicos e solventes) foram de qualidade analítica.

### **Determinação da constante de estabilidade aparente ( $K_s$ )**

O estudo de solubilidade de fases para a determinação da constante de estabilidade aparente e estequiometria ideal de complexação da  $\beta$ -lap com cada ciclodextrina foi realizado de acordo com o método de Higuchi e Connors [39].

Um excesso de  $\beta$ -lap (aproximadamente 20 mM) foi adicionado em soluções aquosas contendo concentrações crescentes das ciclodextrinas ( $\beta$ CD 0 a 24 mM; HP $\beta$ CD 0 a 200 mM e M $\beta$ CD 0 a 50 mM). As suspensões obtidas foram submetidas à agitação constante em agitador oscilante, protegidas da luz, à 25°C durante 14 dias, com posterior repouso de 24 h para que fosse estabelecido o equilíbrio dinâmico. As amostras foram filtradas através de filtros de nylon 0,45  $\mu$ m (Millipore<sup>®</sup> HA) e volumetricamente diluídas. A quantificação foi feita por espectrofotometria de ultravioleta com comprimento de onda de 256 nm e sistema de solventes álcool etílico:água purificada (60:40, v/v), seguindo metodologia validada anteriormente pelo nosso grupo (Shimadzu<sup>®</sup> UV-1603, Japão) [40].

As constantes de estabilidade ( $K_s$ ) dos complexos de inclusão foram calculadas a partir da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados da porção linear das curvas dos diagramas de solubilidade de fases de cada ciclodextrina, utilizando a equação (1):

$$K_s = \text{Declive} / S_0 (1 - \text{Declive}) \quad (1)$$

Onde  $S_0$  representa a solubilidade da  $\beta$ -lap na ausência de ciclodextrina.

Foi realizado um estudo comparativo para verificar a influência das ciclodextrinas na absorbância obtida nas amostras. Foram feitas leituras usando como branco para zerar o

equipamento o sistema de solvente preconizado pelo método analítico, álcool etílico:água purifica (60:40), e leituras usando um sistema onde a fase aquosa foi composta por uma solução da ciclodextrina em análise. As soluções das ciclodextrinas foram manipuladas com as maiores concentrações utilizadas no estudo de solubilidade de fases. Os experimentos foram realizados em triplicata de amostras e os dados foram tratados por análise de variância one-way com  $p < 0,05$ .

### **Obtenção dos sistemas sólidos binários de $\beta$ -lap:ciclodextrinas**

Os sistemas sólidos binários de  $\beta$ -lap: $\beta$ CD,  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD foram preparados com relação molar de 1:1, de acordo com o resultado do estudo de solubilidade de fases, utilizando três métodos distintos: malaxagem, co-evaporação e secagem por atomização. Foram preparadas misturas físicas de cada binário para o efeito de comparação.

### **Preparação das Misturas Físicas (MF)**

Foram preparadas misturas físicas da  $\beta$ -lap com as três ciclodextrinas contendo quantidades estequiométricas de 1:1 (mol:mol), exatamente pesadas. O método de diluição geométrica foi utilizado de forma a garantir a homogeneidade do produto, manipulado em almofariz de porcelana com o auxílio de um pistilo, com posterior tamisação em malha de 200  $\mu$ m para uniformização do tamanho das partículas. As misturas físicas foram acondicionadas em frascos ampolas protegidas da luz.

### **Preparação por Malaxagem (ML)**

Os binários malaxados foram preparados em almofariz com o auxílio de um pistilo a partir de misturas físicas equimolares da  $\beta$ -lap com cada ciclodextrina pela adição de pequenos volumes de uma solução álcool etílico:água (1:2, v/v) sob trituração contínua para

obtenção de uma pasta. Esta pasta foi malaxada durante 60 minutos sempre com a adição da solução hidroalcoólica na quantidade equivalente a 30% do peso dos pós para manter a consistência pastosa. Após o tempo de malaxagem os produtos foram colocados em estufa à 40°C por 36 horas para secagem. Depois de secos foram tamisados em malha de 200  $\mu$ m e acondicionados em frascos ampolas protegidos da luz.

### **Preparação por Co-evaporação (CE)**

Quantidades equimolares de  $\beta$ -lap e das ciclodextrinas foram pesadas e solubilizadas separadamente sob agitação mecânica. A  $\beta$ -lap foi solubilizada em álcool etílico e as ciclodextrinas foram solubilizadas em água purificada. Após completa solubilização dos compostos as soluções alcoólicas de  $\beta$ -lap foram vertidas nas soluções aquosa das ciclodextrinas, sob agitação mecânica. As soluções hidroalcoólicas de fármaco:ciclodextrina foram deixadas em agitador oscilante durante 24h antes de serem submetida à evaporação sob pressão reduzida ( $-800 \pm 20$  mbar) a  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  em evaporador rotativo (Heidolph-Laborota 4001). Após a evaporação dos solventes os produtos foram colocados em estufa à 40°C por 36 horas para secagem. Depois de secos foram tamisados em malha de 200  $\mu$ m e acondicionados em frascos ampolas protegidos da luz.

### **Preparação por Secagem por Atomização – *Spray-drying* (SD)**

Quantidades equimolares de  $\beta$ -lap e das cilcodextrinas foram pesadas e solubilizadas separadamente sob agitação mecânica. A  $\beta$ -lap foi solubilizada em álcool etílico e as ciclodextrinas foram solubilizadas em água purificada. Após completa solubilização dos compostos as soluções alcoólicas de  $\beta$ -lap foram vertidas nas soluções aquosa das ciclodextrinas, sob agitação mecânica. As soluções hidroalcoólicas de fármaco:ciclodextrina foram deixadas em agitador oscilante durante 24h antes de serem secas por atomização em

*spray drier* (LabPlant SD-O5). As soluções obtidas foram secas por atomização nas seguintes condições: temperatura de entrada de 145°C, temperatura de saída de  $80 \pm 5^\circ\text{C}$ , velocidade do fluxo de ar de 40 - 50  $\text{m}^3/\text{h}$ , velocidade do fluxo da solução de 400 mL/h e pressão de ar de atomização de  $1,1 \pm 2$  bar. Os sólidos resultantes foram tamisados em malha de 200  $\mu\text{m}$  e acondicionados em frascos ampolas protegidos da luz.

## **CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS SÓLIDOS BINÁRIOS**

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As amostras dos compostos isolados ( $\beta$ -lap,  $\beta\text{CD}$ ,  $\text{HP}\beta\text{CD}$  e  $\text{M}\beta\text{CD}$ ), misturas físicas e complexos de inclusão foram montadas em stub, fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 5 minutos (Metalizador Desk II/Denton Vacuum). A morfologia das amostras foi verificada em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol<sup>®</sup> 5600 LV, onde foram obtidas as eletromicrografias. As tensões de excitação e fatores de aumento, respectivamente, foram:  $\beta$ -lap 10KV e 20x,  $\beta\text{CD}$  6KV e 80x, compostos binários com  $\beta\text{CD}$  6KV e 1.400 a 1.500x,  $\text{HP}\beta\text{CD}$  10KV e 500x, compostos binários com  $\text{HP}\beta\text{CD}$  10KV e 140x, 2.000 a 3.000x,  $\text{M}\beta\text{CD}$  30KV e 550x, compostos binários com  $\text{M}\beta\text{CD}$  30KV e 430x, 1.000 a 1.200x.

### **Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As curvas de DSC dos compostos isolados e sistemas binários da  $\beta$ -lap:ciclodextrinas foram obtidas em Calorímetro de Varredura Shimadzu<sup>®</sup> DSC-50 interligado ao software Shimadzu<sup>®</sup> TA-60WS/TA-50WS (Kyoto, Japão) com atmosfera de nitrogênio de  $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , numa faixa de temperatura de 25 -  $200^\circ\text{C}$ . As amostras foram colocadas em células de alumínio hermeticamente fechadas com massa de  $2 \text{ mg} \pm 0,2$ .

Foi utilizado Índio (99.98%, mp 156.65°C, Aldrich<sup>®</sup>, Milwaukee, USA) para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

### **Difração de Raios X**

Os difratogramas de raios-X dos produtos isolados e binários foram obtidos num difratômetro SIEMENS (X-Ray Diffractometer, D-5000), equipado com anodo de cobre. As amostras foram analisadas no intervalo de ângulo  $2\theta$  de 5-50°.

### **Espectroscopia vibracional no Infravermelho (FTIR)**

Os espectros de FTIR foram obtidos em um espectrômetro Burker FT-IR / IFS 66. As amostras foram preparadas na concentração de 1% em pastilhas de KBr. A região espectral estudada foi de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **Determinação da solubilidade aquosa**

Para a determinação da solubilidade aquosa quantidades em excesso da  $\beta$ -lapachona matéria-prima, misturas físicas e complexos de inclusão foram colocadas em frascos âmbar hermeticamente fechados contendo 5 mL de água purificada. Após 48h de agitação ininterruptamente com temperatura controlada ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) (Banho Maria Agitador Dubnoff 304/D) as suspensões obtidas foram deixadas em repouso por 1h, para favorecer o equilíbrio da suspensão, antes de serem filtradas em filtro de 0,45 $\mu\text{m}$ . O teor de  $\beta$ -lapachona solubilizada foi quantificado através da metodologia descrita na literatura de doseamento por espectrofotômetro com absorção em ultravioleta em  $\lambda=256\text{nm}$ . (Espectrômetro Varian<sup>®</sup>, Unity plus-300MHz) [40].

## Ensaio de dissolução

O comportamento de dissolução dos diferentes sistemas binários contendo  $\beta$ -lapachona foi avaliado pelos perfis de dissolução *in vitro* realizados em dissolutor Varian VK 7010 de acordo as especificações do FDA (Food and Drug Administration) para drogas pouco solúveis utilizando o método preconizado pela Farmacopéia Americana. [41, 42].

Os ensaios de dissolução decorreram a uma velocidade de 75 rpm, com aparato 2 (pá), temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C, utilizando 900 mL da água purificada como meio de dissolução. Foi realizado também um estudo de dissolução com a  $\beta$ -lapachona matéria-prima na forma de cristais e pó pulverizado e atomizado nas mesmas condições dos produtos binários para serem utilizados como parâmetros comparativos de incremento de solubilidade do fármaco.

A quantidade da amostra foi o equivalente a 25 mg de  $\beta$ -lapachona da matéria-prima, misturas físicas e dispersões sólidas, mantendo as condições sink do estudo. Alíquotas foram coletadas nos intervalos de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, filtradas em filtro de membrana 0,45  $\mu$ m e devidamente diluídas para quantificação do teor dissolvido de  $\beta$ -lapachona por espectroscopia no UV a 256 nm utilizando metodologia anteriormente validada (Espectrômetro Varian<sup>®</sup>, Unity plus-300MHz) [40]. Foi efetuada a reposição do meio de dissolução com o mesmo volume retirado em cada tempo. Todos os ensaios foram efetuados em quadruplicata.

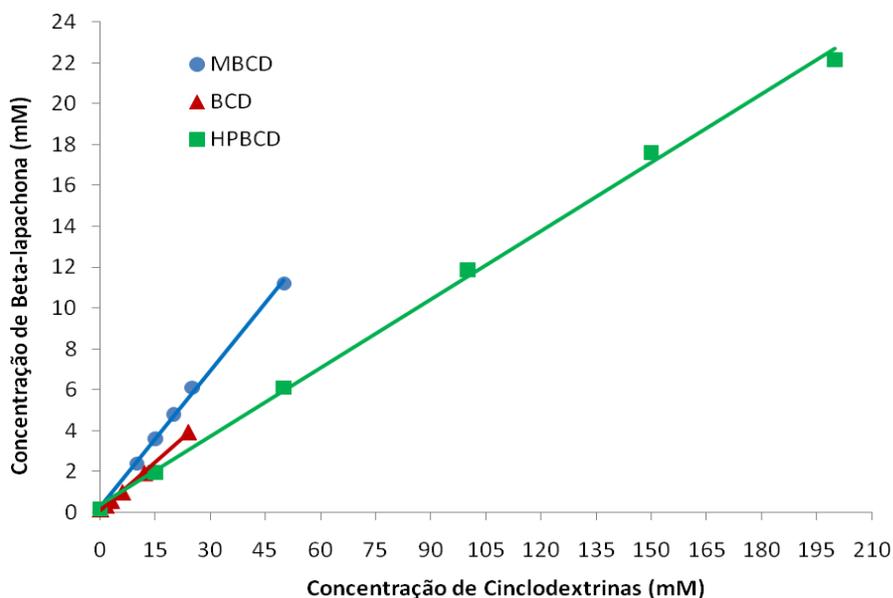
Os perfis de dissolução foram avaliados e comparados em relação à percentagem de fármaco dissolvido em 60, 90 e 120 minutos ( $Q_{60min}$ ,  $Q_{90min}$  e  $Q_{120min}$ ) e à eficiência de dissolução aos 60 e 120 min ( $ED_{60min}$  e  $ED_{120min}$ ) calculada a partir da área sob a curva de dissolução do produto no intervalo de tempo compreendido entre zero e 60 minutos ( $ASC_{0-60minutos}$ ) e zero e 120 minutos ( $ASC_{0-120minutos}$ ), de acordo com o método de Khan. A determinação da ED permite avaliar não apenas a quantidade de fármaco liberada no meio de

dissolução após determinado tempo, mas a própria cinética de liberação ao longo de todo o tempo em questão [43].

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação da constante de estabilidade aparente ( $K_s$ )

De acordo com os resultados do ensaio de solubilidade de fases, representados na Figura 1, foi possível verificar os efeitos das ciclodextrinas utilizadas na solubilidade aquosa da  $\beta$ -lap (0,154 mM). O incremento da solubilidade da  $\beta$ -lap foi completamente dependente do tipo de ciclodextrina, porém, em todos os casos, esta solubilidade aumentou linearmente em função da concentração de ciclodextrina ao longo do intervalo de concentração estudado com declives inferiores a 1 (Tabela 1). Desta forma, foi possível admitir um perfil linear, com curvas tipo  $A_L$ , para as três ciclodextrinas utilizadas, admitindo uma estequiometria de 1:1 (mol:mol), fármaco-CD, para a obtenção dos complexos de inclusão [39].



**Figura 1.** Diagrama de solubilidade de fases dos sistemas  $\beta$ -lap:  $\beta$ CD,  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD em água purificada.

Com base nos diagramas de solubilidade obtidos foram estimados também os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e as constantes de estabilidade ( $K_s$ ) (Tabela 1). Os valores de  $K_s$  calculado para os complexos  $\beta$ -lap:  $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD estão de acordo com os resultados informados na literatura [44-46]. A magnitude da constante  $K_s$  varia geralmente entre 0 e  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , onde, quanto maior este valor mais estável é a formação do complexo [46-48].

**Tabela 1.** Constantes de Estabilidade.

<b>Ciclodextrina</b>	<b>Declive</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>K_s</math> (<math>\text{mol}^{-1}</math>)</b>
$\beta$ CD	0,1345	0,9987	1008,91
HP $\beta$ CD	0,1115	0,9982	814,73
M $\beta$ CD	0,2214	0,9980	1846,12

A M $\beta$ DC, na forma não randomizada, ainda não tinha sido avaliada em estudos anteriores e apresentou uma constante de estabilidade quase 2 vezes maior do que os outros complexos, sugerindo uma maior afinidade de complexação desta ciclodextrina com a  $\beta$ -lap provavelmente devido a presença dos grupos metila que proporciona um prolongamento da região hidrofóbica da cavidade da ciclodextrina, favorecendo a inclusão da molécula do fármaco [49]. Um efeito semelhante ocorre também com a M $\beta$ DC randomizada [44].

Ficou comprovado pelo estudo comparativo realizado com as soluções de branco utilizadas para zerar o equipamento que não há interferência significativa das ciclodextrinas, no intervalo de confiança avaliado, na quantificação da  $\beta$ -lap por espectrofotometria no UV no comprimento de onda especificado para as amostras do estudo de solubilidade de fases.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise de MEV apresenta uma grande importância por evidenciar a ocorrência de complexação através da morfologia dos binários, explicando o comportamento de melhora da solubilidade e teor dissolvido por correlação entre a estrutura morfológica e tamanho de partícula. As eletromicrografias dos produtos isolados e seus binários estão apresentadas na Figura 2.

A  $\beta$ -lapachona apresenta-se na forma cristalina, visível macroscopicamente, com cristais aciculares bem definidos de tamanho regular. As partículas de  $\beta$ CD apresentam uma forma poliédrica, com superfícies planas e tamanho considerável, enquanto que a HP $\beta$ CD e a M $\beta$ CD apresentam-se como compostos de partículas esféricas, com superfícies lisas, relativamente ocas com caráter não cristalino.

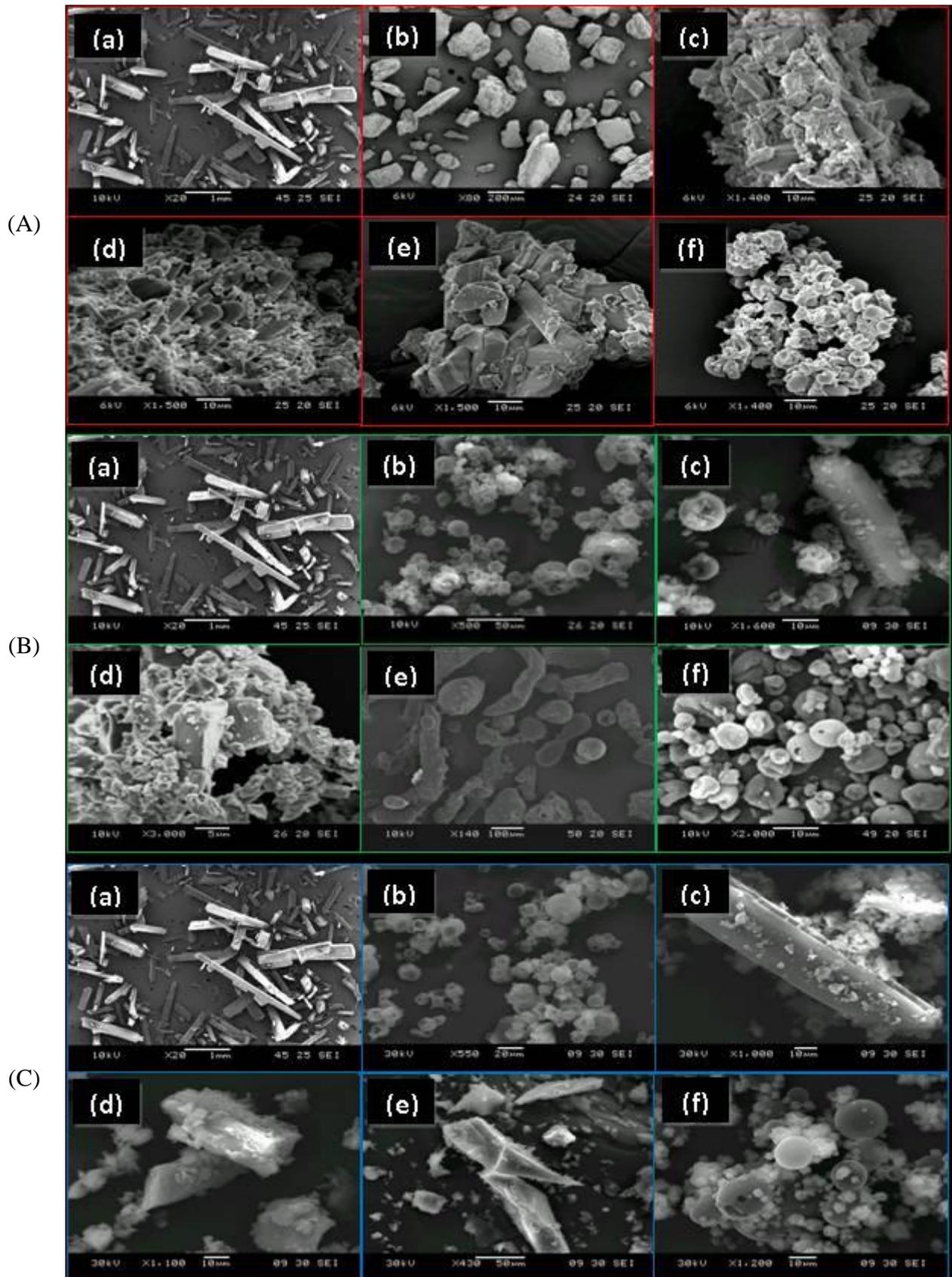
As eletromicrografias das misturas físicas com as três ciclodextrinas demonstraram que houve uma redução no tamanho das partículas com conservação das propriedades físicas dos compostos, sendo de fácil identificação cristais de  $\beta$ -lapachona misturados as ciclodextrinas ou com partículas das ciclodextrinas adsorvidas em seus cristais, não havendo interações entre o fármaco e as ciclodextrinas no estado sólido.

Nos complexos de  $\beta$ -lap: $\beta$ CD obtidos pelos processos de malaxagem e co-evaporação houve a formação de um produto denso com cristais de  $\beta$ -lapachona enovelados por partículas da ciclodextrina, indicando uma baixa eficiência por interação química entre fármaco-CD no processo de complexação. Os cristais de  $\beta$ -lapachona também foram visíveis nos complexos malaxados com HP $\beta$ CD e de forma menos evidente com a M $\beta$ CD. Porém, nestes casos houve uma significativa alteração morfológica nas características das ciclodextrinas que perderam, após o processo de malaxagem, suas formas esféricas surgindo com estruturas tridimensionais pseudolaminares e irregulares. Mesmo assim, não é possível afirmar se houve algum tipo de interação entre as ciclodextrinas e o fármaco, pois há relatos na literatura que o processo de

malaxagem pode resultar em modificações nas ciclodextrinas semelhantes ao observado em nosso estudo [50].

Observou-se uma alteração considerável na morfologia geral do sistema obtido por co-*evaporação* com a HP $\beta$ CD, com redução no tamanho das partículas. Esta técnica originou um produto de aparência peculiar lombricóide sem vestígios das características individuais dos produtos de partida demonstrando a existência de uma nova e única fase sólida, com consequente possível formação de complexos de inclusão. O binário  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD, obtido pela mesma técnica, também demonstrou possível formação de complexos de inclusão já que não foi evidenciada a morfologia original da ciclodextrina nem da  $\beta$ -lapachona apresentando-se como raspas de produto.

Os binários secos por atomização com as três ciclodextrinas originaram produtos heterogêneos de aparência não cristalina com a presença de partículas na forma tipicamente esférica, completamente diferentes das partículas isoladas dos compostos iniciais, com elevada tendência para aglomeração e tamanho reduzido, não sendo possível a diferenciação entre as ciclodextrinas e o fármaco. Estas características indicam a existência de uma nova fase sólida devido às possíveis interações químicas ocorridas entre fármaco e as ciclodextrinas originando os complexos de inclusão.



**Figura 2.** Eletromicrografias de MEV. (A) Binários com  $\beta$ CD, (B) Binários com HP $\beta$ CD e (C) Binários com M $\beta$ CD: (a)  $\beta$ -lapachona (b) Ciclodextrinas, (c) Mistura física, (d) Malaxado, (e) Co-evaporado e (f) *Spray-drying*.

### **Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Os perfis térmicos dos produtos isolados e sistemas binários da  $\beta$ -lapachona,  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD estão representados na Figura 3.

O termograma da  $\beta$ -lapachona isolada apresentou características típicas de um produto anidro no estado cristalino com alto grau de pureza. O pico endotérmico bem definido decorrente do processo de fusão do princípio ativo com temperatura de fusão em 156,46°C e elevada energia desprendida, está de acordo com a literatura [27]. As curvas de DSC das ciclodextrinas isoladas,  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD, apresentaram fenômenos endotérmicos alargados em torno de 50°C e 125°C, associados à perda de cristais de água das moléculas.

As curvas das misturas físicas para as três ciclodextrinas apresentaram um somatório dos eventos encontrados nos termogramas dos compostos isolados, com pico de fusão característico da  $\beta$ -lapachona bem definido e picos referentes ao fenômeno de desidratação das ciclodextrinas, sugerindo que não há formação de complexos de inclusão estáveis nestes binários uma vez que o fármaco manteve sua cristalinidade original, o que foi verificado anteriormente através das análises de MEV.

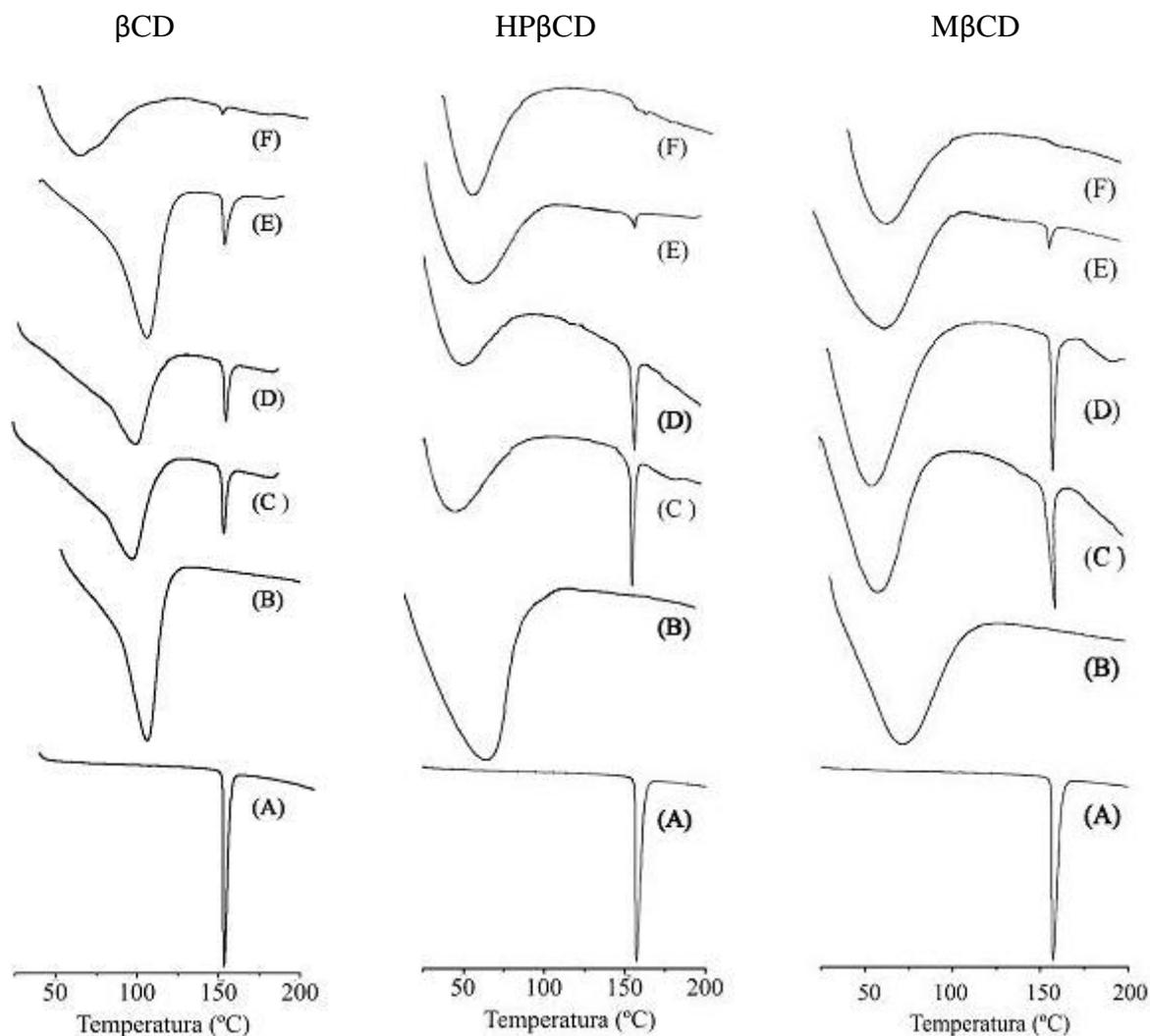
Os efeitos encontrados nos termogramas dos malaxados com  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD, são irrelevantes, apesar dos binários com  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD terem sofrido uma discreta redução de intensidade do pico característico do fármaco e um certo alargamento no evento referente as ciclodextrinas, não é correto dizer que houve complexação. Estas pequenas alterações podem ser explicadas por uma melhor dispersão dos microcristais da  $\beta$ -lapachona na matriz das ciclodextrinas e/ou ativação mecânica do processo de obtenção, sem a ocorrência de interações químicas.

Em todos os sistemas obtidos por co-evaporação houve uma expressiva diminuição da intensidade energética desprendida no processo de fusão da  $\beta$ -lapachona, com deslocamento térmico para temperaturas inferiores, sugerindo a perda do estado cristalino definido. O

complexo  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD apresentou de forma mais pronunciada estas alterações com desaparecimento quase total do pico da  $\beta$ -lapachona, seguido do  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD e por último o  $\beta$ -lap: $\beta$ CD, ficando evidente a interação ocorrida entre o fármaco e as ciclodextrinas.

Houve o desaparecimento completo do pico endotérmico correspondente à transição sólido-líquido da  $\beta$ -lapachona nos produtos obtidos por secagem por atomização com as ciclodextrinas HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD. Para a  $\beta$ CD houve um aparecimento muito discreto do que seria o pico de fusão do fármaco, provavelmente devido à microcristais que permaneceram em quantidades irrelevantes. Ocorreram também alterações no fenômeno endotérmico característico da desidratação das ciclodextrinas, o que contribui para evidenciar a existência de um processo de inclusão, uma vez que o fármaco ao penetrar na cavidade da ciclodextrina provoca a substituição de algumas moléculas de água acomodadas no interior da molécula hospedeira [51, 52] Estes resultados indicam a formação de uma fase sólida não cristalina com provável inclusão molecular da  $\beta$ -lapachona na cavidade das três ciclodextrinas, confirmando o que foi visualizado no MEV.

Os resultados obtidos sugerem a existência de fortes interações intermoleculares, envolvendo a  $\beta$ -lapachona e as ciclodextrinas, caracterizando a provável formação de complexos de inclusão mais estáveis na seguinte ordem:  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD (SD) >  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD (SD) >  $\beta$ -lap: $\beta$ CD (SD) >  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD (CE) >  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD (CE) >  $\beta$ -lap: $\beta$ CD (CE) >  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD (ML) >  $\beta$ -lap: $\beta$ CD (ML).



**Figura 3.** Curvas de DSC: (A)  $\beta$ -lapachona; (B) Ciclodextrina; (C) Mistura física; (D) Malaxado, (E) Co-evaporado, (F) *Spray-drying*.

### Difração de Raios X

A formação de complexos de inclusão no estado sólido está frequentemente associada ao aumento do grau de amorfização das substâncias envolvidas, dependendo do método de obtenção, podendo, desta forma, ser monitorizado pela técnica de difração de raios X através da comparação dos difratogramas de um suposto complexo de inclusão com o de uma mistura física e compostos isolados, onde deverá haver diferenças significativas nas posições e intensidades dos principais picos dos compostos, com possibilidade de desaparecimento de

alguns dos picos de difração característicos. Os difratogramas dos compostos isolados e respectivos produtos binários estão apresentados na Figura 4.

O perfil difratográfico da  $\beta$ -lapachona põe em evidência o seu caráter cristalino, apresentando uma série de picos de difração de elevada intensidade e definição com pico principal de  $9,5^\circ$  ( $2\theta$ ) e picos secundários em  $12,95$ ,  $16,30$ ,  $19,03$ ,  $26,40$  e  $34,98^\circ$  ( $2\theta$ ). O difratograma da  $\beta$ CD revelou também o seu caráter cristalino, com picos de difração mais importantes em  $7,31^\circ$ ,  $10,39^\circ$ ,  $12,39^\circ$ ,  $14,59^\circ$ ,  $17,91^\circ$ ,  $21,84^\circ$  e  $22,84^\circ$  ( $2\theta$ ). Padrões completamente difusos foram obtidos com as outras duas ciclodextrinas, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD, indicando a natureza amorfa das mesmas.

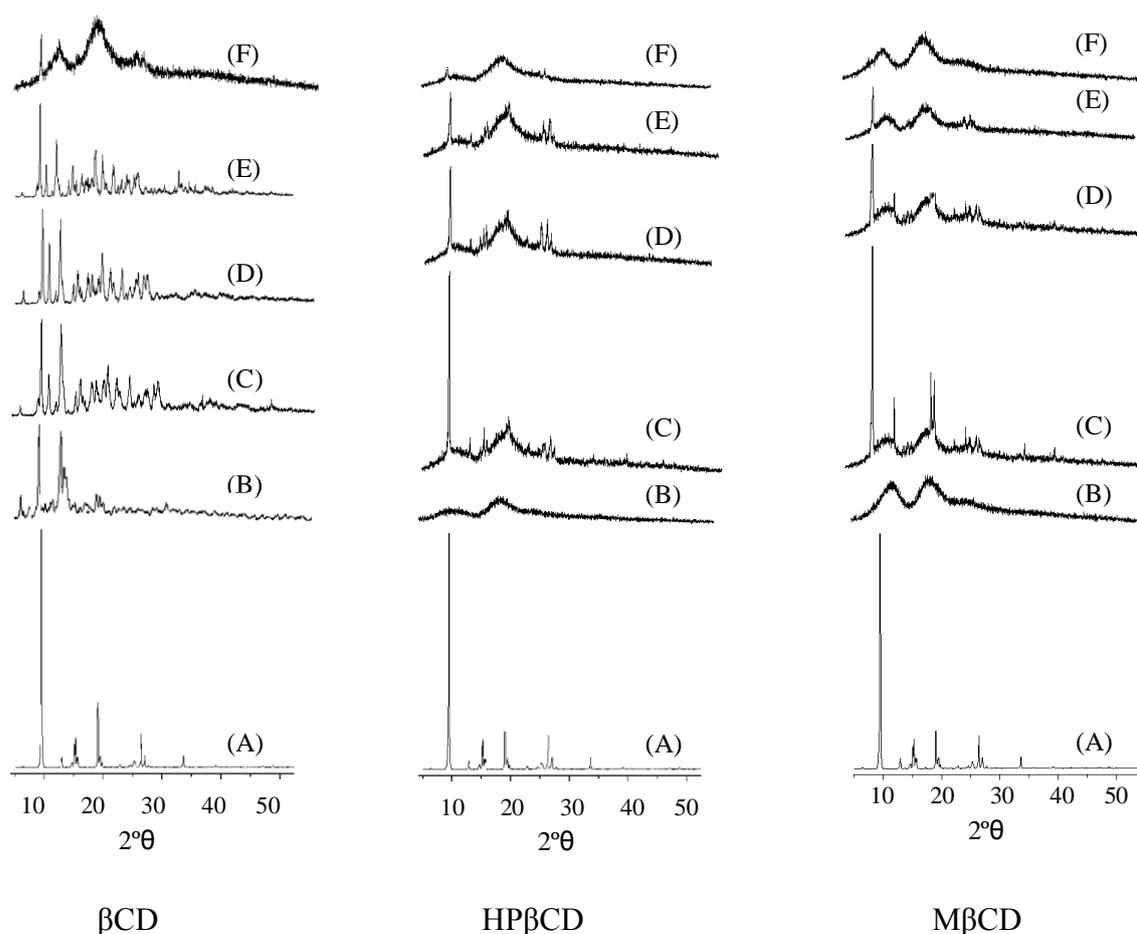
A comparação dos perfis de difração dos componentes isolados com suas misturas físicas demonstrou a inexistência de variações expressivas, com sobreposições dos difratogramas, indicando que não ocorreu a formação de uma nova estrutura.

Os produtos malaxados e co-evaporados obtidos com  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD ostentaram um caráter cristalino com padrões de difração muito semelhantes entre si, dentro do mesmo grupo de ciclodextrina, e em comparação com a relacionada mistura física, sugerindo que não houve formação de um composto completamente não cristalino em nenhum dos casos. Porém, as intensidades do pico principal da  $\beta$ -lapachona foram significativamente diminuídas nos compostos obtidos com HP $\beta$ CD seguindo a seguinte ordem decrescente: mistura física, malaxado e co-evaporado, sugerindo uma perda significativa de cristalinidade da  $\beta$ -lapachona influenciada pelo processo de obtenção dos complexos.

Nos casos dos produtos malaxados e co-evaporados com M $\beta$ CD observou-se uma perda expressiva de cristalinidade, com diminuições pronunciadas do pico principal e picos secundários da  $\beta$ -lapachona, chegando ao completo desaparecimento de alguns picos secundários, sugerindo a ocorrência de um fenômeno de desordem conseqüente da complexação, fenômenos mais evidentes no produto c-evaporado.

No complexo obtido por atomização com a  $\beta$ CD, houve uma redução expressiva do pico principal da  $\beta$ -lapachona com diminuição, alargamentos e desaparecimentos dos picos secundários do fármaco e ciclodextrina utilizada, caracterizando a perda da forma cristalina original dos produtos de partida com formação de um complexo de inclusão.

Os produtos obtidos por atomização com as ciclodextrinas HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD apresentaram difratogramas totalmente difusos indicando a natureza não cristalina dos produtos formados. Desta forma, pode-se afirmar que houve a formação de complexos de inclusão estáveis devido às possíveis interações ocorridas entre o fármaco e as ciclodextrinas decorrentes do maior poder de complexação do fármaco com as referidas ciclodextrinas.



**Figura 4.** Difratogramas: (A)  $\beta$ -lapachona, (B) Ciclodextrinas, (C) Mistura Física, (D) Malaxado, (E) Co-evaporado e (F) *Spray-drying*.

### **Espectroscopia vibracional no Infravermelho (FTIR)**

A utilização da técnica de espectroscopia de FTIR permite não só evidenciar a formação de complexos de inclusão, como avaliar quais os grupos funcionais do fármaco ou da ciclodextrina estão envolvidos no processo de complexação no estado sólido. Os espectros de FTIR dos sistemas  $\beta$ -lap: $\beta$ CD,  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD estão apresentados nas figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

Os espectros FTIR das misturas físicas correspondem ao simples resultado da adição dos espectros da  $\beta$ -lapachona e da respectiva ciclodextrina. A diminuição geral da intensidade das diferentes bandas características da  $\beta$ -lapachona foi atribuída à presença de uma quantidade proporcionalmente inferior de fármaco nas pastilhas de KBr dos sistemas binários, o que resulta na diluição da  $\beta$ -lapachona pelas ciclodextrinas.

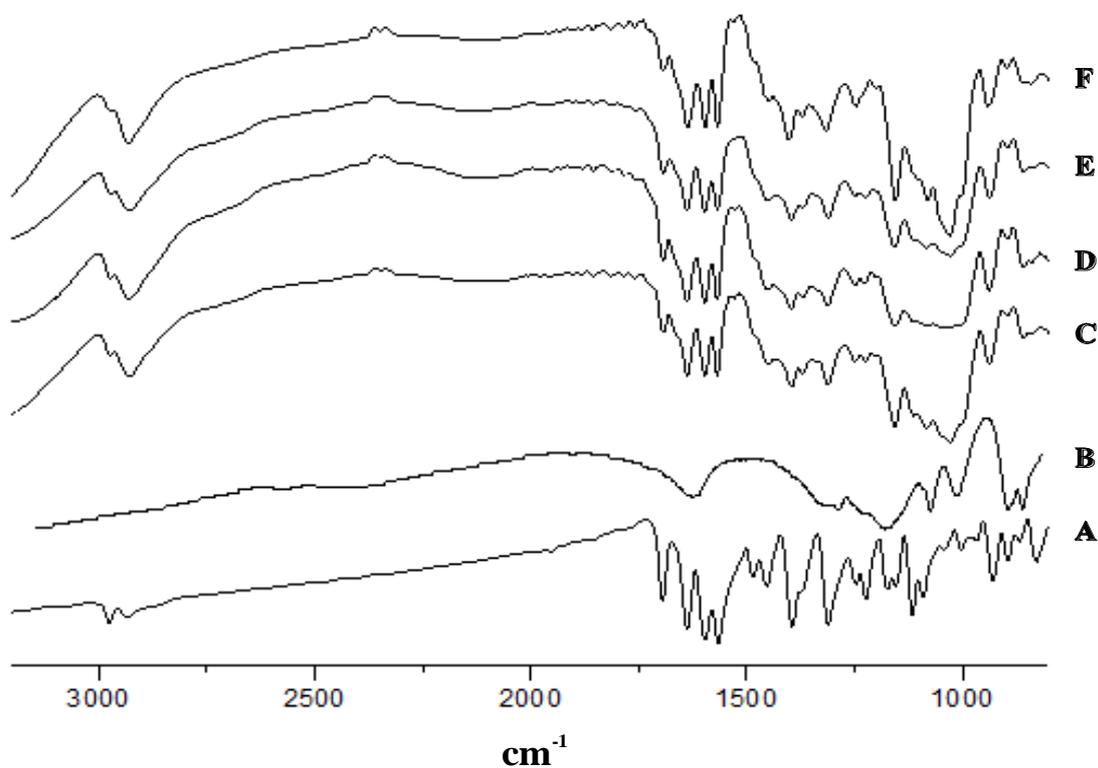
Nos espectros dos produtos malaxados e co-evaporados obtidos com as três ciclodextrinas não se verificam diminuições de intensidade ou desvios significativos das bandas de absorção no infravermelho características da  $\beta$ -lapachona quando comparados com suas respectivas misturas físicas.

Os espectros FTIR dos sistemas binários  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD atomizados apresentaram quase que total desaparecimento da banda em  $2977\text{ cm}^{-1}$  característica de deformação axial de C-H aromático. No composto  $\beta$ -lap: $\beta$ CD obtido pela mesma técnica houve uma diminuição significativa de intensidade desta banda. Esta alteração permite confirmar que as compostos obtidos por secagem por atomização possuem uma modificação do ambiente químico do fármaco caracterizando a formação de complexos de inclusão estáveis na forma sólida.

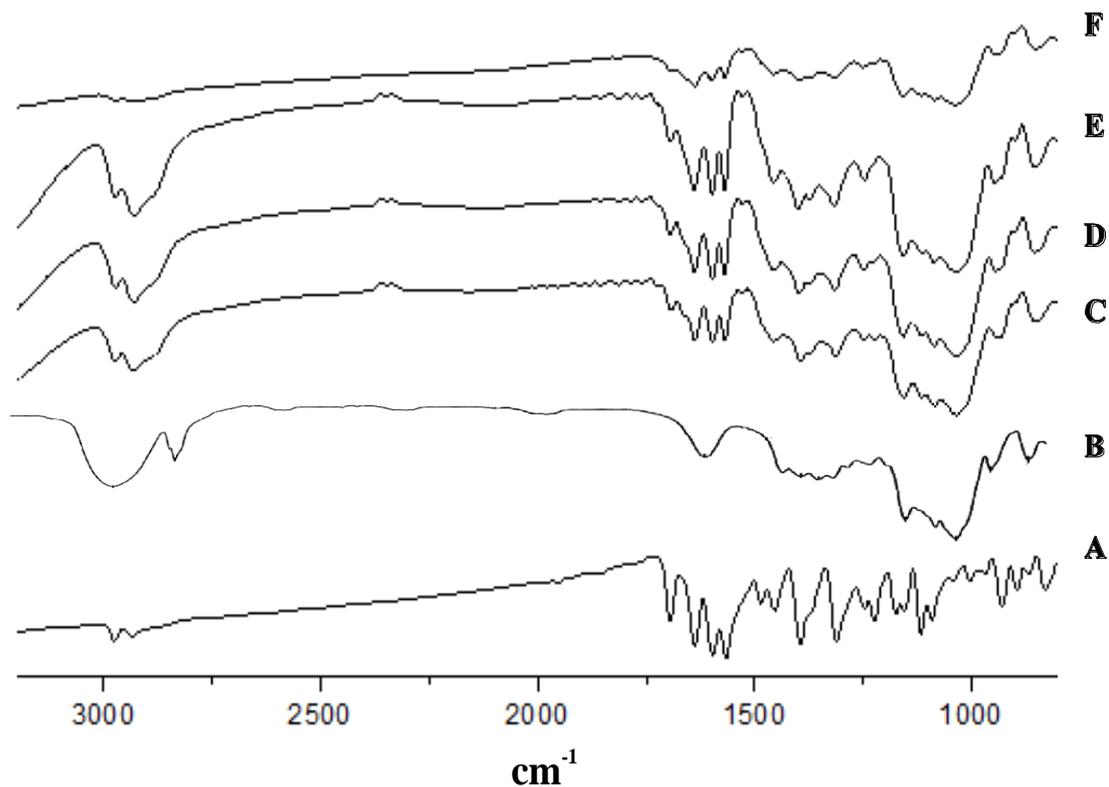
Os sinais na região  $1694\text{ cm}^{-1}$ , atribuído à banda de deformação axial de C=O,  $1591\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial C=C do anel e  $1313,7\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial assimétrica de C-O-C, não foram observado no composto atomizado  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD. Houve

ainda redução extrema da intensidade das bandas  $1694\text{ cm}^{-1}$  e  $1591\text{ cm}^{-1}$  no atomizado  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD.

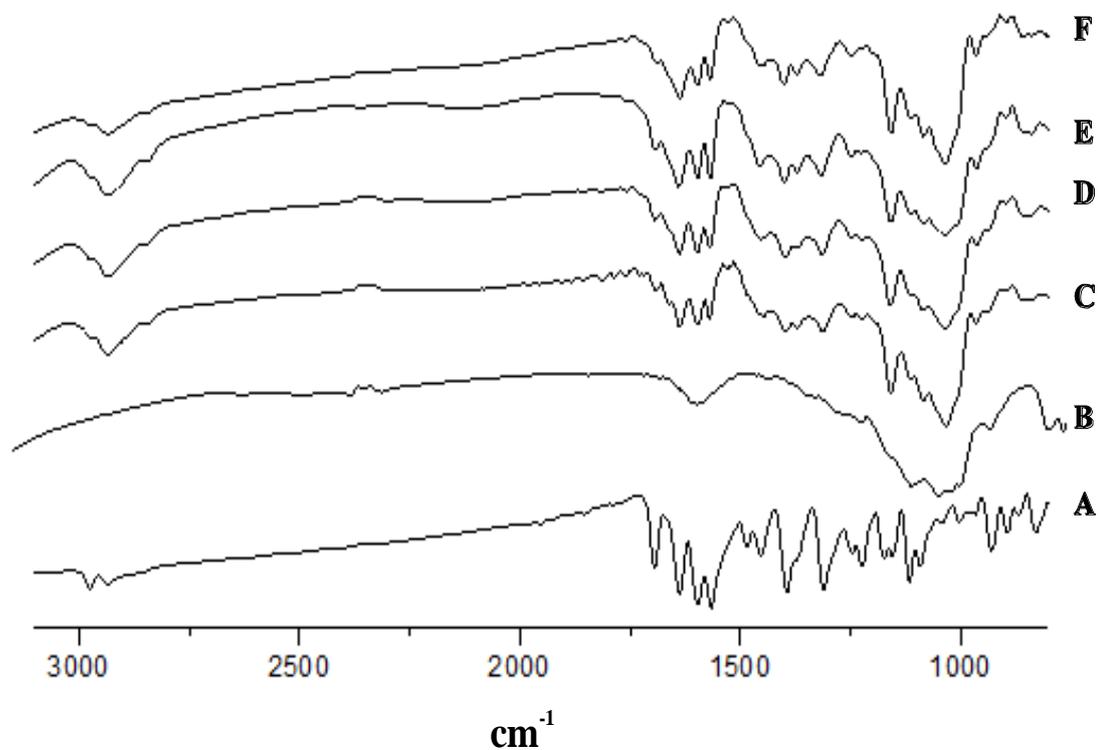
O somatório dos efeitos encontrados nos espectros de FTIR dos atomizados identifica uma maior interação entre as ciclodextrinas e a  $\beta$ -lapachona quando esta técnica de obtenção é utilizada.



**Figura 5.** Espectro de FTIR com  $\beta$ CD: (A)  $\beta$ -lapachona, (B)  $\beta$ CD, (C) Mistura Física, (D) Malaxado, (E) Co-evaporado e (F) *Spray-drying*.



**Figura 6.** Espectro de FTIR com HP $\beta$ CD: (A)  $\beta$ -lapachona, (B) HP $\beta$ CD, (C) Mistura Física, (D) Malaxado, (E) Co-evaporado e (F) *Spray-drying*.



**Figura 7.** Espectro de FTIR com M $\beta$ CD: (A)  $\beta$ -lapachona, (B) M $\beta$ CD, (C) Mistura Física, (D) Malaxado, (E) Co-evaporado e (F) *Spray-drying*.

### **Determinação da solubilidade aquosa**

A solubilidade de uma molécula pode ser alterada devido ao poder complexante da ciclodextrina por interações ocorridas entre os átomos do interior de sua cavidade e os grupos hidrofóbicos da molécula hóspede. A interação da superfície externa da ciclodextrina, de caráter hidrofílico, com o solvente do meio contribui para a solubilização do complexo aumentando a solubilidade da molécula hóspede de forma significativa. A solubilidade aquosa máxima da  $\beta$ -lapachona isolada e nos complexos de inclusão após 48h de agitação contínua sob temperatura controlada está apresentada na Figura 8. Esta solubilidade corresponde à concentração de equilíbrio na presença de quantidades em excesso do fármaco ou respectivo sistema binário não dissolvido. A solubilidade da  $\beta$ -lapachona isolada ( $6,98\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizada como referência para avaliar a influência da ciclodextrina e do processo de obtenção dos complexos.

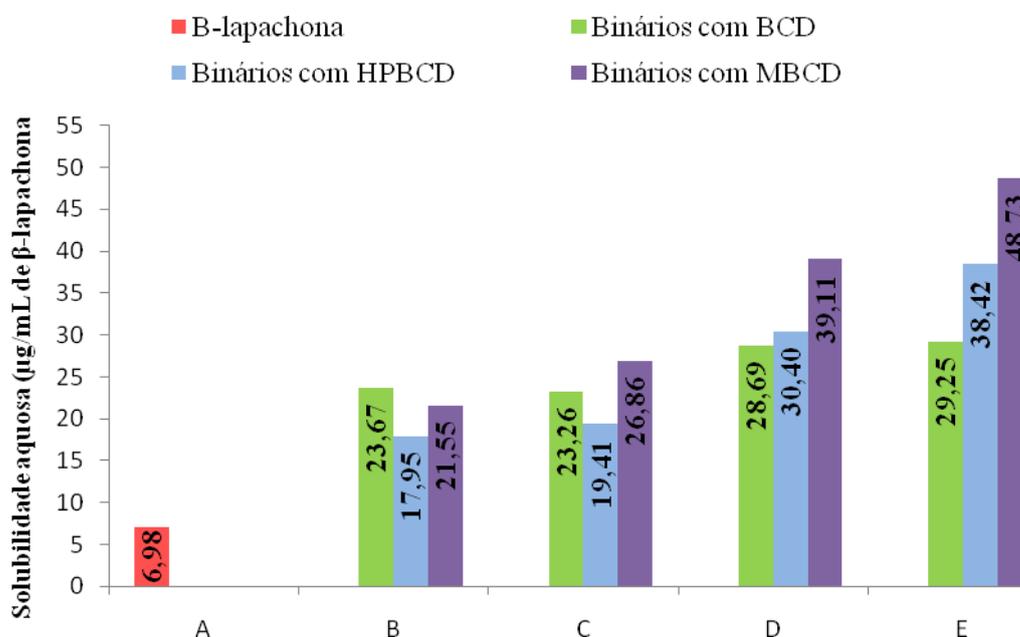
O aumento da solubilidade aquosa da  $\beta$ -lapachona é perceptível inclusive nas misturas físicas possivelmente devido à diminuição do tamanho e adsorção das partículas de  $\beta$ -lapachona nas moléculas das ciclodextrinas. Outro fato relevante que justifica o aumento de solubilidade é a quantidade bastante superior das ciclodextrinas, na relação peso/peso, comparativamente a quantidade de fármaco, o que proporciona um microambiente favorável para sua solubilização no estado de equilíbrio, uma vez que o processo de complexação em solução é caracterizado por ser um processo dinâmico, onde moléculas não complexadas anteriormente através do processo de obtenção utilizado podem vir a se complexarem durante o estudo de solubilidade. Este fato influencia a solubilidade da  $\beta$ -lapachona em todos os produtos binários, independente do processo utilizado para sua obtenção.

O incremento na solubilidade da  $\beta$ -lapachona induzido pelos complexos malaxados foi discretamente superior ao verificado nas misturas físicas para as três ciclodextrinas, o que reforça a teoria de que os produtos obtidos por malaxagem não são verdadeiros complexos de

inclusão apresentando a formação de agregados onde se distingui pequenos cristais de  $\beta$ -lapachona enovelados as ciclodextrinas conforme evidenciado nos ensaios de MEV e confirmado por DSC e difração de raios-X.

Os sistemas de complexos formados com M $\beta$ CD apresentaram maior incremento na solubilidade da  $\beta$ -lapachona, quando comparados aos demais produtos obtidos pelo mesmo processo com as outras duas ciclodextrinas, comprovando a maior eficiência de complexação em solução desta ciclodextrina, o que está em acordo com os resultados do estudo de solubilidade de fases.

O maior aumento de solubilidade da  $\beta$ -lapachona foi manifestado pelos complexos atomizados para as três ciclodextrinas, com incrementos de aproximadamente 700%, 550% e 420% para os complexos com M $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e  $\beta$ CD, respectivamente, seguidos dos complexos co-evaporados na mesma sequência das ciclodextrinas, conforme pode ser verificado na figura 8.



**Figura 8.** Solubilidade em água: (A)  $\beta$ -lapachona; (B) Misturas Físicas; (C) Malaxados, (D) Co-evaporados e (E) *Spray-drying*.

### **Ensaio de dissolução**

Os perfis de dissolução da  $\beta$ -lapachona e sistemas  $\beta$ -lap: $\beta$ CD,  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD em água purificada estão representados na Figura 9.

Como pode ser observado não ocorreu à dissolução completa da  $\beta$ -lapachona na forma de cristais, pó pulverizado ou atomizada, após o período total do ensaio, ou seja, 120 minutos. No entanto, todos os sistemas binários com as três ciclodextrinas, inclusive as misturas físicas, apresentaram melhores propriedades de dissolução.

Este incremento no teor dissolvido de  $\beta$ -lapachona e na velocidade de dissolução dos diferentes produtos pode ser explicado com base na redução da cristalinidade do fármaco com prevalência do estado não cristalino, menor tensão interfacial entre a  $\beta$ -lapachona e o meio de dissolução. Outro aspecto que deve ser observado é a ação solubilizante local das ciclodextrinas, ao nível do microambiente da camada hidrodinâmica que se forma após a rápida dissolução das ciclodextrinas que ocorre na fase inicial do processo de dissolução provocando um aumento da solubilidade e/ou molhabilidade da  $\beta$ -lapachona. A formação de complexos solúveis no meio de dissolução com a inclusão do fármaco na cavidade da ciclodextrina ou apenas através de interações da molécula hóspede com os grupos exteriores das ciclodextrinas são fatores que também influenciam bastante na dissolução das misturas físicas e binários obtidos por malaxagem, nos quais, devido ao atrito mecânico existe um contato mais íntimo entre a  $\beta$ -lapachona e as ciclodextrinas, não necessariamente na cavidade das mesmas. A soma destes fatores propiciaram um incremento de dissolução nos produtos malaxados, com mais de 75% de teor dissolvidos em 60 minutos para o binário  $\beta$ -lap: $\beta$ CD e mais 85% para os binários  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD (Tabela 2).

Os perfis de dissolução encontrados para os produtos avaliados estão em concordância com os resultados dos estudos de caracterização físico-química descrito neste trabalho, sendo

os produtos atomizados os quais apresentam melhores resultados, atingindo mais de 80% de teor dissolvido em 15 minutos e mais que 90% após 60 minutos (Tabela 2).

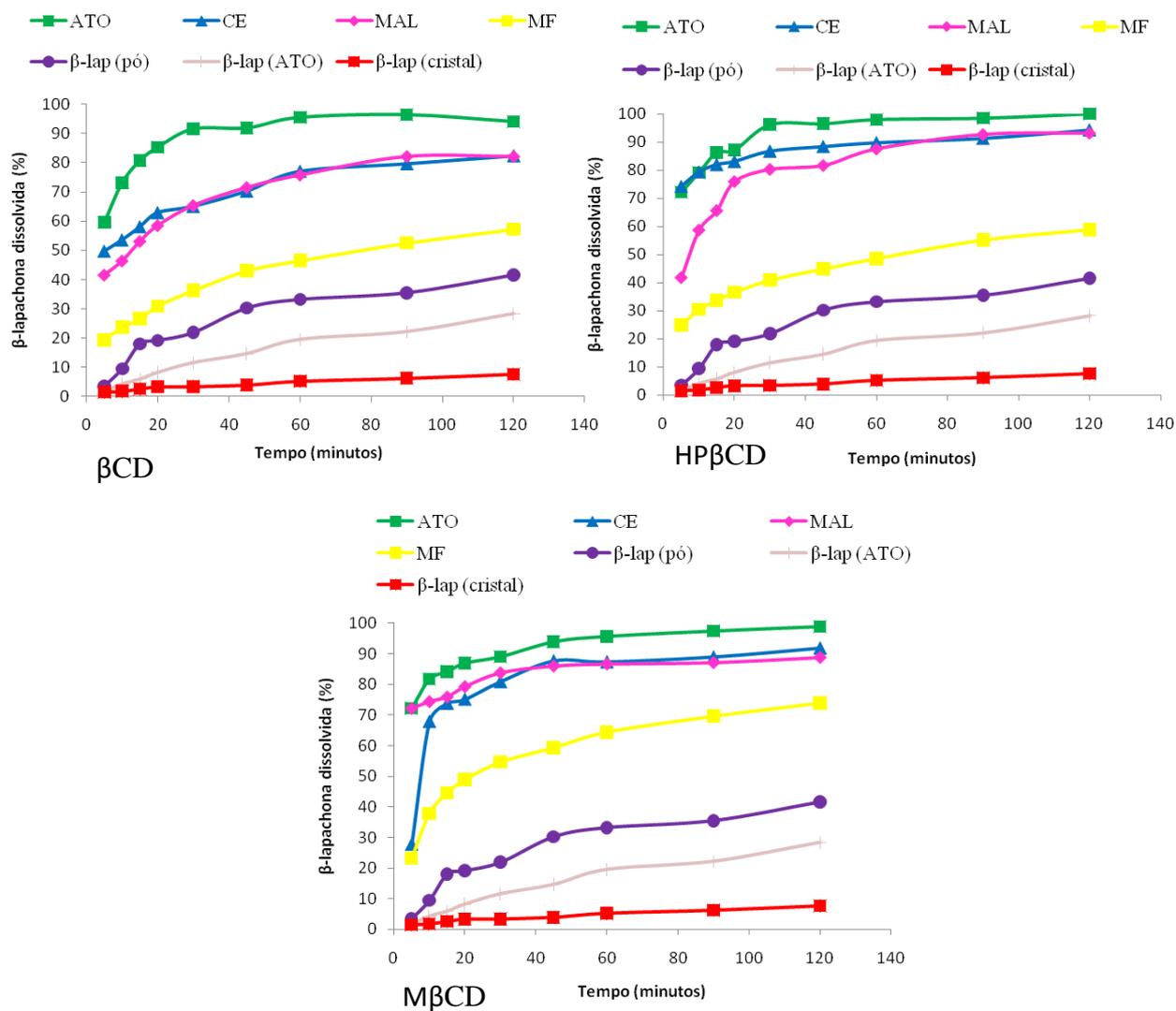


Figura 9. Perfis de dissolução da  $\beta$ -lapachona e binários.

**Tabela 2.** Percentagem de  $\beta$ -lapachona dissolvido após 60, 90 e 120 minutos e eficiência de dissolução em 60 e 120 minutos obtidas a partir da  $\beta$ -lapachona isolada e dos sistemas binários com  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD.

<b>Produto</b>	<b>Q<sub>60min</sub></b>	<b>Q<sub>90min</sub></b>	<b>Q<sub>120min</sub></b>	<b>ED<sub>60min</sub></b>	<b>ED<sub>120min</sub></b>
$\beta$ -lapachona (cristal)	5,21±6,54	6,19±8,41	7,60±6,51	3,23	4,77
$\beta$ -lapachona (pó)	33,21±8,67	35,49±3,10	41,56±4,09	21,25	28,85
$\beta$ -lapachona (atomizada)	19,47±7,46	22,14±8,14	28,29±7,52	10,47	16,74
<b><math>\beta</math>CD</b>					
Mistura física	46,50±2,40	52,52±1,58	57,25±3,42	33,77	42,98
Malaxado	75,87±1,72	82,25±1,05	82,23±2,30	60,04	70,35
Co-evaporado	77,01±2,70	79,59±3,79	82,30±5,93	62,03	70,82
Atomizado	95,50±4,42	96,40±4,99	94,05±3,48	82,42	89,00
<b>HP<math>\beta</math>CD</b>					
Mistura física	48,57±0,30	55,18±0,56	58,85±0,60	37,82	46,13
Malaxado	87,61±2,07	92,73±0,42	93,22±0,35	71,43	81,50
Co-evaporado	89,85±0,92	91,40±0,41	94,39±0,99	81,50	86,63
Atomizado	97,93±0,64	98,44±0,38	99,98±0,15	87,07	92,88
<b>M<math>\beta</math>CD</b>					
Mistura física	64,42±2,08	69,62±1,51	73,93±1,92	49,17	59,29
Malaxado	86,60±0,21	87,07±0,78	88,74±0,88	78,17	82,77
Co-evaporado	87,29±0,29	88,91±0,40	91,79±0,48	73,14	81,18
Atomizado	95,69±1,72	97,46±1,18	98,87±1,37	84,71	91,04

Cada valor de Q representa a média (%)  $\pm$  coeficiente de variação. ED (%).

Os valores obtidos da eficiência de dissolução (Tabela 2) para cada hora de ensaio possibilitam inferir que os melhores perfis de dissolução seguem a seguinte ordem decrescente:  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD atomizado,  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD atomizado,  $\beta$ -lap: $\beta$ CD atomizado,  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD co-evaporado,  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD malaxado,  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD co-evaporado,  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD malaxado,  $\beta$ -lap: $\beta$ CD co-evaporado,  $\beta$ -lap: $\beta$ CD malaxado,  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD mistura física,  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD mistura física,  $\beta$ -lap: $\beta$ CD mistura física,  $\beta$ -lapachona pó,  $\beta$ -lapachona atomizada e  $\beta$ -lapachona cristais.

## CONCLUSÃO

A possibilidade de formação dos complexos de inclusão binários entre a  $\beta$ -lapachona,  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD, foi confirmada através do ensaio de solubilidade de fases que demonstrou um perfil linear com constantes de estabilidade satisfatórias para as três ciclodextrinas avaliadas, estabelecendo uma proporção estequiométrica de 1:1 (mol/mol) de  $\beta$ -lapachona:ciclodextrina. Através da caracterização físico-química comparativa entre os compostos isolados, misturas físicas e complexos de inclusão, para as três ciclodextrinas, foi observado que os complexos  $\beta$ -lap: $\beta$ CD  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD obtidos por secagem por atomização e os complexos  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:M $\beta$ CD obtidos por co-evaporação apresentaram, além da redução no tamanho de partículas, uma conversão do estado cristalino ao estado não cristalino devido às possíveis interações químicas ocorridas entre o fármaco e as ciclodextrinas, processo comprovado pelo ensaio de dissolução. Estes resultados indicam que o uso de ciclodextrinas, pode melhorar a solubilidade da  $\beta$ -lapachona, que possui baixa solubilidade em água, por aumentar a área superficial de contato e originar um composto de forma não cristalina com face exterior de encapsulamento hidrossolúvel.

## REFERÊNCIAS

1. D'ALBUQUERQUE, I. L. (1968) *Rev. Instit. Antib.* **8**: 73-87.
2. GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; GONÇALVES DE LIMA C. & MAIA, M. H. D. (1962) *Rev. Instit. Anti.* **4**: 3-17.
3. OLIVEIRA, A. B., RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; ZANI, C. L.; FERREIRA, D. T. & MAIA, J. G. S. (1990) *Quím. Nova*, **13**: 302-7.
4. SANTANA, C. F.; GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LACERDA, A. L. & MARTINS, D. G. (1968) *Rev. Instit. Antib.* **8**: 3-17.
5. CARVALHO, C. E. M.; FERREIRA, V. F.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R. & HARRISON, W. (2002) *Dyes and Pigm.* **52**: 209-14.

6. GONCALVES, A.M.; VASCONELLOS, M.E.; DOCAMPO, R.; CRUZ, N.S.; SOUZA, W.R. & LEON, W. (1980). *Mol Biochem Parasitol* **1**:167–176.
7. PAHN, E.M.; MOLINA, M.P. & STOPPANI, A.O.M. (1988). *Rev Argent Microbiol* **20**:107-118.
8. PARDEE, A.B.; LI, Y.Z. & LI, C.J. (2002). *Curr Cancer Drug Targets* **2**:227–242.
9. LI, C.J.; AVERBOUKH, L. & PARDEE, A.B. (1993). *J Biol Chem* **268**:22463–22468.
10. GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SEIGLE-MURANDI, F.; SIMEN, D.E. & BUOCHBERG, M. (1994). *Planta Med* **60**:373–374.
11. MOON, D-O; CHOI, Y.H.; KIM, N-D; PARK, Y-M & KIM, G-Y.( 2007). *Intern Immunopharm* **7**: 506–514.
12. PLANCHON, S.M.;WUERZBERGER, S.; FRYDMAN, B.; WITIAK, D.T., HUTSON, P. & CHURCH, D.R. (1995). *Cancer Res* **55**:3706–3711.
13. SHIAH, S.G.; CHUANG, S.E.; CHAU, Y.P.; SHEN, S.C. & KUO, M.L. (1999). *Cancer Res* **59**:391–8.
14. TZENG, H-P; HO, F-M; CHAO, K-F; KUO, M-L; LIN-SHIAU, S-Y & LIU, S-H. (2003). *Am J Respir Crit Care Med* **168**:85–91.
15. 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. (1972) *Rev. Instit. Antib.* **12**: 31-40.
16. FÁVARO, O. C. N.; OLIVEIRA, M. M.; ROSSINI, M. M. A.; KAMAKURA, C. R.; PINTO, A. V. & PINTO, M. C. F. R. (1990) *Anais da Academia Brasileira. Ci.* **62**: 217-24.
17. SOUSA, M. R. Q. (2000). *Estudos dos efeitos da  $\beta$ -Lapachona sobre células da linhagem Hep-2 carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180*. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. Recife, Pernambuco.
18. SCHAEFFNER-SABBA, K.; SCHMIDT-RUPPIN, K. H.; WEHRLI, W.; SCHUERCH, A. R. & WASLEY, J. W. F. (1984) *J. Med. Chem.* **27**: 990-4.
19. LI, C. J.; LI, Y.; PINTO, A. V. & PARDEE, A. B. (1999) *PNAS.* **96**: 13369-74.

20. GUPTA, D.; PODAR, K.; TAI, Y.; LIN, B.; HIDESHIMA, T.; AKIYAMA, M.; LEBLANC, R.; CATLEY, L.; MITSIADES, N.; MITSIADES, C.; CHAUHAN, D.; MUNSHI, N. C. & ANDERSON, K. C. (2002) *Experim. Hemat.* **30**: 711-20.
21. DI GIANNI, P.; FRANCO, M.; BUSTUOABAD, O. D. & RUGGIERO, R. (1997) *Bol. Acad. Nac. Med. B. Aires.* **75(1)**: 145-52.
22. BOOTHMAN, D. A.; TRASK, D. K. & PARDEE, A. B. (1989) *Cancer Res.* **49**: 605-612.
23. LI, C. J.; WANG, C. & PARDEE, A. B. (1995) *Cancer Res.* **55**: 3712-15.
24. KRISHNAN, P. & BASTOW, K.F. (2001). *Cancer Chemother Pharmacol* **47**:187–198.
25. PINK, J. J.; WUERZBERGER-DAVIS, S.; TAGLIARINO, C.; PLANCHON, S. M.; YANG, X.; FROELICH, C. J. & BOOTHMAN, D. A. (2000a) *Experimental Cell Res.* **255**: 144-55.
26. PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M. E.; SIEGEL, D. & BOOTHMAN, D. A. (2000b) *J. Biolog. Chem.* **275**: 5416-24.
27. ALVES, G.M.C.; ROLIM, L.A.; LEITE, A.C.L.; BRONDANI, D.J.; MEDEIROS, F.P.M.; BIEBER, L.W.; MENDONÇA-JÚNIOR, F.J.B. & ROLIM-NETO, P.J. (2008). *Quím Nova* **31(2)**:413-416.
28. PRESMICH, G.M.A.; ROLIM, L.A.; MEDEIROS, F.P.M.; ALBUQUERQUE, M.M. & ROLIM-NETO, P.J. (2009). *Lat. Am. J. Pharm.* (Artigo aceito em fase de correção).
29. SZEJTLI, J. (1984). *J. Incl. Phenom.* **2**:487-501.
30. SZEJTLI, J. (1987). *Topics in pharmaceutical sciences*. London: Elsevier Publishers. 151-168.
31. SZEJTLI, J. (1988). *Cyclodextrin Technology*. Dordrecht: Kluwer.
32. SZEJTLI, J. (1991a). *Pharm.Tech. Int.* **3 (2)**:15-22.
33. SZEJTLI, J. (1991b). *Pharm.Tech. Int.* **3 (3)**:16-24.
34. LOFTSSON, T. & BREWSTER, M.E. (1996). *J. Pharm. Sci.* **85**:1017-1025.
35. LOFTSSON, T. (1999). *Pharm.Tech. Eur.* **11(10)**:20-32.
36. DUCHÊNE, D; VAUTHION, C. & GLOMOT, F. (1986b). *Drug Dev. Ind. Pharm.* **12**:2193-2215.
37. DUCHÊNE, D. & WOUESSIDJEW, D. (1990b). *Acta Pharm. Technol.* **36**:1-6.

38. LOFTSSON, T. & BREWSTER, M.E. (1997). *Pharm.Tech. Eur.* **9(5)**:26-34.
39. HIGUCHI, T. & CONNORS, K. (1965) *Anal. Chem. Instrum.* **4**: 117-212.
40. PRESMICH, G.M.A.; ROLIM, L.A.; CAVALCANTI, O.R.B.R., SILVA, KER & ROLIM-NETO, P.J. (2009). (Aceito para publicação na revista Latin American Journal of Pharmacy).
41. US Department of Health and Human Services. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, August 1997. Available at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/1713bp1.pdf>. Accessed: Juny, 2009.
42. United States Pharmacopeia **29(1225)**: 2006.
43. KHAN, KA. (1975). *J. Pharm. Pharmacol.* **28**: 48-49.
44. CUNHA-FILHO, M.S.S.; DACUNHA-MARINHO, B.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.; MERTÍNEZ-PACHECO, R. & LANDÍN, M. (2007). *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **8(3)**: E1-E10.
45. NASONGKLA, N; WIEDMANN, A.F.; BRUENING, A; BEMAN, M; RAY, D.; BORNMANN, W.G.; BOOTHMAN, D.A. & GAO, J. (2003). **20(10)**:1626-1633.
46. STELLA, V.J. & RAJEWSKI, R.A. (1997) *Pharm. Res.* **14**: 556-567.
47. STELLA, V.J.; RAO, V.M.; ZANNOU, E.A. & ZIA, V. (1999) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **36**: 3-16.
48. ZIA, V.; RAJEWSKI, R.A. & STELLA, V.J. (2001) *Pharm. Res.* **18**: 668-673.
49. MURA, P.; FURLANETTO, S.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; CORTI, G. & PINZAUTI, S. (2005). *J Pharm Biomed Anal.* **37**:987-994.
50. VEIGA, M.D.; DIAZ, P.J. & ASHAN, F. (1998) *J. Pharm. Sci.* **87**:891-900.
51. WINTERS, C.S.; YORK, P. & TIMMINS, P. (1997). *Eur. J. Pharm. Sci.* **5**:209-214.
52. SINGH, U.V.; AITHAL, K,S. & UDUPA, N. (1998). *Pharmazie* **53**:208-210.

*Ensaio biológico*

**Estudos preliminares da influência dos complexos  $\beta$ -lapachona:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lapachona:PVP K-30 no tratamento de camundongos com tumor sólido de Ehrlich.**

## **ESTUDOS PRELIMINARES DA INFLUÊNCIA DOS COMPLEXOS $\beta$ -LAPACHONA:HPBCD E $\beta$ -LAPACHONA:PVP K-30 NO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM TUMOR SÓLIDO DE EHRlich**

### **INTRODUÇÃO**

A  $\beta$ -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 no ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor), da família *Bignoniaceae*, crescente principalmente no Brasil, que também pode ser obtida através do processo de semi-síntese do seu isômero lapachol, isolado da mesma planta, por ação controlada do calor ou por hidrólise ácida [1-5]. A  $\beta$ -lapachona induz a morte celular tumoral *in vitro* em células de linhagens de câncer de próstata, ovário, cólon, pulmão, melanomas, pâncreas, leucemia e mama. Estudos realizados em terapia do câncer de próstata e ovário com a utilização de  $\beta$ -lapachona durante ou após o uso do Paclitaxel<sup>®</sup> (Taxol) conduziram a resultados significativamente melhores por inibir pontos diferentes da replicação celular, comprovando a ocorrência de um sinergismo na utilização deste fármaco [6-8]. 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 nas fases G0/G1 do ciclo celular e que induz a apoptose, morte celular programada de células cancerígenas, por um mecanismo particular, independente da expressão da proteína p53 [9-11].

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específica e corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongos, utilizado como modelo experimental em análises de desenvolvimento e tratamentos de carcinomas em geral. Este tumor tem crescimento em várias linhagens dessa espécie animal na forma sólida, quando inoculado por via subcutânea [12-15].

Devido à baixa solubilidade em água da  $\beta$ -lapachona o desenvolvimento de complexos de inclusão e dispersões sólidas que produzam uma melhor disponibilidade do fármaco para a realização de ensaios toxicológicos mais consistentes, que comprovem a eficácia e segurança da  $\beta$ -lapachona em terapias antineoplásicas consiste um desafio para o desenvolvimento tecnológico.

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração oral da  $\beta$ -lapachona complexada com HP $\beta$ CD e PVP K-30 em tumor de Ehrlich, sobre a capacidade proliferativa das células tumorais no microambiente subcutâneo, quadro hematológico, peso dos rins, baço e fígado utilizando como modelo experimental o camundongo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Substâncias e Reagentes**

A  $\beta$ -lapachona ( $\beta$ -lap; lote: 103) utilizada foi produzida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Pernambuco, Brasil). A ciclodextrina 2-Hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD; Kleptose<sup>®</sup>HP) foi gentilmente doada pela Roquette<sup>®</sup> (Lestrem, França). O polímero hidrossolúvel polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30) foi adquirido da ISP<sup>®</sup> do Brasil. O Paclitacel<sup>®</sup> (Taxol) (Eurofarma<sup>®</sup>; lote 153923A) foi gentilmente cedido pelo Hospital das clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Como solventes foram utilizados álcool etílico absoluto da Merck<sup>®</sup> (Portugal), álcool metílico da Cinética<sup>®</sup> (Jand Química Indústria e Comércio de Produtos Químicos, Brasil) e água purificada pelo sistema de osmose reversa. Para a construção da curva analítica, quando necessário a realização de doseamento, foi utilizado um padrão de trabalho de  $\beta$ -lapachona também produzido pela UFPE (lote: PS01; 99,26%), padronizado a partir do padrão primário Sigma<sup>®</sup> (lote: 31K1558). Foi utilizado álcool etílico absoluto (Dinâmica<sup>®</sup>, Brasil) e água

purificada pelo sistema de osmose reversa (Gehaka<sup>®</sup>) na preparação das amostras para a análise de doseamento.

### **Obtenção do complexo de inclusão $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD**

Quantidades equimolares (1:1 mol) de  $\beta$ -lap e HP $\beta$ CD foram pesadas e solubilizadas separadamente sob agitação mecânica, utilizando como solvente álcool etílico e água purificada, respectivamente. Após completa solubilização as soluções foram misturadas originando uma solução hidroalcoólica que permaneceu sob agitação em agitador oscilante durante 24h antes da secagem por atomização em *spray drier* (LabPlant SD-O5) nas seguintes condições: temperatura de entrada de 145°C, temperatura de saída de 80  $\pm$  5°C, velocidade do fluxo de ar de 40 - 50 m<sup>3</sup>/h, velocidade do fluxo da solução de 400 mL/h e pressão de ar de atomização de 1,1  $\pm$  2 bar. O complexo resultante foi tamisado em malha de 200  $\mu$ m.

### **Obtenção da dispersão sólida $\beta$ -lap:PVP K-30**

A dispersão sólida contendo  $\beta$ -lapachona com PVP K-30 foi preparada na concentração de 20% de  $\beta$ -lapachona (p/p) em relação ao polímero, através do método de evaporação do solvente de solubilização, álcool etílico, sob temperatura controlada (55°C  $\pm$  5 °C) e pressão reduzida (-800mbar  $\pm$  20mbar) com agitação contínua de 90  $\pm$  3rpm, havendo uma precipitação da  $\beta$ -lapachona juntamente com o polímero (Evaporador rotativo Fisatom<sup>®</sup>, 802). A dispersão resultante foi congelada a -4°C por 5 dias e posteriormente liofilizada (pressão de 80 a 150  $\mu$ Hg; temperatura -40°C  $\pm$  5°C; vácuo 220  $\pm$  2 Vca) (Liofilizador L101 Liobras<sup>®</sup> com bomba acoplada para alto vácuo de 2 etapas IP 21 Liobras<sup>®</sup>). Após a secagem a dispersão foi pulverizada e tamisada em malha de 250  $\mu$ m.

### **Obtenção das suspensões amostra**

A suspensão base utilizada no estudo foi formulada com carboximetilcelulose (CMC 1000 a 2000), sorbitol 70%, dióxido de silício coloidal utilizando água como veículo e mantida em vidro âmbar, armazenada em geladeira ao abrigo da luz. Esta suspensão base foi utilizada como placebo, controle negativo, e veículo para incorporação dos produtos a serem avaliados: dispersão sólida, complexo de inclusão e Paclitaxel<sup>®</sup> (Taxol), controle positivo. As suspensões medicamentosas foram preparadas diariamente utilizando quantidades dos produtos complexados suficientes para obtenção da concentração de 20mg/Kg de  $\beta$ -lapachona e no caso do controle positivo (Paclitaxel<sup>®</sup>) 100mg/Kg de taxol.

### **Estudo *in vitro* - Ensaio de dissolução**

Com o intuito de avaliar a velocidade e a taxa de dissolução foi realizado um estudo dos perfis de dissolução dos produtos intermediários obtidos pelos métodos de dispersão sólida e complexo de inclusão, antes de serem incorporados na suspensão base para administração *in vivo*. Os perfis de dissolução *in vitro* foram realizados em dissolutor Varian VK 7010 com velocidade de 75 rpm, aparato 2 (pá), temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C, utilizando 900 mL da água purificada como meio de dissolução. A quantidade da amostra foi o equivalente a 25 mg de  $\beta$ -lapachona, mantendo as condições *sink* do estudo. Os intervalos de coleta foram de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, onde se procedeu à filtração em membrana 0,45  $\mu$ m e adequada diluição para quantificação do teor dissolvido de  $\beta$ -lapachona por espectroscopia no UV a 256 nm utilizando metodologia anteriormente validada (Espectrômetro Varian<sup>®</sup>, Unity plus-300MHz) [16]. Foi efetuada a reposição do meio de dissolução com o mesmo volume retirado em cada tempo. Todos os ensaios foram efetuados em quadruplicata.

### **Estudo *in vivo***

Foram utilizados 24 camundongos albinos da linhagem *Swiss*, machos, com idade aproximada de 2 meses, pesando entre 25 e 35g, provenientes do Biotério do Instituto de Antibióticos da UFPE. Estes animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais (n=6) os quais receberam os seguintes tratamentos: G1 suspensão base (controle negativo); G2 suspensão contendo a dispersão sólida  $\beta$ -lap:PVP K-30; G3 suspensão contendo Paclitaxel<sup>®</sup> (controle positivo) e G4 suspensão contendo o complexo de inclusão  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD. Os animais permaneceram durante todo o tempo de experimento em gaiolas, sendo alimentados com ração comercial balanceada e água potável à vontade, submetidos ao controle artificial de ciclos de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro).

No primeiro dia do estudo foram inoculados 0,2 mL de solução contendo  $5 \times 10^6$ /mL de células viáveis de tumor de Ehrlich entre os coxins plantares do membro inferior direito de todos os animais, obtendo-se, assim, a implantação do tumor sólido de Ehrlich (TSE).

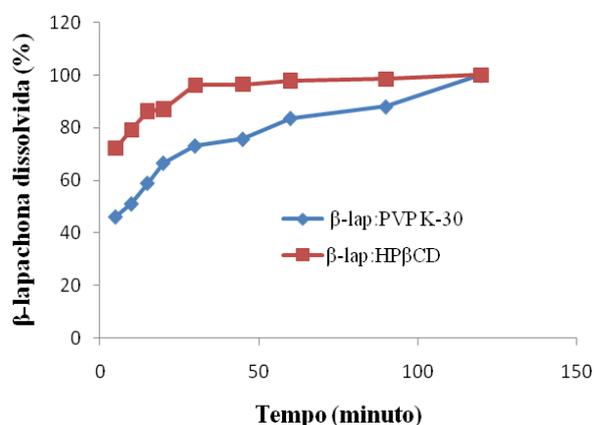
Após sete dias de administração oral das suspensões pré-estabelecidas para cada grupo, sempre no mesmo horário, os camundongos foram submetidos à anestesia geral, por via intraperitoneal, com cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina, pesados, coletados 0,7 mL de sangue com EDTA 10%, sacrificados por deslocamento cervical e necropsiados.

Para obtenção dos valores hematológicos dos animais foi utilizada contador Micros 60 Horiba<sup>ABX</sup> e integrador Diagnostics Microline 320 turbo.

À necropsia, a massa tumoral foi extraída e pesada em balança analítica. Os pesos absolutos do tumor de cada animal foram obtidos pela divisão do peso do tumor individual pela média do peso do tumor do grupo controle negativo após eutanásia.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis de dissolução dos sistemas  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:PVP K-30 mostram excelentes propriedades de dissolução, tendo ocorrido completa dissolução do fármaco durante o tempo decorrido no ensaio (Figura 1). Fato este que pode ser explicado com base na propriedade hidrossolubilizante e poder molhante da ciclodextrina e polímero utilizados, além da formação de uma nova fase sólida, originada através dos processos de complexação e dispersão, caracterizada pela perda de cristalinidade do fármaco. A maior eficiência no perfil de dissolução observada no binário  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD, apresentando um teor dissolvido aproximado de 80% com apenas 10 minutos de ensaio, está relacionada com uma maior interação química intermolecular ocorrida durante o processo de obtenção do complexo de inclusão, quando comparado com a dispersão sólida com PVP K-30. Diante do exposto, os resultados obtidos *in vitro*, referentes ao teor de dissolução, dão subsídios para utilização destes dois sistemas na realização de estudos *in vivo*.



**Figura 1.** Perfis de dissolução dos sistemas  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD e  $\beta$ -lap:PVP K-30.

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao eritograma dos grupos avaliados no estudo, ocorrendo diferença significativa entre os grupos, ( $p \leq 0,05$ ), relaciona ao número relativo de linfócitos e monócitos (Tabela 01).

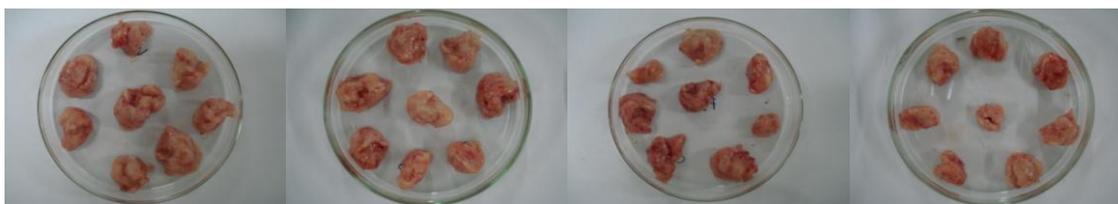
Quando comparamos percentualmente as células das linhagens imunológicas, percebemos uma discreta monocitose com linfopenia relativa no grupo tratado com o complexo de inclusão  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD. Entre as diversas hipóteses para justificar este achado estão à possibilidade de uma toxicidade seletiva a linhagem linfocítica. Outra hipótese levantada em análises preliminares está à possibilidade de uma recuperação medular pós mielosupressão pelo quimioterápico mais precoce neste grupo, visto que, a primeira linhagem a aparecer no sangue periférico nesta fase é a monocítica. Outras hipóteses podem justificar este achado, porém, um estudo mais específico e detalhado necessita ser realizado.

**Tabela 1.** Valores hematológicos.

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>F calculado</b>
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	10,25 $\pm$ 3,38	9,12 $\pm$ 2,47	9,73 $\pm$ 3,41	9,55 $\pm$ 2,54	0,44
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	5,92 $\pm$ 1,11	6,13 $\pm$ 0,81	6,04 $\pm$ 1,19	5,94 $\pm$ 1,04	0,14
Hemoglobinas (g/dl)	8,17 $\pm$ 1,49	8,17 $\pm$ 0,86	7,82 $\pm$ 1,67	8,12 $\pm$ 1,44	0,23
Hematócritos (%)	30,58 $\pm$ 5,96	31,07 $\pm$ 3,20	29,83 $\pm$ 6,63	30,95 $\pm$ 5,71	0,17
Linfócitos (%)	45,45 $\pm$ 4,84	40,28 $\pm$ 5,49	40,83 $\pm$ 6,70	34,37 $\pm$ 9,95	<b>4,75</b>
Monócitos (%)	31,18 $\pm$ 5,07	37,93 $\pm$ 3,92	37,48 $\pm$ 2,85	41,55 $\pm$ 3,61	<b>16,21</b>
Granulócitos (%)	21,28 $\pm$ 6,05	21,43 $\pm$ 3,63	20,73 $\pm$ 4,32	24,03 $\pm$ 6,28	0,73

\* F<sub>(0,95; 3,20)</sub>: 3,098

Na necropsia, macroscopicamente, os tumores, independente do grupo avaliado, apresentaram-se semelhantes, esbranquiçados e infiltrados nos tecidos adjacentes (Figura 2).



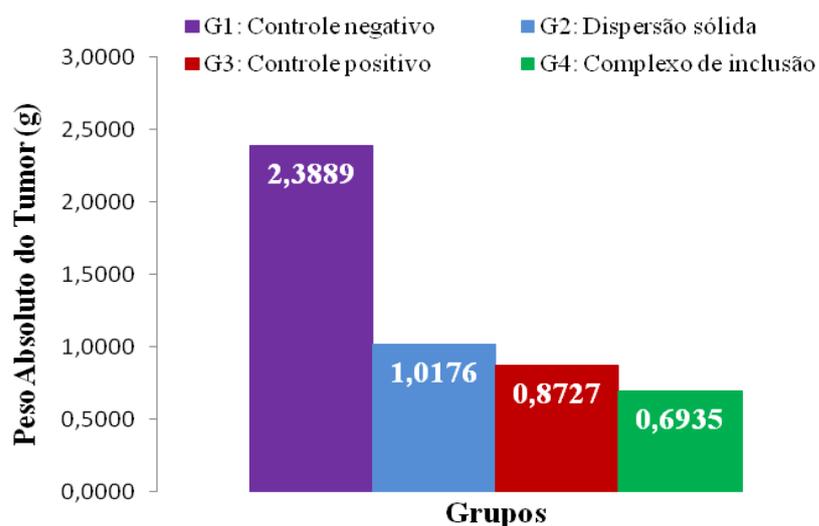
**Figura 2.** Massa tumoral: 1) Controle negativo, 2) Dispersão sólida, 3) Controle positivo e 4) Complexo de inclusão.

Porém, foi observada diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos ( $p \leq 0,05$ ) no peso absoluto dos tumores (f calculado: 219,56 - F<sub>0,95; 3,20</sub>: 3,098).

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados, independente do tratamento, dispersão sólida  $\beta$ -lap:PVP K-30, controle positivo ou complexo de inclusão  $\beta$ -lap:HP $\beta$ CD ( $p \leq 0,05$ ) (f calculado: 7,696 - F<sub>0,95; 2,15</sub>: 3,682).

Os resultados sugerem uma melhor eficiência na inibição tumoral da  $\beta$ -lapachona complexada com a HP $\beta$ CD por ter sido o grupo que apresentou a menor média para o peso absoluto dos tumores, apresentando-se diferente estatisticamente aos demais grupos, inclusive quando comparado apenas com o controle positivo ( $p \leq 0,05$ ) (f calculado: 6,380 - F<sub>0,95; 1,10</sub>: 4,965) (Figura 3).

Deve ser ressaltado que a avaliação do peso tumoral absoluto realizada conforme o protocolo utilizado está sujeita a um grande número de interferências, tais como a existência de processo inflamatório e de edemas nas regiões periféricas à massa tumoral, que podem interferir na adequada avaliação do peso, não proporcionando uma aferição conclusiva.



**Figura 3.** Peso absoluto dos tumores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. D'ALBUQUERQUE, I. L. Termorreação da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. *Revista do Instituto de Antibiótico*. Recife/UFPE. 8 (1/2): 73-87. 1968.
2. PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, 1984. 6V.
3. OLIVEIRA, A.B., RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; ZANI, C. L.; FERREIRA, D. T.; MAIA, J. G. S.. Estruturas químicas e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. *Química Nova*, v. 13, nº4, p. 302-07, 1990.
4. KHAN, R. M.; MLUNGWANA, S. M. 5-hydroxylapachol: A cytotoxic agent from *Tectona grandis*. *Phytochemistry*. 50:4. Feb,1999.
5. MORRINSON, R. K.; BRONW, D. E. OLESON, J. J.; CONEY, D. A. Oral toxicology studies with Lapachol. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 17: 01-11. 1970.
6. LI, C. J.; LI, Y.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Potent inhibiton of tumor survival *in vivo* by  $\beta$ -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 96, p. 13369-74. Nov,1999.
7. GUPTA, D.; PODAR, K.; TAI, Y.; LIN, B.; HIDESHIMA, T.; AKIYAMA, M.; LEBLANC, R.; CATLEY, L.; MITSIADES, N.; MITSIADES, C.; CHAUHAN, D.; MUNSHI, N. C.; ANDERSON, K. C..  $\beta$ -lapachona, a novel plant produt, overcome drug resistance in human multiple myeloma cells. *Experimental Hematology*. nº 30, p. 711-720, 2002.
8. CARVALHO, C.E.M.; FERREIRA, V. F.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; HARRISON, W.. Heterocycles derivatives from natural occurring naphthoquinones: synthesis, characterization and x-ray structure of  $\beta$ -lapachona hydrazo compounds. *Dyes and Pigments*. nº 52, p. 209-14, 2002.

9. BOOTHMAN, D.A.; TRASK, D.K.; PARDEE, A.B. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by  $\beta$ -lapachone, an activator of topoisomerase I. *Cancer Research*. 49:605-612. Feb, 1989.
10. LI, C. J.; WANG, C. & PARDEE, A. B. Induction of apoptosis by  $\beta$ -lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Research*. 55:3712-15. Sept, 1995.
11. PLANCHON, S. M.; WUERZBERGER, S.; FRYDMAN, B. WITIAK, D. T.; HUTSON, P.; CHURCH, D. R.; WILDING, G.; BOOTHMAN, D. A.  $\beta$ -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.
12. DAGLI, M.L.Z. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 1989. 148f.
13. DAGLI, M.L.Z.; GUERRA, J.L.; SALDIVA, P.H.N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.29, p.97-103, 1992a.
14. DAGLI, M.L.Z.; SOMA, M.; GUERRA, J.L. et al. Lymphatic dissemination in neoplasia: determination of nuclear volume and DNA content of primitive and regional lymph node Ehrlich tumor cells. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.29, p.267-2671, 1992b.
15. EHRLICH, P. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. *Arb. Inst. Exp. Ther. Frankfurt*, v.1, p. 78-80, 1906.
16. PRESMICH, G.M.A.; ROLIM, L.A.; CAVALCANTI, O.R.B.R., SILVA, KER & ROLIM-NETO, P.J. Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação da  $\beta$ -lapachona por espectrofotometria no ultravioleta, 2009. (Aceito para publicação na revista *Latin American Journal of Pharmacy*).

## ***Conclusão***

### *Conclusão*

O método desenvolvido para quantificação  $\beta$ -lapachona por espectrofotometria no UV demonstrou-se robusto, linear, sensível, preciso e exato garantindo a qualidade da análise e assim as boas práticas de laboratório e fabricação.

Os resultados obtidos indicam que o uso do PVP K-30 e PEG 4000, polímeros hidrofílicos, como carreadores na formação de dispersões sólidas, melhora a solubilidade em água da  $\beta$ -lapachona. De acordo com as análises realizadas a melhor opção para a formação de uma dispersão sólida com interações químicas e físicas entre a  $\beta$ -lapachona e o PVP K-30 ocorreu na concentração de 20% de  $\beta$ -lapachona, o que foi confirmado através do ensaio de dissolução. Quando utilizado o PEG como carreador a concentração 20% de  $\beta$ -lapachona também foi à dispersão que apresentou melhor resultado com o menor aporte total do produto para atingir uma determinada concentração terapêutica. Estes binários apresentaram significativas alterações térmicas, espectrais e morfológicas, assim como maior solubilidade aquosa e teor dissolvido, quando comparados à  $\beta$ -lapachona isolada e a suas respectivas misturas físicas.

As três ciclodextrinas estudadas ( $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD) demonstraram, através do estudo de solubilidade de fases, capacidade de formação de complexos de inclusão em solução com a  $\beta$ -lapachona, com estequiometria de 1:1 (mol:mol). Os processos de obtenção por secagem por atomização para as três ciclodextrinas e co-evaporação para a HP $\beta$ CD e M $\beta$ CD, revelaram-se adequados para a formação de complexos no estado sólido com a  $\beta$ -lapachona. Estes complexos apresentaram, além da redução no tamanho de partículas, uma perda do estado cristalino devido às possíveis interações químicas ocorridas entre o fármaco e as ciclodextrinas.

## *Perspectivas*

## **PERSPECTIVAS**

- Foi iniciada a elaboração de artigo científico referente à caracterização físico-química da  $\beta$ -lapachona frente a sua atividade biológica;
- Foi iniciado, aguardando conclusão do estudo de metodologia computacional com os complexos de inclusão (em anexo);
- Foi iniciado, aguardando conclusão dos estudos de RMN<sup>1</sup>H e RMN de sólidos para as dispersões sólidas e complexos de inclusão;
- Obtenção e caracterização de complexos de inclusão multicomponentes;
- Realização de estudos de estabilidade das misturas físicas, dispersões sólidas, complexos de inclusão binários e multicomponentes;
- Desenvolvimento tecnológico e caracterização de forma farmacêutica sólida (cápsula ou comprimido) a base de  $\beta$ -lapachona, a partir das dispersões sólidas e/ou complexos de inclusão;
- Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para o doseamento e dissolução da forma farmacêutica sólida (cápsula ou comprimido) obtida;
- Avaliação da estabilidade acelerada e de longa duração (em câmaras climáticas) das formulações desenvolvidas;
- Aprofundamento da investigação toxicológica pré-clínica da  $\beta$ -lapachona complexada em modelos animais.

## *Referências Bibliográficas*

**Referências Bibliográficas**

1. Hooker, SC. Lomatiol. Part II. Its Occurrence, Constitution, Relation to and Conversion into Lapachol. Also a Synthesis of Lapachol. J Am Chem Soc 58:1181-1190. 1936.
2. D'Albuquerque, IL. Termorreação da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. Rev Inst Antibióticos. UFPE. 8 (1/2): 73-87. 1968.
3. Alves, CGB; Lopes, RSC; Lopes, CC; Snieckus, V. Two expedient synthesis of beta-Lapachone. Synthesis-Stuttgart. 11(11): 1875-1877. 1999.
4. D'Albuquerque, IL; Maciel, MCN; Schuler, ARP; Araújo, MCM; Maciel, GM; Cavalcanti, MAB; Martins, DG; Lacerda, AL. Preparação e primeiras observações sobre as atividades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogas inferiores da série da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol). Rev Inst Antibióticos. UFPE. 12 (1/2): 31-40. 1972.
5. Lima, OG; Albuquerque, I; Lima, CG; Maia, MH. 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 avellanae* Lor. ex Griseb. Rev Inst Antibióticos. UFPE. 4:3-17. 1962.
6. Schuerch, AR; Wehrli, W.  $\beta$ -Lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polimerase- $\alpha$ . Eur. J. Biochem. 84:197-205. 1978.
7. Guiraud, P; Steiman, R; Takaki, GMC; Murandi, FS; Buochberg, MS. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and  $\beta$ -lapachone. Planta Medica 60: 373-4. 1994.
8. Boveris, A; Stoppani, AOM; Docampo, R; Cruz, F. Superoxide anion production and trypanocidal action of naftoquinones on *Trypanossoma cruzi*. Comp Biochemistry and Physiology. 61:327-329. 1978.
9. Fávoro, OCN; Oliveira, MM; Rossini, MMA; Kamakura, CR; Pinto, AV; Pinto, MCFR. Seleção por meio de células KB de substâncias e extratos potencialmente ativos em quimioterapia do câncer. Anais da Academia Brasileira. Ci. 62(3): 217-24. 1990.
10. Docampo, R; Cruz, FS; Boveris, A; Muniz, RP; Esquivel, DM. Beta-Lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascite tumor cells. Biochem Pharmacol 28:723–728. 1979.
11. Schaeffner-Sabba, K; Schmidt-Ruppin, KH; Wehrli, W; Schuerch, AR; Wasley, JWF.  $\beta$ -Lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. Journ of Medicinal Chemistry. 27(8): 990-994. 1984.

**Referências Bibliográficas**

12. Boothman, DA; Greer, S; Pardee, AB. Potentiation of halogenated pyrimidine radiosensitizers in human carcinoma cells by beta-lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran- 5,6-dione), a novel DNA repair inhibitor. *Cancer Res* 47:5361–5366. 1987.
13. Li, C J; Wang, C & Pardee, A B. Induction of apoptosis by  $\beta$ -lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 55: 3712-15. 1995.
14. Di Gianni, P; Franco, M; Bustuoabad, O D; Ruggiero, R.  $\beta$ -Lapachona: una naftoquinona com actividad antitumoral in vivo. *Boletín de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. Buenos Aires.* 75(1): 145-52. 1997.
15. Li, CJ; Averboukh, L; Pardee, AB. Beta-lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem* 268:22463–22468. 1993.
16. Planchon, SM; Wuerzberger, S; Frydman, B; Witiak, DT; Hutson, P; Church, DR; Wilding, G; Boothman, DA.  $\beta$ -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic Leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: A p53-independent response. *Cancer Res.* 55: 3706-3711. 1995.
17. Frydman, B; Marton, LJ; Sun, JS; Neder, K; Witiak, DT; Liu, AA; Wang, HM; Mao, Y; Wu, HY; Sanders, MM; Liu, LF. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by beta-lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Res* 57:620–627. 1997.
18. Li, C J; Li, Y; Pinto, AV; Pardee, AB. Potent inhibitor of tumor survival *in vivo* by  $\beta$ -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 96: 13369-74. 1999.
19. Don, MJ; Chang, YH; Chen, KK; Ho, LK; Chau, YP. Induction of CDK Inhibitors (p21WAF1 and p27Kip1) and Bak in the  $\beta$ -Lapachone-Induced Apoptosis of Human Prostate Cancer Cells. *Mol Pharmacol* 59:784–794. 2001.
20. Pardee, AB; Li, YZ; Li, CJ. Cancer therapy with beta-lapachone. *Curr Cancer Drug Targets* 2:227–242. 2002.
21. Boothman, DA; Trask, DK; Pardee, AB. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by  $\beta$ -lapachone, an activator of topoisomerase I. *Cancer Res.* 49:605-612. 1989.
22. Lai, CC; Liu, TJ; Ho, LK; Don, MJ; Chau, YP. Beta-Lapachone induced cell death in human hepatoma (HepA2) cells. *Histol Histopathol* 13:89–97. 1998.

**Referências Bibliográficas**

23. Chau, YP; Shiah, SG; Don, MJ; Kuo, ML. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radical Biol Med* 24:660–670. 1998.
24. Shiah, SG; Chuang, SE; Chau, YP; Shen, SC; Kuo, ML. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res* 59:391–398. 1999.
25. Tzeng, H-P; Ho, F-M; Chao, K-F; Kuo, M-L; Lin-Shiau, S-Y; Liu, S-H.  $\beta$ -Lapachone Reduces Endotoxin-induced Macrophage Activation and Lung Edema and Mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 168:85–91. 2003.
26. Krishnan, P; Bastow, KF. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives alphalapachone and beta-lapachone. *Cancer Chemother Pharmacol* 47:187–198. 2001.
27. Santana, CF.; Gonçalves de Lima, O; D'Albuquerque, IL.; Lacerda, AL; Martins, D.G. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do Pau d'Arco (*Tabebuia avellanedae*). *Rev Inst Antibióticos. UFPE.* 8( 1-2):3-17. 1968.
28. Castro, MS; Oliveira, AB; Silva, EA. Toxicidade aguda das naftoquinonas:  $\beta$ -lapachona. In: 50ª Reunião Anual da SBPC – Resumos. p. 1199. 1998.
29. Sousa, MRQ. Estudos dos efeitos da  $\beta$ -lapachona sobre células da linhagem Hep-2 carcinoma de Erlich e sarcoma 180. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2000.
30. Alves, FC. Desenvolvimento de formas farmacêuticas a partir de  $\beta$ -lapachona para utilização em terapias antineoplásicas. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, 2002.
31. ALVES, GMC. Otimização da tecnologia de obtenção das formas farmacêuticas suspensão e cápsulas à base de  $\beta$ -lapachona. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, 2004.
32. YOUSSEF, CH. Desenvolvimento da forma farmacêutica injetável a partir da  $\beta$ -lapachona e ensaios preliminaries in vivo. Disertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

***Referências Bibliográficas***

33. Chiou, WL; Riegelman, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 60(9): 1281-1302. 1971.
34. Serajuddin, A. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 88: 1058–1066. 1999.
35. Duchêne, D; Wouessidjewe, D; Ponchel, G. Cyclodextrins and carrier systems. *Journal of Controlled Release*. 62: 263-268. 1999.
36. Trapani, G; Cutrignelli, A; Latrofa, A; Franco, M; Serra, M; Psiu, MG; Biggio, G; Liso, G. Valproic acid-hydrophilic cyclodextrin complexes and valproic acid-solid dispersions: evaluation of their potential pharmaceutical use. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 30(1): 53-64. 2004.
37. Britto, MAFO; Júnior, CSN; Santos, H F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. *Química. Nova*. 27(6): 882-888. 2004.

*Anexos*



UNIVERSIDADE DE COIMBRA  
FACULDADE DE FARMÁCIA

## PARECER

A Dra. Geisiane Maria Alves Presmich, realizou durante 10 semanas, trabalhando mais de 12 horas diárias, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra um extenso trabalho experimental sobre a complexação de fármacos e sua caracterização físico-química.

Foram disponibilizados todos os meios materiais necessários ao desenvolvimento das diferentes composições farmacêuticas bem como os respectivos equipamentos.

Devo salientar que a Dra. Geisiane Presmich adquiriu muito rapidamente autonomia no uso das técnicas e equipamentos envolvidos nos estudos, sendo em alguns casos a primeira vez que teve oportunidade em os utilizar.

Os resultados obtidos foram muito promissores face aos objectivos inicialmente estabelecidos para o estágio de 10 semanas.

Associando à qualidade do trabalho efectuado, a dedicação, o entusiasmo e o espírito crítico da Dra. Geisiane Presmich, somos de parecer que o estágio foi totalmente aproveitado pela aluna no estudo das tecnologias de complexação de fármacos com ciclodextrinas.

Deste modo, considero que o estágio realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia de Coimbra, foi altamente proveitoso para a aluna e para a instituição a que pertence, já que teve a oportunidade de experimentar tecnologias não instaladas no Laboratório onde trabalha, podendo assim, devido a competência que possui, transferi-las de modo fácil e com conhecimento consistente.

Coimbra, 15 de Fevereiro de 2008

Prof. Doutor Francisco José Baptista Veiga  
Professor Associado com Agregação  
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

## **BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**

### **RECIBO**

**Nº de Registro: 112/09**

Acusamos o recebimento do trabalho para publicação no **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.

AUTORIA: ALVES, L. D. S.; LYRA, M. A. M.; ROLIM, L. A.; PRESMICH, G. M. A.; ROLIM-NETO, P. J.

Título do artigo: “Advances, properties and applications of the solid dispersions in the pharmaceutical products attainment”

São Paulo, 12 de novembro de 2009.

Profa. Elizabeth Igne Ferreira  
Editoria Científica

## *Comprovante de submissão de artigo*

Citando Latin American Journal of Pharmacy <[info@latamjpharm.org](mailto:info@latamjpharm.org)>:

November 20th, 2009

Pedro José Rolim-Neto

Universidade Federal de Pernambuco ([pedro.rolim@pq.cnpq.br](mailto:pedro.rolim@pq.cnpq.br))

Manuscript Identification Number: LAJP 1768-09

Dear author:

I am glad to inform you that your article 'Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação do Fármaco Anti-neoplásico b-lapachona por espectrofotometria' by Geisiane Maria A. Presmich, Larissa A. Rolim, Otávio R.B.R. Cavalcanti, Pedro José Rolim Neto has been accepted for publication in Latin American Journal of Pharmacy. In due moment you will receive the page proof consigning the issue where your article will be included.

Many thanks for your interest in our journal.

Reviewer's comments: The revised version is suitable for being published in Lat. Am. J. Pharm.

Yours sincerely,

Prof. Néstor O. Caffini,

Editor Latin American Journal of Pharmacy

E-mail: [caffini@biol.unlp.edu.ar](mailto:caffini@biol.unlp.edu.ar)

## *Comprovante de submissão de artigo*

----- Mensagem encaminhada de International Journal of Pharmaceutics

<[ijp@elsevier.com](mailto:ijp@elsevier.com)> -----

Data: 21 Dec 2009 17:00:25 +0100

De: International Journal of Pharmaceutics <[ijp@elsevier.com](mailto:ijp@elsevier.com)>

Reponder para: International Journal of Pharmaceutics <[ijp@elsevier.com](mailto:ijp@elsevier.com)>

Assunto: Editor Handles IJP-D-09-00852

Para: [pedro.rolim@pq.cnpq.br](mailto:pedro.rolim@pq.cnpq.br)

Dear Dr. Rolim-Neto,

Your submission entitled "Characterization of inclusion complexes developed with  $\beta$ -lapachone and  $\beta$ -cyclodextrins" will be handled by editor Diane Burgess, Ph.D..

You may check on the progress of your paper by login on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ijp/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

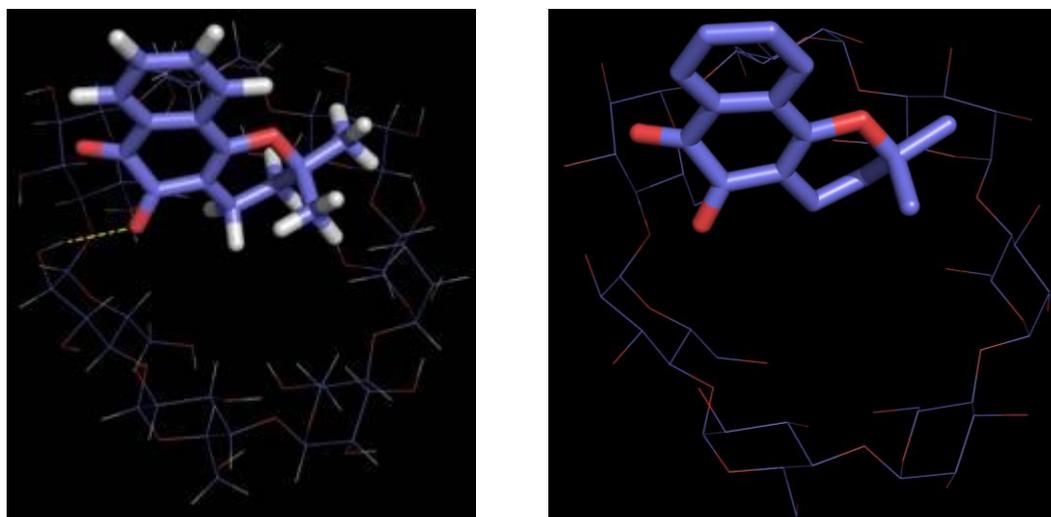
Elsevier Editorial System  
International Journal of Pharmaceutics

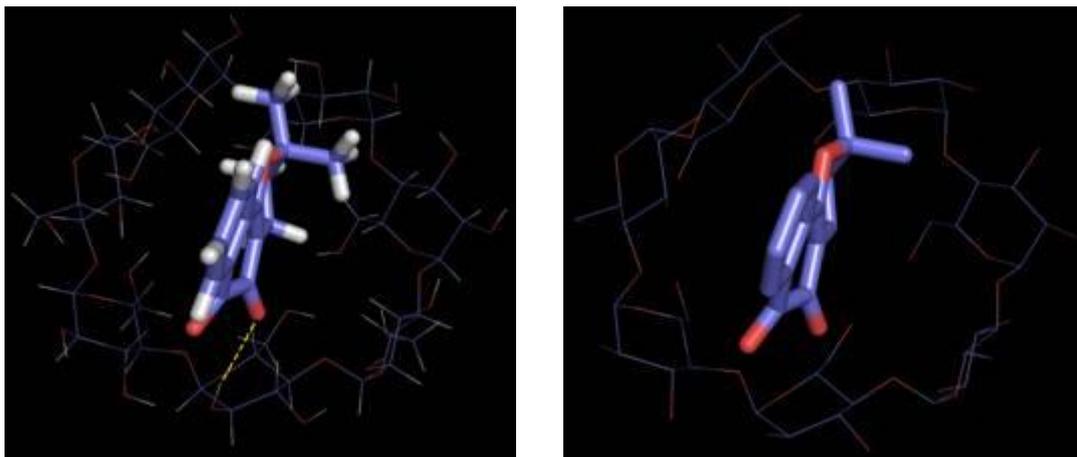
## Modelagem Molecular

As estruturas do complexo Beta-Lapachona...Beta-Ciclodextrina (BL...BCD) e dos monômeros isolados (BL e BCD) foram otimizadas com o método de química quântica semi-empírico RM1 [Rocha, G.B.; Freire, R.O.; Simas, A.M.; Stewart, J. P.; *Journal of Computational Chemistry*, 27(10), 1101-1111, 2006]. Todos os cálculos foram executados pelo programa SPARTAN'08 versão 1.0.0. O valor da energia de interação ( $\Delta E$ ) foi determinado pela aproximação da supermolécula, onde se subtrai as energias dos monômeros (BL e BCD) da energia do complexo (BL...BCD), ou seja,  $\Delta E = E_{(BL...BCD)} - E_{(BL)} - E_{(BCD)}$ , onde E é a energia RM1 de cada molécula ou supermolécula otimizada.

## Resultados

O resultado mais estável encontrado para o complexo BL...BCD pode ser observado na Figura X. O valor da energia de interação ( $\Delta E$ ) é de 3,15 Kcal.mol<sup>-1</sup>, onde a principal interação observada é uma ligação de hidrogênio de 2,56 Å entre uma hidroxila da BCD e uma das carbonilas da BL, como está destacado na Figura X. Esta interação é a principal responsável pela estabilização energética do complexo BL...BCD.





**Figura X.** Geometria do complexo mais estável BL...BCD obtida através dos cálculos semi-empíricos RM1. São apresentados 2 ângulos de visão diferentes e, em cada caso, a figura com e sem os hidrogênios. A linha tracejada representa a ligação de hidrogênio intermolecular.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA**

Teresina, 21 de Dezembro de 2009

Venho por meio deste declarar que o Professor José Lamartine Soares Sobrinho deu entrada no processo de patenteamento da invenção intitulada “**DISPERSÕES SÓLIDAS DE B-LAPACHONA EM POLIVINILPIRROLIDONA K-30 E POLIETILENOGLICOL 4000 PARA MELHORA DA SOLUBILIDADE AQUOSA**” no dia 21 de dezembro de 2009 no *Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia (NITEC)* da **Universidade Federal do Piauí (UFPI)**.

Esta proposta de patente possui vinculação com a Universidade Federal do Piauí (Teresina - Brasil) e Universidade Federal de Pernambuco (Recife – Brasil), e possui como autores:

- 1 – Geisiane Maria Alves Presmich - UFPE
- 2 – José Lamartine Soares Sobrinho - UFPI
- 3 – Pedro José Rolim Neto - UFPE
- 4 – Larissa Araújo Rolim - UFPE

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em azul sobre uma linha horizontal.

Funcionário do *NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA* da UFPI