

- FREIRE, S.M.; EMIM, J.A.S.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; TORRES, L.M.B. Analgesic and antiinflammatory properties of *Scoparia dulcis* L. extracts and glutinol in rodents. *Phytother. Res.*, v. 7, n.6, p.408-14, 1993.
- JOLY, A.B. *Botânica. Introdução à taxonomia vegetal*. 5.ed. São Paulo: Nacional, 1979. 777p.
- KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. 1054p.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E.J. Acetic for analgesic screening. *Fred. Proc.*, v.18, p.412, 1959.
- KUMAR, V.L.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. *J. Ethnopharmacol.*, v.44, n. 2, p.123-5, 1994.
- MOSSA, J.S.; TARIQ, M.; MOUSIN, A.; BAGEEL, A.M.; AL-YAHYA, M.A.; AL-SAID, M.S.; RAFATULLANH, S. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. *Am. J. Chin. Med.*, v.19, n.3/4, p.223-31, 1991.
- OLIVEIRA, A.V. *Contribuições para o estudo químico da espécie C. Procera R. Br. (Asclepiadaceae)*. 2000. 54f. Monografia (Química Industrial) – Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2001.
- RAMABADRAN, K.; BASINATH, M.; TURNDORF, H.; PUIG, M.M. Tail immersion test for the evaluation of a nociceptive reaction in mice. Methodological considerations. *J. Pharmacol. Methods*, v.21, p.21-31, 1989.
- RASIKA, A.M.; RAGHUBIR, R. GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESHTHA, D.K. Healingi potencial of *Calotropis procera* on dermal wounds in guinea pigs. *J. Ethnopharmacol.*, v.68, n.1/3, p.261-6, 1999.
- SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R. Tropical rain forests: potential source of new drugs? *Persp. Biol. Med.*, v.32, n.2, p.244-56, 1989.
- VACHER, J.; DUCHÊNE-MARULLAZ, P.; BARRAT, P. A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. *Med. Exp.*, v.11, p.51-8, 1964.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.143, p.711-4, 1973.
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in haind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.111, p.544-47, 1962.

# AValiação DO MÉTODo DE DOSEAMENTO DE INdINAVIR POR MEIO DE HPLC

Marcio FERRARINI; Irene Satiko KIKUCHI; Rosa Noriko YAMAMOTO; Terezinha de Jesus Andreoli PINTO\*  
 Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.  
 Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – bloco 13A - Cidade Universitária. 05508-900 São Paulo – SP, Brasil.  
 Autor responsável E-mail: tjapinto@usp.br

## INTRODUÇÃO

O tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) tem mostrado grande evolução, a partir de 1983-84, quando se deu a identificação da etiologia ser virótica<sup>1,13,19</sup>. No princípio, foi utilizada a droga zidovudine<sup>6</sup> e depois, uma combinação com nucleosídeos análogos<sup>5,12</sup>, que foram desenvolvidos, em função dos nucleosídeos naturais necessários à replicação dos vírus<sup>20</sup>. Recentemente, tem sido aplicada aos pacientes uma combinação de drogas que têm como alvo a protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV)<sup>8</sup>.

A introdução dos inibidores de protease do HIV foi feita, a partir de 1996, para uso em combinação com os inibidores da transcriptase reversa do vírus<sup>10</sup> e os compostos foram desenvolvidos por meio da técnica de modelagem molecular, baseando-se na estrutura cristalina da protease do vírus. Os inibidores de protease são moléculas grandes e lipofílicas, sendo metabolizados e eliminados do organismo, principalmente pela ação da isoenzima CYP3A4 do citocromo P-450<sup>2</sup>. Porém, esta enzima é responsável pela grande variabilidade entre os indivíduos e, fármacos utilizados em associações podem inibir ou induzir a inativação de uma

das drogas<sup>20</sup>, como é o caso do indinavir, um dos primeiros inibidores da protease. Pertencem também a este grupo o saquinavir, ritonavir e nelfinavir<sup>10</sup>.

Tratamentos que se mostraram promissores continham dois inibidores de proteases<sup>14,17</sup> e quando as enzimas do citocromo P450 eram inibidas, aumentaram os níveis plasmáticos das drogas, produzindo efeito antiviral<sup>5,16,24</sup>.

Indinavir, hidrato de sulfato de N-(2(R)-hidroxi-1(S)-indanil)-2(R)-(fenilmetil)-4(S)-hidroxi-5-[1-[4-(3-piridimilmetil)-2(S)-(N-terc-butilcarbamoil)piperazinil]]-pentanamida (FIGURA 1)<sup>11</sup> é um inibidor específico e potente da protease do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Em cultura de células, o composto interferiu na replicação do vírus, resultando na produção de partículas virais imaturas e não infecciosas<sup>4,9</sup>.

Estudos clínicos envolvendo pacientes infectados com HIV<sup>7,8</sup> demonstraram que a combinação de indinavir e nucleosídeos análogos foi eficiente na diminuição do nível de RNA viral no sangue. O indinavir apresentou uma meia vida de cerca de 2 horas e um perfil farmacocinético não linear devido ao seu metabolismo oxidativo dose-dependente<sup>18,26</sup>.



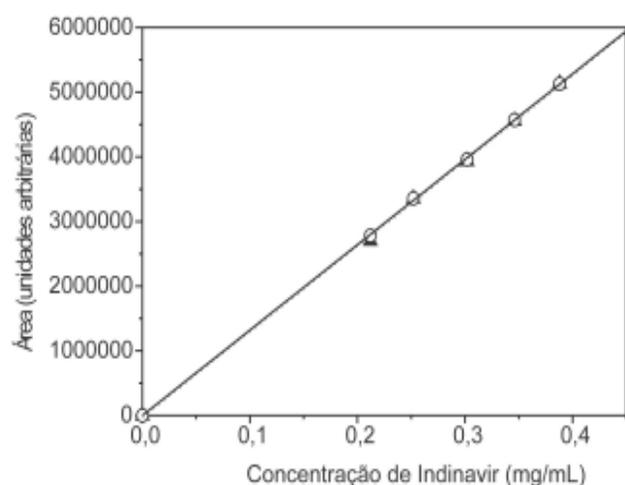
a faixa de concentração do teste entre 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL. O efeito da matriz na linearidade da curva de calibração foi estudado pela adição de excipientes comumente utilizados pelas indústrias. A massa de excipiente utilizada foi de aproximadamente 11,5 mg e cada concentração foi avaliada em triplicata, com cada réplica analisada em triplicata também.

Para determinação do tempo de retenção da matéria-prima de indinavir, foram realizados estudos para avaliação da influência das substâncias consideradas impurezas que podem eventualmente contaminar um lote, sendo estas, o aminoindanol, piperazina bis-alquilada e lactona. Para tal, foi preparada uma solução com concentração final de 5 µg de cada uma destas substâncias.

## Resultados e discussão

A metodologia utilizada foi baseada na monografia constante no Fórum da Farmacopéia americana, edição de 2001<sup>23</sup>, para matéria-prima de sulfato de indinavir, com adaptações para as condições do laboratório e produto final na forma farmacêutica de cápsulas.

Um estudo prévio do espectro de indinavir em fase móvel confirmou que em 260 nm, a substância apresentava absorvância significativa como recomendado pelo Fórum da Farmacopéia americana<sup>23</sup>. Conforme pode ser observado na FIGURA 2, a presença de impurezas não interferiu no tempo de retenção do indinavir nem apresentou sobreposição entre si, demonstrando ser um método preciso e específico. A exatidão do método foi demonstrada pelos resultados da Tabela 1 referentes ao teste de recuperação das amostras que apresentou variação de 99,8 a 103,6% para a série de concentrações testadas.

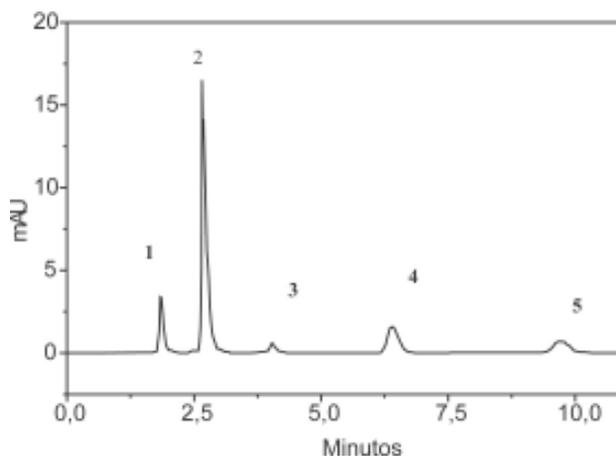


**FIGURA 2** - Efeito da matriz na linearidade da curva de calibração de indinavir. (○) e (●) representam amostras de Indinavir sem e com excipientes, respectivamente. (.....) Curva de calibração de Indinavir matéria-prima sem excipientes, cuja equação foi  $y = -233392 + 1,32 \times 10^7 x$ , onde coeficiente de correlação  $r^2 = 0,9997$ . (—) Curva de calibração de Indinavir matéria-prima com excipientes, cuja equação foi  $y = -1611 + 1,32 \times 10^7 x$ ,  $r^2 = 0,99$

**TABELA 1** – Teste de recuperação das amostras

Concentração das amostras (em % da concentração nominal de 400 mg de princípio ativo)	Recuperação média (em %)	Recuperação Intermediária média (em %)
70	103,60 ± 2,30	100,20 ± 0,07
100	100,80 ± 0,01	100,17 ± 0,27
130	99,80 ± 2,60	100,08 ± 0,09
Recuperação média global:	101,4 ± 2,4	100,15 ± 0,06

As equações das curvas de calibração da FIGURA 3 foram obtidas pela relação da área do pico obtido em função da concentração nominal do indinavir. Para esta determinação foram utilizadas concentrações da faixa de 0,2 a 0,4 mg/mL do fármaco e as equações, obtidas por regressão linear. As equações das retas (a) e (b) são coincidentes, correspondendo, respectivamente, às amostras sem e com excipientes, além dos coeficientes de correlação terem sido superiores a 0,999. Como esperado, não foi observada interferência dos excipientes na determinação da curva de calibração do indinavir e as curvas de calibração mostraram uma linearidade na faixa de concentrações testadas, isto é, 0,2 e 0,4 mg/mL.



**FIGURA 3** – Cromatograma do padrão de indinavir e impurezas comumente encontradas na matéria-prima. Onde: (1) aminoindanol, tempo de retenção ( $t_r$ ) do pico foi 1,837 min; (2) bis-alquil-piperazina,  $t_r$  - 2,658 min; (3) substância desconhecida não caracterizada,  $t_r$  - 4,032 min; (4) indinavir,  $t_r$  - 6,403 min; (5) lactona,  $t_r$  - 9,702 min.

Para calcular o teor de indinavir, apesar de parecer uma observação óbvia, foi importante, determinar a potência do padrão, considerando-se os teores de etanol e umidade intrínsecos. Estes valores, normalmente, são indicados pelo fabricante, porém, caso contrário, devem ser determinados pelo laboratório antes das análises.

No Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários e Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Confar), este método de doseamento tem sido utilizado, nos últimos meses, com bastante eficiência em

amostras procedentes de vários laboratórios, seja na forma de matérias-primas ou produtos finais na forma de cápsulas e um levantamento de mais de 110 amostras na forma de cápsulas apresentou teor de indinavir base de  $400,6 \pm 9,3$  mg/cápsula ou 100,2% do valor rotulado, resultado expressivo do bom desempenho do método adotado.

## Conclusão

As metodologias descritas nas edições de 2000 e 2001 do Fórum da Farmacopéia Americana<sup>22,23</sup> podem ser aplicadas para determinação de indinavir em matérias-primas e em produtos terminados na forma de cápsulas, com as adaptações e ajustes locais, mostrando-se específico, eficiente, seguro e rápido, tanto que foi testado e apresentou bons resultados em amostras de diversas origens.

Recomenda-se obter uma curva de calibração para cada conjunto de amostras a serem analisadas. Portanto, apesar das monografias para indinavir matéria-prima e produto final cápsula ainda não constarem como oficiais na Farmacopéia Americana USP 27<sup>21</sup>, a metodologia apresentou boa aplicabilidade nos produtos testados no laboratório.

## Agradecimentos

Os autores agradecem pelo auxílio na execução dos ensaios a Andréa Cristhyane Pereira e Fernanda dos Santos Sacaramel, vinculadas à Fundação Instituto de Pesquisas Farmacêuticas (Fipfarma).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRESINOSSI, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NU-GEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLERBLIN, C.; VEZINETBRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune-deficiency syndrome (AIDS). *Science*, Washington D.C., v.220, n.4599, p.868-871, 1983.
2. BARRY, M.; MULCAHY, F.; MERRY, C.; GIBBONS, S.; BACK, D. Pharmacokinetics and potential interactions amongst antiretroviral agents used to treat patients with HIV infection. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.36, n.4, p.289-304, 1999.
3. CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v.689, n.1, p.175-180, 1997.
4. DORSEY, B.D.; LEVIN, R.B.; MCDANIEL, S.L.; VACCA, J.P.; GUARE, J.P.; DARKE, P.L.; ZUGAY, J.A.; EMINI, E.A.; SCHLEIF, W.A.; QUINTERO, J.C.; LIN, J.H.; CHEN, I.W.; HOLLOWAY, M.K.; FITZGERALD, P.M.D.; AXEL, M.G.; OSTOVIC, D.; ANDERSON, P.S.; HUFF, J.R. L-735,524 - The design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J. Med. Chem.*, Washington D.C., v.37, n.21, p.3443-3451, 1994.
- 5 - ERON, J.J.; BENOIT, S.L.; JEMSEK, J.; MACARTHUR, R.D.; SANTANA, J.; QUINN, J.B.; KURITZKES, D.R.; FALLON, M.A.; RUBIN, M. Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to

500 CD4+ cells per cubic millimeter. *New Engl. J. Med.*, Waltham, v.333, n.25, p.1662-1669, 1995.

- 6 - FISCHL, M.A.; RICHMAN, D.D.; GRIECO, M.H.; GOTTLIEB, M.S.; VOLBERDING, P.A.; LASKIN, O.L.; LEEDOM, J.M.; GROOPMAN, J.E.; MILDVAN, D.; SCHOOLEY, R.T.; JACKSON, G.G.; DURACK, D.T.; KING, D. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS-related complex - a double-blind, placebo-controlled trial. *New Engl. J. Med.*, Waltham, v.317, n.4, p.185-191, 1987.
- 7 - GULICK, R.M.; MELLORS, J.W.; HAVLIR, D.; ERON, J.J.; GONZALES, C.; McMAHON, D.; RICHMAN, D.D.; VALENTINE, F.T.; JONAS, L.; MEIBOHM, A.; EMINI, E.A.; CHODAKEWITZ, J.A. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *New Eng. J. Med.*, Waltham, v.337, n.11, p.734-739, 1997.
- 8 - HAMMER, S.M.; SQUIRES, K.E.; HUGHES, M.D.; GUMES, J.M.; DEMETER, L.M.; CURRIER, J.S.; ERON, J.J.; FEINBERG, J.E.; BALFOUR, H.H.; DAYTON, L.R.; CHODAKEWITZ, J.A.; FISCHL, M.A. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *New Eng. J. Med.*, Waltham, v.337, n.11, p.725-733, 1997.
- 9 - HOETELMANS, R.M.W.; MEENHORST, P.L.; MULDER, J.W.; BURGER, D.M.; KOKS, C.H.W.; BEIJNEN, J.H. Clinical pharmacology of HIV protease inhibitors: focus on saquinavir, indinavir, and ritonavir. *Pharm. World Sci.*, Dordrecht, v.19, n.4, p.159-175, 1997.
- 10 - HUGEN, P.W.H.; VERWEIJ-VAN WISSEN, C.P.W.G.M.; BURGER, D.M.; WUIS, E.W.; KOOPMANS, P.P.; HEKSTER, Y.A. Simultaneous determination of the HIV-protease inhibitors indinavir, nelfinavir, saquinavir and ritonavir in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography B*, Amsterdam, v.727, n.1-2, p.139-149, 1999.
- 11 - JAYEWARDENE, A.L.; ZHU, F.; AWEKA, F.T.; GAMBERTOGLIO, J.G. Simple high-performance liquid chromatographic determination of the protease inhibitor indinavir in human plasma. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v.707, n.1-2, p.203-211, 1998.
- 12 - KATLAMA, C.; INGRAND, D.; LOVEDAY, C.; CLUMECK, N.; MALLOLAS, J.; STASZEWSKI, S.; JOHNSON, M.; HILL, A.M.; PEARCE, G.; MCDADE, H. Safety and efficacy of lamivudine-zidovudine combination therapy in antiretroviral-naïve patients - A randomized controlled comparison with zidovudine monotherapy. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.276, n.2, p.118-125, 1996.
- 13 - LEVY J.A.; HOFFMAN, A.D.; KRAMER, S.M.; LANDIS, J.A.; SHIMABUKURO, J.M. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San-Francisco patients with AIDS. *Science*, Washington D.C., v.225, n.4664, p.840-842, 1984.
- 14 - LORENZI, P.; YERLY, S.; ABDERRAKIM, K.; FATHI, M.; RUTSCHMANN, O.T.; VONOVERBECK, J.; LEDUC, D.; PERRIN, L.; HIRSCHL, B.; BATTEGAY, M.; BURGISER, P.; DOORLY, R.; EGGER, M.; ERB, P.; FIERZ, W.; FLEPP, M.; FRANCIOLI, P.; GROB, P.; GRUNINGER, U.; LEDERGERBER, B.; LUTHY, R.; MALINVERNI, R.; MATTER, L.; OPRAVIL, M.; PACCAUD, F.; PICHLER, W.; RICKENBACH, M.; RUTSCHMANN, O.; VERNAZZA, P. Toxicity, efficacy, plasma drug concentrations and protease mutations in patients with advanced HIV infection treated with ritonavir plus saquinavir. *AIDS*, Philadelphia, v.11, n.12, p.F95-F99, 1997.

- 15 - MERRY, C.; BARRY, M.G.; MULCAHY, F.; HALIFAX, K.L.; BACK, D.J. Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with nelfinavir in HIV-infected patients. *AIDS*, Philadelphia, v.11, n.15, p.F117-F120, 1997.
- 16 - MERRY, C.; BARRY, M.G.; MULCAHY, F.; RYAN, M.; HEAVEY, J.; TJIA, J.F.; GIBBONS, S.E.; BRECKENRIDGE, A.M.; BACK, D.J. Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with ritonavir in HIV-infected patients. *AIDS*, Philadelphia, v.11, n.4, p.F29-F33, 1997.
- 17 - MOYLE, G. The role of combinations of HIV protease inhibitors in the management of persons with HIV infection. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, London, v.7, n.3, p.413-426, 1998.
- 18 - POIRIER, J.M.; ROBIDOU, P.; JAILLON, P. Determination of indinavir in plasma by solid-phase extraction and column liquid chromatography. *Ther. Drug Monit.*, Philadelphia, v.21, n.4, p.404-410, 1999.
- 19 - POPOVIC, M.; SARGADHARAN, M.G.; READ, E.; GALLO, R.C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, Washington D.C., v.224, n.4648, p.497-500, 1984.
- 20 - SVENSSON, J.O.; SONNERBORG, A.; STAHL, L. Rapid and simple determination of indinavir in serum, urine, and cerebrospinal fluid using high-performance liquid chromatography. *Ther. Drug Monit.*, Philadelphia, v.22, n.5, p.626-629, 2000.
- 21 - UNITED STATES Pharmacopeia. 27.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. 3013p.
- 22 - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC. *Pharmacopeial Forum*, Rockville, v.26, n.6, p.1641-1643, 2000.
- 23 - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC. *Pharmacopeial Forum*, Rockville, v.27, n.2, p.2165-2168, 2001.
- 24 - VAN HEESWIJK, R.P.G.; HOETELMANS, R.M.W.; HARMS, R.; MEENHORST, P.L.; MULDER, J.W.; LANGE, J.M.A.; BEIJNEN, J.H. Simultaneous quantitative determination of the HIV protease inhibitors amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir in human plasma by ion-pair high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v.719, n.1-2, p.159-168, 1998.
- 25 - YEH, K.C.; DEUTSCH, P.J.; HADDIX, H.; HESNEY, M.; HOAGLAND, V.; JU, W.D.; JUSTICE, S.J.; OSBORNE, B.; STERRETT, A.T.; STONE, J.A.; WOOLF, E.; WALDMAN, S. Single-dose pharmacokinetics of indinavir and the effect of food. *Antimicrob. Agents Ch.*, Washington D.C.; v.42, n.2, p.332-338, 1998.

## CHÁ VERDE: BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE HUMANA

Vanusa MANFREDINI<sup>1</sup>; Vanessa DUARTE MARTINS<sup>2</sup>; Mara da SILVEIRA BENFATO<sup>3</sup>

1. Farmacêutica, mestre em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM-UFRGS).

2. Graduanda do curso de Nutrição – UFRGS.

3. Professor adjunto do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 91501 - 970, Porto Alegre (RS).

Autor responsável E-mail: mara.benfato@ufrgs.br

### Introdução

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas normalmente durante o metabolismo celular, ou seja, são subprodutos do metabolismo da mitocôndria, do citocromo P450, da ativação de células inflamatórias, entre outros. Elas também podem ser formadas devido à ação química e física a agentes como radiação  $\gamma$ , UVA e  $H_2O_2$ . Quando ocorre um aumento das ERO e/ou uma diminuição da capacidade antioxidante, os radicais livres são capazes de lesar componentes celulares, inclusive o DNA, modificando sua estrutura e/ou função e gerando o estresse oxidativo<sup>10</sup>.

Compostos fenólicos abrangem um grande grupo de flavonóides que estão presentes em vegetais, frutas, vinho e chá<sup>13,17</sup>. Eles contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente

importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas<sup>4,13</sup>.

A capacidade dos polifenóis vegetais em atuar como antioxidantes nos sistemas biológicos já foi reconhecida nos anos trinta<sup>1</sup>, entretanto, o mecanismo antioxidante foi ignorado até pouco tempo. Para alguns derivados de ácidos fenólicos, tem sido relatada a excelente propriedade de quelação do ferro e de outros metais de transição, e neutralização da ação oxidativa dos radicais livres<sup>3,6,8</sup>. Estudos realizados demonstraram que os polifenóis presentes no chá verde (*Camellia sinensis*) apresentam bioatividades importantes em certas patologias como: diabetes mellitus, cardiopatias, infecções virais, inflamações e em doenças degenerativas, como o câncer e o envelhecimento. Evidências sugerem que a ingestão diária de antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, é capaz de retardar o aparecimento destas doenças<sup>5</sup>.