

Beta-lapachona: desenvolvimento e validação de metodologia analítica para nova alternativa terapêutica antineoplásica*

Beta-lapachone: development and validation of analytical method for new therapeutic antineoplastic alternative

Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho¹; Felixsandra Carneiro Alves¹; Geisiane Maria Cavalcante Alves¹; Deborah Bezerra Monteiro^{1,2}; Flávia Patrícia Morais de Medeiros^{1,2} & Pedro José Rolim Neto^{1,2}

RESUMO – A β -lapachona é uma ortoquinona com excelente potencial antineoplásico, ainda não disponível na forma de medicamento, cujos estudos na área de tecnologia farmacêutica dependem do desenvolvimento, de forma pioneira, de um método analítico para sua quantificação e a certificação deste método através do processo de validação, comprovando sua segurança, viabilidade e reprodutibilidade. Foi desenvolvido um método isocrático, em coluna de fase reversa C-18, tendo como fase móvel o sistema metanol/água (80:20) com vazão de 1mL/min, detector UV a 256nm, volume de injeção de 20 μ L e com pico típico de injeção em 4,6min. Este método foi validado segundo orientação para a matéria-prima, mostrando-se robusto quanto às variações na composição da fase móvel, fluxo e resistência à fotodegradação das amostras; linear na faixa de concentração de 20 a 100 μ g/mL; preciso nos níveis avaliados (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), com exatidão de 99,9% e seletivo em relação aos produtos da fotodegradação. A metodologia desenvolvida demonstrou possuir os requisitos necessários para ser incorporada à rotina dos laboratórios de controle de qualidade, por ser de rápida e fácil execução, constituindo um valioso avanço para a futura produção industrial deste fármaco promissor.

PALAVRAS-CHAVE – β -lapachona, antineoplásico, doseamento, validação.

SUMMARY – The β -lapachone is an ortoquinone with excellent potential antineoplastic, still not available like medication, whose studies in pharmaceutical technology area depend the development as pioneering form an analytical method for its quantification and certification through the validation process, proving its security, viability and reproducibility. It was developed a isocratic method in high performance liquid chromatography, with C-18 reverse-phase column, using as mobile phase methanol/water (80:20) in a flow-rate of 1mL/min, UV detector at 256nm injected with 20 μ L to typical retention time for β -lapachone in 4.6min. This method was validated according to orientation for raw material. This methodology showed robust in variations in the composition of the mobile phase, flow-rate and with photostability during analysis period, linear in band concentrations from 20 to 100 μ g/mL, precision in the evaluated levels (repeatability, intermediate precision and reproducibility) and 99.9% as well as selective accuracy in relation to the photodegradation products. The development method demonstrate the qualifications needed to be incorporated in the quality control analysis routine, as fast and simplicity execution, becoming a valuable advance in the future industry production of this promising drug.

KEYWORDS – β -lapachone, antineoplastic, assay, validation.

INTRODUÇÃO

Na metade do século passado, as naftoquinonas do ipê roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor) foram estudadas pioneiramente pelo Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco com destaque para o lapachol, atualmente comercializado como medicamento e para a β -lapachona cujas estruturas químicas estão descritas na Fig 1⁷. Estudos *in vitro* desta época, com as quinonas do ipê roxo, evidenciaram atividade antibacteriana⁴ antifúngica⁸, antiviral¹⁸ e antitumoral^{4,17}.

A β -lapachona (C₁₅H₁₄O₃, PM 242,3), conhecida quimicamente como 3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2-b]pirano-5,6-diona), tem sido desde o início da

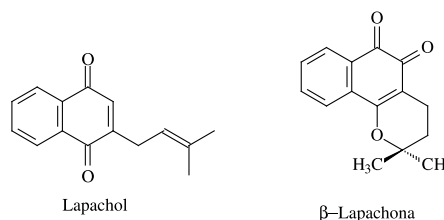


FIG. 1 - Estrutura molecular de quinonas do ipê roxo.

década de 90, alvo de estudos no mundo todo devido ao excelente potencial farmacológico *in vitro* e *in vivo*

Recebido em 19/01/2005

*1 Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – UFPE, 2 Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE

na inibição de tumores refratários aos tratamentos convencionais, como o câncer de próstata^{12,13,14,16}, sem contudo existir algum ensaio clínico em humanos com esta droga descrito na literatura¹⁵.

O mecanismo de ação da β -lapachona diferencia-se de outros antineoplásicos por atuar na topoisomerase I promovendo a recuperação da capacidade de apoptose celular¹⁶. Alguns estudos reportam sua ação sinérgica de potenciação com o Taxol[®] promovendo a inibição em diferentes pontos de replicação celular^{11,15}, além de sua combinação com outros tratamentos, como a aplicação de radiação ionizante³.

O câncer de próstata ocupa o quinto lugar entre as neoplasias de maior mortalidade no mundo inteiro. No Brasil, no ano 2002 representou a segunda causa de morte pelo câncer em homens¹⁰. A terapêutica hormonal tradicionalmente indicada neste caso funciona apenas como medida paliativa, pois não impede a progressão da enfermidade e os pacientes vêm a sucumbir dentro de 12 meses após a doença tornar-se refratária. Neste contexto a β -lapachona aparece como uma esperança concreta na oncologia clínica.

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica para a realização de ensaios clínicos requer especificações prévias de parâmetros a serem utilizados no controle de qualidade, bem como a validação destas metodologias de maneira a certificar a qualidade com alto grau de segurança. Sendo assim, foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica para doseamento da β -lapachona adequada à rotina de controle de qualidade da indústria farmacêutica.

Dentre os poucos trabalhos na área de produção e controle de medicamentos envolvendo a β -lapachona, em 1986, Awang e colaboradores² propõem um método de doseamento em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para as naftoquinonas derivadas do lapachol, utilizando para a β -lapachona, coluna C-18 e fase móvel acetoneitrila/ácido acético 0,25% (1:1) num fluxo de 2 mL/min e tempo de corrida de 15 minutos, porém sem separação adequada dos picos entre os isômeros α e β . Em 1997, Glen, e colaboradores⁶ desenvolveram uma metodologia em fase reversa com CLAE para quantificação da β -lapachona em plasma humano utilizando coluna fenil e fase móvel acetoneitrila/tampão fosfato (45:55) com tempo de corrida de 10 minutos, permitindo clara separação entre a β -lapachona e a 3-hidroxi- β -lapachona.

A validação de métodos analíticos é plenamente justificável, tanto por razões científicas, uma vez que produzem resultados confiáveis na transferência entre laboratórios, quanto por razões comerciais, pois métodos validados são pré-requisitos para a certificação das análises e para o livre comércio internacional.

O principal objetivo da validação de metodologias analíticas é assegurar que o método seja exato, específico, reprodutível e resistente dentro da variação especificada para a substância em exame, assegurando assim sua credibilidade no uso rotineiro¹⁹.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e solventes

- Água deionizada Milli-Q[®]
- Metanol grau analítico Merck[®]

- Acetonitrila grau analítico Merck[®]
- Ácido Acético Glacial grau analítico Merck[®]

Substâncias químicas de referência

- Padrão Primário β -lapachona produzido pela Sigma L2037, lote 31K1558
- Padrão Secundário de Lapachol produzido pelo Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Equipamentos

- Sistema deionizador com filtro de 0,45 μ m, Milli-Q Millipore Corporation[®]
- Aparelho de Ultrassom, Branson 2510[®]
- Balança analítica, Mettler AE 260[®]
- Espectrofotômetro, HP 8453
- Coluna RP-18 Merck LiChrosorb[®], com 12,5cm de comprimento e partículas com 5 μ m de diâmetro
- Coluna LC-18 Supelco[®], com 25cm de comprimento e partículas com 5 μ m de diâmetro
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência HP[®] série 1100 com injetor manual, alça dosadora de 20 μ L.
- Integrador, HP[®] 3395
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] com injetor automático de 20 μ L, acoplado a software Class-VP V6125PI

Amostras

- β -lapachona, produzida pelo Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco lotes 010901 e 010100;

Procedimento para o desenvolvimento do método analítico

O método foi desenvolvido por CLAE em cromatógrafo marca HP série 1100. A solubilidade da β -lapachona em sistemas polares de fase orgânica-aquosa definiu a utilização do método cromatográfico de fase reversa, mais fácil, rápido e econômico que a cromatografia normal.

A escolha da fase estacionária foi feita de acordo com a estrutura da molécula e dados referentes ao lapachol, que foi utilizado como padrão interno, devido a sua semelhança estrutural e disponibilidade literária sobre esta substância na área de controle de qualidade⁵.

Diferentes composições e proporções de fase móvel (FM) foram testadas, utilizando misturas binárias. Avaliou-se a composição acetoneitrila/ácido acético 0,25%, na proporção de 50:50 v/v, conforme²; metanol/ácido acético 5%⁵ nas proporções 90:10, 80:20, 70:30 v/v e metanol/água nas proporções de 90:10, 80:20, 70:30 v/v.

A escolha do comprimento de onda (λ) baseou-se numa varredura espectrofotométrica em UV de uma solução de β -lapachona em metanol a 40 μ g/mL definindo os λ de maior absorbância. Em CLAE estas soluções foram injetadas em triplicata e avaliadas quanto à sensibilidade e a repetibilidade das respostas obtidas nos λ selecionados e no λ de maior absorbância para o lapachol⁵, analisando-se as áreas e os desvios-padrão obtidos.

As amostras foram preparadas na concentração de 40 µg/mL, a partir de 25mg de β-lapachona com diluições sucessivas para 25mL, sendo a primeira em metanol e a segunda em fase móvel. A fase móvel e as amostras foram preparadas com água deionizada, filtradas em membrana de 0,45 µm e submetidas ao ultrassom para eliminação de bolhas e homogeneização das amostras.

Procedimento para validação da metodologia analítica

O protocolo de validação analítica aplicado no estudo baseou-se nas recomendações da *Internacional Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use*⁹ e da Resolução RE 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária¹ para matéria-prima, estabelecendo os parâmetros:

Robustez: foram realizadas variações na FM metanol/água de ± 5% da proporção 80:20 e de ± 10 e 20% na vazão de 1mL/min, avaliando o impacto destas variações nas áreas obtidas. A degradação da molécula de β-lapachona devido à exposição à luz durante um intervalo de análise foi avaliada como parâmetro de robustez, pois a sua fotossensibilidade constitui, conforme dados de literatura⁶, uma variável experimental que pode afetar o método de análise. Avaliou-se as amostras protegidas e expostas a luz nos tempos 0, 3, 6, 9, 12 e 24h.

Linearidade: foi testada em 5 pontos numa faixa de variação com concentração entre 20 e 100 µg/mL, em três curvas de calibração com amostras autênticas, avaliada estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados ordinários plotados no gráfico com o software Excel[®].

Precisão: avaliada por análise de variância dos dados em três níveis: a *repetibilidade*, realizada com seis amostras autênticas na concentração de trabalho (40 µg/mL), com um analista, durante dois dias, em curtos intervalos de tempo entre as injeções; a *precisão intermediária*, determinada entre dois analistas, em dias diferentes, com três amostras autênticas de mesma concentração; e a *reprodutibilidade*, estabelecida por dois analistas, em dois dias diferentes, em laboratórios distintos, usando-se um cromatógrafo Shimadzu, com volume de injeção de 20 µL.

Exatidão: foi medida com doze amostras autênticas através do desvio percentual do valor médio, durante dois dias.

Especificidade: foi realizada em amostras na concentração de trabalho, submetidas a estresse luminoso por 15 dias, utilizando luz branca incandescente, com objetivo de obter os produtos de degradação da molécula. A partir dos cromatogramas obtidos, avaliou-se a adequação do sistema cromatográfico através dos parâmetros de fator de capacidade, fator de cauda, fator de resolução e números de pratos teóricos.

RESULTADOS

Desenvolvimento do método analítico

A coluna RP-18 Merck LiChorosorb[®], com 12,5cm e partículas com 5 µm de diâmetro foi selecionada por ser compatível com diversas estruturas moleculares e bas-

tante comum nos laboratórios de controle de qualidade. A **Tabela I** descreve a avaliação dos diferentes comprimentos de onda realizados.

A FM acetona/ácido acético 0,25% (50:50 v/v) apresentou cromatogramas sem definição adequada e com tempo de retenção muito longo, superior a 15 minutos. As composições metanol/água e metanol/ácido acético 5% ambos na proporção de 80:20 apresentaram resultados semelhantes com picos bem resolvidos e sem cauda, curto tempo de retenção e área satisfatória, mostrando-se bastante sensível.

Validação da metodologia analítica

O método foi robusto para as três variáveis analisadas conforme demonstrado nas **Tabelas II e III** e no **Gráfico 1**.

Quanto à linearidade, obteve-se um coeficiente de correlação dos pontos das três curvas de R= 0,9997. A análise de variância comprovou não haver diferença entre as três curvas feitas, não ocorrendo falta de ajuste com intervalo de confiança de 95%.

Os resultados dos três níveis de precisão expostos na **Tabela IV**, calculados a partir da análise de variância dos dados (**Tabela V**), bem como os resultados de exatidão (**Tabela VI**) ratificam a adequação do método nestes dois quesitos.

De acordo com o protocolo oficial seguido^{1,9}, o método apresentou especificidade para os produtos da fotodegradação da β-lapachona conforme ilustrado pelas **Figuras 2 e 3**. A especificidade do método é subsidiada pela performance do sistema, que apresentou Fator de Resolução = 2, Número de pratos superior a 2000, Fator de Cauda de 1,3 e Fator de capacidade = 2, índices dentro dos limites estabelecidos.

DISCUSSÃO

Baseado no espectro de absorção obtido com a varredura espectrofotométrica o λ 256nm apresentou melhor relação entre sensibilidade e repetibilidade além de sofrer menor influência do isômero α-lapachona, sendo escolhido para a validação.

Na escolha da fase móvel para validação optou-se pela fase móvel metanol/água (80:20, v/v) por apresentar sensibilidade e tempo de retenção satisfatórios, resolução adequada, além de promover menor desgaste na coluna que a fase móvel metanol/ácido acético 5% (80:20, v/v).

Na robustez as variações de ±5% da proporção 80:20 da FM apresentaram resultados adequados quanto às áreas e os tempos de retenção obtidos. Variações de até 20% na vazão estimada para trabalho de 1mL/min provocaram modificações proporcionais as variações submetidas, nas áreas do pico e nos T_R, com desvios padrões relativos (DR) compatíveis com os níveis estatísticos de exigência (abaixo de 2%) e com T_R fora da zona de saída do solvente. Os resultados do **Gráfico 1** mostraram que não existe diferença estatística entre as áreas das amostras protegidas da luz e expostas com até 24 horas de exposição, não havendo, portanto necessidade de proteção das amostras no período de análise.

Para a linearidade, a curva de regressão (R²) expli-

TABELA I
Avaliação da β -lapachona em diferentes comprimentos de onda

λ (nm)	Área do	Desvio-padrão Absoluto (S)	Desvio-padrão Relativo (DR)
256	42.120.352	163488,9	0,39%
264	37.906.080	244064,2	0,64%
278	15.658.220	50262,4	0,32%
281	1.566.880	164423,8	1,05%

TABELA III
Avaliação da Variação de Fluxo na Robustez do Método

Fluxo	Área	s	CV (%)	t_r (min)	s	CV (%)
0,8	58073098	424696,4	0,73	5,82	0,0050	0,09
0,9	49727189	413397,8	0,83	5,13	0,0050	0,10
1,0	41684491	206451,1	0,50	4,54	0,0034	0,07
1,1	38391701	191280,4	0,50	4,13	0,0058	0,14
1,2	35870048	200976,6	0,56	3,80	0,0022	0,06

TABELA V
Resultados da análise de variância da precisão do método

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico
Entre grupos	0,717158	1	0,717158	1,620083	4,493998
Dentro dos grupos	7,082681	16	0,442668		
Total	7,799839	17			

TABELA VI
Exatidão do método calculada a partir da repetibilidade

Amostra	Dia 1	Dia 2
1	38,82	40,29
2	40,24	40,07
3	39,27	40,40
4	40,28	40,05
5	39,53	40,35
6	39,98	40,16
Média	39,69	40,22
Desvio-padrão	0,53	0,14
CV	1,34	0,34
Exatidão (%)	99,2	100,6

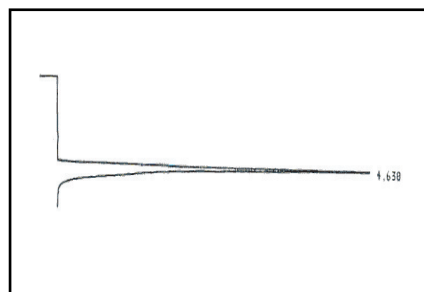


FIG. 2 - Cromatograma típico.

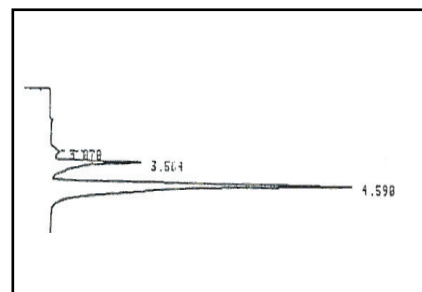


FIG. 3 - Cromatograma de amostra exposta à luz por 15 dias.

ca 99,93% da variação dos dados, enquanto a porcentagem máxima de variância explicável é de 99,96%, indicando que há linearidade dentro do intervalo estabelecido.

Na avaliação da precisão não houve diferença entre as médias obtidas (Tabela V) com intervalo de confiança de 95%. Para a exatidão a variação em relação à concentração teórica de 40 μ g/mL ficou abaixo de 2%, apresentando uma exatidão média de 99,9%, variando entre 99,2 e 100,6%.

Na especificidade, as amostras submetidas ao estresse por exposição à luz, pôde-se observar a eluição simultânea de picos referentes a produtos de degradação da β -lapachona, sem, contudo haver sobreposição

TABELA II
Avaliação da composição da fase móvel na robustez do método

Composição da FM	Área do pico	S	DR (%)	Tempo de Retenção- t_r (min)	s	DR (%)
85/15	46.815.739	1165654,7	2,49	3,15	0,0009	0,03
80/20	44.380.971	528973,2	1,19	4,53	0,0040	0,09
75/25	43.011.712	1440223,8	3,35	5,76	0,0423	0,73

TABELA IV
Precisão do método expressa em concentração média (μ g/mL) e desvio padrão absoluto

Parâmetros		Resultados	
		Dia 1	Dia 2
Repetibilidade	Analista 1	39,7 \pm 0,5	40,2 \pm 0,1
	Analista 2	39,7 \pm 0,5	40,2 \pm 0,1
Precisão Intermediária	Analista 1	39,7 \pm 0,5	40,2 \pm 0,1
	Analista 2	40,3 \pm 0,5	40,9 \pm 0,3
Reprodutibilidade	Analista 1	39,7 \pm 0,5	40,2 \pm 0,1
	Analista 3	39,8 \pm 0,7	39,4 \pm 0,5

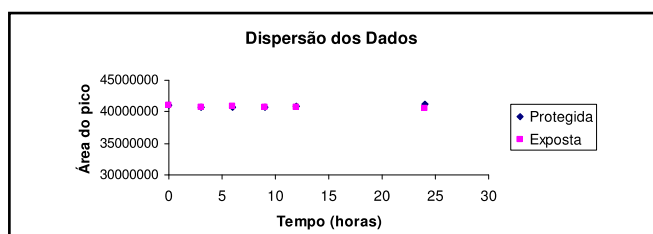


GRÁFICO 1 - Dispersão dos dados de amostras exposta e protegida da luz.

com o analito. A Fig. 2 mostra um cromatograma com perfil representativo do pico da β -lapachona e a Fig. 3 comprova que os produtos da fotodegradação da amostra não interferem na definição do pico do analito desde sua linha de base.

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que o método desenvolvido possui os requisitos necessários para sua utilização em laboratórios de controle de qualidade da Indústria Farmacêutica, por ser de execução fácil e rápida, com tempo de corrida de 7 minutos.

O trabalho desenvolvido constitui um complemento à literatura dos parâmetros para o controle de qualidade da β -lapachona, uma vez que consegue de forma

inédita apresentar um método validado para quantificação desta matéria-prima com viabilidade para a rotina industrial etapa relevante para permitir que em breve ocorra a introdução no mercado desta nova alternativa terapêutica para câncer de próstata.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco-UFPE; ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco-LAFEPE e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

1. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE 899, de maio de 2003, Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.
2. Awang, D. V. C.; Kindack, D.; Dawson, B.A. Tandem high-performance liquid chromatography methods for resolution of lapachol and related naphthaquiunones. *Journal of Chromatography*, v.368, p.439-443.1986.
3. Choi, E. K. Synergistic effect of ionizing radiation and beta-lapachone against tumor *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v.57, p.S351. Oct, 2003
4. D'Albuquerque, I. L.; Maciel, M. C. N.; Schuler, A. R. P.; Araújo, M. C. M.; Maciel, G. M.; Cavalcanti, M. A. B.; Martins, D. G.; Lacerda, A. L. Preparação e primeiras observações sobre as atividades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogas inferiores da série da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol). *Revista do Instituto de antibióticos, Recife*, v.12, n.1-2, p.31-40. Dez, 1972.
5. Fonseca, S. G. C. Desenvolvimento farmacotécnico de formas microparticuladas contendo lapachol e avaliação comparativa da atividade antineoplásica sobre o sarcoma de yoshida. Recife, 2000. 163p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.
6. Glen, V. L.; Hutson, P. R.; Kehrl, N. J.; Boothman, D. A.; Wilding, G. Quantitation of b-lapachone and 3-hidroxy-β-lapachone in human plasma samples by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.692, p. 181-186. 1997.
7. Gonçalves de Lima, O.; et al. Uma nova substância isolada do "Pau d'arco", *Tabebuia sp. An. Soc. Biol.*, v.14, n.1-2, p.136-140. 1956.
8. Gonçalves de Lima, O.; D'Albuquerque, I. L.; Pereira, M. A.; Maia, M. H. D. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores – Comuni-

cação 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. *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife*, v.4, n.1-2, p.3-7, Dez, 1962.

9. ICH Q2B: Internacional Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Methodology. November, 1996.
10. Instituto Nacional de Câncer-INCA, Ministério da saúde – 2002 Disponível em: <http://www.inca.org.br/>. Acesso em: 20.10.2002.
11. Li, C. J.; Li, Y. Z.; Pinto, A. V.; Pardee, A. B. Potent inhibitor of tumor survival *in vivo* by b-lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. *PNAS – Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.96, p. 13369-13374. Nov, 1999.
12. Li, C. J.; Wang, C.; Pardee, A. B. Induction of apoptosis by b-lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, v.55, p. 3712-3715. Set, 1995.
13. Li, Y. Z.; Sun, X.; La Mont, J. T.; Pardee, A. B.; Li, C. J. Select Killing of cancer cells by beta-lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. *PNAS – Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.100, n.5, p. 2674-8. Mar, 2003.
14. Nasongkla, N.; Wiedmann, A. F.; Bruening, A.; Beman, M.; Ray, D.; Bornmann, W. G.; Boothman, D. A.; Gao, J. Enhancement of solubility and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm. Res.*, v.20, p.1626-1633, Oct, 2003.
15. Pardee, A. B.; Li, Y. Z.; Li, C. J. Cancer therapy with beta-lapachone. *Curr. Cancer Drugs Targets*, v.2, p.227-42. Mar, 2002
16. Planchon, S. M.; Wuerzberger, S.; Frydman, B.; Witiak D. T.; Hutson, P.; Church, D. R.; Wilding, G.; Boothman, D. A. β-lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic Leukemia (HL-60) And human prostate cancer cells: A p53-independent response. *Cancer Research*, v.55, p. 3706-3711. Sept, 1995.
17. Santana, C. F.; Lima, O. G.; D'Albuquerque, I. L.; Lacerda, A. L.; Martins, D. G. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do liber e de alguns componentes do cerne do pau d'arco (*Tabebuia avellanae*). *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife*, v.8, n.1-2. P3-17. Dez, 1968.
18. Schuerch, A. R.; Wehrli, W. β-lapachone, na inhibitor of onconavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polimerase-a. *Eur. J. Biochem.*, v.84, p. 197-205. 1978.
19. United States Pharmacopeia. 23ª Ed. Rockville: United States. Pharmacopeial convention Inc, 1994. 2391p.

Endereço para correspondência

Pedro José Rolim Neto
Rua Artur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Cidade Universitária, Recife/PE
E-mail: prolim@ufpe.br