

6

Estudo de caso:

Métodos analíticos aplicáveis a substâncias anticancerígenas

O câncer é a principal causa de morte no mundo, atribuem-se à doença 7,9 milhões das mortes ocorridas em 2007, o que corresponde aproximadamente a 13% dos óbitos nesse ano [14]. Dentre os medicamentos desenvolvidos recentemente para o tratamento dessa doença se destacam os derivados semisintéticos da camptotecina (CPT), irinotecana (CPT-11) e topotecana (TPT). Essas três substâncias possuem uma alta semelhança na sua estrutura química, motivo pelo qual a CPT (altamente tóxica) pode passar despercebida em testes de controle de qualidade dos medicamentos cujo princípio ativo é CPT-11 ou TPT. Mais preocupante ainda, a CPT pode ser adicionada deliberadamente para a falsificação de medicamentos substituindo o TPT ou CPT-11 como princípio ativo. Em ambos casos, vale a pena ressaltar a importância dos métodos analíticos para a identificação de produtos fora do padrão ou falsificados, ambos prejudiciais à saúde. Métodos analíticos disponíveis em farmacopéias ou compêndios internacionais podem ser utilizados pela indústria no controle de qualidade para a identificação de medicamentos fora do padrão, ou são utilizados por autoridades fiscalizadoras para identificar medicamentos falsificados. Na ausência desses, métodos validados e devidamente documentados na literatura especializada devem ser aplicados.

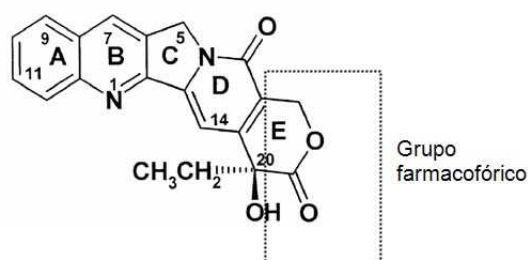
Devido à importância da identificação de medicamentos falsificados ou fora do padrão, neste capítulo realiza-se um estudo de caso para avaliar os métodos analíticos disponíveis na literatura especializada para a determinação de CPT, TPT e CPT-11, visando identificar àqueles que possam ser utilizados como ferramentas para identificação de medicamentos fora do padrão ou falsificados

6.1

A camptotecina e seus derivados, irinotecana e topotecana

A camptotecina (CPT) foi isolada pela primeira vez por Wall *et al*[76], da cortiça e dos talhos da planta *Camptotheca acuminata*, uma planta proveniente

da China. A substância foi caracterizada como um alcalóide com um sistema de anéis e grupos funcionais de alto potencial antitumoral e antileucêmico em animais. Os estudos iniciais na década de setenta foram feitos com o intuito de explorar a utilidade clínica da CPT como um agente anticancerígeno, sendo o seu uso descartado para tal fim devido à alta toxicidade e a baixa solubilidade da substância em água em pH fisiológico. Na tentativa de se aproveitar as características do grupo farmacofórico da CPT, foram sintetizados vários derivados solúveis em água, sendo os principais o CPT-11 e o TPT. As estruturas destas substâncias são apresentadas na figura 6.1:



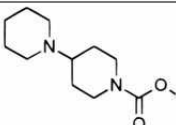
SUBSTÂNCIA	C5	C7	C9	C10	C20(S)
CPT	H	H	H	H	OH
TPT	H	H	(CH ₃) ₂ NHCH ₂	OH	OH
CPT-11	H	C ₂ H ₅	H		OH

Figura 6.1: Estruturas da camptotecina e seus derivados

O sítio farmacofórico da CPT e de seus derivados contém um grupo funcional lactônico que, dependendo do pH no meio, pode abrir formando um grupo carboxilato (figura 6.2), inativo como antitumoral. A formação do carboxilato é reversível e favorecida em pH fisiológico para a maioria dos derivados da CPT, exceto para o metabólito SN-38¹, que de fato é mais eficiente na ação antitumoral [77].

A atividade anticancerígena do CPT-11 e do TPT deve-se à inibição de uma enzima do DNA, a Topoisomerase Tipo I (Topo I). As topoisomerasas são enzimas que atuam em processos-chaves do DNA como replicação, transcrição, recombinação, reparação, montagem de cromatina e segregação de cromossomos. Existem dois tipos de topoisomerasas, as do Tipo I iniciam o rompimento de uma cadeia na molécula de DNA, e as do Tipo II rompem ambas as cadeias do DNA. Estas ações garantem o processo de replicação

¹O CPT11 é transformado no fígado em SN38, metabólito com atividade antitumoral até 1000 vezes maior do que o próprio CPT11.

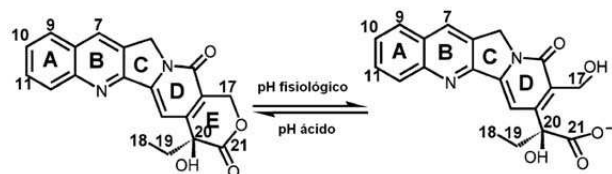


Figura 6.2: Equilíbrio do grupo farmacofórico da CPT. Adaptado de: Adams et al [77]

subseqüente do DNA. A inibição parcial ou total dos processos desenvolvidos pelas topoisomerasas resulta na morte celular [78]. O mecanismo pelo qual os inibidores da Topo I causam o efeito antitumoral encontra-se esquematizado na figura 6.3:

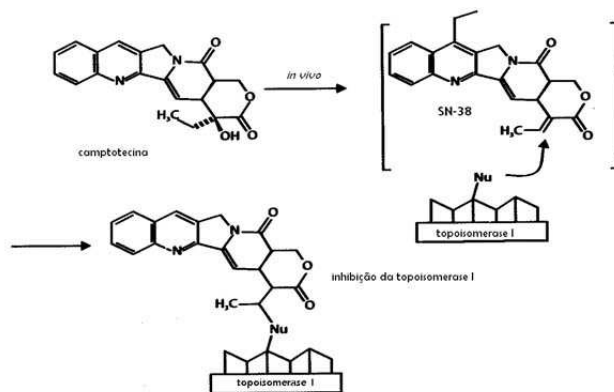


Figura 6.3: mecanismo de reação da Topo I e o CPT. Adaptado de: Marques [79]

Segundo este mecanismo, um complexo formado por Topo I e DNA reage com a CPT e seus derivados para formar um complexo ternário (Topo I - DNA - CPT). Este complexo inibe a religação das cadeias de DNA, causando a quebra da cadeia dupla de DNA, o que leva à morte celular [78].

As células cancerígenas possuem uma maior velocidade de replicação e são mais sensíveis a interferências medicamentosas, o que dá certa seletividade aos tratamentos quimioterapêuticos. Porém, células que se renovam constantemente (medula óssea, mucosa do trato digestivo, pêlos) também são atingidas pelos medicamentos quimioterapêuticos, causando os chamados efeitos secundários do tratamento [81].

O CPT-11 e o TPT contam com a aprovação da FDA para serem utilizados no tratamento do câncer. O TPT é comercializado com o nome de Hycamtin®, lançado pela GlaxoSmithKline. O Hycamtin® encontra-se em

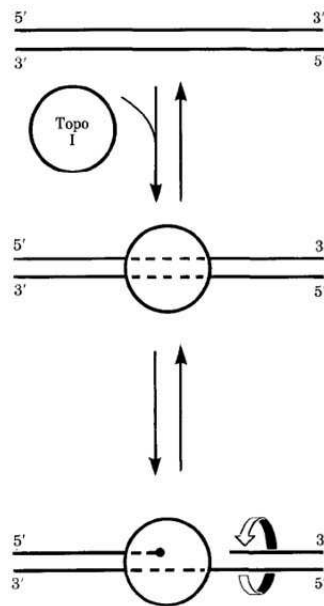


Figura 6.4: Mecanismo de inibição da Topo I. Adaptado de: Creemerst, *et al* [80]

forma de pó líofilo injetável (cloridrato de topotecana) e, recentemente em forma de cápsulas (topotecana). O medicamento injetável (que possui 4mg de topotecana) é recomendado para a terapia de câncer de ovário, cervical e de pulmão. As cápsulas são recomendadas para o tratamento de carcinoma de pulmão de pequenas células (*small cell lung cancer*) [82]. O CPT-11 encontra-se também em forma de cloridrato no medicamento Camptosar® que possui uma concentração de 17,33 mg de irinotecana por cada mililitro de solução injetável. O medicamento é comercializado pela Pfizer e é recomendado para tratamento de câncer de cólon e de reto [83]. Na tabela 6.1 se descrevem algumas propriedades desses medicamentos.

As duas marcas de medicamentos rendem lucros consideráveis para as empresas que detêm as suas patentes. Suas vendas representam 1/3 do mercado farmacêutico de drogas quimioterápicas. Além da alta margem de lucro que trouxeram às suas empresas, as duas substâncias foram responsáveis por salvar milhares de vidas em todo o mundo [79]. Em 2008, as vendas totais no mundo de Hycamtin® chegaram a cerca de R\$ 451 milhões [82], e as vendas mundiais de Camptosar® chegaram a cerca de R\$ 432 milhões nesse mesmo ano [83]. Essa alta margem de lucro faz desses medicamentos alvos para a falsificação.

Tabela 6.1: Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do TPT e CPT-11 [80, 82–84]

Propriedades	Medicamentos	
	TPT (cloridrato)	CPT11 (cloridrato)
Fórmula molecular	$C_{23}H_{23}N_3O_5 \cdot HCl$	$C_{33}H_{38}N_4O_6HCl \cdot 3H_2O$
Massa molar	457,9	677,19
Dosagem	0,5 a 1,5 mg m ⁻² administradas em infusão intravenosa de 30 minutos	125 e 340 mg m ⁻² administradas em infusão intravenosa de 30 a 90 minutos
Vida média de eliminação	De 2 a 3 horas	De 0,8 a 0,11 h
Ligação com proteínas plasmáticas (%)	35%	SN-38: 95%; CPT-11: 50%
Metabólitos	N-desmetilpotecana e bis-N-desmetilpotecana	SN-38, que inibe a topoisomerase I com potência aproximadamente 1.000 vezes maior do que o CPT-11. A conversão metabólica é mediada pelas enzimas carboxilestearasas e ocorre principalmente no fígado.
Eliminação	Via renal, cerca de 30–40% da dose administrada	Cerca de 17% do CPT-11 é excretado pela urina em um período de 24 horas, entanto, a quantidade de SN-38 recuperada da urina representa 0,23% do CPT-11.

6.2

Métodos utilizados na análise de CPT, TPT e CPT-11

A concentração de CPT-11 ou TPT em medicamentos encontra-se na ordem do mg mL⁻¹. Para identificar e quantificar essas substâncias nessa faixa de concentração é necessário dispor de métodos analíticos sensíveis² (baixa detectabilidade). Para quantificar CPT na presença de TPT ou de CPT-11 (que pode ocorrer em medicamentos falsificados ou fora do padrão) necessita-se de métodos altamente seletivos que possam diferenciar essas três substâncias quimicamente similares.

Para a CPT e seus derivados, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é utilizada para a separação e quantificação dessas substâncias. O tipo de detecção mais utilizada em HPLC é por medição da fluorescência natural dessas substâncias. Outras formas de detecção como espectrometria de massa (MS) ou espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta/visível (UV/VIS) também são utilizadas. Técnicas espectrofluorimétricas e técnicas baseadas na separação eletroforética em capilar também são utilizadas para a determinação da CPT e derivados. A seguir faz-se uma breve descrição das características gerais dos métodos utilizados na determinação da CPT, TPT e CPT-11 para, em seguida, descrever alguns dos parâmetros de desempenho dos métodos existentes na literatura especializada.

- **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC):** A cromatografia é uma técnica de separação de misturas, que se baseia na

²O termo sensível (que acusa diferenças pequeníssimas, variações mínimas) foi traduzido da expressão em inglês *sensitive*

partição das substâncias de interesse entre duas fases: a fase estacionária, que está imobilizada em uma coluna; e a fase móvel, que é o meio que transporta a amostra pelo sistema. A migração diferencial das substâncias na coluna leva a separação das mesmas. A fase estacionária é constituída por partículas de diâmetro da ordem de 3 a 5 micrômetros sendo as fases classificadas como reversa (RP), de característica apolar, no caso dos métodos para CPT e derivados. A fase móvel (solvente ou mistura de solventes) é introduzida a pressões elevadas para se obter separação eficiente e rápida entre as substâncias de interesse [85]. Após a separação, as espécies são detectadas aproveitando alguma de suas propriedades físicoquímicas, no caso da CPT e derivados, destacam-se as propriedades ópticas (absorção e luminescência).

- **Espectrofluorimetria:** A técnica se baseia na capacidade que certas substâncias possuem para emitir luz quando são excitadas por fótons, na região do ultravioleta (próximo e visível) do espectro eletromagnético. A capacidade de emissão luminescente das substâncias está relacionada com a sua estrutura (presença de elétrons π deslocalizados e rigidez estrutural), sendo diretamente proporcional à quantidade presente na amostra, dentro de condições específicas, basicamente aquelas que valem para a lei de Beer-Lambert [85]. Na espectrofluorimetria não há a separação física do(s) analito(s) de interesse da matriz da amostra, assim a detecção seletiva é baseada na propriedade luminescente diferenciada do(s) analito(s), que pode ser amplificada por meio de ajustes das condições experimentais.
- **Eletroforese capilar:** A eletroforese capilar é uma técnica de separação muito eficiente e que se baseia na migração diferenciada das espécies químicas dentro de um meio tamponado em um capilar. Entre as extremidades do capilar é aplicada uma diferença de potencial elétrico, que faz com que os analitos carregados migrem. A separação ocorre devido à diferença na razão entre massa/carga das espécies químicas. A detecção em geral é realizada por fotometria de absorção molecular e, em menor frequência por fluorimetria e por espectrometria de massa. Existem muitos modos de separação eletroforética que podem ser utilizados para separações mais eficientes de diferentes classes de espécies químicas [85]. Por exemplo, o uso de micelas iônicas permite a separação eletroforética de substâncias sem carga, que estabelecem equilíbrio de partição com a micela. Esse tipo de abordagem é denominado cromatografia eletrocínica micelar (MEKC).

O detalhamento dos métodos para determinação de CPT e de seus derivados em vários tipos de matrizes é indicado nas duas próximas subseções³. Na primeira estudam-se os métodos baseados em HPLC, e na segunda faz-se uma descrição dos métodos espectrofluorimétricos e os baseados na eletroforese

³Dado que este estudo de caso se centra na avaliação de métodos aplicáveis à análise da CPT e seus derivados (CPT-11 e TPT) em medicamentos, aqueles métodos desenhados exclusivamente para detectar SN-38 ou qualquer outro metabolito (usualmente em matrizes biológicas) não foram incluídos neste trabalho.

capilar. Após a descrição dos métodos realiza-se uma avaliação para determinar àqueles mais adequados para a análise de CPT na presença de TPT ou CPT-11, fundamental para identificar medicamentos fora do padrão ou falsificados.

6.2.1

Análise de CPT e derivados com HPLC

A HPLC é a técnica analítica mais difundida para análises de rotina na indústria farmacêutica, utilizada no controle de qualidade de medicamentos e no monitoramento dessas substâncias em fluidos biológicos. Um pré-tratamento (*clean up*) à amostra em matrizes biológicas (e.g.: sangue, saliva, urina) deve realizar-se para separar, minimizar e/ou retirar uma diversidade de componentes (proteínas, peptídios, lipídios) que podem causar interferências analíticas ou danos aos componentes do sistema de HPLC. Os procedimentos utilizados para o pré-tratamento de amostras que contêm CPT ou derivados em matrizes biológicas incluem: a precipitação de proteínas [86–93]; a extração em fase sólida (SPE) [94]; a extração líquido-líquido (LLE) [95, 96] e a microdiálise [97].

Para a separação de CPT, TPT e CPT-11 em diversas matrizes (biológicas, fármacos⁴ e medicamentos), a cromatografia de fase reversa (fase estacionária apolar) é a mais aplicada, usualmente mediante a utilização de fase do tipo octodecil (C18, RP18 ou ODS) suportada em sílica ou em base polimérica [88, 98, 99]. No entanto, o uso de fase estacionária quiral, para a separação de (R)- e (S)-CPT em fármacos foi reportada [100].

Para a determinação da concentração total (lactona e carboxilato) de CPT ou derivados [87, 95, 96, 101], a fase móvel com dois ou três componentes é a mais utilizada. São esses componentes: (i) uma solução tampão utilizada para controlar o pH e o equilíbrio lactona/carboxilato; (ii) um solvente orgânico, usualmente acetonitrila, para controlar a retenção da lactona do CPT ou derivado e; (iii) um modificador químico para controlar a formação de cauda nos picos cromatográficos (*peak tailing*⁵). Para a determinação por separado da concentração da lactona e do carboxilato [89, 90, 94, 102], um agente pareador de íons foi agregado à fase móvel, para aumentar a afinidade do carboxilato à coluna e assim evitar a sua eluição no volume morto.

Diversos tipos de detecção são acoplados ao sistema de HPLC para determinar a concentração CPT e derivados. A detecção por fluorescência

⁴Neste estudo de caso, considerou-se fármaco à substância pura (cloridrato de TPT ou CPT-11) obtida como padrão comercial ou sintetizada em laboratórios de pesquisa, e medicamento exclusivamente aos produtos Hycamtin® e Camptosar®.

⁵O *peak tailing* ocorre devido às interações entre o analito e partículas de silício não derivatizadas da parede da coluna.

é a mais utilizada [87, 89–91, 93–95, 97, 102, 103], aplicada até em estudos farmacocinéticos [89, 93] ou de monitoramento terapêutico dos fármacos [87, 101]. A detecção por fotometria de absorção no UV/VIS é utilizada, em menor proporção, para análise de CPT e derivados em matrizes biológicas [96] e em formulações farmacêuticas [98, 101]. A detecção por espectrometria de massas (MS) também é utilizada para análise de amostras em matrizes biológicas [86, 88, 92] e em fármacos [100]. A HPLC-MS tem sido aplicada em estudos exploratórios [86, 100] que precisam de maior seletividade.

A detectabilidade dos métodos é definida em termos de limite de quantificação (LQ) da concentração de CPT ou derivados. Para análises em matrizes biológicas, limites de quantificação entre $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ [91, 92] e 40 ng mL^{-1} [96], foram reportados. Para os métodos aplicáveis a medicamentos ou fármacos, os limites de quantificação a partir de 150 ng mL^{-1} [104] foram reportados.

Um resumo das principais características dos métodos analíticos baseados no uso do HPLC desenvolvidos para determinação de CPT, TPT e/ou CPT-11, (publicados na literatura especializada entre os anos de 2000 e 2009) encontra-se na tabela 6.2.

Tabela 6.2: Métodos por HPLC para determinação de CPT, TPT e CPT-11

Análito	Matriz	Condições da Análise: Coluna. Fase móvel. Detecção	Parâmetros de validação					Ref.
			LQ (ng mL ⁻¹)	% Recuperação	Precisão - CV (%)	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	r	
CPT-11	Medicamento e fármaco	Kromasil C18. KH ₂ PO ₄ (pH 3,5 ácido o-fosfórico), acetonitrila, metanol (55:25:20). Absorção: $\lambda = 254$ nm	$3,0 \times 10^4$	99,0 – 102,1	< 1,0	$3,0 \times 10^4 - 7,0 \times 10^4$	0,999	[98]
TPT	Fármaco	Inertsil ODS 3V C18. Grad. KH ₂ PO ₄ 0,01M (pH3)/ ácido fosfórico, acetonitrila. Abs (PDA) $\lambda = 267$ nm	$1,2 \times 10^4$	99,0 – 101,0	< 2,1	$1,2 \times 10^4 - 7,5 \times 10^4$	0,999	[99]
CPT-11 (a)	Frações microsomais de fígado (Ppt. prot.)	Alltima C18. Grad.Água, acetonitrila com 0,25% de ácido fórmico. MS/MS, ion produto (m/z) 124.	1,6	98,5 – 112,8	< 17,6	$1,6 - 1,0 \times 10^2$	0,991	[86]
	Plasma humano.		1,6	92,4 – 107,8	< 14,9	$1,6 - 2,5 \times 10^2$	0,999	
CPT-11 (b)	Plasma (Ppt. prot.).	YMC, C-18, ODS-AMRP. Grad: acetonitrila/água (pH 3,0). UV/VIS: $\lambda_{max} = 254$ nm (plasma), $\lambda = 365$ nm (bilis).	$2,5 \times 10^1$	95,4 – 105,4	< 4,1	$2,5 \times 10^1 - 1,0 \times 10^4$	0,999	[96]
	Bilis de rato (LLE)		$5,0 \times 10^1$	94,2 – 114,3	< 4,2	$5,0 \times 10^1 - 1,0 \times 10^4$	0,999	
CPT (a)	Plasma de rato (LLE)	Phenomenex Synergi Polar-PP C18. Gradiente:ácido acético 1% / acetonitrila (80:20, 50:50, 0:100). Fluorimetria 380/418 nm	5,0	n.r.	< 7,3	$5,0 - 1,0 \times 10^3$	0,990	[95]
TPT (c)	Fármaco	YMC, C-18, ODS-A, RP. Grad. Acetonitrila/água (pH 3,0 ácido o-fosfórico 20%). Absorção, $\lambda = 220$ nm	$4,6 \times 10^2$	93,2 – 102,0	< 5,0	$4,6 \times 10^2 - 2,3 \times 10^4$	0,999	[101]
(R)-CPT (d)	(S)-CPT com 0,0-0,017% de (R)-CPT	CSP: (S,S) e (R,R)-DACH-DNB. n-hexano, diclorometano (50:50). ESI-MS/MS: ion produto m/z= 349 e 305	7,9	99,8	< 0,2	$7,9 \times 10^2 - 4,0 \times 10^5$	0,999	[100]
CPT-11 (b)	Meio de cultivo. (Ppt prot.)	Hyperclon ODS (C18). Acetonitrila 50 mM, buffer de Na ₂ HPO ₄ + 1-heptano-sulfonato de sódio 10 mM (pH 3,0) (23:73). Fluorimetria: 380/540 nm	5,0	96,9 – 108,3	< 9,6	$5,0 - 4,2 \times 10^4$	0,998	[87]
	Restos de lisis celular (Ppt prot.)		2,0	94,3 – 107,2	< 6,5	$2,0 - 4,2 \times 10^4$		

Continua na página seguinte...

...Tabela 6.1

Análito	Matriz (*)	Condições da Análise: Coluna. Fase móvel. Detecção	Parâmetros de validação						Ref.
			LQ (ng mL ⁻¹)	% Recuperação	Precisão - CV (%)	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	r		
CPT	<i>E. infrequens</i> (ppt metanol)	RP18-e. Grad. Água/acetoneitrila. ESI-MS/MS: ion produto (m/z) 349	5,0	98,5 – 101,5	n.r	5,0 – 5,0 x10 ¹	0,999	[88]	
CPT-11 (b)	Plasma de rato (Ppt prot.)	Hypersil ODS. KH ₂ PO ₄ 0,1M + 0,01M TBAHS (pH 6,4), acetoneitrila (75:25). Fluorimetria: 380/540 nm	6,8	95,5 – 108,8	< 5,5	6,7 – 6,8 x10 ¹	0,999	[89]	
CPT-11 e TPT	Fármacos	Nucleodur C18. Grad. Acetonitrila/KH ₂ PO ₄ , 50mM pH 3,5. Fluorimetria: 355/515 nm. T. retenção: TPT: 2 min, CPT-11: 7 min.	1,5 x 10 ²	n.r.	< 5,0	1,0 x10 ² – 1,0 x10 ³	0,998	[104]	
CPT-11 (a)	Plasma e tecidos de rato (ppt. Prot.)	Zorbax SB-phenyl /Xterra C18. Acetato de amônia 20mM pH 3,5, acetoneitrila (65:35) / (67:33). MS/MS: Transição: 587,6 → 167,2.	5,0 x10 ¹	96 – 100	< 12,7	5,0 x10 ¹ – 5,0 x10 ²	0,995	[92]	
CPT-11 (b)	Sangue humano (Ppt. Prot.)	Hypersil ODS. Metanol, Acetato de amônio 0,1M + fosfato de tetrabutilamônio (35:60). Fluorimetria: 355/515 nm	5,0	85,2 – 103,4	< 9,7	5,0 – 2,0 x10 ²	0,993	[103]	
CPT-11	Sangue humano (Ppt. prot)	Symetry C8. Grad.: acetato de amônia 0,75M/fosfato de tetrabutilamônio 5mM pH 6,0/ acetoneitrila. Fluorimetria::380/460 nm	5,0	96,0 – 114,4	< 12,9	5,0 – 3,0 x10 ²	0,984	[90]	
CPT-11	Plasma (ppt, prot)	Xterra RP18. Grad. de A (acetoneitrila,água 75:25)/B (tampão de fosfatos pH 4). Fluorimetria: 370/470 nm	5,0 x10 ¹	95,6 – 102,6	< 13	5,0 x 10 ¹ – 1,0 x10 ³	0,990	[91]	
CPT	Saliva humana. cultivo de células cancerosas (SPE)	Simetry Shield (RP8). 10 mM acetato de amônio – metanol (20:80). Fluorimetria: 380/423 nm	2,0	100,3 – 101,4	< 9,5	1,0 – 4,0 x10 ³	0,982	[94]	
CPT	Sangue e cérebro de rato (MD)	RP-Microbore C18. Metanol 100 mM, ácido fosfórico monossódico (35:25), pH 2,2. Fluorimetria: 360/440 nm	1,0	n.r.	< 10	5,0 – 5,0 x10 ²	0,997	[97]	
CPT-11 (b)	Plasma humano (Ppt. prot)	Nucleosil C18. KH ₂ PO ₄ 0,1 M, acetoneitrila (67:33). Fluorimetria: 228/453 nm	1,0	90,0 – 95,5	< 9,3	1,0 – 1,0 x10 ³	n.r	[93]	
TPT	Plasma, saliva. (ppt prot)	Zorbax SB-C18. 0,01 M TEMED (pH 6), 0,1 M ácido 1-hexano-sulfônico, metanol (62:10:28). Flu: 316/527	5,0 x10 ²	85 – 109	< 17	1,0 – 7,5 x10 ¹	n.r	[102]	

Métodos aplicáveis à análise de: (a) CZ48; (b) SN-38; (c) marcadores de permeabilidade no intestino; (d) gimnatecan. n.r.: não reportado.

6.2.2

Análise de CPT e derivados com outras técnicas

Outras técnicas analíticas, como espectrofluorimetria ou eletroforese capilar, também são utilizadas para analisar a CPT e derivados. Características luminescentes da CPT foram investigadas utilizando espectrofluorimetria [105]. Esse estudo indica que os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão fluorescente da CPT não se deslocam em função do solvente, nem dependem da sua polaridade ou da capacidade de produzir pontes de hidrogênio. Porém, maiores intensidades fluorescentes em solventes mais polares foram alcançadas (efeito hipercrômico).

As características fluorescentes do CPT-11 em meio ácido e básico e, a emissão fluorescente gerada pela oxidação de CPT-11 com diversos agentes —Ce(IV), I²/I⁻ e íons metálicos⁶— foram estudadas [106]. A partir desse estudo, métodos espectrofluorimétricos para análise de CPT-11 em meio ácido; na presença de Ce(IV), I²/I⁻ e Fe³⁺ foram propostos⁷. Para a análise de CPT-11 em urina utilizou-se o método baseado na oxidação com iodo (melhor reprodutibilidade e a detectabilidade mais baixa), entanto que o método em meio ácido utilizou-se para análise de CPT-11 em medicamentos (melhor percentagem de recuperação).

A determinação da concentração de CPT-11 e outro medicamento anticancerígeno utilizando fluorimetria e calibração multivariada foi reportada [107]. Aplicou-se tratamento com irradiação ultravioleta a uma solução de CPT-11, na presença de traços de peróxido de hidrogênio. Esse procedimento de derivatização fotoquímica permitiu a amplificação do sinal do analito. Para analisar os dados de calibração de segunda ordem compararam-se vários algoritmos como fator de análise paralelo (PARAFAC), mínimos quadrados bilineares (BLLS), e mínimos quadrados multivariados (*multiway least squares*, N-PLS). O estudo reportou que estes três métodos apresentam resultados similares para a determinação de CPT-11 nas condições estudadas.

A aplicação da espectrofluorimetria foi proposta [79] para a análise seletiva de CPT em fármacos e medicamentos. Nesse estudo, dois métodos espectrofluorimétricos para a determinação da concentração de CPT foram propostos. No primeiro método utilizaram-se diferentes recursos do equipamento (espectro de 2ª derivada e varredura sincronizada) para melhorar a seletividade e detecção da CPT. O espectro de segunda derivada foi aplicado para detectar CPT na presença de CPT-11. O LD de CPT nessa condição foi

⁶Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Sr²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺.

⁷Nos métodos que utilizam cério e iodo quantifica-se a supressão da fluorescência do CPT- 11 (lei Stern-Volmer).

$9,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($3,4 \times 10^1 \text{ ng mL}^{-1}$). O espectro de varredura sincronizada foi utilizado para detectar CPT na presença de TPT. O LQ de CPT nessa condição foi $7,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($2,6 \text{ ng mL}^{-1}$). A incerteza expandida ($U_{k=2,95\%}$) desse método foi calculada utilizando a medida de fluorescência de um padrão de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,7 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$) de CPT. Os resultados das incertezas foram: $6,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($2,4 \times 10^1 \text{ ng mL}^{-1}$) de CPT para o método em que se utiliza o espectro de 2ª derivada e $1,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($4,3 \times 10^1 \text{ ng mL}^{-1}$) de CPT para o método em que se utiliza o espectro sincronizado. No segundo método utilizou-se a derivatização fotoquímica em meio básico (reação que modifica as propriedades luminescentes do analito) para amplificar o sinal da CPT e melhorar a detectabilidade. O LQ da concentração de CPT na presença de TPT ou CPT-11 para esse método foi $2,7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($9,4 \times 10^{-1} \text{ ng mL}^{-1}$). A incerteza expandida ($U_{k=2,95\%}$) foi calculada utilizando a medida de fluorescência de um padrão com concentração de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,7 \times 10^3 \text{ ng mL}^{-1}$) de CPT fotoderivatizado. O resultado da incerteza foi $5,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($2,0 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$).

A eletroforese capilar foi utilizada como técnica para a determinação de camptotecina em extratos de *Nothapodytes foetida*, planta de origem chinesa. Nesse estudo, a CPT foi extraída de amostras da planta com dimetilsulfóxido (DMSO) em temperatura elevada. O extrato foi injetado em um capilar de separação e analisado no modo MEKC utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS) como eletrólito de trabalho. Reportou-se uma faixa de trabalho de 5 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de variação menor do que 7%. O método foi aplicado para monitorar a quantidade de camptotecina durante o cultivo da planta medicinal [108]. Para a análise simultânea das três substâncias, um método baseado em cromatografia eletrocínética micelar foi proposto [79]. Estudos univariado e multivariado (planejamento de composto central) foram utilizados para: otimizar as condições analíticas; verificar as possíveis interações entre as variáveis do processo e determinar simultaneamente CPT, TPT e CPT-11. Os limites de quantificação das substâncias foram $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($4,9 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$) de TPT; $8,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($3,0 \times 10^1 \text{ ng mL}^{-1}$) de CPT e $4,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,5 \times 10^1 \text{ ng mL}^{-1}$) de CPT-11.

Um resumo das características principais dos métodos analíticos baseados em espectrofluorimetria e eletroforese capilar desenvolvidos para determinação de CPT, TPT e/ou CPT-11, publicados entre os anos de 2000 e 2009, encontra-se na Tabela 6.3.

Tabela 6.3: Métodos espectrofluorimétricos e de eletroforese capilar para a determinação de CPT, TPT e CPT-11

Análito	Matriz	Metodologia	Condições analíticas	Parâmetros de validação					Ref.	
				LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)	% Recuperação	Precisão -CV(%)	Faixa linear (ng mL ⁻¹)		r
CPT	<i>N. foetida</i>	MEKC	Extração: DMSO 60%, SDS, pH 8-10. Detecção com PDA a 369 nm.	n.r	5,0 x 10 ³	n.r	< 5,0	5,0 x 10 ³ – 4,0 x 10 ⁴	0,999	[108]
CPT-11	Fármaco/ medicamento Urina	Espectrofluorimetria, λ_{ex} = 368 nm, λ_{em} = 426 nm	Meio ácido	2,1	5,0 x 10 ²	100 – 104,3	2,5	5,0 x 10 ² – 2,5 x 10 ³	0,997	[106]
			Oxidação com iodo	5,0 x 10 ⁻¹	2,5 x 10 ²		1,4	2,5 x 10 ² – 2,5 x 10 ³	0,999	
			Oxidação com Ce (IV)	2,6	2,5 x 10 ²	106,7 – 119,7	1,7	2,5 x 10 ² – 2,5 x 10 ³	0,994	
			Reação com Fe ³⁺	2,0	2,0 x 10 ²		1,5	2,0 x 10 ² – 2,0 x 10 ³	0,998	
CPT-11	Fármaco	Espectrofluorimetria	Fotoirradiação na presença de H ₂ O ₂ . Análise de dados de 2ª ordem: PARAFAC, N-PLS e BILLS	1,2 x 10 ¹	4,2 x 10 ¹	101 – 104	1,6	5,0 x 10 ² – 1,0 x 10 ³	0,999	[107]
CPT	Fármaco e medicamento fortificados com CPT-11	Espectrofluorimetria	CPT/CPT-11 (1:50) λ_{iso} = 267 nm. Análise do espectro 2ª derivada	1,0 x 10 ¹	3,4 x 10 ¹		3,2	3,4 x 10 ¹ – 3,5 x 10 ²	0,999	
CPT	Fármaco e medicamento fortificados com TPT	Espectrofluorimetria	CPT/TPT (1:10) λ_{iso} = 368 nm. Análise do espectro sincronizado	8,0	2,6 x 10 ¹	100 – 104	3,9	2,6 x 10 ¹ – 1,7 x 10 ³	0,999	
CPT	Fármaco e medicamento fortificados com CPT-11 ou TPT	Espectrofluorimetria	Meio básico. CPT/TPT (1:50) ou CPT/CPT-11 (1:10). Irradiação UV/VIS por 26 min, $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm) = 368/450	3,0 x 10 ⁻¹	9,0 x 10 ⁻¹	101-103	1,8	3,5 x 10 ⁻¹ – 3,5 x 10 ³	0,999	[79]
TPT	Fármacos, saliva fortificada	MEKC	Pré-concentração em linha. Matriz de baixa cond.: água, tampão borato; alta cond.: ácido bórico, SDS, ACN, pH 8,8. 25°C, 25kV, 75s, 50mbar, λ =368nm.	1,6 x 10 ²	4,9 x 10 ²	103 – 117	5,2	3,5 x 10 ² – 3,5 x 10 ⁴	0,997	
CPT				9,1	3,0 x 10 ¹	109 – 105	2,4	3,5 x 10 ² – 3,5 x 10 ³	0,998	
CPT-11				4,5	1,5 x 10 ¹	103 – 113	2,6	3,5 x 10 ² – 3,5 x 10 ³	0,998	

n.r.=não reportado.

A produção de medicamentos falsificados está sendo realizada sob maiores exigências, o que torna imprescindível a aplicação de técnicas analíticas mais rigorosas para a identificação de produtos irregulares. No caso dos medicamentos cujo princípio ativo é CPT-11 ou TPT, a determinação de impurezas de CPT na faixa de concentração encontrada nos medicamentos (mg mL^{-1}) é de suma importância para a identificação de produtos fora do padrão e de falsificações.

A partir da revisão bibliográfica e da avaliação de métodos analíticos existentes, constatou-se que a técnica de HPLC é a mais difundida e a mais utilizada para a análise de CPT e derivados. Esta técnica é a mais versátil, tanto na sua aplicabilidade em diversos tipos de matrizes (vários tipos de amostras biológicas, formulações farmacêuticas), quanto na detectabilidade dos analitos em amplas faixas de concentração (LQ em amostras biológicas a partir de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ e em fármacos a partir de 150 ng mL^{-1}). Porém, apesar da HPLC ser uma técnica de separação que pode aplicar-se para detectar várias substâncias simultaneamente, na grande maioria das metodologias avaliadas somente é utilizada para analisar uma das três substâncias de interesse. Apenas um método foi reportado para a sua aplicação na separação de duas substâncias (TPT e CPT-11) [104], mas a aplicabilidade para a identificação/quantificação de CPT na presença de seus derivados não foi reportada.

No que concerne à espectrofluorimetria, poucas foram as metodologias encontradas que utilizam a técnica para a determinação dos analitos de interesse. Dos métodos avaliados, somente dois [79] podem ser aplicados a CPT na presença de seus derivados em fármacos e medicamentos. Esses métodos foram testados para quantificar CPT em concentrações na ordem dos ng mL^{-1} na presença de CPT-11 ou TPT, inclusive em concentrações até 50 vezes maiores que a da CPT. Além disso, esses métodos foram os únicos —dentre os avaliados neste estudo de caso— em que foi reportado o cálculo da incerteza de medição, dando-lhes maior confiabilidade metrológica.

A eletroforese capilar, tão pouco é uma técnica amplamente utilizada para análise de CPT e derivados. Dos métodos avaliados, somente um [79] pode ser aplicado na quantificação de CPT na presença dos derivados. Esse método (desenvolvido no modo MEKC) é aplicável para a determinação simultânea de CPT, TPT e CPT-11 em saliva e fármacos. A CPT e CPT-11 podem ser detectadas em concentrações na ordem dos ng mL^{-1} utilizando esse método.

A adoção de um método na rotina de trabalho depende não somente das características anteriormente discutidas (aplicabilidade do método na matriz de interesse e detecção do analito na concentração de interesse), mas também do custo e da operabilidade da técnica. No que diz respeito ao

custo, as três técnicas avaliadas requerem altos investimentos na aquisição e manutenção dos equipamentos. A HPLC ainda requer investimentos constantes relacionados aos insumos próprios da técnica (e.g.: solventes de alta pureza, filtros, pré-colunas e colunas de separação). A MEKC e a espectrofluorimetria requerem uma quantidade de insumos em menor escala, se comparada com a HPLC. Em termos de operabilidade, a espectrofluorimetria oferece uma vantagem maior, já que as amostras analisadas por essa técnica usualmente não precisam de pré-tratamentos (limpeza de amostra, filtração), enquanto que esse procedimento é necessário ao analisar amostras utilizando MEKC ou HPLC.

Com base na avaliação das características discutidas (aplicabilidade, detectabilidade, custo e operabilidade) destacam-se os métodos espectrofluorimétricos desenvolvidos por Marques [79], que apresentaram vantagens para serem utilizados: (i) no controle de qualidade de medicamentos cujo princípio ativo é CPT-11 ou TPT, visando identificar produtos fora do padrão e (ii) na identificação de falsificações desses medicamentos.