

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

PEDRO HENRIQUE CAVALCANTI FRANCO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO E DA FARMACOCINÉTICA DE UM
NOVO DERIVADO TIAZOLIL-HIDRAZONA CANDIDATO A FÁRMACO
ANTIFÚNGICO**

Belo Horizonte - MG

2020

PEDRO HENRIQUE CAVALCANTI FRANCO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO E DA FARMACOCINÉTICA DE UM
NOVO DERIVADO TIAZOLIL-HIDRAZONA CANDIDATO A FÁRMACO
ANTIFÚNGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Isabela da Costa César – UFMG

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira – UFMG

Belo Horizonte – MG

F825a	<p>Franco, Pedro Henrique Cavalcanti. Avaliação do perfil de degradação e da farmacocinética de um novo derivado tiazolil-hidrazona candidato a fármaco antifúngico / Pedro Henrique Cavalcanti Franco. – 2020. 185 f. : il.</p> <p>Orientadora: Isabela da Costa César. Coorientadora: Renata Barbosa de Oliveira.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.</p> <p>1. Atividade antifúngica – Teses. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 3. Ressonância magnética nuclear – Teses. 4. Espectrometria de massa – Teses. 5. Antifúngicos – Teses. 6. Farmacocinética – Teses. I. César, Isabela da Costa. II. Oliveira, Renata Barbosa de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 615.4</p>
-------	--



FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO E DA FARMACOCINÉTICA DE UM
NOVO DERIVADO TIAZOLIL-HIDRAZONA CANDIDATO A FÁRMACO
ANTIFÚNGICO**

PEDRO HENRIQUE CAVALCANTI FRANCO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Isabela da Costa César - Orientadora
UFMG

Profa. Renato Barbosa de Oliveira - Coorientadora
UFMG

Prof. Ricardo José Alves
UFMG

Prof. Christian Fernandes
UFMG

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha eterna companheira, Jéssica, que me acompanhou em cada etapa da minha formação, e que me deu a força para ir sempre adiante e querer sempre mais.

À minha família, pelo incentivo, pela educação e pelo apoio em cada decisão tomada e em cada desafio encontrado.

À minha orientadora, Isabela, e a minha co-orientadora, Renata, inspirações profissionais e pessoas sem as quais este projeto não teria sido bem-sucedido.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade e do Laboratório de Química Farmacêutica, por toda a ajuda prestada, por todo conhecimento trocado e por toda conversa tida. Um agradecimento mais que especial à Talita, Naialy, Mateus e Juliana, que estiveram presentes em cada etapa deste projeto e em cada merecido descanso.

Aos Professores Christian, Pianetti, Cristina, Lucas, Gisele, Scheilla, Ricardo, Jarbas e ao agora Professor Saulo pelo suporte dado, pelo auxílio na construção deste trabalho e pela colaboração com ensinamentos valiosos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Faculdade de Farmácia por cada oportunidade oferecida.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”

Carl Sagan

“Se eu vi mais longe que outros, foi por me apoiar sobre os ombros de gigantes”

Sir Isaac Newton

RESUMO

As infecções fúngicas têm se tornado um relevante problema em saúde pública por apresentarem uma crescente incidência, principalmente em pacientes imunodebilitados e hospitalizados. Estima-se que 1,7 bilhão de pessoas no mundo estejam infectadas com algum fungo, levando a 1,4 milhão de óbitos anuais. O arsenal terapêutico antifúngico é limitado pelo baixo investimento da indústria farmacêutica neste campo, pelas poucas opções de alvos moleculares seletivos às células fúngicas e por problemas relacionados à farmacocinética e à crescente resistência de fungos patogênicos. Neste contexto, o Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais desenvolveu moléculas com potencial a fármacos antifúngicos, dentre as quais destaca-se a RI76. O perfil de degradação desta molécula foi estudado e sua susceptibilidade a hidrólise e conversão em um produto de degradação foi descoberta por meio de um método indicativo de estabilidade, desenvolvido em sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e validado segundo a RDC 166/2017 da ANVISA e o guia ICH Q2(R1). O produto de degradação, denominado PD76, apresentou atividade antifúngica superior ao de seu precursor. Adicionalmente, um método de quantificação por ressonância magnética nuclear (RMN) foi desenvolvido e validado para a determinação absoluta da pureza de lotes sintetizados de RI76, medição não possível em CLAE-DAD devido à inexistência de padrões de referência desta substância. Por fim, um método bioanalítico por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial foi desenvolvido para a avaliação farmacocinética de RI76 e PD76 em modelo murino. Uma avaliação preliminar do comportamento farmacocinético demonstrou concentrações plasmáticas de até 250 ng/mL para PD76 e 200 ng/mL para RI76, após administração de uma dose de 100 mg/kg.

Palavras-chave: tiazolil-hidrazona, cromatografia a líquido de alta eficiência, ressonância magnética nuclear quantitativa, espectrometria de massas, antifúngico.

ABSTRACT

Fungal infections are becoming a relevant issue in public health services for its increasing incidence, especially in immune debilitated and hospitalized patients. It is estimated that 1.7 billion people across the world are infected with some type of fungus, which leads to 1.4 million deaths annually. The therapeutic options for antifungal treatment are limited due to a low investment from pharmaceutical companies on this field, few potential targets and mechanisms of action, pharmacokinetics (PK) issues and to the increasing resistance of pathogenic fungi. In this context, the *Laboratório de Química Farmacêutica* from *Universidade Federal de Minas Gerais* has developed molecules with a potential application as antifungal agents, from which RI76 stands out. The degradation profile of this molecule was studied and its susceptibility to hydrolysis and conversion to a single degradation product was determined using a stability-indicating method developed in a high-performance liquid chromatography system coupled to diode array detector (HPLC-DAD) and validated according to ANVISA's RDC 166/17 and ICH's Q2(R1) guideline. This product, named PD76, has shown a more potent antifungal activity than its precursor. Additionally, a quantitative nuclear magnetic resonance (NMR) method was developed and validated to measure the absolute purity of synthesized RI76 batches, as such measurement would not be possible in HPLC-DAD due to the lack of reference standards for this substance. Finally, a bioanalytical method using HPLC coupled to tandem mass spectrometry was developed for the PK profiling of RI76 and PD76 in murine model. A preliminary assessment of its PK behaviour has shown plasmatic concentrations up to 250 ng/mL for PD76 and 200 ng/mL for RI76 after a single-dose administration of 100 mg/kg.

Keywords: thiazolyl-hidrazone, high performance liquid chromatography, quantitative nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais estruturas celulares fúngicas e os fármacos que atuam sobre elas.	30
Figura 2 - Estruturas dos principais antifúngicos comercialmente disponíveis com ação sistêmica	33
Figura 3 – Estrutura, e contribuições de QSAR, do candidato a fármaco RI76.	36
Figura 4 - Gráfico referente a distribuição das espécies de ionização de RI76 versus o pH.....	37
Figura 5 - Rota sintética desenvolvida para RI76.....	38
Figura 6 - Ilustração esquemática do desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade.	42
Figura 7 - Curva farmacocinética para a administração de um fármaco antifúngico por via oral, ilustrando os parâmetros farmacocinéticos avaliados.	48
Figura 8 - Desenvolvimento de um processo hipotético utilizando-se da estratégia de uma variável por vez (a), e pela utilização de planejamento de experimentos (b).	54
Figura 9 - Placa cromatográfica utilizada no monitoramento da reação de formação da tiossemicarbazona. Aplicações: tiossemicarbazona RI72 de referência (A), subproduto de reação (B), alíquota da reação após 120 minutos (C). Fase móvel constituída de hexano e acetato de etila (6:4), revelação realizada por solução de CAM sob aquecimento.....	74
Figura 10 - Espectro de absorção na região do infravermelho da tiossemicarbazona RI72.	74
Figura 11 - Mecanismo proposto para a reação entre 3-hexanona e tiossemicarbazida.	75
Figura 12 - Placa cromatográfica utilizada no monitoramento da reação de formação de RI76. Aplicações: tiossemicarbazona (A), 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (B), amostra de RI76 sintetizada por Lino (2015) (C), amostra sintetizada neste projeto (D). Fase móvel constituída de hexano e acetato de etila (8:2) e revelação por vapor de iodo.	75
Figura 13 - Mecanismo proposto para a segunda etapa da reação entre a tiossemicarbazona e 2-bromo-4'-metoxiacetofenona.....	76
Figura 14 - Espectro na região do infravermelho de RI76.	77
Figura 15 - Espectro de absorção de RI76, na concentração de 16 µg/mL, em ACN:H ₂ O (50:50), na região do ultravioleta.	78
Figura 16 - Cromatograma obtido para a análise de RI76, utilizando fase móvel composta de ACN:H ₂ O (65:35)	80
Figura 17 - Estruturas dos isômeros E e Z do composto RI76.....	80

Figura 18 - Cromatograma obtido para a análise de RI76, utilizando fase móvel adicionada de trietilamina 0,1% e ácido fórmico em quantidade suficiente para reduzir o pH a 3,0.	81
Figura 19 - Cromatograma obtido para RI76 com as condições finais do método. Gradiente de eluição conforme descrito na Tabela 12, sendo A: acetato de amônio 2 mM + 0,1% ácido fórmico e B: acetonitrila. Fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 5 µL em coluna ZORBAX	83
Figura 20 - Cromatogramas obtidos para soluções de uracila (azul) RI72 (vermelho), 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (verde) e RI76 (preto).	83
Figura 21 - Perfil de degradação de RI76, na solução de trabalho, após 3, 6 e 24 horas.	85
Figura 22 - Cromatograma obtido com uma amostra de RI76 preparada no dia anterior da análise. Observa-se degradação da amostra, levando à formação de um pico em 3,04 min (k = 1,27).	86
Figura 23 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em meio neutro, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).	88
Figura 24 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em meio ácido, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).	88
Figura 25 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em meio alcalino, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).	89
Figura 26 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em meio alcalino, sendo o degradante NaOH 0,01 M, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).	90
Figura 27 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em condição oxidativa, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).	91
Figura 28 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em condição oxidativa catalisada por CuSO₄ 50 mM, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).	92
Figura 29 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em condição oxidativa catalisada por íons metálicos, utilizando CuSO₄ 1 mM, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).	92
Figura 30 - Cromatogramas obtidos com a degradação térmica a seco de RI76. O cromatograma em vermelho se trata da amostra controle, em azul a amostra aquecida a 70 °C por 17 dias e em preto, uma solução branco.	94
Figura 31 - Cromatogramas obtidos com a degradação térmica úmida de RI76. O cromatograma em vermelho é obtido com a amostra controle, em azul a amostra aquecida a 70 °C com 75% de umidade relativa por 17 dias, e em preto, uma solução branco.	95
Figura 32 - Cromatogramas obtidos com a degradação térmica úmida de RI76. O cromatograma em vermelho é obtido com a amostra controle, em azul a	

amostra aquecida a 70 °C com 75% de umidade relativa por cinco dias, e em preto, uma solução branco.	96
Figura 33 - Cromatogramas obtidos com a degradação térmica de RI76. O cromatograma em vermelho é obtido com a amostra controle, em azul a amostra aquecida a 60 °C por 30 dias, e em preto, uma solução branco.	97
Figura 34 - Cromatogramas obtidos com a degradação fotolítica de RI76. O cromatograma em vermelho se trata da amostra controle, em azul a amostra exposta e em preto, uma solução branco.....	98
Figura 35 - Cinética de degradação de RI76 nas condições de hidrólise neutra, ácida, alcalina e de oxidação por peróxido.	100
Figura 36 - Cromatograma obtido por CLAE-EM, no modo varredura, para uma amostra de RI76 exposta a HCl 0,1 M.....	101
Figura 37 - Espectro de massas obtido para o pico em 1,95 minutos observado nos cromatogramas de RI76 em condições de estresse, por CLAE-EM.....	102
Figura 38 - Proposta de estrutura para o produto de degradação majoritário obtido nos estudos de degradação forçada.	102
Figura 39 - Mecanismo de hidrólise ácida de RI76 levando à formação do produto de degradação.	103
Figura 40 - Mecanismo de hidrólise alcalina de RI76 levando à formação do produto de degradação	104
Figura 41 - Mecanismo proposto para a síntese do produto de degradação, por meio de reação entre tiossemicarbazida e 2-bromo-4'-metoxiacetofenona. ..	104
Figura 42 - Correspondência de tempos de retenção entre a substância sintetizada (azul) e o produto de degradação obtido em uma amostra de RI76 degradada (vermelho).....	105
Figura 43 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o produto de degradação PD76 sintetizado	105
Figura 44 - Espectro de RMN de ¹ H- do produto de degradação PD76 e ampliação da região de hidrogênios aromáticos para visualização da multiplicidade.	107
Figura 45 - Espectro de -RMN de ¹³ C do produto de degradação PD76 e sub-espectro de DEPT-135.	107
Figura 46 - Método de avaliação de pureza de pico em <i>softwares</i> da Agilent.110	
Figura 47 - Sobreposição de espectros de RI76 obtidos em diferentes porções do pico cromatográfico.	110
Figura 48 - Regressão linear obtida com o ensaio de linearidade para a faixa de concentração de 0,7 µg/mL a 91 µg/mL.....	111
Figura 49 - Gráfico de dispersão dos resíduos obtidos pelo MMQO na faixa linear trabalhada de 0,7 µg/mL a 91 µg/mL.	111
Figura 50 - Avaliação gráfica, em termos de teor obtido versus teor esperado, dos resultados obtidos com o ensaio de exatidão.	116

Figura 51 - Cromatogramas obtidos com injeções de soluções diluídas de RI76 para determinação dos limites de detecção e de quantificação.....	117
Figura 52 - Estrutura química da acetanilida.....	121
Figura 53 - Aparência dos espectros de ¹H-RMN após intervalos de tempo em um experimento de inversão-recuperação.....	122
Figura 54 - Espectro de RMN 1H obtido para uma mistura de RI76 e Acetanilida em DMSO-<i>d</i>₆ a 400 MHz.....	130
Figura 55 - Curvas de intensidade do sinal versus tempo após o pulso de 180° obtidos na sequência de inversão recuperação para os sinais de interesse. À direita, ampliação da região em que as curvas cruzam o eixo x.....	131
Figura 56 - Ampliação do espectro de RMN 1H obtido para uma mistura de RI76 e acetanilida na faixa de 1 a 5 ppm, para visualização da possível interferência do sinal de HOD residual em 4,1 ppm no sinal em 3,78 ppm.....	132
Figura 57 - Exemplo ilustrativo de uma deconvolução espectral. (a) espectro apresentando sobreposição de sinais; (b) espectro deconvoluído.....	133
Figura 58 - Resultados obtidos com a análise termogravimétrica de RI76 (azul) e com a calorimetria de varredura diferencial (vermelho).....	134
Figura 59 - Padrão de intensidade dos sinais de RMN para pulsos de diferentes ângulos de magnetização.....	135
Figura 60 - Mapas de contornos COSY ¹H-¹H (A) e HSQC ¹H-¹³C (B) obtidos em 400 MHz para uma mistura de RI76 e acetanilida evidenciando a seletividade dos sinais.....	139
Figura 61 - Curva de calibração construída para a determinação do teor de RI76 por qRMN com calibração por referência interna.....	141
Figura 62 - Gráfico normal (Gráfico de Daniel) correlacionando os efeitos ordenados aos quantis da distribuição normal.....	144
Figura 63 - Resultados obtidos com a análise de efeitos significativos pelo método de Lenth. Efeitos realçados em vermelho são significativos.....	144
Figura 64 - Curva de calibração construída para a determinação do teor de RI76 por qRMN com calibração por ERETIC 2.....	147
Figura 65 – Cromatogramas obtidos para as transições de massas de quantificação e confirmação de uma amostra contendo PD76, clotrimazol e RI76, analisado em coluna Merck Chromolith C18 (100 x 3 mm) com fase móvel de tampão acetato de amônio 2 mM + HCOOH 0,1% e ACN (30:70).....	157
Figura 66 – Cromatogramas obtidos para as transições de massas de quantificação e confirmação de uma amostra contendo PD76, clotrimazol e RI76, analisado em coluna ZORBAX Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) com fase móvel de tampão acetato de amônio 2 mM + HCOOH 0,1% e ACN (30:70).....	158
Figura 67 - Superfícies de respostas obtidas para o planejamento fatorial utilizado na otimização da recuperação de PD76 e RI76 em amostras biológicas. No lado (A) são apresentadas as recuperações utilizando acetoneitrila como agente extrator, e no lado (B), metanol.....	161

Figura 68 - Superfícies de respostas obtidas para o planejamento de misturas de solventes testados para a recuperação de PD76 e RI76 em amostras biológicas.	162
Figura 69 – Curvas de calibração construídas para a razão de áreas entre os analitos RI76 (A) e PD76 (B) e o padrão interno, <i>versus</i> a concentração dos analitos no plasma.	164
Figura 70 – Concentrações plasmáticas de RI76 e PD76 obtidas após a administração de uma dose de 100 mg/kg <i>per os</i> de cada composto em camundongos.....	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Epidemiologia das principais infecções fúngicas sistêmicas (Adaptado de BROWN <i>et al.</i> , 2012)	29
Tabela 2 - Condições de realização dos estudos de degradação forçada preconizadas pela ANVISA (BRASIL, 2008).	39
Tabela 3 - Limites de notificação, identificação e quantificação para impurezas e produtos de degradação conforme definidos pela ICH e pela ANVISA.	41
Tabela 4 - Termos descritivos de solubilidade da FB 6 e alíquotas do solvente usadas no protocolo de solubilidade.	60
Tabela 5 - Amostras preparadas para o estudo de estabilidade em solução de RI76.....	61
Tabela 6 - Condições iniciais para a condução dos estudos de degradação... 62	
Tabela 7 - Esquema de diluição da solução estoque de RI76, para a avaliação da linearidade do método.....	67
Tabela 8 - Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para avaliação da robustez do método.	72
Tabela 9 - Solubilidade de RI76 em solventes e soluções aquosas avaliadas. 73	
Tabela 10 - Correspondências estruturais das principais bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho de RI76.	77
Tabela 11 - Gradiente desenvolvido para o método indicativo de estabilidade para RI76, sendo que A representa o solvente aquoso e B o modificador orgânico.	82
Tabela 12 - Comparação dos parâmetros cromatográficos obtidos com o preparo da amostra em H ₂ O:ACN (50:50) e em acetonitrila pura (n = 5).	86
Tabela 13 - Número de dias necessários para simular um armazenamento de 24 meses a 25 °C, considerando diferentes energias de ativação.....	94
Tabela 14 - Extensão da degradação de RI76, avaliada em termos de porcentagem de área no cromatograma, em cada condição estudada.	98
Tabela 15 – Equações da cinética de degradação para RI76 nas condições de degradação em solução.	100
Tabela 16 - Correspondências estruturais das bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho do produto de degradação PD76.	106
Tabela 17 - Solubilidade de PD76 em solventes avaliados.	108
Tabela 18 - Atividade antifúngica, expressa em termos de concentração inibitória mínima do produto de degradação obtido.....	108
Tabela 19 - Resultados obtidos com o ensaio de precisão.....	113
Tabela 20 - Recuperações obtidas com o ensaio de exatidão.	115
Tabela 21 - Significâncias, em p-valor, do impacto causado pelas variáveis nas respectivas respostas estudadas no ensaio de robustez.	118

Tabela 22 - Condições de aquisição recomendadas para experimentos quantitativos e as condições selecionadas.....	123
Tabela 23 - Planejamento do estudo de linearidade para validação do método de qRMN.....	125
Tabela 24 - Planejamento fatorial Plackett-Burman para avaliação da robustez do método.....	127
Tabela 25 - Teores de RI76 obtidos por qRMN e por CLAE-DAD para avaliação da exatidão	142
Tabela 26 - Teores de RI76 obtidos por qRMN utilizando-se a calibração por referência interna e por ERETIC 2	148
Tabela 27 – Variáveis estudadas no planejamento fatorial 2³ para otimização do procedimento de precipitação de proteínas.....	153
Tabela 28 – Volumes, em mL, de diclorometano, MTBE e acetato de etila utilizados nas misturas de solventes testadas na extração líquido-líquido ...	154
Tabela 29 – Transições de MRM otimizadas para os compostos RI76, PD76 e para os padrões internos testados.....	156
Tabela 30 – Parâmetros otimizados da fonte de íons para o método desenvolvido.	159

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

4'-MBCF	2-bromo-4'-metoxiacetofenona
ACN	Acetonitrila
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
CAM	Molibdato cérico de amônio (do inglês <i>Ceric ammonium molybdate</i>)
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDC	<i>U.S. Center for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	<i>Clearance</i> (Depuração)
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
C _{máx}	Concentração plasmática máxima
CYP450	Citocromo P-450
d.i.	Diâmetro Interno
DAD	Detector de arranjo de diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DoE	<i>Design of Experiments</i>
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese Capilar
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee for Antimicrobial Susceptibility</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
ITD	Ingestão total diária

K	Fator de retenção
m/z	Relação massa sobre carga
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAFE	<i>Postantifungal effect</i>
PD	Produto de degradação
PP	Precipitação de proteínas
qRMN	Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
$t_{1/2}$	Meia-vida de eliminação
$t_{máx}$	Tempo equivalente ao $C_{máx}$
t_R	Tempo de retenção
V_d	Volume de distribuição
UFC	Unidade formadora de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UR	Umidade relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 Fungos	24
3.1.1 Morfologia dos fungos.....	24
3.1.2 Infecções fúngicas	25
3.2 Agentes antifúngicos	29
3.3 Desenvolvimento de novos fármacos	34
3.4 Derivados tiazolil hidrazonas e o composto de interesse	35
3.5 Impurezas orgânicas.....	38
3.5.1 Estudos de degradação forçada	39
3.6 Ressonância magnética nuclear	43
3.6.1 Quantificação por RMN.....	44
3.7 Estudos farmacocinéticos.....	46
3.7.1 Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas.....	49
3.7.2 Preparo de amostras biológicas	51
3.8 Planejamento de experimentos.....	53
4 CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA RI76 E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	56
4.1 Materiais.....	56
4.1.1 Amostras e reagentes.....	56
4.1.2 Equipamentos e acessórios	57
4.2 Métodos	57
4.2.1 Síntese e caracterização de RI76	57
4.2.2 Avaliação da solubilidade de RI76.....	59
4.2.3 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade.....	60
4.2.4 Avaliação da estabilidade de RI76 em solução	61
4.2.5 Estudo de degradação forçada	62

4.2.6 Caracterização dos produtos de degradação.....	64
4.2.7 Validação do método analítico.....	66
4.3 Resultados e discussão	73
4.3.1 Avaliação da solubilidade de RI76.....	73
4.3.2 Síntese e caracterização de RI76	73
4.3.3 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade.....	78
4.3.4 Avaliação da estabilidade de RI76 em solução	84
4.3.5 Estudo de degradação forçada	87
4.3.6 Caracterização do produto de degradação.....	101
4.3.7 Validação do método analítico.....	109
5 CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO QUANTITATIVO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA RI76 ...	119
5.1 Materiais.....	119
5.1.1 Amostras e reagentes.....	119
5.1.2 Equipamentos.....	119
5.2 Métodos	120
5.2.1 Seleção da substância de referência.....	120
5.2.2 Determinação dos tempos de relaxação (T1)	121
5.2.3 Escolha dos sinais para quantificação	122
5.2.4 Otimização das condições experimentais	122
5.2.5 Validação do método	124
5.2.6 Comparação com a abordagem de calibração externa ERETIC 2	128
5.3 Resultados e Discussão	129
5.3.1 Seleção da substância de referência.....	129
5.3.2 Determinação dos tempos de relaxação (T1)	130
5.3.3 Escolha dos sinais para quantificação	131
5.3.4 Otimização das condições experimentais	134
5.3.5 Validação do método	138
5.3.6 Comparação com a abordagem de calibração externa ERETIC 2	146
6 CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE- EM/EM PARA O ESTUDO FARMACOCINÉTICO DE RI76 E PD76 EM MODELO ANIMAL	150
6.1 Materiais.....	150
6.1.1 Amostras e reagentes.....	150

6.1.2 Equipamentos.....	150
6.2 Métodos	151
6.2.1 Otimização das transições de MRM	151
6.2.2 Otimização cromatográfica	151
6.2.3 Otimização da fonte de íons.....	152
6.2.4 Otimização do preparo de amostras	152
6.2.5 Estudo piloto de farmacocinética	154
6.3 Resultados e discussão	155
6.3.1 Otimização das transições de MRM	155
6.3.2 Otimização cromatográfica	157
6.3.3 Otimização da fonte de íons.....	159
6.3.4 Otimização do preparo de amostras	160
6.3.5 Estudo piloto de farmacocinética	163
7 CONCLUSÕES.....	166
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168
APÊNDICE A – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do IV ABCF Congress, realizado na cidade de São Paulo – SP, em setembro de 2018.....	181
APÊNDICE B – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas, realizado na cidade de Belo Horizonte – MG, em novembro de 2018	183
APÊNDICE C – Artigo publicado na revista <i>Magnetic Resonance in Chemistry</i>, referente ao CAPÍTULO 2 deste trabalho.	185
APÊNDICE D – Aprovação do protocolo submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG para realização do estudo de farmacocinética descrito no CAPÍTULO 3 deste trabalho.	186

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas podem ser classificadas como superficiais, subcutâneas ou sistêmicas. A última sendo frequentemente observada em pacientes imunocomprometidos seja pela Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), por tratamento imunossupressor ou idade avançada. Estima-se que até 90% dos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) serão acometidos por uma infecção fúngica oportunista ao longo da vida.

As infecções sistêmicas são causadas principalmente por fungos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*. Estas infecções são críticas por apresentarem em muitos casos, mortalidade superior a 50% dos casos.

Estudos demonstram que uma das causas para a mortalidade elevada destas infecções é o número reduzido de medicamentos com eficácia adequada para o tratamento. Muitos antifúngicos disponíveis hoje comercialmente apresentam limitações relacionadas à farmacocinética, como biodisponibilidade reduzida ou vias de administrações restritas.

Torna-se então relevante o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos com perfil farmacocinético e eficácia adequados para combater estas infecções oportunistas. Neste contexto, nosso grupo de pesquisas desenvolveu uma série de compostos com potencial antifúngico, dentre os quais o composto RI76 apresentou um bom perfil de eficácia e segurança.

De forma a viabilizar a inserção de novos medicamentos no mercado, é interessante para a academia o prosseguimento na investigação dos compostos que se configurem como potenciais candidatos a fármacos.

O conhecimento da estabilidade e do perfil de degradação de um fármaco é de suma importância nesta investigação, uma vez que fármacos instáveis podem levar à formação de produtos de degradação de comportamento desconhecido, podendo

comprometer a segurança do uso do medicamento. Além disso, a redução do teor da substância devido à degradação pode levar a perda de eficácia.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), assim como outras agências regulatórias, delineou protocolos de estudos de degradação que podem ser conduzidos para prever produtos e rotas de degradação às quais um fármaco pode ser susceptível.

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é a técnica de escolha para estes estudos por permitir a separação da substância estudada de seus produtos de degradação e a quantificação destas substâncias na amostra analisada. O acoplamento da CLAE a detectores de arranjo de diodos (DAD) ou espectrometria de massas (EM) fornece ainda informações úteis para a elucidação estrutural dos produtos obtidos.

Outro ponto chave do desenvolvimento de novos produtos é a determinação da pureza do composto candidato a fármaco. As principais farmacopeias definem em suas monografias que insumos farmacêuticos ativos devem possuir teor entre 98% e 102%, para a grande maioria dos produtos de origem sintética (BRASIL, 2019; USP, 2018). Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) pode ser utilizada para quantificação de substâncias orgânicas sem a necessidade de um padrão de referência daquela substância, tornando-a ideal para a análise de novos fármacos.

Finalmente, um terceiro estudo que deve ser realizado durante o desenvolvimento de novos fármacos é a avaliação da farmacocinética em modelo animal. Com esta pesquisa, é possível conhecer a maneira na qual um fármaco se comporta no organismo animal, permitindo a predição do comportamento em humanos e a inferência de vias de administração e doses adequadas.

O estudo de farmacocinética requer o desenvolvimento de métodos bioanalíticos que contemplem procedimentos de extração do fármaco de matrizes biológicas, e

análises por técnicas suficientemente sensíveis para a detecção de baixas concentrações do analito, tal como a CLAE-EM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudo de degradação forçada da tiazolil hidrazona RI76, candidato a fármaco antifúngico, por meio do desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE-DAD. Avaliar a pureza de amostras sintetizadas de RI76 por meio do desenvolvimento e validação de um método por qRMN. Estudar a farmacocinética de RI76 em modelo animal, por meio do desenvolvimento e validação de um método bioanalítico por CLAE-EM/EM.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar RI76 para condução dos estudos;
- submeter o candidato a fármaco RI76 aos testes de degradação forçada;
- desenvolver e otimizar um método analítico indicativo de estabilidade seletivo para RI76 e seus produtos de degradação, utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos;
- caracterizar os produtos de degradação formados empregando a espectrometria de massas;
- desenvolver método quantitativo por ressonância magnética nuclear para a determinação da pureza das amostras sintetizadas de RI76;
- desenvolver método de preparo de amostra, utilizando ferramentas de planejamento de experimentos, para extração de RI76 de plasma de camundongos;
- desenvolver e otimizar um método bioanalítico para determinação de RI76 e seus produtos de degradação relevantes em plasma de camundongos, utilizando cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas sequencial;
- validar os métodos desenvolvidos de acordo com a legislação vigente;
- avaliar o perfil farmacocinético de RI76 e seus produtos de degradação relevantes por meio da administração *per os* do composto em camundongos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fungos

Por muito tempo, os fungos foram considerados vegetais e, somente em 1969, passaram a ser classificados em um reino a parte denominado *Fungi*. Diversos fatores, hoje bem esclarecidos, permitem a diferenciação de fungos e plantas, como a ausência de pigmento fotossintético, ausência de celulose na parede celular e o armazenamento de glicogênio como fonte de energia (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008; MURRAY *et al.*, 2014).

Fungos são ubíquos, estando presentes em vegetais, na água, em animais, no homem e no solo, não necessitando em grande parte das vezes de um hospedeiro para propiciar seu ciclo de vida (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008; GARBER, 2001).

3.1.1 Morfologia dos fungos

Os fungos são seres vivos eucarióticos, mononucleados, denominados leveduras, ou multinucleados, como os fungos filamentosos, os bolores e os cogumelos (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008, MURRAY *et al.*, 2014).

As células fúngicas contém uma parede celular rígida que protege a célula de choques osmóticos e é composta de modo geral por glucanas, mananas, e em menor quantidade, quitina, proteínas e lipídeos. As glucanas são polímeros de glicose presentes nos fungos nas configurações β -1,3 e β -1,6 (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008, LEWIS *et al.*, 2011; ODDS *et al.*, 2003).

Abaixo da parede celular está presente a membrana citoplasmática, que assim como em humanos, atua como uma barreira semipermeável, no transporte ativo e passivo de materiais, para dentro e fora da célula (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008). Da mesma forma que o colesterol está presente nas células humanas para garantir fluidez à membrana, nas células fúngicas está presente o ergosterol (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008; ODDS *et al.*, 2003).

3.1.2 Infeções fúngicas

Conforme mencionado anteriormente, grande parte dos fungos não necessita de hospedeiros para sobreviverem e se reproduzirem. No entanto, algumas espécies são patogênicas, podendo causar infecções em seres humanos. Apenas poucas espécies de fungos causam infecções em indivíduos saudáveis, outras se tornam patogênicas quando o indivíduo está imunologicamente debilitado por doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou por efeitos farmacológicos e toxicológicos de imunossuppressores e quimioterápicos (DELARZE e SANGLARD, 2015; GARBER, 2001; LEWIS *et al.*, 2011).

As infecções fúngicas podem ser superficiais, subcutâneas e/ou sistêmicas. As infecções superficiais ocorrem na pele, unhas, cabelo e mucosas. Dentre as doenças de pele existentes, as infecções fúngicas são as mais frequentemente observadas, afetando milhões de pessoas mundialmente (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008; GARBER, 2001; TYAGI, 2016). Estima-se que aproximadamente 1,7 bilhão de pessoas no mundo estejam infectadas com fungos patogênicos, levando a morte de 1,5 milhão de pessoas por ano (BROWN *et al.*, 2012; DELARZE e SANGLARD, 2015).

A maioria das infecções fúngicas superficiais é causada por fungos dermatófitos como os do gênero *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Epidermophyton* spp.. Estes são causadores das infecções conhecidas como *Tinea pedis*, quando nos pés, *Tinea capitis*, quando na cabeça, e *Tinea unguium*, nas unhas, e são caracterizadas por prurido, descamação, perda de cabelo (*Tinea capitis*) e descoloração e fragilidade das unhas (*Tinea unguium*) (GARBER, 2001; TYAGI, 2016). Outra infecção fúngica comum na superfície da pele é a *Tinea versicolor*, causada pelo *Malassezia furfur* e caracterizada por hipo ou hiperpigmentação do extrato córneo (MURRAY *et al.*, 2014; SAVIN *et al.*, 1996).

As infecções fúngicas na unha são responsáveis por um terço de todas as infecções fúngicas superficiais e pela metade de todas as doenças que acometem este tecido. Estima-se que 2 a 13% da população mundial sejam acometidos por este tipo de

infecção, sendo que em grupos de risco este número pode subir para 30% (BROWN *et al.*, 2012; CHIRITESCU *et al.*, 1996; LEVY, 1997).

Dentre as infecções fúngicas superficiais, talvez a mais conhecida seja a candidíase. Causada por fungos do gênero *Candida* spp., acomete principalmente mucosas do trato gastrointestinal superior (boca e esôfago) e do trato genital. A candidíase vaginal é a infecção ginecológica mais frequente em mulheres saudáveis, sendo que 95% dos casos são causados pela *C. albicans* (GARBER, 2001). Estima-se que até 75% das mulheres sofrerão de ao menos um episódio de candidíase vulvovaginal durante seu período fértil (BROWN *et al.*, 2012).

A transmissão das infecções fúngicas superficiais se dá principalmente pelo contato direto com indivíduos ou animais infectados, mas também por fômites, e o diagnóstico é facilmente feito por uma combinação de histórico do paciente, exame físico e microscopia ou cultura do tecido infectado (GARBER, 2001; NUCCI *et al.*, 2010).

As infecções fúngicas subcutâneas são causadas por uma variedade de patógenos e estão geralmente limitadas a regiões tropicais e subtropicais, na maioria das vezes não causam risco a vida e são de fácil diagnóstico e tratamento. A esporotricose é causada pelo *Sporothrix schenckii* encontrado no solo e na vegetação e acomete principalmente fazendeiros e jardineiros na América Latina. A cromoblastomicose é uma infecção crônica causada por membros da família Dermatiaceae encontrados também na vegetação e no solo (GARBER, 2001).

Infecções sistêmicas causadas por fungos são predominantemente oportunistas, ocorrendo majoritariamente quando o sistema de defesa do hospedeiro está fragilizado, como por exemplo, em pacientes transplantados, HIV-positivos, neonatos pré-maturos, idosos e/ou em tratamento imunossupressor. Estas doenças são de alta relevância clínica por possuírem alto índice de morbidade e mortalidade (GARBER, 2001; NUCCI *et al.*, 2010). Pacientes submetidos a transplante de medula óssea para o tratamento de doenças hematológicas recebem tratamento imunossupressor para minimizar o risco de rejeição. Com a baixa imunológica,

infecções sistêmicas por *Candida* spp. são observadas, com uma taxa de mortalidade de 73%, e infecções por *Aspergillus* spp. têm índices ainda maiores, de 84% (MEYERS, 1990). Além disso, estima-se que 30% de pacientes que recebem transplante de medula óssea irão desenvolver aspergilose com prognóstico ruim (DELARZE e SANGLARD, 2015).

Pacientes imunocomprometidos pelo vírus HIV são o principal grupo de risco para infecções fúngicas, sendo que 60 a 90% destes são acometidos por ao menos uma infecção fúngica durante o curso da doença. Dentre as infecções oportunistas mais frequentes, estão a candidíase, a aspergilose e a criptococose (GARBER, 2001).

Candidemia, que é a infecção sistêmica causada por fungos do gênero *Candida* spp., é uma importante infecção nosocomial, sendo a quarta maior incidência em nível mundial (BROWN *et al.*, 2012). No Brasil, um grande estudo sobre a incidência de candidemia estimou uma incidência de 2,49 casos a cada 1000 pacientes admitidos no meio hospitalar (COLOMBO *et al.*, 2006; NUCCI *et al.*, 2010). As principais espécies de *Candida* spp. responsáveis por casos de candidemia no Brasil são *C. albicans*, com 40,9% dos casos, *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%) (COLOMBO *et al.*, 2006; NUCCI *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2011). *C. glabrata* é responsável por 4,9% dos casos, apresentando um alto índice de resistência clínica, sendo que alguns estudos populacionais estimam taxas de resistência de até 25% para os principais fármacos triazólicos (BRUNTON *et al.*, 2012; CUENCA-ESTRELLA, 2014; FARMAKIOTIS e KONTOYIANNIS, 2017; NUCCI *et al.*, 2010).

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica causada pelos fungos *Cryptococcus* spp.. A infecção pela espécie *Cryptococcus neoformans* afeta principalmente pacientes imunossuprimidos, sendo uma das principais infecções oportunistas em pacientes HIV-positivos. Por sua vez, a infecção por *Cryptococcus gattii* ocorre também em pacientes imunocompetentes, porém com uma incidência geográfica mais restrita, sendo encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais (NUCCI *et al.*, 2010; PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Um estudo ligado a Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre infecções oportunistas em pacientes com HIV mostrou, no Brasil, uma prevalência de criptococose de 5% (LIZARAZO *et al.*, 2007). A mortalidade da criptococose no Brasil é de, em média, 65% dos casos (PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Outra infecção fúngica sistêmica de importância é a paracoccidioidomicose, causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, e também conhecida como blastomicose sul-americana. Ela é causada pela inalação do fungo e pode se apresentar anatomopatologicamente em diversas formas, como tegumentar, linfática, visceral ou mista (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008). As lesões se apresentam como abscessos ou inflamações granulomatosas com centros necróticos (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008).

A paracoccidioidomicose é distribuída por regiões tropicais e subtropicais da América Latina. Os poucos casos relatados nos EUA, na Europa, Ásia e África correspondem a pacientes que haviam residido anteriormente em áreas endêmicas (ALTHERTHUM e TRABULSI, 2008).

As infecções fúngicas sistêmicas são condições críticas, que apresentam taxas de mortalidade muitas vezes superiores às infecções bacterianas e virais mais agressivas (BROWN *et al.*, 2012). Na **Tabela 1** são apresentados dados epidemiológicos de incidência e mortalidade das principais infecções fúngicas sistêmicas.

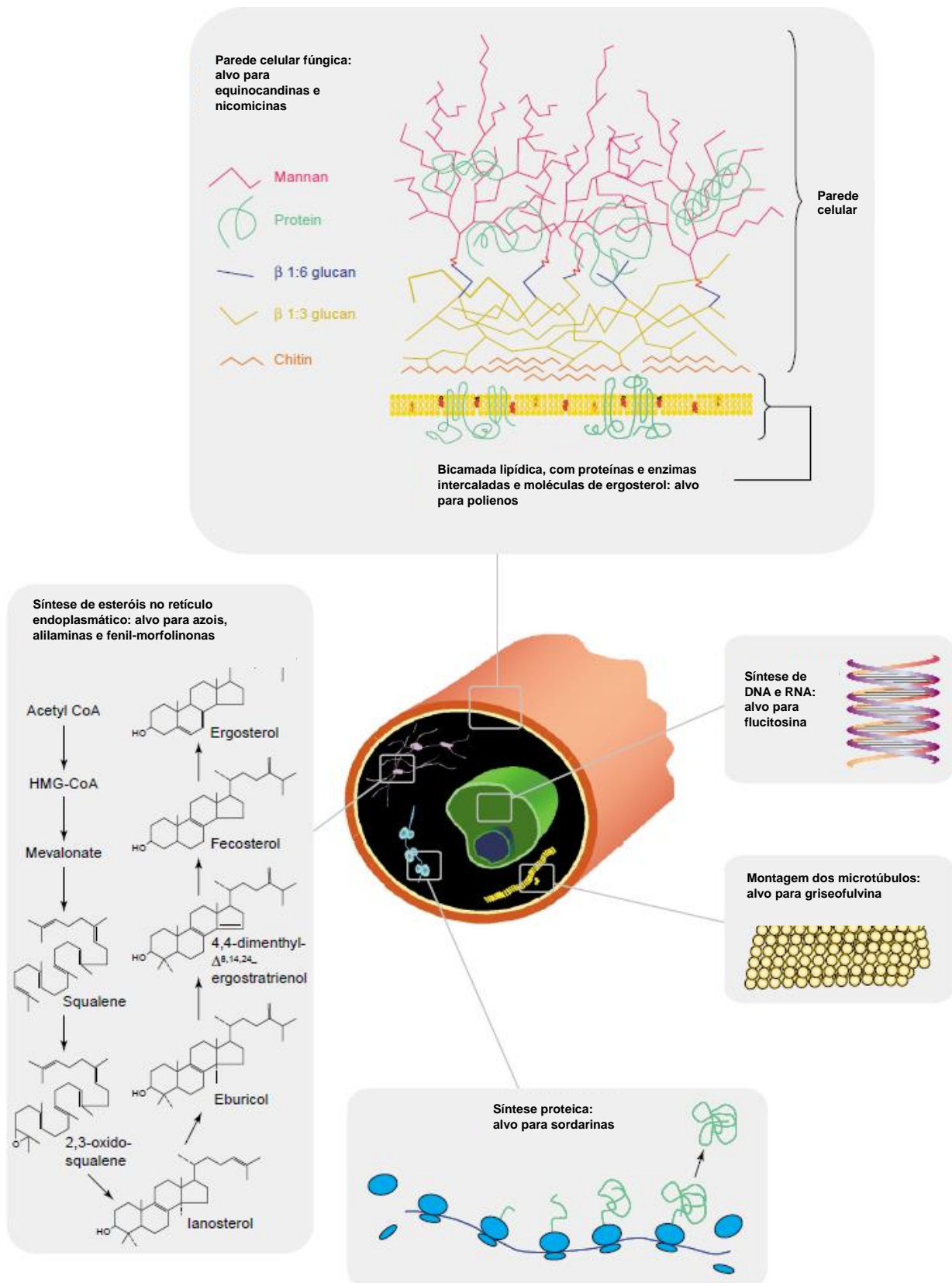
Tabela 1 - Epidemiologia das principais infecções fúngicas sistêmicas (Adaptado de BROWN *et al.*, 2012)

Doença (espécie causadora mais comum)	Localização	Número de infecções de risco/ano	Taxa de mortalidade (% de infectados)
Micoses invasivas oportunistas			
Aspergilose (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	Mundial	>200.000	30-95
Candidíase (<i>Candida albicans</i>)	Mundial	>400.000	46-75
Criptococose (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	Mundial	> 1.000.000	20-70
Pneumociste (<i>Pneumocystis jirovecii</i>)	Mundial	>400.000	20-80
Mucormicose (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Mundial	>10.000	30-90
Micoses dimórficas endêmicas			
Blastomicose (<i>Blastomyces dermatidis</i>)	Oeste dos EUA	~3.000	<2-68
Coccidioidomicose (<i>Coccidioides immitis</i>)	Oeste dos EUA	~25.000	<1-70
Histoplamose (<i>Histoplasma capsulatum</i>)	Sudoeste dos EUA	~25.000	28-50
Paracoccidioidomicose (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)	Brasil	~4.000	5-27
Penicilose (<i>Penicillium marneffe</i>)	Sudeste asiático	>8.000	2-75

3.2 Agentes antifúngicos

Por serem organismos eucarióticos, fungos são metabolicamente parecidos com os mamíferos, o que torna difícil a identificação de alvos patógeno-específicos para o desenvolvimento de terapias antifúngicas. A presença de parede celular e de ergosterol na membrana plasmática no lugar do colesterol são diferenças chaves entre fungos e mamíferos que permitiram o desenvolvimento dos principais antifúngicos disponíveis no mercado (BROWN *et al.*, 2012; LEWIS *et al.*, 2011; MORACE *et al.*, 2014; ODDS *et al.*, 2003). Na **Figura 1** estão ilustrados os principais sítios de ação para antifúngicos.

Figura 1 - Principais estruturas celulares fúngicas e os fármacos que atuam sobre elas.



Fonte: adaptado de ODDS *et al.*, 2003.

A terapia sistêmica com antifúngicos teve início em 1958 com a introdução da anfotericina B, um agente poliênico que atua se ligando ao ergosterol da membrana celular fúngica, desestabilizando-a e promovendo o extravasamento do conteúdo intracelular e a morte do microrganismo (BUTTS e KRYSAN, 2012; LEWIS *et al.*, 2011; ODDS *et al.*, 2003).

A seletividade da anfotericina B ao microrganismo é apenas parcial, visto que o colesterol, análogo ao ergosterol, também pode se ligar, embora com menor afinidade, à anfotericina B, promovendo a lise de células humanas. Este mecanismo explica a nefrotoxicidade elevada da anfotericina B. Este fármaco, quando infundido por via intravenosa, promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, resultando em calafrios, febre e rigidez durante a infusão. O desenvolvimento de formulações lipossomais de anfotericina B auxilia na redução da nefrotoxicidade e da liberação de citocinas (BRUNTON *et al.*, 2012; LEWIS *et al.*, 2011; ODDS *et al.*, 2003; SANGLARD e ODDS, 2002).

Os efeitos adversos da anfotericina B, aliados ao aumento da incidência de infecções fúngicas oportunistas a AIDS, e ao aumento de fatalidades por estas doenças em pacientes em terapia imunossupressora, levou a uma necessidade de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. No início da década de 90, o fluconazol entrou no mercado como o primeiro antifúngico da classe dos azóis a ser desenvolvido para uso sistêmico. Anteriormente, em 1979 e em 1981, já haviam sido lançados os azóis de uso tópico miconazol e cetoconazol, respectivamente (BUTTS e KRYSAN, 2012; LEWIS *et al.*, 2011; ODDS *et al.*, 2003).

Os azóis inibem a 14 α -desmetilase, uma enzima fúngica dependente do citocromo P450 (CYP450) que atua na síntese do ergosterol. Ao ser inibida, esta enzima impede a formação deste lipídeo de membrana, reduz a fluidez da membrana, impede o crescimento do microrganismo, eventualmente levando-o a morte. Diferenças de conformação desta enzima entre os diferentes fungos definem a eficácia terapêutica ou a resistência aos azóis (LEWIS *et al.*, 2011; ODDS *et al.*, 2003).

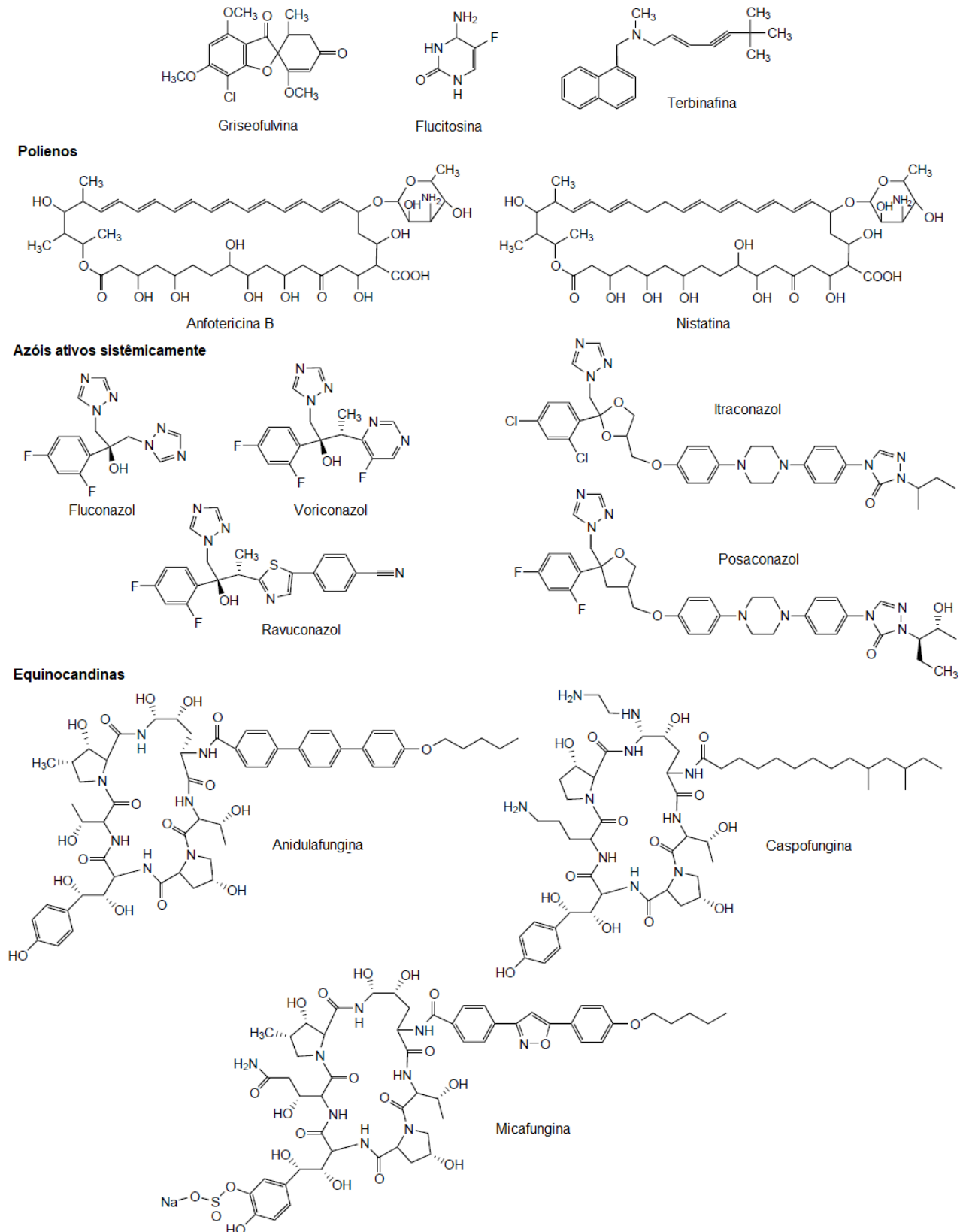
Como a enzima-alvo dos azóis é dependente do CYP450, fármacos desta classe também inibem, com menor afinidade, a CYP450 humana, levando a potenciais interações farmacológicas de grande importância, uma vez que esta enzima é responsável pela metabolização da maioria dos xenobióticos (BRUNTON *et al.*, 2012; LEWIS *et al.*, 2011; ODDS *et al.*, 2003).

De forma similar aos azóis, a terbinafina, pertencente à classe das alilaminas, inibe a formação de ergosterol por inibir a esqualeno monoxigenase. Este fármaco se acumula em grandes concentrações na pele e na unha após administração sistêmica, sendo seu uso restrito ao tratamento de infecções cutâneas (LEWIS *et al.*, 2011; ODDS *et al.*, 2003).

Outros fármacos de menor importância terapêutica são as equinocandinas que inibem a polimerização da β -1,3-D-glucana na parede celular fúngica pela glucana sintetase. A flucitosina é convertida em 5-fluorouracil no microrganismo, o qual, após fosforilação, se liga ao RNA fúngico causando erros na transcrição com consequente morte do organismo. A griseofulvina, por último, tem mecanismo de ação pouco estabelecido, mas sabe-se que ela se liga à tubulina, impedindo a formação de microtúbulos (LEWIS *et al.*, 2011; ODDS *et al.*, 2003).

Na **Figura 2**, encontram-se ilustradas as estruturas químicas dos principais antifúngicos disponíveis comercialmente.

Figura 2 - Estruturas dos principais antifúngicos comercialmente disponíveis com ação sistêmica



Fonte: adaptado de ODDS, 2003.

3.3 Desenvolvimento de novos fármacos

A resistência de microrganismos ao arsenal terapêutico existente no mercado é uma ameaça crescente à saúde humana e gera um grande impacto socioeconômico aos sistemas de saúde. No entanto, as medidas tomadas para contornar o problema têm se mostrado insuficientes (DELARZE e SANGLARD, 2015).

A alta prevalência de infecções bacterianas hospitalares leva a uma busca incansável por novos fármacos pelas grandes indústrias farmacêuticas e de biotecnologia mundiais. No entanto, Spellberg *et al.* (2004) mostraram que dos 225 novos medicamentos aprovados pelo FDA entre 1998 e 2002, apenas sete eram antibacterianos, e que dentre as 418 entidades químicas no *pipeline* de pesquisa e desenvolvimento das principais indústrias farmacêuticas mundiais, apenas 31 eram estudadas com o foco de tratar infecções, sendo cinco deles antibacterianos.

Em relação ao desenvolvimento de antifúngicos, o quadro é ainda pior, apenas dois antifúngicos foram lançados no mercado entre 1998 e 2004, e dos 31 agentes anti-infecciosos no *pipeline* farmacêutico, apenas três são antifúngicos. Isto significa que de 418 moléculas cujo desenvolvimento foi divulgado, menos de 1% têm como objetivo tratar infecções fúngicas (SPELLBERG *et al.*, 2004). Estudos mais recentes não têm apresentado uma evolução neste cenário, demonstrando que as infecções fúngicas ainda são negligenciadas no desenvolvimento de novos ativos farmacêuticos (PERFECT, J. R., 2017; VAN DAELE *et al.*, 2019).

O monitoramento de fungos por agências de saúde pública é também reduzido, com exceção do *U.S. Center for Disease Control and Prevention* (CDC), não há programas de controle de infecções fúngicas, nem mesmo pela OMS. Tal situação limita os dados sobre a epidemiologia de resistência fúngica no mundo (BROWN *et al.*, 2012).

Percebe-se que o desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas é de importância quando se avalia que boa parte dos antifúngicos presentes no mercado sofre de restrições nas vias de administração, espectro de atividade limitado e

muitas vezes biodisponibilidade reduzida nos tecidos alvo (BROWN *et al.*, 2012). A alta mortalidade das infecções fúngicas está muitas vezes atrelada a ausência de antifúngicos de grande eficácia (BUTTS e KRYSAN, 2012).

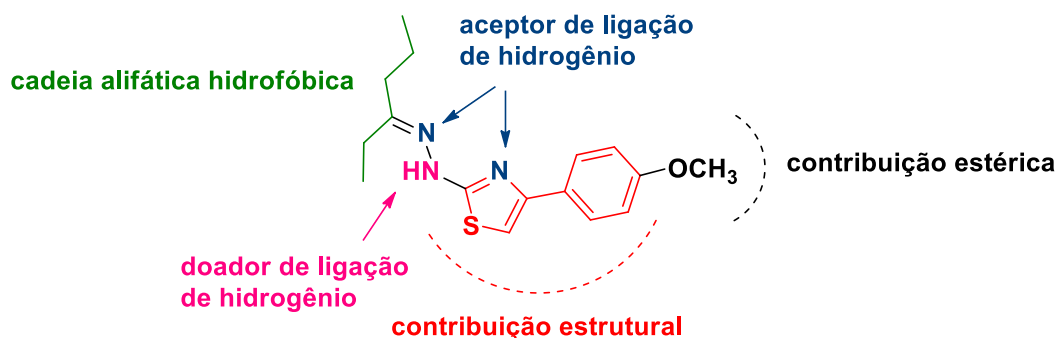
Torna-se ainda mais crítica esta necessidade quando se observa que a incidência de casos de candidemia por *C. glabrata*, uma espécie que apresenta maior resistência ao tratamento antifúngico, aumentou significativamente nos últimos anos (CUENCA-ESTRELLA, 2014; NUCCI *et al.*, 2010; PASQUALOTTO *et al.*, 2008; PFALLER, 2012). Percebe-se que há uma correlação entre o uso de fluconazol e a maior incidência de candidemia por *C. glabrata* (PASQUALOTTO *et al.*, 2008). Apesar de a profilaxia com fluconazol para a prevenção de candidemia em pacientes pós-cirúrgicos estar relacionada com uma diminuição dos casos de candidemia, há um aumento da proporção de casos causados por espécies que não a *C. albicans* (CASTÓN-OSORIO *et al.*, 2008; FARMAKIOTIS e KONTOYIANNIS, 2017).

3.4 Derivados tiazolil hidrazonas e o composto de interesse

Lino (2015) sintetizou uma série de 15 tiazolil hidrazonas no Laboratório de Química Farmacêutica (LQF) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A eficácia dos compostos, em termos da concentração inibitória mínima (CIM), foi testada frente a sete importantes espécies fúngicas, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatti* e *Paracoccidioides brasiliensis*, e sua segurança foi avaliada em termos de toxicidade (IC₅₀) em células humanas, pelo grupo de pesquisa em Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (LINO, 2015).

O composto RI76 (2-[2-(hexan-3-ilideno)hidrazinil]-4-(4-metoxifenil)tiazol) (**Figura 3**) apresentou valores de CIM próximos, ou até mesmo menores do que aqueles obtidos com o fluconazol para todas as espécies fúngicas testadas, além de pouco tóxico em células HEK-293, cultura derivada de células renais embrionárias, utilizada em avaliações toxicológicas *in-vitro*. Estes dados fazem do composto RI76 um promissor candidato a fármaco.

Figura 3 – Estrutura, e contribuições de QSAR, do candidato a fármaco RI76.



Fonte: adaptado de LINO *et al.*, 2017.

Estudos de relação estrutura atividade quantitativa (QSAR) utilizando essa série de compostos, realizados pelo grupo de pesquisa do LQF, demonstram que a presença da porção tiazolil hidrazona, de uma cadeia alifática hidrofóbica e de um anel aromático *para*-substituído é fundamental para a atividade antifúngica (LINO, 2015).

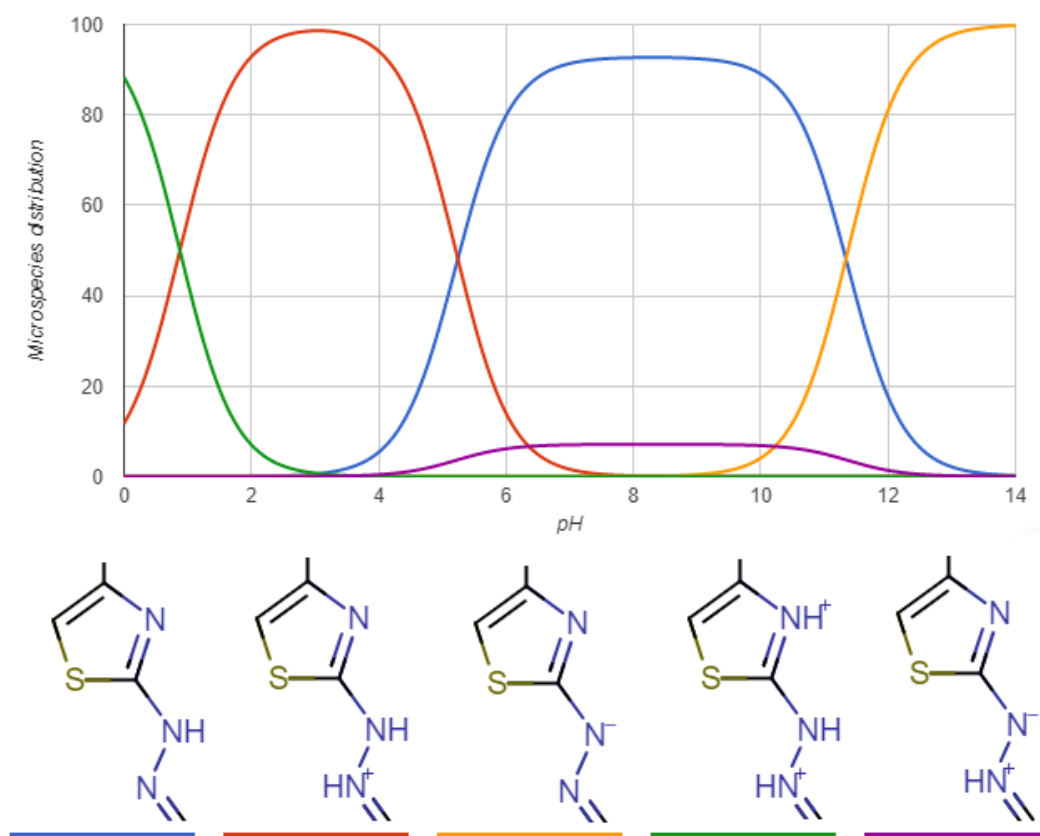
O composto RI76 se apresenta como um pó marrom, possui 303.1405 Da de massa molar e apresenta três nitrogênios ionizáveis. O nitrogênio do anel tiazólico apresenta um pKa do ácido conjugado de 0,88, o nitrogênio primário ligado diretamente ao anel possui um pKa de 11,37, e o nitrogênio ligado a ele possui um pKa do ácido conjugado de 5,21. O logP calculado da molécula é 5,21. Todos os valores foram calculados no website Chemicalize (CHEMICALIZE, 2019).

A presença de três grupos ionizáveis leva a um complexo perfil de ionização, conforme ilustrado na **Figura 4**. Cada curva representa a presença de uma espécie de ionização e o gráfico representa sua abundância em porcentagem, em função do pH.

A solubilidade em água pode ser prevista matematicamente levando-se em consideração os grupos funcionais presentes na estrutura, a cadeia carbônica e o quanto cada grupamento favorece ou desfavorece a solubilidade. O website Chemicalize prevê uma solubilidade máxima de 303,42 mg/mL em pH 0,9, o que

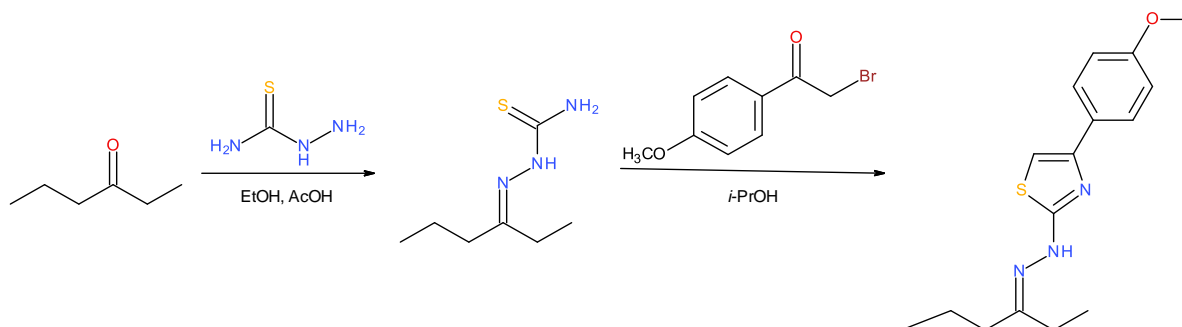
pode ser explicado pelos dois grupos básicos ionizados, favorecendo a solubilidade. A solubilidade cai a partir deste pH, até atingir o valor de 1,285 mg/mL em pH 3. Em valores de pH acima de 3, a solubilidade se mantém abaixo de 1 mg/mL até o pH 13,5, atingindo 3,33 mg/mL em pH 14. A solubilidade prevista em pH fisiológico, i.e. pH = 7,4 é extremamente baixa: 0,008 mg/mL (CHEMICALIZE, 2019; HOU *et al.*, 2004).

Figura 4 - Gráfico referente a distribuição das espécies de ionização de RI76 versus o pH.



A síntese de RI76 está esquematizada na **Figura 5**. A primeira etapa consiste na reação entre 3-hexanona e tiosemicarbazida na presença de etanol e ácido acético sob agitação e refluxo, para a formação de um intermediário com 60% de rendimento. A tiosemicarbazona obtida é purificada por cromatografia em coluna de sílica (CCS) e, em seguida, submetida à reação com a 2-bromo-4'-metoxiacetofenona na presença de isopropanol para a obtenção do produto final, RI76 com 97% de rendimento (LINO, 2015).

Figura 5 - Rota sintética desenvolvida para RI76.



Legenda: EtOH, álcool etílico; AcOH, ácido acético; *i*-PrOH, isopropanol.

Fonte: adaptado de LINO, 2015.

3.5 Impurezas orgânicas

Um ponto central no desenvolvimento de novos fármacos é a garantia de sua eficácia, segurança e qualidade. O conhecimento das impurezas oriundas das etapas de síntese ou da degradação da molécula é, então, de suma importância, uma vez que estas podem acarretar em efeitos farmacológicos desconhecidos, indesejados ou tóxicos, além do risco de ocorrer uma diminuição do teor do fármaco no produto acabado (KOMMANBOYINA e RHODES, 1999; RAO e NAGARAJU, 2003).

A *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) é uma organização internacional, criada inicialmente pelos órgãos regulatórios dos Estados Unidos, da Europa e do Japão, e hoje com participação mundial, que atua desenvolvendo guias e diretrizes para a regulamentação farmacêutica harmonizada (ICH, 2018). O Guia Q3A(R2) trata de impurezas em novos insumos farmacêuticos ativos (IFA), classificando-as em três grupos. As impurezas orgânicas são oriundas da manufatura ou do armazenamento do IFA e podem ser materiais de partida e intermediários sintéticos, subprodutos e produtos de degradação. As impurezas inorgânicas também podem ser reagentes, sais e metais utilizados no processo de síntese do IFA que não foram completamente eliminados do produto final. Por último, solventes residuais são líquidos orgânicos ou inorgânicos usados como

veículos na preparação do IFA que não foram também completamente removidos (ICH, 2006).

Impurezas orgânicas oriundas do processo de manufatura podem ser detectadas com a análise do insumo farmacêutico por técnicas de separação como a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) ou a eletroforese capilar (EC). Já as impurezas que podem ser formadas durante o armazenamento do produto podem ser previstas pelos estudos de degradação forçada (ICH, 2003; ICH, 2006).

3.5.1 Estudos de degradação forçada

Segundo a ICH, estudos de degradação forçada auxiliam na identificação de possíveis produtos de degradação que permitem estabelecer rotas de degradação e a estabilidade intrínseca da molécula (ICH, 2006). A ANVISA conceitua este tipo de estudo como um estudo que permite a geração de produtos de degradação por meio da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/básica e oxidativa, entre outras (BRASIL, 2015).

A ANVISA delinea no Informe Técnico nº 1/2008 as condições nas quais os IFAs devem ser expostos nos estudos de degradação forçada, aqui reproduzidos na **Tabela 2**. A Organização Mundial da Saúde (OMS) apresenta os mesmos requisitos da ANVISA no Anexo 5 de seu *Technical Report Series 929* de 2005 (WHO, 2005).

Tabela 2 - Condições de realização dos estudos de degradação forçada preconizadas pela ANVISA (BRASIL, 2008).

Condição	Valor
Aquecimento	60 °C
Umidade	75% UR ou mais
Hidrólise ácida	0,1 M HCl
Hidrólise alcalina	0,1 M NaOH
Oxidação	3% (v/v) H ₂ O ₂
Fotólise	UV-B Fluorescente
Oxidação por íons metálicos (opcional)	0,05 M Fe ²⁺ ou Cu ²⁺

A ICH, por sua vez, não padroniza condições específicas como a ANVISA. É descrito no guia Q1A apenas que o efeito da temperatura deve ser avaliado em mais de um nível em incrementos de 10 °C (50 °C e 60 °C, por exemplo), que a umidade deve ser de 75% UR ou superior, e que a fotólise deve seguir o procedimento descrito no guia Q1B (ICH, 1996; ICH, 2003). Outra distinção significativa entre os requerimentos da ANVISA e da ICH é de que a primeira requer uma degradação de ao menos 10% nas condições de estresse, enquanto a ICH não demanda uma degradação mínima, apenas uma avaliação racional, bem documentada e justificada do estudo de degradação forçada. A ANVISA e o ICH declaram ainda que as condições de degradação, incluindo temperatura e tempo de exposição podem ser alterados de forma racional, de modo a atingir a degradação desejada (BRASIL, 2015; ICH, 2006; JANZEN, 2016).

Os produtos de degradação encontrados durante o estudo de degradação forçada são utilizados no desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade, ou seja, que permite a identificação de cada impureza obtida na fabricação de lotes e nos estudos de estabilidade (ICH, 2003; ICH, 2006; BRASIL, 2015). A quantificação das impurezas e produtos de degradação encontradas na análise por um método indicativo de estabilidade permite então classificá-las perante limites estabelecidos pela ICH e pela ANVISA (**Tabela 3**) (BRASIL, 2015; ICH, 2006).

Limite de notificação é aquele acima do qual a impureza, mesmo que desconhecida, deve ter sua presença registrada no laudo analítico e na documentação do produto. Impurezas encontradas acima do limite de identificação devem possuir no mínimo sua estrutura química elucidada, e impurezas encontradas acima do limite de qualificação devem ser submetidas a estudos de segurança biológica, sendo avaliados principalmente o potencial mutagênico e carcinogênico (BRASIL, 2015; ICH, 2006).

Tabela 3 - Limites de notificação, identificação e quantificação para impurezas e produtos de degradação conforme definidos pela ICH e pela ANVISA.

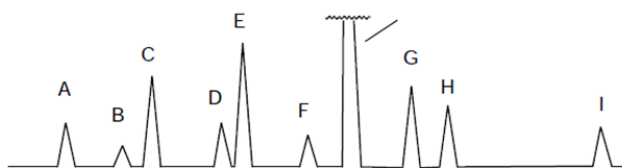
Limites estabelecidos pela ICH (ICH, 2006)			
Dose máxima diária	Limite de notificação	Limite de identificação*	Limite de quantificação*
≤ 2 g/dia	0,05%	0,10% ou 1 mg ITD, o que for menor	0,15% ou 1 mg ITD, o que for menor
> 2 g/dia	0,03%	0,05%	0,05%
Limites estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2015)			
	Dose máxima diária	Limites*	
Limites de notificação	≤ 1 g	0,1%	
	> 1 g	0,05%	
Limites de identificação	< 1 mg	1,0% ou 5 µg ITD, o que for menor	
	1 – 10 mg	0,5% ou 20 µg ITD, o que for menor	
	> 10 mg – 2 g	0,2% ou 2 mg ITD, o que for menor	
	> 2 g	0,10%	
Limites de qualificação	< 10 mg	1,0% ou 50 µg ITD, o que for menor	
	10 mg – 100 mg	0,5% ou 200 µg ITD, o que for menor	
	> 100 mg – 2 g	0,2% ou 3 mg ITD, o que for menor	
	> 2 g	0,15%	

* Limites de impurezas expressos em porcentagem em relação ao fármaco ou em ingestão total diária (ITD) da impureza em massa.

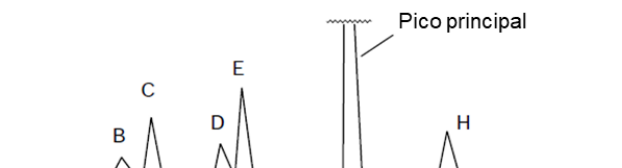
Percebe-se então, que os estudos de degradação forçada são de caráter preditivo, ou seja, são utilizadas condições drásticas que ajudam a prever potenciais produtos de degradação que podem ser visualizados nos estudos de estabilidade, conforme exemplificado por Baertschi *et al.* (2011) na **Figura 6**.

Figura 6 - Ilustração esquemática do desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade.

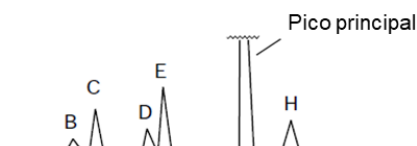
Método inicial desenvolvido a partir da degradação forçada



Produtos detectados em estudos de estabilidade



Método otimizado para os produtos relevantes



Fonte: adaptado de BAERTSCHI *et al.*, 2011.

As condições de degradação estabelecidas pela ANVISA e pelo ICH, e também recomendadas na literatura visam avaliar os principais mecanismos de degradação que um fármaco pode sofrer.

A exposição a altas temperaturas nas degradações térmicas pode levar a quebra de ligações covalentes e a reações termolíticas, ou seja, reações cuja cinética mantém proporcionalidade à temperatura (BAERTSCHI *et al.*, 2011). A hidrólise, por sua vez, se refere a reações mediadas por água, e são afetadas principalmente pelo pH da solução (BAERTSCHI *et al.*, 2011, STEWART e TUCKER, 1985). Reações hidrolíticas geralmente consistem de ataque nucleofílico de íons OH^- presentes na água a regiões eletrofílicas da molécula. Meios alcalinos possuem maior quantidade de íons OH^- , favorecendo estas reações, e meios ácidos possuem íons H^+ que podem se ligar a sítios da molécula aumentando sua eletrofilia e vulnerabilidade ao ataque pela molécula de água (SOLOMONS e FRYHLE, 2012).

As condições de estresse oxidativo estabelecidas no Informe Técnico nº 1/2008 da ANVISA visam prever dois mecanismos principais de oxidação, o mediado por peróxidos e o mediado por transferência de elétrons (BAERTSCHI *et al.*, 2011).

Peróxidos podem ser encontrados em níveis variáveis em excipientes e seus níveis podem aumentar por processos auto-oxidativos, expondo assim os fármacos a este degradante desde a fabricação até o armazenamento (WASYLASCHUK *et al.*, 2007). A transferência de elétrons por sua vez está relacionada a metais de transição, como Fe^{3+} e Cu^{2+} , que oxidam moléculas orgânicas à compostos radicalares desencadeando processos oxidativos (BAERTSCHI *et al.*, 2011; REIS, 2015). Por sua vez, a degradação fotolítica é resultado da exposição de substâncias químicas a radiação ultravioleta-visível, tipicamente entre 300 e 800 nm (BAERTSCHI, 2011).

3.6 Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas mais utilizadas para obtenção de informações acerca da estrutura de compostos orgânicos (DARBEAU, 2006; HOLZGRABE, 2010; MAGGIO *et al.*, 2014).

Seu princípio é baseado na absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência (RF) por núcleos que possuem número quântico de *spin* diferente de zero. Os núcleos atômicos mais utilizados para estudos de RMN são ^1H , ^{13}C , ^{15}N e ^{31}P (DARBEAU, 2006; PAVIA *et al.*, 2009; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Quando núcleos ativos para RMN são expostos a um campo magnético, seus dipolos magnéticos se alinham em duas populações (α e β) e entram em precessão em uma frequência (ν) dada pela equação (COSTA, 2014; FRIEBOLIN, 1993; DARBEAU, 2006; PAVIA *et al.*, 2009; SILVERSTEIN *et al.*, 2005):

$$\nu = \gamma\beta_0/2\pi$$

em que γ é denominada constante magnetogírica e β_0 é o campo magnético presente ao redor do núcleo, o que é influenciado por outros núcleos na vizinhança (DARBEAU, 2006). No experimento de RMN, ao irradiar-se uma molécula com RF na presença de um campo magnético, os núcleos absorvem radiação de frequência igual à frequência de precessão, o que é chamado de ressonância (CLARIDGE, 2016; COSTA, 2014; DARBEAU, 2006; FRIEBOLIN, 1993; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Para a obtenção de um espectro de RMN, equipamentos antigos aplicavam uma metodologia na qual ou mantinha-se a radiofrequência constante e fazia-se uma varredura no campo magnético para igualar a frequência de precessão de cada núcleo ativo, ou mantinha-se o campo magnético constante e fazia-se uma varredura de radiofrequência. As desvantagens deste tipo de experimento são o longo tempo de aquisição do espectro, o que dificulta o acúmulo de dados e a obtenção de uma relação sinal/ruído adequada (DARBEAU, 2006; FRIEBOLIN, 1993; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Com o advento da transformada de Fourier (FT), tornou-se possível analisar toda uma faixa de radiofrequências em um único pulso de radiação. Neste caso todos os núcleos são excitados simultaneamente, e a ressonância gera um sinal conhecido como *free induction decay* (FID), no qual é aplicado a transformada de Fourier para obtenção do espectro de RMN. Equipamentos de FT-RMN são capazes de realizar análises com maior rapidez e, portanto, mais facilmente acumuláveis (CLARIDGE, 2016; DARBEAU, 2006; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

3.6.1 Quantificação por RMN

Embora o emprego qualitativo da técnica de RMN seja amplamente difundido, seu uso quantitativo é pouco explorado. Os potenciais da quantificação por RMN são muitos, por ser um método rápido, não destrutivo e com mínimo preparo de amostra. Além disso, é considerado um método primário de análise, ou seja, que não requer um padrão da substância analisada (BHARTI e ROY, 2012; HOLZGRABE, 2010; MAGGIO *et al.*, 2014; SANTOS, 2014).

Por ser um método primário de quantificação, a técnica de RMN é frequentemente utilizada no meio farmacêutico para determinação da pureza de moléculas em desenvolvimento e para a padronização de substâncias de referência (HOLZGRABE, 2010; SINGH e ROY, 2016). Sua aplicação estende-se também para a determinação da composição isomérica e/ou enantiomérica, para a determinação de impurezas orgânicas e solventes residuais e para o controle de falsificações (HOLZGRABE, 2010; SINGH e ROY, 2016). A Farmacopeia Americana aplica a técnica de RMN quantitativa em algumas de suas monografias (COSTA, 2014; USP, 2018).

O princípio da análise quantitativa por RMN se baseia na proporcionalidade entre a intensidade do sinal (I) e o número de núcleos gerando determinado sinal (N), conforme demonstrado na equação, sendo k_s uma constante espectroscópica (HOLZGRABE, 2010; MALZ e JANCKE, 2005):

$$I = k_s N$$

Adicionando-se uma substância de referência com conhecida pureza na amostra contendo o analito de interesse, é possível quantificar este analito, por meio da comparação entre um sinal da substância de referência e um sinal do analito, no qual sabe-se o número de núcleos responsáveis por cada um, conforme descrito na equação (HOLZGRABE, 2010; MALZ e JANCKE, 2005; SOININEN, 2008):

$$P_x = \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{m_{std}}{m_x} P_{std}$$

em que x é o analito de interesse; std representa a substância de referência; P , a pureza; I , a intensidade do sinal; N , o número de núcleos geradores do sinal; M , a massa molar; e m , a massa pesada.

Para a obtenção de uma quantificação adequada, os parâmetros da técnica devem ser ajustados para que k_s seja, de fato, constante para todos os sinais do espectro,

além de ser fundamental a resolução adequada entre os sinais medidos na quantificação e quaisquer outros para evitar interferências (HOLZGRABE, 2010; SOININEN, 2008).

Um importante parâmetro que deve ser ajustado para a quantificação é o tempo de repetição (d1) entre cada aquisição de espectro, que deve ser suficiente para garantir relaxação completa dos núcleos estudados, ou seja, o retorno da magnetização ao tempo de equilíbrio. Um d1 superior a cinco vezes o maior tempo de relaxação garante um equilíbrio de magnetização de 99,3% (BHARTI e ROY, 2012; COSTA, 2014; HOLZGRABE, 2010).

O número de aquisições acumuladas em cada espectro deve ser suficiente para garantir uma relação sinal ruído (s/n) superior a 250:1 em RMN de ^1H . Desta forma, desvios inferiores a 1% são obtidos (HOLZGRABE, 2010). Adicionalmente, é interessante que cada aquisição possua um número de pontos de dados no FID suficientemente altos para garantir boa resolução espectral (BHARTI e ROY, 2012). O preenchimento do FID com valores nulos, também conhecido como *zero filling*, garante uma menor perda de dados durante a transformada de Fourier e maior exatidão no método (BHARTI e ROY, 2012; HOLZGRABE, 2010).

Adicionalmente aos parâmetros de aquisição e processamento dos dados, deve-se atentar também à substância de referência escolhida, que deve obedecer a alguns critérios para não prejudicar a confiabilidade da quantificação. Esta deve ser solúvel no solvente utilizado na análise, gerar sinais simples em regiões do espectro que não coincidam ou interfiram com sinais do analito, além de não ser higroscópica, reativa ou volátil (BHARTI e ROY, 2012; HOLZGRABE, 2010; RUNDLÖF *et al.*, 2010; SINGH e ROY, 2016; SOININEN, 2008).

3.7 Estudos farmacocinéticos

Os estudos de farmacocinética tem como objetivo avaliar como os organismos reagem a administração de uma substância, por meio da determinação das suas concentrações plasmáticas ao longo de um período após sua administração. Estes

estudos buscam conhecer a absorção, distribuição, metabolismo e excreção, ou ADME, do fármaco investigado, sendo uma importante análise na avaliação da eficácia e segurança de um candidato a fármaco (JOYCE *et al.*, 2014; LEPAK e ANDES, 2011; NIHS, 2001; ROCHE, 2018).

Nas fases iniciais de desenvolvimento de novos fármacos, os estudos de farmacocinética são conduzidos em camundongos (LEPAK e ANDES, 2015; JOYCE *et al.*, 2014). O conhecimento de parâmetros farmacocinéticos nesta fase de desenvolvimento pré-clínico é de suma importância para as indústrias farmacêuticas e centros de pesquisa, uma vez que estudos estimam que, até 1985, cerca de 40% dos fármacos que chegavam aos estudos clínicos falhavam por possuírem farmacocinética inadequada (PRENTIS *et al.*, 1988).

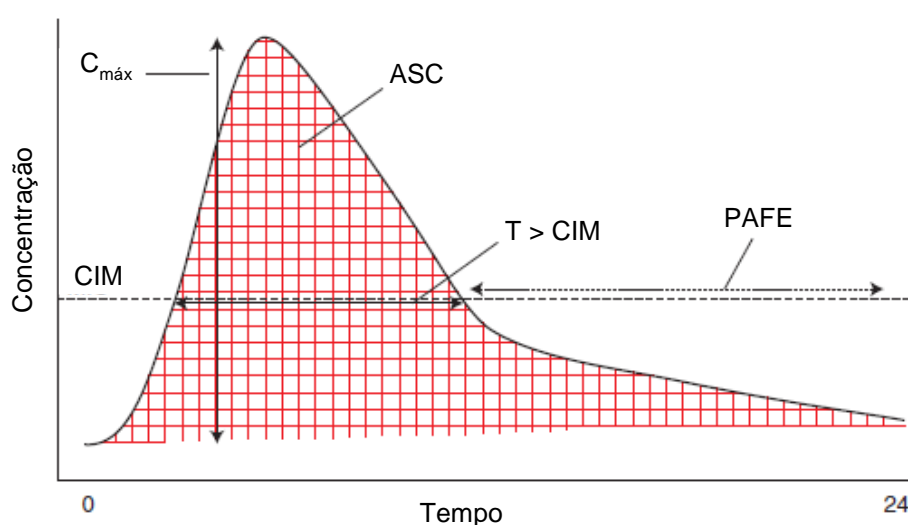
A avaliação da farmacocinética *in vivo* em estudos pré-clínicos permite caracterizar como o corpo lida com o fármaco administrado. Diversos conceitos devem ser compreendidos para uma correta execução de estudos de farmacocinética. A depuração ou *clearance* (CL) é a medida da habilidade do corpo em eliminar um fármaco. O volume de distribuição (V_d) corresponde ao volume aparente que seria necessário para distribuir em equilíbrio um fármaco no organismo, ou seja, ele relaciona a quantidade de fármaco no organismo à sua concentração medida no plasma. Fármacos com alta afinidade tecidual geralmente apresentam alto volume de distribuição. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) consiste no tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco seja reduzida pela metade. Por último, a biodisponibilidade corresponde a fração de fármaco que atinge a circulação sistêmica na sua forma inalterada. A biodisponibilidade oral é reduzida quando comparada a via intravenosa devido aos efeitos de absorção e de metabolismo de primeira passagem (BENET e ZIA-AMIRHOSSEINI, 1995; BUXTON e BENET, 2012; FAN e LANNOY, 2014).

Em um estudo farmacocinético padrão são analisados instrumentalmente amostras de sangue, plasma ou soro coletadas em intervalos de tempo que permitam a construção de parâmetros de área sob a curva (ASC), depuração, concentração plasmática máxima ($C_{máx}$), tempo necessário para atingir essa concentração ($t_{máx}$), e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) do fármaco administrado (LEPAK e ANDES, 2015;

NIHS, 2001). Em estudos de farmacocinética envolvendo agentes microbianos, é interessante avaliar a relação de alguns parâmetros com a CIM do agente estudado. Os três parâmetros mais comumente avaliados na farmacocinética de agentes antimicrobianos é o tempo em que a concentração plasmática permanece acima da CIM ($T > CIM$), a razão entre a concentração plasmática máxima e a CIM ($C_{m\acute{a}x}/CIM$) e a relação entre a biodisponibilidade até 24 h e a CIM (AUC_{0-24}/CIM). Estes parâmetros atuam como parâmetros de eficácia da terapia antifúngica (AMBROSE *et al.*, 2007; LEPAK e ANDES, 2011; LIGNELL, 2011). Um gráfico comum para a farmacocinética de antifúngicos administrados por via oral, ilustrando estes parâmetros encontra-se na **Figura 7**.

Outro fator comumente estudado em experimentos de farmacocinética deste tipo de fármacos é o efeito pós-antifúngico, do inglês *post-antifungal effect* (PAFE), que corresponde ao efeito antifúngico que permanece mesmo após a concentração plasmática do fármaco cair abaixo da CIM. A definição prática do PAFE é o tempo que leva para um microrganismo exposto crescer 1 \log_{10} UFC/mL após a remoção do antifúngico, em comparação com um controle (ANDES, 2011; LEPAK e ANDES, 2015; LIGNELL, 2011).

Figura 7 - Curva farmacocinética para a administração de um fármaco antifúngico por via oral, ilustrando os parâmetros farmacocinéticos avaliados.



Fonte: adaptado LEPAK e ANDES, 2015. **Legenda:** CIM, concentração inibitória mínima; $C_{\text{máx}}$, concentração plasmática máxima; ASC, área sob a curva; PAFE, *post-antifungal effect*.

A ação antimicrobiana dos fármacos pode ocorrer em dois padrões com base em dados farmacocinéticos. O comportamento concentração-dependente indica que quanto maior a concentração plasmática, e quanto maior a relação $C_{\text{máx}}/\text{CIM}$, mais eficiente será o tratamento. Já no comportamento tempo-dependente, o aumento da dose surte pouco efeito na melhora da terapia, a eficácia terapêutica aumenta com o tempo em que o fármaco permanece em suficiente concentração plasmática, ou seja, com o aumento de $T > \text{CIM}$ (AMBROSE *et al.*, 2007; ANDES, 2006; LEPAK e ANDES, 2011; LIGNELL, 2011).

Os triazóis são a classe mais estudada de antifúngicos em termos de farmacocinética e farmacodinâmica. Sabe-se que esta classe de fármacos é tempo-dependente, cuja eficácia é observada em relações $\text{AUC}_{0-24}/\text{CIM}$ do fármaco livre (não ligado a proteínas plasmáticas) acima de 25, sendo que relações abaixo deste valor estão associadas à alta incidência de falha no tratamento (ANDES, 2006; LEPAK e ANDES, 2011; LIGNELL, 2011).

Métodos bioanalíticos, capazes de detectar quantidades reduzidas de fármacos e seus metabólitos em fluidos biológicos, são a principal ferramenta dos estudos farmacocinéticos (NIHS, 2001; ROCHE, 2018).

3.7.1 Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas

Para a análise de fármacos em matrizes biológicas, existe uma grande limitação no uso de detectores espectrofotométricos na cromatografia a líquido devido à baixa detectabilidade e seletividade. Têm-se então utilizado cada vez mais a cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) devido ao seu maior poder de separação. Nesta técnica, além da separação cromatográfica, há também a separação dos analitos por sua relação massa/carga (m/z) no espectrômetro de massas (EM). A CLAE-EM apresenta também maior detectabilidade que a cromatografia acoplada a detectores fotométricos, detectando concentrações de até ng/mL e pg/mL (DE HOFFMANN e STROOBANT, 2007;

DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER e BOURGOGNE, 2003; KUSHNIR *et al.*, 2005).

A EM se baseia na detecção de íons livres formados a partir dos analitos. Estes são obtidos na fase gasosa por diversos mecanismos, sendo o mais comumente utilizado para amostras biológicas em cromatografia a líquido é o de ionização por eletrospray (ESI). Esta ionização ocorre quando um campo elétrico bastante forte é aplicado sob um líquido que passa por um capilar aquecido sob fluxo baixo à pressão atmosférica. A aplicação da voltagem, que pode ser positiva ou negativa dependendo da natureza do analito, leva a um acúmulo de carga na superfície do líquido de modo que, ao final do capilar, será formado um spray com gotículas altamente carregadas. A última etapa do processo consiste na passagem dessas gotículas por um gás inerte e aquecido promovendo a evaporação do solvente e a formação de uma névoa de íons (DE HOFFMANN e STROOBANT, 2007; PEREIRA, 2017).

Os íons formados pelo ESI são então direcionados por um repulsor eletrostático para o analisador de massas. A função do analisador é separar os diversos íons que chegam da interface de ionização por meio de suas relações m/z . Diversos tipos de analisadores de massas foram desenvolvidos ao longo dos anos, cada qual com suas vantagens e limitações. O analisador mais utilizado na determinação quantitativa de fármacos em matrizes biológicas é o do tipo quadrupolo, tanto em sua forma simples, quanto sequencial (DE HOFFMANN e STROOBANT, 2007; PEREIRA, 2017).

Os analisadores do tipo quadrupolo são dispositivos que utilizam da estabilidade de trajetórias em campos elétricos oscilatórios para separar os íons conforme suas relações m/z (DE HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Os analisadores de espectrometria de massas sequenciais (EM/EM) são de grande interesse analítico por promoverem maior seletividade para a técnica. Um importante analisador deste tipo é o triplo quadrupolo, no qual dois quadrupolos atuam como analisadores de massas e são separados por um terceiro quadrupolo que atua como uma célula de colisão. Desta forma, o primeiro quadrupolo (Q_1) pode ser utilizado para a seleção

de um ou mais íons precursores que serão fragmentados na célula de colisão (q_2), e os fragmentos, ou íons produto, podem ser separados no último quadrupolo (Q_3) (DE HOFFMANN e STROOBANT, 2007; KUSHNIR *et al.*, 2005; PEREIRA, 2017).

Diversos experimentos são possíveis em EM/EM, sendo que o mais utilizado na área biofarmacêutica é o de monitoramento de reações selecionadas (SRM). Neste, programa-se Q_1 para permitir apenas a passagem de íons com a relação m/z do analito de interesse, fragmenta-se os íons transmitidos em q_2 , e em Q_3 , programa-se a transmissão de apenas um íon fragmento conhecido do analito de interesse (DE HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010). Tal experimento promove um aumento significativo de seletividade, uma vez que para que um interferente seja detectado, o mesmo deve, além de possuir a mesma relação m/z que o analito alvo, possuir também uma fragmentação semelhante, que gere um íon produto de mesma relação m/z (HOPFGARTNER e BOURGOGNE, 2003).

3.7.2 Preparo de amostras biológicas

Estudos de farmacocinética e demais estudos utilizados na quantificação de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como soro, plasma, sangue, urina e saliva, requerem uma etapa prévia de preparo de amostras. Tal etapa é essencial para a remoção de componentes da amostra que podem influenciar no resultado da análise por efeito de matriz ou danificar a coluna e a instrumentação (DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER e BOURGOGNE, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2001).

As principais técnicas utilizadas para o preparo de amostras biológicas são a precipitação de proteínas (PP), a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS). Estes procedimentos são utilizados com a intenção de obter-se uma boa recuperação dos analitos em solução, removendo componentes da matriz que podem interferir na análise, como proteínas, lipídeos e sais (DEVANSHU *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2001).

A extração por PP consiste na utilização de sais, ácidos ou solventes orgânicos para remover as proteínas da amostra por precipitação. A PP é uma técnica rápida de tratamento de amostra e promove o rompimento da ligação entre fármacos e proteínas plasmáticas, permitindo a análise destes em sua forma livre (DEVANSHU *et al.*, 2010; POLSON *et al.*, 2003). A utilização de sais remove a água de solvatação da proteína, aumentando a interação entre proteínas, o que leva a diminuição de sua solubilidade e consequente precipitação. Ácidos são utilizados para alterar o pH da amostra, fazendo com que as proteínas atinjam o ponto isoelétrico (pI), que é o ponto de menor solubilidade destas macromoléculas, o que também leva à precipitação. Solventes orgânicos por sua vez diminuem a constante dielétrica da solução, o que leva a diminuição da solubilidade de moléculas carregadas, levando à precipitação das proteínas. As proteínas e outras moléculas que também precipitaram podem ser então separadas por centrifugação (DEVANSHU *et al.*, 2010; POLSON *et al.*, 2003).

A ELL é baseada nos princípios de solubilidade diferencial e no equilíbrio de partição de moléculas entre uma fase aquosa, a amostra biológica, e uma fase orgânica adicionada. Utilizam-se solventes orgânicos nos quais o analito de interesse possua uma boa partição, de forma que, após agitação, seguida de separação das fases, o analito esteja presente na fase orgânica, e os constituintes da matriz se mantenham retidos na fase aquosa (DEVANSHU *et al.*, 2010). A eficiência desta técnica de extração depende do solvente utilizado, da razão entre as fases e do número de extrações realizadas. O ajuste de pH pode ser realizado para evitar ou promover a ionização de ácidos e bases. As vantagens desta técnica são sua simplicidade, baixo custo, e a ampla gama de solventes comerciais disponíveis, cada qual com sua seletividade (QUEIROZ *et al.*, 2001).

A EFS, por sua vez, é atualmente uma das técnicas mais eficientes de preparo de amostra. Assim como na cromatografia, baseia-se na interação do analito com uma fase sólida. Esta fase geralmente encontra-se presente em um cartucho, e é semelhante ao material utilizado em colunas cromatográficas, porém utilizam-se maiores tamanhos de partícula para permitir a eluição da amostra em condições de

pressão atmosférica ou sob baixa pressão adicional (DEVANSHU *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2001).

O procedimento usual de EFS consiste na eluição da amostra pelo cartucho após condicionamento, seguido de lavagem do cartucho com uma solução com a qual pretende-se remover interferentes de matriz, e então a eluição do analito com um solvente adequado. Diversos tipos de cartuchos são disponíveis comercialmente e oferecem mecanismos similares aos de cromatografia, como partição, adsorção e troca iônica (DEVANSHU *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2001).

3.8 Planejamento de experimentos

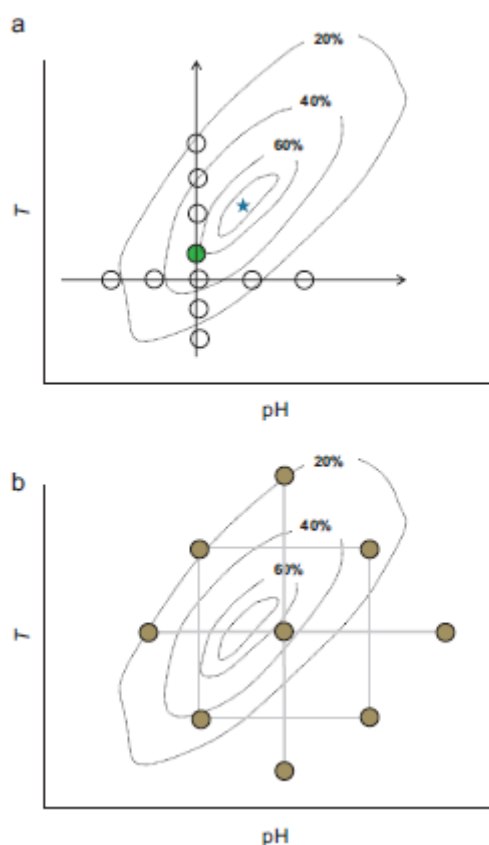
É possível definir o planejamento de experimentos, do inglês *Design of Experiments* (DoE), como uma abordagem multivariada de dados experimentais que se ajustam a uma função matemática empírica, o que pode resultar em informações adicionais sobre o sistema estudado, ou seja, trata-se de uma técnica estatística que permite planejar, conduzir, analisar e interpretar dados de experimentos (BEZERRA *et al.*, 2008; HIBBERT, 2012; POLITIS *et al.*, 2017). De forma simplificada, em DoE, variáveis experimentais são sistematicamente e intencionalmente variadas de forma a determinar o seu efeito nas respostas (POLITIS *et al.*, 2017).

No desenvolvimento de métodos e processos, a maior vantagem do DoE sobre os métodos tradicionais de alterar uma variável a cada experimento se dá pela identificação de fatores que se correlacionam, ou seja, quando a resposta depende de um fator que por sua vez depende de outro. Dificilmente a otimização do método é alcançada quando há a presença de tais correlações pelos métodos convencionais de desenvolvimento (BEZERRA *et al.*, 2008; CANDIOTI *et al.*, 2014; HIBBERT, 2012).

Supondo-se por exemplo, que no desenvolvimento de um processo z , sejam relevantes os fatores pH e temperatura (T). Tradicionalmente, a estratégia utilizada no desenvolvimento seria variar os valores de pH e T, separadamente, como mostrado na **Figura 8a**, no entanto, se o valor ótimo de pH e T para um máximo de

z é representado pela estrela, este nunca seria alcançado por este desenvolvimento. O DoE por sua vez (**Figura 8b**) realiza experimentos em toda uma área de possíveis valores no gráfico, conhecido como *Design Space*, e permite a identificação do máximo dentro de sua amplitude.

Figura 8 - Desenvolvimento de um processo hipotético utilizando-se da estratégia de uma variável por vez (a), e pela utilização de planejamento de experimentos (b).



Fonte: adaptado de HIBBERT, 2012.

As aplicações do DoE nas ciências farmacêuticas e biofarmacêuticas são amplamente variadas (POLITIS *et al.*, 2017), sendo utilizado para dois tipos principais de experimentos, os de *screening*, e de otimização, sendo o objetivo sempre de minimizar o número de experimentos necessários para a obtenção dos dados necessários ao propósito analisado (BEZERRA *et al.*, 2008; CANDIOTI *et al.*, 2014; HIBBERT, 2012; POLITIS *et al.*, 2017).

Os DoE voltados para o *screening* de variáveis tem como objetivo identificar quais das variáveis estudadas possuem um impacto estatisticamente significativo na resposta medida (CANDIOTI *et al.*, 2014; HIBBERT, 2012; POLITIS *et al.*, 2017), permitindo estudar se, por exemplo, a temperatura do solvente orgânico em uma ELL impacta na recuperação de um fármaco. Os tipos de planejamento utilizados para *screening* de variáveis permitem a avaliação de um grande número de fatores em poucos experimentos (CANDIOTI *et al.*, 2014)

A otimização de métodos por DoE é geralmente feita após um *screening* prévio ou quando as variáveis significativas já são previamente conhecidas. Em cromatografia por exemplo, sabe-se que o fluxo de fase móvel e sua composição impactam no tempo de retenção do analito, não sendo necessário portanto um *screening* para estas variáveis. Uma das grandes vantagens do DoE é que em muitos casos, os experimentos realizados no *screening* podem ser utilizados também na otimização, reduzindo o número de experimentos necessários (CANDIOTI *et al.*, 2014; HIBBERT, 2012; POLITIS *et al.*, 2017). Os planejamentos utilizados em otimização geralmente requerem um maior número de experimentos mas geram um maior número de informações do que o anterior (CANDIOTI *et al.*, 2014).

Outras importantes vantagens do DoE são a possibilidade de avaliação estatística de mais de uma resposta simultaneamente, como por exemplo, tempo de retenção, número de pratos teóricos e assimetria do pico cromatográfico, e a obtenção de áreas no qual critérios estabelecidos pelo analista sejam encontrados, ou *Design Space*. O analista pode definir um valor mínimo, máximo ou uma faixa desejável de suas respostas, e estatisticamente encontrar uma gama de condições experimentais que levarão a estas respostas (BEZERRA *et al.*, 2008; CANDIOTI *et al.*, 2014; HIBBERT, 2012).

4 CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA RI76 E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

4.1 Materiais

4.1.1 Amostras e reagentes

- Amostras de RI76 foram sintetizadas *in loco* conforme procedimento descrito em 4.2.1 Síntese e caracterização de RI76.
- 2-bromo-4'-metoxiacetofenona, intermediário de síntese, 97% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote: STBD4623V.
- Tiossemicarbazida, material de partida de síntese, 99% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote: WXBC0057V.
- 3-hexanona, material de partida de síntese, 98% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote: BCBJ8237V.
- Reagentes grau analítico: hidróxido de sódio, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio, sulfato de cobre penta hidratado, isopropanol, hexano, acetato de etila, etanol, ácido acético, acetato de amônio, ácido fórmico e dimetilsulfóxido.
- Reagentes grau cromatográfico: acetonitrila e metanol.
- Cepas microbianas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* foram obtidas no Centro de Culturas da *University of Georgia* (Atlanta, GA).
- Cepas microbianas de *Cryptococcus neoformans* foram obtidas na Divisão de Doenças Infecciosas da *Brown University* (Providence, RI).
- Cepas microbianas de *Cryptococcus gatti* foram obtidas no Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Belo Horizonte, MG).

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo a líquido Thermo Surveyor, equipado com detector de arranjo de diodos, amostrador automático, forno de coluna e bomba quaternária de solventes.
- Cromatógrafo a líquido Agilent 1200, equipado com detector de arranjo de diodos, amostrador automático, forno de coluna e bomba quaternária de solventes.
- Cromatógrafo a líquido Waters, composto por bomba binária 1525 μ , amostrador automático 2777, forno de colunas DCM/CHM, acoplado a um espectrômetro de massas Quattro LC.
- Colunas cromatográficas ZORBAX Eclipse XDB (Agilent), C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), lotes: B06016 e B17260.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg, modelo BP211D.
- Evaporador rotatório BUCHI R-3.
- Sistema de purificação de água Millipore Direct Q3.
- Espectrofotômetro SHIMADZU UV-1800.
- Espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum One FT-IR.
- Estufa NABERTHERM TR 60.

4.2 Métodos

4.2.1 Síntese e caracterização de RI76

A síntese de RI76 foi efetuada de modo a obter quantidade suficiente para a condução dos experimentos propostos. Para a primeira etapa de reação, 147 mg de tiossemicarbazida (1,62 mmol) (MM = 91,13 g/mol) e 200 μ L de 3-hexanona (1,62 mmol) (MM = 100,16 g/mol, d = 0,81 g/mL) foram medidas e adicionadas a um balão de fundo redondo e dissolvidas em 5 mL de etanol e ácido acético glacial em quantidade suficiente para reduzir o pH até uma faixa de 4-4,5. O balão foi então colocado sob refluxo e agitação magnética, para reagir por cerca de 2 horas (LINO, 2015).

A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se hexano:acetato de etila (6:4) como eluente e solução de molibdato cérico de amônio 3 (CAM) seguida de aquecimento como revelador. A solução de CAM foi preparada dissolvendo-se, sob banho de gelo e agitação, 5 g de sulfato de cério IV em uma solução contendo 25 g de molibdato de amônio em 450 mL de água, e adicionando-se lentamente 50 mL ácido sulfúrico.

Após o término da reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório e ao resíduo obtido adicionaram-se 20 mL de água e extraiu-se com três frações de 30 mL de diclorometano. O produto obtido foi então purificado, quando necessário, por cromatografia em coluna de sílica (CCS), utilizando hexano:acetato de etila (8:2) como eluente (LINO, 2015).

Na segunda etapa da reação, após o cálculo do rendimento, usualmente próximo a 80%, a tiossemicarbazona obtida na etapa anterior foi colocada para reagir com 296,87 mg de 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (1,296 mmol; MM = 229,07 g/mol), na presença de 2 mL de isopropanol, sob refluxo e agitação magnética. O monitoramento da reação por CCD se deu utilizando hexano:acetato de etila (8:2) como eluente e vapor de iodo como revelador (LINO, 2015).

Após a reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, e, após resfriar até temperatura ambiente, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório. O precipitado formado foi filtrado a vácuo, lavado com solução saturada de bicarbonato de sódio em água destilada gelada e mantido em dessecador. O rendimento da reação foi usualmente próximo a 90%.

A estrutura do composto obtido foi então confirmada por espectroscopia na região do infravermelho e posteriormente, pelo tempo de retenção na cromatografia a líquido, utilizando o método desenvolvido em **4.2.4 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade**.

Os experimentos de IV foram realizados em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum One FT-IR com medição por refletância total atenuada (do inglês *attenuated total reflectance*, ATR), uma técnica não destrutiva e que requer mínimo

ou nenhum preparo de amostra como nas análises convencionais (KAZARIAN e CHAN, 2006). Os espectros obtidos com as substâncias sintetizadas (intermediário de síntese e produto final) foram comparados ao espectro descrito por Lino (2015).

Adicionalmente, para o desenvolvimento do método analítico por HPLC-UV/DAD é necessária a determinação de possíveis comprimentos de onda de absorção na região do ultravioleta (UV) a serem utilizados no método. Para tal, obteve-se o espectro de absorção UV, na faixa de 200 a 400 nm, em um equipamento Shimadzu UV-1800 de duplo feixe.

4.2.2 Avaliação da solubilidade de RI76

A solubilidade do composto RI76 foi avaliada em solventes que seriam, posteriormente, utilizados no desenvolvimento e aplicação dos métodos analíticos e bioanalíticos, assim como nos estudos de degradação forçada e no preparo das amostras para trabalho.

Avaliou-se, portanto, a solubilidade do composto em água, acetonitrila, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e soluções aquosas de sulfato de cobre (CuSO_4) 0,05 M, ácido clorídrico (HCl) 1 M, hidróxido de sódio (NaOH) 1 M, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% e cloreto de sódio (NaCl, solução salina) 0,9%.

O procedimento de avaliação da solubilidade consistiu em pesar, aproximadamente, 10 mg de RI76 em recipientes de volume adequado e acrescentar alíquotas do solvente, conforme a **Tabela 4** até a completa solubilização. Após cada alíquota, o erlenmeyer era submetido a banho de ultrassom por 1 minuto para garantir se houve ou não solubilização.

As alíquotas de solvente foram baseadas nos termos descritivos presentes na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (FB 6) (BRASIL, 2019).

Tabela 4 - Termos descritivos de solubilidade da FB 6 e alíquotas do solvente usadas no protocolo de solubilidade.

Termo descritivo	Solubilidade	Alíquota de solvente
Muito solúvel	Menos de 1 parte	10 µL
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes	90 µL
Solúvel	De 10 a 30 partes	200 µL
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes	700 µL
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes	9 mL
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes	10 mL, repetidamente até o volume final de 100 mL
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes	-

Fonte: adaptado de FARMACOPEIA, (2010).

O termo parte se refere a quantidade de solvente, em mL, necessários para solubilizar 1 g da amostra. Uma amostra muito solúvel em um determinado solvente requer, então, 10 µL ou menos de solvente para solubilização de 10 mg. Têm-se, com este raciocínio, as alíquotas de solvente que devem ser adicionadas para avaliar a solubilidade de RI76 com base em cada termo descritivo.

4.2.3 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade

Objetivou-se com o desenvolvimento do método a separação, em nível de linha de base do analito principal, RI76, seus intermediários de síntese 2-bromo-4'-metoxiacetofenona e tiossemicarbazona, e as impurezas e produtos de degradação observados no cromatograma. Após o desenvolvimento do método e sua otimização por meio dos estudos de degradação forçada, o método foi validado de acordo com a RDC 166/2017 da ANVISA e o guia ICH Q2(R1) (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

As análises foram realizadas em cromatógrafos a líquido Thermo Surveyor e Agilent 1200, ambos equipados com bomba quaternária de solventes, amostrador

automático, forno de coluna e detector de arranjo de diodos (DAD). A coluna cromatográfica utilizada foi uma ZORBAX Eclipse XDB C18 de 150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno (d.i.), com partícula de 5 µm. As amostras de RI76 foram preparadas na concentração de 100 µg/mL utilizando-se acetonitrila como diluente. As condições do método desenvolvido consistiram em fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min, constituída de tampão acetato de amônio 2 mM com 0,1% de ácido fórmico, como fase aquosa, e acetonitrila como modificador orgânico, avaliados em diferentes proporções para otimização do método. A detecção foi realizada a 260 nm, comprimento de onda máximo de absorção do RI76, e o volume de injeção foi de 5 µL. A coluna foi mantida a 40 °C e as amostras a temperatura ambiente.

4.2.4 Avaliação da estabilidade de RI76 em solução

Visando investigar a estabilidade da RI76 em solução, experimentos foram conduzidos preparando-se soluções do fármaco, na concentração de trabalho (70 µg/mL), em diversas condições mostradas na **Tabela 5**. Foram avaliados o impacto da luz, da temperatura e a influência da presença de água como solvente na degradação da amostra.

Tabela 5 - Amostras preparadas para o estudo de estabilidade em solução de RI76.

Amostra nº	Condição de preparo	Potenciais de degradação
1	Frasco transparente, mantido a temperatura ambiente. Amostra solubilizada com H ₂ O:ACN.	Risco de fotólise Risco de termólise Risco de hidrólise
2	Frasco âmbar, mantido a temperatura ambiente. Amostra solubilizada com H ₂ O:ACN.	Risco de termólise Risco de hidrólise
3	Frasco transparente, mantido em geladeira. Amostra solubilizada com H ₂ O:ACN.	Risco de fotólise Risco de hidrólise
4	Frasco transparente, mantido a temperatura ambiente. Amostra solubilizada com ACN.	Risco de fotólise Risco de termólise
5	Frasco âmbar, mantido em geladeira. Amostra solubilizada com H ₂ O:ACN.	Risco de hidrólise
6	Frasco âmbar, mantido em geladeira. Amostra solubilizada com ACN.	Nenhum risco

As amostras foram analisadas pelo método desenvolvido por CLAE-DAD logo após o preparo e após 3, 6 e 24 horas. As áreas do pico principal e dos produtos de degradação observados foram calculadas e comparadas para determinação de qual condição de preparo minimizaria a degradação da amostra.

4.2.5 Estudo de degradação forçada

De forma a desenvolver o método indicativo de estabilidade por CLAE-DAD, foram conduzidos estudos de degradação forçada do composto RI76 conforme as condições mostradas na **Tabela 6**, e baseadas no estabelecido pela ANVISA no Informe Técnico nº1/2008, nas diretrizes do ICH Q1A(R2) e Q1B, no guia da OMS e no livro *Pharmaceutical Stress Testing*, referência na área (BAERTSCHI *et al.*, 2011; BRASIL, 2008; ICH, 1996; ICH, 2003; WHO, 2005).

Tabela 6 - Condições iniciais para a condução dos estudos de degradação.

Condição	Exposição	Temperatura	Tempo de exposição
Aquecimento	60 °C e 70 °C	60 °C e 70 °C	30 e 17 dias, respectivamente
Umidade	75% UR	70 °C	5 dias
Hidrólise ácida	0,1 M HCl	Ambiente	24h
Hidrólise alcalina	0,1 M NaOH	Ambiente	24h
Oxidação	0,3% (v/v) H ₂ O ₂	Ambiente	24h
Fotólise	3x ICH Q1B	Ambiente	3x ICH Q1B
Oxidação por íons metálicos	0,05 M Cu ²⁺	Ambiente	24h

Para os estudos de degradação, amostras de 10 mg de RI76 foram pesadas em balão volumétrico de 10 mL, no qual adicionou-se 5 mL de acetonitrila e 5 mL da solução degradante preparada conforme descrito acima. Após o tempo de exposição, alíquotas de 1 mL foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e diluídas com acetonitrila, de modo a minimizar a continuidade da degradação e atingir a concentração de 100 µg/mL utilizada no método analítico por CLAE-DAD. Soluções contendo apenas a solução degradante e acetonitrila na proporção (1:1) foram analisadas como branco. Uma solução preparada com H₂O como solução degradante foi preparada de forma a avaliar a degradação em pH neutro. De forma

a verificar a extensão da degradação e identificar os produtos formados, uma solução de RI76 preparada a 100 µg/mL em acetonitrila foi preparada como referência.

A execução do estudo de degradação forçada na condição de aquecimento foi conduzida colocando-se em estufas, aquecidas a 60 °C e 70 °C, vidros de penicilina contendo 10 mg de uma amostra de RI76. Após o período de exposição as amostras foram retiradas, dissolvidas em acetonitrila até a concentração de 100 µg/mL, e analisadas por CLAE-DAD. Como controle, amostras mantidas em dessecador à temperatura ambiente foram analisadas em conjunto.

Para a avaliação do calor úmido, amostras de 10 mg de RI76 foram colocadas em vidros de penicilina que foram mantidos abertos em um dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio, de forma a gerar uma atmosfera com aproximadamente 75% UR (GREENSPAN, 1977). O dessecador foi então hermeticamente fechado e mantido em estufa a 70 °C. Após o período de exposição, as amostras foram retiradas, dissolvidas em acetonitrila até a concentração de 100 µg/mL, e analisadas por CLAE-DAD. Amostras mantidas em dessecador sem umidade foram analisadas em conjunto como controle.

A avaliação da degradação fotolítica foi realizada em uma câmara de fotoestabilidade artesanal equipada com lâmpadas distintas para emissão de radiação visível e ultravioleta próximo. De modo a avaliar o tempo de exposição necessário para atingir a radiação mínima exigida pelo guia ICH Q1B de 1,2 milhões de lux h para radiação visível e de 200 watts/m² para radiação ultravioleta, executou-se o experimento de actinometria química da quinina (ICH, 1996). Neste experimento, 10 mL de uma solução a 2% de cloridrato de quinina foi colocado em um frasco hermeticamente fechado e exposto à radiação. Um controle foi preparado nas mesmas condições, mas coberto com papel alumínio para bloquear a passagem de luz.

O tempo de exposição na câmara de fotoestabilidade deve ser suficiente para reduzir a absorvância da quinina em pelo menos 0,9 em relação ao controle, medida

em 400 nm com um caminho óptico de 1 cm (ICH, 1996). A exposição de RI76 foi realizada por um tempo três vezes superior ao determinado na avaliação da actinometria, conforme o recomendado por Baertschi *et al.* (2011).

Para todas as condições de degradação estudadas, amostras foram injetadas também no tempo zero de degradação, ou seja, no momento em que as amostras a serem degradadas foram preparadas.

Nas situações em que foram observadas degradações excessivas, ou seja, que não permitiram inferir que os produtos de degradação são primários, e não formados pela degradação de outros produtos de degradação, a concentração e/ou tempo de degradação foi reduzida conforme orientações de Baertschi *et al.* (2011). Por outro lado, não sendo observada degradação, a concentração, tempo e/ou temperatura do meio degradante foi aumentada.

4.2.6 Caracterização dos produtos de degradação

Para caracterizar estruturalmente os produtos de degradação obtidos nos estudos de degradação forçada, análises de varredura em CLAE-EM foram realizadas com o intuito de obter as massas moleculares destes.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido WATERS, composto por bomba binária 1525 μ , auto injetor 2777, forno de colunas DCM/CHM, acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quattro LC do mesmo fornecedor. Utilizou-se uma condição isocrática de fase móvel constituída de 70% de acetonitrila e 30% de acetato de amônio 2 mM com 0,1% de ácido fórmico, em um fluxo de 1 mL/min. O espectrômetro de massas foi configurado com voltagem do capilar de 2,8 kV e voltagem do cone de 35 V. A temperatura de dessolvatação foi de 350 °C e a da fonte de 100 °C.

A estrutura do produto de degradação majoritário foi proposta com base nos resultados obtidos com a CLAE-EM/EM e um método de síntese da substância proposta foi adaptado de Carradori *et al.* (2014).

Para a síntese e confirmação da estrutura do produto de degradação, cerca de 1 mmol de 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (MM = 229,07 g/mol) e 1 mmol de tiossemicarbazida (MM = 91,13 g/mol) foram adicionadas a um balão de fundo redondo e dissolvidas em 5 mL metanol. A reação foi conduzida sob refluxo e agitação magnética e monitorada por CCD em sílica-gel utilizando-se hexano e acetato de etila (1:1) como eluente e vapor de iodo como agente revelador. Ao término da reação, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório e o material obtido foi disperso em 15 mL de água e extraído com três volumes de 10 mL de diclorometano. A fase orgânica reunida foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente em rotavapor. O sólido obtido foi caracterizado por IV, RMN de ^1H e faixa de fusão. Em média, obtiveram-se rendimentos de 70% para esta reação.

A solubilidade do produto de degradação foi avaliada segundo o procedimento descrito para RI76 em **4.2.1 Avaliação da solubilidade de RI76**. Alíquotas de 10 mg foram pesadas em *erlenmeyers* de 125 mL e volumes de água, acetonitrila, metanol, clorofórmio e dimetilsulfóxido foram adicionados até completa solubilização, conforme **Tabela 5**.

A avaliação da atividade antifúngica do produto de degradação sintetizado foi realizada frente a cepas de *Candida albicans* (SC 5314), *C. glabrata* (ATCC2001), *C. krusei* (ATCC20298), *C. parapsilosis* (ATCC22019), *C. tropicalis* (ATCC750), *Cryptococcus neoformans* (H99) e *C. gatti* (L27/01), em colaboração com a Profa. Susana Johan do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológica (ICB) da UFMG.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. O analito foi dissolvido em DMSO e diluído em duas etapas em meio RPMI-1645 em concentrações entre 0,25 e 250 μM . Os compostos fluconazol (na faixa de 0,41 a 209 μM), anfotericina B (na faixa de 0,016 a 8,7 μM) e itraconazol (na faixa de 0,04 a 22,7 μM) foram utilizados como

controle positivo. O meio RPMI-1645 não inoculado foi utilizado como controle negativo.

Os inóculos foram adicionados às placas e incubados a 35°C por 24-48h para *Candida* spp. e 48-72h para *Cryptococcus* spp. Os *endpoints* foram determinados pelo crescimento em meios inoculados sem a presença de drogas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento. Todos os ensaios foram realizados em triplicata com uma replicata biológica.

4.2.7 Validação do método analítico

Com o método analítico para determinação de RI76 desenvolvido, procedeu-se com a validação do método tomando como bases diretivas, a RDC 166/2017 da ANVISA e o guia ICH Q2R1 de validação (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Outros guias e referências foram utilizados para complementar a validação, e justificar escolhas e resultados.

Por ser um produto ainda em estágio de desenvolvimento pré-clínico, não se encontram disponíveis comercialmente padrões analíticos de RI76. Logo, para a condução dos ensaios de validação, utilizou-se como padrão, a amostra de maior pureza de RI76, de aproximadamente 70%, determinada conforme descrito no **CAPÍTULO 2** deste trabalho, e como amostras, outros lotes sintetizados.

4.2.7.1 Seletividade

A seletividade foi demonstrada de três maneiras distintas:

- injetando-se as soluções obtidas nos estudos de degradação forçada, e evidenciando que os produtos de degradação de RI76 não eluem no mesmo tempo de retenção deste. Amostras de 2-bromo-4'-metoxiacetofenona e da tiossemicarbazona RI72 foram injetadas com a finalidade de demonstrar que os materiais de partida e intermediários de síntese, respectivamente, também são separados de RI76.

- com a injeção do diluente, acetonitrila, e a observação de ausência de picos interferentes no mesmo tempo de retenção de RI76, conforme exigido pela RDC 166/2017 (BRASIL, 2017)
- pela avaliação da pureza espectral dos picos de RI76 e de seus produtos de degradação, realizado pelo *software* do instrumento, ChemStation. Com este teste, comprova-se que o pico cromatográfico é devido a uma única substância, não apresentando assim, co-eluição (BRASIL, 2017).

4.2.7.2 Linearidade

A linearidade do método foi demonstrada de 1% a 130% da concentração de RI76 na tomada de amostra usual de 100 µg/mL, equivalendo a faixa de 0,7 a 91 µg/mL de RI76. Para a construção da curva, preparou-se uma solução estoque a 1 mg/mL, ou seja, 700 µg/mL de RI76, em acetonitrila, e procederam-se diluições, em triplicata, conforme as descritas na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Esquema de diluição da solução estoque de RI76, para a avaliação da linearidade do método.

Concentração Final	Alíquota da solução estoque	Volume final da diluição, em acetonitrila
0,7 µg/mL	100 µL	100 mL
7 µg/mL	100 µL	10 mL
28 µg/mL	400 µL	10 mL
49 µg/mL	700 µL	10 mL
70 µg/mL	1000 µL	10 mL
91 µg/mL	650 µL	5 mL

As três réplicas da curva analítica foram analisadas de forma aleatória no sistema cromatográfico, e conforme exigido pela RDC 166/2017, considerou-se o método linear, quando obtido um coeficiente de correlação acima de 0,990, resíduos aleatoriamente dispersos e homoscedásticos, coeficiente angular significativamente diferente de zero e coeficiente linear estatisticamente igual a zero (BRASIL, 2017).

O coeficiente de correlação foi obtido em *software* Microsoft Excel 2016, e a avaliação estatística da adequabilidade do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi realizada segundo o descrito por Souza (2007) no *software* Action Stat.

O MMQO parte do pressuposto que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, possuem variância constante ao longo do eixo x e são independentes (SOUZA, 2007).

Avaliou-se, então, a normalidade dos resíduos pelo teste de *Ryan-Joiner*, a homoscedasticidade pelo teste de *Levene* modificado por *Brown e Forsythe*, e a independência dos resíduos pelo teste de *Durbin-Watson*. Finalmente, verificou-se a adequação dos dados ao modelo linear, e a ausência de desvio de linearidade por análise de variância (ANOVA) (SOUZA, 2007). Em todos os testes estatísticos, utilizou-se nível de significância de 5%, conforme recomendado pela RDC 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

O teste de *Ryan-Joiner* avalia a normalidade dos resíduos por meio da correlação linear entre quantis da distribuição normal de tamanho n e a amostra estudada. O coeficiente de correlação obtido é avaliado em comparação a um valor crítico para o teste de hipótese da normalidade (PORTAL ACTION, 2018; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

O teste de *Brown-Forsythe* é extensivamente utilizado como teste de igualdade de variâncias, podendo ser utilizado também na avaliação de homoscedasticidade de resíduos. A estatística do teste consiste em uma avaliação por ANOVA na qual cada observação é substituída pela distância das observações em relação a mediana amostral dentro do seu grupo (ALMEIDA *et al.*, 2008; BROWN e FORSYTHE, 1974). O teste de *Brown-Forsythe* requer, portanto que haja grupos de réplicas em cada nível, ou seja, não é possível a condução do teste em situações nas quais foram utilizadas soluções estoques distintas (PORTAL ACTION, 2018).

O teste de *Durbin-Watson* avalia a independência dos resíduos partindo da premissa de que os resíduos no modelo são gerados por um processo autoregressivo de primeira ordem, segundo a equação (CHATTERJEE e SIMONOFF, 2013; PORTAL ACTION, 2018):

$$e_i = \rho e_{i-1} + a_i$$

em que e_i é o resíduo, ρ é um parâmetro de correlação e a é um parâmetro derivado da distribuição normal. A independência dos resíduos é demonstrada estatisticamente se $\rho = 0$ (CHATTERJEE e SIMONOFF, 2013; PORTAL ACTION, 2018).

A presença de outliers no modelo foi avaliada pelo teste de resíduo *studentizado*, e os mesmos, se presentes, foram removidos da curva de calibração, respeitando um máximo de 22% dos pontos (PORTAL ACTION, 2018; SOUZA, 2007).

4.2.7.3 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis, sendo o primeiro a repetibilidade, pela avaliação de seis réplicas de uma amostra de RI76 na concentração de trabalho de 70 $\mu\text{g/mL}$. A variação dos resultados obtidos com cada réplica foi medida e expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR).

Para a avaliação da precisão intermediária, os ensaios foram repetidos em um segundo dia por um segundo analista e avaliou-se por meio do teste *t* de *Student* se houve diferença estatisticamente significativa entre as medições (BRASIL, 2017). As premissas de normalidade e homoscedasticidade, necessárias ao teste *t*, foram realizadas com os testes de *Kolmogorov-Smirnov* e teste F, respectivamente, no *software* GraphPad Prism 7.0. A ausência de outliers nas medições de precisão foi confirmada aplicando-se o teste de *Grubbs*.

4.2.7.4 Exatidão

De modo a determinar a exatidão do método, foram preparadas, em triplicata, soluções a 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho (49 µg/mL, 70 µg/mL e 91 µg/mL, respectivamente). Estas soluções foram injetadas no sistema cromatográfico e as concentrações obtidas experimentalmente foram comparadas às concentrações teóricas.

A recuperação, dada pela equação abaixo (ANVISA, 2017; AOAC, 1998; ICH, 2005) foi utilizada como critério mínimo para aprovação no ensaio de exatidão, sendo considerados os critérios de aceitação preconizados pela AOAC (AOAC, 1998).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração obtida experimentalmente}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Adicionalmente, conforme solicitado pelo guia Q2(R1), intervalos de confiança (IC) foram construídos conforme a equação a seguir (BELOUFA *et al.*, 2017; ICH, 2005):

$$IC = X \pm t_{(0,05;n-1)} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

em que:

X = média experimental;

$t_{(0,05; n-1)}$ = valor da distribuição *t* de *Student* com um nível de significância de 5% e n-1 graus de liberdade.

s = desvio padrão experimental;

n = número de réplicas

A exatidão do método foi verificada também segundo os critérios de avaliação propostos pela United States Pharmacopeia (USP) no capítulo <1225>. Para tal, foi construída uma curva de concentração teórica versus concentração obtida, e os coeficientes obtidos com a regressão foram analisados. A proximidade do coeficiente angular de 1,0 indica forte correlação entre os valores teóricos e experimentais, enquanto a proximidade do coeficiente linear de 0 indica ausência de erros sistemáticos (USP, 2018).

4.2.7.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados baseados nos parâmetros da curva analítica construída.

A equação que descreve o cálculo do limite de detecção é descrita a seguir (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

em que:

LOD = limite de detecção;

σ = desvio padrão da resposta;

S = inclinação da curva analítica.

Por sua vez, a equação que descreve o cálculo do limite de quantificação é descrita a seguir (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

em que:

LOQ = limite de quantificação;

σ = desvio padrão da resposta;

S = inclinação da curva analítica.

De forma a confirmar experimentalmente os limites de detecção e quantificação calculados nas equações acima, foram injetadas soluções diluídas abaixo do ponto inferior da curva analítica. Uma relação sinal/ruído (S/R) de 10:1 é considerada mínima para o limite de quantificação, e uma relação de 2:1 é mínima para o limite de detecção (BRASIL, 2017).

Na concentração equivalente ao limite de quantificação, foi realizado também um ensaio de precisão e exatidão, conforme estabelecido pela RDC 166/2017 (BRASIL, 2017).

4.2.7.6 Robustez

Para o ensaio de robustez, um planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} foi utilizado para avaliar de forma multivariada o impacto no método do fluxo de fase móvel, comprimento de onda de detecção, temperatura do forno de coluna, porcentagem de ácido fórmico adicionado à fase móvel e lote da coluna cromatográfica. Os parâmetros foram escolhidos com base no sugerido pela ANVISA na RDC 166/2017 (BRASIL, 2017). Os experimentos conduzidos neste planejamento estão descritos na

Tabela 8.

Tabela 8 - Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para avaliação da robustez do método.

Experimento	Fator A Fluxo (mL/min)	Fator B Comprimento de onda (nm)	Fator C Temperatura (°C)	Fator D % HCOOH na fase móvel	Fator E Lote da coluna
1	1,2	258	35	0,9	B17260
2	0,8	258	35	0,9	B06016
3	1,2	262	35	0,9	B06016
4	0,8	262	35	0,9	B17260
5	1,2	258	45	0,9	B06016
6	0,8	258	45	0,9	B17260
7	1,2	262	45	0,9	B17260
8	0,8	262	45	0,9	B06016
9	1,2	258	35	1,1	B06016
10	0,8	258	35	1,1	B17260
11	1,2	262	35	1,1	B17260
12	0,8	262	35	1,1	B06016
13	1,2	258	45	1,1	B17260
14	0,8	258	45	1,1	B06016
15	1,2	262	45	1,1	B06016
16	0,8	262	45	1,1	B17260

O impacto dos fatores acima descritos no tempo de retenção de RI76, na resolução do par crítico entre o pico principal e a impureza adjacente e no doseamento de RI76 foram avaliados estatisticamente no software Design-Expert 10.0. O método é considerado robusto se não houver diferenças estatisticamente significativas na resposta de RI76 frente a estas alterações (BRASIL, 2017; FERREIRA *et al.*, 2017).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Avaliação da solubilidade de RI76

A solubilidade de RI76 nos solventes avaliados está descrita na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Solubilidade de RI76 em solventes e soluções aquosas avaliadas.

Solvente	Solubilidade	Termo descritivo
Água	10 mg não solúveis em 100 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel
Acetonitrila	10 mg solúveis em < 300 µL	Solúvel
Metanol	10 mg solúveis em < 300 µL	Solúvel
DMSO	10 mg solúveis em < 100 µL	Facilmente solúvel
CuSO ₄ 0.05 M	10 mg não solúveis em 100 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel
HCl 1 M	10 mg solúveis em < 100 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel
NaOH 1 M	10 mg solúveis em < 100 mL	Muito pouco solúvel
H ₂ O ₂ 3%	10 mg não solúveis em 100 mL	Muito pouco solúvel
NaCl 0.9%	10 mg não solúveis em 100 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel

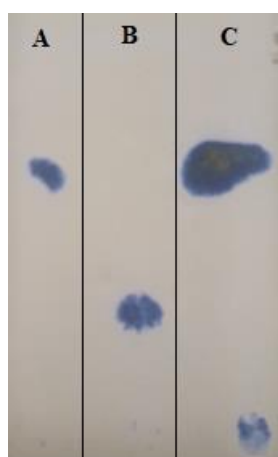
Observa-se com estes resultados que o RI76 apresenta baixa solubilidade em soluções aquosas. Em razão disso, torna-se necessária a utilização de co-solvente nos meios de degradação forçada para facilitar a dispersão da amostra no meio.

4.3.2 Síntese e caracterização de RI76

A síntese foi conduzida conforme descrito em **4.2.2 Síntese e caracterização de RI76**. O monitoramento das reações por CCD foi realizado a cada trinta minutos. Na primeira etapa da reação, após 120 minutos, observou-se consumo quase completo da tiossemicarbazida e formação de apenas um produto, a tiossemicarbazona RI72, conforme mostrado na placa cromatográfica (**Figura 9, ponto C**). Observa-se também que o método por cromatografia em camada delgada possibilita a

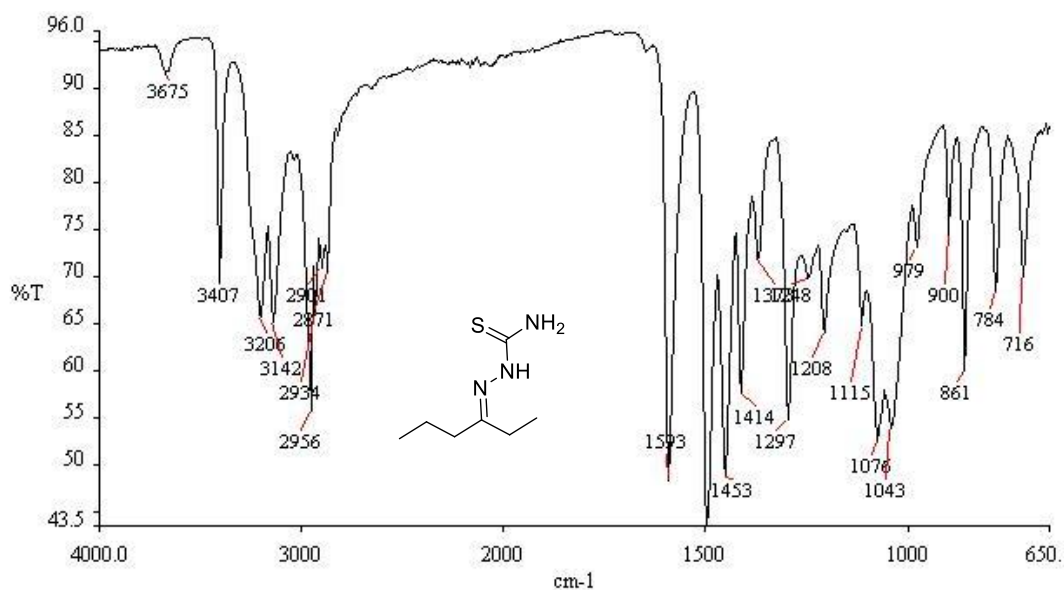
separação da tiossemicarbazona obtida de um subproduto observado em reações anteriores.

Figura 9 - Placa cromatográfica utilizada no monitoramento da reação de formação da tiossemicarbazona. Aplicações: tiossemicarbazona RI72 de referência (A), subproduto de reação (B), alíquota da reação após 120 minutos (C). Fase móvel constituída de hexano e acetato de etila (6:4), revelação realizada por solução de CAM sob aquecimento.



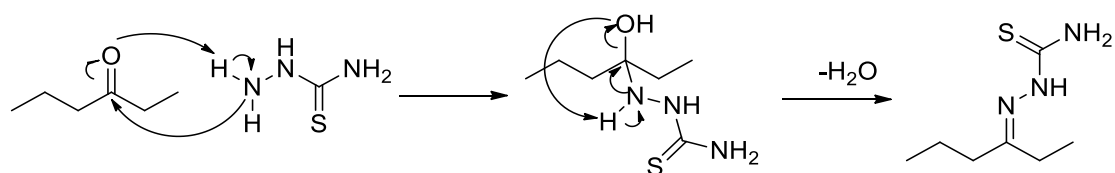
O fator de retenção calculado para a tiossemicarbazida é zero, não sendo eluída na sílica, enquanto o fator de retenção da tiossemicarbazona formada é 0,7. Após a síntese e elaboração, confirmou-se a identidade do produto por IV, cujo espectro, reproduzido na **Figura 10**, é equivalente ao espectro referência. Não havendo necessidade de purificação posterior, evidenciada pela ausência da impureza na CCD e por espectros correspondentes no IV, procedeu-se a segunda etapa da síntese.

Figura 10 - Espectro de absorção na região do infravermelho da tiossemicarbazona RI72.



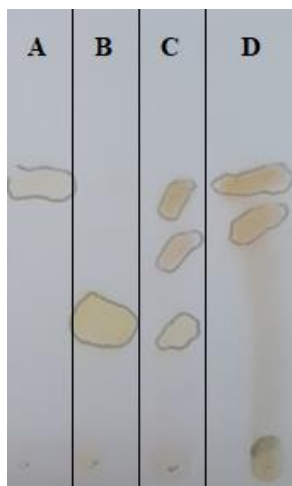
Na **Figura 11** é demonstrado o mecanismo proposto para esta etapa da reação entre a 3-hexanona e a tiossemicarbazida.

Figura 11 - Mecanismo proposto para a reação entre 3-hexanona e tiossemicarbazida.



A reação entre a tiossemicarbazona obtida e a 2-bromo-4'-metoxiacetofenona foi conduzida conforme descrito por Lino (2015) e após 60 minutos, observou-se, na CCD de monitoramento (**Figura 12**), consumo completo dos materiais de partida e formação de RI76. É interessante ressaltar a observação de duas bandas distintas para o produto, correspondente aos isômeros E e Z de RI76.

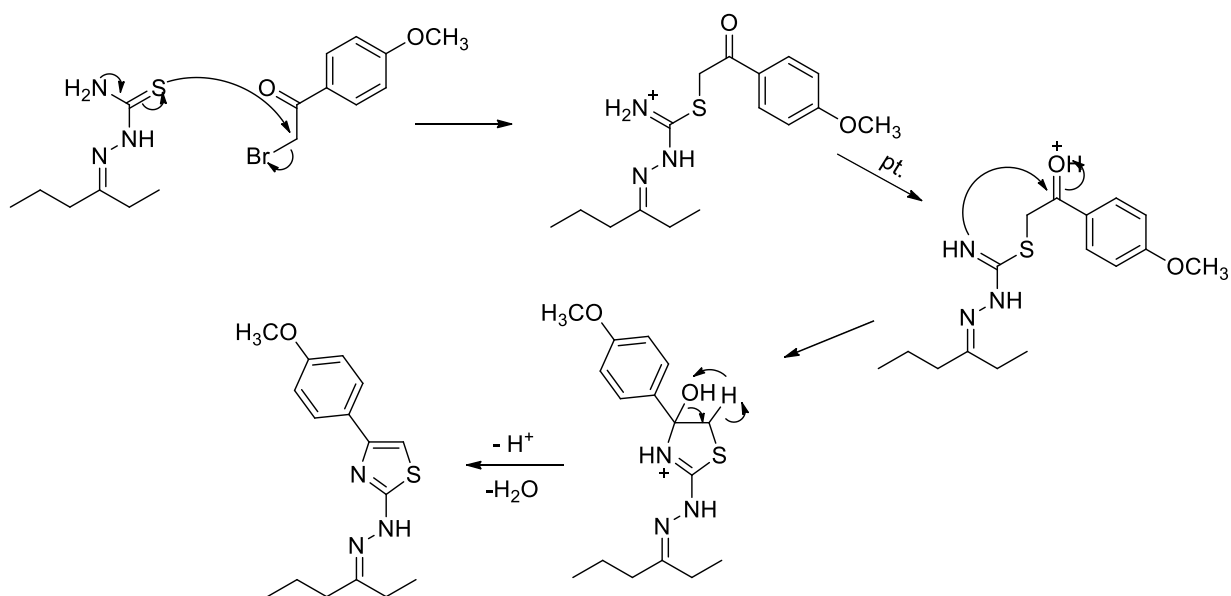
Figura 12 - Placa cromatográfica utilizada no monitoramento da reação de formação de RI76. Aplicações: tiossemicarbazona (A), 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (B), amostra de RI76 sintetizada por Lino (2015) (C), amostra sintetizada neste projeto (D). Fase móvel constituída de hexano e acetato de etila (8:2) e revelação por vapor de iodo.



Com o término da reação, o balão foi colocado em banho de gelo e em seguida o solvente foi evaporado em evaporador rotatório. O resíduo obtido foi, então, lavado com bicarbonato de sódio para remoção do HBr formado e com água destilada para remoção de impurezas polares. O material foi então filtrado a vácuo e produto final foi obtido como um sólido de tonalidade marrom cuja identidade foi confirmada espectrometricamente.

Na **Figura 13**, propõe-se o mecanismo para esta etapa reacional (WANG, 2010).

Figura 13 - Mecanismo proposto para a segunda etapa da reação entre a tiossemicarbazona e 2-bromo-4'-metoxiacetofenona.



Legenda: pt: protropismo.

Na **Figura 14** é mostrado o espectro na região do infravermelho do RI76 sintetizado nesse trabalho, que é compatível ao espectro de referência obtido por Lino (2015). Na **Tabela 10** estão descritas as correspondências estruturais das principais bandas observadas no espectro (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Figura 14 - Espectro na região do infravermelho de RI76.

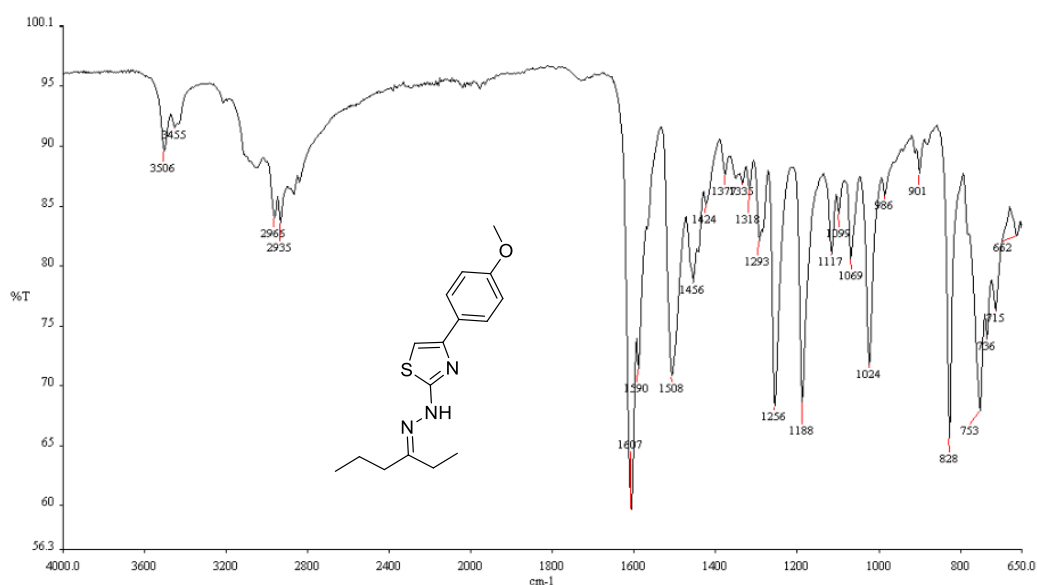
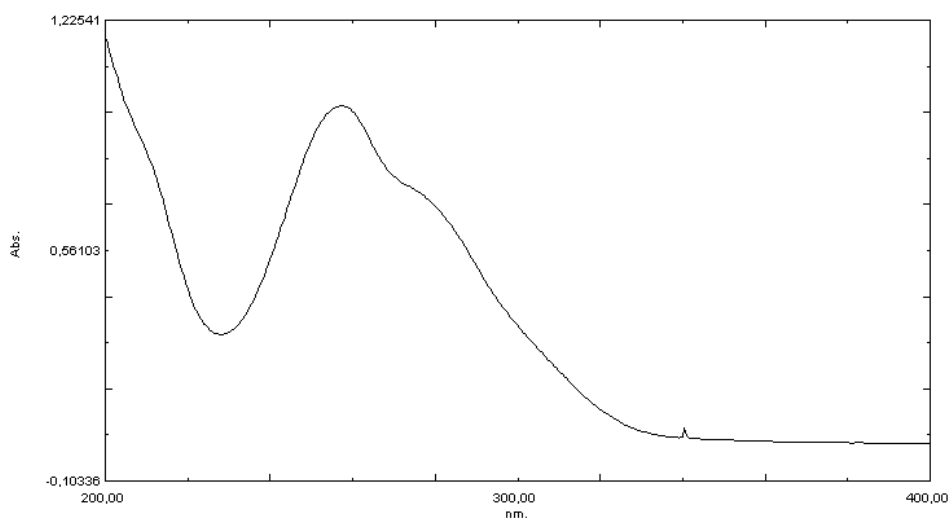


Tabela 10 - Correspondências estruturais das principais bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho de RI76.

Banda característica	Correspondência estrutural
3506 cm ⁻¹	Estiramento de ligação N-H
2965, 2935 cm ⁻¹	Estiramentos de ligação C-H sp ³
1607 cm ⁻¹	Estiramento de ligação C=N
1590, 1508, 1456 cm ⁻¹	Estiramentos de ligação C=C anel aromático
1256, 1024 cm ⁻¹	Estiramentos de ligação C-O de éter fenilalquílico
828 cm ⁻¹	Vibrações fora do plano de anel aromático parassubstituído

Por sua vez, o espectro de absorção no UV obtido para a solução de RI76 a 16 µg/mL em ACN:H₂O (50:50) é ilustrado na **Figura 15**. Observou-se uma banda de absorção com máximo em 260 nm e um vale com mínimo em 228 nm, sendo assim dois comprimentos de onda passíveis de serem utilizados em métodos analíticos quantitativos. O pequeno pico presente pouco após 300 nm corresponde a um artefato experimental, provocado pela troca de lâmpadas, de tungstênio para deutério, na varredura.

Figura 15 - Espectro de absorção de RI76, na concentração de 16 µg/mL, em ACN:H₂O (50:50), na região do ultravioleta.



4.3.3 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade

De forma a analisar os produtos de degradação obtidos nos estudos de degradação forçada, torna-se necessário o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade, capaz de separar o pico principal, referente ao candidato a fármaco RI76, dos picos obtidos para produtos de degradação e impurezas presentes na amostra.

Como o composto estudado foi recentemente sintetizado no LQF-UFMG e não é disponível comercialmente, não existem na literatura métodos descritos para sua análise qualitativa ou quantitativa por CLAE-DAD, de forma que o método deve então ser desenvolvido do princípio.

Nos primeiros passos do desenvolvimento do método indicativo de estabilidade por CLAE-DAD para RI76, preparou-se uma solução a 100 µg/mL deste composto em ACN:H₂O (50:50) e injetou-se esta solução em um cromatógrafo Thermo Surveyor, equipado com uma coluna Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 de 150 mm x 4,6 mm d.i., com tamanho de partícula de 5 µm.

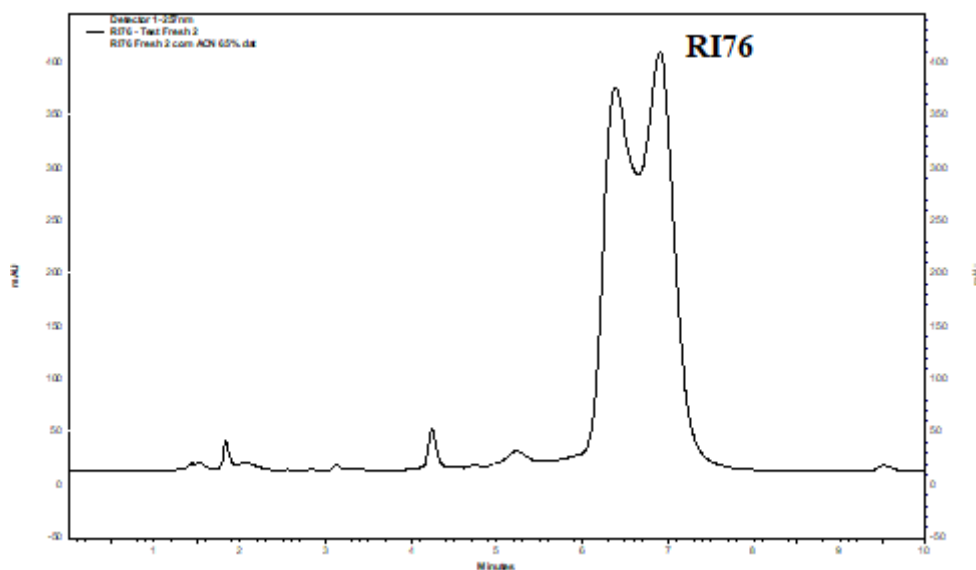
As condições iniciais visaram uma eluição rápida de RI76 de modo a determinar sua resposta cromatográfica e obter informações iniciais de pureza cromatográfica. As condições testadas foram fase móvel constituída de acetonitrila como solvente orgânico e H₂O como solvente aquoso, na proporção de 85:15, sob o fluxo de 1 mL/min. O comprimento de onda escolhido foi 260 nm, um dos máximos de absorção de RI76.

Com base nos resultados obtidos com os primeiros testes, modificou-se o volume de injeção até que o pico referente ao RI76 atingisse uma altura de aproximadamente 1200 mAU, de forma que as impurezas presentes na amostra apresentassem também uma altura que permitisse sua distinção do ruído, mas sem atingir, mesmo em concentrações mais elevadas, altura superior a 2000 mAU para o pico principal. Determinou-se então um volume de injeção de 20 µL.

Procederam-se então, eluições isocráticas com diferentes proporções de fase móvel, reduzindo-se a proporção de solvente orgânico na fase móvel até que houvesse uma separação e retenção adequada das impurezas identificadas no início do cromatograma.

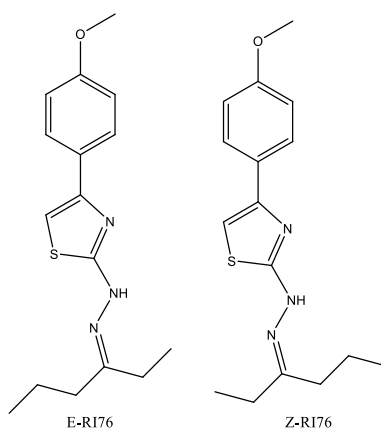
O melhor resultado, ilustrado na **Figura 16**, foi obtido com uma fase móvel constituída de 65 partes de acetonitrila para 35 partes de H₂O.

Figura 16 - Cromatograma obtido para a análise de RI76, utilizando fase móvel composta de ACN:H₂O (65:35)



Percebe-se, no entanto, uma duplicação do pico referente ao RI76 nestas condições, além de um expressivo alargamento de pico. Três hipóteses foram postuladas para explicar esse resultado. A primeira, de que ocorreu sobrecarga na coluna por um volume de injeção ou concentração elevada, a qual foi refutada pela observação do mesmo perfil cromatográfico em volumes de injeção inferiores. A segunda, de que poderia haver uma mistura de forma ionizada e não ionizado do RI76, e a terceira, de que os picos se tratavam dos diastereoisômeros E e Z do RI76 (Figura 17).

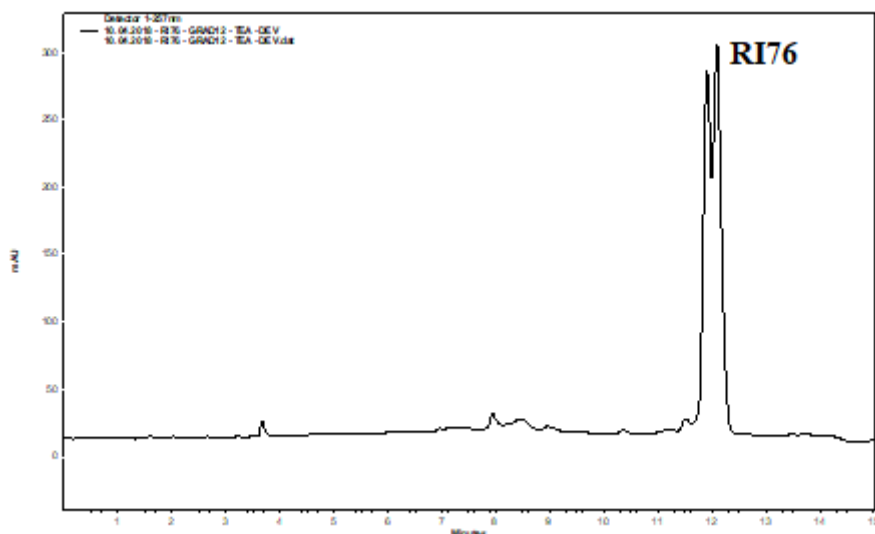
Figura 17 - Estruturas dos isômeros E e Z do composto RI76.



A segunda hipótese foi testada alterando-se o pH da fase móvel para aproximadamente 3,0 com a adição de 0,1% de ácido fórmico ao solvente aquoso.

Após a injeção de amostras, observou-se que os dois picos coeluíram, o que nos faz acreditar que se tratava de estados de ionização distintos. No entanto, a análise com uma fase móvel aquosa contendo 0,1% de trietilamina em pH ajustado para 3,0 com ácido fórmico novamente apresentou os dois picos com leve separação (**Figura 18**). Como em pH 3,0 há apenas um estado de ionização abundante para RI76, acredita-se que de fato trata-se dos diastereoisômeros E e Z.

Figura 18 - Cromatograma obtido para a análise de RI76, utilizando fase móvel adicionada de trietilamina 0,1% e ácido fórmico em quantidade suficiente para reduzir o pH a 3,0.



Esforços foram feitos na tentativa de se separar os dois diastereoisômeros até a obtenção de uma resolução de 1,5, considerada por muitos autores como mínima para uma separação adequada para quantificação (SNYDER *et al.*, 1997; MEYER, 2010). Diversos autores relatam a possibilidade de separar diastereoisômeros em cromatografia de fase reversa. A Farmacopeia Europeia, inclusive, possui monografias nas quais há separação de isômeros E-Z (NYAMBAKA e RYLEY, 1995; HASDENTEUFEL, 2006; EUROPEAN, 2010).

Para tal, foram testados metanol como alternativa de solvente orgânico, e trietilamina, ácido fórmico e ácido trifluoroacético como aditivos de fase aquosa. Buscou-se como pH da fase móvel valores entre 2,0 e 7,0, considerados pelo fabricante da coluna como os mais adequados para análise (ZORBAX, 2018)

A substituição do solvente orgânico acetonitrila por metanol levou a coeluição dos picos referentes aos diastereoisômeros. Os solventes aquosos com aditivos mantidos

em condições ácidas ou neutras também não promoveram separação adequada destes e, portanto, decidiu-se por analisar o par de isômeros como um pico único do cromatograma.

Com a proposta de analisar os diastereoisômeros como uma mistura em um único pico, esforços foram feitos na tentativa de desenvolver um gradiente que permitisse a separação de E+Z-RI76 de quaisquer impurezas oriundas da síntese visíveis no cromatograma. Como a acetonitrila promoveu melhor separação das impurezas que o metanol, este solvente foi utilizado como modificador orgânico, e como aditivos de fase aquosa foram testados ácido fórmico 0,1%, ácido acético 0,1% e tampão acetato de amônio 2 mM + ácido fórmico 0,1%.

Alterações no método foram realizadas até a obtenção de um gradiente adequado para a separação de todos os picos de impureza observados e do pico principal. As condições ideais foram obtidas com volume de injeção de 5 μ L, por promover um pico mais fino que em volumes de injeção mais altos, temperatura do forno de coluna de 40 °C, fluxo de 1 mL/min e gradiente seguindo o descrito na **Tabela 11**.

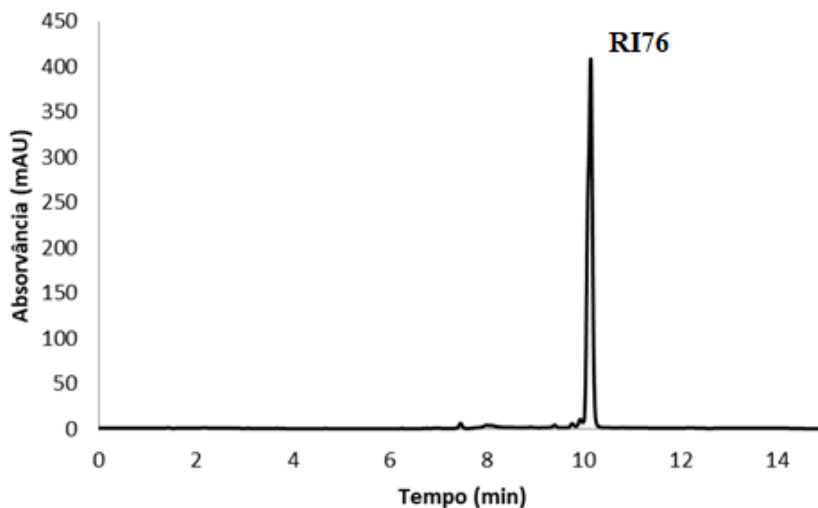
Tabela 11 - Gradiente desenvolvido para o método indicativo de estabilidade para RI76, sendo que A representa o solvente aquoso e B o modificador orgânico.

Tempo (min)	Proporção A (%)	Proporção B (%)
0	30	70
6	88	12
12	88	12
13	30	70
15	30	70

Na avaliação do melhor aditivo para ser utilizado na fase aquosa, percebeu-se que o formato do pico não era adequado quando utilizou-se 0,1% de ácido fórmico na fase aquosa. A substituição por 0,1% de ácido acético melhorou significativamente a simetria, mas, no entanto, promoveu quebra dos picos dos isômeros E e Z. A utilização de acetato de amônio 2 mM + 0,1% de ácido fórmico levou a cromatogramas com resolução adequada e boa simetria para os principais picos,

conforme mostrado na **Figura 19**. O pH resultante desta fase móvel foi de 3,0, conforme desejado para obter um único estado de ionização de RI76.

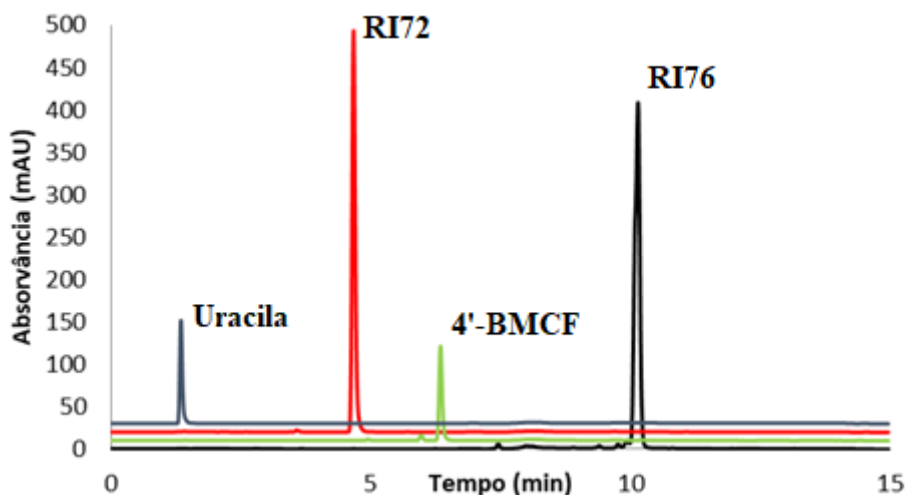
Figura 19 - Cromatograma obtido para RI76 com as condições finais do método. Gradiente de eluição conforme descrito na Tabela 12, sendo A: acetato de amônio 2 mM + 0,1% ácido fórmico e B: acetonitrila. Fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 5 μ L em coluna ZORBAX



A partir deste ponto, as análises foram realizadas em cromatógrafo a líquido Agilent 1200. Demonstra-se, portanto, certa robustez do método, uma vez que o mesmo foi capaz de ser reproduzido em outro equipamento sem alteração nas condições cromatográficas.

De modo a verificar a adequabilidade do método para ser utilizado nos estudos de degradação forçada, avaliou-se a capacidade deste em separar o candidato a fármaco RI76 de seus intermediários de síntese RI72 (tiossemicarbazona) e 2-bromo-4'-metoxiacetofenona. Uma solução de uracila a 20 μ g/mL também foi injetada para a medida do tempo morto da cromatografia. Os cromatogramas obtidos encontram-se sobrepostos na **Figura 20**.

Figura 20 - Cromatogramas obtidos para soluções de uracila (azul) RI72 (vermelho), 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (verde) e RI76 (preto).



A boa resolução obtida entre os picos demonstra que o método possui bom poder de separação, e pode ser utilizado para tentar separar os produtos de degradação obtidos nos estudos de degradação forçada. Tendo sido determinado o volume morto do sistema pela injeção de uracila em 1,34 minutos, pode-se então calcular o fator de retenção (k) de todos os compostos eluídos pela fórmula abaixo (MEYER, 2010; SNYDER *et al.*, 1997):

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

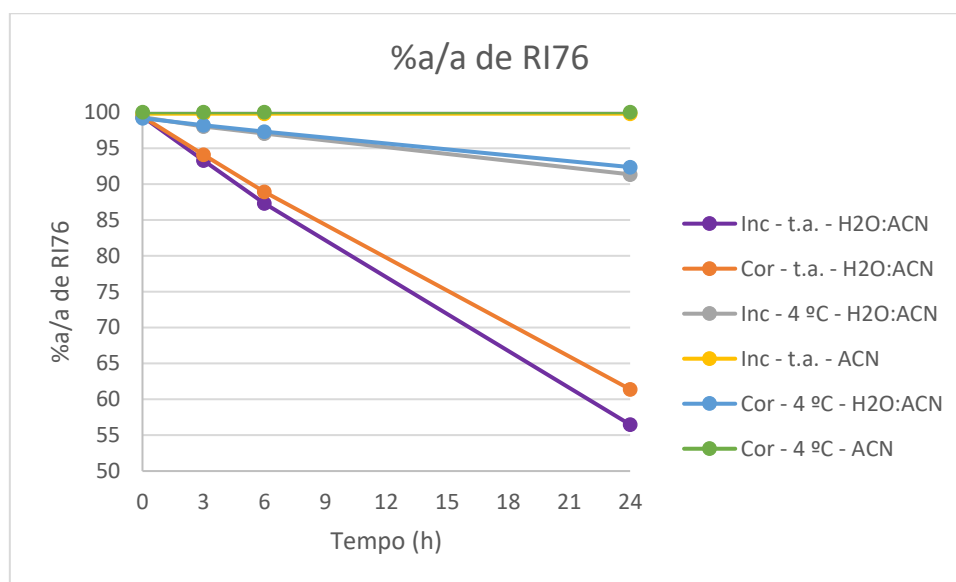
em que t_R é o tempo de retenção de um analito e t_0 é o tempo morto determinado. O cálculo do fator de retenção é importante por ser um fator reprodutível para um mesmo método em diferentes sistemas cromatográficos, com volumes extra coluna distintos e por permitir a avaliação da retenção de compostos na coluna (MEYER, 2010; SNYDER *et al.*, 1997). É recomendado na literatura que o fator de retenção esteja entre 1 e 10 (MEYER, 2010; SNYDER *et al.*, 1997).

Os fatores de retenção calculados foram de 2,48 para RI72, 3,73 para a 2-bromo-4'-metoxiacetofenona e 6,57 para RI76.

4.3.4 Avaliação da estabilidade de RI76 em solução

Na **Figura 21**, é ilustrado o perfil de degradação de R176 nas condições estabelecidas em **4.2.4 Avaliação da estabilidade de R176 em solução**. Observa-se uma rápida degradação da substância em solução, quando a mesma é mantida em temperatura ambiente, mesmo protegida da luz. O armazenamento sob refrigeração reduz de forma significativa a degradação, de cerca de 12% para cerca de 2% após 6 horas. A solubilização da amostra em acetonitrila pura, por sua vez, anula completamente a degradação da amostra, mantendo-a estável por ao menos 24 horas. Acredita-se então, que o mecanismo responsável pela degradação do candidato a fármaco nas soluções de trabalho é uma hidrólise, independente da luz, e dependente de temperatura.

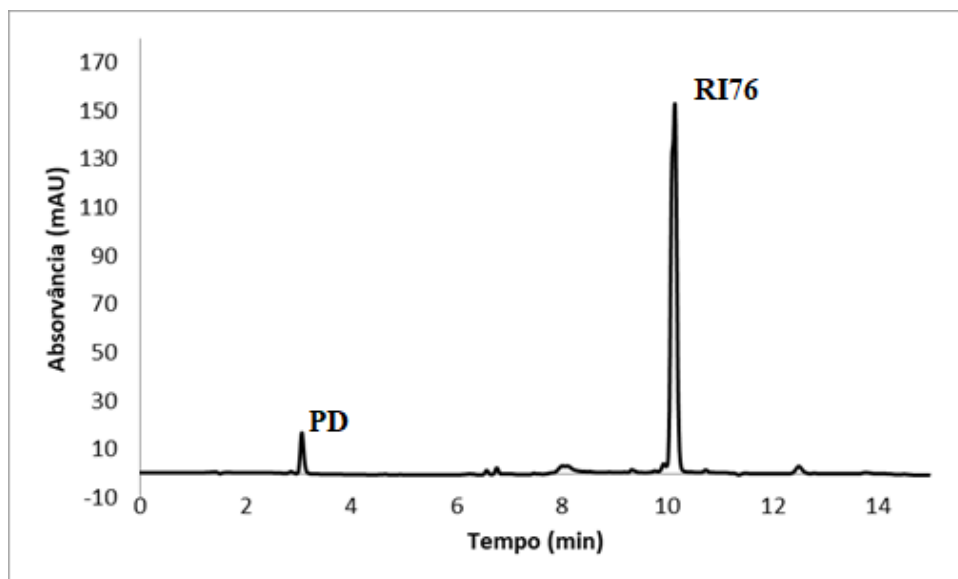
Figura 21 - Perfil de degradação de R176, na solução de trabalho, após 3, 6 e 24 horas.



Legenda: Inc, frasco transparente; Cor, frasco âmbar; t.a., mantido à temperatura ambiente; 4 °C, mantido em geladeira; H2O:ACN, solubilizado em mistura de acetonitrila e água; ACN, solubilizado em acetonitrila.

Na **Figura 22** é ilustrado um cromatograma obtido após degradação intensa nas condições testadas, na qual se percebe a formação de um único pico referente ao produto de degradação.

Figura 22 - Cromatograma obtido com uma amostra de RI76 preparada no dia anterior da análise. Observa-se degradação da amostra, levando à formação de um pico em 3,04 min ($k = 1,27$).



Com os resultados obtidos, percebe-se que a utilização de acetonitrila:água 50:50 como solvente no preparo de amostra é inadequado. Optou-se, então, por utilizar acetonitrila pura no preparo. Uma vez que é descrito que o uso de solventes com força eluotrópica superior àquela da fase móvel pode levar a prejuízo nos parâmetros cromatográficos, avaliou-se, comparativamente com amostras preparadas em fase móvel, os parâmetros de fator de cauda, número de pratos teóricos, variabilidade do tempo de retenção e variabilidade da área sob o pico. Os resultados são apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Comparação dos parâmetros cromatográficos obtidos com o preparo da amostra em H₂O:ACN (50:50) e em acetonitrila pura (n = 5).

Parâmetro	Preparo da amostra em H ₂ O:ACN (50:50)	Preparo da amostra em acetonitrila pura
Fator de cauda	0,876	0,876
Número de pratos teóricos	37565	38382
Variação das áreas (%DPR)	1,89	0,98
Variação dos t_R (%DPR)	0,06	0,03

Observa-se que não houve diferença entre os parâmetros de fator de cauda e número de pratos teóricos quando os preparos da amostra são comparados, o que

indica que o uso de um solvente com força eluotrópica superior à da fase móvel, nesta situação, não impacta na eficiência da análise.

Observou-se também que a reprodutibilidade das áreas ficou comprometida quando a amostra foi preparada em H₂O:ACN, o que está diretamente relacionado à degradação que a amostra sofre entre uma injeção e outra. A pequena redução de área a cada 15 minutos é suficiente para impactar no desvio padrão obtido para as áreas dentre cinco repetições de uma mesma amostra.

4.3.5 Estudo de degradação forçada

Com o método desenvolvido, procedeu-se então com os estudos de degradação forçada de RI76. Amostras a 1 mg/mL, preparadas como descrito em **4.2.6 Estudo de degradação forçada**, foram submetidas a condições de estresse visando a formação de produtos de degradação. As amostras foram então diluídas para a concentração de trabalho (100 µg/mL) com acetonitrila, e injetadas no cromatógrafo.

De modo a garantir reprodutibilidade em diferentes sistemas cromatográficos, os produtos de degradação serão indicados em termos de fator de retenção, calculados pela fórmula abaixo (BRASIL, 2019).

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

na qual:

t_r = tempo de retenção;

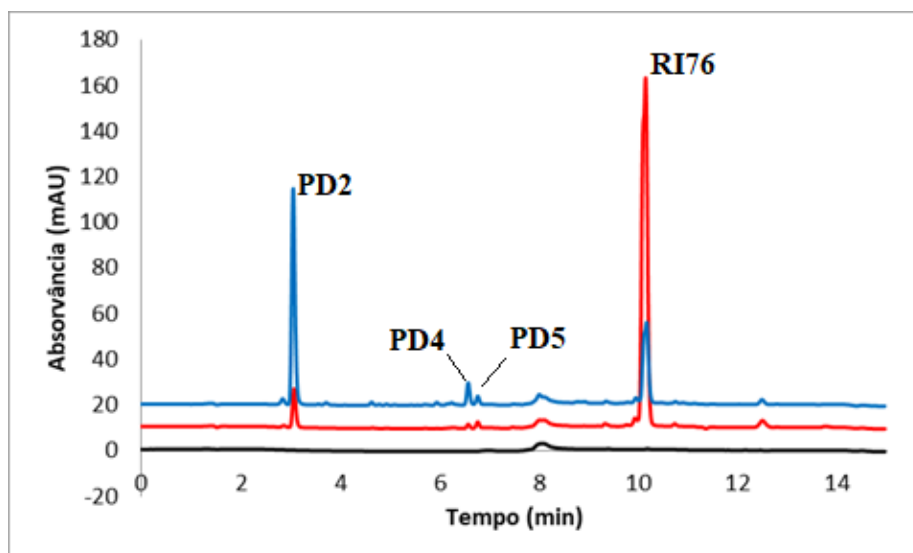
t_0 = tempo morto do equipamento.

4.3.5.1 Hidrólise em meio neutro, ácido e alcalino

Utilizando-se água em pH próximo a 7,0 como solução degradante, confirmou-se o que já havia sido observado anteriormente na investigação dos diluentes para amostra: a formação de um pico intenso em $k = 1,27$ (PD2). Foram detectados

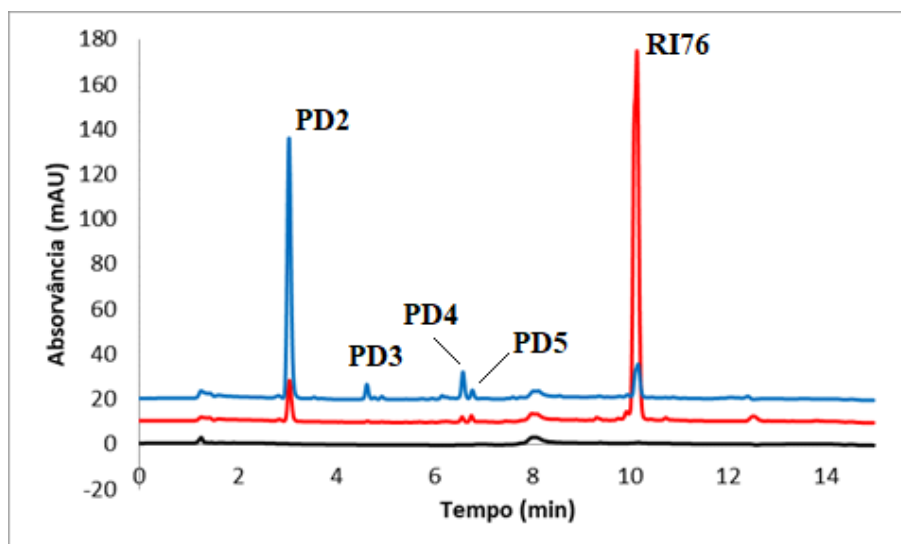
também, outros picos menores em $k = 3,88$ (PD4) e em $4,06$ (PD5) conforme ilustrado na **Figura 23**.

Figura 23 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em meio neutro, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).



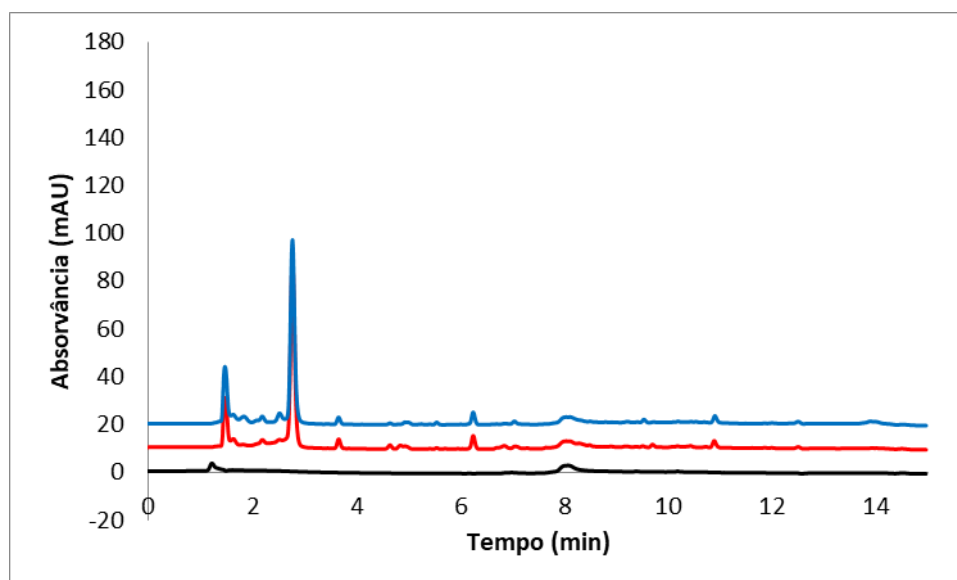
Na **Figura 24**, exibem-se os cromatogramas obtidos com a degradação em meio ácido, na qual utilizou-se HCl $0,1 M$ como degradante. A degradação foi mais intensa neste pH do que no pH neutro e foram observados os mesmos produtos de degradação, além de um outro em $k = 2,48$ (PD3), observado apenas nesta condição.

Figura 24 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em meio ácido, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).



Na condição alcalina, por sua vez, observou-se degradação quase completa de RI76 mesmo no tempo zero, como mostrado nos cromatogramas da **Figura 25**. Essa degradação intensa pode ser inferida ao analisar o próprio balão onde foi realizada a degradação, pela mudança de cor da solução de amarelo para verde quase instantaneamente.

Figura 25 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em meio alcalino, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).

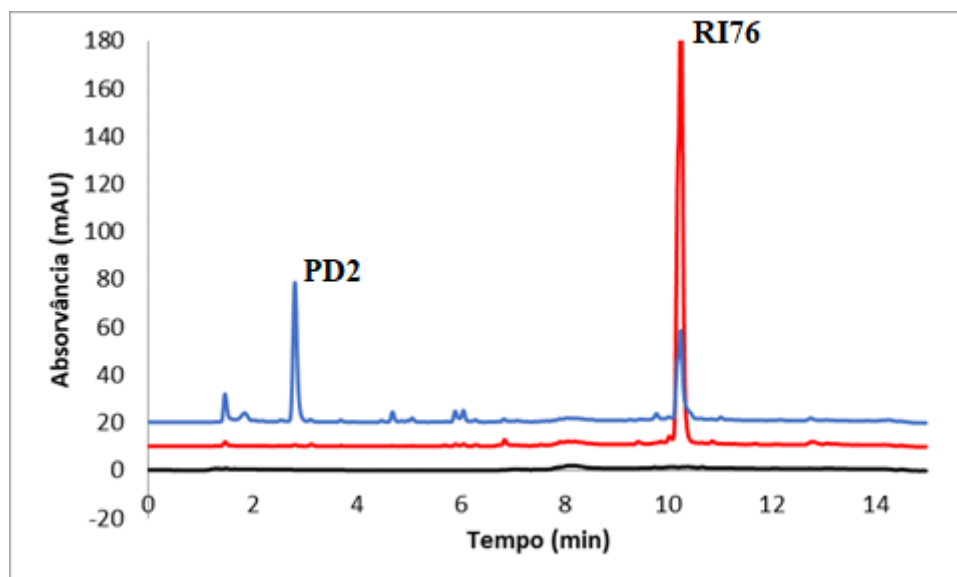


Os cromatogramas obtidos nesta condição mostram a formação de diversos picos pouco retidos, com baixa separação. Buscou-se então uma condição alcalina mais amena para provocar uma degradação menos intensa, que evidenciasse melhor os

produtos formados diretamente do RI76, sem o risco de formação de produtos de degradação secundários.

Degradando-se a amostra com uma solução de NaOH 0,01 M, observou-se, como esperado, hidrólise mais branda do RI76, permitindo a formação de um produto de degradação majoritário e observado em $k = 1,09$ (**Figura 26**). Nos estudos empregando CLAE-EM, percebeu-se que este pico em 1,09 corresponde a PD2, mas com o tempo de retenção levemente alterado.

Figura 26 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em meio alcalino, sendo o degradante NaOH 0,01 M, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).



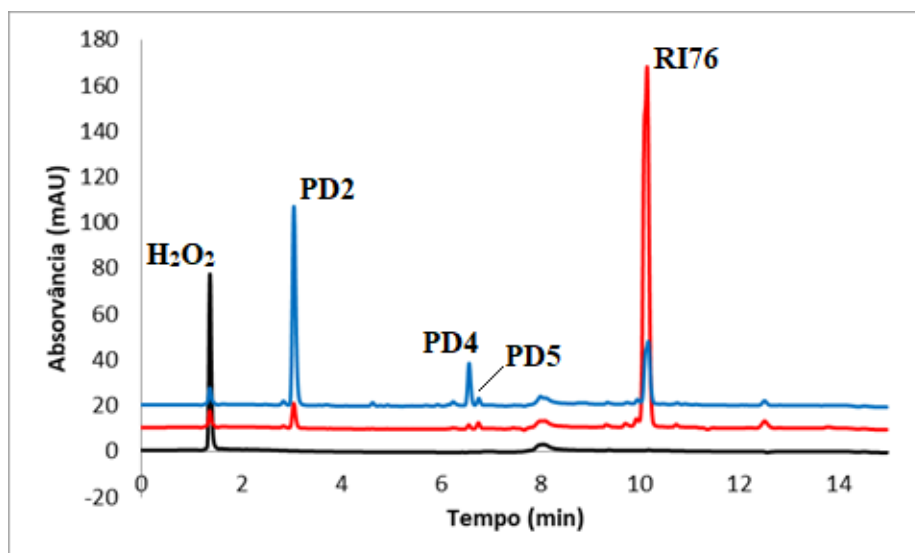
4.3.5.2 Oxidação por peróxidos e íons metálicos

Diante da instabilidade do RI76, já demonstrada nos experimentos anteriores, optou-se por iniciar os experimentos de degradação com peróxido em uma concentração mais baixa do que o preconizado pela ANVISA (ANVISA, 2008). Os testes foram iniciados com H₂O₂ a 0,3%, conforme descrito por Baertschi *et al.* (2011).

Nesta condição observou-se uma degradação um pouco mais suave do que aquela observada em meio ácido, com a formação dos mesmos produtos já observados em

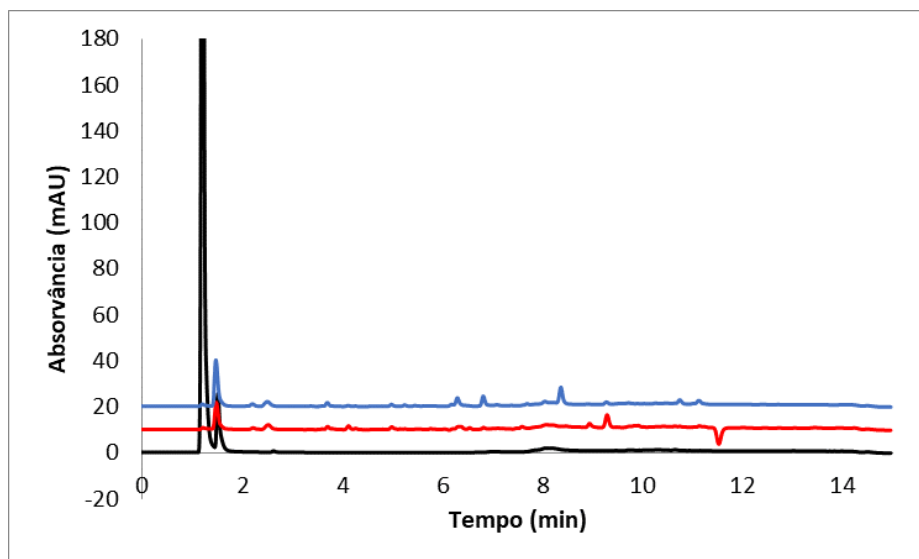
meio neutro e ácido. PD4, no entanto, foi formado com maior intensidade nesta condição (**Figura 27**).

Figura 27 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em condição oxidativa, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).



A condição de estresse oxidativo por íons metálicos, conduzida neste trabalho utilizando-se íons Cu^{2+} , provocou degradação significativamente superior à oxidação por peróxidos, conforme demonstrado na **Figura 28**. Não foram observados picos de intensidade significativa ao longo da análise, com exceção dos picos eluídos no volume morto, também evidenciados no branco, que são correlacionados ao sulfato de cobre. Conclui-se, então, que o mecanismo de oxidação por transferência de elétrons é mais prejudicial a molécula de RI76 do que a degradação por peróxidos.

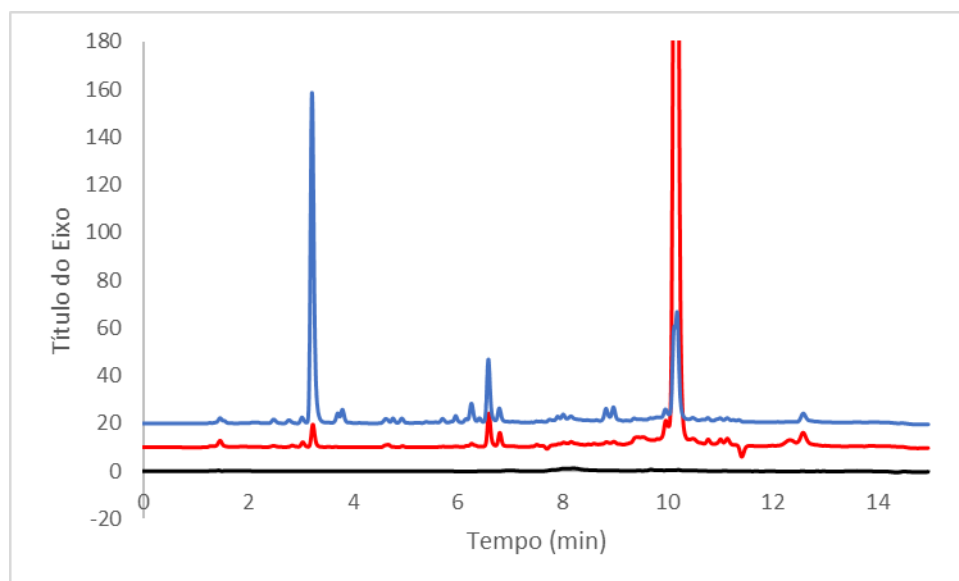
Figura 28 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em condição oxidativa catalisada por CuSO_4 50 mM, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).



Assim como na hidrólise por NaOH, na oxidação por CuSO_4 , observou-se uma alteração de cor da solução de degradação. Seria esperado que a adição da solução azulada de CuSO_4 à solução amarelada de RI76 produzisse uma tonalidade verde, no entanto, obteve-se uma solução avermelhada, o que evidencia uma reação praticamente instantânea entre o degradante e RI76.

Diante da extensão da degradação observada nesta condição, reduziu-se a concentração de CuSO_4 em um novo experimento de 50 mM para 1 mM, conforme recomendado na literatura (BAERTSCHI, 2011). Os resultados obtidos com estas condições estão ilustrados na **Figura 29**.

Figura 29 - Cromatogramas obtidos com a degradação de RI76 em condição oxidativa catalisada por íons metálicos, utilizando CuSO_4 1 mM, no tempo zero (vermelho), após 24 horas (azul) e o respectivo branco (preto).



A degradação por íons Cu^{2+} na concentração de 1 *mM* foi caracterizada pela formação de um produto de degradação majoritário, PD2, e pela formação dos picos já observados anteriormente, PD4 e PD5. Outros picos foram também observados, mas em menor intensidade. A mudança de cor observada no experimento anterior ocorreu de maneira menos pronunciada e de forma lenta ao longo da exposição.

As análises CLAE-EM permitiram evidenciar que o pico em $k = 1,39$ corresponde ao mesmo produto de degradação visto anteriormente em $k = 1,27$.

4.3.5.3 Degradação por calor seco e úmido

A degradação térmica tem como objetivo reproduzir, de maneira acelerada, reações passíveis de ocorrerem na vida útil de um insumo ou produto farmacêutico (BAERTSCHI *et al.*, 2011).

Com base nos conhecimentos já disponíveis na literatura científica sobre a cinética de degradação de fármacos, é possível estimar o efeito da temperatura na degradação de um composto com energia de ativação (E_a) conhecida. Uma vez que para muitos compostos a energia de ativação não foi estudada experimentalmente, considera-se o valor de 20 kcal/mol como uma estimativa adequada para a maioria dos fármacos (BAERTSCHI *et al.*, 2011).

Baertschi *et al.* (2011) disponibilizaram dados, reproduzidos na **Tabela 13**, referentes ao tempo de exposição necessário para reproduzir um armazenamento por dois anos a 25 °C, considerando diferentes energias de ativação.

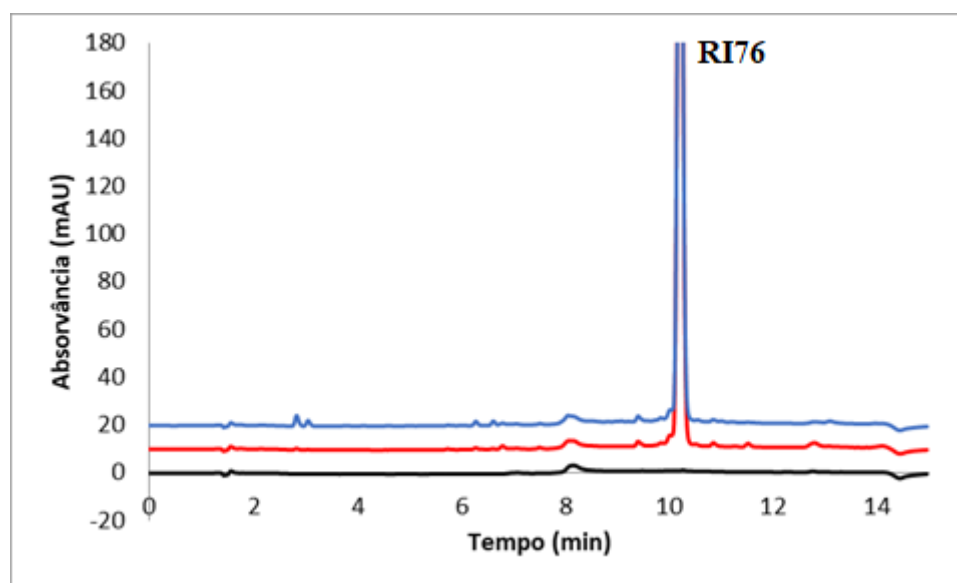
Tabela 13 - Número de dias necessários para simular um armazenamento de 24 meses a 25 °C, considerando diferentes energias de ativação.

Temperatura (°C)	$E_a = 12$ kcal/mol	$E_a = 17$ kcal/mol	$E_a = 20$ kcal/mol	$E_a = 25,8$ kcal/mol	$E_a = 29,8$ kcal/mol
40	280,8	182,5	146	90,1	65,2
50	152,1	79,3	54,9	25	14,8
60	86,9	35,8	21,7	7,5	3,7
70	51	16,9	9,1	2,4	1,0

FONTE: Adaptado de BAERTSCHI, 2011.

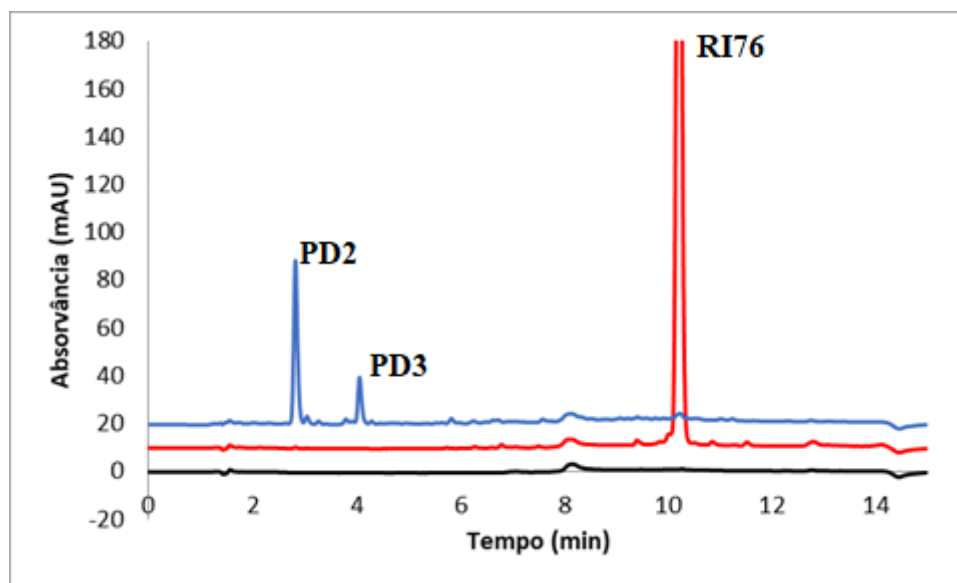
Com base nos valores apresentados na **Tabela 14**, optou-se por considerar $E_a = 17$ kcal/mol, conforme recomendado por Baertschi (2011). Uma amostra de RI76 foi então colocada em estufa a 70 °C por 17 dias, e os resultados obtidos são reproduzidos na **Figura 30**. Observa-se que não há formação de produtos de degradação e não há redução na intensidade do pico de RI76, indicando a estabilidade desta substância frente a altas temperaturas.

Figura 30 - Cromatogramas obtidos com a degradação térmica a seco de RI76. O cromatograma em vermelho se trata da amostra controle, em azul a amostra aquecida a 70 °C por 17 dias e em preto, uma solução branco.



Avaliou-se também o efeito da presença de umidade na degradação térmica de RI76, mantendo as amostras sob uma atmosfera com 75% de umidade relativa. Nesta condição, a degradação foi significativamente superior, como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 31**.

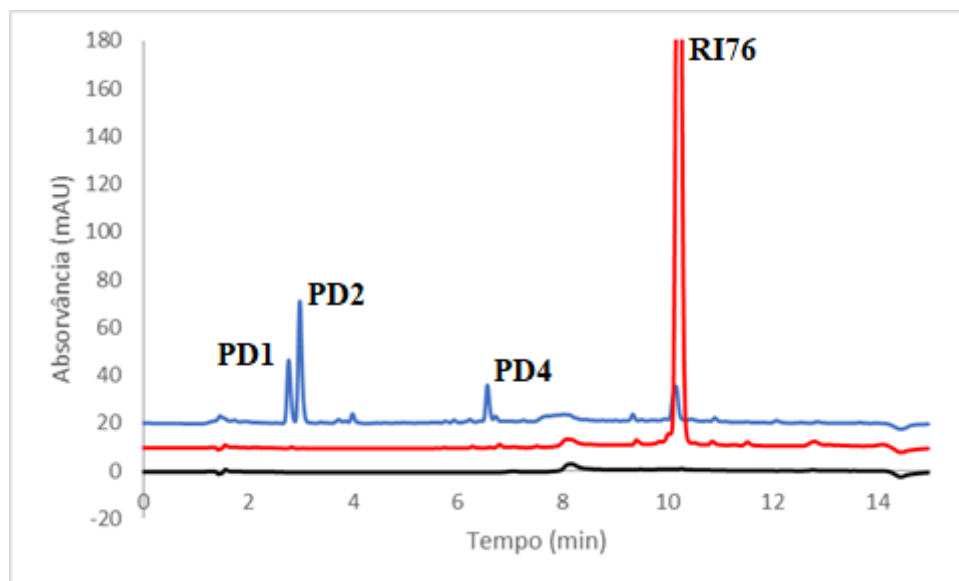
Figura 31 - Cromatogramas obtidos com a degradação térmica úmida de RI76. O cromatograma em vermelho é obtido com a amostra controle, em azul a amostra aquecida a 70 °C com 75% de umidade relativa por 17 dias, e em preto, uma solução branco.



A amostra de RI76 mantida em uma atmosfera com alta umidade absorveu água, o que pode ter possibilitado reações de hidrólise, uma vez que o produto majoritariamente formado corresponde aquele observado nas degradações em meio aquoso (PD2).

Visto que se observa degradação completa de RI76 quando este é mantido sob alta temperatura e umidade por 17 dias, avaliou-se também a degradação em um tempo reduzido de 5 dias, de modo a verificar se os produtos de degradação obtidos são os mesmos (**Figura 32**).

Figura 32 - Cromatogramas obtidos com a degradação térmica úmida de RI76. O cromatograma em vermelho é obtido com a amostra controle, em azul a amostra aquecida a 70 °C com 75% de umidade relativa por cinco dias, e em preto, uma solução branco.

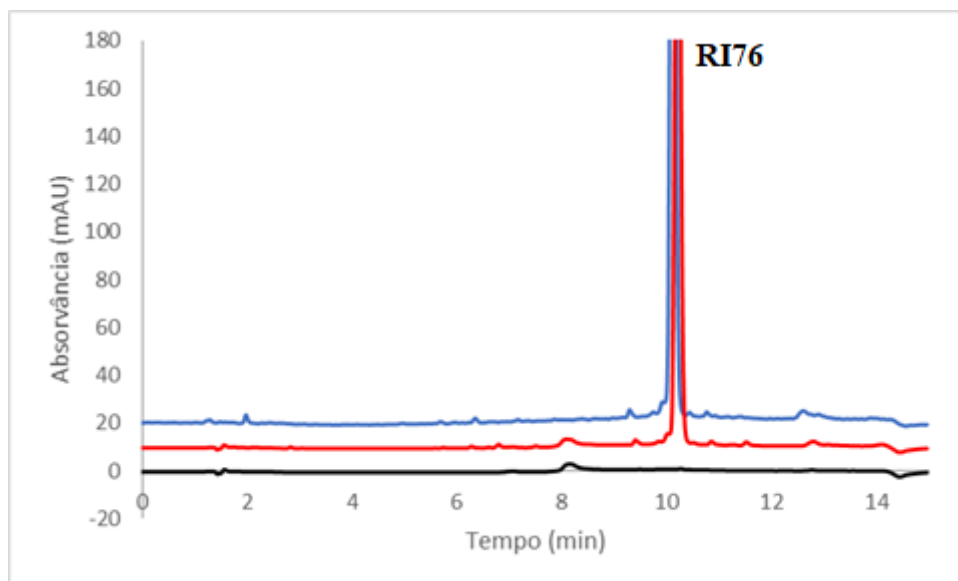


Nota-se que os produtos de degradação obtidos após uma exposição mais curta são diferentes dos obtidos anteriormente na longa exposição, o que indica que a degradação anterior foi drástica e levou a formação de produtos de degradação secundários.

Adicionalmente, conforme recomendado pelo guia do ICH, e com o intuito de verificar se a mudança de temperatura provoca alguma alteração no mecanismo de degradação térmica, levando à formação de produtos distintos ou com cinéticas distintas, avaliou-se também a termólise a seco a 60 °C por 30 dias, fornecendo à amostra, portanto, a mesma quantidade de energia que a exposição a 70 °C por 17 dias (BAERTSCHI et al., 2011; ICH, 1996).

Os resultados, reproduzidos na **Figura 33**, demonstram que não há degradação significativa nestas condições, assim como observado no experimento por calor seco anterior.

Figura 33 - Cromatogramas obtidos com a degradação térmica de RI76. O cromatograma em vermelho é obtido com a amostra controle, em azul a amostra aquecida a 60 °C por 30 dias, e em preto, uma solução branco.



4.3.5.4 Degradação fotolítica

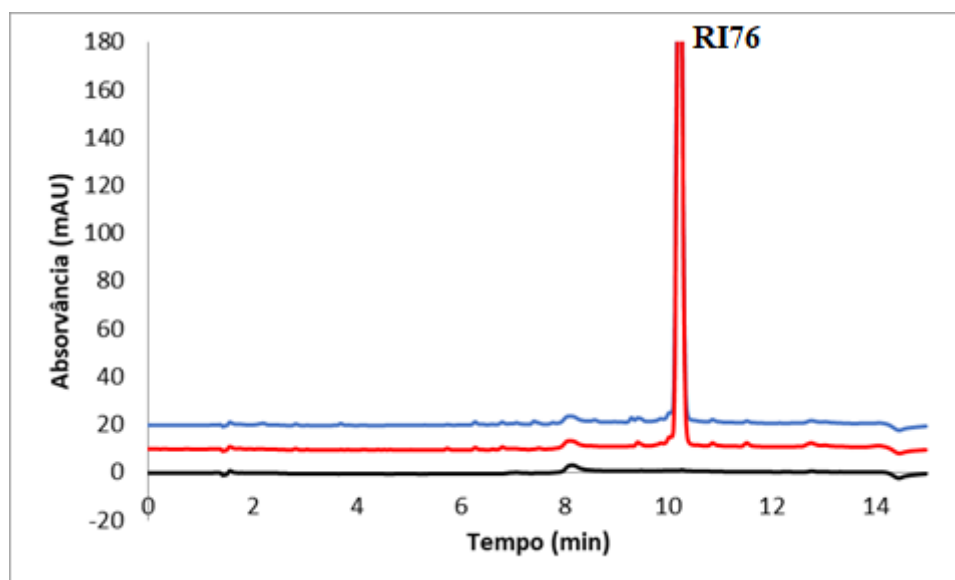
No experimento de actinometria química da quinina, realizado antes dos testes de degradação fotolítica, buscou-se o tempo necessário de exposição a luz que promovesse degradação na quinina com conseqüente alteração na sua absorvância de 0,9 em relação a uma amostra controle.

A avaliação da absorvância das amostras de quinina foi realizada após 48 h e 72 h. Após 48 h, foi observada uma alteração de apenas 0,3 na absorvância da quinina exposta a radiação em relação ao controle, indicando exposição insuficiente, enquanto que após 72 h, uma alteração de absorvância na ordem de 1,2 foi observada, indicando exposição suficiente para cumprimento das exigências do ICH (ICH, 1996).

As amostras de RI76 foram mantidas, portanto, por nove dias na câmara de fotoestabilidade, representando uma exposição três vezes superior ao mínimo exigido pelo ICH (ICH, 1996), e seguindo o recomendado por Baertschi *et al.*, 2011. Na **Figura 34** exibem-se os cromatogramas obtidos com a amostra controle,

protegida da luz por um revestimento de papel alumínio, e com a amostra exposta a luminosidade.

Figura 34 - Cromatogramas obtidos com a degradação fotolítica de RI76. O cromatograma em vermelho se trata da amostra controle, em azul a amostra exposta e em preto, uma solução branco.



Observa-se nos cromatogramas que não houve degradação de RI76 na amostra exposta a luminosidade, o que indica que o composto é fotoestável.

4.3.5.5 Conclusões do estudo de degradação

Um resumo dos resultados obtidos com os ensaios de degradação encontra-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Extensão da degradação de RI76, avaliada em termos de porcentagem de área no cromatograma, em cada condição estudada.

		RI76	PD1	PD2	PD3	PD4	PD5
Fator de retenção (k)		6,57	1,16	1,27	2,48	3,88	4,06
Amostra controle (% a/a)		95,0		-	-	-	-
Hidrólise em pH neutro (% a/a)	t = 0 h	85,8		5,2		0,4	0,8
	t = 24 h	32,1		54,2	0,7	5,1	2,1
Hidrólise em pH	t = 0 h	95,0					

alcalino (% a/a)	t = 24 h	41,6		45,2	2,6	3,3	0,9
Hidrólise em pH ácido (% a/a)	t = 0 h	84,5		5,7		0,6	0,8
	t = 24 h	11,3		64,3	3	5,6	1,7
Oxidação por peróxidos (% a/a)	t = 0 h	89,5		3,9		0,6	0,9
	t = 24 h	26,9		53,5	0,9	11,1	1,7
Ox. por íons metálicos (% a/a)	t = 0 h	90,6		1,8	0,4	2,6	1,1
	t = 24 h	22,6		43,6	0,6	7,8	1,8
Termólise (% a/a)	Controle	95,0					
	t = 17 d	94,0		0,1		0,4	0,4
Umidade (% a/a)	Controle	95,0					
	t = 5 d	17,3	19,2	37,7		11,3	1,6
Fotólise (% a/a)	Controle	95,0					
	t = 9 d	95,0					

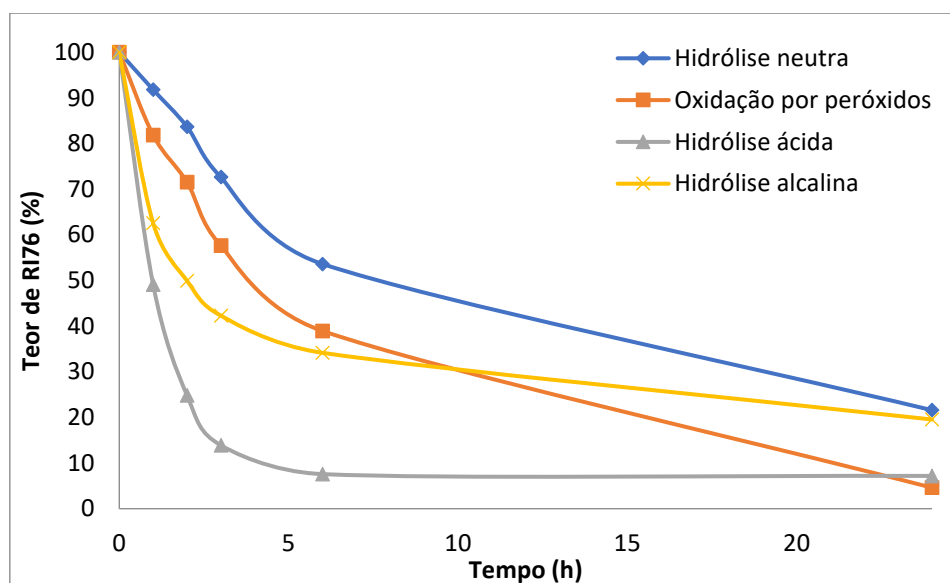
Uma avaliação cromatográfica em outros comprimentos de onda, possibilitada pelo detector de arranjo de diodos, não evidenciou a formação de outros produtos de degradação com intensidade significativa, mostrando que a detecção em 260 nm é adequada tanto para a determinação do teor de RI76, quanto para a avaliação de sua pureza.

O método cromatográfico desenvolvido permitiu separação, com adequada resolução, de RI76 e de todos os seus produtos de degradação detectados. Todos os picos apresentaram adequada retenção ($1,0 < k < 10$) e boa simetria (MEYER, 2010; SNYDER *et al.*, 1997). Desta forma, procedeu-se à validação do método desenvolvido.

A cinética da degradação de RI76 foi avaliada para as condições de hidrólise neutra, (H_2O), ácida (HCl 0,1 M) e alcalina (NaOH 0,01 M), e por oxidação por peróxido (H_2O_2 0,3%). Amostras foram preparadas nas condições definidas no estudo de degradação forçada e analisadas logo após o preparo (tempo zero), e após 1, 2, 3, 6 e 24 horas.

Observa-se na **Figura 35**, que a degradação ocorre mais rapidamente na condição ácida, com a observação de que a concentração de hidróxido na exposição alcalina é 10 vezes inferior a concentração de ácido na exposição ácida. Observa-se um máximo de degradação após 24 horas oxidação por peróxido. Apesar da condição de hidrólise neutra ser a mais branda avaliada, observou-se degradação superior a 70% em 24 horas.

Figura 35 - Cinética de degradação de RI76 nas condições de hidrólise neutra, ácida, alcalina e de oxidação por peróxido.



Para todas as hidrólises, as reações seguem a cinética de primeira ordem na qual a velocidade de degradação depende da concentração dos reagentes. A constante de degradação (K_{deg}) foi calculada a partir da equação $-K / 2,303 = a$, onde a é igual a inclinação da reta obtida a partir do gráfico logaritmo natural da concentração de RI76 *versus* tempo (horas). As equações que modelam a cinética de degradação e as constantes de degradação são apresentadas na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Equações da cinética de degradação para RI76 nas condições de degradação em solução.

Condição de degradação	Equação	K_{deg}
Hidrólise neutra	$100 - e^{deg} = -0.0622t + 4.5217$	0.1432
Hidrólise ácida	$100 - e^{deg} = -0.6603t + 4.5760$	1.5207
Hidrólise alcalina	$100 - e^{deg} = -0.2806t + 4.5062$	0.6462
Oxidação por peróxidos	$100 - e^{deg} = -0.1254t + 4.5202$	0.2888

deg = degradação, t = tempo.

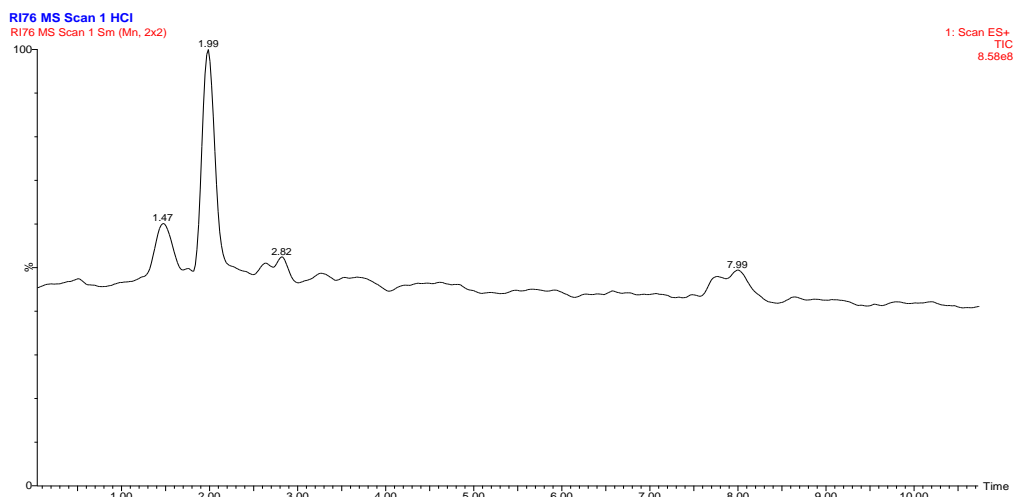
4.3.6 Caracterização do produto de degradação

Uma vez que estudos de degradação forçada podem levar a formação de diversos produtos de degradação, é muitas vezes inviável a caracterização de todos. Nas condições reais de armazenamento e em estudos de estabilidade de longa duração, espera-se que apenas os produtos de degradação majoritários sejam formados. Desta forma, é recomendado na literatura que ao menos os produtos de degradação que representem 10% ou mais da degradação total sejam caracterizados (ALSANTE *et al.*, 2011; BAERTSCHI *et al.*, 2011; REYNOLDS *et al.*, 2002).

Buscou-se então identificar e caracterizar PD2, o produto de degradação majoritário obtido em todas as condições de estresse onde houve degradação. Para tal, três condições foram reproduzidas para serem analisadas por CLAE-EM: a degradação em meio ácido com HCl 0,1 M, a degradação em meio alcalino com NaOH 0,01 M e o estresse por íons metálicos com CuSO₄ 1 mM.

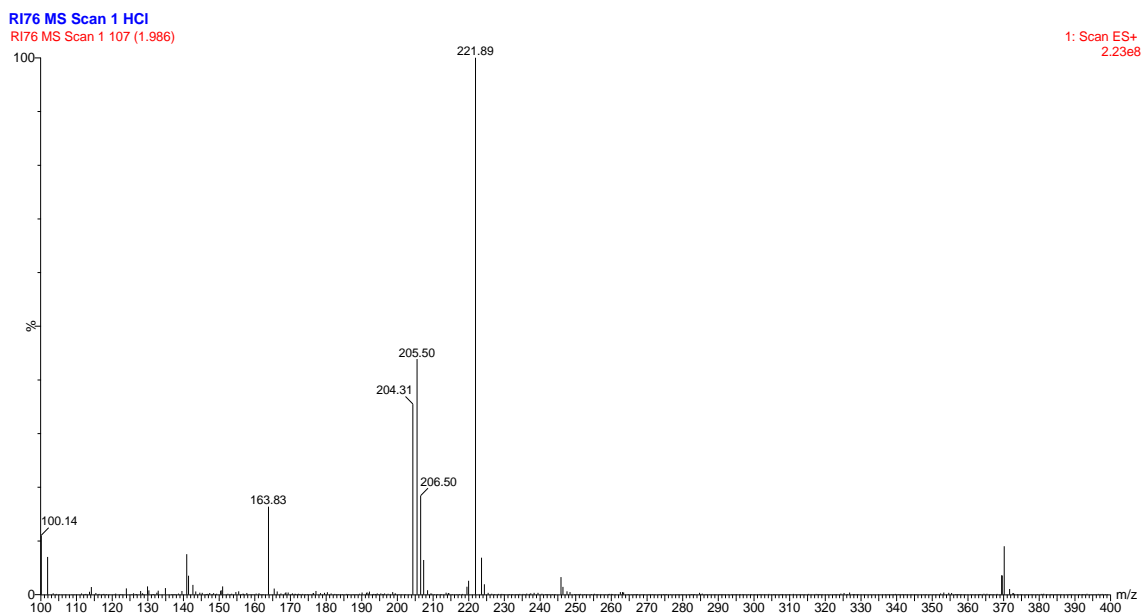
Observaram-se nos cromatogramas de varredura no EM um pico referente ao produto de degradação principal, em 1,95 minutos, além dos picos referentes aos isômeros E e Z de RI76, conforme exemplificado na **Figura 36**.

Figura 36 - Cromatograma obtido por CLAE-EM, no modo varredura, para uma amostra de RI76 exposta a HCl 0,1 M.



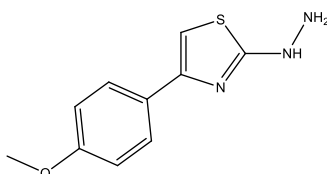
O pico em 1,95 minutos, correspondente ao pico observado em $k = 1,27$ por CLAE-DAD, e apresenta m/z de aproximadamente 222 (**Figura 37**).

Figura 37 - Espectro de massas obtido para o pico em 1,95 minutos observado nos cromatogramas de RI76 em condições de estresse, por CLAE-EM.



Para a massa de 221 Da, considerando o íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 222$, foi proposta a estrutura mostrada na **Figura 38** como possível correspondência deste produto de degradação.

Figura 38 - Proposta de estrutura para o produto de degradação majoritário obtido nos estudos de degradação forçada.



Para avaliar se a estrutura proposta é plausível, aplicou-se 10 μL da solução de RI76 após estresse por HCl 0,1 M em uma placa de CCD e revelou-se com ninhidrina. A ninhidrina é um revelador utilizado para detecção de aminas primárias. Dessa forma, a formação de uma mancha de coloração rosada evidenciou a presença de aminas primárias, presente no possível produto de degradação e ausente em RI76, demonstrando que é plausível a formação deste produto (FRIEDMANN, 2004).

A formação deste produto está associada a uma hidrólise do grupo hidrazona com liberação da cadeia alifática na forma de 3-hexanona. O mecanismo proposto para a hidrólise em meio ácido é apresentado na **Figura 39**, e em meio básico na **Figura 40**.

Figura 39 - Mecanismo de hidrólise ácida de RI76 levando à formação do produto de degradação.

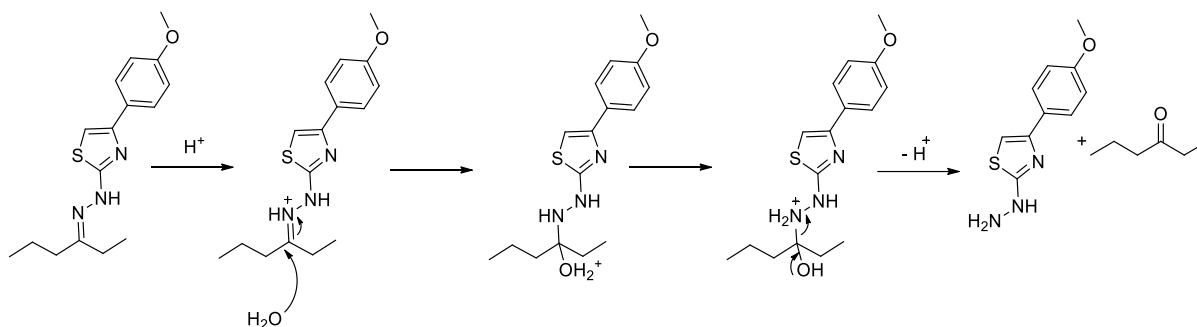
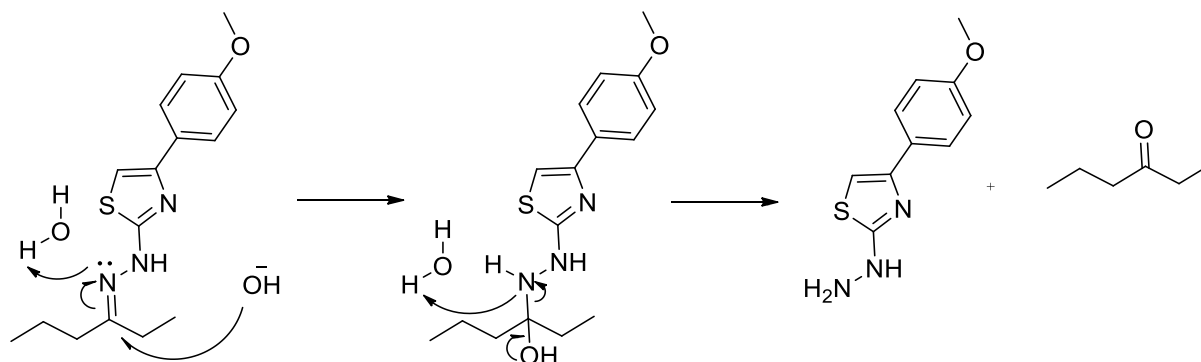
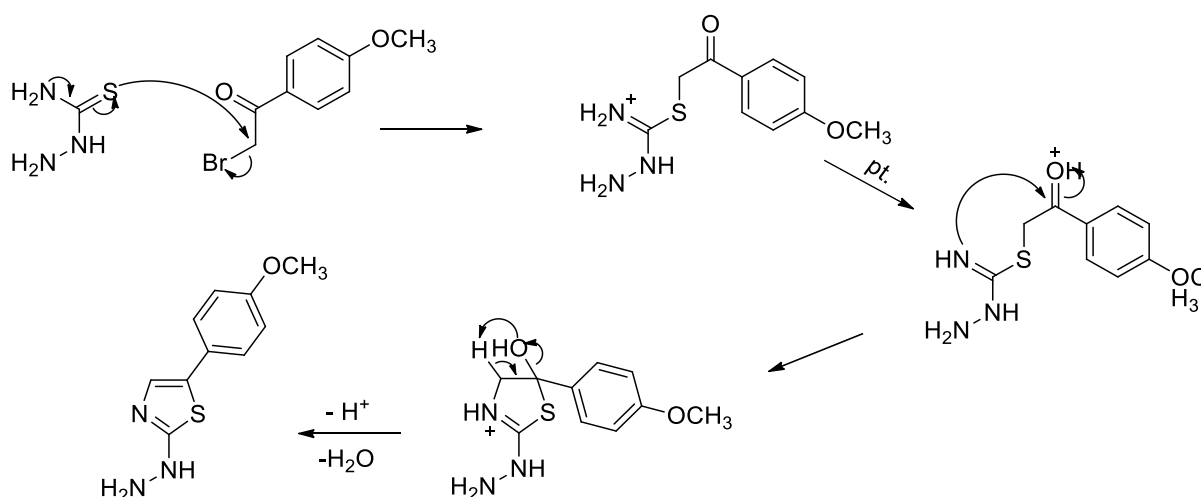


Figura 40 - Mecanismo de hidrólise alcalina de RI76 levando à formação do produto de degradação



Realizou-se então a síntese do produto de degradação segundo a rota proposta na **Figura 41** e o procedimento descrito na seção **4.2.7 Caracterização do produto de degradação**, e o material obtido foi caracterizado para verificação de sua identidade.

Figura 41 - Mecanismo proposto para a síntese do produto de degradação, por meio de reação entre tiossemicarbazida e 2-bromo-4'-metoxiacetofenona.

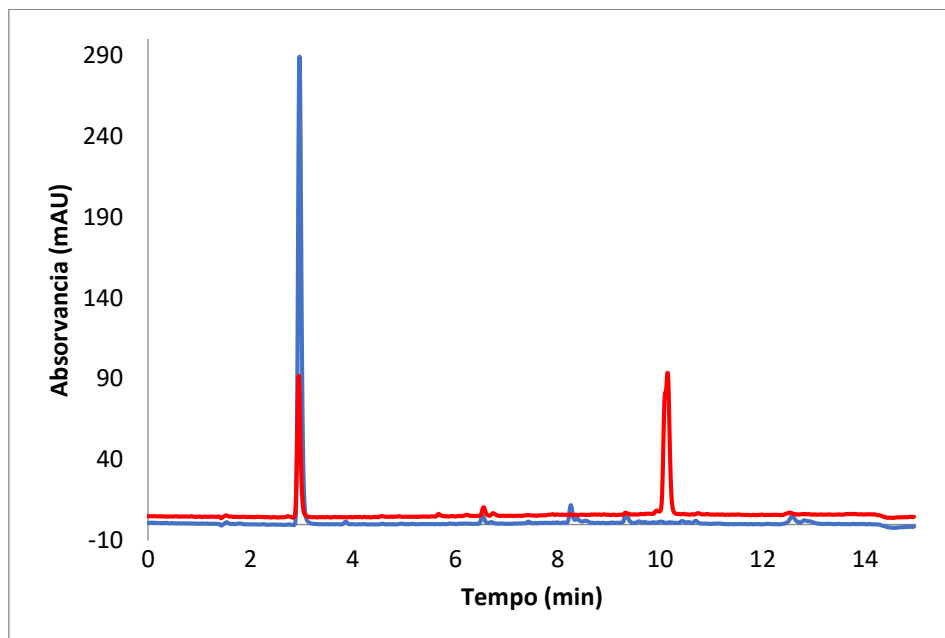


Legenda: pt: protropismo.

A confirmação de que a substância sintetizada realmente correspondia ao produto de degradação investigado, denominada de agora em diante por PD76, foi realizada por meio da injeção de uma solução desta substância no sistema cromatográfico,

visualizando-se um pico no mesmo tempo de retenção daquele observado nas condições de degradação forçada, conforme ilustrado na **Figura 42**.

Figura 42 - Correspondência de tempos de retenção entre a substância sintetizada (azul) e o produto de degradação obtido em uma amostra de RI76 degradada (vermelho).



O espectro de absorção no infravermelho obtido para a amostra sintetizada está mostrado na **Figura 43**. Na **Tabela 16** são correlacionadas as principais bandas de absorção relativas aos grupos funcionais responsáveis pela absorção.

Figura 43 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o produto de degradação PD76 sintetizado

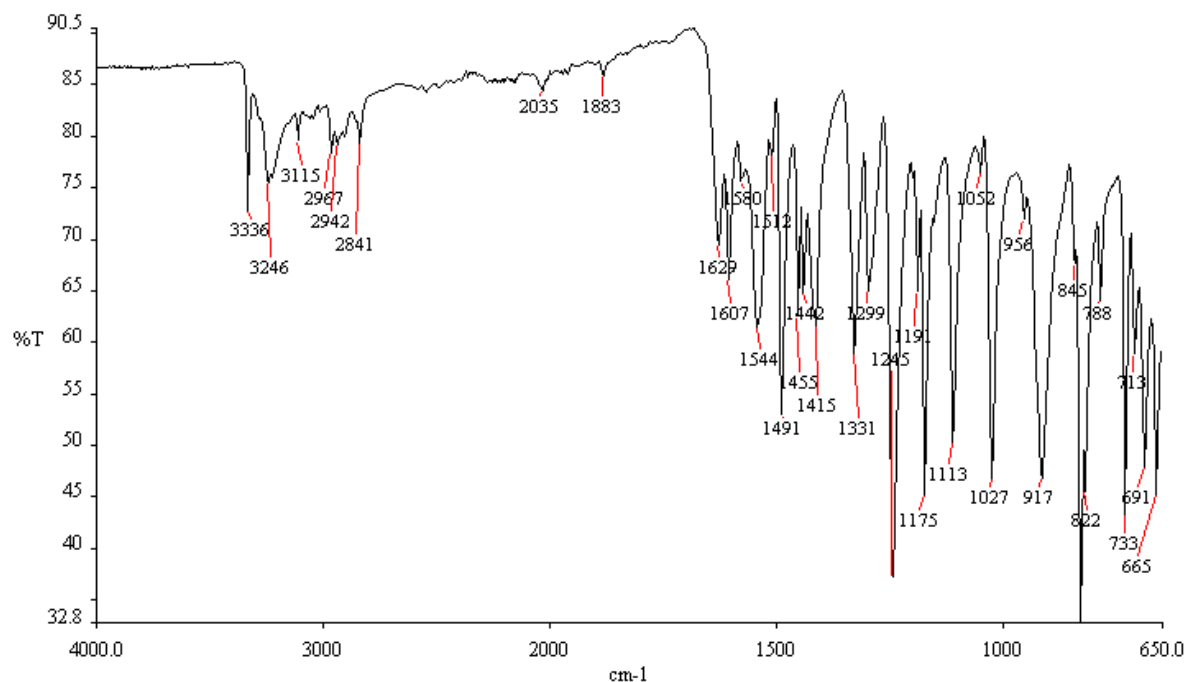


Tabela 16 - Correspondências estruturais das bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho do produto de degradação PD76.

Banda característica	Correspondência estrutural
3336 cm ⁻¹	Estiramento de ligação N-H secundária
3246 cm ⁻¹	Estiramento de ligação N-H primária
2967, 2942 e 2841 cm ⁻¹	Estiramentos de ligação C-H sp ³
1245, 1027 cm ⁻¹	Estiramentos de ligação C-O de éter fenilalquílico
822 cm ⁻¹	Vibrações fora do plano de anel aromático parassubstituído

A faixa de fusão determinada para o material obtido foi entre 164,5°C e 166,4°C, e a elucidação estrutural do material, com conseqüente confirmação da estrutura do produto de degradação, foi realizada por RMN de ¹H, ¹³C e DEPT-135, cujos espectros estão mostrados na **Figura 44** e na **Figura 45**.

Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H - do produto de degradação PD76 e ampliação da região de hidrogênios aromáticos para visualização da multiplicidade.

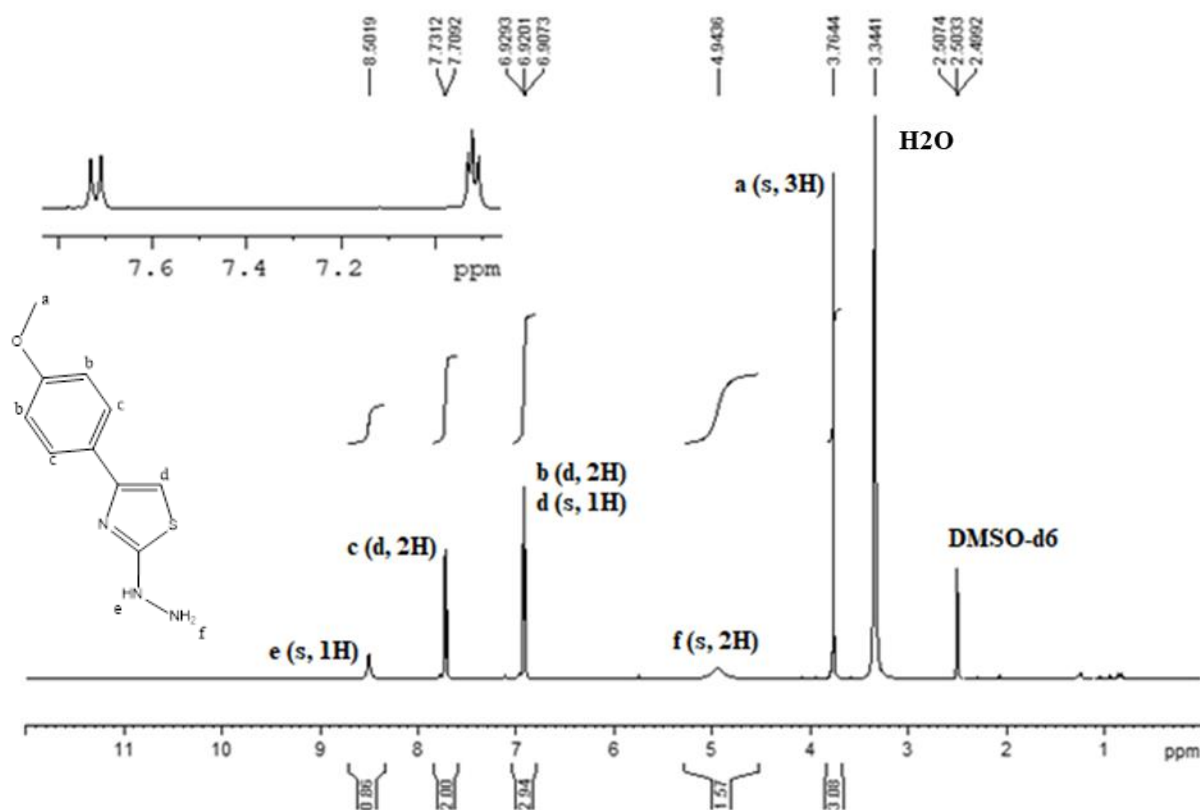
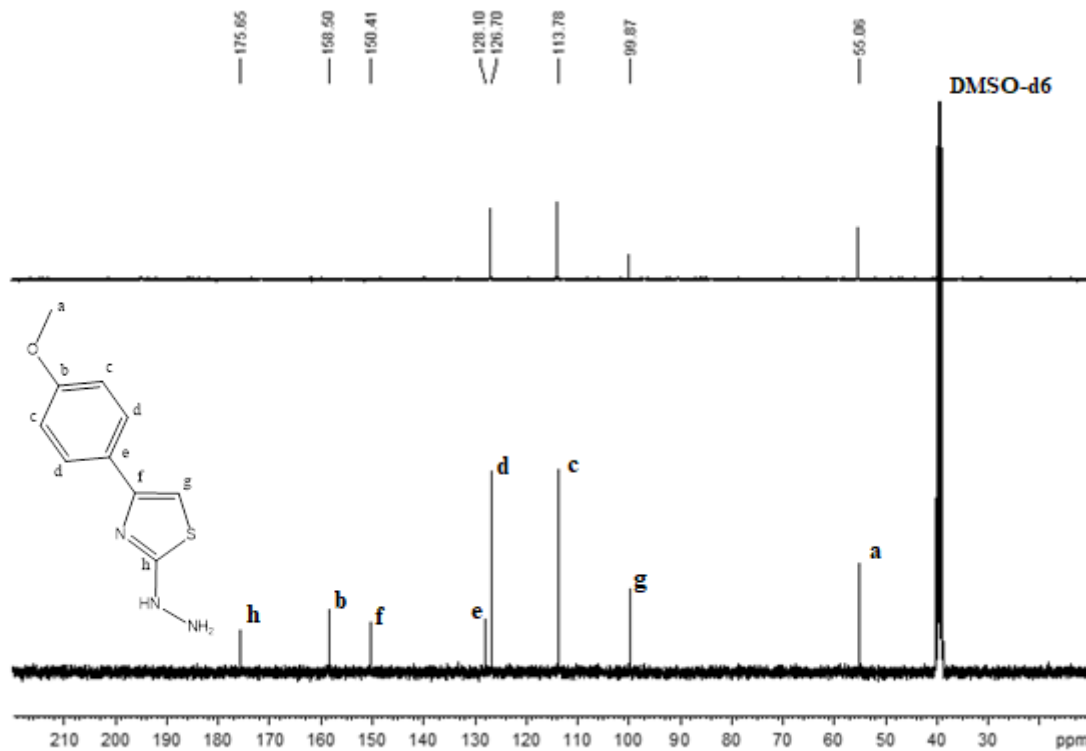


Figura 45 - Espectro de -RMN de ^{13}C do produto de degradação PD76 e sub-espectro de DEPT-135.



A solubilidade de PD76 foi avaliada em água, em acetonitrila e metanol, solventes amplamente utilizados em CLAE-DAD, e em clorofórmio e dimetilsulfóxido, utilizados em sua forma deuterada em experimentos de RMN e qRMN. Os resultados e os respectivos termos descritivos da FB 6 são reproduzidos na Tabela 17 (BRASIL, 2019).

Tabela 17 - Solubilidade de PD76 em solventes avaliados.

Solvente	Solubilidade	Termo descritivo
Água	10 mg não solúveis em 100 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel
Acetonitrila	10 mg solúveis em < 10 mL	Pouco solúvel
Metanol	10 mg solúveis em < 10 mL	Pouco solúvel
DMSO	10 mg solúveis em < 100 µL	Facilmente solúvel
CHCl ₃	10 mg solúveis em < 10 mL	Pouco solúvel

DMSO, dimetilsulfóxido; CHCl₃, clorofórmio.

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica de PD76 estão dispostos na Tabela 18.

Tabela 18 - Atividade antifúngica, expressa em termos de concentração inibitória mínima do produto de degradação obtido.

Composto	Concentração inibitória mínima (µM)						
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
PD76	0,24	125	250	1,95	3,9	0,24	0,24
Fluconazol	0,5	4	32	1	0,25	8	16
RI76	3,9	N.A.	7,8	15,6	7,8	1,9	3,9
Anfotericina	0,25	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1
Itraconazol	0,5	0,25	2	0,25	0,12	1	2

PD76 = produto de degradação. N.A. = Não avaliado. Leveduras utilizadas: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Observa-se que PD76 possui elevada atividade contra a espécie *Candida albicans*, uma das espécies mais relevantes no cenário médico (BROWN *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2006; NUCCI *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2011) e contra as espécies de *Cryptococcus* estudadas. A atividade de PD76 contra estas cepas demonstrou-se superior aos antifúngicos comumente utilizados fluconazol, anfotericina B e itraconazol, indicando significativo potencial terapêutico da substância.

Quando comparado ao seu precursor, RI76, observa-se que PD76 apresenta maior atividade antifúngica contra todas as cepas testadas, excetuando-se *Candida krusei*, sendo assim uma substância com maior potencial farmacêutico.

4.3.7 Validação do método analítico

4.3.7.1 Seletividade

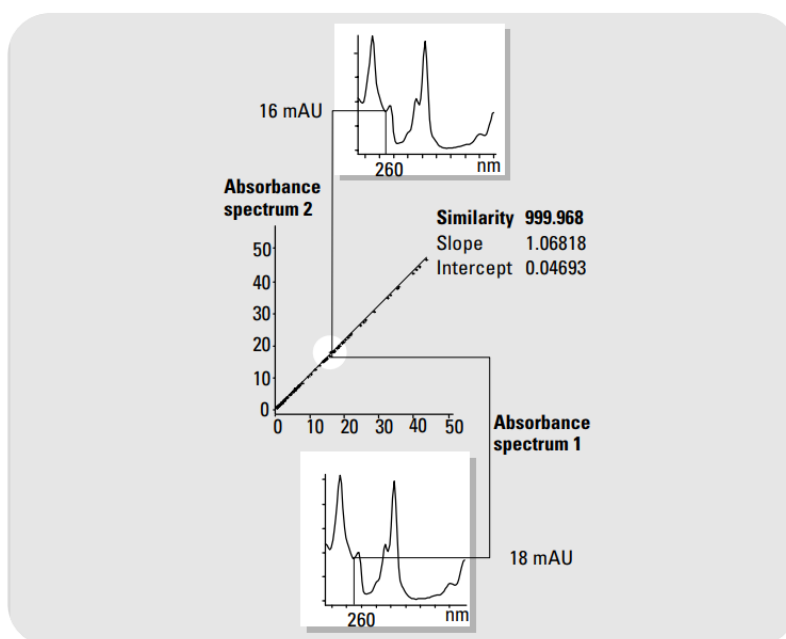
Como demonstrado anteriormente na **Figura 20**, os materiais de partida RI72 e 2-bromo-4'-metoxiacetofenona eluem em tempos de retenção diferentes de RI76, não interferindo, portanto na detecção e quantificação deste analito.

Adicionalmente, em **4.3.6 Estudo de degradação forçada**, demonstrou-se que os produtos de degradação de RI76 também são separados no método analítico desenvolvido, e que não são observados nos brancos, picos no mesmo tempo de retenção de RI76, o que demonstra a seletividade do método.

Para corroborar com a conclusão de que o método é seletivo para determinação de RI76, na presença de impurezas e produtos de degradação, avaliou-se também a homogeneidade espectral do pico deste composto no *software* de cromatografia ChemStation da Agilent.

Para o cálculo da homogeneidade espectral, o *software* obtém um número de espectros em diferentes pontos do pico, avalia a diferença de absorvância entre cada espectro em cada comprimento de onda pelo método dos mínimos quadrados ordinários e traça uma curva de correlação entre os espectros individuais (**Figura 46**, STAHL, 2018).

Figura 46 - Método de avaliação de pureza de pico em softwares da Agilent.

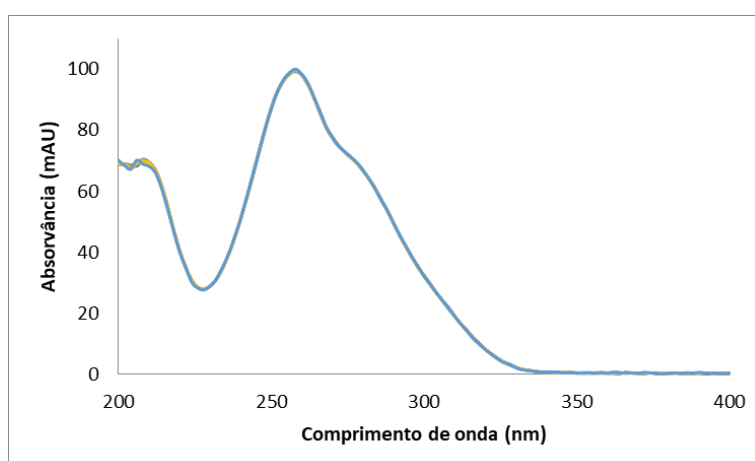


Fonte: STAHL, 2018.

Em todas as análises de RI76, foi obtido um coeficiente de determinação (r^2), acima de 0,950, indicando uma similaridade adequada, e muito possivelmente ausente de impurezas (STAHL, 2018).

Na **Figura 48** estão sobrepostos espectros obtidos para diferentes pontos do pico de RI76, corroborando, de maneira visual, a inferência de pureza do pico cromatográfico.

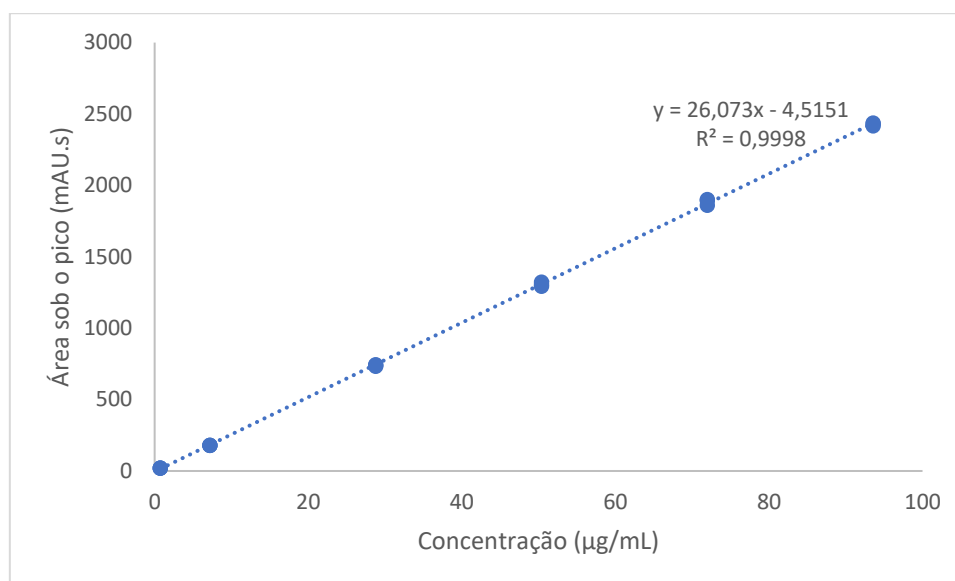
Figura 47 - Sobreposição de espectros de RI76 obtidos em diferentes porções do pico cromatográfico.



4.3.7.2 Linearidade

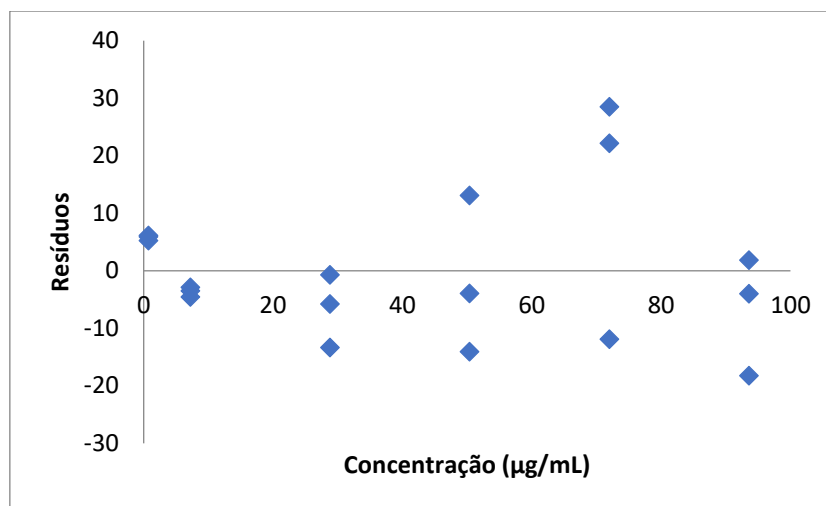
Avaliaram-se, no ensaio de linearidade, três curvas analíticas compostas por seis níveis de concentração na faixa de 1% a 130% da concentração de trabalho (0,7 µg/mL a 91 µg/mL). A curva analítica construída pelo MMQO no *software* Microsoft Excel 365 é ilustrada na **Figura 48**.

Figura 48 - Regressão linear obtida com o ensaio de linearidade para a faixa de concentração de 0,7 µg/mL a 91 µg/mL.



A análise estatística da regressão, realizada no *software* Action Stat, comprovou a ausência de *outliers* no estudo dos resíduos *studentizados*; a normalidade dos resíduos pelo teste de *Ryan-Joiner*, a independência dos resíduos pelo teste de *Durbin-Watson* e a homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de *Levene* modificado por *Brown-Forsythe*. Na **Figura 49** é reproduzido o gráfico de distribuição dos resíduos, evidenciando a homoscedasticidade.

Figura 49 - Gráfico de dispersão dos resíduos obtidos pelo MMQO na faixa linear trabalhada de 0,7 µg/mL a 91 µg/mL.



A análise da regressão por ANOVA resultou em uma modelo linear $y = 26,073x - 4,5151$ ($r^2 = 0,9998$) em que a regressão é significativa ($p < 0,05$) e sem desvio de linearidade ($p > 0,05$). O coeficiente angular foi estatisticamente diferente de zero ($p < 0,05$) e o intercepto estatisticamente igual a zero ($p > 0,05$).

Desta forma, os resultados obtidos com o ensaio de linearidade cumprem todos os requisitos da RDC 166/2017 da ANVISA e do guia Q2(R1) do ICH (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Os testes estatísticos realizados demonstram que o modelo linear obtido pelo MMQO é válido, e adequado para uso (SOUZA, 2007). Conclui-se então que o método é linear na faixa proposta.

4.3.7.3 Precisão

O ensaio de precisão foi conduzido pela análise de seis réplicas de uma amostra de RI76 na concentração de trabalho. O teor destas amostras foi determinado em comparação com uma amostra de RI76 que foi considerada de pureza adequada para ser utilizada como padrão de trabalho. Para os cálculos, foi considerada a pureza cromatográfica de 70% como o teor nominal deste padrão de trabalho.

Os resultados obtidos se encontram reproduzidos na **Tabela 19**. O ensaio de precisão intermediária foi conduzido por um segundo analista em um segundo dia de análises. Com o intuito de comparar se os resultados obtidos pelos dois analistas

são estatisticamente iguais, um teste-t de comparação de médias foi conduzido, após a realização de um teste-F que visava verificar a igualdade de variâncias.

Tabela 19 - Resultados obtidos com o ensaio de precisão.

Amostra Analisada	Teores obtidos no 1º dia de análise (%)	Teores obtidos no 2º dia de análise (%)
Amostra 1	63,39	62,03
Amostra 2	61,34	63,41
Amostra 3	62,28	62,39
Amostra 4	61,54	61,32
Amostra 5	62,53	62,53
Amostra 6	61,43	62,19
Média (n = 6)	62,08	62,31
DPR (n = 6) (%)	1,29	1,10
Média global (n = 12)		62,20
DPR global (n = 12) (%)		1,16

Uma vez que a RDC 166/2017 não estipula um limite máximo para o DPR, afirmando que o mesmo deve ser definido pelo analista e devidamente justificado (BRASIL, 2017), assim como o faz o ICH, por possuir caráter orientativo (ICH, 2005) buscou-se na literatura valores que pudessem ser utilizados como referência para a estimativa da precisão do método.

A AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) e o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) estabelecem um limite de 1,3% para amostras em que o teor esperado do analito na amostra seja em torno de 100% (AOAC, 1998; MAPA, 2011).

O limite estabelecido de 1,3% é derivado dos valores de DPR preditos por Horwitz *et al.* (1980) em um estudo interlaboratorial que avaliou milhares de resultados de vários produtos farmacêuticos e alimentícios, cujas concentrações dos analitos variavam desde componentes principais até resíduos na ordem de ppb (HEYDEN *et al.*, 2005; THOMPSON e WOOD, 2015).

Com os resultados, Horwitz propôs a equação abaixo para a definição de critérios de aceitação em estudos de reprodutibilidade, e estudos posteriores com o mesmo conjunto de dados demonstraram que os critérios para ensaios de repetibilidade devem ser 2/3 do valor obtido pela equação (HEYDEN *et al.*, 2005; THOMPSON, 2004):

$$DPR_R = 2^{(1-0,5 \log_{10} C)}$$

em que DPR_R é o DPR previsto para a reprodutibilidade, e C é a concentração do analito em frações unitárias. Modificações desta equação foram realizadas posteriormente por Horwitz e outros cientistas (HORWITZ e ALBERT, 2006; THOMPSON e WOOD, 2015), sendo a mais aceita atualmente a descrita a seguir (THOMPSON e WOOD, 2015; AOAC, 2016):

$$DPR_R = 2C^{0,15}$$

Os valores de DPR obtidos tanto na repetibilidade quanto na precisão intermediária foram menores que 1,3%, o que indica que o método é preciso segundo os parâmetros estabelecidos por Horwitz e implementados na literatura (AOAC, 1998; HEYDEN *et al.*, 2005; MAPA, 2011; THOMPSON, 2004).

O teste F de comparação de variâncias indicou que as variâncias obtidas pelos dois analistas foram equivalentes ($p > 0,05$), e o teste t de comparação de médias, presumindo variâncias equivalentes, indicou que não houve também diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p > 0,05$), e que os resultados obtidos em ambos os níveis de precisão são também equivalentes. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* demonstrou que os resultados obtidos seguem a distribuição normal ($p > 0,05$).

4.3.7.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pela avaliação da recuperação em análises a 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho. Avaliou-se também a recuperação

a 1% da concentração de trabalho para estudo do limite de quantificação. Na **Tabela 20** são demonstrados os resultados obtidos no ensaio de exatidão.

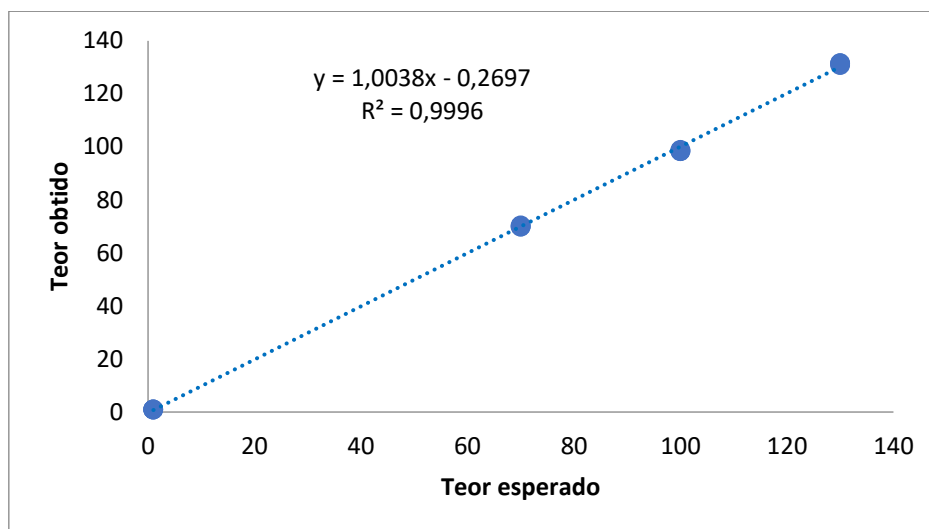
As recuperações médias obtidas para os níveis 70%, 100% e 130% encontram-se no intervalo de 98 a 102% preconizado pela AOAC e a recuperação no limite de quantificação encontra-se no intervalo de 97 a 103%, o que indica a exatidão do método em sua faixa de trabalho (AOAC, 1998).

Tabela 20 - Recuperações obtidas com o ensaio de exatidão.

Nível estudado	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação média
1%	0,68	0,70	(102,83 \pm 0,99)%
	0,66	0,68	
	0,75	0,77	
70%	51,80	52,10	(100,18 \pm 0,91)%
	47,88	47,81	
	50,96	51,02	
100%	68,32	67,27	(98,58 \pm 0,65)%
	66,08	65,34	
	75,32	74,11	
130%	92,4	94,28	(101,46 \pm 1,23)%
	94,36	95,51	
	92,12	93,16	

Para a avaliação da exatidão seguindo os critérios da USP, foi construída a curva reproduzida na **Figura 50**. O coeficiente angular da equação da reta é próximo a 1,0, indicando que os dados experimentais são próximos aos valores teóricos, o que permite inferir que o método é exato. O coeficiente linear, por sua vez, está contido em um intervalo de $\pm 1\%$ da concentração de trabalho, indicando ausência de erros sistemáticos (USP, 2018).

Figura 50 - Avaliação gráfica, em termos de teor obtido versus teor esperado, dos resultados obtidos com o ensaio de exatidão.



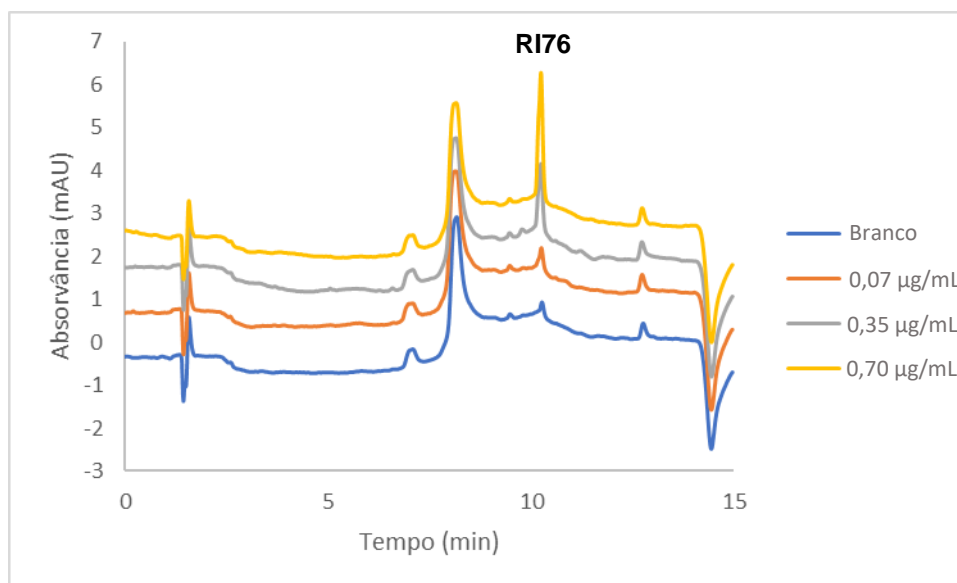
4.3.7.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação calculados com base nos termos da curva analítica construída foram, respectivamente, 0,01 µg/mL e 0,35 µg/mL.

De forma a determinar visualmente os limites de detecção e quantificação, injetaram-se amostras em concentrações reduzidas no cromatógrafo. Conforme estabelecido na RDC 166/2017 e no guia ICH Q2(R1), o limite de detecção corresponde a concentração na qual a relação sinal/ruído do analito é igual a 2, e para o limite de quantificação, igual a 10.

Na **Figura 51** são mostrados os cromatogramas obtidos para injeções nas concentrações de 0,7 µg/mL, menor concentração da curva analítica, 0,35 µg/mL e 0,07 µg/mL, além da injeção de uma solução branco constituída de acetonitrila.

Figura 51 - Cromatogramas obtidos com injeções de soluções diluídas de RI76 para determinação dos limites de detecção e de quantificação.



Observa-se que há a presença de um pico no branco, possivelmente relacionado a um efeito residual das injeções anteriores, o que compromete os limites de detecção e de quantificação. Ainda assim, pode-se estimar que o limite de detecção é próximo a 0,07 µg/mL, enquanto o limite de quantificação é próximo a 0,7 µg/mL, valores superiores aos estimados matematicamente.

Conforme preconizado pela RDC 166/2017, ensaios de precisão e exatidão foram conduzidos no limite de quantificação. No ensaio de exatidão, a recuperação obtida foi de $(102,83 \pm 0,99\%)$, o que indica que o método é exato. Para a precisão, os desvios obtidos foram menores que 2%, valor considerado aceitável seguindo os critérios de Horwitz (AOAC, 1998; HEYDEN *et al.*, 2005; THOMSON, 2004).

4.3.7.6 Robustez

A avaliação da robustez por meio de um planejamento fatorial fracionário permitiu a avaliação do método, em termos de resposta analítica, tempo de retenção, assimetria e resolução do par crítico, após variações controladas nas condições do método.

O uso de planejamentos experimentais para avaliação da robustez é bem descrito na literatura, e vantajoso por possibilitar a alteração de mais de uma variável em uma análise, e possibilitar a análise da interação entre diferentes fatores por meio de análise estatística multivariada (CHRISTIAN *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017; WATERS e DOVLETOGLOU, 2003). O *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulatório americano, preconiza o uso de planejamentos experimentais para a avaliação da robustez (FDA, 2015).

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por ANOVA, e os resultados estão dispostos na **Tabela 21**. Aqueles em que se observou impacto estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na resposta estudada foram realçados.

Tabela 21 - Significâncias, em p-valor, do impacto causado pelas variáveis nas respectivas respostas estudadas no ensaio de robustez.

Variável estudada	Efeito na resposta estudada (p-valor)			
	Teor obtido de RI76	Simetria do pico	Tempo de retenção	Resolução do par crítico
Fluxo de fase móvel	0,5746	< 0,0001	< 0,0001	0,4281
Temperatura do forno	0,8632	< 0,0001	0,1908	0,6906
Comprimento de onda	0,3125	0,4893	0,5534	0,8280
Lote da coluna	0,7996	0,0002	0,1834	0,2805
% HCOOH no eluente	0,8681	0,1306	0,4958	0,6292

Os resultados obtidos demonstram, como esperado pelo princípio da cromatografia, que a variação do fluxo de fase móvel influencia significativamente no tempo de retenção dos analitos (MEYER, 2010; SNYDER *et al.*, 1997).

A influência significativa do fluxo de fase móvel, temperatura do forno de coluna e lote de coluna na simetria dos picos podem estar relacionada a uma alteração na eficiência da retenção. Percebe-se, no entanto, que mesmo nas condições em que houve mudança significativa neste parâmetro, a assimetria manteve-se entre 0,8 e 1,5, estando, portanto, adequada (MEYER, 2010; USP, 2018). As variáveis estudadas não tiveram impacto significativo na resposta de teor calculada com o método, ou na resolução entre o par crítico, desta forma, pode-se concluir que não é

necessário um controle rigoroso destas variáveis durante a aplicação do método em análises rotineiras.

5 CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO QUANTITATIVO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA RI76

5.1 Materiais

5.1.1 Amostras e reagentes

- Amostras de RI76 foram sintetizadas conforme procedimento descrito em **4.2.1 Síntese e caracterização de RI76**;
- 2-bromo-4'-metoxiacetofenona, intermediário de síntese, 97% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote: STBD4623V;
- Tiossemicarbazida, material de partida de síntese, 99% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote: WXBC0057V;
- 3-hexanona, material de partida de síntese, 98% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote: BCBJ8237V.
- Ácido fumárico, substância de referência, 100% de pureza, foi obtido em U.S. Pharmacopeia (Rockville, MA), lote: H0E328.
- Acetanilida, padrão de trabalho, 99% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St.Louis, MO).
- Teofilina, padrão de trabalho, 99% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St.Louis, MO), lote: 120M0211V.
- Dimetilsulfóxido- d_6 , 99,9% de deutério, + 0,05% (v/v) de TMS, em ampolas, foi obtido em Cambridge Isotope Laboratories, lote: PR-28497/02177DM1.

5.1.2 Equipamentos

- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker AVANCE DPX400, operando em 400 MHz, com *software* de aquisição e processamento de dados TOPSPIN 3.5.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg, modelo BP211D.

5.2 Métodos

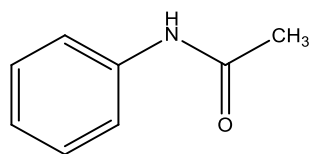
5.2.1 Seleção da substância de referência

A primeira etapa necessária para o desenvolvimento de um método quantitativo por RMN é a seleção da substância de referência que será adicionada às amostras de RI76. A substância escolhida deve ser inerte, não ser higroscópica ou volátil e apresentar um sinal simples em uma região do espectro que não interfira ou sobreponha com sinais do RI76. Os sinais da substância de referência devem também apresentar um tempo de relaxação (T1) na mesma ordem de magnitude que aqueles da amostra analisada (BHARTI e ROY, 2012; HOLZGRABE, 2010; RUNDLÖF *et al.*, 2010; SINGH e ROY, 2016; SOININEN, 2008).

Rundlöf *et al.* (2010) avaliaram o potencial de 25 substâncias para sua utilização como substâncias de referências em RMN quantitativo (qRMN), dentre as quais nove demonstraram comportamento químico adequado. Fornecedores de referência como a Sigma Aldrich (SIGMA, 2018) e a Cambridge Isotope Laboratories (CAMBRIDGE, 2018) dispõem de listas de substâncias químicas recomendadas para utilização como padrão de referência para qRMN.

Verificou-se a disponibilidade destas substâncias no LCQ-UFMG e no CEDAFAR e as substâncias disponíveis foram avaliadas em duas etapas. Inicialmente, por meio de espectros disponíveis na literatura e em bancos de dados on-line verificou-se se seria esperada a sobreposição de sinais. Caso sobreposições ou interferências não fossem esperadas, foram conduzidos experimentos para visualizar o espectro da mistura e a resolução entre os sinais de interesse.

A acetanilida (**Figura 52**) foi selecionada como padrão interno neste trabalho por atender aos critérios dispostos acima.

Figura 52 - Estrutura química da acetanilida.

5.2.2 Determinação dos tempos de relaxação (T1)

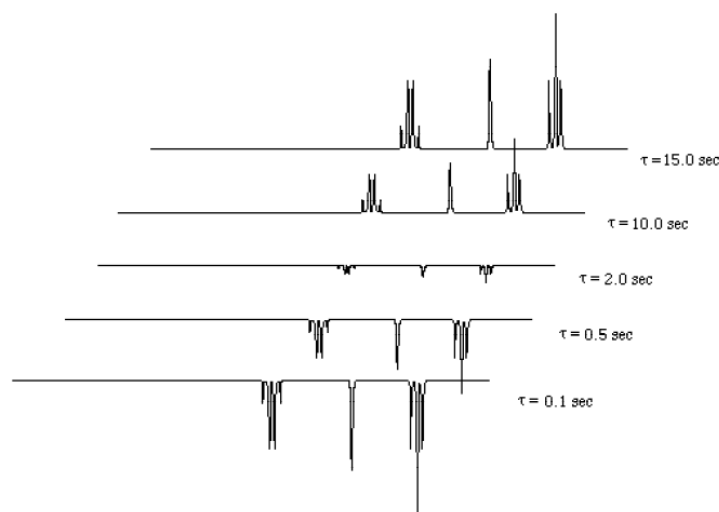
Com o objetivo de otimizar o tempo necessário para a obtenção de cada espectro, foi conduzida uma sequência de inversão-recuperação de pulso para determinar o tempo de relaxação dos núcleos responsáveis pelos sinais utilizados na quantificação (CLARIDGE, 2016; HOLZGRABE, 2010).

O tempo de relaxação (T1) pode ser calculado pela equação a seguir, na qual M_z é a magnetização no eixo-z após um tempo de repetição t , e M_0 é a relaxação completa (BHARTI e ROY, 2012; FRIEBOLIN, 1993; HOLZGRABE, 2010).

$$M_z = M_0 - (1 - e^{-t/T1})$$

Neste experimento, a magnetização é invertida por um pulso de 180° e uma sequência de tempos de repetição seguidos de pulsos de 90° são utilizados para a obtenção de espectros. Com o pulso de 180° , o spin de todos os núcleos é invertido, fazendo com que espectros adquiridos nesta condição apresentem picos negativos. A medida que a relaxação acontece, ocorre um equilíbrio na magnetização e os sinais tornam-se, novamente, positivos, conforme exemplificado na **Figura 53** (ASDL, 2018; FRIEBOLIN, 1993).

Figura 53 - Aparência dos espectros de ^1H -RMN após intervalos de tempo em um experimento de inversão-recuperação.



Fonte: ASDL, 2018.

Desta forma, é possível construir uma curva de *delay* de relaxação *versus* intensidade do sinal, que está relacionada à magnetização, para calcular o tempo de relaxação (ASDL, 2018). Reorganizando matematicamente a equação de magnetização apresentada anteriormente, obtêm-se T1 no tempo no qual os picos deixam de ser negativos e passam a ser positivos conforme a equação a seguir (FRIEBOLIN, 1993).

$$T1 = \frac{t}{\ln 2}$$

5.2.3 Escolha dos sinais para quantificação

A escolha do sinal mais adequado para a quantificação foi realizada por meio da avaliação de potenciais interferentes em cada região espectral e da simplicidade do sinal. Foi dada preferência para a utilização de sinais mais simples como simpletos e dupletos para a quantificação por sua maior intensidade, o que garante maior relação sinal/ruído e pela facilidade na integração.

5.2.4 Otimização das condições experimentais

Em experimentos de qRMN, as condições de aquisição e processamento dos dados devem ser bem estabelecidas de modo a garantir que todos os núcleos estejam sujeitos ao mesmo ambiente eletromagnético e que ocorra magnetização completa dos núcleos estudados (HOLZGRABE, 2010).

Na **Tabela 22** são descritas condições experimentais recomendadas por diversos autores para a aquisição de espectros adequados à quantificação e as condições selecionadas no presente trabalho. Análises foram realizadas buscando obter um espectro com linha de base adequada para quantificação, e relação sinal/ruído adequada, com base nas condições recomendadas e as condições definidas para o experimento.

Tabela 22 - Condições de aquisição recomendadas para experimentos quantitativos e as condições selecionadas.

Parâmetro	Código Bruker	Malz; Jancke (2005)	Holzgrabe (2010)	Bharti; Roy (2012)	ACS (2018)	Condições selecionadas
Ângulo de pulso	<i>zg</i>	30°	90°	<90°	90°	30°
Pré-aquisição	<i>de</i>	5 µs	5 µs			auto
Tempo de aquisição	<i>aq</i>	3,41 s	3,41 s		4 s	4,09 s
Tempo de repetição	<i>d1</i>	(7/3)x o maior T1	5x o maior T1	5x o maior T1	60 s	15 s
Janela espectral	<i>sw</i>	16 ppm	16 ppm		30 ppm	20 ppm
Pontos de dados do FID	<i>td</i>	32k	32k	64k	64k	64k
Número de scans	<i>ns</i>	mínimo para s/n > 150	mínimo para s/n > 250	mínimo para s/n > 250	64	16
Pontos de dados de frequência	<i>si</i>	64k	64k	128k	256k	128k
<i>Dummy scans</i>	<i>ds</i>				4	4
Alisamento	<i>lb</i>	0,3 Hz	0,3 Hz	0,3 Hz	0,3 Hz	0,3 Hz

T1 = tempo de relaxação longitudinal; s/n = relação sinal ruído

5.2.5 Validação do método

Visto a maior aplicabilidade de técnicas cromatográficas na rotina industrial, a RDC 166/2017 e o guia ICH Q2(R1) foram desenvolvidos de forma mais direcionada à validação em métodos cromatográficos (ANVISA, 2017; ICH, 2005). Desta forma, os experimentos conduzidos nesta validação foram baseados nos parâmetros destas referências, assim como em outros textos da literatura (MALZ e JANCKE, 2005; YANG *et al.*, 2015).

5.2.5.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método, verificou-se a ausência de sinais sobrepostos aos sinais de interesse por meio de técnicas de RMN bidimensionais ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HSQC. A ausência de manchas de correlação, além das esperadas, indica que o sinal de interesse se deve a um único tipo de núcleo.

5.2.5.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade do método, avaliou-se a resposta analítica obtida em cinco níveis de razões molares entre a acetanilida referência e RI76, conforme descrito na **Tabela 23**. O preparo das amostras foi feito, em triplicata, transferindo-se as massas abaixo listadas em tubos de RMN de 5 mm e adicionando-se 600 μL de DMSO- d_6 para dissolução.

Considerou-se como concentração de trabalho (100%), as condições de preparo ideais na qual são pesados 12 mg de RI76 e 5 mg de acetanilida.

Tabela 23 - Planejamento do estudo de linearidade para validação do método de qRMN.

Nível de concentração	Massa de RI76 (mg)	Massa de acetanilida (mg)	Razão molar ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$)
40%	4,8	5	0,43
60%	7,2	5	0,64
80%	9,6	5	0,86
100%	12	5	1,07
120%	14,4	5	1,28

Foram construídas três curvas analíticas com os resultados obtidos, e considerou-se o método linear sob as condições de coeficiente de correlação acima de 0,990, resíduos aleatoriamente dispersos e homoscedásticos e coeficiente angular significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017).

A avaliação estatística foi realizada conforme descrito em **4.2.8.2 Linearidade**.

5.2.5.3 Precisão

Para avaliação da precisão, foram preparadas, de forma independente, amostras em triplicata a 40, 100 e 120% da concentração de trabalho, isto é, 4,8, 12 e 14,4 mg, respectivamente, de RI76 e 5 mg de acetanilida em 600 μL de DMSO- d_6 . As amostras foram analisadas e os resultados expressos em termos de média e DPR. Os critérios de aceitação foram baseados no descrito em **4.2.8.3 Precisão**.

5.2.5.4 Exatidão

Para avaliação da exatidão do método, foram preparadas amostras de três lotes de síntese distintos de RI76, em triplicata, para análise pelo método de qRMN e pelo método de CLAE-DAD, já considerado validado. Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados, e caso os teores obtidos sejam equivalentes, pode-se considerar que o método de qRMN cumpre o requisito de exatidão (BRASIL, 2017).

5.2.5.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados baseados nos parâmetros da curva analítica construída.

A equação que descreve o cálculo do limite de detecção é descrita a seguir (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

em que:

LOD = limite de detecção;

σ = desvio padrão da resposta;

S = inclinação da curva analítica.

Por sua vez, a equação que descreve o cálculo do limite de quantificação é descrita a seguir (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

em que:

LOQ = limite de quantificação;

σ = desvio padrão da resposta;

S = inclinação da curva analítica.

5.2.5.6 Robustez

Para o ensaio de robustez, um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman de 11 variáveis foi utilizado para avaliar de forma multivariada o impacto no método causado por alterações no ângulo de pulso (θ), na deconvolução (dec), no número de pontos de dados do FID (td), no tempo de repetição ($d1$), no número de *scans* (ns), no *zero-filling* (si) no alisamento (lb), na região de integração (int), na calibração do pulso (cal), e no número de *dummy scans* (ds). Como apenas dez variáveis foram analisadas, a restante foi considerada uma variável inerte (DV). O

planejamento de Plackett-Burman permite a avaliação das variações de onze fatores em doze experimentos (NIST, 2018; PLACKETT e BURMAN, 1946).

Os experimentos conduzidos neste planejamento estão descritos na **Tabela 24**.

Tabela 24 - Planejamento fatorial Plackett-Burman para avaliação da robustez do método.

Exp.	θ	<i>dec</i>	<i>Td</i>	<i>d1 (s)</i>	<i>ns</i>	<i>si</i>	<i>Lb (Hz)</i>	<i>Int (w_{1/2})</i>	<i>cal</i>	<i>ds</i>
1	30°	N	64k	15	16	2xTD	0,3	20	S	4
2	30°	N	64k	15	8	1xTD	1	20	N	2
3	30°	N	32k	10	8	2XTD	1	10	S	2
4	30°	S	64k	10	16	2xTD	0,3	10	N	2
5	30°	S	32k	15	8	1xTD	0,3	10	S	4
6	30°	S	32k	10	16	1xTD	1	20	N	4
7	90°	N	64k	10	8	1xTD	0,3	10	N	4
8	90°	N	32k	15	16	2xTD	1	10	N	4
9	90°	N	32k	10	16	1xTD	0,3	20	S	2
10	90°	S	64k	15	16	1xTD	1	10	S	2
11	90°	S	64k	10	8	2xTD	1	20	S	4
12	90°	S	32k	15	8	2xTD	0,3	20	N	2

O impacto dos fatores acima descritos no doseamento de RI76 foram avaliados estatisticamente nos *softwares* Microsoft Excel e Design-Expert. O método é considerado robusto se não houver diferenças estatisticamente significativas na resposta de RI76 frente a estas alterações (BRASIL, 2017; FERREIRA *et al.*, 2017).

A avaliação estatística é dada pela avaliação do gráfico de Daniel e pelo método de Lenth. O gráfico de Daniel é construído com os valores de contrastes obtidos para cada variável em comparação aos quantis da distribuição normal. Presume-se que efeitos insignificantes sigam a distribuição normal, e, portanto, se ajustem a uma reta construída no gráfico. Efeitos significantes se deslocam da reta e são passíveis de identificação (DANIEL, 1959; OLGUÍN e FEARN, 1997).

O método de Lenth consiste na determinação dos contrastes de cada efeito (c), seguido da determinação de um pseudo-erro (PSE), segundo as equações a seguir (LAWSON *et al.*, 1998; PORTAL ACTION, 2018):

$$c = \bar{y}_+ - \bar{y}_-$$

$$s_0 = 1,5 \times \text{mediana} \{|c_j|\} \quad j = 1, \dots, m$$

$$PSE = 1,5 \times \text{mediana} \{|c_j| : |c_j| \leq 2,5 s_0\} \quad j = 1, \dots, m$$

O PSE é utilizado para a construção de uma margem de erro para os efeitos (ME), segundo a equação a seguir (LAWSON *et al.*, 1998; PORTAL ACTION, 2018):

$$ME = t_{\{1-\frac{\alpha}{2}; df\}} \times PSE$$

É descrito, no entanto, que para um grande número de fatores, é esperado que um ou dois fatores excedam ME, levando a uma falsa conclusão. Para estes casos, é criada uma margem de erro simultânea (SME) pela equação a seguir (LAWSON *et al.*, 1998; PORTAL ACTION, 2018):

$$SME = t_{\left(1+\frac{0,95m}{2}; df\right)} \times PSE$$

As conclusões do método de Lenth, portanto, são que fatores que excedam ME podem ser ativos no modelo, requerendo análise crítica, e fatores que excedam SME definitivamente são ativos (LAWSON *et al.*, 1998; PORTAL ACTION, 2018).

5.2.6 Comparação com a abordagem de calibração externa ERETIC 2

O ERETIC (*Electronic Reference to access In-Vivo Concentration*) consiste na produção de um sinal virtual de ^1H -RMN utilizado para a calibração externa de amostras em experimentos quantitativos. O sinal é gerado por um dispositivo eletrônico que emite radiofrequência gerando um pseudo-FID, cujas características são controladas pelo operador (AKOKA *et al.*, 1999).

O ERETIC 2, por sua vez, é baseado na ferramenta PULCON (*Pulse length based concentration determination*), que mede a concentração de amostras partindo do princípio que a duração do pulso de 90° é inversamente proporcional a intensidade dos sinais. Utilizando-se pulsos bem calibrados, e conhecendo a concentração de

uma amostra precisamente, é possível realizar uma calibração externa por meio da fórmula abaixo, na qual C é a concentração, I é a intensidade dos sinais, T é a temperatura, θ é a duração do pulso e n é o número de transientes. K é um fator de correção que leva em consideração condições experimentais que podem ter sido alteradas, como ganho do receptor (BRUKER, 2018; WIDER e DREIER, 2006):

$$C_x = kC_{std} \frac{I_x T_x \theta_x n_{std}}{I_{std} T_{std} \theta_{std} n_x}$$

De forma a validar a aplicabilidade da ferramenta ERETIC 2 para a quantificação de RI76, todos os resultados obtidos durante a validação do método foram processados tanto pela calibração interna, quanto por ERETIC 2, quando possível.

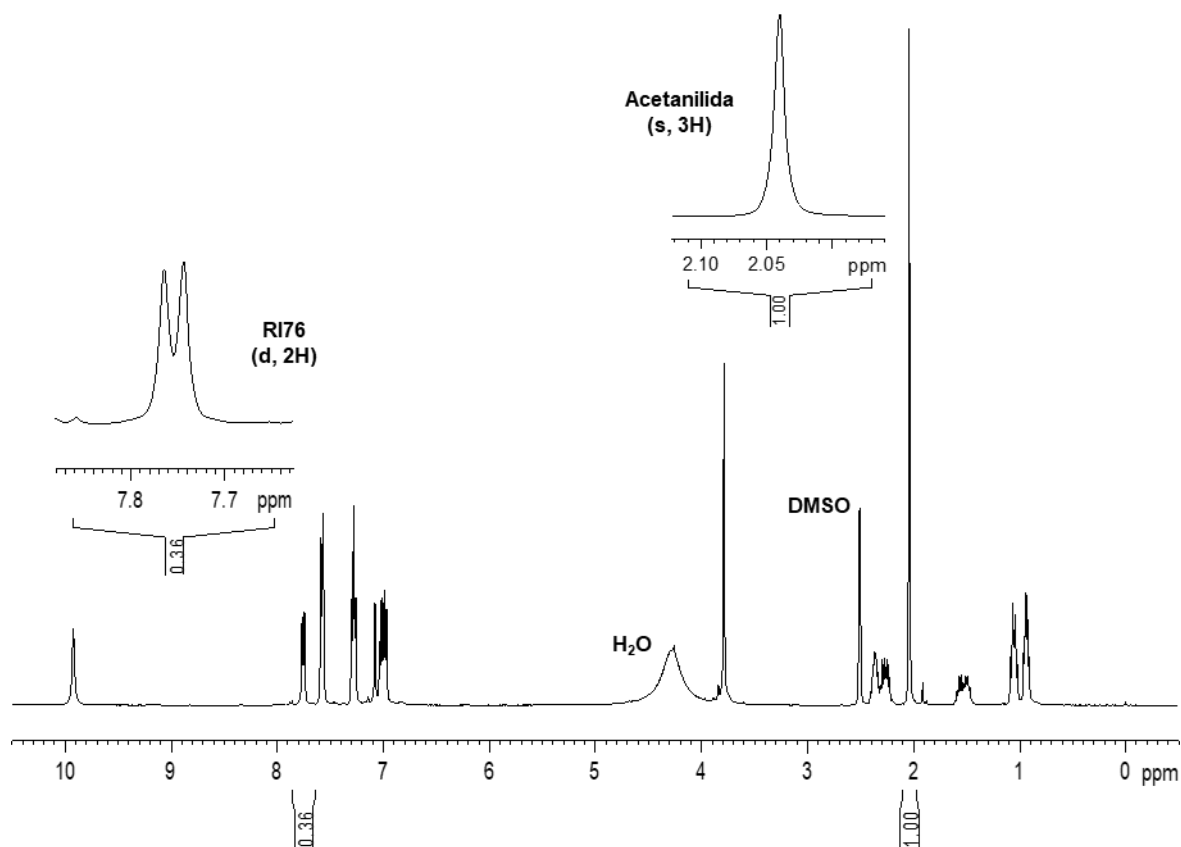
5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Seleção da substância de referência

Dentre as substâncias descritas na literatura e em páginas de fornecedores como bons padrões de referência, apenas a acetanilida era prontamente disponível no LCQ-UFMG. Como o sinal referente ao grupo metila na acetanilida encontra-se em 2,0 ppm, avaliou-se o espectro da acetanilida com RI76 em DMSO- d_6 , evitando o risco de sobreposição pelo sinal da água residual do $CDCl_3$, que pode estar presente em 2,0 ppm, interferir com a quantificação.

Na **Figura 54** é reproduzido o espectro de RMN 1H a 400 MHz obtido com uma mistura de RI76 e acetanilida em DMSO- d_6 . Uma análise minuciosa revela não haver sobreposições evidentes de outros sinais com o sinal do hidrogênio do grupo metila da acetanilida (2,03 ppm), com o sinal do hidrogênio do grupo metoxila de RI76 (3,78 ppm), ou com o duplete referente aos hidrogênios aromáticos de RI76 (7,75 ppm).

Figura 54 - Espectro de RMN 1H obtido para uma mistura de RI76 e Acetanilida em DMSO-d₆ a 400 MHz.



Desta forma, o desenvolvimento do método foi continuado com a seleção dos sinais mais adequados para serem utilizados na quantificação e a determinação das melhores condições de aquisição do espectro.

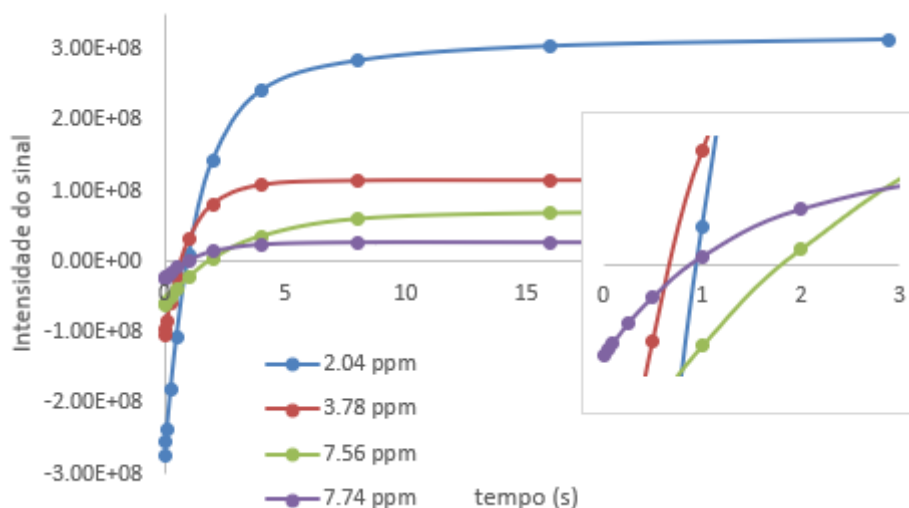
5.3.2 Determinação dos tempos de relaxação (T₁)

O tempo de relaxação dos sinais de RI76 e da acetanilida utilizada como referência foram obtidos experimentalmente por uma sequência de inversão-recuperação. Após o pulso de 180°, foram realizados pulsos de 90° nos tempos de 0,001, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 e 30 segundos. Com estes dados, foram construídos gráficos de intensidade do sinal versus tempo para o pulso, a partir dos quais foram calculados os tempos de relaxação.

Os gráficos para os sinais possíveis de serem utilizados na quantificação, em 2,04 ppm (s, 3H) da acetanilida, e em 3,78 ppm (s, 3H) e 7,75 ppm (d, 2H) de RI76 estão

reproduzidos na **Figura 55** junto ao sinal de tempo de relaxação mais lento, o tripleto da acetanilida em 7,56 ppm.

Figura 55 - Curvas de intensidade do sinal versus tempo após o pulso de 180° obtidos na sequência de inversão recuperação para os sinais de interesse. À direita, ampliação da região em que as curvas cruzam o eixo x.



Os tempos de relaxação calculados foram de 1,449 s para o sinal dos hidrogênios da metila da acetanilida, 0,939 s para o sinal dos hidrogênios da metoxila de RI76 e 1,747 s para o duplete do hidrogênio aromático de RI76. O tempo de relaxação mais longo obtido no espectro foi 2,906 s, referente a um tripleto da acetanilida na região aromática em 7,6 ppm.

Com estes resultados obtidos, determinou-se um tempo de 15 s para *d1* como satisfatório, garantindo assim um mínimo de 99,3% da recuperação da magnetização para todos os núcleos no espectro (BHARTI e ROY, 2012; CLARIDGE, 2016; HOLZGRABE, 2010).

5.3.3 Escolha dos sinais para quantificação

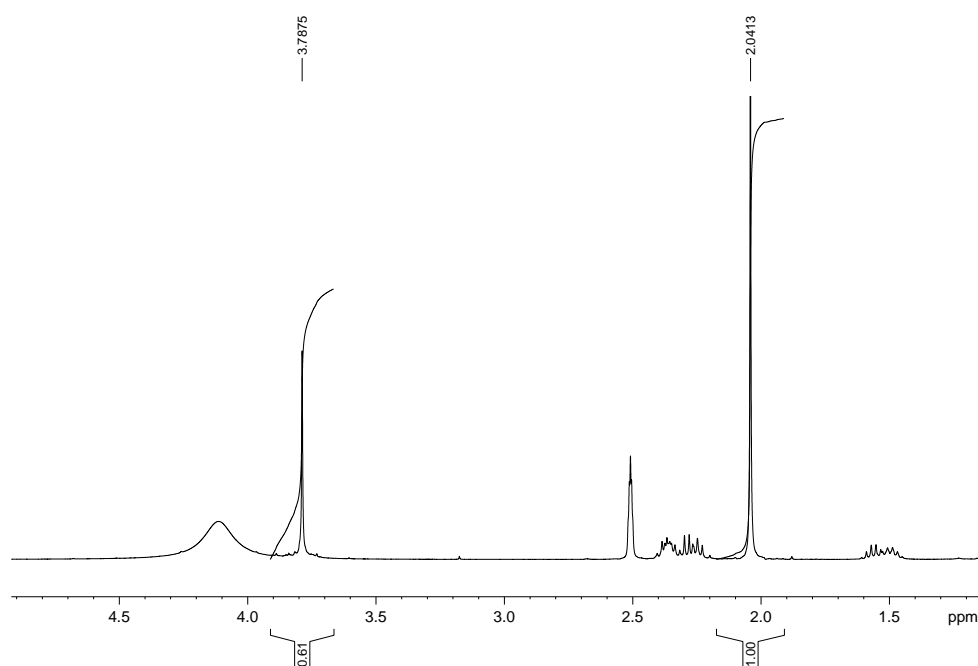
De forma a avaliar o melhor sinal de RI76 para ser utilizado na quantificação, procedeu-se com uma análise quantitativa considerando os sinais de RI76 em 3,78 ppm (s, 3H) e em 7,75 ppm (d, 2H).

Os resultados de pureza obtidos para RI76 foram de 91%, quando calculando sobre o sinal em 3,78 ppm, e de 71% utilizando o sinal em 7,75 ppm. Diante da discrepância entre os resultados obtidos, avaliou-se a pureza de RI76 frente a outra substância cujos sinais não se sobrepussem aos de RI76, no caso, a teofilina, mesmo que sem relatos de sua utilização como substância de referência para qNMR.

A pureza da teofilina frente a acetanilida foi avaliada utilizando as mesmas condições espectroscópicas definidas anteriormente, e obteve-se um resultado de 88,9%. Considerando-se este valor como referência, calculou-se a pureza de RI76 frente a teofilina e o resultado obtido foi de aproximadamente 70% para todos os sinais avaliados.

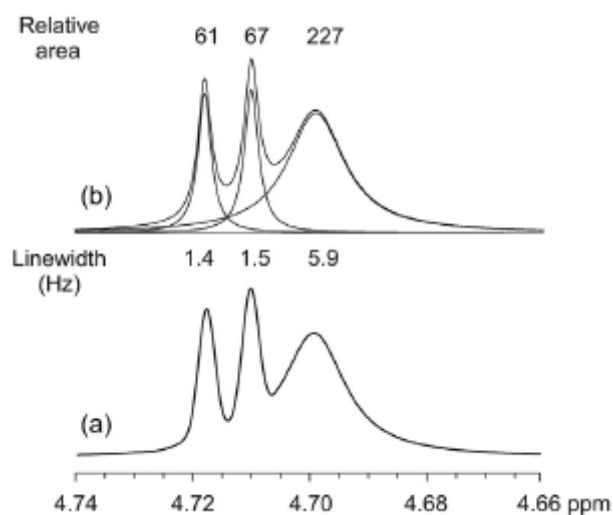
Buscando uma explicação para o valor discrepante observado na comparação entre RI76 e acetanilida, realizou-se uma análise de deconvolução dos sinais do espectro de forma a verificar se o sinal da água residual do DMSO-*d*₆, em 4,1 ppm, poderia estar prejudicando a quantificação do sinal em 3,78 ppm (**Figura 56**).

Figura 56 - Ampliação do espectro de RMN 1H obtido para uma mistura de RI76 e acetanilida na faixa de 1 a 5 ppm, para visualização da possível interferência do sinal de HOD residual em 4,1 ppm no sinal em 3,78 ppm.



A deconvolução consiste em determinar a contribuição de área individual de diferentes sinais dentro de uma sobreposição parcial, possibilitando a integração de cada sinal ali presente e sua quantificação (BHARTI e ROY, 2012; HOLZGRABE, 2010). A abordagem para a deconvolução é matemática e leva em consideração uma série de fatores como a frequência, intensidade e formato esperado do sinal para extrair a contribuição individual, conforme exemplificado na **Figura 57** (BARDING *et al.*, 2012; CLARIDGE, 2016; SOININEN, 2008).

Figura 57 - Exemplo ilustrativo de uma deconvolução espectral. (a) espectro apresentando sobreposição de sinais; (b) espectro deconvoluído.



Fonte: CLARIDGE, 2016.

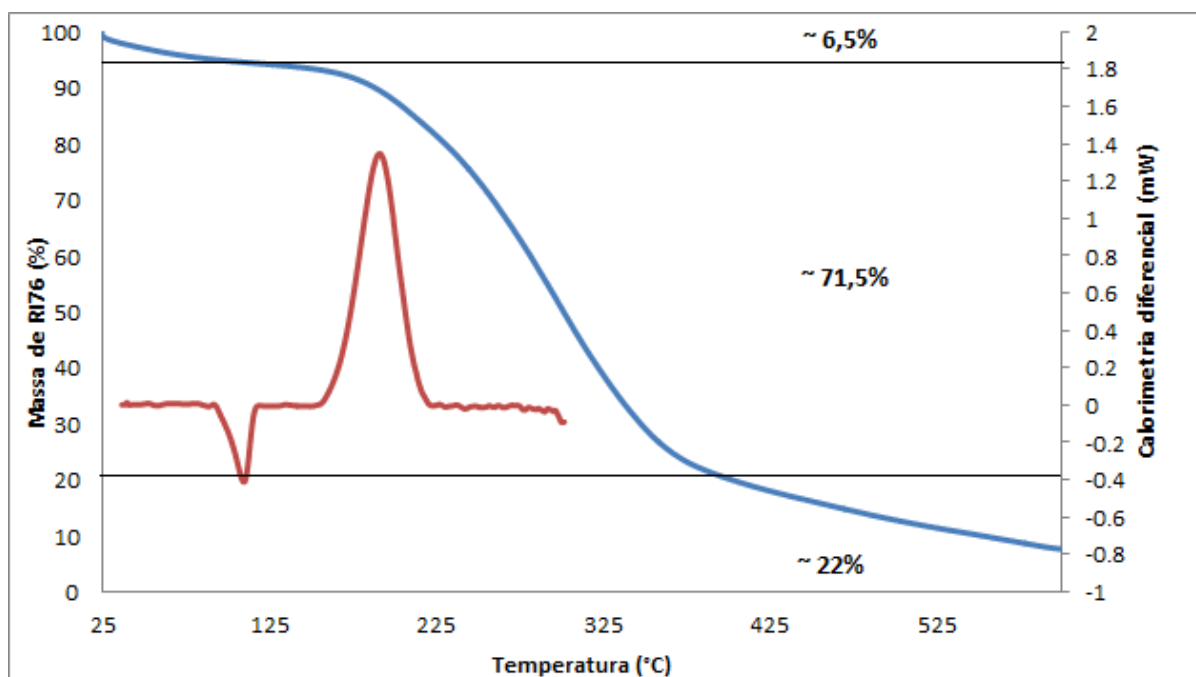
A avaliação quantitativa dos sinais obtidos para os espectros deconvoluídos resultou em uma pureza média de aproximadamente 70% para ambos os sinais espectrais utilizados de RI76 (3,78 e 7,75 ppm), frente aos sinais de ambas referências testadas, acetanilida e teofilina.

De forma a confirmar a veracidade do resultado obtido com estas análises, uma alíquota da mesma amostra de RI76 foi analisada por termogravimetria, na qual se obteve uma perda de massa de 6,2% em baixas temperaturas, o que pode estar relacionada a solventes residuais e água adsorvida, um resíduo de 22,3% em altas temperaturas, relacionado a impurezas inorgânicas e outros compostos orgânicos de alta temperatura de decomposição e/ou ebulição, e uma decomposição entre 120

e 380 °C de 71,5% (**Figura 58**). Esta última perda está associada à decomposição de RI76, conforme evidenciado pelo pico exotérmico em 119 °C visualizado na calorimetria de varredura diferencial (DSC). O evento endotérmico em 109 °C está associado a fusão de RI76.

A perda de massa inicial foi reproduzida em um ensaio de perda por dessecação, segundo os procedimentos descritos pela FB 6 (BRASIL, 2019). Observou-se neste experimento uma perda de massa de aproximadamente 8%, o que indica uma grande presença de compostos voláteis na amostra, impactando em sua pureza.

Figura 58 - Resultados obtidos com a análise termogravimétrica de RI76 (azul) e com a calorimetria de varredura diferencial (vermelho).



Os resultados obtidos com a análise termogravimétrica corroboram os obtidos por qRMN, permitindo concluir que o duplete em 7,75 ppm é adequado para análise quantitativa de RI76 em DMSO-*d*₆. A análise quantitativa de RI76 utilizando-se o sinal em 3,78 ppm pode ser, no entanto, realizada mediante deconvolução.

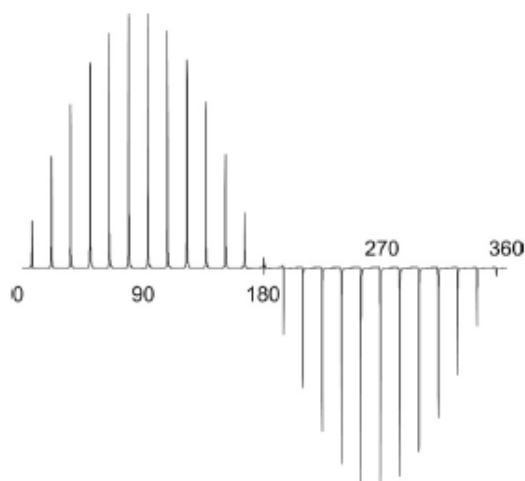
5.3.4 Otimização das condições experimentais

Os experimentos de FT-RMN são dependentes do pulso de radiofrequência incidido na amostra cuja duração, também conhecida como largura do pulso, deve ser finamente calibrada para que a intensidade de todos os sinais no espectro seja homogênea (CLARIDGE, 2016).

A calibração do pulso consiste em verificar qual a duração de um pulso, em μs , para uma potência, em dBW, gera uma magnetização de 90° na qual os picos apresentam intensidade máxima (CLARIDGE, 2016).

Experimentalmente, é montada uma sequência de pulsos com duração progressivamente incrementada a fim de obter um padrão como demonstrado na **Figura 59**. A calibração do pulso de 90° é feita com base na avaliação de um dos pontos de intensidade nula que correspondem a 180° e 360° . A duração do pulso de 90° é um quarto da duração do pulso de 360° ou metade da duração de um pulso de 180° (CLARIDGE, 2016).

Figura 59 - Padrão de intensidade dos sinais de RMN para pulsos de diferentes ângulos de magnetização.



Fonte: CLARIDGE, 2016

Para experimentos quantitativos a calibração é verificada periodicamente antes da execução dos experimentos.

O tempo de aquisição, aq , é otimizado automaticamente segundo a equação abaixo que correlaciona o número de pontos de dados obtidos no FID, td , e o tamanho da janela espectral analisada, sw (ASDL, 2018; CLARIDGE, 2016; SOININEN, 2008).

$$aq = \frac{td}{2sw}$$

Obtêm-se com esta equação que o tempo ideal de aquisição para um td de 64k e uma sw de 20 ppm é de 4,09 segundos. Tempos menores são insuficientes para aquisição de todo o sinal emitido, e tempos superiores só gerarão ruído ao FID uma vez que o decaimento da magnetização já foi completado (CLARIDGE, 2016; SOININEN, 2008).

A janela espectral de 16 ppm foi definida para garantir ao menos 2 ppm de espaço vazio em cada direção do espectro. Desta forma, impede-se que os filtros de frequência impactem na intensidade dos sinais (PAULI *et al.*, 2007; SOININEN, 2008). O número de pontos de dados de 64k foi selecionado por meio da equação abaixo que calcula a resolução digital, dr , do espectro, sendo que resoluções menores que 0,2 Hz são desejadas (CLARIDGE, 2016; PAULI *et al.*, 2007).

$$dr = \frac{2sw}{td}$$

A utilização de 64k (64 x 1024) pontos de dados gera uma resolução digital de aproximadamente 0,1 Hz.

A próxima etapa da otimização consistiu na determinação da quantidade de amostra ideal e do número de transientes, ns , que gerassem um sinal com relação sinal/ruído adequada para quantificação, ou seja, superior a 250:1 para obtenção de erros inferiores a 1% (BHARTI e ROY, 2012; HOLZGRABE, 2010; SOININEN, 2008).

Devido à alta intensidade do sinal da acetanilida, optou-se por utilizar uma massa deste material de 5 mg, considerada mínima para pesagem adequada, e uma

massa de RI76 de 12 mg para obtenção de uma relação sinal/ruído suficientemente superior a 250:1.

A utilização de *dummy scans* se faz necessária para equilibrar as condições do experimento antes da aquisição dos dados do FID, desta forma, aumentando a reprodutibilidade dos espectros (PAULI *et al.*, 2007), seguindo as recomendações da literatura, foram utilizados 4 *dummy scans* (ACS, 2018; PAULI *et al.*, 2007).

A transformação dos dados do FID em um espectro de RMN pela transformada de Fourier faz com que metade dos pontos obtidos sejam perdidos. Uma forma de melhorar a resolução espectral é a adição de valores nulos no FID para que não haja perda de dados durante a transformada em um processo conhecido como *zero-filling* (CLARIDGE, 2016).

Na prática, o número de dados de frequência, *si*, é a metade do número de pontos de dados adquiridos, *td*. Utilizando-se um valor de *si* igual a *td* implica no processamento de dados adicionar um número de zeros, por *zero-filling*, igual ao número de pontos obtidos (CLARIDGE, 2016). Recomenda-se para espectros com finalidade quantitativa um *si* de uma a duas vezes o valor de *td* (BHARTI e ROY, 2012; HOLZGRABE, 2010; MALZ e JANCKE, 2005). Um *zero-filling* de 2 x *td* foi utilizado nas aquisições.

Assim como o *zero-filling*, outra estratégia capaz de melhorar a resolução espectral e a relação sinal/ruído é o alisamento do espectro que consiste em multiplicar o FID por uma função exponencial negativa. Os valores recomendados são entre 0,3 e 1 Hz, sendo o valor mais usual o de 0,3 Hz, utilizado no presente método (BHARTI e ROY, 2012; COSTA, 2014; SOININEN, 2008).

Após a aplicação da transformada de Fourier, a fase e a linha de base do espectro devem ser corrigidas, e a integração deve ser, além de reprodutível, suficientemente ampla para armazenar o máximo possível da área do sinal. Muitos autores recomendam uma integração cuja extensão seja entre 20 e 76 vezes a largura à

meia altura do sinal (BHARTI e ROY, 2012; COSTA, 2014; HOLZGRABE, 2010; SOININEN, 2008).

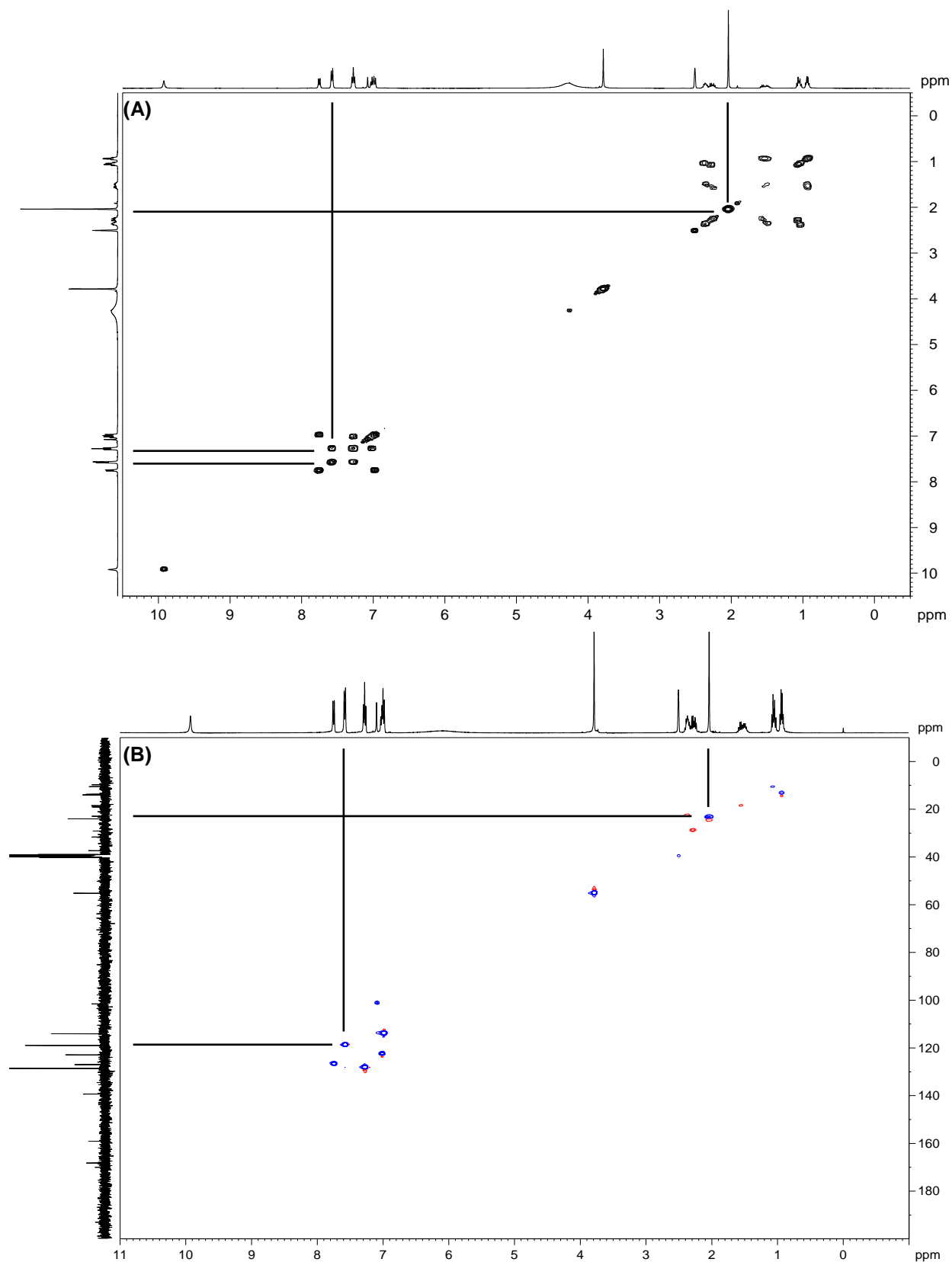
5.3.5 Validação do método

5.3.5.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método, buscou-se verificar se os sinais utilizados na quantificação são devido a um único núcleo ou se existem interferentes nos mesmos deslocamentos químicos dos sinais estudados.

Na **Figura 60** são reproduzidos os mapas de contornos COSY ^1H - ^1H e HSQC ^1H - ^{13}C obtidos para uma mistura de RI76 e acetanilida em DMSO- d_6 . Observa-se a ausência de manchas de correlação além das esperadas para as estruturas das substâncias estudadas.

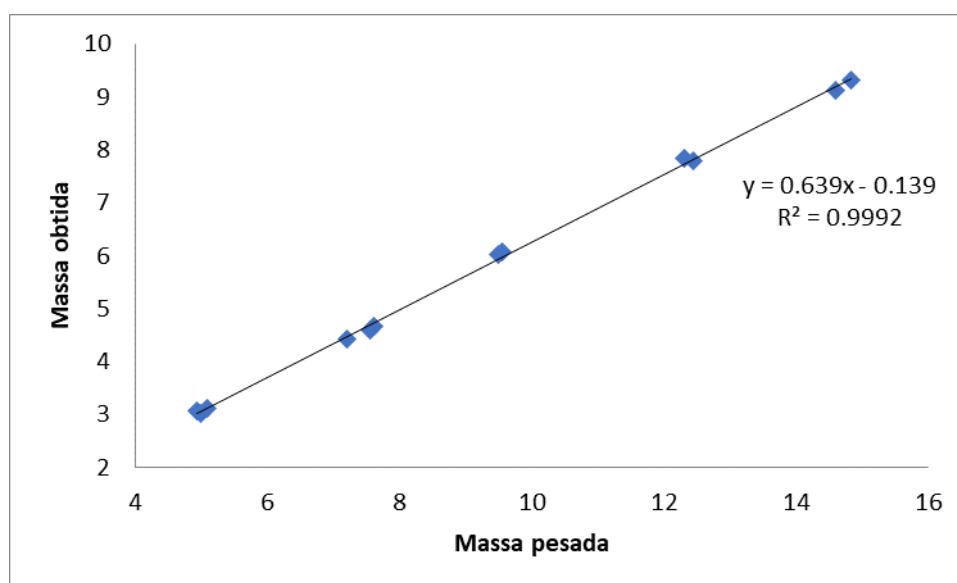
Figura 60 - Mapas de contornos COSY ^1H - ^1H (A) e HSQC ^1H - ^{13}C (B) obtidos em 400 MHz para uma mistura de RI76 e acetanilida evidenciando a seletividade dos sinais.



5.3.5.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada em uma faixa de 40 a 120% das massas nominais pesadas (12 mg de RI76 e 5 mg de acetanilida). Foi construído um diagrama de dispersão, reproduzido na **Figura 61**, correlacionando a massa pesada de RI76 e a massa recuperada de RI76 no método de qRMN. Uma reta foi ajustada pelo MMQO e as premissas e a significância do modelo foram avaliadas.

Figura 61 - Curva de calibração construída para a determinação do teor de RI76 por qRMN com calibração por referência interna.



A análise estatística foi realizada nos *softwares* Microsoft Excel e Action Stat. Foram identificados 3 *outliers* pelo método de *Jackknife*, e estes foram removidos. Posteriormente, comprovou-se a normalidade dos resíduos pelo teste de *Ryan-Joiner*; a independência dos resíduos pelo teste de *Durbin-Watson* e a homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de *Levene* modificado por *Breusch-Pagan*. Não foi possível conduzir o teste de *Brown-Forsythe* para homoscedasticidade devido à ausência de réplicas.

A significância do modelo foi avaliada por ANOVA, pelo qual não foi observado desvio de linearidade ($p > 0,05$) e obteve-se que a regressão é significativa ($p < 0,05$). Estes testes demonstram que o modelo linear obtido pelo MMQO é válido e adequado para uso, permitindo assim atestar a linearidade do método (SOUZA, 2007).

5.3.5.3 Precisão

A precisão do método de qRMN foi avaliada apenas no nível de repetitividade. Os DPR obtidos foram de 1,01% para o nível de 40%, 2,70% para o nível de 100% e 2,35% para o nível de 120%. Ao considerarmos a pureza obtida para RI76 nos quinze pontos preparados para a curva analítica, obtemos um DPR de 1,91%.

Os valores de DPR obtidos, apesar de superiores aos obtidos por CLAE-DAD e aos indicados por referências utilizadas em validação de métodos (AOAC, 1998; HEYDEN *et al.*, 2005; MAPA, 2011), encontram-se próximos aos obtidos em outros estudos de validação de qRMN para análise de fármacos (COSTA, 2014; SANTOS, 2014; SUN *et al.*, 2017).

Desta forma, podemos considerar os resultados obtidos precisos, havendo ainda a possibilidade de melhoria dos desvios pela análise de maior número de réplicas e pela padronização dos tubos de qRMN (BURTON *et al.*, 2005; WIDER e DREIER, 2006).

5.3.5.4 Exatidão

Na **Tabela 25** estão apresentados os resultados obtidos para os três lotes por qRMN e por CLAE-DAD. Observa-se uma concordância entre os dados, o que permite inferir a exatidão do método para a quantificação de amostras sintetizadas de RI76 (BRASIL, 2017).

Tabela 25 - Teores de RI76 obtidos por qRMN e por CLAE-DAD para avaliação da exatidão

Lote	Teor obtido por qRMN (n = 3)	Teor obtido por CLAE-DAD (n =3)
A	69,27%	69,71%
B	63,78%	62,87%
C	61,74%	61,28%

5.3.5.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados de maneira informativa, uma vez que a limitação para a aplicabilidade da técnica de qRMN em insumos farmacêuticos é a precisão da balança analítica para pesagens de pouca massa.

O método, no entanto, seria capaz de detectar concentrações de até 40 µg/mL de RI76, e quantificar concentrações a 126 µg/mL. Apesar da sensibilidade do método de qRMN ser significativamente menor do que aquela obtida por CLAE, estratégias podem ser utilizadas visando aumentar a sensibilidade desta técnica, como o aumento do número de transientes (ns) ou o aumento da concentração amostral.

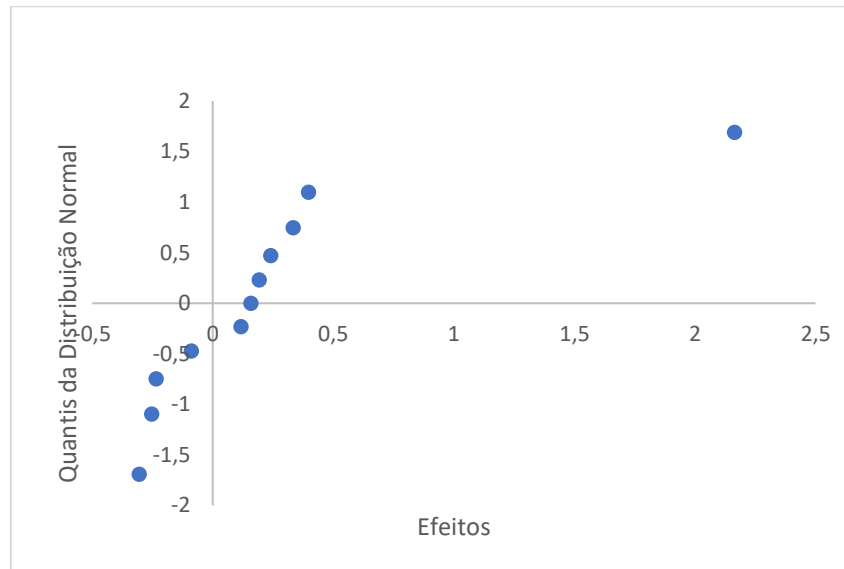
Os limites, no entanto, atendem ao propósito do método de determinar a pureza absoluta de amostras sintetizadas de RI76.

5.3.5.6 Robustez

A avaliação da robustez do método pelo planejamento de Plackett-Burman conduzida pela interpretação do gráfico de Daniel e pelos resultados obtidos com o método de Lenth permitiu a interpretação de que apenas a região de integração impacta significativamente nos resultados obtidos pelo procedimento de qRMN.

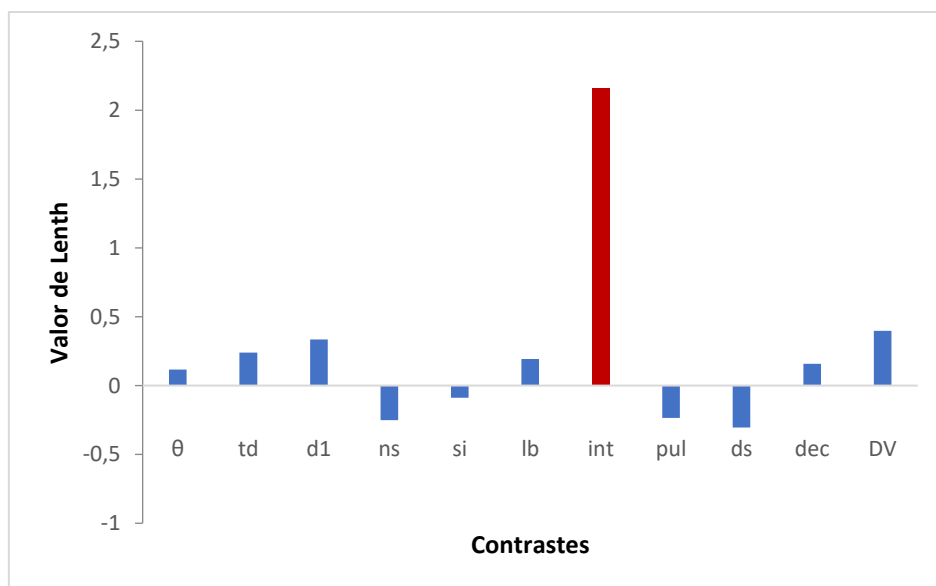
No gráfico de Daniel (**Figura 62**), apenas o ponto referente ao efeito provocado pela região de integração se distancia dos demais pontos que se concentram ordenadamente próximos à origem, indicando significância deste efeito.

Figura 62 - Gráfico normal (Gráfico de Daniel) correlacionando os efeitos ordenados aos quantis da distribuição normal.



O método de Lenth corrobora estas informações, uma vez que o efeito provocado pela mudança na região de integração é o único efeito que ultrapassa a margem de erro calculada (**Figura 63**). Tais resultados permitem concluir que a redução da região de integração ao redor do sinal pode impactar no resultado da quantificação.

Figura 63 - Resultados obtidos com a análise de efeitos significativos pelo método de Lenth. Efeitos realçados em vermelho são significativos.



Demonstrou-se com os resultados da robustez que, apesar de alguns autores recomendarem o uso de um pulso de 90° para a aquisição dos espectros (ACS, 2018; HOLZGRABE, 2010; SANTANA, 2017), o uso de um pulso de 30° não impacta significativamente nos resultados. Assim, é possível utilizar pulsos mais curtos quando não há limitação de sensibilidade do método, uma vez que tal alteração promove a diminuição da relação sinal/ruído (CLARIDGE, 2016; PAULI *et al.*, 2006).

Observou-se ainda que a variação de parâmetros como *td* e *si* dentro da faixa estudada não provocaram alterações nos resultados. Desta forma, podemos considerar adequadas as propostas de utilização de 32k (BHARTI e ROY, 2012; MALZ e JANCKE, 2005) e 64k (ACS, 2018; HOLZGRABE, 2010) pontos de dados, assim como a utilização de um *zero-filling* (CLARIDGE, 2016; COSTA, 2014) ou dois (ACS, 2018; BHARTI e ROY, 2012).

O número de transientes (*ns*), quando reduzido de 16 para 8 vezes, não promoveu redução da relação sinal/ruído para valores inferiores aos recomendados de 150:1, e como esperado, não foi significativa para os resultados. O número de *dummy scans* (*ds*), ao ser reduzido de 4 para 2, também não impactou significativamente no método, indicando que ainda é possível reduzir o tempo necessário para os experimentos utilizando menor *ds*.

Variações no tempo de repetição (*d1*) na faixa estudada também se mostraram não significativas para a obtenção dos resultados. Verificou-se que não é necessário contemplar apenas no *d1* o tempo equivalente aos cinco tempos de relaxação. A adoção de um $d1 + aq = 5T1$ mostra-se igualmente capaz de quantificar o analito com precisão e exatidão.

O processamento com alisamentos (*lb*) de 0,3 Hz e 1 Hz também não provocou alterações nos resultados obtidos, influenciando apenas na relação sinal/ruído, corroborando o descrito na literatura (BHARTI e ROY, 2012; HOLZGRABE, 2010). A calibração precisa do pulso mostrou-se pouco significativa nos experimentos de quantificação utilizando referência interna. A adoção de pulsos intencionalmente e

levemente descalibrados não influenciou nos resultados obtidos por esta técnica, ao contrário do descrito na literatura (ACS, 2018; BHARTI e ROY, 2012).

O estudo do impacto da deconvolução corroborou as observações prévias. A utilização da técnica não modificou os resultados obtidos por sinais que não possuem interferentes na vizinhança, além de permitir a quantificação em sinais que sejam afetados por interferentes em deslocamentos químicos próximos.

A integração, por sua vez, foi a única variável estudada que alterou de forma significativa os resultados. Diversos autores discutem que a região de integração deve ser bem definida e reproduzida em cada sinal (BHARTI e ROY, 2012; COSTA, 2014; HOLZGRABE, 2010; SOININEN, 2008). Observou-se, no entanto, que a adoção de uma mesma região de integração para os dois sinais utilizados na quantificação, quando muito reduzida, pode inserir um erro no resultado.

Acredita-se que a integração muito estreita de um sinal com multiplicidade, ou seja, o duplete utilizado, apresente um erro mais significativo que a mesma integração em um sinal menos alargado e de maior intensidade como o simpleto. Este erro é minimizado adotando-se regiões de integração mais alargadas, conforme descrito por Griffiths e Irving (1998).

5.3.6 Comparação com a abordagem de calibração externa ERETIC 2

Para a calibração do ERETIC 2, pesou-se 10,92 mg de ácido fumárico, padrão de referência da USP com 100% de pureza, em um frasco de penicilina, e adicionou-se 600 μ L de DMSO- d_6 para solubilização. A concentração final da solução, nas unidades utilizadas para cálculo pelo *software* TopSpin foi de 156,80 mmol/L.

A amostra de ácido fumárico foi analisada seguindo-se o mesmo procedimento adotado para as amostras de RI76, e o sinal dos hidrogênios olefínicos foi utilizado para calibração.

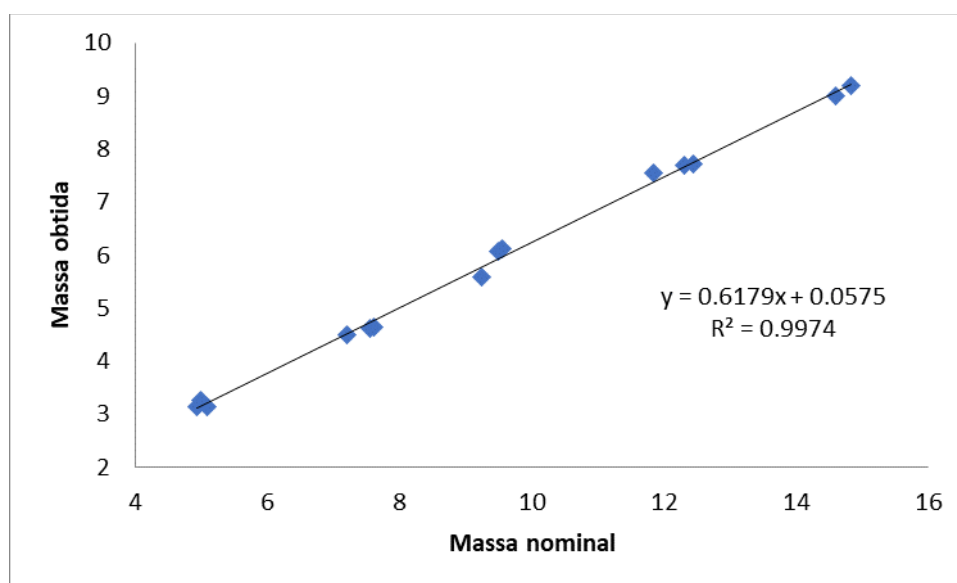
Para avaliação da exatidão e precisão deste procedimento de quantificação, os sinais em $\delta = 2,04$ ppm da acetanilida em todas as amostras preparadas para a validação foram analisados. Obteve-se uma pureza calculada média de 99,23% para a acetanilida, valor muito próximo ao rotulado de 99%. O DPR obtido foi 3,14% ($n = 14$), superior aos desvios obtidos com a calibração por referência interna.

Uma vez demonstrado que a calibração por ERETIC 2 havia sido adequada, foram avaliadas a curva analítica, a precisão, a exatidão e o limite e quantificação desta técnica para quantificação de RI76.

A análise das amostras preparadas para a robustez não pôde ser conduzida por ERETIC 2, uma vez que as modificações nos parâmetros de aquisição e processamento dos dados inviabilizam a aplicação do cálculo de PULCON utilizado na calibração.

A curva analítica ajustada pelo MMQO (**Figura 64**) apresentou um *outlier*, removido pelo teste de Jackknife. A normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos foi comprovada estatisticamente pelos testes de *Ryan-Joiner*, *Breusch-Pagan* e *Durbin-Watson*, respectivamente.

Figura 64 - Curva de calibração construída para a determinação do teor de RI76 por qRMN com calibração por ERETIC 2.



O limite de quantificação, determinados matematicamente pela equação da reta, para a quantificação por ERETIC 2, foi 330 µg/mL. A diferença entre este limite e o obtido pela calibração por referência interna pode estar associada a maior variância observada no ERETIC 2, que leva a perda de sensibilidade do método.

Os DPR obtidos no ensaio de precisão, com a calibração por ERETIC 2 foram 2,72% para o nível de 40%, 3,24% para o nível de 100% e 2,78% para o nível de 120%. Ao considerarmos os quinze pontos preparados para a curva analítica, obtemos um DPR de 2,53%.

Analisando-se estatisticamente os dados obtidos, tem-se pelo teste-F que as variâncias obtidas pelo método de referência interna e de ERETIC 2 não diferem entre si ($p > 0,05$). Desta forma, pode-se concluir que a precisão em ambas técnicas de calibração é equivalente. Os resultados de pureza obtidos por ambas técnicas também não diferem entre si estatisticamente quando avaliadas por teste-t pareado ($p > 0,05$).

Na avaliação da exatidão, observou-se variação não significativa dos teores de RI76 nas amostras dos três lotes estudados, conforme reproduzido na **Tabela 26**.

Tabela 26 - Teores de RI76 obtidos por qRMN utilizando-se a calibração por referência interna e por ERETIC 2

Lote	Teor obtido por ref. Interna (n = 3)	Teor obtido por ERETIC 2 (n =3)
A	69,27%	68,54%
B	63,78%	62,77%
C	61,74%	62,26%

A equivalência entre os resultados obtidos por ERETIC 2 e pela calibração interna demonstra que para esta análise, a calibração eletrônica apresenta-se mais vantajosa por ser de preparo mais simples, não requerendo a adição de um padrão a cada amostra, evitando por consequência, riscos de contaminação e interações químicas e físico-químicas que podem alterar a concentração do analito de interesse.

A leitura do padrão em uma análise diferente também se apresenta vantajosa em analitos que possuem espectro complexo, para os quais é difícil encontrar uma região espectral limpa em sinais e um padrão interno cujo sinal encontre-se nessa região para a correta medição da concentração. Por outro lado, em análises de matrizes mais complexas que exigem um maior preparo de amostra, o uso da calibração por padrão interno torna-se preferível por minimizar a variação entre amostras.

6 CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE-EM/EM PARA O ESTUDO FARMACOCINÉTICO DE RI76 E PD76 EM MODELO ANIMAL

6.1 Materiais

6.1.1 Amostras e reagentes

- Amostras de RI76 foram sintetizadas conforme procedimento descrito em **4.2.2 Síntese e caracterização de RI76**;
- Amostras de PD76 foram sintetizadas conforme procedimento descrito em **4.2.7 Caracterização dos produtos de degradação**
- 2-bromo-4'-metoxiacetofenona, intermediário de síntese, 97% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote: STBD4623V;
- Tiossemicarbazida, material de partida de síntese, 99% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote: WXBC0057V;
- 3-hexanona, material de partida de síntese, 98% de pureza, foi obtido em Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote: BCBJ8237V.
- Clotrimazol, mebendazol, miconazol, cetoconazol, fluconazol, nevirapina, fenitoína, trimetoprima, cimetidina, nortriptilina, bupivacaína, meclizina substâncias de referências, de alto grau de pureza, foram obtidos em U.S. Pharmacopeia (Rockville, MA).
- Reagentes grau analítico: acetato de etila, éter metil tert-butílico, diclorometano, acetato de amônio, sulfato de amônio, ácido acético, hidróxido de amônio, ácido fórmico.
- Reagentes grau cromatográfico: acetonitrila e metanol.

6.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido Agilent 1200, equipado com amostrador automático, forno de coluna e bomba binária de solventes.
- Espectrômetro de Massas AB Sciex QTRAP 5500 equipado com fonte de íons TurbolonSpray V.

- Coluna cromatográfica ZORBAX Eclipse XDB (Agilent), C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm), lote B17260.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg, modelo BP211D.
- Concentrador de amostras TecVap TE-0194.
- Sistema de purificação de água Millipore Direct Q3.

6.2 Métodos

6.2.1 Otimização das transições de MRM

A primeira etapa no desenvolvimento do método por CLAE-EM/EM consistiu na determinação das transições de MRM de maior intensidade e na otimização dos parâmetros de potencial de desagregamento (*Declustering Potential*, DP), energia de colisão (*Collision Energy*, CE) e potencial na saída da célula de colisão (*Collision Cell Exit Potential*, CXP).

Para a otimização, preparam-se soluções contendo RI76, PD76 e os padrões internos testados a 50 ng/mL em acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (50:50). As soluções foram infundidas no espectrômetro de massas em fluxo contínuo de 10 µL/min. A otimização foi conduzida de forma automatizada pelo *software* Analyst. O modo positivo de ionização foi selecionado uma vez que os compostos analisados possuem caráter básico, sendo passíveis de protonação.

As substâncias selecionadas como potenciais padrões internos foram submetidas ao mesmo procedimento para determinação de suas transições em MRM.

6.2.2 Otimização cromatográfica

Para o método bioanalítico, a cromatografia foi otimizada com o objetivo de alcançar um tempo de corrida reduzido, retenção adequada e formato adequado dos picos. Buscou-se também condições que garantissem alta intensidade dos sinais, possibilitando a quantificação em baixas concentrações, e um fluxo de fase móvel reduzido, o que diminui a contaminação da fonte de íons.

As condições otimizadas consistiram na utilização de uma coluna ZORBAX Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel constituída de tampão acetato de amônio 5 mM com 0,5% de ácido fórmico (pH 2,5) e acetonitrila em eluição isocrática (10:90) sob fluxo de 0,6 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL e as amostras no injetor foram mantidas refrigeradas a 4 °C.

6.2.3 Otimização da fonte de íons

Com as condições cromatográficas determinadas, procedeu-se com a otimização da fonte de íons *TurboSpray* do espectrômetro de massas. O procedimento visa maximizar a geração de íons na fonte por meio da otimização do gás de dessolvatação (*Curtain Gas*, CUR), gás de colisão (*Collision Gas*, CAD), voltagem do spray de íons (*IonSpray Voltage*, IS), temperatura (TEM), gás nebulizante (*Ion Source Gas 1*, GS1) e gás secante (*Ion Source Gas 1*, GS1) (JUNIOR *et al.*, 2006).

A otimização automática da fonte de íons pelo *software* Analyst consiste na injeção de PD76, composto que apresenta menor intensidade do sinal, na concentração de 10 ng/mL, utilizando-se o método cromatográfico otimizado, sem a utilização da coluna cromatográfica.

6.2.4 Otimização do preparo de amostras

O desenvolvimento do procedimento de preparo de amostras objetivou a obtenção de um método que proporcionasse alta recuperação e baixo efeito matriz. As técnicas de precipitação de proteínas e extração líquido-líquido foram utilizadas por serem abordagens de baixo custo e prática execução.

6.2.4.1 Preparo de amostras por precipitação de proteínas

A otimização da técnica de preparo de amostras por precipitação de proteínas foi iniciada com a condução de um estudo multivariado do tipo fatorial 2³ com ponto central. As variáveis estudadas foram o tipo de agente precipitante (metanol ou

acetonitrila), o uso de hidróxido de amônio para alcalinizar o plasma e a proporção entre plasma e agente precipitante, conforme descrito na **Tabela 27**.

Tabela 27 – Variáveis estudadas no planejamento fatorial 2³ para otimização do procedimento de precipitação de proteínas.

Variável	Nível baixo (-1)	Ponto central (0)	Nível alto (+1)
Agente precipitante	Metanol	-	Acetonitrila
Proporção agente prec.:plasma	3:1	3,5:1	4:1
Concentração de NH ₄ OH	0%	5%	10%

A precipitação de proteínas foi conduzida adicionando-se em um microtubo, 100 µL de plasma branco, 50 µL de uma solução contendo os analitos PD76 e RI76 e o padrão interno (250 ng/mL), e o volume adequado do agente extrator utilizado, conforme o planejamento. O microtubo foi então agitado em vórtex por 30 s e centrifugado a 15000 rpm (21128 g) por 5 minutos. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi então transferida para *vial* contendo *insert* e injetada no cromatógrafo.

Posteriormente, avaliou-se também a eficiência de extração de uma mistura de acetonitrila e metanol (1:1) e do uso de ácido fórmico como agente acidificante do plasma.

6.2.4.2 Preparo de amostras por extração líquido-líquido

Para a avaliação da eficiência da extração líquido-líquido na extração dos compostos do plasma, adicionou-se 100 µL de plasma branco, 50 µL de uma solução contendo os analitos PD76 e RI76 (100 ng/mL), 50 µL de uma solução contendo o padrão interno (50 ng/mL), e 1 mL de solvente orgânico. O microtubo foi então agitado em vórtex por 30 s e centrifugado a 15000 rpm (21128 g) por 5 minutos.

Retirou-se uma alíquota de 800 µL da fase orgânica, e evaporou-se o solvente em concentrador de amostras. O conteúdo do microtubo foi então reconstituído com 80 µL de acetonitrila, transferido para *vial* contendo *insert* e injetado no cromatógrafo.

A escolha do solvente orgânico ideal para a extração foi conduzida por meio de um planejamento de misturas, na qual se avaliou a eficiência de extração por acetato de etila, éter metil tert-butilico (MTBE) e diclorometano em proporções definidas na **Tabela 28**.

Tabela 28 – Volumes, em mL, de diclorometano, MTBE e acetato de etila utilizados nas misturas de solventes testadas na extração líquido-líquido

Análise	Diclorometano	MTBE	Acetato de Etila
1	1	1	4
2	0	4	2
3	0	2	4
4	4	0	2
5	0	0	6
6	1	4	1
7	4	1	1
8	2	0	4
9	2	2	2
10	0	6	0
11	0	0	6
12	6	0	0
13	4	2	0
14	2	4	0
15	0	6	0
16	6	0	0
17	2	2	2

Após a seleção do solvente ideal, avaliou-se o efeito da técnica de *salting out* utilizando solução saturada de sulfato de amônio e alcalinização do plasma com hidróxido de amônio 5% como facilitadores da extração.

6.2.5 Estudo piloto de farmacocinética

A avaliação da farmacocinética de RI76 e PD76 em modelo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o número de protocolo 45/2019 (**APÊNDICE C**).

O estudo piloto foi conduzido em camundongos *Swiss*, fêmeas, pesando entre 27 e 31 g, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, em sala com temperatura controlada, com ração e água disponíveis.

Os animais foram então separados em dois grupos (n = 12) para administração dos compostos. Nos animais do primeiro grupo foi administrado RI76 (100 mg/kg) *per os* (8 mL/kg), enquanto os animais do segundo grupo receberam PD76 (100 mg/kg) *per os* (8 mL/kg). Ambos os compostos foram administrados sob a forma de suspensão preparada com solução salina contendo 0,5% (p/v) de carboximetilcelulose.

Após intervalos de tempo de 15, 30, 60 e 120 minutos (n = 3 por intervalo) coletou-se o sangue dos animais por decapitação em microtubos contendo 10 µL de heparina (5000 UI/mL). O funil utilizado para coleta do sangue era lavado após cada coleta com solução salina contendo 1% de heparina (5000 UI/mL).

O sangue coletado foi submetido a centrifugação por 20 minutos a 5000 rpm (7042 g) e 4 °C para separação do plasma. O plasma foi transferido para microtubos identificados e congelados em *freezer* a -50 °C.

No momento da análise, as amostras foram descongeladas e submetidas ao preparo de amostra, no qual transferiu-se 100 µL do plasma para microtubo, adicionaram-se 50 µL da solução de padrão interno (250 ng/mL), 350 µL de acetonitrila e agitou-se em vórtex por 30 s. Os microtubos foram então centrifugados por 5 minutos a 15000 rpm a 4 °C e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para *vial*.

Para determinação das concentrações plasmáticas, uma curva de calibração matrizada foi analisada, em duplicata, na faixa de 5 ng/mL a 200 ng/mL.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Otimização das transições de MRM

As transições de MRM de maior intensidade para RI76 e PD76 estão descritas na **Tabela 29**, assim como os parâmetros do analisador de massas otimizados para as fragmentações. As transições ótimas para as substâncias estudadas como padrões internos encontram-se também descritas.

Para cada composto, duas transições foram selecionadas para utilização no método, sendo a de maior intensidade para quantificação dos produtos, e a de segunda maior intensidade para confirmação.

Tabela 29 – Transições de MRM otimizadas para os compostos RI76, PD76 e para os padrões internos testados.

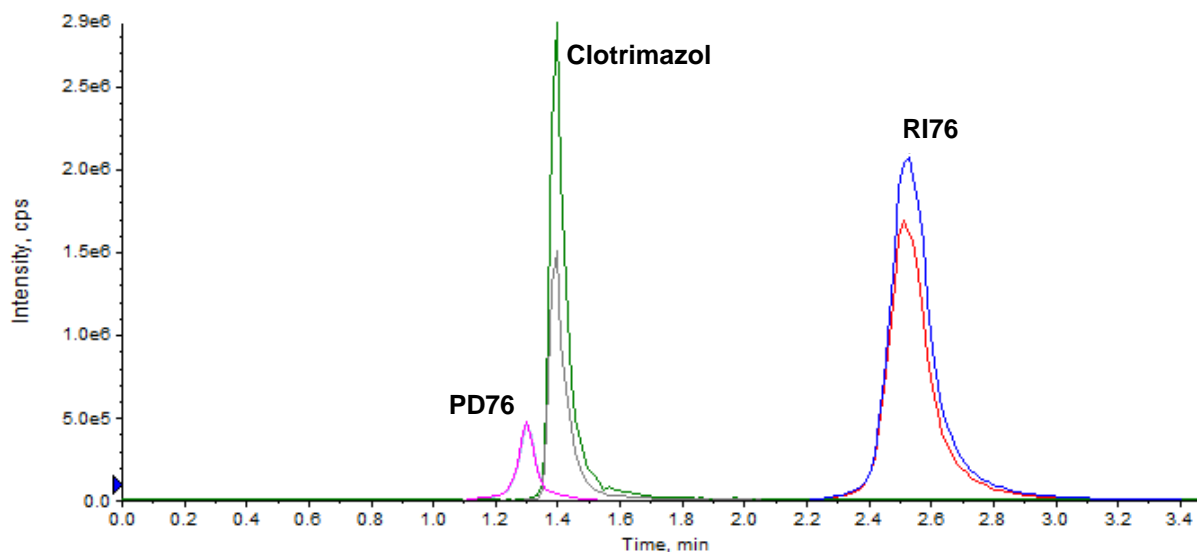
Composto	Transição	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
RI76	304,17 → 164,00 (quantificação)	96	39	10
	304,17 → 121,00 (confirmação)	96	77	8
PD76	222,00 → 121,00 (quantificação)	81	57	18
	222,00 → 149,00 (confirmação)	81	39	12
Clotrimazol	345,20 → 277,10 (quantificação)	30	14	15
	345,20 → 165,20 (confirmação)	30	44	8
Fluconazol	307,90 → 266,80 (quantificação)	106	13	12
	307,90 → 223,00 (confirmação)	106	23	12
Cetoconazol	533,00 → 126,80 (quantificação)	131	89	8
	533,00 → 160,90 (confirmação)	131	69	12
Miconazol	417,90 → 161,90 (quantificação)	111	39	10
	417,90 → 123,00 (confirmação)	111	39	10
Mebendazol	297,00 → 265,00 (quantificação)	106	29	18
	297,00 → 104,90 (confirmação)	106	43	16
Fenitoína	253,00 → 209,00 (quantificação)	106	21	24
	253,00 → 182,00 (confirmação)	106	25	12
Nortriptilina	264,20 → 117,00 (quantificação)	51	29	16
	264,20 → 105,00 (confirmação)	51	27	12
Bupivacaína	289,20 → 140,17 (quantificação)	71	29	10
	289,20 → 243,19 (confirmação)	71	29	12
Nevirapina	267,20 → 226,14 (quantificação)	81	35	12
	267,20 → 198,15 (confirmação)	81	45	10
Trimetoprima	291,20 → 230,20 (quantificação)	91	31	12
	291,20 → 261,10 (confirmação)	91	35	12
Cimetidina	253,00 → 209,04 (quantificação)	91	21	24
	253,00 → 117,00 (confirmação)	91	21	8
Meclizina	392,20 → 116,12 (quantificação)	36	61	8
	392,20 → 202,09 (confirmação)	36	25	10

6.3.2 Otimização cromatográfica

Uma grande vantagem intrínseca a métodos por MRM em CLAE-EM/EM é a não-obrigatoriedade de separação cromatográfica entre os analitos. Como cada transição é monitorada individualmente, analitos podem co-eluir sem prejuízo a quantificação.

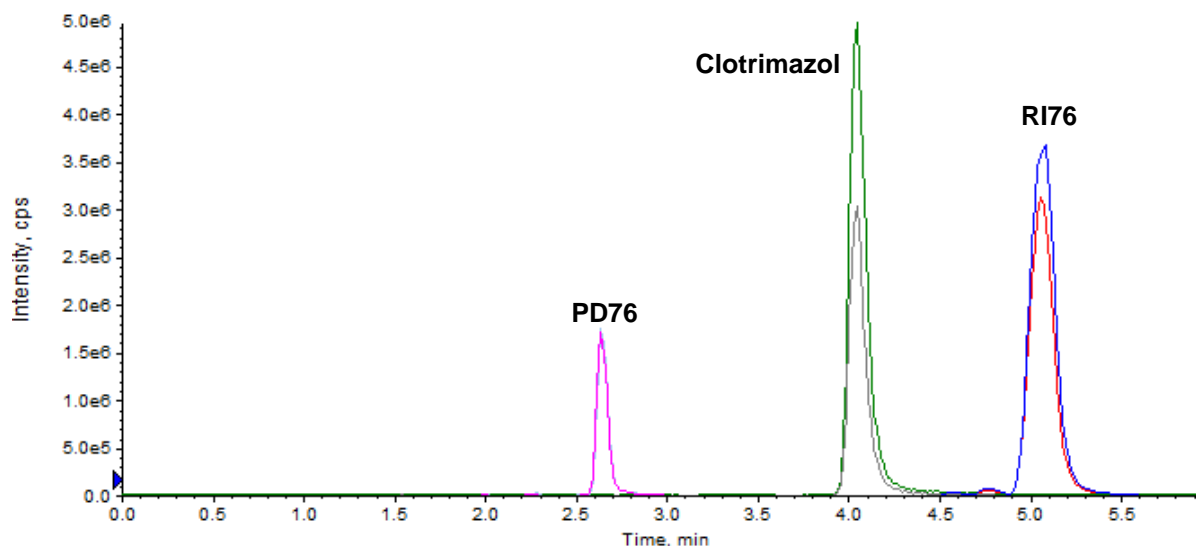
O método cromatográfico foi desenvolvido então buscando-se uma retenção adequada dos analitos, que ao serem afastados do tempo morto da cromatografia, possuem reduzida chance de sofrerem efeito matriz causado por constituintes polares da matriz biológica. Na **Figura 65** são apresentados os cromatogramas obtidos para cada transição de massas, de quantificação e de confirmação, para PD76, RI76 e clotrimazol, na primeira coluna testada, Merck Chromolith C18 (100 x 3 mm d.i.), que não apresentou retenção adequada para PD76 utilizando-se uma fase móvel constituída de tampão acetato de amônio 2 mM com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila (3:7) sob um fluxo de 0,5 mL/min. Eluições isocráticas com menor proporção de modificador orgânico tornaram-se inviáveis devido a elevada retenção de RI76, e eluições em gradiente que promovessem boa retenção e simetria de pico dos analitos apresentaram elevado tempo de análise (maior do que 12 minutos).

Figura 65 – Cromatogramas obtidos para as transições de massas de quantificação e confirmação de uma amostra contendo PD76, clotrimazol e RI76, analisado em coluna Merck Chromolith C18 (100 x 3 mm) com fase móvel de tampão acetato de amônio 2 mM + HCOOH 0,1% e ACN (30:70).



Avaliou-se então a coluna utilizada no método analítico, tratado no **CAPÍTULO 1** deste trabalho. A coluna ZORBAX Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5 μ m) apresentou melhor retenção dos analitos e picos simétricos. Sob um fluxo de 0,6 mL/min e fase móvel constituída de tampão acetato de amônio 5 mM + 0,5% de ácido fórmico (pH 2,5) e acetonitrila (10:90), foi possível obter uma retenção adequada de PD76 e eluição de todos os analitos estudados em um tempo de corrida de 6 minutos (**Figura 66**). Um volume de injeção de 10 μ L foi escolhido para garantir picos com intensidade adequada tanto em concentrações baixas quanto elevadas.

Figura 66 – Cromatogramas obtidos para as transições de massas de quantificação e confirmação de uma amostra contendo PD76, clotrimazol e RI76, analisado em coluna ZORBAX Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) com fase móvel de tampão acetato de amônio 2 mM + HCOOH 0,1% e ACN (30:70).



Utilizando-se o método acima descrito, proposto para a análise de PD76 e RI76, avaliaram-se também diferentes substâncias como padrão interno. Na concentração de 100 ng/mL, o clotrimazol apresentou intensidade muito elevada, devendo ser diluído para 25 ng/mL de forma a apresentar intensidade próxima a dos analitos e formato de pico adequado.

Miconazol e mebendazol apresentaram intensidades e formatos de pico adequados na concentração de 100 ng/mL, sendo que o mebendazol foi o único composto que co-eluiu com um analito, PD76. Injeções de ambos os compostos, isoladamente, em altas concentrações, evidenciaram a ausência de *cross-talk*. Fluconazol e cetoconazol apresentaram intensidade muito baixa, mesmo em altas concentrações. Assim, os candidatos a padrão interno que apresentaram retenção adequada nesta etapa foram testados na otimização do método de extração.

6.3.3 Otimização da fonte de íons

As condições otimizadas da fonte de íons estão descritas na **Tabela 30**. A otimização foi realizada buscando-se maximizar a formação dos íons PD76, uma vez que este é o menos abundante e crítico para a determinação em baixas concentrações.

Tabela 30 – Parâmetros otimizados da fonte de íons para o método desenvolvido.

Parâmetro	Condição otimizada
<i>Curtain Gas</i> (CUR)	10
<i>Collision Gas</i> (CAD)	Médio
<i>IonSpray Voltage</i> (IS)	4000
Temperatura	600 °C
<i>Ion Source Gas 1</i> (GS1)	40
<i>Ion Source Gas 2</i> (GS2)	40

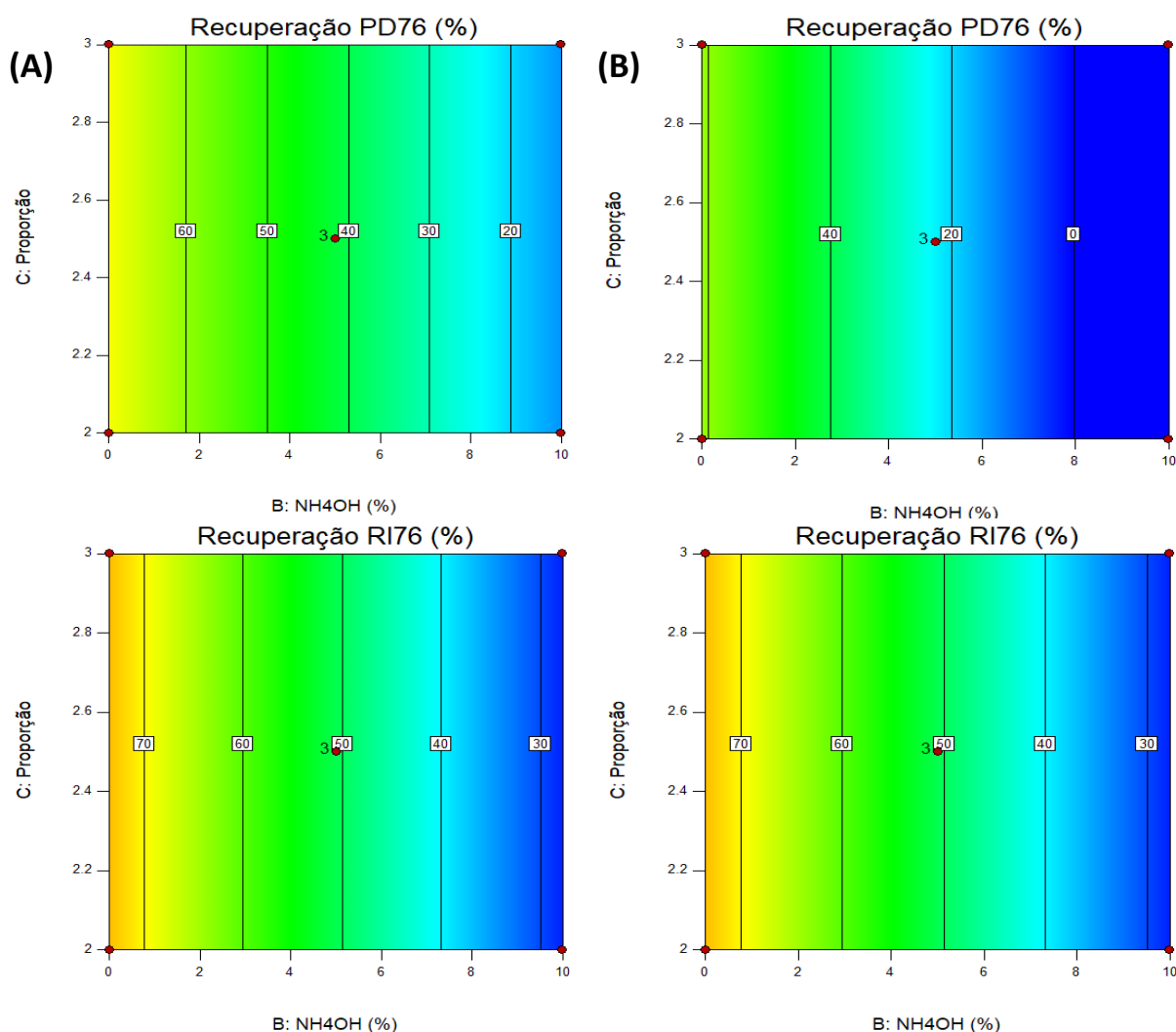
6.3.4 Otimização do preparo de amostras

6.3.4.1 Preparo de amostras por precipitação de proteínas

O estudo de otimização do preparo de amostras por planejamento experimental conduzido inicialmente, cujas superfícies de resposta estão ilustradas na **Figura 67**, demonstrou que o uso de acetonitrila ou metanol, sem a adição de NH_4OH leva a recuperações semelhantes de RI76 (aproximadamente 75%). O uso de acetonitrila, no entanto, apresenta-se favorável quando comparado ao metanol na extração de PD76, extraído cerca de 70% do analito contra 60% obtido com metanol.

Adicionalmente, com o uso de acetonitrila na proporção de 4:1 em relação ao plasma, observou-se cromatogramas com menor ruído e picos de menor assimetria, o que pode favorecer a detecção em baixas concentrações.

Figura 67 - Superfícies de respostas obtidas para o planejamento fatorial utilizado na otimização da recuperação de PD76 e RI76 em amostras biológicas. No lado (A) são apresentadas as recuperações utilizando acetonitrila como agente extrator, e no lado (B), metanol.



O uso de ácido fórmico, assim como o uso de hidróxido de amônio, como agentes modificadores de pH do plasma, prejudicou a recuperação dos analitos. A precipitação de proteínas utilizando uma mistura de acetonitrila e metanol (50:50) não levou a um aumento na recuperação e dessa forma, buscando uma técnica mais simples, o uso de acetonitrila na proporção de 4:1 foi considerada como ótima.

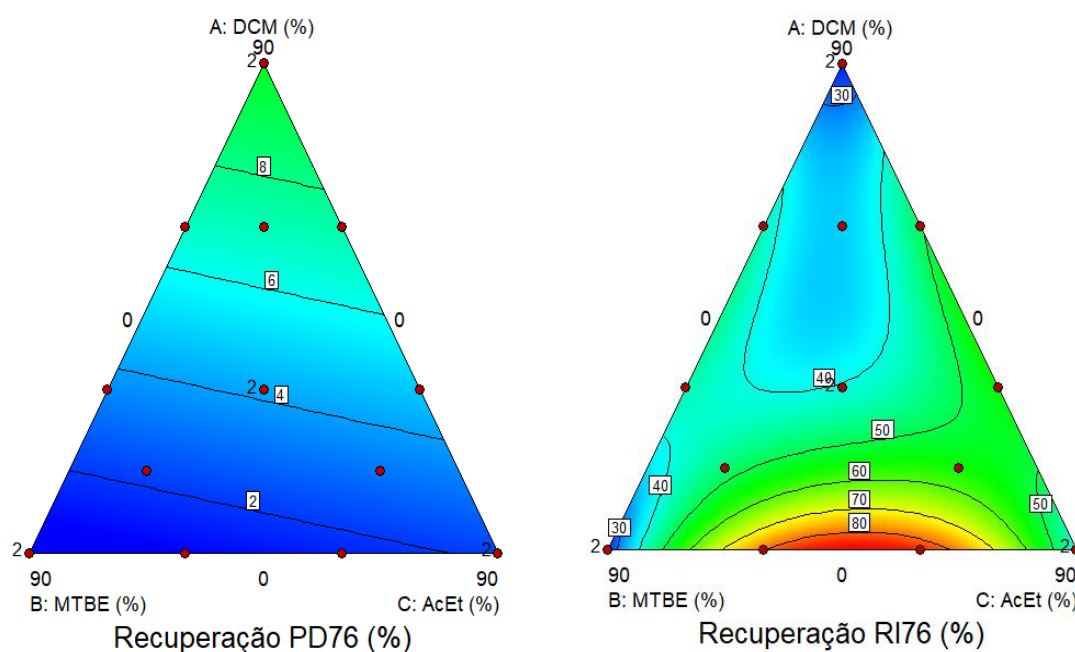
Avaliando-se a recuperação dos padrões internos selecionados na fase de otimização cromatográfica, observam-se recuperações baixas para miconazol e metronidazol, de cerca de 30%, e uma boa recuperação para clotrimazol (80%).

O clotrimazol, no entanto, apresentou-se instável nas amostras estudadas, inviabilizando o seu uso. Ao serem injetadas diversas amostras em uma sequência, observa-se uma tendência a diminuição da intensidade e da área do pico deste composto ao longo das injeções, o que leva a uma superestimação dos resultados obtidos na porção final da sequência.

3.4.2 Preparo de amostras por extração líquido-líquido

A avaliação da extração líquido-líquido como técnica de preparo das amostras de PD76 e RI76 em plasma foi iniciada com um planejamento de misturas que visava verificar o melhor solvente extrator, ou mistura destes. As superfícies de resposta obtidas, reproduzidas na **Figura 68**, mostram um baixo poder de extração para PD76 utilizando-se acetato de etila, diclorometano e MTBE isoladamente, e em misturas. Para RI76, misturas de acetato de etila e MTBE em proporções próximas a 1:1 levam a um maior potencial de extração.

Figura 68 - Superfícies de respostas obtidas para o planejamento de misturas de solventes testados para a recuperação de PD76 e RI76 em amostras biológicas.



Buscando-se formas de melhorar a recuperação de PD76 com esta extração, estudou-se também a alcalinização do plasma com a adição de 50 μ L de hidróxido

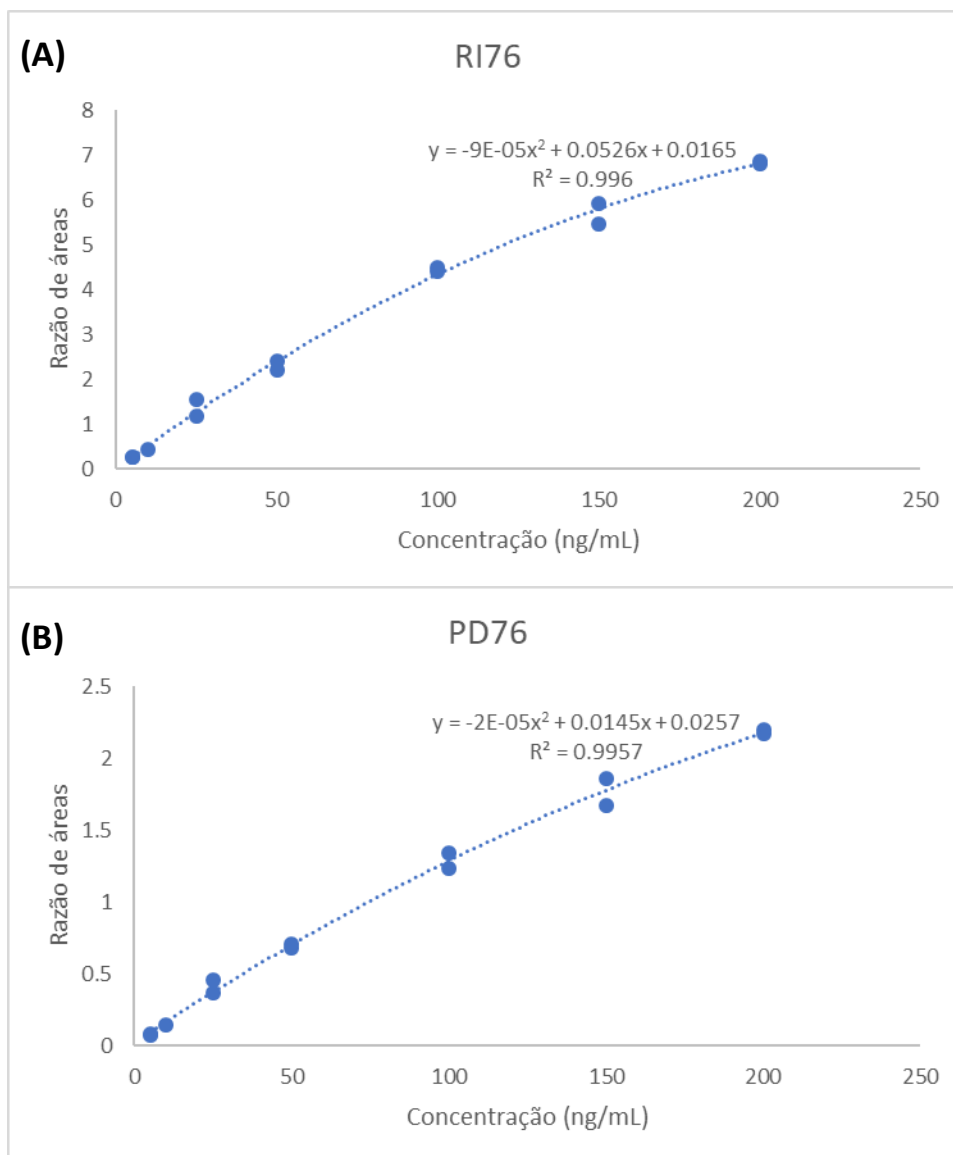
de amônio 5%, objetivando a desprotonação de PD76, e também a adição de 50 µL de solução saturada de sulfato de amônio, buscando minimizar a solvatação dos analitos por efeito *salting out*. Ambas estratégias possibilitaram um pequeno aumento na recuperação de PD76, porém insuficiente para considerar esta técnica adequada.

Desta forma, verificou-se que, dentre as técnicas de preparo de amostras avaliadas, a precipitação de proteínas com acetonitrila na proporção de 4:1 promoveu melhores resultados para PD76 e RI76, levando a recuperações superiores a 70% em todas as análises.

6.3.5 Estudo piloto de farmacocinética

As curvas de calibração obtidas para a análise de RI76 e PD76 em amostras de plasma de camundongos no estudo piloto de farmacocinética estão mostradas na **Figura 69**. As curvas foram construídas com as razões de área entre os analitos e o clotrimazol, padrão interno utilizado, na faixa de 5 a 200 ng/mL.

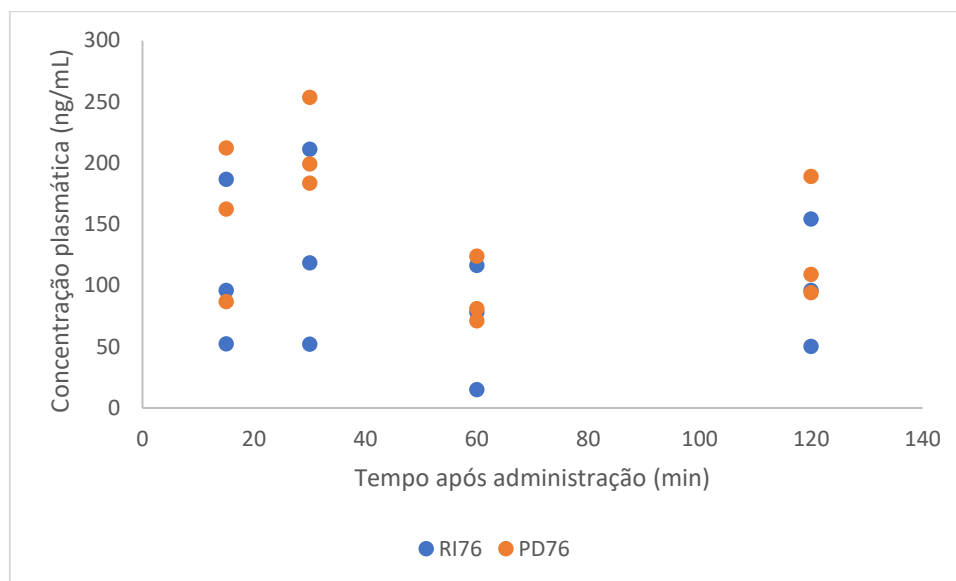
Figura 69 – Curvas de calibração construídas para a razão de áreas entre os analitos RI76 (A) e PD76 (B) e o padrão interno, *versus* a concentração dos analitos no plasma.



O modelo quadrático apresentou melhor ajuste às curvas de ambos os compostos. Um *outlier* foi identificado e removido em cada curva de calibração.

Na **Figura 70** são apresentadas as concentrações plasmáticas de RI76 e PD76 após sua administração aos animais. Observa-se que a concentração plasmática máxima, de aproximadamente 250 ng/mL para PD76 e 200 ng/mL para RI76 é atingida em 30 minutos.

Figura 70 – Concentrações plasmáticas de RI76 e PD76 obtidas após a administração de uma dose de 100 mg/kg *per os* de cada composto em camundongos.



Observou-se ainda uma leve tendência de formação de PD76 nas amostras de animais que receberam RI76, sendo possível detectar cerca de 8 ng/mL deste composto no plasma dos animais em 2 horas após a administração. Tal observação pode estar relacionada à metabolização deste composto pelos animais, ou a mais provável hidrólise ácida de RI76 no fluido gástrico.

Como perspectiva para a continuidade deste trabalho, pretende-se realizar um estudo farmacocinético completo. Para uma determinação mais precisa dos parâmetros farmacocinéticos $C_{máx}$ e $T_{máx}$, é desejável que seja incluído um maior número de pontos na primeira hora após a administração. A avaliação da concentração plasmática dos compostos em 12 e 24 horas após a administração pode ser utilizada para avaliar a presença de PD76 em animais que receberam RI76, devido a conversão.

Percebeu-se, ainda, que as suspensões de RI76 e PD76 utilizadas para a administração de doses de 100 mg/kg foram de difícil dispersão, provocando entupimentos frequentes na cânula de administração. Propõe-se que o estudo final seja realizado com doses de 50 mg/kg, para melhor dispersão das substâncias candidatas a fármaco no meio de administração, sem prejuízo na detectabilidade destes compostos, visto as elevadas concentrações plasmáticas obtidas.

7 CONCLUSÕES

O composto tiazolilhidrazona denominado RI76, candidato a fármaco antifúngico, foi submetido a condições de estresse químico e físico como parte do desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade por CLAE-DAD. Os resultados deste estudo apontaram para uma susceptibilidade a hidrólise em seu grupamento hidrazona, com a liberação de 3-hexanona e um produto de degradação denominado PD76.

Com o objetivo de determinar a pureza do material sintetizado, um método de qRMN foi desenvolvido e validado, permitindo a determinação qualitativa e quantitativa dos produtos de síntese de forma precisa e exata, em ambas as metodologias de calibração testadas: a calibração por padrão interno, e a calibração eletrônica por ERETIC 2.

Empregando-se o método de microdiluição em caldo para determinação da CIM, PD76 apresentou elevada atividade antifúngica contra certas espécies de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., sendo mais ativo do que RI76 e os antifúngicos comerciais fluconazol, itraconazol e anfotericina B contra *Cryptococcus gatti*, *Cryptococcus neoformans* e a altamente relevante *Candida albicans*.

Tendo em vista o alto potencial farmacêutico destes compostos, almejou-se avaliar a farmacocinética destes, por via *per os* em camundongos. Um método bioanalítico por CLAE-IES-EM/EM, com preparo de amostras por precipitação de proteínas foi desenvolvido e um estudo piloto foi conduzido em um número reduzido de animais. Observou-se com os resultados uma boa absorção destes compostos, com elevadas concentrações plasmáticas meia hora após a administração.

Uma interpretação dos resultados demonstra que PD76 é provavelmente um melhor candidato a fármaco que RI76, devido a elevada instabilidade do último. Embora exista a possibilidade de RI76 se converter em PD76 nos meios aquosos de testes *in vitro*, e agir como um pró-fármaco de PD76, testes preliminares de

farmacocinética não demonstraram uma relevante extensão desta conversão *in vivo*.

Como perspectivas futuras deste trabalho, têm-se a validação do método bioanalítico e a execução do estudo de farmacocinética em maior escala, permitindo assim o cálculo de parâmetros farmacocinéticos relevantes ao desenvolvimento pré-clínico de fármacos. Projeta-se também a avaliação do perfil de degradação de PD76 de forma a verificar a estabilidade intrínseca da molécula em diferentes condições, de forma a verificar sua viabilidade como candidato a fármaco.

Os resultados deste trabalho são de grande relevância para fundamentar o desenvolvimento de novos potenciais fármacos antifúngicos, servindo de base para estudos de pré-formulação e de formulação para PD76 e RI76, estudos *in vitro* e *in vivo* de toxicidade, eficácia e propriedades biofarmacêuticas, e futuramente, em possíveis estudos clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS, American Chemical Society. Purity by absolute qNMR. Disponível em: <http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/jmcmarmar/jmcmarmar_purity_instructions.pdf> Acesso em: 27 set. 2018.

AKOKA, S.; BARANTIN, L.; TRIERWEILER, M. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Analytical Chemistry*, v.71(3), p. 2554-2557, 1999.

AL-SAYAH, M. A.; RIZOS, P.; ANTONUCCI, V.; WU, N. High throughput of active pharmaceutical ingredients by UPLC. *Journal of Separation Science*, v. 31, p. 2167-2172, 2008.

ALMEIDA, A.; ELIAN, S.; NOBRE, J. Modificações e alternativas aos testes de Levene e de Brown e Forsythe para igualdade de variâncias e médias. *Revista Colombiana de Estadística*, v.31(2), p. 241-260, 2008.

ALSANTE, K. M.; BAERTSCHI, S. W.; COUTANT, M.; MARQUEZ, B. L.; SHARP, T. R.; ZELESKY, T. C. Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. In: AHUJA, S.; SCYPINSKI S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. p. 59-170, Academic Press, Boston, 2011.

ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R. Microbiologia. 5. ed. Atheneu, 2008, Rio de Janeiro.

AMBROSE, P. G.; BHAVNANI, S. M.; RUBINO, C. M.; GUMBO, T.; FORREST, A.; DRUSANO, G. L. Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of Antimicrobial Therapy: It's not just for mice anymore. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, p. 79-86, 2007.

ANDES, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 20, p. 679-697, 2006.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Peer-Verified Methods Program. Manual on Policies and Procedures, p. 1 – 35, 1998.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. AOAC Guidelines for Standard Method Performance Requirements, p. 1 – 18, 2016.

ASDL, Analytical Sciences Digital Library, Quantitative NMR: Practical Aspects. Disponível em: <<http://www.asdlib.org>>. Acesso em: 01 out. 2018.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation, 2nd edition, Informa Healthcare, Londres, 2011.

BELOUAFIA, S.; HABTI, F.; BENHAR, S.; BELAFKIH, B.; TAYANE, S.; HAMDOUN, S.; BENNAMARA, A.; ABOURRICHE, A. Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. *International Journal of Metrology and Quality Engineering*, v. 8(9), p. 1-9, 2017.

BENET, L. Z.; ZIA-AMIRHOSSEINI, P. Basic principles of pharmacokinetics. *Toxicology Pathology*, v. 23; p. 115-123, 1995.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v. 76, p. 965-977, 2008

BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 35, p. 5-26, 2012.

BRASIL. Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008 - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do Guia para realização dos estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Diário Oficial da União, Brasília, DF, jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, mai. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 53, de 04 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. Brasília, 2019.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, v. 4(165), p. 1-9, 2012.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust test for the equality of variances, *Journal of the American Statistical Association*, v. 69(346), p. 364-367, 1974.

BRUKER Corporation, TopSpin ERETIC 2, User Manual, Disponível em: <ftp://ftp.spectrospin.ch/NMR/download/Temp/debug_classes_to_Prabhakar_version-2016-07-14_14-27-50/classes/doc/English/pdf/eretic2.pdf> Acesso em 26 nov. 2018.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12. ed. Mc Graw Hill, 2012.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. *PLOS Pathogens*, v. 8(9), p. 1–3, 2012.

BUXTON, I. L. O.; BENET, L. Z. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição, ação e eliminação dos fármacos. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12. ed. Mc Graw Hill, 2012, p. 17-40.

BURTON, I. W.; QUILLIAM, M. A.; WALTER, J. A. Quantitative ^1H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for Algal toxins and other natural products. *Analytical Chemistry*, v. 77, p. 3123-3131, 2005.

CAMBRIDGE Isotope Laboratories, Standards for qNMR: qNMR Standards for External and Internal Referencing. Disponível em: <http://www.isotope.com/userfiles/files/assetLibrary/NMR_RSCH_qNMR%20referenc e%20standards.pdf> Acesso em: 28 set. 2018.

CANDIOTI, L. V.; DE ZAN, M. M.; CÂMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, v. 124, p. 123-138, 2014.

CARRADORI, S.; ROTILI, D.; DE MONTE, C.; LENOCI, A.; D'ASCENZIO, M.; RODRIGUEZ, V.; FILETICI, P.; MICELI, M.; NEBBIOSO, A.; ALTUCCI, L.; SECCI, D.; MAI, A. Evaluation of a large library of (thiazol-2-yl)hydrazones and analogues as histone acetyltransferase inhibitors: Enzyme and cellular studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 80, p. 569-578, 2014.

CASTÓN-OSORIO, J. J.; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS, J. Epidemiology of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 32 suppl. 2, p. S103-S109, 2008.

CHATTERJEE, S.; SIMONOFF, J. S. Time series data and autocorrelation. In: CHATTERJEE, S.; SIMONOFF, J. S. Handbook of Regression Analysis. p. 81-109, John Wiley & Sons, 2013.

CHEMICALIZE. Disponível em < <https://chemicalize.com/>>. Acesso em 19 dez. 2019.

CHIRITESCU, M. M.; CHIRITESCU, M. E.; SCHER, R. K. Newer systemic antifungal drugs for the treatment of onychomycosis. *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, v. 13, p. 741-758, 1996.

CHRISTIAN, J. R.; PATEL, K.; GANDHI, T. R. Validation and Experimental Design Assisted Robustness Testing of RPLC Method for the Simultaneous Analysis of Brinzolamide and Brimonidine Tartrate in an Ophthalmic Dosage Form, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 78(5), p. 631-640, 2016.

CLARIDGE, T. D. W. *High-Resolution NMR techniques in organic chemistry*, 3 ed., Elsevier, 537 p., 2016.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44(8), p. 2816-2823, 2006.

COSTA, L. F. *Estudos de quantificação do fármaco furosemida por Ressonância Magnética Nuclear*. 2014. 72f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Distrito Federal. 2014.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenical fungi: from bench to bedside. *Clin Microb Infect*, v. 20 (Suppl. 6), p. 54-59, 2014.

DANIEL, C. Use of half-normal plots in interpreting factorial two-level experiments. *Technometrics*, v.1(4), p. 311-341, 1959.

DARBEAU R. W. Nuclear magnetic resonance (NMR) Spectroscopy: A review and a look at its use as a probative tool in deamination chemistry. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 41, p. 401-425, 2006.

DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. 489 p.

DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resistance Updates*, v. 23, p. 12–19, 2015.

DEVANSHU, S.; RAHUL, M.; ANNU, G.; KISHAN, S.; ANROOP, N. Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS: A Review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v. 7(01), p. 1-9, 2010

EUROPEAN Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, London, United Kingdom, 2011.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 10th edition. EDQM, Strasbourg, France, 2019.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics, *Biochemical Pharmacology*, v. 87, p. 93-120, 2014.

FARMAKIOTIS, D.; KONTOYIANNIS, D. P. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 50, p. 318–324, 2017.

FDA, Food and Drug Administration, Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics: Guidande for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, 2015.

FDA, Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation: Guidande for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, 2018.

FERREIRA, S. L. C.; CAIRES, A. O.; BORGES, T. S.; LIMA, A. M. D. S.; SILVA, L. O. B.; SANTOS, W. N. L. Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs, *Microchemical Journal*, v. 131, p. 163-169, 2017.

FRIEBOLIN, H. Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy, 2 ed, VCH, Weinheim, 368 p., 1993.

FRIEDMANN, M. Applications of the Ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52(3), p. 385-406, 2004.

GARBER, G. An Overview of Fungal Infections. *Drugs*, v. 61(1), p. 1-12, 2001.

GIRAUDEAU, P.; SILVESTRE, V.; AKOKA, S. Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics: a tutorial review. *Metabolomics*, v. 11(5), p. 1041-1055, 2015.

GONZÁLES, A. G.; HERRADOR, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26(3), p. 227-238, 2007.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GREENSPAN, L. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards – A. Physics and Chemistry*, v. 81A(1), p. 89-96, 1977.

GRIFFITHS, L.; IRVING, A. M. Assay by nuclear magnetic resonance spectroscopy: quantification limits, *Analyst*, v. 123, p. 1061-1068, 1998.

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. 6a ed. LTC Editora, 2008.

HASDENTEUFEL, F. Twenty years of separation of Cis-Trans (Z)-(E) Isomers. *Separation & Purification Reviews*, v. 35, p.193-221, 2006.

HEYDEN, Y. V.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L. Benchmarking for Analytical Methods: The Horwitz Curve. *LC/GC Online*, v. 18(10), p. 528-531, 2005.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*. v. 910, p. 2-13, 2012.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; STANLEY, R. C. Princípios de Análise Instrumental. 6a ed. Bookman, 2009.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 57, p. 229-240, 2010.

HONG, D. D.; SHAH, M. Development and Validation of HPLC Stability-Indicating Assays. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. Drug Stability, Principles and Practices, 3a ed. Marcel Dekker, 2000, p. 329-384.

HOPFGARTNER, G.; BOURGOGNE, E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 22, p. 195-214, 2003.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz Ratio (H_o): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*, v. 89(4), p.1095-1109, 2006.

HOU, T. J.; XIA, K.; ZHANG, W.; XU, X. J. ADME Evaluation in Drug Discovery. 4. Prediction of Aqueous Solubility Based on Atom Contribution Approach. *Journal of Chemical Informatics and Computational Science*, v. 44, p. 266-275, 2004

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q1B – Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products*, 1996.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q1A(R2) – Stability Test of New Drug Substances and Products*, 2003.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q2(R1) – Validation of analytical procedures: text and methodology*, 2005.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q3A(R2) – Impurities in New Drug Substances*, 2006.

ICH Official web site: ICH. Disponível em < <https://ich.org/>>. Acesso em 23 jan. 2018.

JANZEN, H. *Forced degradation studies – comparison between ICH, EMA, FDA and WHO guidelines and ANVISA's resolution RDC 53/2015*. 2016. 57f. Dissertação de mestrado (*Master of Drug Regulatory Affairs*) – Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Rheinischen Friedrich-Willhelms Universität Bonn, Bonn – GER, 2016.

JENKE, D. R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, v. 19, p. 719-736, 1996.

JOYCE, A. P.; WANG, M.; LAWRENCE-HENDERSON, R.; FILLIETTAZ, C.; LEUNG, S. S.; XU, X.; O'HARA, D. M. One mouse, one pharmacokinetic profile: Quantitative whole blood serial sampling for biotherapeutics. *Pharmaceutical Research*, v. 31(7), p. 1823-1833, 2014.

JUNIOR, H. A. M.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F.; LEBRE, D. T.; WANG, A. Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). *Química Nova*, v. 29 (3), p. 586-592, 2006.

KAZARIAN, S. G.; CHAN, K. L. A. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1758, p. 858-867, 2006.

KING, B. *In-house method validation. A guide for chemical laboratories. LGC Limited*. 2003.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, p. 857-868, 1999.

KUSHNIR, M.M.; ROCKWOOD, A.L.; NELSON, G.J.; YUE, B.; URRY, F.M. Assessing analytical specificity in quantitative analysis using tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, v. 38, n. 4, p. 319-327, 2005.

LAWSON, J.; GRIMSHAW, S.; BURT, J. A quantitative method for identifying active contrasts in unreplicated factorial designs based on the half-normal plot. *Computational Statistics and Data Analysis*, v. 26, p. 425-436, 1998.

LEPAK, A. J.; ANDES, D. R. Antifungal PK/PD considerations in fungal pulmonary infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 32(6), p. 783-794, 2011.

LEPAK, A. J.; ANDES, D. R. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5:a019653, p. 1-23, 2015.

LEVY, L. A. Epidemiology of onychomycosis in special-risk populations. *Journal of American Podiatry Medical Association*, v. 87, p. 546-550, 1997.

LEWIS, R. E. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clinical Proceedings*, v. 86(8), p. 805-817, 2011.

LIGNELL, A. *In vitro pharmacodynamics of antifungal agents in the treatment of Candida infections*. 2011. 84f. Tese de doutorado (*Doctor of Philosophy*) – Faculty of Medicine, Uppsala Universitet, Uppsala – SWE, 2011.

LINO, C. I. *Síntese e avaliação das atividades antioxidante e citotóxica de análogos da curcumina e heterociclos tiazólicos*. 2015. 189f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2015.

LINO, C. I.; SOUZA, I. G.; BORELLI, B. M.; MATOS, T. T. S.; TEIXEIRA, I. N. S.; RAMOS, J. P.; FAGUNDES, E. M. S.; FERNANDES, P. O.; MALTAROLLO, V. G.; JOHANN, S.; OLIVEIRA, R. B. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 151, p. 248-260, 2018.

LIZARAZO, J.; LINARES, M. DE BEDOUT, C.; RESTREPO, A.; AGUDELO, C. I.; CASTAÑEDA, E. Results of nine years of the clinical and epidemiological survey on cryptococcosis in Colombia 1997-2005. *Biomedica*, v. 27(1), p. 94-109, 2007.

LOUGH W. J., WAINER I. W. *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*. 1a ed. Blackie Academic & Professional, 1995.

MAGGIO, R. M.; CALVO, N. L.; VIGNADUZZO, S. E.; KAUFMAN, T. S. Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 101, p. 102-122, 2014.

MALZ F., JANCKE H. Validation of quantitative NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p. 813-832, 2005.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Guia: Validação e Controle de Qualidade Analítica (Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários), Brasília, 78 p., 2011.

MEYER, V.R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5a ed. Wiley, 2010.

MEYERS, J. D. Fungal infections in bone marrow transplant patients. *Semin. Oncol.*, v. 17 Suppl. 6, p. 10-13, 1990.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 2, p. 254–259, 2014.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 7. ed. Elsevier, 2014.

NATA (National Association of Testing Authorities – Australia). Technical Note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. Sydney: NATA, 8 p., 1997

NIHS (National Institute of Health Sciences – Japan). Clinical Pharmacokinetic Studies of Pharmaceuticals. Japan: NIHS, 23 p. 2001

NETO, F. R. A. CGAR em análise de resíduos. *Química Nova*, v. 18 (1), p. 65-67, 1995.

NIST (National Institute of Standards and Technology). Information Technology Laboratory. Engineering Statistics Handbook, 5.3.3.5. Plackett-Burman designs. Disponível em <<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri335.htm>>. Acesso em 26 nov. 2018.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51(5), p. 561-570, 2010.

NYAMBAKA, H.; RYLEY, J. An isocratic reversed-phase HPLC separation of the stereoisomers of the provitamin A carotenoids (α - and β -carotene) in dark green vegetables. *Food Chemistry*, v.55(1), p. 63-72, 1996.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW N. A. R. Antifungal Agents: Mechanisms of action. *TRENDS in Microbiology*, v. 11(6), p. 272–279, 2003.

OLGUÍN, J.; FEARN, T. A new look at half-normal plots for assessing the significance of contrasts for unreplicated factorials. *Applied Statistics*, v. 46(4), p. 446-462, 1997.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 45(6), p. 299-305, 2003.

PASQUALOTTO, A. C.; ZIMERMAN, R. A.; ALVES, S. H.; AQUINO, V. R.; BRANCO, D.; WILTGEN, D.; DO AMARAL, A.; CECHINEL, R.; COLARES, S. M.; DA ROCHA, I. G.; SEVERO, L. C.; SUKIENNIK, T. C. Take over control of your fluconazole prescriptions: the growing importance of *Candida glabrata* as an agent of candidemia in Brazil. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 29, p. 898-899, 2008

PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. A routine experimental protocol for qHNMR illustrated with taxol. *Journal of Natural Products*, v. 70, p.589-595, 2007.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introduction to spectroscopy. 4 ed. Brooks/Cole, Belmont, USA, 745p, 2009.

PEREIRA, D. B. *Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de lamivudina e tenofovir em plasma humano por CLUE-EM/EM*. 2017. 78f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 2017.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check, *Nature Review Drug Discovery*, v. 16(9), p. 603-616, 2017.

PFALLER, M. A.; Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*, v. 125(1A), p. S3-S13, 2012.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, v. 33(4), p. 305-325, 1946.

POLITIS, S. N.; COLOMBO, P.; COLOMBO, G.; REKKAS, D. M. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 43:6, p. 889-901, 2017.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 785, p. 263-275, 2003.

PORTAL ACTION, 3.3 – Experimentos fatoriais sem réplicas. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/33-experimentos-fatoriais-sem-replicas>> Acesso em: 04 out. 2018.

PRENTIS, R. A.; LIS, Y.; WALKER, S. R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 25, p. 387-396, 1988.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 335–377, 2003.

REIS, N. F. A. *Avaliação da estabilidade da nevirapina. Desenvolvimento e validação de métodos indicativos de estabilidade, caracterização estrutural e estudo de citotoxicidade para os produtos de degradação*. 2015. 178f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2015.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, J. F.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, T. D.; MOTTO, M. G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies, *Pharmaceutical Technology*, p. 48-56, 2002.

ROCHE – Pharmacokinetics. Disponível em <https://www.roche.com/research_and_development/what_we_are_working_on/resea

rch_technologies/translational_technologies/pharmacokinetics.htm>. Acesso em 25 jan. 2018.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 73-85, 2002.

SANTANA, J. M. *O uso da ressonância magnética nuclear na análise do perfil químico de sucos de uva do tipo integral e néctar*. 2017. 169f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2017

SANTOS, S. M. *Desenvolvimento de métodos de RMN para controle de qualidade de produtos farmacêuticos e agrícolas*. 2014. 156f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2014.

SAVIN, R. Diagnosis and treatment of *Tinea versicolor*. *Journal of Pharmaceutical Practices*, v. 43, p. 127-132, 1996.

SIGMA-Aldrich, Quantitative NMR: Technical Details and TraceCERT® Certified Reference Materials. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/qnmr-brochure-rjo.pdf>> Acesso em: 28 set. 2018.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. 7. ed. John Wiley & Sons, 550 p, 2005.

SINGH, S.; ROY, R. The application of absolute quantitative (1)H NMR spectroscopy in drug discovery and development. *Expert Opinions on Drug Discovery*, v. 11(7), p. 695-706, 2016.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development. 2. ed. John Wiley & Sons, 1997.

SOININEN, P. *Quantitative ¹H NMR Spectroscopy, Chemical and Biological Applications*. 2008. 131f. Tese de doutorado (*Natural and Environmental Sciences*) – Faculty of Natural and Environmental Sciences, University of Kuopio, Kuopio – FIN, 2008.

SOLOMONS T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica, Volume 1, 10ª ed, LTC, 2012.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method, *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos*. 2007. 297f. Tese de

doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2007.

SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS JR., J. E. Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. *Antimicrobial Research and Development*, v. 38, p. 1279-86, 2004.

STAHL, M. Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology. *Agilent Technologies*. Disponível em <www.agilent.com/en/library/literature> Acesso em: 06 jun. 2018.

STEWART, P. J., TUCKER, I. G. Prediction of drug stability. Part 2. Hydrolysis. *Australian Journal of Hospital Pharmacy*, v.15, p. 11-16, 1985.

SUN, S.; JIN, M.; ZHOU, X.; NI, J.; JIN, X.; LIU, H.; WANG, Y. The application of quantitative ¹H-NMR for the determination of orlistat in tablets. *Molecules*, v. 22(1517), p. 1-10, 2017.

THOMPSON, M. The amazing Horwitz function, *AMC Technical Brief*, Royal Society of Chemistry, 2004.

THOMPSON, M.; WOOD, R. The 'Horwitz ratio' – a study of the ratio between reproducibility and repeatability precisions in the analysis of foodstuffs. *Analytical Methods*, v. 7, p. 375-379, 2015.

TYAGI, S. Fungal pathogenicity and diseases in humans – A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 5(6), p. 192–193, 2016.

USP, United States Pharmacopeia - National Formulary (USP-NF), 41th Edition, 2018.

VAN DAELE, R., SPRIET, I., WAUTERS, J., MAERTENS, J., MERCIER, T., VAN HECKE, S.; BRÜGGEMANN, R. Antifungal drugs: what brings the future? *Medical mycology*, v. 57, p. S328-S343, 2019.

WANG, Z. Hantzsch Thiazole Synthesis. In: WANG, Z. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. 1. ed. Wiley, 2010, p. 1330-1334.

WASYLASCHUK, W. R.; HARMON P. A.; WAGNER G. Evaluation of hydroperoxides in common pharmaceutical excipients. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 96, p. 106–116, 2007.

WATERS, R. B., DOVLETGLOU, A. Evaluating HPLC Assay Robustness with Experimental Design, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v.26, p. 2975 – 2985, 2003.

WHO, World Health Organization, WHO expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations, Technical Report Series, 929, 39th report, 152 p., 2005.

WIDER, G.; DREIER, L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, p. 2571-2576, 2006.

ZORBAX Eclipse XDB | Agilent, Disponível em:
<<https://www.agilent.com/en/products/liquid-chromatography/lc-columns/small-molecule-separations/zorbax-eclipse-xdb>> Acesso em: 26 Abr. 2018.

APÊNDICE A – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do IV ABCF Congress, realizado na cidade de São Paulo – SP, em setembro de 2018.

**DEGRADATION PROFILE OF RI76 – A NEW HYDRAZINE-THIAZOLE DRUG CANDIDATE
WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY**

FRANCO, PHC¹; OLIVEIRA, RB¹; CÉSAR, IC¹

¹Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Introduction: RI76 is a novel 2-thiazolylhydrazone synthesized in UFMG. It has shown potent *in vitro* activity against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and *Paracoccidioides* spp., including higher potency than fluconazole for some of the tested species. The goal with this work is to follow-up the development of this drug candidate by investigating its degradation profile according to current stress testing guidelines.

Methods: A synthesized batch of RI76 with ca. 95% purity was submitted to forced degradation conditions listed in IT n° 1/2008 of ANVISA, which are 0.1M HCl, 0.1M NaOH, 0.05M CuSO₄ and 0.3% H₂O₂. The outcomes of these tests were analysed in a stability-indicating method developed on a HPLC-DAD system.

Results: RI76 presented intense degradation in aqueous media, with the formation of a single degradation product. After 24h, over 70% of the compound was converted into this product when diluted in water/acetonitrile. This degradation was not detected up to 72h when water was not used as solvent. The use of 0.1M HCl accelerates this degradation and reacts to form a second minor degradation product. The same was observed for 0.3% H₂O₂, while for 0.1M NaOH and 0.05M CuSO₄, an almost complete degradation is instantly observed, requiring the use of slighter conditions to achieve relevant results.


Conclusions: Although RI76 is a strong candidate to antifungal drug in terms of safety and efficacy, it is highly unstable. After characterization, the antifungal activity and safety of the main degradation product will be assessed, to investigate if RI76 may be designed as a prodrug.

The authors would like to thank FAPEMIG and CNPq for the Financial Support.

CERTIFICATE

We certify that the work DEGRADATION PROFILE OF RI76 – A NEW HYDRAZINE-THIAZOLE DRUG CANDIDATE WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY, authorship of PEDRO HENRIQUE CAVALCANTI FRANCO , RENATA BARBOSA DE OLIVEIRA, ISABELA DA COSTA CÉSAR, was presented as POSTER PRESENTATION at the IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care, held in São Paulo (SP), Brazil, from September 6 to 8, 2018.


Maria José Soares Mendes Giannini
President Congress


Teresa Dalla Costa
President ABCF



ABCF - 2018
BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care
September 06 to 08, 2018
CENTRO FECOMERCIO DE EVENTOS, SAO PAULO, SP

APÊNDICE B – Resumo submetido e certificado de apresentação na sessão de pôsteres do III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas, realizado na cidade de Belo Horizonte – MG, em novembro de 2018



III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas
07, 08 e 09 de novembro de 2018 - Belo Horizonte (MG)

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CLAE-DAD PARA
A DETERMINAÇÃO DE UM NOVO COMPOSTO HIDRAZINO-TIAZÓLICO E SEUS
PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

FRANCO, P.H.C.; OLIVEIRA, R.B.; CÉSAR, I.C.

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
pedrofrancobh@gmail.com

Introdução: RI76 é um novo composto hidrazino-tiazólico sintetizado no LQF-UFMG que demonstrou potente atividade antifúngica *in vitro* contra cepas de *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Favoscioides* spp., sendo mais potente que o fluconazol contra algumas das cepas testadas. O composto apresentou também segurança adequada *in vitro*, configurando-se como um potencial candidato a fármaco.

Objetivos: Validar o método indicativo de estabilidade desenvolvido para sua aplicação na avaliação da estabilidade de amostras de RI76 sintetizadas.

Metodologia: A validação do método desenvolvido foi realizada conforme disposto na RDC 166/2017 e no guia ICH Q2(R1). Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade na faixa de 1% a 130% da concentração de trabalho (1 a 130 µg/mL), precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez. O método é conduzido em um sistema CLAE-DAD Agilent 1100 com uma coluna ZORBAX Eclipse-XDB 150 mm x 4,6mm com partícula de 5 µm mantida a 40 °C. A fase móvel aquosa é constituída de tampão acetato de amônio 2 mM + 0,1% de ácido fórmico, o modificador orgânico é acetonitrila e a eluição é feita em gradiente sob um fluxo de 1,0 mL/min. São injetados 5 µL das amostras que são preparadas em acetonitrila.

Resultados e Discussão: O método mostrou-se seletivo, sendo capaz de separar RI76 de suas impurezas de síntese e produtos de degradação. Todos os picos apresentaram pureza adequada. A exatidão e precisão do método foram consideradas adequadas, tendo apresentado desvio inferior a 2,0%. O método foi linear na faixa de trabalho estudada, sendo todas as premissas do MMQO obedecidas. A robustez, avaliada por meio de um planejamento fatorial fracionário, demonstrou que as variáveis estudadas não impactam na determinação do teor. O limite de quantificação obtido experimentalmente foi de 1 µg/mL, a menor concentração da curva analítica.

Conclusão: Os resultados obtidos permitem considerar o método validado para determinar o conteúdo de RI76 nas amostras sintetizadas na presença de impurezas e produtos de degradação.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro.

III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas

7, 8 e 9 de novembro de 2018

Certificado

Certificamos que **Pedro Henrique Cavalcanti Franco** apresentou o trabalho intitulado **VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CLAE-DAD PARA A DETERMINAÇÃO DE UM NOVO COMPOSTO HIDRAZINO-TIAZÓLICO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO** do(s) autor(es) **FRANCO, P.H.C, OLIVEIRA, R.B.; CÉSAR, I.C.** na modalidade de **pôster** durante o **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR.**

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.

Lucas A.M. Ferreir

Lucas Antônio Miranda Ferreira

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Farmácia – UFMG

Saulo Fehelberg Pinto Braga

Saulo Fehelberg Pinto Braga
Membro da Comissão Organizadora
III SINCIFAR

UFMG



APÊNDICE C – Artigo publicado na revista *Magnetic Resonance in Chemistry*, referente ao CAPÍTULO 2 deste trabalho.

Received: 4 June 2019 | Revised: 7 August 2019 | Accepted: 16 August 2019

DOI: 10.1002/mrc.4936

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Purity determination of a new antifungal drug candidate using quantitative ^1H NMR spectroscopy: Method validation and comparison of calibration approaches

Pedro Henrique Cavalcanti Franco¹  | Saulo Fehelberg Pinto Braga²  |
Renata Barbosa de Oliveira¹  | Isabela Costa César¹ 

¹Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

Correspondence

Pedro Henrique Cavalcanti Franco,
Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.
Email: pedrofrancobh@gmail.com

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Abstract

Quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) is an analytical technique that offers numerous advantages in pharmaceutical applications including minimum sample preparation and rapid data collection times with no need for response factor corrections, being a powerful tool for assaying drug content in both drug discovery and early drug development. In the present work, we have applied qNMR, using both the internal standard and the electronic reference to access in vivo concentrations 2 calibration methods, to assess the purity of RI76, a novel antifungal drug candidate. NMR acquisition and processing parameters were optimized in order to obtain spectra with intense, well-resolved signals of completely relaxed nuclei. The analytical method was validated following current guidelines, demonstrating selectivity, linearity, accuracy, precision, and robustness. The calibration approaches were statistically compared, and no significant difference was observed when comparing the obtained results and their dispersion in terms of relative standard deviation. The proposed qNMR method may, therefore, be used for both qualitative and quantitative assessments of RI76 in early drug development and for characterization of this compound.

KEYWORDS

^1H , NMR, 2-thiazolylhydrazone, analytical chemistry, antifungal, drug development, NMR, quantitative NMR, spectroscopy

1 | INTRODUCTION

Nuclear magnetic resonance (NMR) is widely described as a qualitative technique for structural elucidation.^[1,2] However, its quantitative capabilities have been discussed as early as 1963.^[3] The principle of quantitative NMR (qNMR) is based on the direct relationship between the

integrated intensity of a signal (I) and the number of nuclei (N) evoking that signal

$$I = K_s N,$$

where K_s is a spectrometer constant affected by acquisition and processing parameters.^[1,4]

APÊNDICE D – Aprovação do protocolo submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG para realização do estudo de farmacocinética descrito no CAPÍTULO 3 deste trabalho.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação farmacocinética de RI76 e PD76, compostos hidrazino-tiazólicos com atividade antifúngica", protocolo do CEUA: 45/2019 sob a responsabilidade de Isabela da Costa Cesar que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/04/2019.

Vigência da Autorização	29/04/2019 a 28/04/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/inhagem	Camundongo isogênico / Swiss
Nº de animais	40
Peso/Idade	20g / 40(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
*Espécie/inhagem	Camundongo isogênico / Swiss
Nº de animais	40
Peso/Idade	20g / 40(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
*Espécie/inhagem	Camundongo isogênico / Swiss
Nº de animais	40
Peso/Idade	20g / 40(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia

Considerações posteriores:

29/04/2019	Aprovado na reunião do dia 29/04/2019. Validade: 29/04/2019 à 28/04/2024
------------	--

Belo Horizonte, 30/04/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha