

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DOIS NOVOS DERIVADOS DOS ÁCIDOS
BETULÍNICO E URSÓLICO COM ATIVIDADE ANTIMALÁRICA**

LEONARDO TREVISAN SECRETTI

Porto Alegre

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DOIS NOVOS DERIVADOS DOS ÁCIDOS
BETULÍNICO E URSÓLICO COM ATIVIDADE ANTIMALÁRICA**

Tese apresentada por **LEONARDO
TREVISAN SECRETTI** para a obtenção do
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Co-orientadora: Prof. Dr. Simone Gnoato

Porto Alegre

2018

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.04.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Andréa Inês Horn Adams
Universidade Federal de Santa Maria

Nathalie Ribeiro Wingert
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Secretti, Leonardo Trevisan
Caracterização Físico-química, desenvolvimento e validação de métodos analíticos para dois novos derivados dos ácidos betulínico e ursólico com atividade antimalárica / Leonardo Trevisan Secretti.
-- 2018.
112 f.
Orientador: Pedro Eduardo Fröhlich.

Coorientadora: Simone Gnoato.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. novos fármacos. 2. malária. 3. ácido 3-O-butanoilbetulínico. 4. ácido 3-O-butanoilursólico. 5. balanço de massas. I. Fröhlich, Pedro Eduardo, orient. II. Gnoato, Simone, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. O autor recebeu bolsa CAPES.

Dedico este trabalho à minha mãe,
Ligia Cremonese Trevisan.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Ligia Cremonese Trevisan por toda instrução, todo suporte e amor incondicional.

Às minhas irmãs Gisele Trevisan Secretti e Anelise Trevisan Secretti pelo fraternal apoio em todas as etapas até aqui.

Aos incríveis cidadancers Lívia, Ana Laura, Douglas, Alexandre, Barbie, Carol, Felipe, Bruna Nedel, Jay, Marrie, Júlia e Gabi Brack, por me ensinarem sobre o amor e a vida.

À Gabriela Zuchetto pelas trocas e inspirações.

Ao amigo Bruno Bavaresco pelo companheirismo e pela cumplicidade.

Ao orientador Pedro Fröhlich e à co-orientadora Simone Gnoato pelo auxílio na execução e conclusão deste trabalho.

RESUMO

Considerada endêmica em mais de 90 países e territórios, a malária é a doença parasitária mais abrangente, em termos geográficos e populacionais, do mundo. Segundo a OMS, mais de 200 milhões de pessoas são infectadas por ano e há estimativa de 400 mil óbitos no mesmo período. A resistência do plasmódio aos fármacos disponíveis é reconhecida como um dos maiores problemas para a erradicação da malária. Com intuito de encontrar novos fármacos, SILVA e colaboradores (2013) sintetizaram duas séries de análogos aos triterpenos ácido betulínico (AB) e ácido ursólico (AU) para melhorar a atividade terapêutica destas moléculas, reduzir a toxicidade e procurar por novos alvos terapêuticos. O estudo investigou a substituição de ésteres no carbono-3 dos ácidos e avaliou a atividade antimalárica, resultando em moléculas com bom potencial de ação, designadas ácido 3-O-butanoilbetulínico (3-OBB) e ácido 3-O-butanoilursólico (3-OBU). Estas moléculas foram semissintetizadas, caracterizadas físico-quimicamente e métodos analíticos foram desenvolvidos e validados para a identificação e quantificação destes protótipos. A avaliação por ponto de fusão capilar e calorimetria diferencial exploratória (DSC) resultou em caracterização térmica do composto 3-OBB, porém, devido a degradações moleculares, não foi efetiva na avaliação do composto 3-OBU. A identidade das moléculas foi confirmada por espectroscopia no ultravioleta e infravermelho, além de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , resultando em espectros característicos e assimiláveis à estrutura química dos fármacos. Devido à ausência de padrão de referência compendial, um balanço de massas é proposto para identificar a pureza dos compostos sintetizados, resultando em pureza de 94,56% e 83,38% para os compostos 3-OBB e 3-OBU, respectivamente. O método analítico foi desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplado a detectores ultravioleta (UV) e aerossol carregado (DAC), em série. O sistema cromatográfico, operado isocriticamente e em fase reversa, consistiu em fase móvel composta por acetonitrila:água pH 3,0 ajustado com ácido fórmico (85:15, v/v), com fluxo de 1,2 mL/min e coluna PhenoSphere Next octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm de diâmetro e 5 μm de tamanho de partícula). Os cromatogramas foram registrados em 210nm, com amostras de 3-OBB e 3-OBU, avaliadas simultaneamente, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, com volume de injeção de 20 μL e sob temperatura controlada de 50 $^{\circ}\text{C}$. O tempo de análise cromatográfica foi de 30 min. O método se

mostrou específico, linear, preciso e exato para ambos os analitos, 3-OBB e 3-OBU, e foi considerado estatisticamente validado, podendo ser utilizado identificação e quantificação dos novos fármacos.

Palavras-chave: Malária; ácido 3-O-butanoilbetulínico; ácido 3-O-butanoilursólico; novos fármacos; caracterização físico-química; balanço de massas; CLAE/UV; CLAE/CAD.

ABSTRACT

Physicochemical characterization, development and validation of analytical methods for two new derivatives of betulinic and ursolic acids presenting antimalarial activity

Endemic in more than 90 countries and territories, malaria is the most widely, populational and geographically, parasitic disease in the world. According to the WHO, more than 200 million people are infected each year and an estimated 400.000 deaths occur in the same period. Plasmodio resistance to available drugs is recognized as one of the major problems for malaria eradication. In order to find new drugs, SILVA and collaborators (2013) synthesized two series of analogues to the betulinic acid (BA) and ursolic acid (UA) triterpenes to improve the therapeutic activity of these molecules, reduce toxicity and search for new therapeutic targets. The study investigated ester substitution on carbon-3 of BA and UA, resulting in molecules with good antimalarial activity, designed 3-O-butanoilbetulinic acid (3-OBB) and 3-O-butanoilursolic acid (3-OBU). These molecules were semisynthesized, physic-chemically characterized and an analytical method was developed and validated for the identification and quantification of these prototypes. An evaluation by capillary melting point and differential scanning calorimetry (DSC) resulted in thermal characterization of 3-OBB compound, but due to molecular degradations, was not effective in the evaluation of compound 3-OBU. The identity of the molecules was confirmed by ultraviolet and infrared spectroscopy, as well as ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance, resulting in characteristic and assimilable spectra to the chemical structure of the drugs. Due to the absence of compendial reference standard, a mass balance is proposed to identify the purity of the synthesized compounds, resulting in 94.56% and 83.38% of 3-OBB and 3-OBU, respectively. Analytical method was developed by high performance liquid chromatography (HPLC), coupled, in series, to ultraviolet (UV) and charged aerosol (CAD) detectors. Chromatographic system, operated isocratically by reversed phase, consisted on a mobile phase composed of acetonitrile: water pH 3.0 adjusted with formic acid (85:15, v/v), flow rate of 1.2 mL/min and a PhenoSphere Next octadecylsilane column (250 mm x 4.6 mm internal diameter and 5 μm particle size). The chromatograms were recorded at 210 nm with 3-OBB and 3-OBU samples, simultaneously evaluated, at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$, an injection volume of 20

μL at a controlled temperature of $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. The chromatographic analysis time was set at 30 min. The method was found to be specific, linear, precise and accurate for both analytes, 3-OBB and 3-OBU, and was considered statistically validated, so it can be applied in the identification and quantification of the new drugs.

Keywords: Malaria; 3-O-butanoilbetulinic acid; 3-O-butanoilursolic acid; new drugs; physicochemical characterization; mass balance; HPLC/UV; HPLC/CAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Ciclo do protozoário <i>Plasmodium</i> sp	30
Figura 3.2 Estrutura química do ácido betulínico	36
Figura 3.3 Estrutura química do ácido ursólico	37
Figura 3.4 Estrutura química do ácido 3-O-butanoilbetulínico	39
Figura 3.5 Estrutura química do ácido 3-O-butanoilursólico	39
Figura 4.1 Exemplo de cromatografia em camada delgada (CCD) realizada. Referência dos compostos cedidos pelo LaFis (P); Amostras eluentes da semissíntese (A). Imagem 1 referente ao início da eluição, sem manchas dos analitos de interesse. Imagem 2 identifica os analitos de interesse	49
Figura 4.2 Cromatograma do composto 3-OBB com evidência de impurezas orgânicas com detecção UV	52
Figura 4.3 Cromatograma do composto 3-OBU com evidência de impurezas orgânicas com detecção UV	53
Figura 4.4 Cromatograma do composto 3-OBB com evidência de impurezas orgânicas com detecção por CAD	54
Figura 4.5 Cromatograma do composto 3-OBU com evidência de impurezas orgânicas com detecção por CAD	54
Figura 4.6 Capilar após análise de faixa de fusão para a amostra 3-OBB, indicando degradação da amostra.....	56
Figura 4.7 Curva de aquecimento obtida por DSC para o composto 3-OBU com taxa de aquecimento de 10 °C/min	58
Figura 4.8 Curva de aquecimento obtida por DSC para o composto 3-OBB com taxa de aquecimento de 10 °C/min	59
Figura 4.9 Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto 3-OBU	60
Figura 4.10 Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto 3-OBB	61
Figura 4.11 Espectro de absorção na região do ultravioleta para o composto 3-OBB	62
Figura 4.12 Espectro de absorção na região do ultravioleta para o composto 3-OBU	63

Figura 4.13 Espectro de RMN ¹ H do 3-OBB (400 MHz, em CDCl ₃)	64
Figura 4.14 Espectro de RMN ¹³ C do 3-OBB (100 MHz, em CDCl ₃)	64
Figura 4.15 Espectro de RMN ¹ H do 3-OBU (400 MHz, em CDCl ₃)	67
Figura 4.16 Espectro de RMN ¹³ C do 3-OBU (100 MHz, em CDCl ₃)	67
Figura 5.1 Cromatogramas sobrepostos do diluente (A), ácido betulínico (B) (1), ácido ursólico (C) (2), 3-O-butanoilbetulínico (D) (3), 3-O-butanoilursólico (E) (4), e solução contendo todos os compostos (H), com detecção UV.....	80
Figura 5.2 Cromatogramas sobrepostos do diluente (A), ácido betulínico (B) (1), ácido ursólico (C) (2), 3-O-butanoilbetulínico (D) (3), 3-O-butanoilursólico (E) (4), e solução contendo todos os compostos (H), com detecção CAD.....	81
Figura 5.3 Pureza de pico para o composto 3-OBU.....	82
Figura 5.4 Pureza de pico para o composto 3-OBB.....	83
Figura 5.5 Curva média encontrada a partir da construção de três curvas analíticas para o 3-OBB, com detecção UV	84
Figura 5.6 Plotagem dos resíduos encontrados na construção da linearidade para o 3-OBB, com detecção UV	85
Figura 5.7 Curva média encontrada a partir da construção de três curvas analíticas para o 3-OBB, com detecção CAD	86
Figura 5.8 Plotagem dos resíduos encontrados na construção da linearidade para o 3-OBB, com detecção CAD	87
Figura 5.9 Curva média encontrada a partir da construção de três curvas analíticas para o 3-OBU, com detecção UV	88
Figura 5.10 Plotagem dos resíduos encontrados na construção da linearidade para o 3-OBU, com detecção UV	89
Figura 5.11 Curva média encontrada a partir da construção de três curvas analíticas para o 3-OBU, com detecção CAD	90
Figura 5.12 Plotagem dos resíduos encontrados na construção da linearidade para o 3-OBU, com detecção CAD	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Dados epidemiológicos comparativos da incidência e mortalidade da malária no mundo	31
Tabela 3.2 Relação dos principais fármacos utilizados no tratamento da malária	32
Tabela 3.3 Métodos analíticos para o AB e AU descritos na literatura	37
Tabela 4.1 Resultados referentes às impurezas orgânicas para o composto 3-OBB em detector UV	52
Tabela 4.2 Resultados referentes às impurezas orgânicas para o composto 3-OBB em detector CAD	53
Tabela 4.3 Resultados referentes às impurezas orgânicas para o composto 3-OBU em detector UV	54
Tabela 4.4 Resultados referentes às impurezas orgânicas para o composto 3-OBU em detector CAD	54
Tabela 4.5 Resultado da pureza dos compostos 3-OBU e 3-OBB realizado através do balanço de massas	55
Tabela 4.6 Resultados do ponto de fusão para as amostras 3-OBB e 3-OBU	56
Tabela 4.7 Atribuições das principais frequências resultantes da análise de absorção na região do infravermelho para o composto 3-OBU	60
Tabela 4.8 Atribuições das principais frequências resultantes da análise de absorção na região do infravermelho para o composto 3-OBB	61
Tabela 4.9 Atribuições do espectro RMN ¹ H do 3-OBB em CDCl ₃	65
Tabela 4.10 Atribuições do espectro RMN ¹³ C do 3-OBB em CDCl ₃	65
Tabela 4.11 Atribuições do espectro RMN ¹ H do 3-OBU em CDCl ₃	68
Tabela 4.12 Atribuições do espectro RMN ¹³ C do 3-OBU em CDCl ₃	69
Tabela 5.1 Dados analíticos da curva média de linearidade para o composto 3-OBB, com detecção UV	84
Tabela 5.2 Resultado da regressão linear estatística para o 3-OBB com detecção UV	85
Tabela 5.3 Dados analíticos da curva média de linearidade para o composto 3-OBB, com detecção CAD	86

Tabela 5.4 Resultado da regressão linear estatística para o 3-OBB com detecção CAD	87
Tabela 5.5 Dados analíticos da curva média de linearidade para o composto 3-OBU, com detecção UV	88
Tabela 5.6 Resultado da regressão linear estatística para o 3-OBU com detecção UV	89
Tabela 5.7 Dados analíticos da curva média de linearidade para o composto 3-OBU, com detecção CAD	90
Tabela 5.8 Resultado da regressão linear estatística para o 3-OBU com detecção CAD	91
Tabela 5.9 Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBB, com detecção UV	92
Tabela 5.10 Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBB, com detecção CAD	92
Tabela 5.11 Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBU, com detecção UV	93
Tabela 5.12 Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBU, com detecção CAD	93
Tabela 5.13 Limites de detecção e quantificação para os compostos 3-OBB e 3-OBU com detecção UV e CAD	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 ASPECTOS GERAIS	31
3.2 PREVALÊNCIA	33
3.2 FÁRMACOS	34
3.3.1 Terapia farmacológica	34
3.3.2 Resistência farmacológica	36
3.3.3 Derivados triterpênicos	37
3.3.3.1 Métodos analíticos.....	39
3.3.3.2 Séries análogas aos AB e AU	40
3.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	42
3.4.1 Balanço de massas	42
4 CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPOSTOS 3- OBB E 3-OBU	47
4.1 INTRODUÇÃO	47
4.2 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS 3-OB B E 3-OB U	47
4.2.1 Materiais e métodos	47
4.2.1.1 Semissíntese dos compostos 3-OB B e 3-OB U	48
4.2.1.2 Purificação dos compostos.....	48
4.2.1.3 Recristalização	49
4.2.2 Resultados e discussão	49
4.3 BALANÇO DE MASSAS	50
4.3.1 Materiais e métodos	50
4.3.1.1 Impurezas inorgânicas	51
4.3.1.2 Impurezas voláteis.....	51
4.3.1.3 Impurezas orgânicas	52
4.3.2 Resultados e discussão	52
4.3.2.1 Impurezas inorgânicas	52
4.3.2.3 Impurezas orgânicas	52
4.4 FAIXA DE FUSÃO.....	56
4.4.1 Materiais e métodos	56
4.4.2 Resultados e discussão	57
4.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC)	58

4.5.1 Materiais e método	58
4.5.2 Resultados e discussão	58
4.6 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	60
4.6.1 Materiais e métodos	60
4.6.2 Resultados e discussão	61
4.7 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA	63
4.7.1 Materiais e métodos	63
4.7.2 Resultados e discussão	63
4.8 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹ H E ¹³ C	64
4.8.1 Materiais e métodos	64
4.8.2 Resultados e discussão	64
4.9 CONCLUSÕES	71
5 CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR CLAE/UV E CLAE/CAD PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS 3-OBB E 3-OBU	75
5.1 INTRODUÇÃO	75
5.2 PARTE EXPERIMENTAL	76
5.2.1 Desenvolvimento e otimização do método analítico	76
5.2.2 Condições cromatográficas	77
5.2.3 Substâncias químicas e reagentes	78
5.2.3.1 Preparo das soluções analíticas de 3-OBB e 3-OBU	78
5.2.4 Validação do método analítico	78
5.2.4.1 Especificidade	79
5.2.4.2 Linearidade	79
5.2.4.3 Precisão	79
5.2.4.4 Exatidão	80
5.2.4.5 Limites de detecção e quantificação	80
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.3.1 Especificidade	80
5.3.2 Linearidade	84
5.3.3 Precisão	93
5.3.4 Exatidão	95
5.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação	95
5.4 CONCLUSÕES	95
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1 INTRODUÇÃO

A malária é considerada um dos maiores desafios do século XXI. Cientistas e organizações mundiais têm unido esforços para debater e encontrar alternativas para a prevenção e o tratamento da doença (GARDNER et al., 2009).

Em 2016, a Organização Mundial da Saúde relatou 91 países e territórios do mundo em situação endêmica - estima-se que 226 milhões de casos de malária tenham ocorrido neste ano e que, atualmente, cerca de 3,4 bilhões de pessoas estejam em risco. No Brasil, a incidência dos casos é considerada alta e se concentra na região norte (WHO, 2016).

Patologia causada por diversos protozoários do gênero *Plasmodium*, a malária tem transmissão vetorial por mosquitos do gênero *Anopheles*, o que contribui para a ampla distribuição geográfica e a dificuldade de controle da doença (WHO, 2013). A resistência do plasmódio aos fármacos em uso é um dos maiores problemas na erradicação da doença. Nos últimos 30 anos, somente um fármaco sintético foi descoberto, a mefloquina. Houve também um aumento da resistência do parasita da espécie *Plasmodium falciparum*, o mais virulento para o ser humano, ao fármaco mais utilizado, cloroquina (VANGAPANDU et al., 2007; WOODROW e KRISHNA, 2006). Assim, é importante que as buscas por novos fármacos que possam ser utilizados no combate às endemias, sejam isoladas ou associadas aos fármacos já utilizados.

Neste sentido, SILVA e colaboradores (2013) sintetizaram duas séries de análogos aos triterpenos ácido betulínico (AB) e ácido ursólico (AU), através de esterificações no carbono C3 das referidas moléculas, resultando em compostos não citotóxicos e com comprovada atividade antimalárica. Os compostos derivados ácido 3-O-butanoilbetulínico (3-OBB) e ácido 3-O-butanoilursólico (3-OBU) apresentaram atividade antimalárica até cinco vezes maior do que seus precursores, AB e AU, respectivamente.

Para a avaliação e o monitoramento efetivos de um novo fármaco, é indispensável a elucidação de aspectos ligados às características físico-químicas. Assim, o desenvolvimento de metodologias analíticas tem papel fundamental, pois propicia uma avaliação possível de identificar alterações que possam comprometer a atividade terapêutica ou agregar características tóxicas ao composto (AHUJA, 2001; YOSHIOKA et al., 2002).

Pelas razões estabelecidas, justifica-se o estudo dos compostos ácidos 3-OBB e 3-OBU, selecionados para análise e obtenção de dados científicos relacionados às características qualitativas e quantitativas, na forma de matéria-prima, a fim de explorar seus potenciais terapêuticos e contribuir para o controle de qualidade destas moléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar método analítico para a determinação qualitativa e quantitativa dos compostos ácido 3-O-butanoilbetulínico (3-OBB) e ácido 3-O-butanoilursólico (3-OBU) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores UV (CLAE/UV) e CAD (CLAE/CAD).

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os compostos 3-OBB e 3-OBU através da determinação da faixa de fusão, calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia no ultravioleta (UV), no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) qualitativo ¹H e ¹³C;
- Desenvolver e validar método analítico para a identificação e quantificação simultânea dos compostos 3-OBB e 3-OBU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores ultravioleta (CLAE/UV) e aerossol carregado (CLAE/CAD).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais

A malária é uma parasitose que antecede a história do homem e possui impactos históricos desde os primórdios das civilizações. As primeiras descrições referentes à doença datam da Grécia antiga com poemas que fazem menção às febres terçã e quartã, sintomas hoje relacionados à patologia (SCHLAGENHAUF, 2004). Muitos outros registros históricos, literários e científicos foram feitos desde então.

Apesar de afligir o ser humano há três mil anos, somente na segunda metade do século XIX, em 1880, o agente etiológico da malária foi identificado. A descoberta é atribuída ao médico francês Charles Laveran, que nomeou o parasita flagelado de *Oscillaria malariae* (LAVERAN, 1881). O parasita de Laveran era, na verdade, um dos estágios sanguíneos do *Plasmodium falciparum*, espécie que parasita o homem.

O termo malária vem do italiano *mal aire*, em tradução livre, “mau ar”, uma vez que a transmissão da doença era relacionada ao ar de pântanos. O verdadeiro vetor só foi descoberto em 1897 quando Ross estudou a transmissão do parasita em uma população aviária e identificou a transmissão pelo mosquito *Culex fatigans* (ROSS, 1897). No ano seguinte, os cientistas Grassi, Bignami e Bastianelli mostraram que a malária humana era transmitida pelo mosquito do gênero *Anopheles* (GRASSI, 1899).

Hoje se sabe que a malária humana é causada por cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*. Quatro destas espécies – *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* – são espécies que disseminam o parasita de pessoa para pessoa através da picada da fêmea dos mosquitos do gênero *Anopheles*. Casos da doença pelo *P. knowlesi* são raros e atribuídos a mosquitos contaminados por macacos que picam o ser humano, chamada de transmissão zoonótica. Das 400 espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* conhecidas, cerca de 30 são vetores considerados importantes na difusão da doença (WHO, 2015).

O ciclo do plasmódio, ilustrado na figura 3.1, compreende duas fases: uma assexuada, no homem, e uma fase sexuada, que ocorre no mosquito. O prognóstico e as intermitências sintomáticas dependem da espécie de *Plasmodium* infectante. Os termos terçã maligna, terçã benigna e quartã são denominações da doença causadas pelas espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malarae*, respectivamente, devido aos

tempos de ciclo de cada protozoário – 48 horas para as malárias terças e 72 horas para a quartã. As manifestações clínicas da malária são devido à fase eritrocitária no desenvolvimento dos parasitas (BROWN *et al.*, 2000).

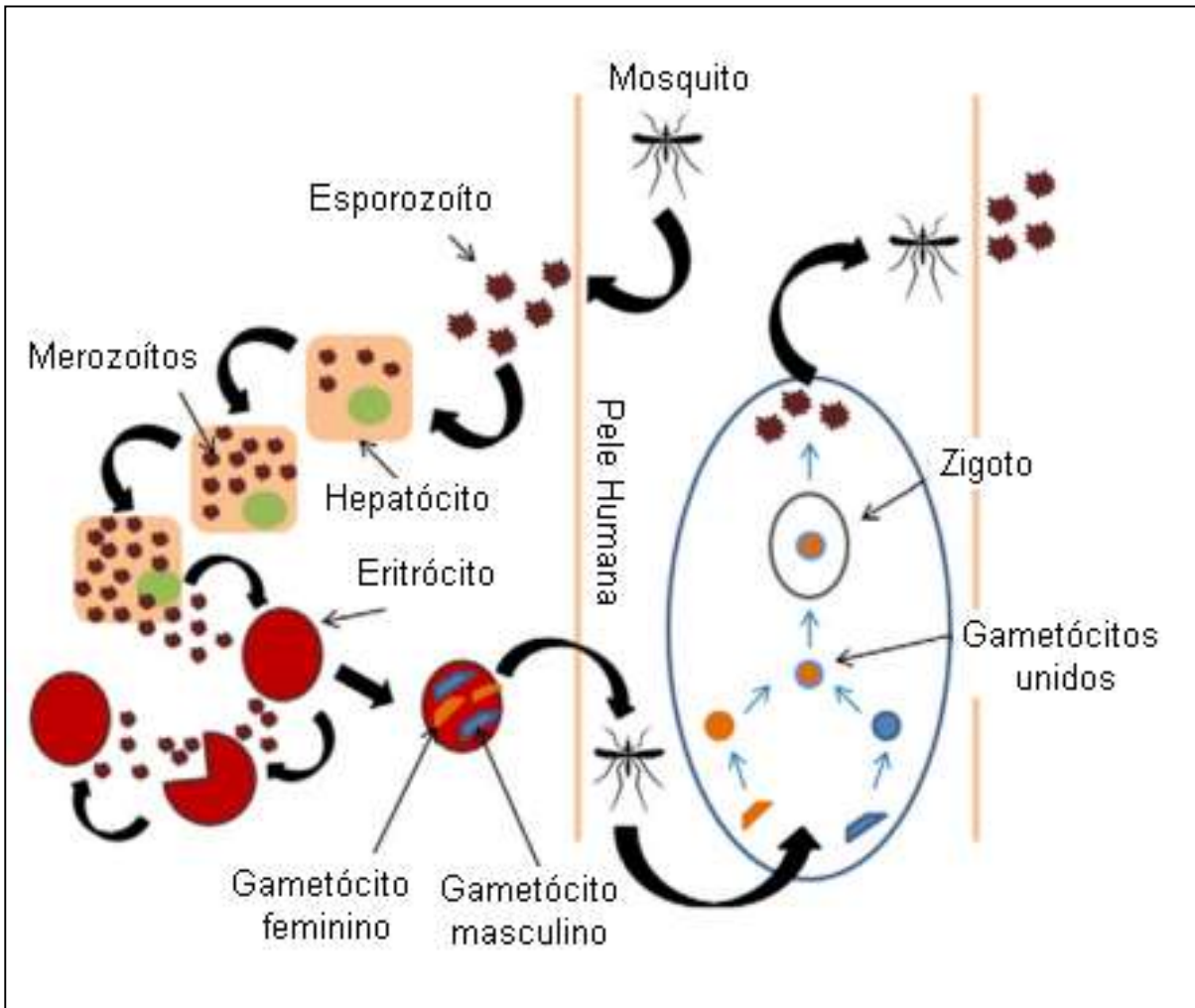


Figura 3.1 Ciclo do protozoário *Plasmodium* sp. (Fonte: adaptado de ADITYA *et al.*, 2013)

Os primeiros sintomas da malária compreendem dores de cabeça, fadiga, náusea, dores musculares e febre irregular. Convulsões generalizadas são associadas especificamente ao *P. falciparum* (WHITE *et al.*, 2013). Anemia severa e hipoglicemia são comuns em crianças, enquanto endema pulmonar e danos renais são mais comuns em adultos. A ausência de tratamento pode levar a quadros de acidose, coma e morte (DONDORP *et al.*, 2013).

As intervenções recomendadas pela Organização Mundial da Saúde incluem controle do vetor; confirmação de diagnóstico da malária através de microscopia e testes rápidos em todos os casos de suspeita; tratamento com agentes antimaláricos

de acordo com a espécie de protozoário e as informações geográficas de resistência ao fármaco, e prevenções específicas das populações mais vulneráveis (WHO, 2016).

3.2 Prevalência

Considerada endêmica em mais de 90 países e territórios, a malária é a doença parasitária mais abrangente, em termos geográficos e populacionais, do mundo. Segundo a OMS, mais de 200 milhões de pessoas são infectadas por ano e há estimativa de 400 mil óbitos no mesmo período (WHO, 2016).

A região mais afetada é a África com mais de 90% dos casos, seguido do sudeste da Ásia, da região do mediterrâneo oriental e da América do Sul. Depois dos países africanos, a maior incidência se situa na Índia, no Brasil, no Vietnã, na Colômbia e nas Ilhas Salomão. No Brasil, a região amazônica é a mais atingida com 150 mil casos confirmados e estimativa de 230 mil infectados em 2015.

Entre as faixas etárias, a maior incidência e mortalidade da doença está em crianças de 1 a 5 anos. Geralmente crianças abaixo de um ano estão imunizadas pelas imunoglobulinas herdadas da mãe e acima de cinco anos já possuem um sistema imunológico que resiste quando há tratamento (WHO, 2015).

A tabela 3.1 registra os dados epidemiológicos da incidência e mortalidade da malária, no mundo, nos últimos anos.

Tabela 3.1 - Dados epidemiológicos comparativos da incidência e mortalidade da malária no mundo (Fonte: Adaptado de World Malaria Report (2012 – 2016))

Ano	Número de países endêmicos	Número de pessoas em risco	Número de casos (milhões) ^a	Número de óbitos ^a	% de crianças menores do que 5 anos
2000	106	-	205 – 316	653 mil - 1,1 milhão	86
2012	-	3,4 bilhões	135 – 287	473 – 789 mil	77
2013	97 (+7) ^b	3,4 bilhões	124 – 283	367 – 755 mil	78
2014	-	3,3 bilhões	-	-	-
2015	95 (+6) ^b	3,2 bilhões	149 – 303	236 – 635 mil	70
2016	91	3,4 bilhões	148 – 304	235 – 639 mil	70

^a Entre 80 e 90% dos casos e óbitos são em território africano;

^b Número de países de territórios que eliminaram a malária e estão sob observação.

Além dos fatores geográficos, o risco de infecção está associado às condições socioeconômicas. Segundo estudo de meta-análise realizado em regiões endêmicas, crianças de 0 a 15 anos na linha da pobreza tem o dobro de chances de contraírem a doença em relação às crianças em classes socioeconômicas mais altas (TUSTING *et al.*, 2013).

3.2 Fármacos

3.3.1 Terapia farmacológica

A terapia farmacológica da malária depende da região geográfica, da espécie de plasmódio infectante, do estágio e do quadro clínico do paciente (WHO, 2016). A tabela 3.2 apresenta uma relação dos principais fármacos utilizados na terapia de combate à malária.

Tabela 3.2 - Relação dos principais fármacos utilizados no tratamento da malária (continua)

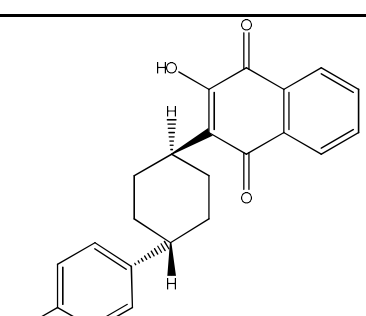
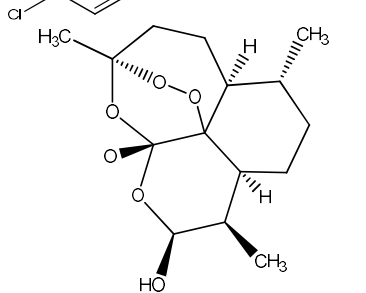
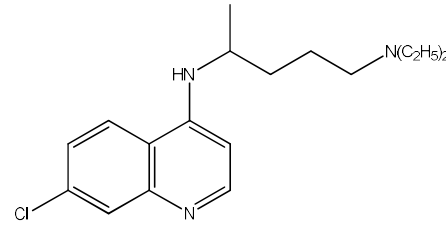
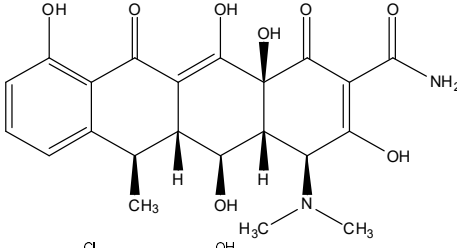
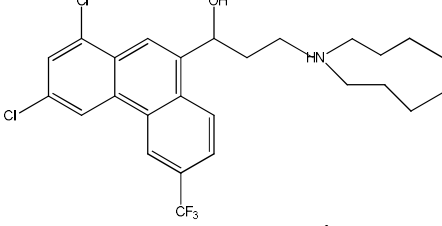
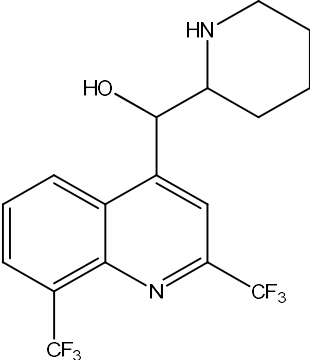
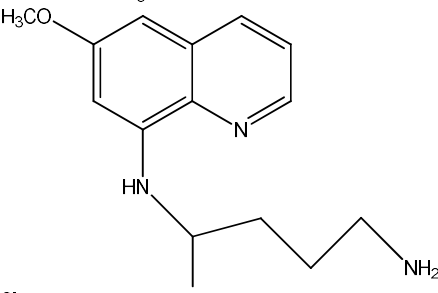
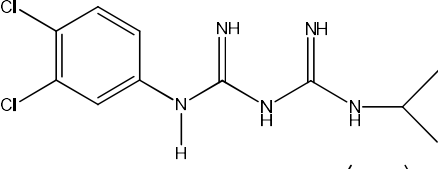
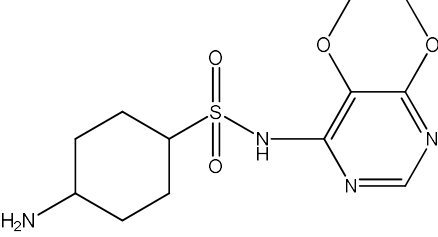
Fármaco	Estrutura química	Mecanismo de ação proposto	Referências
Atovaquona		Atua nas funções mitocondriais do parasita	BAGGISH, A.L.; HILL, 2002; NIXON <i>et al.</i> , 2013; PAINTER, 2007.
Artemisinina		Modula o estresse oxidativo do parasita; Atua nas funções mitocondriais do parasita	CUI, 2009.
Cloroquina		Inibem a formação de vesículas e consequente transporte proteico celular; Inibe a formação de hemozoína	SLATER, 1993.

Tabela 3.2 - Relação dos principais fármacos utilizados no tratamento da malária (conclusão)

Fármaco	Estrutura química	Mecanismo de ação proposto	Referências
Doxiciclina		Bloqueio da expressão gênica do apicoplasto; Inibição da síntese proteica.	TAN, 2011.
Halofantrina		Inibição da formação da hemozoína Inibição das plasmepsinas, proteases do parasita.	FRIEDMAN; CATLISCH, 2009.
Mefloquina		Inibe a formação de hemozoína; Degradação do heme sanguíneo.	DASSONVILLE- KLIMPT, 2011.
Primaquina		Inibição da formação de vesículas celulares; Inibição do transporte proteico celular.	HIEBSCH, 1991; DEEPIKA, 2011; OLENICK, 1972.
Proguanil		Aumenta, sinergicamente, os efeitos da atovaquona	SRIVASTAVA; VAIDYA, 1999.
Sulfadoxina		Inibição da síntese de ácido fólico.	WANG <i>et al.</i> , 1997.

Devido à resistência aos fármacos usuais, a monoterapia tem sido substituída por associações de fármacos (AWEEKKA; GERMAN, 2008). Um exemplo comum é o

proguanil associado à atovaquona para ação sinérgica no tratamento (SRIVASTAVA; VAIDYA, 1999).

3.3.2 Resistência farmacológica

A resistência do plasmódio aos fármacos disponíveis é reconhecida como um dos maiores problemas para a erradicação da malária. É definida, essencialmente, como a habilidade do parasita em se multiplicar na presença de fármacos em concentrações usuais terapêuticas.

Na década de 1950, a resistência à cloroquina, o fármaco mais utilizado, foi detectada no sul asiático e na América do Sul pela primeira vez. Em 10 anos, o problema foi observado no continente africano (MEHLOTRA *et al.*, 2008). Recentemente, observou-se rápido aumento da resistência do *P. falciparum* ao fármaco em todo o mundo (WOODROW e KRISHNA, 2006). Nos últimos 30 anos, um único antimalárico sintético, a mefloquina, foi desenvolvido. Além deste, somente a artemisinina, produto natural (cascas de *Artemisia annua*) foi adicionado ao coquetel de tratamento, e somente indicado para casos de malária cerebral.

As vias de resistência do *Plasmodium* são múltiplas e dependem do fármaco em questão: as sulfas atingem a dihidropteroato sintase (DHPS), enzima necessária na síntese de ácido fólico do parasita, na qual a mutação ocorre de modo progressivo, sob ação do fármaco, através de mudanças que ocorrem nos nucleotídeos. Tais mutações se acumulam através do processo, dificultando cada vez mais a eficácia do tratamento (GREGSON; PLOWE, 2005; OLLIARO, 2001).

Com ação nas funções mitocondriais, a resistência do plasmódio à atovaquona se dá devido à farmacocinética, uma vez que possui absorção lenta e a alta lipofilicidade expõe o parasita a baixos níveis do fármaco com o tempo. A solução encontrada foi a combinação com o proguanil, que aumenta a efetividade do tratamento com a atovaquona. Este processo ocorre através da ação do metabólito cicloguanil, que age como inibidor da enzima diidrofolato redutase, diminuindo a eliminação da atovaquona e aumentando a biodisponibilidade do fármaco (HUDSON, 1984 *apud* OLLIARO).

No caso da cloroquina e derivados, estudos relatam a presença de transportadores resistentes à cloroquina pelo *Plasmodium falciparum* (PfCRT), que aumentam o efluxo do fármaco para fora dos vacúolos. A extensão desta resistência

se dá por mutações no gene-1 de resistência a multidrogas (PfMDR) (VALDERRAMOS; FIDOCK, 2006). Este processo de resistência, ainda em estudo, é um dos fatores-chave associados ao tratamento da malária. Outro mecanismo de resistência envolvendo transportador, o PfATP6, acontece com a artemisinina e derivados, mas ainda é pouco elucidado (ECKSTEIN-LUDWIG, E., 2003).

A resistência a novos e mais caros agentes terapêuticos, como a mefloquina e a halofantrina, além dos fármacos usuais supracitados, a resistência dos mosquitos aos pesticidas e a restrição do uso de sprays químicos, entre outros, levaram à procura por alternativas para o tratamento da malária [VANGAPANDU *et al.*, 2006].

3.3.3 Derivados triterpênicos

SILVA e colaboradores (2013) sintetizaram duas séries de análogos aos triterpenos ácido betulínico (AB) e ácido ursólico (AU) com o intuito de melhorar a atividade terapêutica destas moléculas, reduzir a toxicidade e procurar por novos alvos terapêuticos. O estudo investigou a substituição de ésteres no carbono C3 dos ácidos betulínico e ursólico e avaliou a atividade antimalárica, resultando em moléculas com bom potencial de ação.

O ácido betulínico ou ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-em-28-oico, figura 3.2, é um triterpeno pentacíclico com estrutura semelhante ao lupano e amplamente distribuído no reino vegetal (YOGEE SWARI e SRIRAM, 2005).

Diversas atividades biológicas do AB e derivados foram descobertas e estudadas. Entre elas estão as atividades anti-HIV (FUJIOKA *et al.*, 1994; MAYAUX *et al.*, 1994; KASHIWADA *et al.*, 1996; SOLER *et al.*, 1996; XU *et al.*, 1996), antineoplásica (MUKHERJEE *et al.*, 2006), antibacteriana (SCHÜHLY *et al.*, 1999; CHANDRAMU *et al.*, 2003), antimalárica (BRINGMANN *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2013) e anti-helmíntica (DOMINGUEZ-CARMONA *et al.*, 2010), entre outras.

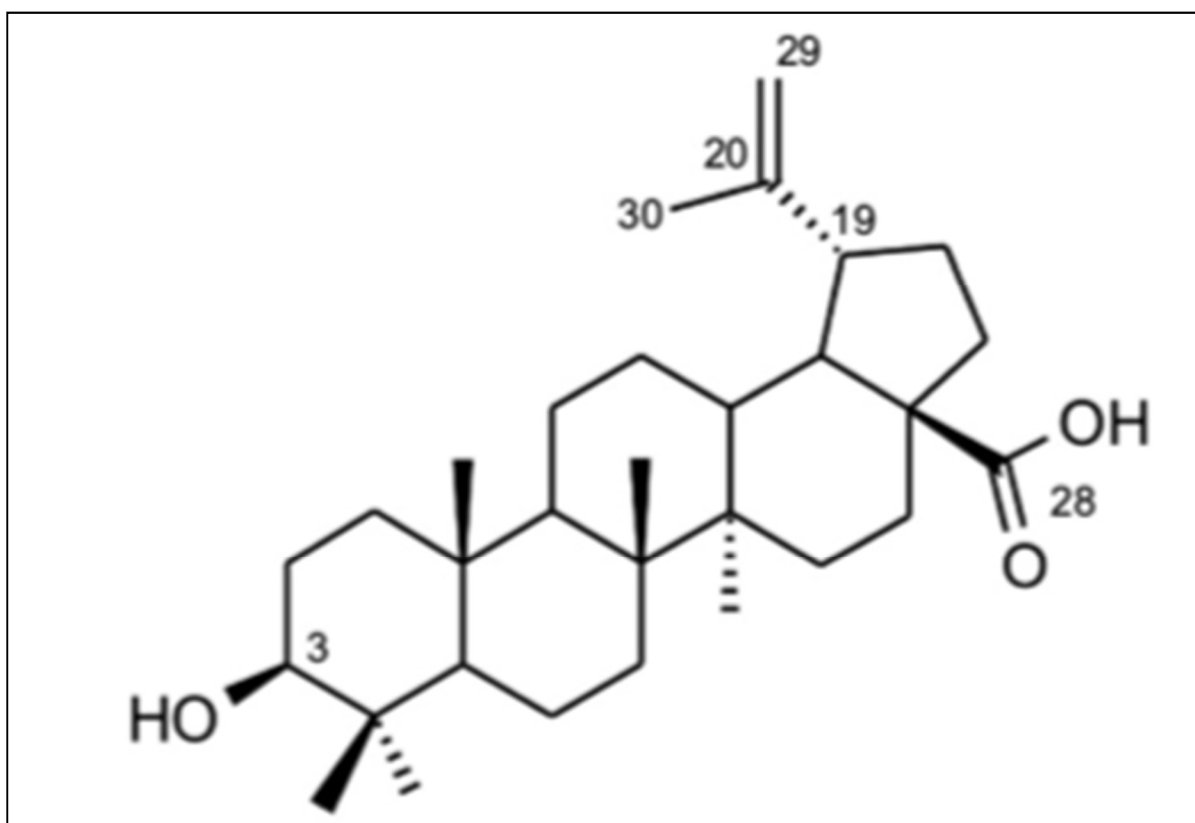


Figura 3.2 - Estrutura química do ácido betulínico (AB).

Os estudos sobre a atividade anti-HIV do AB levaram à descoberta do [3-O-(3',3'-dimetilsuccinato) ácido betulínico] ou Bevirimat, derivado do ácido betulínico que se encontra em estudos de fase clínica (SMITH et al, 2007). O Bevirimat é o primeiro de uma nova classe de inibidores da maturação viral no combate ao HIV, demonstrando o potencial destas moléculas na descoberta de novas alternativas farmacológicas (MARTIN; SALZWEDEL e ALLAWAY, 2008).

A atividade antimalárica dos derivados do AB foi demonstrada como promissora, substituindo-se regiões farmacóforas, como os carbono C3 e C28, para melhorar a interação da molécula com o receptor e, assim, melhorar a eficácia dos potenciais fármacos (INNOCENTE *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

O ácido ursólico ou ácido 3 β -hidroxi-12-urso-12-em-28-óico, figura 3.3, é um triterpeno com diversas atividades biológicas conhecidas, entre elas antitumoral (VERMA, A.K. *et al.*, 1980; TOKUDA, H. *et al.*, 1986), anti-inflamatória (RYU, S.Y. *et al.*, 2000), antioxidante (SUH, N. *et al.*, 1998), atividade antitripanossoma (LEITE *et al.*, 2001), atividade antimalárica (LIU, J., 1995), entre outras.

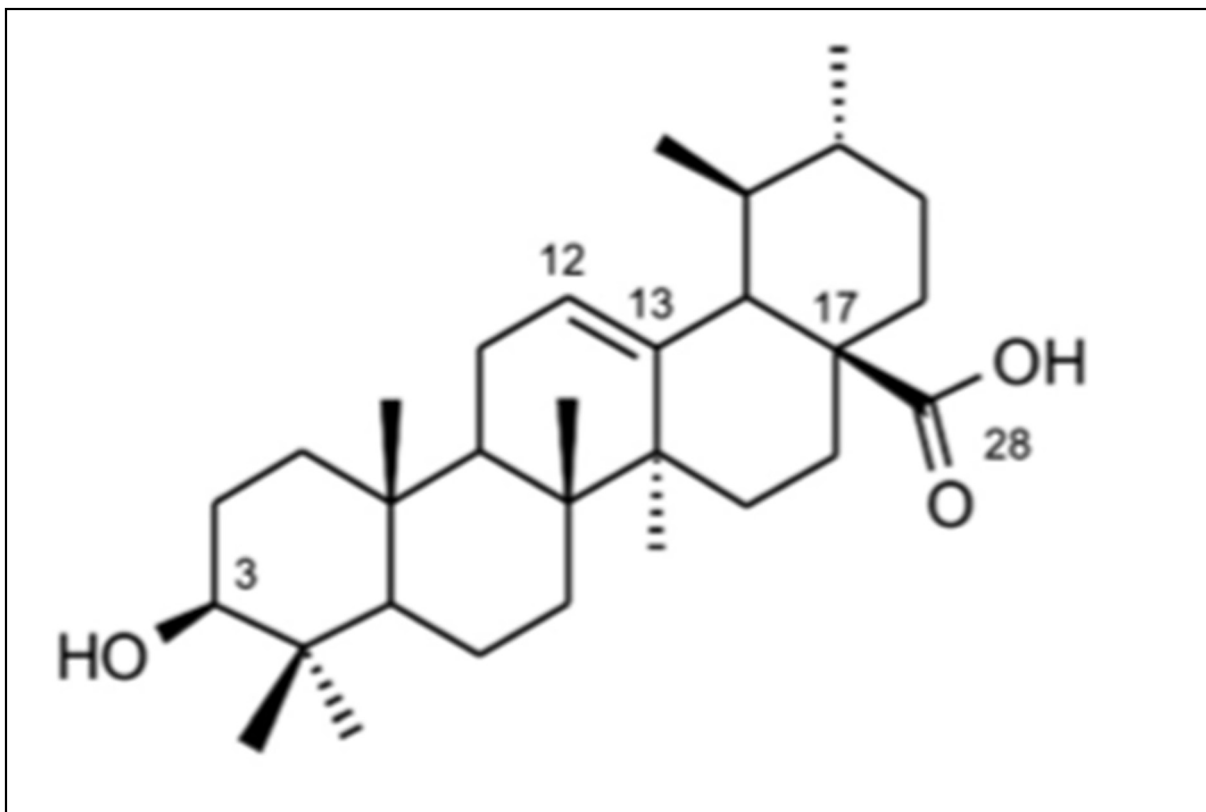


Figura 3.3 - Estrutura química do ácido ursólico (AU)

3.3.3.1 Métodos analíticos

A literatura apresenta grande variedade de estudos envolvendo os AU e AB, assim como métodos analíticos cromatográficos para a identificação e quantificação destas moléculas. A tabela 3.3 lista as principais metodologias encontradas.

Tabela 3.3 - Métodos analíticos para o AB e AU descritos na literatura (continua)

Amostra	Coluna	FM	Parâmetros	Referência
AB	C18	ACN:Metanol:H ₂ O pH 2,8 (70:20:10, v/v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	HUSSAIN <i>et al.</i> , 2012
AB	C18	Acetonitrila:Água pH 3,0 (90:10, v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	OLIVEIRA; SANTOS e ESPÍNDOLA, 2002
AB	C18	Acetonitrila:Água (84:16, v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	DUBEY e GOEL, 2013
AB	C18	Acetonitrila:Água (86:14, v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	ZHAO; YAN e CAO, 2007

Tabela 3.3 - Métodos analíticos para o AB e AU descritos na literatura (conclusão)

Amostra	Coluna	FM	Parâmetros	Referência
AB	C18	Acetonitrila:Água pH 3,0 (90:10, v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	KUMAR <i>et al.</i> , 2010
AB	C18	Acetonitrila:Água (84:16, v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	PAIA <i>et al.</i> , 2011
AU	C8	A: ACN:Água (30:70, v/v) B: Acetonitrila	Isocrático HPLC - Fluorescência	LI <i>et al.</i> , 2011
AU	C18	Acetonitrila:Água (85:15, v/v)	Isocrático 215 nm HPLC-MS	GBAGUIDI <i>et al.</i> , 2005
AU	C18	MeOH:Água:Ácido Acético:Trietilamina (88:12:0,05:0,06, v/v/v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	FANG <i>et al.</i> , 2010
AU	C18	Metanol:Tampão Fosfato 0,03 M pH 2,8 (88:12, v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	ZHOU <i>et al.</i> , 2007
AU	C18	Metanol:Ácido Fosfórico:Água (88:0,05:11,95, v/v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	WANG; WANG; GAO, 2008
AU	C18	Metanol:Tampão Fosfato 0,01 M pH 2,8 (88:12, v/v)	Isocrático 210 nm HPLC-UV	LEEEA <i>et al.</i> , 2009

3.3.3.2 Séries análogas aos AB e AU

SILVA e colaboradores (2013) descreveram as análises realizadas com os compostos sintetizados a partir dos AB e AU. No estudo, foram avaliadas modificações no carbono-3 das moléculas, a influência do tamanho da cadeia lateral e a presença de grupos polares ou lipofílicos. Dos 18 compostos sintetizados e testados, foram escolhidos dois derivados acila de cadeia lateral curta, com melhor potencial antimalárico para este estudo físico-químico, denominados ácido 3-O-butanoilbetulínico (3-OBB), figura 3.4, e ácido 3-O-butanoilursólico (3-OBU), figura 3.5.

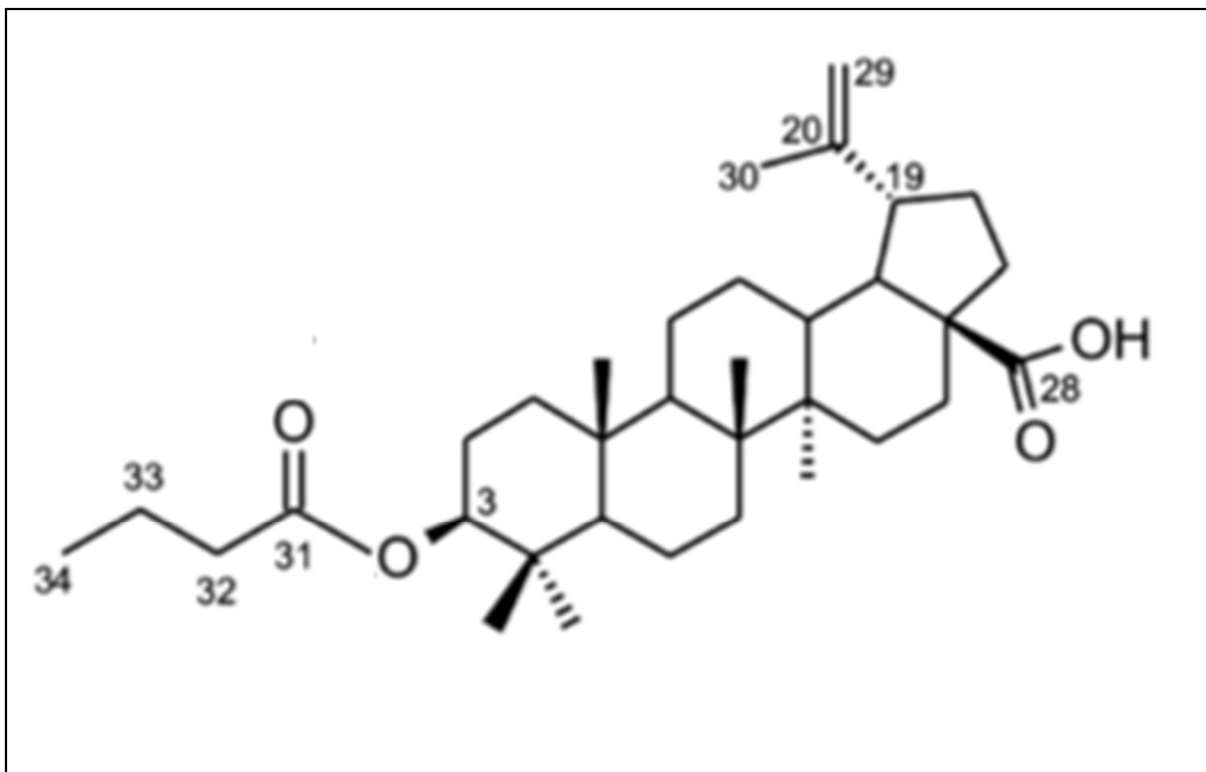


Figura 3.4 - Estrutura química do ácido 3-O-butanoilbetulínico (3-OBB)

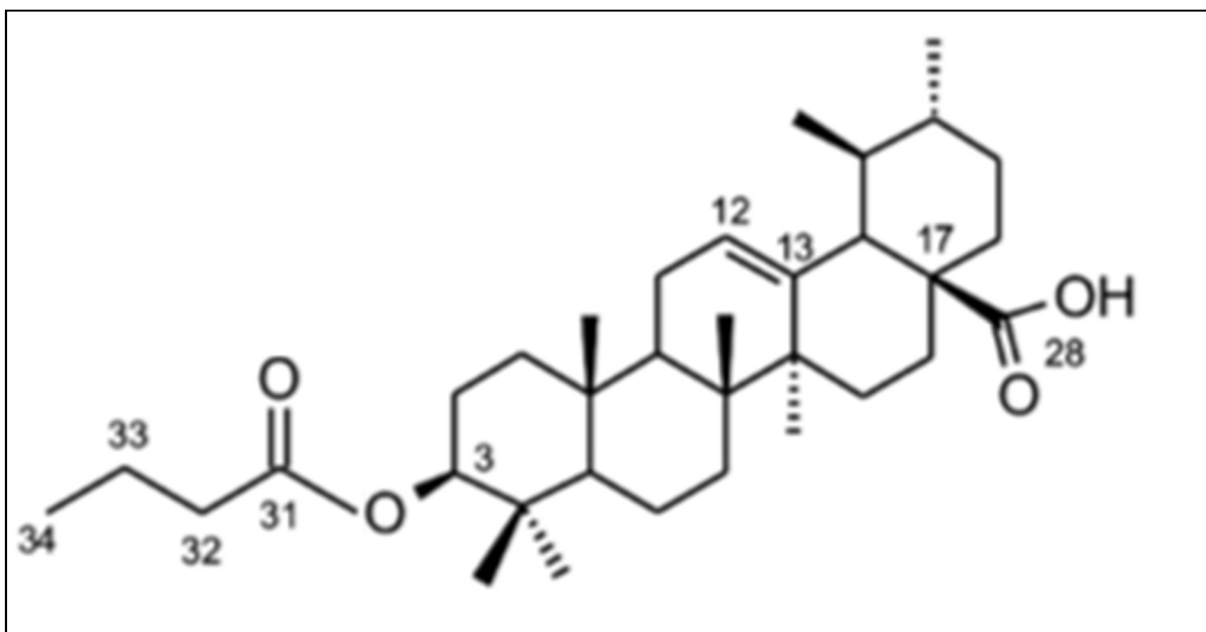


Figura 3.5 - Estrutura química do ácido 3-O-butanoilursólico (3-OBU)

Os resultados indicaram que os derivados têm ação no ciclo eritrocítico, impedindo a formação da β -hematina em cepas de *Plasmodium falciparum* 3D7 sensíveis à cloroquina. A definição de atividade antimalárica utilizada no estudo foi a descrita por RAMALHETE, C. (2011), na qual um $IC_{50} \leq 1 \mu M$ define como atividade potente; $IC_{50} 1 - 10 \mu M$, boa atividade; $IC_{50} 10 - 30 \mu M$, atividade moderada; e $IC_{50} \geq$

30 μM , inatividade. Os derivados 3-OBB e 3-OBU resultaram em IC_{50} de $5 \pm 0,14 \mu\text{M}$ e $7 \pm 0,15 \mu\text{M}$, respectivamente, ou seja, boa atividade antimalária.

As análises demonstraram, ainda, que os compostos não apresentaram citotoxicidade em células embrionárias renais HEK293T, inferindo potencial *in vivo*.

Em testes realizados pelos pesquisadores, não houve alteração do potencial de membrana ($\Delta\Psi\text{m}$) nas concentrações testadas, sugerindo que o mecanismo de ação antimalária destes compostos é distinto daquele da atovaquona.

A identificação dos compostos citados foi realizada através do ponto de fusão, espectroscopia no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) (SILVA et al, 2013). No entanto, não há caracterização ou métodos analíticos quantitativos disponíveis na literatura a fim de explorar o potencial farmacológico e físico-químico destes compostos.

3.4 Validação dos métodos analíticos

A validação de metodologias analíticas permite demonstrar a capacidade do método de cumprir, estatisticamente, a finalidade para a qual foi proposto (ICH, 2005).

É importante, uma vez que garante a qualidade, a segurança e a eficácia das matérias-primas e dos produtos farmacêuticos. Para tanto, uma metodologia analítica precisa ser validada conforme parâmetros estabelecidos pelos compêndios de referência, tais como ICH, USP e ANVISA. Para testes de identificação e quantificação, os parâmetros analíticos utilizados são: especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Além disso, as definições físico-químicas e metodologias desenvolvidas podem auxiliar na continuidade das pesquisas científicas envolvendo estas moléculas e outros antimaláricos que apresentam potencial terapêutico.

3.4.1 Balanço de massas

O balanço de massas pode ser definido como a aplicação da lei da conservação de massas na síntese e degradação químicas. Na linha farmacêutica, o balanço de massas indica as perdas e resquícios típicos de processos de manufatura de compostos químicos (MACKAPLOW, M.B., 2010). É comumente utilizada para

estabelecer a potência de material de referência farmacêutico através da subtração quantitativa das impurezas presentes (CULBERT, B.D., 2004).

Segundo GÖRÖG, S. (2008), o balanço de massas tem maior qualidade do que a simples análise cromatográfica para quantificar a pureza de substâncias químicas, principalmente nos casos nos quais não há um padrão primário disponível. Para tanto, leva em consideração as impurezas voláteis, orgânicas e inorgânicas que possam fazer parte da amostra.

4 CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPOSTOS 3-OBB E 3-OBU

4.1 Introdução

Na busca por novos e melhores fármacos, a avaliação das características físico-químicas dos candidatos é de extrema importância e visa acumular o máximo de informação sobre o comportamento molecular, a fim de conhecer as possíveis interações químicas ou condições especiais necessárias no estudo destes protótipos. Além disso, a qualidade de um medicamento é fator fundamental para assegurar a eficácia e diminuir os efeitos indesejáveis provenientes de impurezas ou produtos de degradação (MOREIRA et al., 2010).

O objetivo deste estudo é caracterizar físico-quimicamente os compostos ácido 3-O-butanoilbetulínico (3-OBB) e o ácido 3-O-butanoilursólico (3-OBU). Para tanto, foram analisados espectros de absorção nas regiões do ultravioleta, infravermelho e RMN 1H e 13C para a identificação das estruturas moleculares. Foram realizadas, também, análises de faixa de fusão e calorimetria exploratória diferencial a fim de registrar o comportamento térmico e caracterizar estas substâncias. Além disso, métodos analíticos quantitativos por CLAE-UV e CLAE-CAD foram desenvolvidos e validados e podem servir para identificar e quantificar estes candidatos a fármacos.

Para aplicação de métodos analíticos, comumente, utiliza-se uma substância química de referência (SQR) para assegurar, comparativamente, a identidade e o teor do fármaco. Neste caso, como são moléculas sintetizadas pelo nosso grupo de pesquisa e não possuem referência compendial, optou-se pelo balanço de massas para quantificar a pureza dos compostos.

4.2 Obtenção dos compostos 3-OBB e 3-OBU

4.2.1 Materiais e métodos

Os procedimentos de semissíntese e purificação dos compostos 3-OBB e 3-OBU, a partir dos ácidos betulínico e ursólico, foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (LaFiS) – UFRGS.

Os ácidos betulínico e ursólico são provenientes de cascas de *Platanus acerifolia* (rendimento de 2,0%) e resíduo industrial de cascas de maçã *Malus*

domestica (rendimento de 2,8%), respectivamente, e foram cedidos pelo LaFiS para a realização da semissíntese aqui descrita.

4.2.1.1 Semissíntese dos compostos 3-OBB e 3-OBU

A semissíntese foi realizada conforme descrito por SILVA e colaboradores (2013). Em balão de fundo redondo, adicionou-se anidrido butírico (1,1 mmol, 5 Eq), 4-dimetilaminopiridina (0,22 mmol, 1 Eq) e o ácido de interesse (betulínico ou ursólico) diluído em piridina (0,22 mmol, 1 Eq). O meio reacional foi submetido à agitação em temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 1 h e, então, adicionou-se diclorometano até a precipitação dos ésteres (3-OBB e 3-OBU). O rendimento desta síntese, após purificação dos compostos, foi em torno de 40% para ambos os protótipos.

4.2.1.2 Purificação dos compostos

A purificação dos compostos 3-OBB e 3-OBU foi feita através de cromatografia em coluna de gel de sílica. Inicialmente, utilizou-se cicloexano: diclorometano 95:5 (v/v) como eluente, com incremento de 5% de diclorometano até as concentrações finais de cicloexano: diclorometano 60:30 (v/v) para o 3-OBB, e de cicloexano: diclorometano 55:45 (v/v) para o 3-OBU. O intuito foi alterar lentamente a polaridade, eluindo os subprodutos de síntese mais apolares e, então, os compostos de interesse. Foram adicionados 100 mL a 200 mL de cada proporção do eluente a cada nova eluição.

As frações resultantes foram acondicionadas em frascos de 5 mL e analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) para avaliação prévia da pureza e identificação dos compostos. As referências utilizadas foram amostras de 3-OBB e 3-OBU previamente sintetizadas e cedidas pelo LaFiS.

As amostras para CCD foram solubilizadas em diclorometano, eluíram em placas de gel de sílica 60 F₂₅₄ com fase móvel composta por diclorometano com 5% (v/v) de metanol. As manchas foram reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico.

Depois da purificação, todas as alíquotas identificadas que continham o analito de interesse foram misturadas e evaporadas. A pureza foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) acoplada a arranjo de diodos (DAD).

O método cromatográfico utilizado e o preparo de amostras e reagentes para avaliação da pureza são os mesmos utilizados pelo método CLAE-UV desenvolvido e validado conforme Capítulo 5.

4.2.1.3 Recristalização

Para melhorar a pureza dos compostos obtidos, foi necessária recristalização. Foram testados vários solventes, incluindo acetonitrila a frio e a quente, acetonitrila:água (50:50, v/v), acetonitrila:água (75:25, v/v), acetonitrila:acetato de etila (50:50, v/v), entre outros. O teste com acetonitrila a quente obteve melhor resultado. O processo foi repetido em triplicata para máximo rendimento e, então, os compostos foram recristalizados após filtração a vácuo. A pureza foi avaliada por CLAE-UV acoplada a arranjo de diodos (DAD).

O método cromatográfico utilizado e o preparo de amostras e reagentes para avaliação da pureza são os mesmos utilizados pelo método CLAE-UV desenvolvido e validado conforme Capítulo 5.

4.2.2 Resultados e discussão

A identificação dos compostos, após síntese, foi realizada com sucesso por cromatografia em camada delgada (CCD), figura 4.1. A pureza cromatográfica obtida depois da purificação por cromatografia em coluna foi em torno de 80% para ambos os compostos.

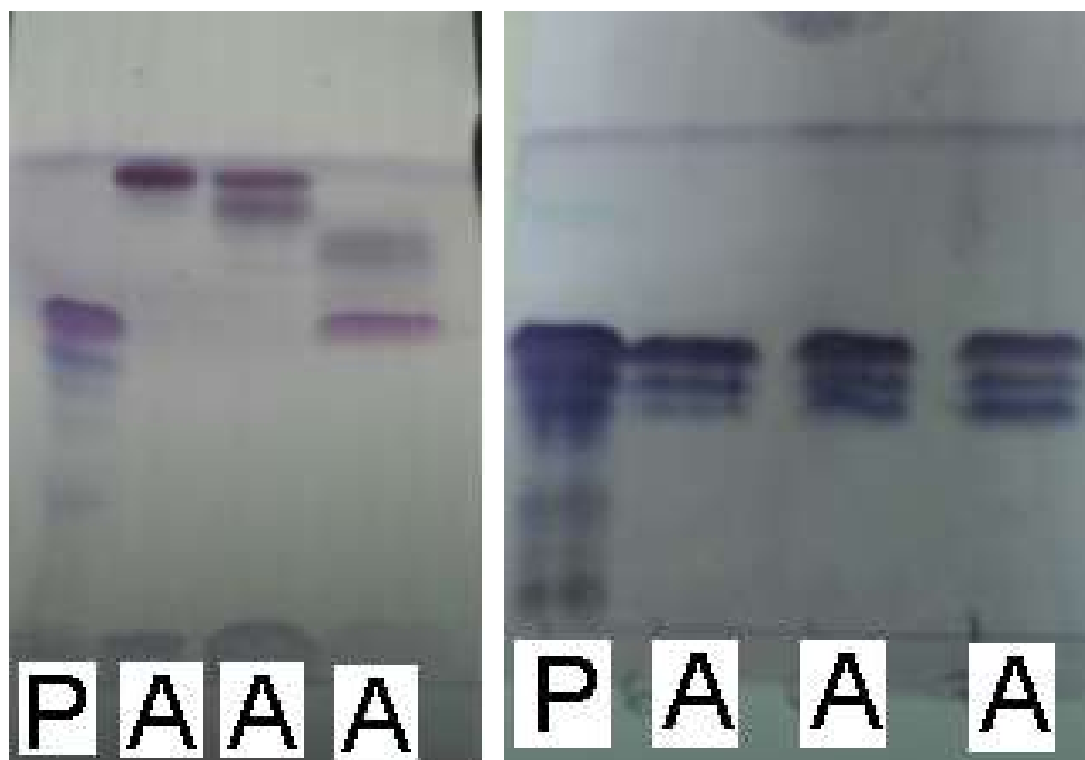


Figura 4.1 - Exemplo de cromatografia em camada delgada (CCD) realizada. Referência dos compostos cedidos pelo LaFis (P); Amostras eluentes da semissíntese (A). Primeira imagem referente ao início da eluição, sem manchas dos analitos de interesse. Segunda imagem identifica os analitos de interesse.

A purificação por recristalização elevou a pureza dos compostos 3-OBB e 3-OBU para 94,9% e 84,2%, respectivamente. Subsequentes recristalizações poderiam aumentar a pureza do composto, mas não se deu continuidade às purificações devido ao baixo rendimento do processo e à necessidade de quantidade suficiente de amostra para realizar todas as análises necessárias dentro do tempo estipulado para este estudo.

4.3 Balanço de massas

4.3.1 Materiais e métodos

O balanço de massas foi idealizado conforme a fórmula abaixo (GÖRÖG, 2008):

$$\text{Teor do composto ativo} = (100 - \sum \text{impurezas})\% = \quad (\text{Equação 4.1})$$

$$(100 - \sum \text{impurezas inorgânicas} - \sum \text{impurezas orgânicas} - \sum \text{impurezas voláteis})\%$$

4.3.1.1 Impurezas inorgânicas

As impurezas inorgânicas foram quantificadas através da determinação de cinzas sulfatadas (resíduo por incineração) conforme método geral 5.2.10 da Farmacopeia brasileira 5ª edição. Pesou-se 0,2574g e 0,2510g de 3-OBB e 3-OBB, respectivamente.

A porcentagem de cinzas sulfatadas foi calculada através da equação fornecida pelo método geral:

$$\text{Cinzas sulfatadas(\%)} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} \times 100 \quad (\text{Equação 4.2})$$

Na qual,

P_1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (tara do cadinho);

P_2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P_3 = Peso da amostra inicial;

100 = Fator da porcentagem.

4.3.1.2 Impurezas voláteis

As impurezas voláteis foram avaliadas através do método gravimétrico de perda por dessecação (método geral 5.2.9) conforme a FB, 5ª edição. Pesou-se 100,5 mg de 3-OBU e 101,3 mg de 3-OBB em balança analítica de 5 casas (Sartorius, Germany). As amostras foram submetidas à temperatura de 105 °C por 2 horas, em estufa, até obtenção de peso constante. Os ácidos foram considerados estáveis à temperatura escolhida com base na análise realizada por calorimetria diferencial exploratória (item 4.5).

A porcentagem de perda por dessecação foi calculada pela equação:

$$\text{Perda por dessecação (\%)} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad (\text{Equação 4.3})$$

Onde:

P_a = Peso da amostra;

P_u = Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação;

P_s = Peso do pesa-filtro contendo a amostra depois da dessecação;

100 = fator de porcentagem.

4.3.1.3 Impurezas orgânicas

Impurezas orgânicas foram medidas através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores UV-DAD e CAD. O cromatógrafo a líquido (CL) utilizado para detecção UV foi um Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-20AT, degaseificador DGU-20A, forno para coluna CTO-10A e detector UV com arranjo de diodos, SPD-M10A Vp.

Para detecção em aerossol carregado, foi utilizado equipamento Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-20AT, degaseificador DGU-14A, forno para coluna CTO-10° e detector Corona CAD (ESA Bioscience, Chelmsford, MA, USA).

As impurezas foram consideradas descontando-se os analitos de interesse e os picos do sistema cromatográfico (fase móvel e diluente).

4.3.2 Resultados e discussão

4.3.2.1 Impurezas inorgânicas

De acordo com a análise realizada, a proporção de impurezas inorgânicas para os compostos 3-OBB e 3-OBU foi de 0,01% e 0,08%, respectivamente.

4.3.2.2 Impurezas voláteis

A quantidade de impurezas voláteis encontrada foi de 0,32% para o 3-OBB e 0,75% para o 3-OBU.

4.3.2.3 Impurezas orgânicas

As figuras 4.2 a 4.5 apresentam os cromatogramas da análise realizada em cromatógrafo acoplado a detectores UV-DAD e CAD. Foram ignorados os picos cromatográficos atribuídos à fase móvel e ao diluente. O tempo de retenção diferente

dos ativos deve-se ao fato de que equipamentos diferentes foram utilizados na análise.

As tabelas 4.1 a 4.4 listam todos os compostos orgânicos encontrados nos cromatogramas e suas respectivas proporções percentuais. As impurezas foram nomeadas conforme ordem de eluição, em cada cromatograma, para melhor compreensão.

O somatório das impurezas orgânicas levou em consideração os picos cromatográficos das impurezas presentes em ambos os detectores. No caso da impureza determinada por ambos os detectores, considerou-se a maior área%.

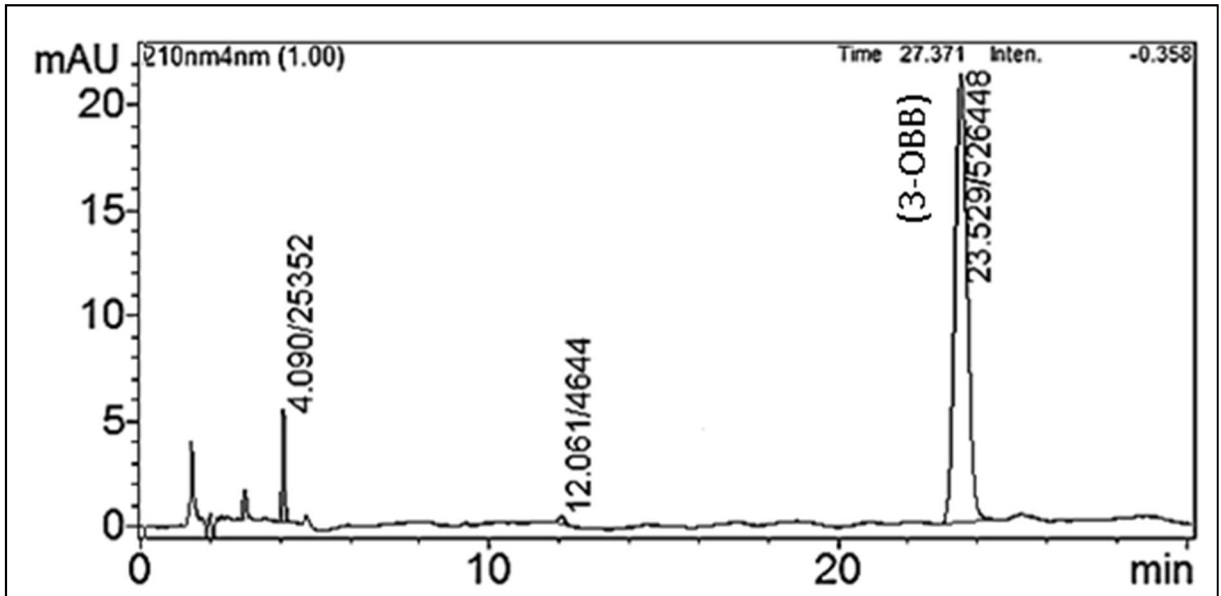
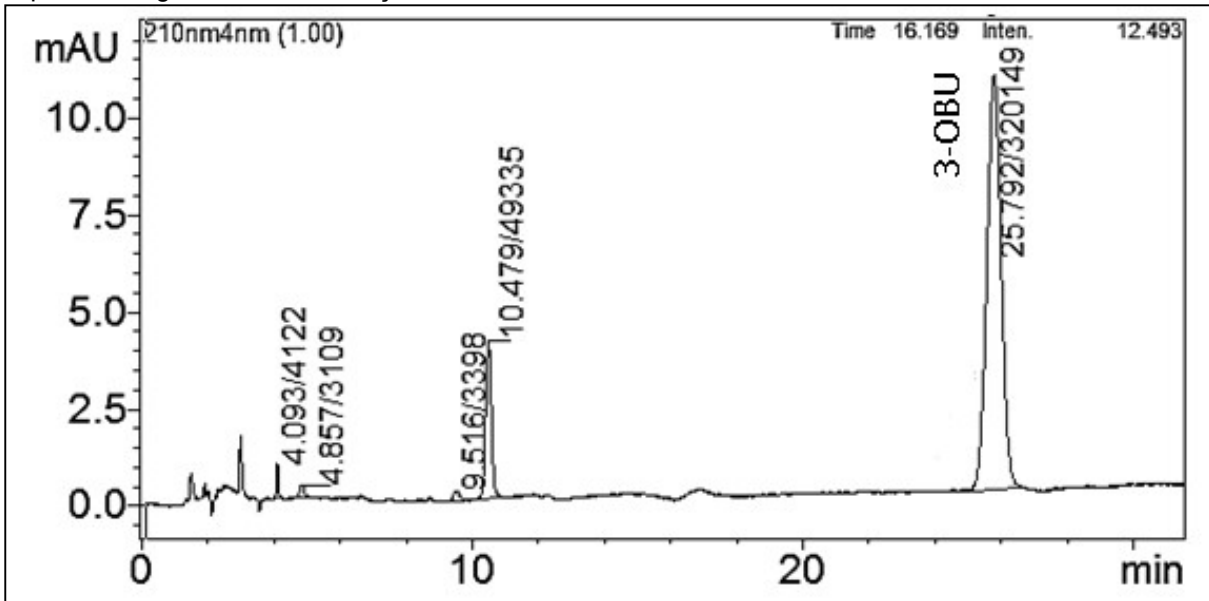


Figura 4.2 - Cromatograma do composto 3-OBB (tempo de retenção de 23,5 min) com evidência de impurezas orgânicas com detecção UV em 210 nm

Tabela 4.1 - Resultados referentes às impurezas orgânicas para o composto 3-OBB em detecção UV em 210 nm

Amostra	Tempo de Retenção (min)	Área (mAU)	Área (%)
Impureza 1	4,090	25352	4,31
Impureza 2	12,061	4644	0,79
3-OBB	23,529	526448	94,90

Figura 4.3 - Cromatograma do composto 3-OBU (tempo de retenção de 25,8 min) com evidência de impurezas orgânicas com detecção UV em 210 nm.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Tabela 4.2 - Resultados referentes às impurezas orgânicas para o composto 3-OBU em detecção UV em 210 nm

Amostra	Tempo de Retenção (min)	Área (mAU)	Área (%)
Impureza 1	4,093	4122	1,08
Impureza 2	4,857	3109	0,82
Impureza 3	9,516	3398	0,89
Impureza 4	10,479	49335	12,98
3-OBU	25,792	320149	84,22

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

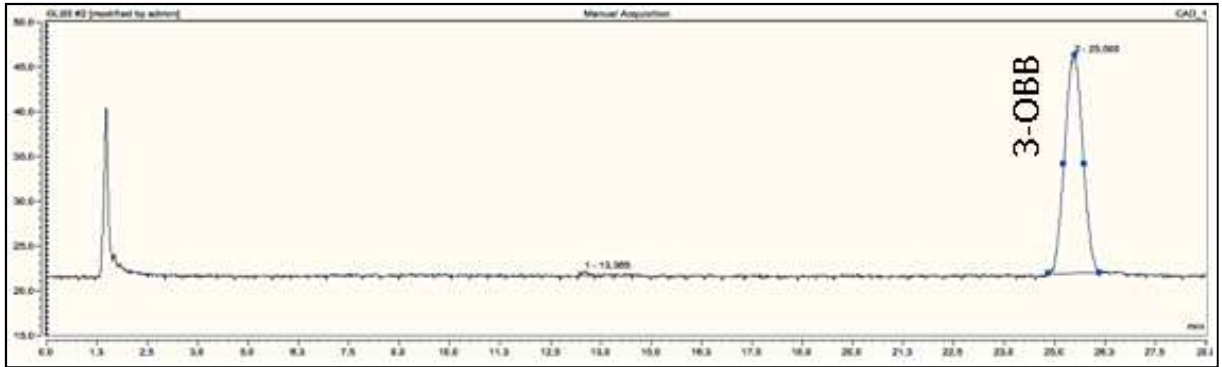


Figura 4.4 - Cromatograma do composto 3-OBB (tempo de retenção 25,5 min) com evidência de impurezas orgânicas com detecção em CAD

Tabela 4.3 - Resultados referentes às impurezas orgânicas para o composto 3-OBB em detector CAD

Amostra	Tempo de Retenção (min)	Área (pA*min)	Área (%)
Impureza 1	13,365	0,0596	0,47
3-OBB	25,500	12,6953	99,53

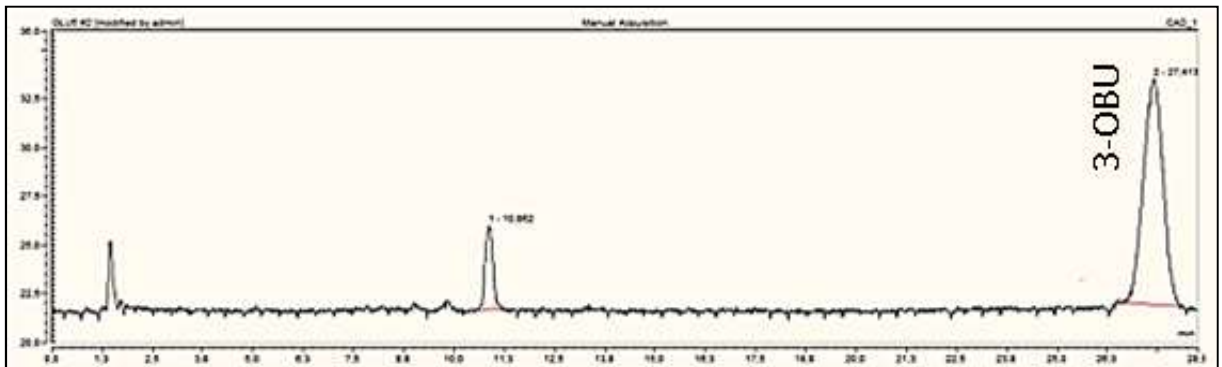


Figura 4.5 - Cromatograma do composto 3-OBU (tempo de retenção 27,4 min) com evidência de impurezas orgânicas com detecção em CAD

Tabela 4.4 - Resultados referentes às impurezas orgânicas para o composto 3-OBU em detector CAD

Amostra	Tempo de Retenção (min)	Área (pA*min)	Área (%)
Impureza 1	10,862	0,9077	12,17
3-OBU	27,413	6,5518	87,83

Conforme evidenciado nos cromatogramas e tabelas, os compostos 3-OBb e 3-ObU apresentaram 5,10% e 15,78% de impurezas orgânicas, respectivamente.

Os diferentes picos cromatográficos encontrados com detecção UV e não detectados no detector CAD são devido às características das impurezas, uma vez que a detecção em aerosol carregado só é possível se os analitos forem semi-voláteis ou não voláteis, inferindo que tais impurezas sejam voláteis.

A tabela 4.5 apresenta os resultados integrais do balanço de massas realizado para os compostos de interesse.

Tabela 4.5 - Resultado da pureza dos compostos 3-ObU e 3-OBb realizado através de balanço de massas

Amostra	Impurezas inorgânicas (%)	Impurezas voláteis (%)	Impurezas orgânicas (%)	Impurezas totais (%)	Pureza total (%)
3-OBb	0,01	0,32	5,10	5,43	94,56
3-ObU	0,08	0,75	15,78	16,62	83,38

A pureza final dos compostos, baseando-se na equação 4.1, foi de 94,56% para o 3-OBb e 83,38% para o 3-ObU.

4.4 Faixa de fusão

4.4.1 Materiais e métodos

Por definição, a faixa de fusão uma substância é o intervalo de temperatura compreendido entre o início (no qual a substância começa a fluidificar-se) e o término da fusão (que é evidenciado pelo desaparecimento da fase sólida). (F. BRAS, 2010).

A faixa de fusão foi analisada em equipamento Mettler Toledo, FP 90, previamente calibrado com padrões de acetanilida (Ponto de fusão: 116 °C) e fenolftaleína (ponto de fusão: 263 °C). O método consiste na compactação das amostras em capilares com 6 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro que são expostos à temperatura crescente até que toda amostra esteja fundida. As temperaturas são moduladas e registradas automaticamente pelo equipamento.

A análise foi realizada em triplicata para ambas as amostras 3-OBb e 3-ObU.

4.4.2 Resultados e discussão

Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Resultados da faixa de fusão para as amostras 3-OBB e 3-OBU

Amostra	Faixa de fusão	Faixa média de fusão
3-OBB	313,5 °C – 350,8 °C	312,9 °C – 351,0 °C
	312,8 °C – 348,8 °C	
	312,3 °C – 353,3 °C	
3-OBU	255,9 °C – 284,5 °C	256,3 °C – 283,2 °C
	257,8 °C – 281,4 °C	
	255,3 °C – 283,8 °C	

A faixa de fusão para o composto 3-OBU foi de 256,3 °C – 283, 2 °C com pequena variação entre as amostras, que pode ser devido à baixa pureza do composto.

O composto 3-OBB apresentou menor variação entre as respostas, mas apresentou escurecimento do pó ao final do experimento (evidenciado dentro do capilar), figura 4.6, o que indica degradação de parte da amostra, comprovada com a realização da calorimetria diferencial exploratória (item 4.5).



Figura 4.6 - Capilar após análise de faixa de fusão para a amostra 3-OBB, indicando degradação da amostra.

Por este motivo, a faixa de fusão não pode ser indicada pela técnica capilar para o composto 3-OBB.

4.5 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

4.5.1 Materiais e método

A calorimetria diferencial exploratória é uma técnica que possibilita avaliar os fenômenos energéticos, físicos e/ou químicos produzidos durante o aquecimento ou resfriamento de uma substância (F. BRAS, 2010). Permite obter resultados mais exatos que os métodos clássicos de ponto de fusão, além da possibilidade de avaliação de polimorfismos, determinação de pureza, entre outros (CLAS et al., 1999).

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60 e integrador Thermal Analyzed TA-60WS, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL/min e aquecimento com incremento de 10 °C/min. As amostras de 3-OBU e 3-OBB, com massa em torno de 1,0 mg, foram acondicionadas em porta-amostra de alumínio e submetidas a faixa de aquecimento de 50 a 360 °C, utilizando controlador de fluxo FC-60A.

4.5.2 Resultados e discussão

As figuras 4.7 e 4.8 ilustram as curvas de DSC dos compostos 3-OBU e 3-OBB, respectivamente.

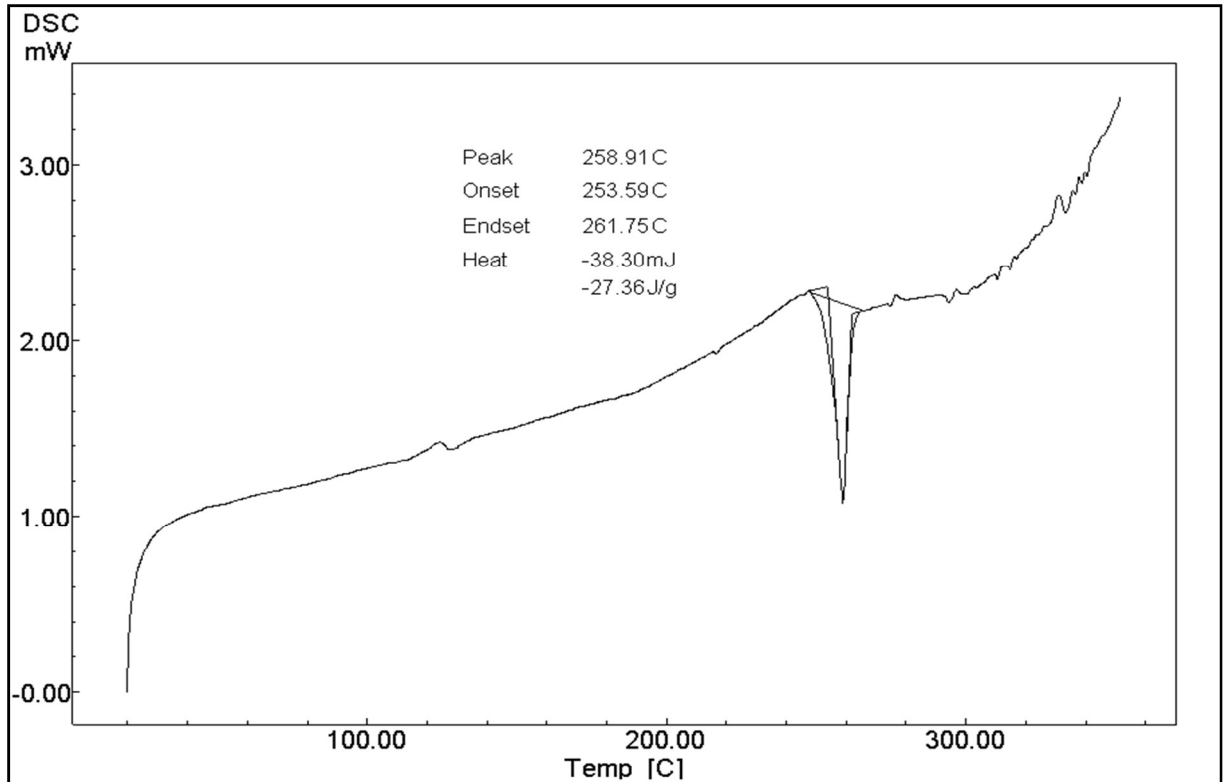


Figura 4.7 - Curva de aquecimento obtida por DSC para o composto 3-OBU com taxa de aquecimento de 10 °C/min

Baseando-se nos dados do DSC, a faixa de fusão do 3-OBU foi de 253,59 °C (*onset*) a 261,75 °C (*endset*), com pico em 258,91 °C (*peak*).

O espectro revela um único pico endotérmico, referente à transição energética molecular do 3-OBU durante a fusão, resultando em faixa e ponto de fusão descritos acima.

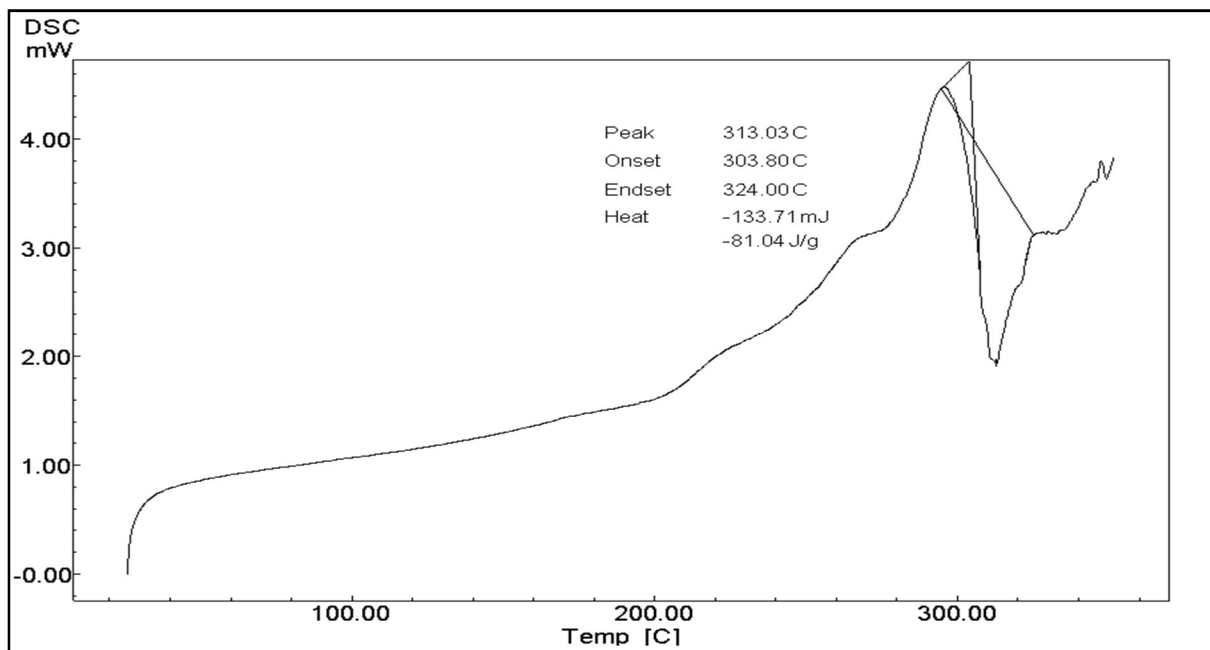


Figura 4.8 - Curva de aquecimento obtida por DSC para o composto 3-OBB com taxa de aquecimento de 10 °C/min.

A faixa de fusão do 3-OBB foi de 303,80 °C (*onset*) a 324,00 °C (*endset*), com pico em 313,03 °C (*peak*).

O pico entre 280 e 300 °C indica fenômeno exotérmico, provavelmente proveniente de mudanças na configuração molecular e liberação de energia para uma configuração eletrônica mais estável, de menor energia. Este fenômeno é característico também de degradações, fato que corrobora com o resultado encontrado durante o ponto de fusão capilar. A endoterma, a partir de 300 °C aponta para a transição de fusão da substância.

Devido ao comportamento térmico do 3-OBB, não há como indicar a temperatura de fusão da molécula pela técnica de DSC.

4.6 Espectroscopia na região do infravermelho

4.6.1 Materiais e métodos

As análises de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum BX foi utilizado com faixa de 4000 – 600 cm^{-1} , resolução 4,0, com número de varreduras igual a 20.

4.6.2 Resultados e discussão

A partir da análise das bandas do espectro da absorção na região do infravermelho, pode-se identificar os principais grupos funcionais e interações intramoleculares.

A figura 4.9 apresenta o espectro referente ao 3-OBU; as principais atribuições das frequências identificadas são descritas na tabela 4.7.

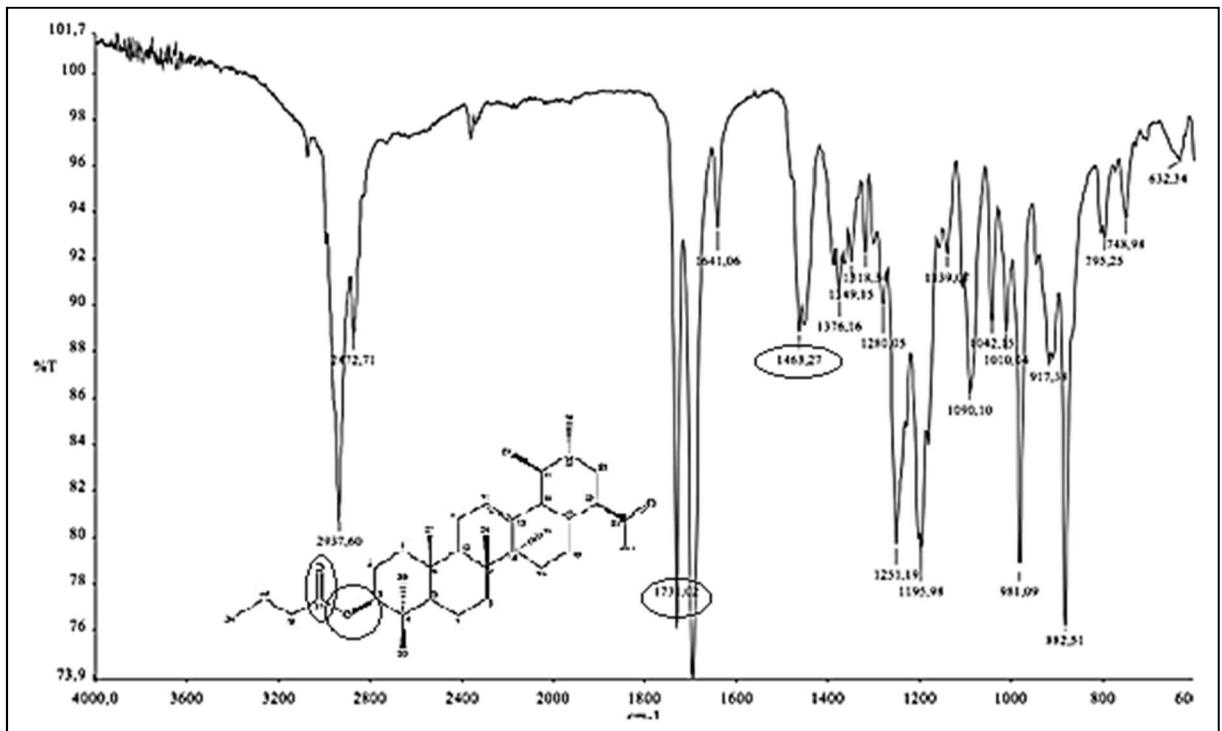


Figura 4.9 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto 3-OBU. Evidência das principais interações encontradas referentes ao substituinte semissintético (1463 cm^{-1} deformação axial C-O; 1731 cm^{-1} deformação axial C=O do ácido alifático).

Tabela 4.7 - Atribuições das principais frequências resultantes da análise de absorção na região do infravermelho para o composto 3-OBU

Frequência (cm^{-1})	Atribuições
2937; 2872	Deformação axial de ligação C-H em grupos CH_2 e CH_3
1731	Deformação axial de C=O de éster alifático
1690	Deformação axial de C=O de ácido carboxílico
1463	Deformação axial de C-O

A figura 4.10 apresenta o espectro referente de infravermelho do 3-OBB, com respectivas atribuições das frequências identificadas na tabela 4.8.

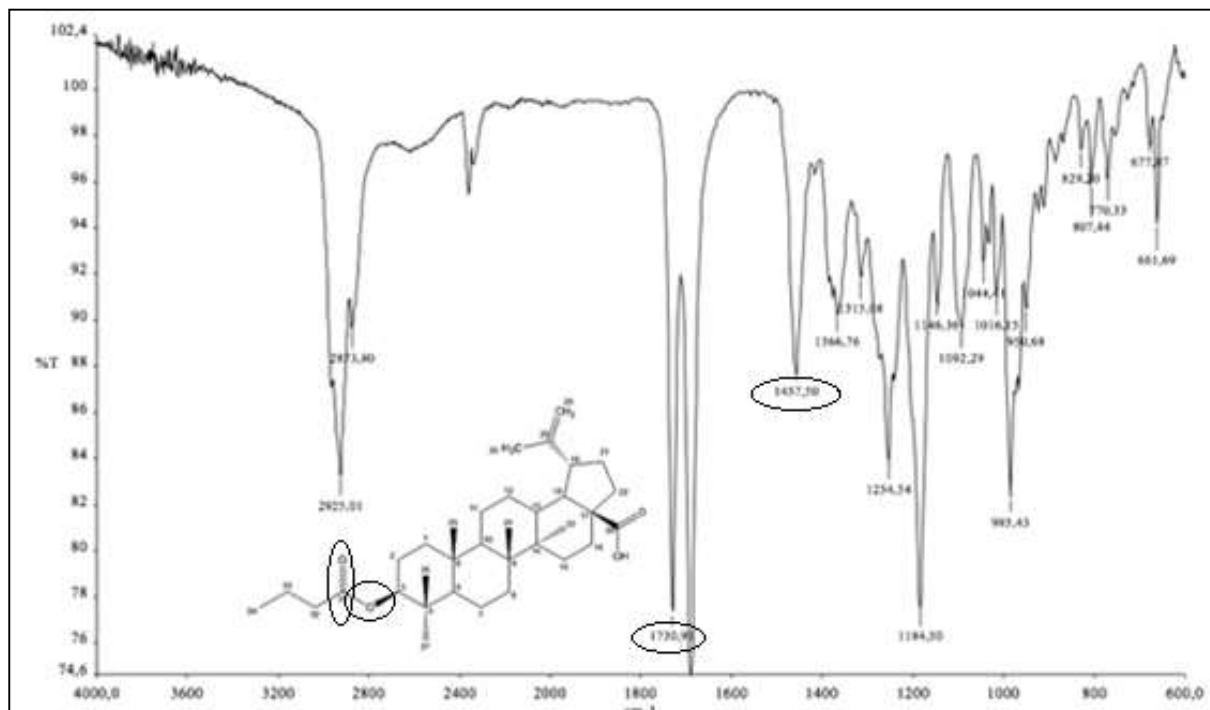


Figura 4.10 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto 3-OBB. Evidência das principais interações encontradas referentes ao substituinte semissintético (1457 cm^{-1} deformação axial C-O; 1730 cm^{-1} deformação axial C=O do ácido alifático).

Tabela 4.8 - Atribuições das frequências resultantes da análise de absorção na região do infravermelho para o composto 3-OBB.

Frequência (cm^{-1})	Atribuições
2937; 2872	Deformação axial de ligação C-H em grupos CH_2 e CH_3
1730	Deformação axial de C=O de éster alifático
1690	Deformação axial de C=O de ácido carboxílico
1457	Deformação axial de C-O

Os resultados encontrados, tanto para a molécula 3-OBU como para a 3-OBB, estão de acordo com as atribuições esperadas, uma vez que apresentam as bandas características dos grupamentos funcionais presentes nos compostos, com evidências da identificação de estiramentos axiais referentes ao substituinte semissintético.

4.7 Espectroscopia na região ultravioleta

4.7.1 Materiais e métodos

Os espectros de absorção na região ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC a partir de varreduras entre 190 e 400 nm. Para tanto, foram feitas amostras dos compostos 3-OBB e 3-OBU na concentração de 50 µg/mL, diluídos em ACN:Água pH 3,0 (85:15, v/v) ajustado com ácido fórmico.

As amostras foram analisadas em cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura, utilizando o diluente como branco.

4.7.2 Resultados e discussão

As figuras 4.11 e 4.12 apresentam os espectros de absorção de luz na região ultravioleta para os compostos 3-OBB e 3-OBU, respectivamente.

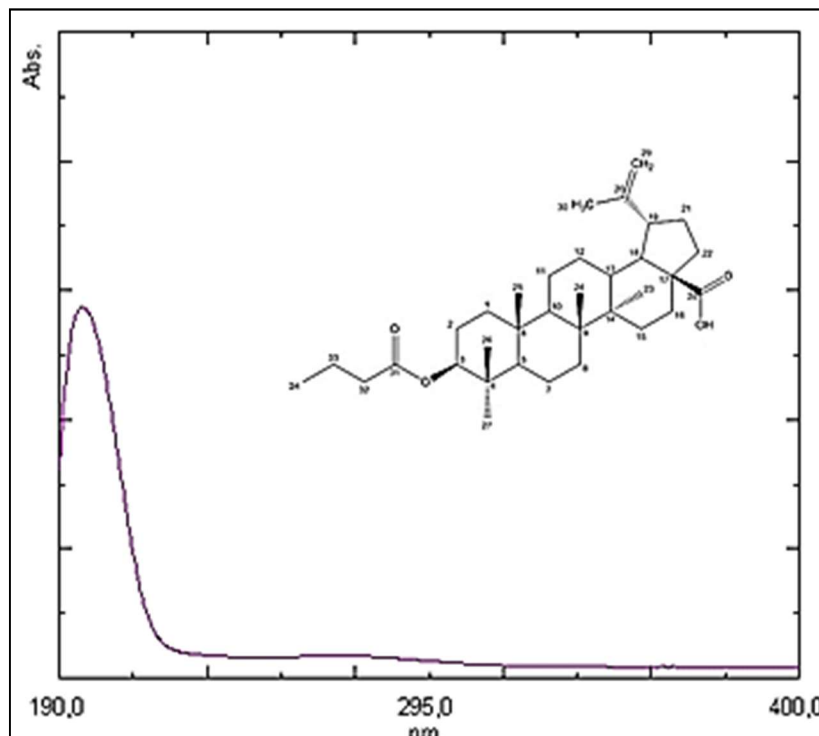


Figura 4.11 - Espectro de absorção na região ultravioleta para o 3-OBB.

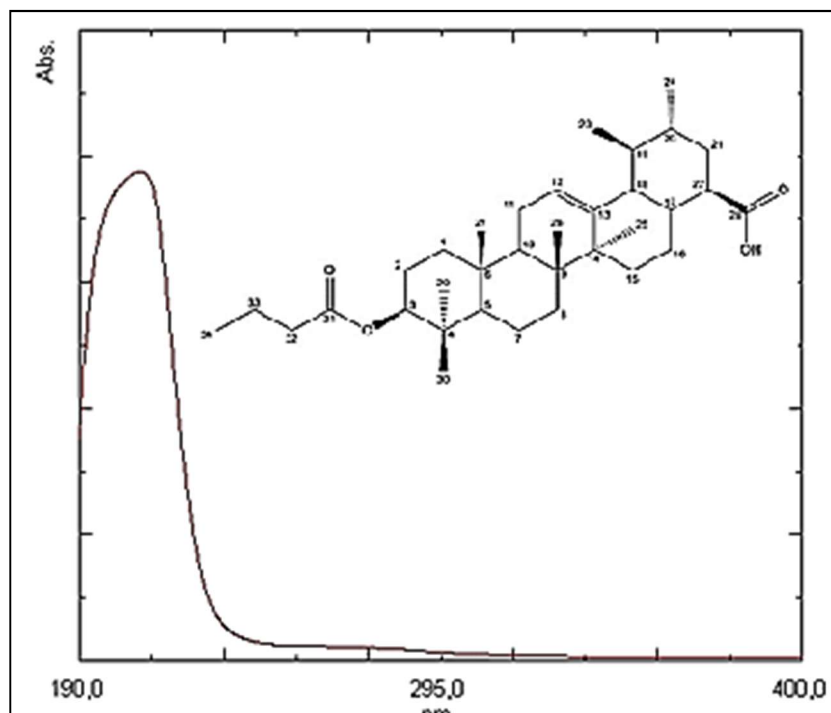


Figura 4.12 - Espectro de absorção na região ultravioleta para o 3-OBU.

Como apresentado nos espectros, a absorção dos compostos é baixa na região ultravioleta devido à composição e às configurações eletrônicas das moléculas. Os máximos de absorção para os compostos foram de 205 nm para o 3-OBB e 218 nm para o 3-OBU.

4.8 Ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C

4.8.1 Materiais e métodos

A RMN de ^1H e ^{13}C foi realizada em equipamento Bruker, modelo DPX de 400 MHz para o hidrogênio e 100 MHz para o carbono, para identificação da estrutura química dos compostos. Clorofórmio deuteado (CDCl_3) foi utilizado como solvente e tetrametilsilano como padrão interno.

4.8.2 Resultados e discussão

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para o 3-OBB são apresentados nas figuras 4.13 e 4.14, respectivamente.

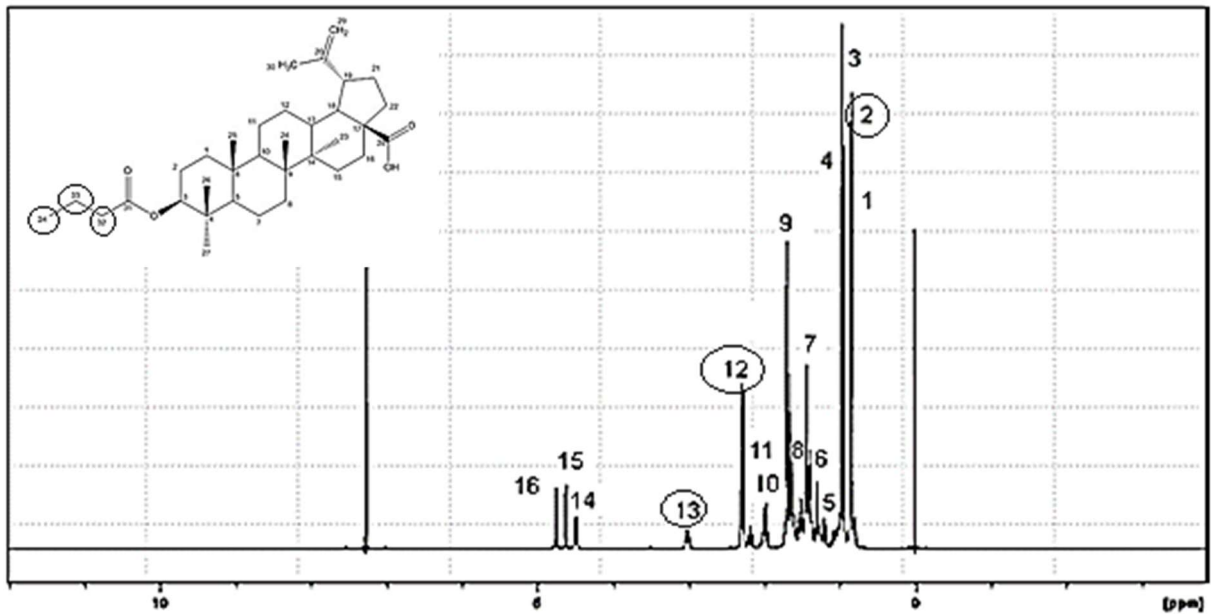


Figura 4.13 - Espectro de RMN ^1H do 3-OBB (400 MHz, em CDCl_3). Hidrogênios ligados à cadeia lateral substituído e característicos do composto 3-OBB semissintetizado são evidenciados na figura.

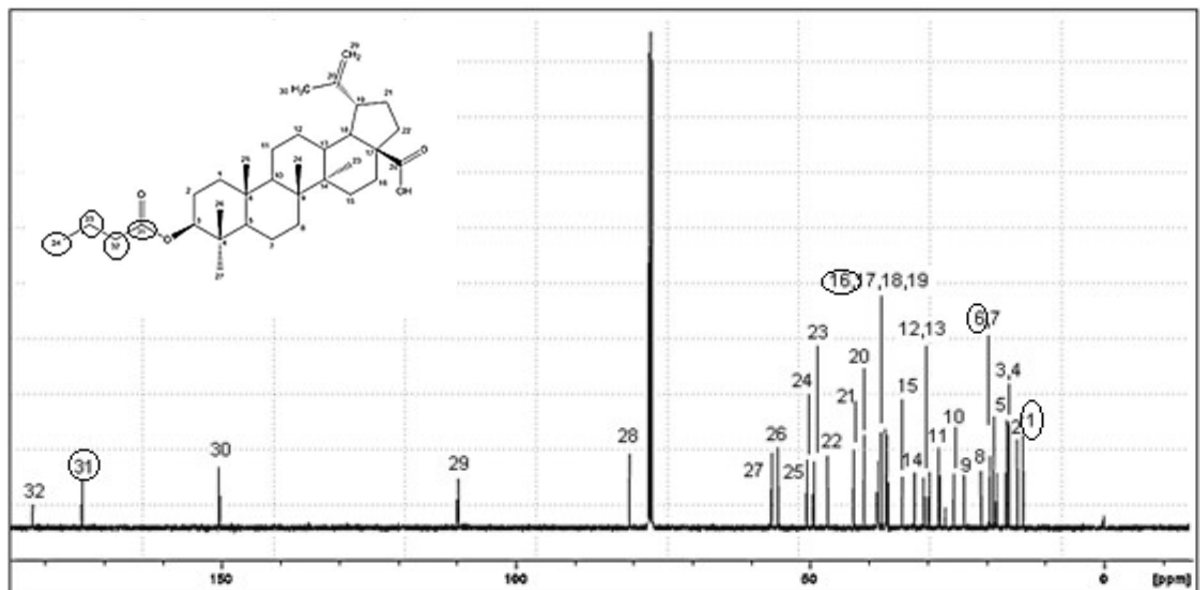


Figura 4.14 - Espectro de RMN ^{13}C do 3-OBB (100 MHz, em CDCl_3). Carbonos referentes à cadeia lateral substituído e característicos do composto 3-OBB semissintetizado são evidenciados na figura.

As atribuições do espectro de RMN ^1H do composto 3-OBB são apresentadas na tabela 4.9; as atribuições referentes ao RMN ^{13}C , na tabela 4.10. Onde s-simpleto, d-dupletto, t-tripletto, dd-duplodupletto, m-multipletto.

Tabela 4.9 - Atribuições do espectro RMN ^1H do 3-OBB em CDCl_3 (continua)

Posição	δ (ppm)	Multiplicidade – N° de Hidrogênios	Interpretação
1	0,90	s – 3H	CH_3 26
2	0,96	s – 3H	CH_3 27
3	0,98	s – 6H	CH_3 23 ; CH_3 24
4	1,04	s – 3H	CH_3 25
5	1,45	m – 2H	CH_2 15
6	1,50	m – 1H	CH 5
7	1,62	m – 2H	CH_2 2
8	1,76	t – 1H	CH 18
9	1,80	s – 3H	CH_3 30
10	2,04	m - 2H	CH_2 21
11	2,24	t – 2H	CH_2 22
12	2,31	m – 6H	CH_2 16, 22, 33
13	3,14	t - 2H	CH_2 32
14	4,53	dd – 1H	CH 3
15	4,64	s – 1H	CH 29b
16	4,76	s – 1H	CH 29a

Tabela 4.10 - Atribuições do espectro RMN ^{13}C do 3-OBB em CDCl_3 . (continua)

Posição	δ (ppm)	Interpretação
1	13,0	C 34
2	15,0	C 27
3	16,0	C 26
4	16,5	C 25
5	18,1	C 6
6	18,6	C 33
7	19,3	C 30

Tabela 4.10 - Atribuições do espectro RMN ^{13}C do 3-OBB em CDCl_3 . (conclusão)

Posição	δ (ppm)	Interpretação
8	20,8	C 11
9	23,6	C 2
10	25,6	C 12
11	27,9	C 23 ; C 24
12	29,7	C 15
13	30,6	C 21
14	32,1	C 16
15	34,2	C 7
16	36,7	C 22; C 32
17	37	C 10
18	37,1	C 4
19	37,8	C 13
20	38,4	C 1
21	40,7	C 8
22	42,4	C 14
23	46,9	C 19
24	49,3	C 18
25	50,4	C 9
26	55,4	C 17
27	56,4	C 5
28	80,6	C 3
29	109,7	C 20
30	150,3	C 29
31	173,5	C 31
32	183,5	C 28

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para o 3-OBU são apresentados nas figuras 4.15 e 4.16, respectivamente.

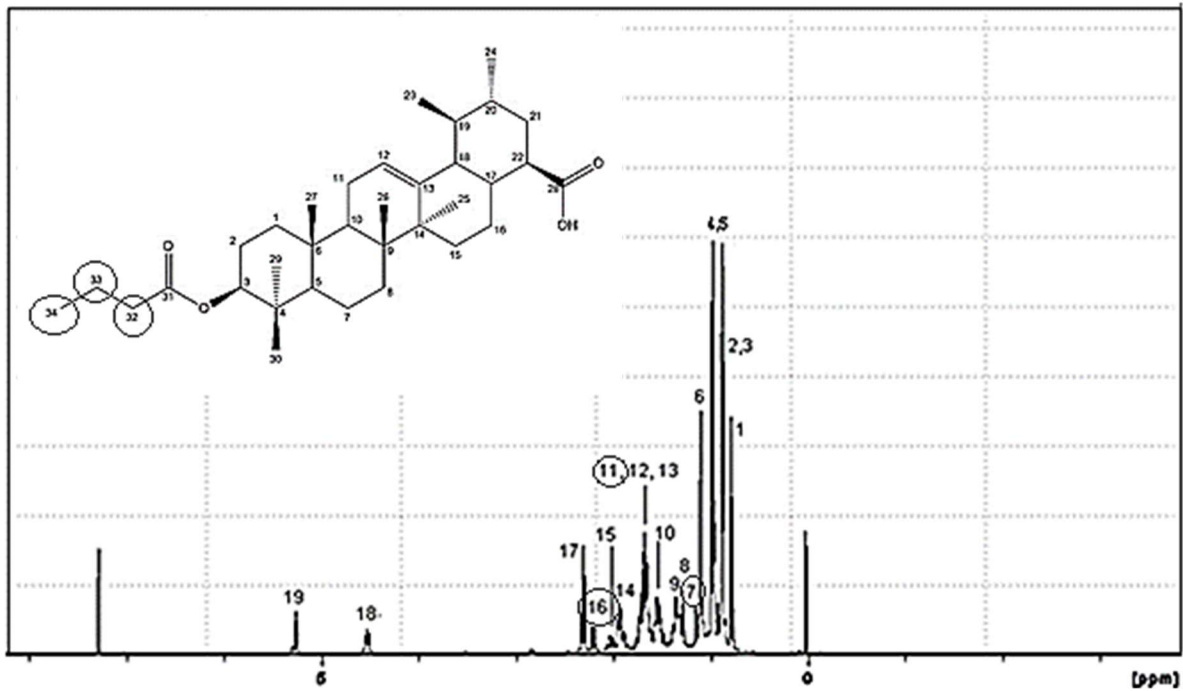


Figura 4.15 - Espectro de RMN ^1H do 3-OBU (400 MHz, em CDCl_3). Hidrogênios ligados à cadeia lateral substituinte e característicos do composto 3-OBU semissintetizado são evidenciados na figura.

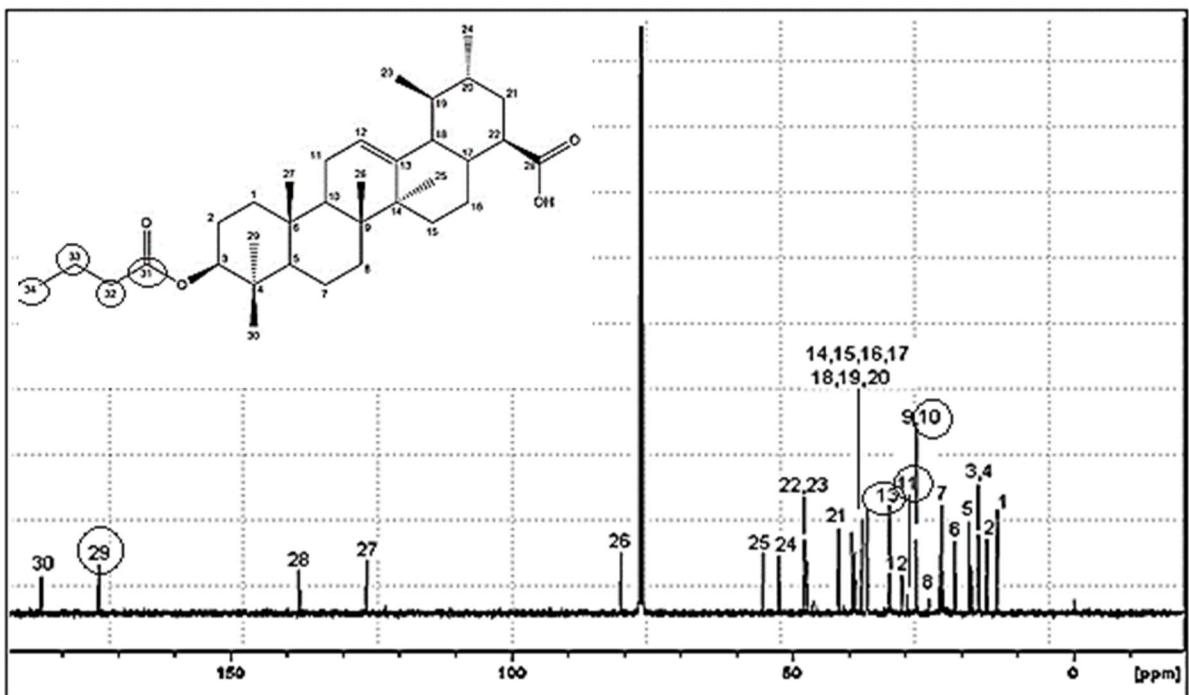


Figura 4.16 - Espectro de RMN ^{13}C do 3-OBU (100 MHz, em CDCl_3). Carbonos referentes à cadeia lateral substituinte e característicos do composto 3-OBU semissintetizado são evidenciados na figura.

As atribuições do espectro de RMN ^1H do composto 3-OBU são apresentadas na tabela 4.11; as atribuições referentes ao RMN ^{13}C , na tabela 4.12. Onde s-singlete, d-duplete, t-triplete, dd-duploduplete, m-multiplete.

Tabela 4.11 - Atribuições do espectro RMN ^1H do 3-OBU em CDCl_3 .

Posição	δ (ppm)	Multiplicidade – N ^o de Hidrogênios	Interpretação
1	0,70	s – 3H	CH_3 25
2	0,84	s – 6H	CH_3 27
3	0,87	s – 3H	CH_3 26
4	0,92	s – 3H	CH_3 29
5	1,00	s – 3H	CH_3 30
6	1,05	d – 3H	CH_3 24
7	1,15	t – 3H	CH_3 34
8	1,19	s – 3H	CH_3 27
9	1,25	d – 3H	CH_3 30
10	1,52	m - H	CH 20
11	1,73	m – 2H	CH_2 7
12	1,77	m – 2H	CH_2 2
13	1,80	m - H	CH_2 19
14	1,96	dd – 2H	CH_2 22
15	2,08	d - H	CH 18
16	2,23	t – 2H	CH_2 32
17	2,39	s – 1H	CH 9
18	4,55	dd – 1H	CH 3
19	5,28	s – 1H	CH 12

Tabela 4.12 - Atribuições do espectro RMN ^{13}C do 3-OBU em CDCl_3 . (continua)

Posição	δ (ppm)	Interpretação
1	14,0	C 25
2	15,3	C 27
3	16,6	C 26
4	16,9	C 29
5	18,1	C 6
6	21,6	C 30
7	23,1	C 23; C 24
8	25,8	C 11
9	27,6	C 2
10	27,7	C 16; C 33
11	29,8	C 15
12	31,5	C 21
13	33,0	C 7; C 32; C 34
14	33,8	C 22
15	36,9	C 10
16	37,7	C 4
17	38,2	C 1
18	38,8	C 19
19	39	C 20
20	39,5	C 8
21	41,9	C 14
22	47,3	C 9
23	47,9	C 17
24	52,5	C 18
25	55,3	C 5
26	80,5	C 3
27	125,7	C 12

Tabela 4.12 - Atribuições do espectro RMN ^{13}C do 3-OBU em CDCl_3 . (conclusão)

Posição	δ (ppm)	Interpretação
28	138,4	C 13
29	173,5	C 31
30	184,0	C 28

Através da RMN ^1H e ^{13}C foi possível identificar os compostos. Os valores encontrados, dentro do esperado, foram atribuídos a moléculas de hidrogênio e carbono para ambos 3-OBB e 3-OBU, de acordo com as características eletrônicas e posicionamento espacial de cada átomo. Os hidrogênios e carbonos característicos da cadeia lateral substituinte são evidenciados, comprovando a síntese realizada e caracterizando os compostos.

4.9 Conclusões

A semissíntese desenvolvida por SILVA et al (2003), através da esterificação do C3 dos ácidos betulínico e ursólico, se mostrou viável, uma vez que resultou na obtenção dos compostos de interesse 3-OBB e 3-OBU. A purificação em coluna cromatográfica e a recristalização com acetonitrila a quente elevaram a pureza das moléculas para 94,56% e 83,38%, respectivamente. Subsequentes purificações aumentariam ainda mais a pureza, porém, não foram realizadas devido ao baixo rendimento apresentado.

Mesmo com a ausência de substância química de referência, o balanço de massas realizado foi eficiente na avaliação de pureza, pois considerou as impurezas orgânicas, inorgânicas e voláteis presentes nas amostras. A pureza também é observada nos resultados obtidos nas outras técnicas físico-químicas aplicadas, que não apresentaram interferência de impurezas e foram efetivos na caracterização das moléculas de interesse.

A análise do comportamento térmico dos fármacos se mostrou confiável para o composto 3-OBU, com faixa de fusão pela técnica capilar, 256,3 °C – 283,2 °C, muito próximo da faixa e pico encontrados pela técnica de DSC, 253,59 °C – 261,75 °C e pico em 258,01 °C. A variação pode ser decorrente da baixa pureza do composto. Para o protótipo 3-OBB, a técnica capilar teve faixa de fusão de 312,9 °C – 351,0 °C, enquanto o DSC resultou em faixa de 303,80 °C – 324,00 °C com pico em 313, 03 °C.

Apesar dos resultados, ocorre provável degradação da molécula antes de atingir o ponto de fusão, e, assim, esta molécula não pode ser caracterizada pelas técnicas realizadas.

A análise de espectroscopia na região do ultravioleta indicou, como esperado, baixos níveis de absorção de energia eletromagnética devido aos arranjos eletrônicos da estrutura química dos compostos 3-OBB e 3-OBU. Assim, ambas as moléculas apresentaram espectro ultravioleta característico.

A espectroscopia no infravermelho apresentou bandas características dos grupos funcionais de ambas as moléculas, confirmando a identidade destas. Além disso, as análises de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C corroboraram com a identidade das amostras através de deslocamentos químicos característicos.

Assim, as moléculas ácido 3-O-butanoilbetulínico e ácido 3-O-butanoilursólico podem ser consideradas caracterizadas, com rota semissintética avaliada, identidade química confirmada e comportamentos físico-químicos observados e discutidos, auxiliando no estudo e aplicação destes protótipos no desenvolvimento de fármacos seguros e eficazes no tratamento da malária.

**5 CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento e validação de métodos analíticos por
CLAE/UV e CLAE/CAD para a identificação e quantificação dos compostos 3-
OBB e 3-OBU**

5 CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR CLAE/UV E CLAE/CAD PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS 3-OBB E 3-OBU

5.1 Introdução

Para a avaliação e o monitoramento efetivos de um novo fármaco, é indispensável a elucidação de aspectos ligados às características físico-químicas. Assim, o desenvolvimento de metodologias analíticas tem papel fundamental, pois propicia uma avaliação possível de identificar alterações que possam comprometer a atividade terapêutica ou agregar características tóxicas ao composto (AHUJA, 2001; YOSHIOKA et al., 2002).

A certificação e a confiabilidade de dados analíticos também são fatores imprescindíveis no desenvolvimento e avaliação de fármacos. As normas internacionais, nacionais e os sistemas de qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido (BARROS et al., 2002).

Para tanto, deve-se seguir um regulamento preconizado por órgãos responsáveis, tais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), a International Conference on Harmonization (ICH, 2005) e a United States Pharmacopeia (USP, 2010).

Os protótipos ácido 3-O-butanoilbetulínico (3-OBB) e ácido 3-O-butanoilursólico (3-OBU), semissintetizados por SILVA et al. (2013), através de esterificações no carbono C3 dos ácidos betulínico e ursólico, apresentaram boa atividade antimalárica, IC₅₀ de $5 \pm 0,14 \mu\text{M}$ para o 3-OBB e $7 \pm 0,15 \mu\text{M}$ para o 3-OBU, inferindo potencial terapêutico a estas moléculas sem apresentar toxicidade nas concentrações testadas.

A literatura não apresenta métodos analíticos relativos aos 3-OBB e 3-OBU. Assim, o presente estudo objetiva desenvolver métodos, para ambas as moléculas, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada, em série, a detectores ultravioleta (UV) e aerossol carregado (CAD), a fim de registrar e avaliar as características físico-químicas dos compostos, além de permitir a identificação e quantificação destas moléculas.

5.2 Parte experimental

5.2.1 Desenvolvimento e otimização do método analítico

O desenvolvimento das metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detectores de aerossol carregado e região do ultravioleta, em série, foi realizado considerando-se parâmetros analíticos de qualidade para ambas as moléculas ácido 3-O-butanoilbetulínico e ácido 3-O-butanoilursólico.

Optou-se pelo desenvolvimento do método nos detectores ultravioleta (UV) e aerossol carregado (CAD), pois ambos apresentam vantagens e desvantagens analíticas independentes e podem funcionar como aliados na avaliação de compostos. No caso da detecção no ultravioleta, somente amostras contendo grupamentos cromóforos são detectadas enquanto que, na detecção por aerossol carregado, são registrados resultados para todas as moléculas não-voláteis ou semi-voláteis (nos casos do soluto ser menos volátil que a fase móvel), independente dos grupamentos e arranjos eletrônicos presentes (GAMACHE, P.H. *et al.*, 2005; COHEN, R.D. *et al.*, 2012).

O ponto de partida foram métodos analíticos encontrados na literatura, referentes à análise dos ácidos betulínico e ursólico, tabela 3.3, precursores dos fármacos analisados. Tais métodos não levaram em consideração a análise conjunta dos 3-OBU e 3-OBB, então modificações foram necessárias a fim de obter um método capaz de avaliar ambos os compostos.

Para o menor consumo de solventes e pela agilidade analítica, foi considerado o menor tempo de retenção dos analitos no sistema escolhido, respeitando as especificações das Guias de validação. Os parâmetros de temperatura e fluxo foram modificados para diminuir a viscosidade da fase móvel, a fim de melhorar a eluição dos analitos e manter as características analíticas necessárias para uma boa resolução entre as substâncias. A meia vida da coluna cromatográfica também foi levada em consideração, respeitando-se as indicações de fabricação na escolha da temperatura, pH e fluxo de fase móvel.

Outro fator observado, o número de pratos teóricos indica a qualidade do empacotamento da coluna cromatográfica e os fenômenos de transferência de massa

no sistema. Além disso, a simetria do pico também foi considerada como parâmetro de qualidade analítico.

As amostras foram diluídas em fase móvel com adição de 10% de diclorometano para aumentar a solubilidade dos compostos, uma vez que os fármacos obtiveram baixa solubilidade nos solventes usuais.

5.2.2 Condições cromatográficas

O método analítico foi desenvolvido em cromatógrafo a líquido (CL) Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-20AT, degaseificador DGU-14^a, forno para coluna CTO-10^a e detectores de UV, SPD-10^a, e Corona CAD (ESA Bioscience, Chelmsford, MA, USA) acoplados em série, para permitir a avaliação das vantagens e desvantagens de cada um. Os softwares utilizados na aquisição e tratamento dos resultados foram o Chromeleon 6.8 (Dionex Corporation) para o detector CAD e o LC-Solutions (Shimadzu), para o detector UV. A detecção por aerossol foi estabelecida com gás nebulizador nitrogênio (35 psi).

A detecção no UV foi registrada em 210 nm devido à baixa absorvidade dos compostos 3-OBU e 3-OBB. Uma coluna PhenoSphere Next octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho de partícula) foi selecionada. O sistema cromatográfico, operado isocriticamente e em fase reversa, utiliza fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila : água pH 3,0 ajustado com ácido fórmico (85 : 15, v/v) filtrada em membrana de 0,45 µm (Millipore, Bedford, USA). O fluxo de fase móvel estabelecido foi de 1,2 mL/min, com temperatura de 50 °C e volume de injeção de 20 µL. O tempo de análise cromatográfica foi de 30 min.

Como não há disponibilidade de padrão de referência, a robustez do método foi avaliada no desenvolvimento analítico e não como parâmetro de validação. Levou-se em consideração modificações nas condições analíticas como coluna de lote diferente, fluxo de fase (1,1 mL/min e 1,3 mL/min), pH (2,9 e 3,1) e proporção de fase móvel (83:17,v/v) e (87:13, v/v). Os resultados não demonstraram diferença nos parâmetros analíticos, logo, as condições escolhidas se deram devido à otimização do método analítico e à melhor resolução entre os analitos 3-OBU e 3-OBB.

A pureza dos picos cromatográficos foi avaliada em cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-20AT, degaseificador DGU-20^a, forno para coluna CTO-10^a e detectores UV com arranjo de diodos, SPD-M10A Vp. A

quantificação dos registros da validação analítica foi realizada utilizando-se a área total, por integral, dos picos registrados.

5.2.3 Substâncias químicas e reagentes

As amostras 3-OBB e 3-OBU foram sintetizadas com os precursores, ácido betulínico e ácido ursólico, obtidos do laboratório de fitoquímica e síntese orgânica (LaFiS) – UFRGS. Ambos os fármacos foram identificados e caracterizados por ponto de fusão, DSC, IV e RMN ^1H e ^{13}C .

Acetonitrila e ácido fórmico (Merck, Frankfurt, Germany) e diclorometano (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados. A água ultrapura foi obtida usando sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, Ma, USA).

5.2.3.1 Preparo das soluções analíticas de 3-OBB e 3-OBU

As soluções-estoque (SE) do 3-OBU e 3-OBB foram preparadas, identicamente, com a transferência de massas exatamente pesadas de cerca de 25,0 mg para balão volumétrico de 100 mL. Foi adicionado 10% de diclorometano e agitadas por 30 min em banho com ultrassom para total dissolução dos compostos. Os volumes foram completados com fase móvel e a concentração final das soluções-estoque foi de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Subsequentes diluições foram feitas em fase móvel. A concentração de trabalho estabelecida foi de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambos.

As soluções individuais utilizadas na precisão e exatidão foram preparadas pesando-se, exatamente, cerca de 5,0 mg da amostra para balão volumétrico de 25 mL. A diluição e tratamento destas amostras foram realizados conforme descrito para as soluções-estoque.

5.2.4 Validação do método analítico

O método analítico foi validado conforme estabelecido na RDC 166/2017 (ANVISA, 2017) e no guia International Conference on Harmonization (ICH, 2003). Para a validação do método foram determinados: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

5.2.4.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada com a utilização de soluções qualitativas contendo diluente, ácido betulínico, ácido ursólico, 3-OBU e 3-OBB. Foi avaliada, também, solução contendo todos os compostos, simultaneamente, para identificação dos tempos de eluição e comprovar a seletividade do método analítico. As soluções de ácido betulínico e ácido ursólico foram escolhidas, pois, enquanto precursores sintéticos, possuem proximidade de estrutura química e afinidades moleculares aos 3-OBB e 3-OBU. Logo, esta avaliação é importante para avaliar possíveis coeluições destes compostos no sistema cromatográfico.

5.2.4.2 Linearidade

A linearidade foi determinada através de três curvas analíticas, cada uma contendo cinco concentrações na faixa de 25 a 75 µg/mL (50 – 150%), em diferentes dias. Foram injetadas triplicatas de cada ponto, para cada curva, com intuito de construir uma curva média com os dados de concentração *versus* área dos picos resultantes.

Avaliou-se a regressão linear (ANOVA) e o coeficiente de correlação © de cada curva e da curva média, a fim de comprovar a linearidade do método analítico. Foram avaliados, também, a distribuição e a 79omoscedasticidade dos resíduos.

5.2.4.3 Precisão

A precisão foi avaliada pela repetibilidade, ou precisão intra-dia, com a análise de seis replicatas de cada amostra, 3-OBU e 3-OBU, preparadas individualmente, na concentração de 50 µg/mL. A precisão intermediária, ou precisão inter-dia, foi avaliada pela comparação dos resultados em dois dias diferentes. Como não há padrão compendial disponível, foi estabelecida a razão entre a concentração prática das amostras e a área-resposta como fator de referência (FR). Foi calculado o desvio padrão relativo (DPR%) dos resultados do FR.

5.2.4.4 Exatidão

Como não há disponibilidade de padrão de referência, a exatidão foi inferida após o estabelecimento da linearidade, seletividade e precisão.

5.2.4.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir do desvio padrão do intercepto das três curvas obtidas na linearidade e a inclinação média destas curvas. Os valores encontrados são teóricos e utilizam as equações abaixo:

$$LD = \frac{3,3s^*}{IC} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde:

s^* = desvio padrão do intercepto, das três curvas analíticas, com o eixo Y;

IC = Inclinação da curva analítica média;

3,3 = constante baseada na relação sinal/ruído.

$$LQ = \frac{10s^*}{IC} \quad (\text{Equação 4.5})$$

Onde:

s^* = desvio padrão do intercepto, das três curvas analíticas, com o eixo Y;

IC = Inclinação da curva analítica média;

10 = constante baseada na relação sinal/ruído.

5.3 Resultados E Discussão

5.3.1 Especificidade

O estudo da seletividade dos analitos de interesse, 3-OBU e 3-OB, foi realizado a partir de possíveis interferentes, pois a seletividade na quantificação analítica é importante para garantir a confiabilidade dos resultados.

As figuras 5.1 e 5.2 apresentam os cromatogramas referentes ao diluente, ácido betulínico, ácido ursólico, ácido 3-O-butanoilbetulínico, ácido 3-O-

butanoilursólico, e solução contendo todos os compostos, com detecção no ultravioleta e aerosol carregado, respectivamente.

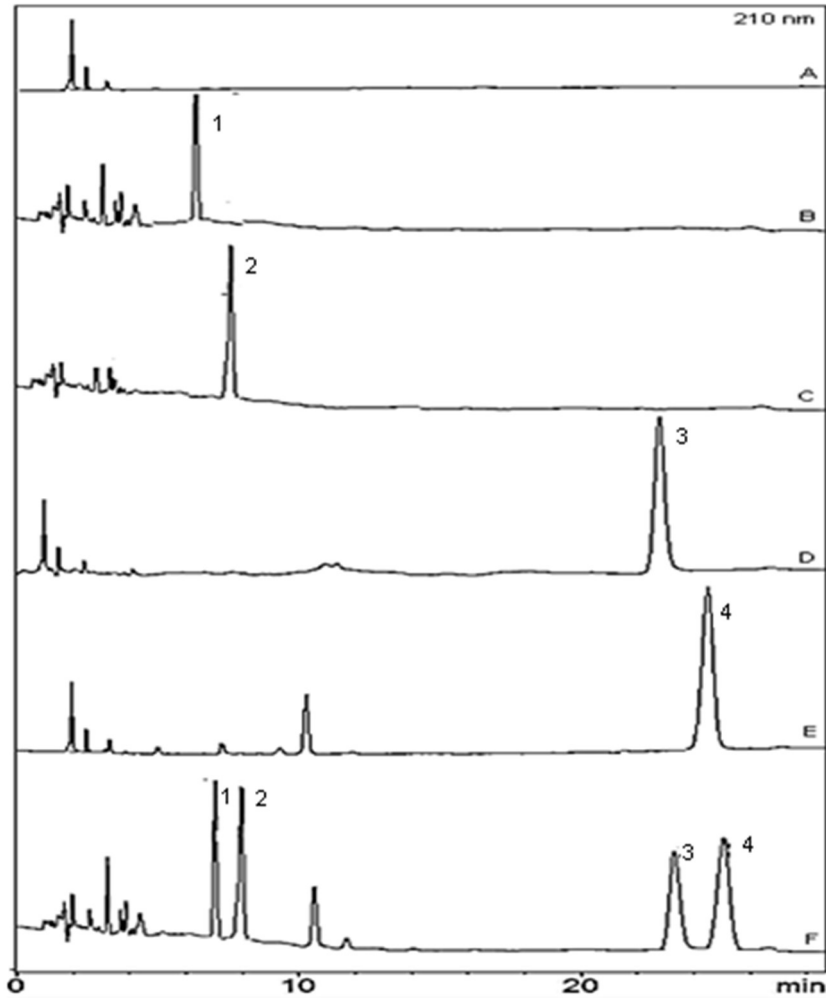


Figura 5.1 - Cromatogramas sobrepostos do diluente (A), ácido betulínico (B) (pico 1), ácido ursólico (C) (pico 2), ácido 3-O-butanoilbetulínico (D) (pico 3), ácido 3-O-butanoilursólico (E) (pico 4), e solução contendo todos os compostos (F), com detecção UV.

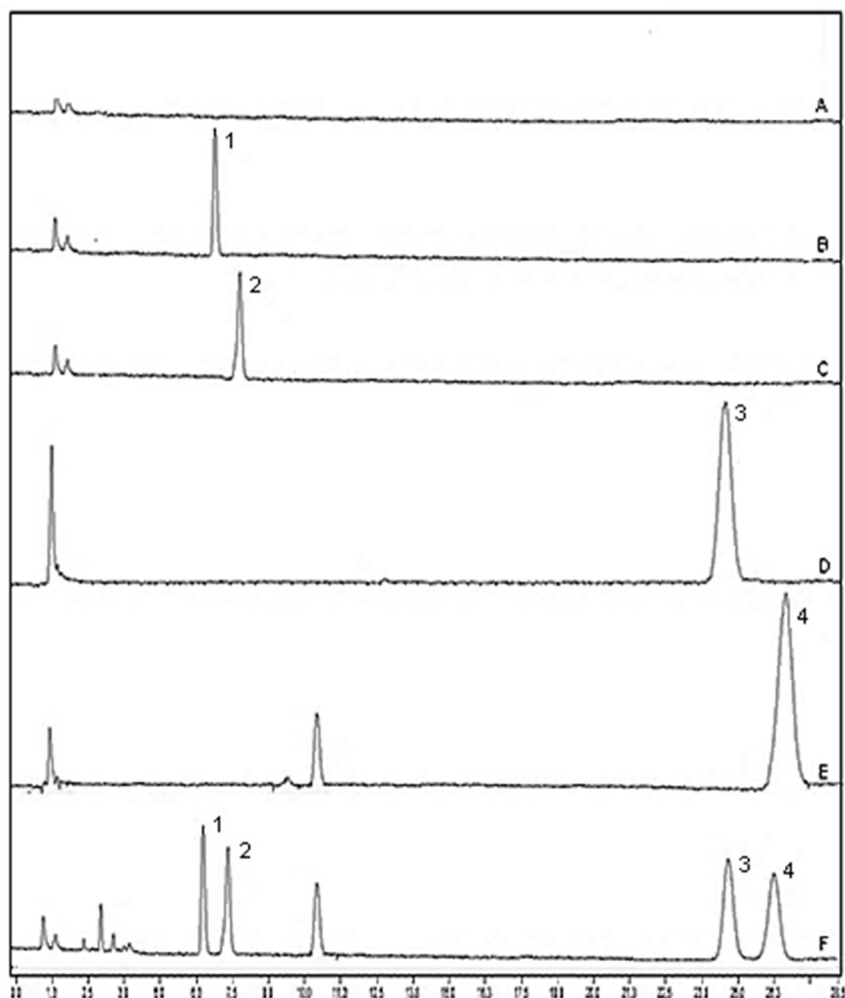


Figura 5.2 – Cromatogramas sobrepostos do diluente (A), ácido betulínico (B) (pico 1), ácido ursólico (C) (pico 2), ácido 3-O-butanoilbetulínico (D) (pico 3), ácido 3-O-butanoilursólico (E) (pico 4), e solução contendo todos os compostos (F), com detecção CAD.

A análise visual dos picos cromatográficos indica a seletividade do método, uma vez que todos os picos eluíram em tempos de retenção diferente. Os compostos 3-OBU e 3-OBB demonstraram resolução de 2,2, maior do que 2,0, conforme recomendação da Guia de validação (ANVISA, 2017; ICH, 2003). A pureza dos picos foi confirmada por análise em detector UV com arranjo de diodos.

As purezas de pico são evidenciadas nas figuras 5.3 e 5.4 para os compostos 3-OBU e 3-OBB, respectivamente.

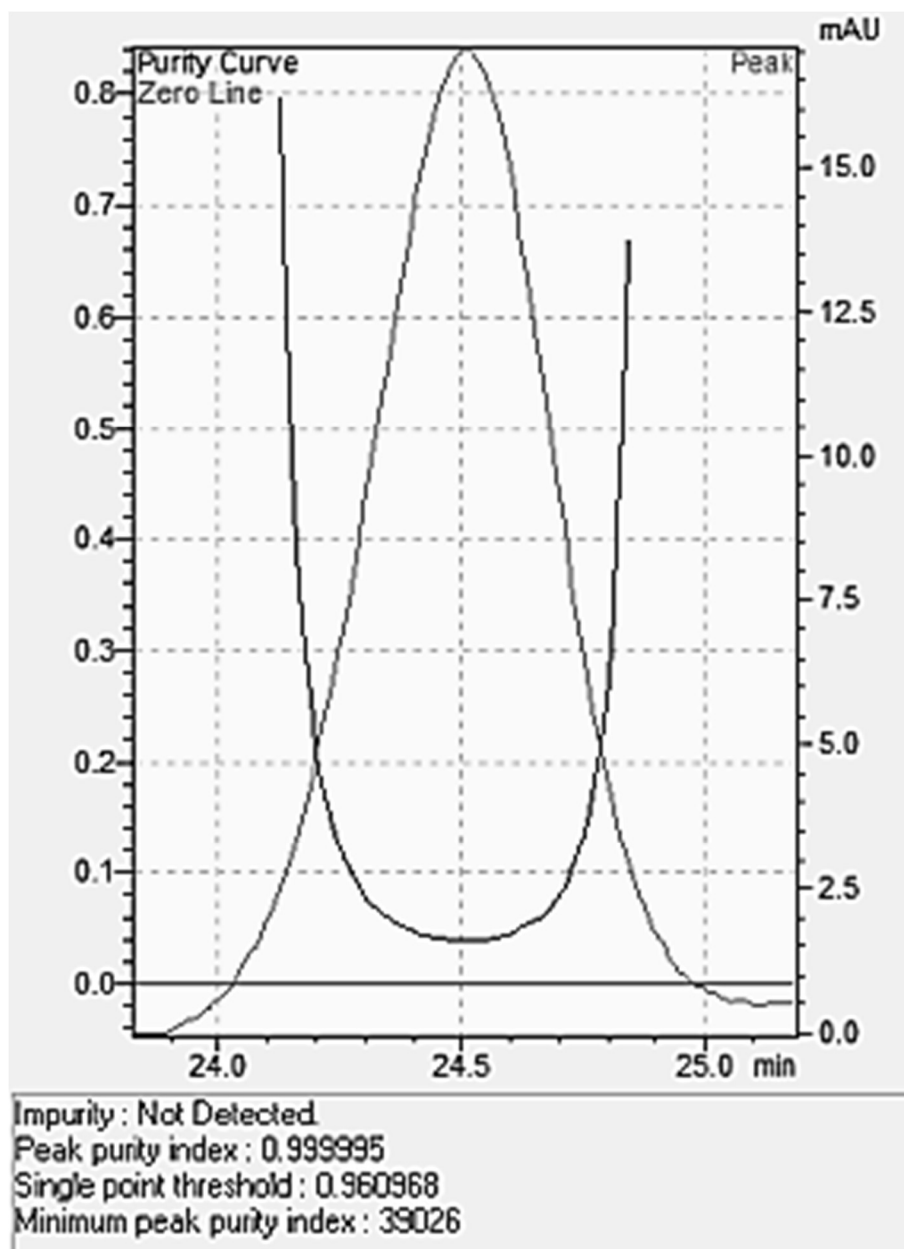


Figura 5.3 - Pureza de pico para o composto 3-OBU.

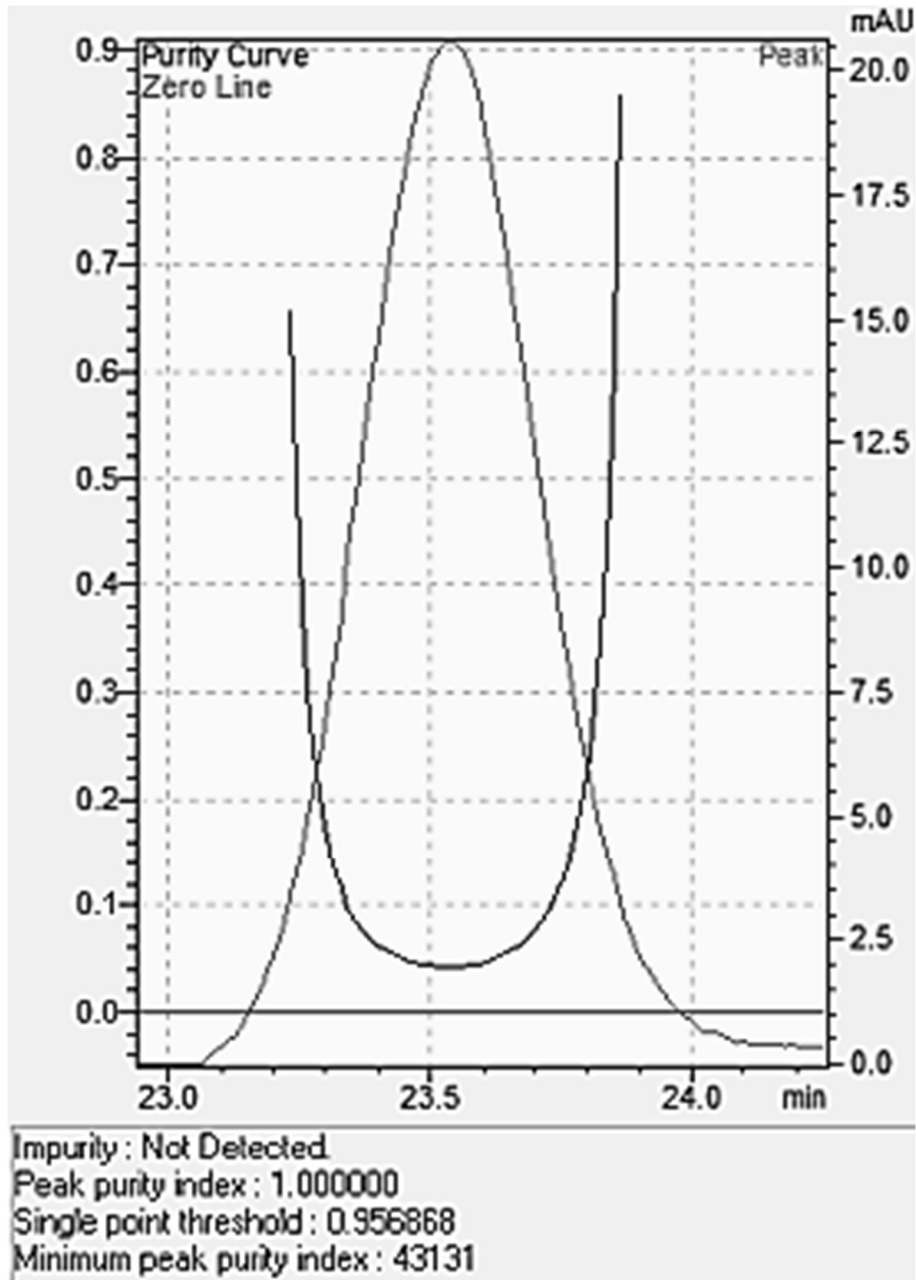


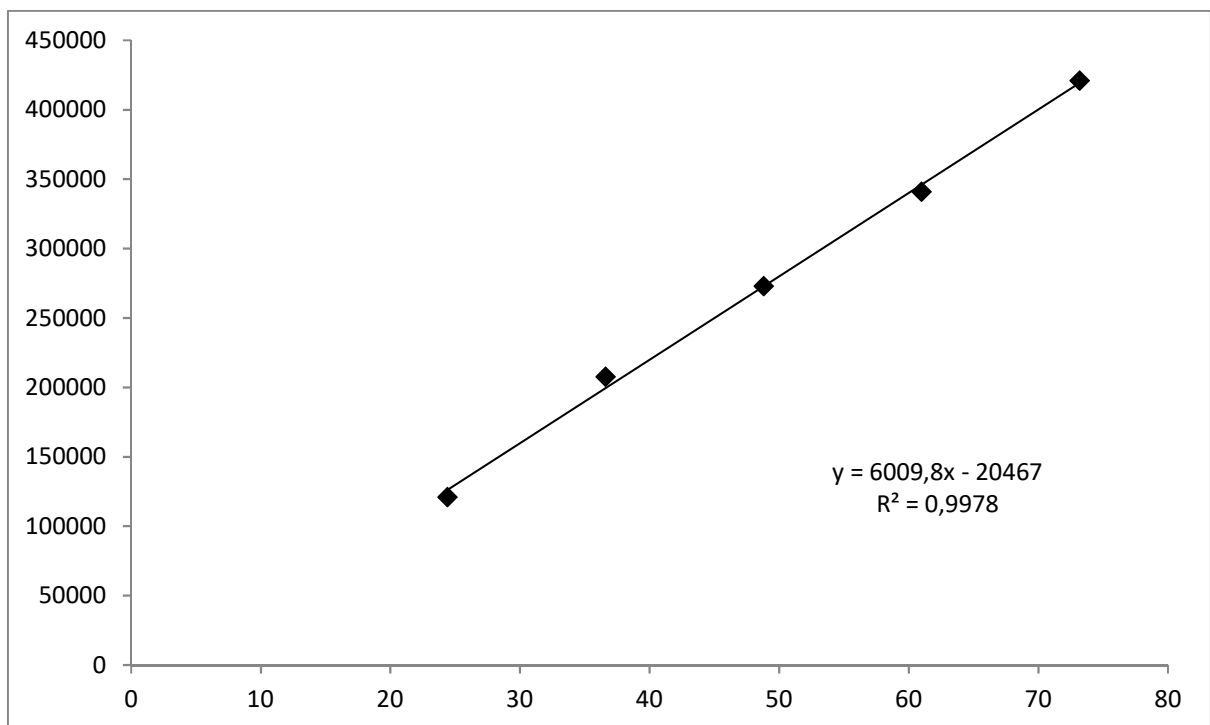
Figura 5.4 - Pureza de pico para o composto 3-OBB

5.3.2 Linearidade

A tabela 5.1 apresenta os resultados encontrados na construção da curva média de linearidade, ou seja, a partir de três curvas independentes, para o 3-OBB, com detecção UV. A figura 5.5 mostra a curva média construída.

Tabela 5.1 - Dados analíticos da curva média de linearidade para o composto 3-OBB, com detecção UV

Amostra	Concentração (µg/mL)	Área	Área Média	DPR (%)
A1 - 50%	24,40	120114		
A2 - 50%	24,40	121931	121136	0,7673
A3 - 50%	24,40	121363		
A1 - 75%	36,60	206005		
A2 - 75%	36,60	210235	207733	1,0679
A3 - 75%	36,60	206959		
A1 - 100%	48,80	275997		
A2 - 100%	48,80	269188	273015	1,2754
A3 - 100%	48,80	273860		
A1 - 125%	61,00	341217		
A2 - 125%	61,00	340916	341152	0,0623
A3 - 125%	61,00	341324		
A1 - 150%	73,20	419557		
A2 - 150%	73,20	420473	421027	0,4302
A3 - 150%	73,20	423050		

**Figura 5.5** - Curva média encontrada a partir da construção de três curvas analíticas para o 3-OBB com detecção UV.

O método se mostrou linear na faixa avaliada, 25 – 75 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9978 e equação de regressão linear $y = 6009,8x - 20467$. O desvio padrão do intercepto com o eixo Y, das as três curvas analíticas, foi de 0,26.

O resultado da estatística de regressão linear, para $p > 0,05$, referente ao 3-OBB, com detecção UV, encontra-se na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Resultado da regressão linear estatística para o 3-OBB com detecção UV.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998749085
R-Quadrado	0,997499735
R-quadrado ajustado	0,997307407
Erro padrão	5576,328168
Observações	15

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,61275E+11	1,61275E+11	5186,448209	2,65E-18
Resíduo	13	404240665,9	31095435,84		
Total	14	1,61679E+11			

A figura 5.6, abaixo, apresenta a distribuição dos resíduos plotados.

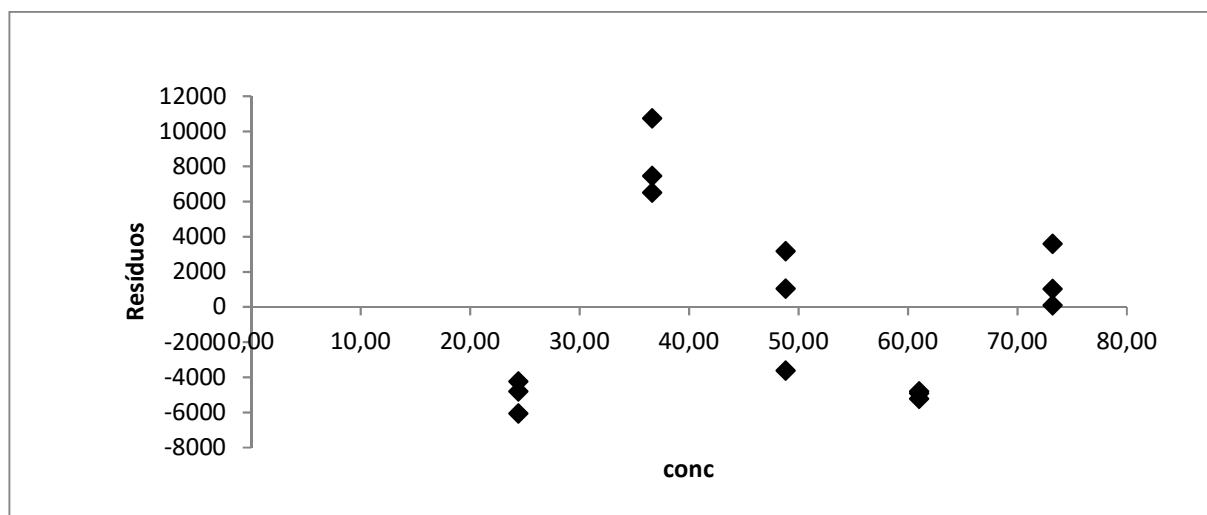


Figura 5.6 - Plotagem dos resíduos encontrados na construção da linearidade para o 3-OBB com detecção UV.

O estudo estatístico demonstrou haver regressão linear para $p > 0,05$, com $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ e distribuição normal dos resíduos, sem tendências, e presença de homocedasticidade.

A tabela 5.3 mostra os resultados encontrados na construção da curva média de linearidade para o 3-OBB, com detector CAD. A figura 5.7 apresenta a curva média construída.

Tabela 5.7 - Dados analíticos da curva média de linearidade para o composto 3-OBB, com detecção por CAD.

Amostra	Concentração (µg/mL)	Área	Área Média	DPR (%)
A1 - 50%	24,40	6,0307		
A2 - 50%	24,40	6,0913	6,0790	0,715304
A3 - 50%	24,40	6,1150		
A1 - 75%	36,60	9,6313		
A2 - 75%	36,60	9,5897	9,6383	0,543466
A3 - 75%	36,60	9,6938		
A1 - 100%	48,80	12,3293		
A2 - 100%	48,80	12,3300	12,3138	0,223275
A3 - 100%	48,80	12,2821		
A1 - 125%	61,00	15,2995		
A2 - 125%	61,00	15,3080	15,2800	0,270951
A3 - 125%	61,00	15,2324		
A1 - 150%	73,20	18,5021		
A2 - 150%	73,20	18,5031	18,4835	0,179315
A3 - 150%	73,20	18,4452		

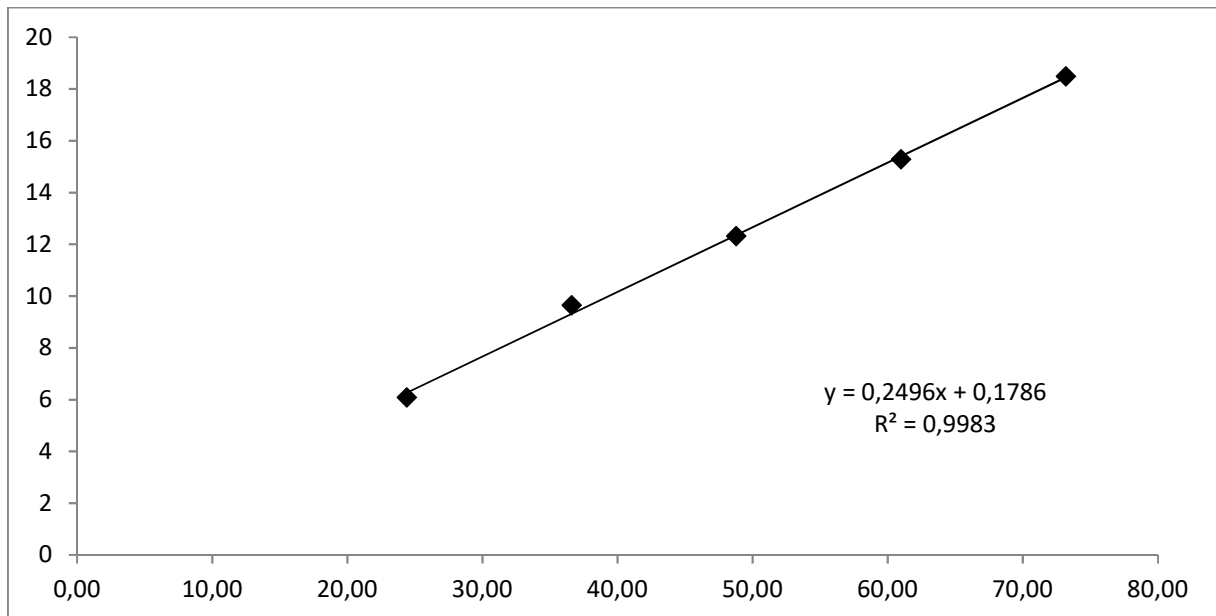


Figura 5.7 - Curva média encontrada a partir da construção de três curvas analíticas para o 3-OBB com detecção CAD.

O método foi linear na faixa avaliada, 25 – 75 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9983 e equação de regressão linear $y = 0,2496x + 0,1786$. O desvio padrão do intercepto com o eixo Y, das as três curvas analíticas, foi de 0,34.

O resultado da estatística de regressão linear, para $p > 0,05$, referente ao 3-OBB, com detecção por CAD, encontra-se na tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Resultado da regressão linear estatística para o 3-OBB com detecção por CAD.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999109605
R-Quadrado	0,998220002
R-quadrado ajustado	0,998083079
Erro padrão	0,195336261
Observações	15

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	278,1736203	278,1736203	7290,381	2,92E-19
Resíduo	13	0,496031315	0,038156255		
Total	14	278,6696517			

A figura 5.8 apresenta a distribuição dos resíduos plotados.

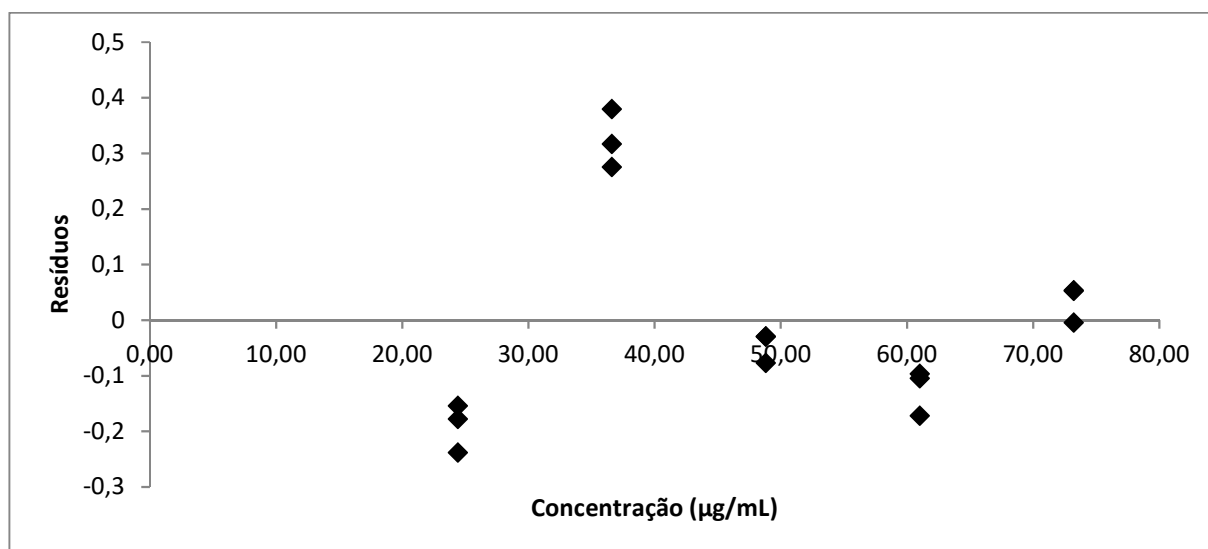


Figura 5.8 - Plotagem dos resíduos encontrados na construção da linearidade para o 3-OBB com detecção por CAD.

O estudo estatístico demonstrou haver regressão linear para $p > 0,05$, com $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ e distribuição normal dos resíduos, sem tendências, e presença de homocedasticidade.

A tabela 5.5 mostra os resultados encontrados na construção da curva média de linearidade para o 3-OBU, com detector UV. A figura 5.9 apresenta a curva média construída a partir destes dados.

Tabela 5.5 - Dados analíticos da curva média de linearidade para o composto 3-OBU, com detecção por UV.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Área Média	DPR (%)
A1 - 50%	24,40	92431	92502	0,413411
A2 - 50%	24,40	92160		
A3 - 50%	24,40	92915		
A1 - 75%	36,60	141866	140996	0,569447
A2 - 75%	36,60	140283		
A3 - 75%	36,60	140841		
A1 - 100%	48,80	189311	191530	1,52725
A2 - 100%	48,80	194845		
A3 - 100%	48,80	190435		
A1 - 125%	61,00	232792	232366	0,452707
A2 - 125%	61,00	231304		
A3 - 125%	61,00	233003		
A1 - 150%	73,20	288472	289312	0,34887
A2 - 150%	73,20	290432		
A3 - 150%	73,20	289032		

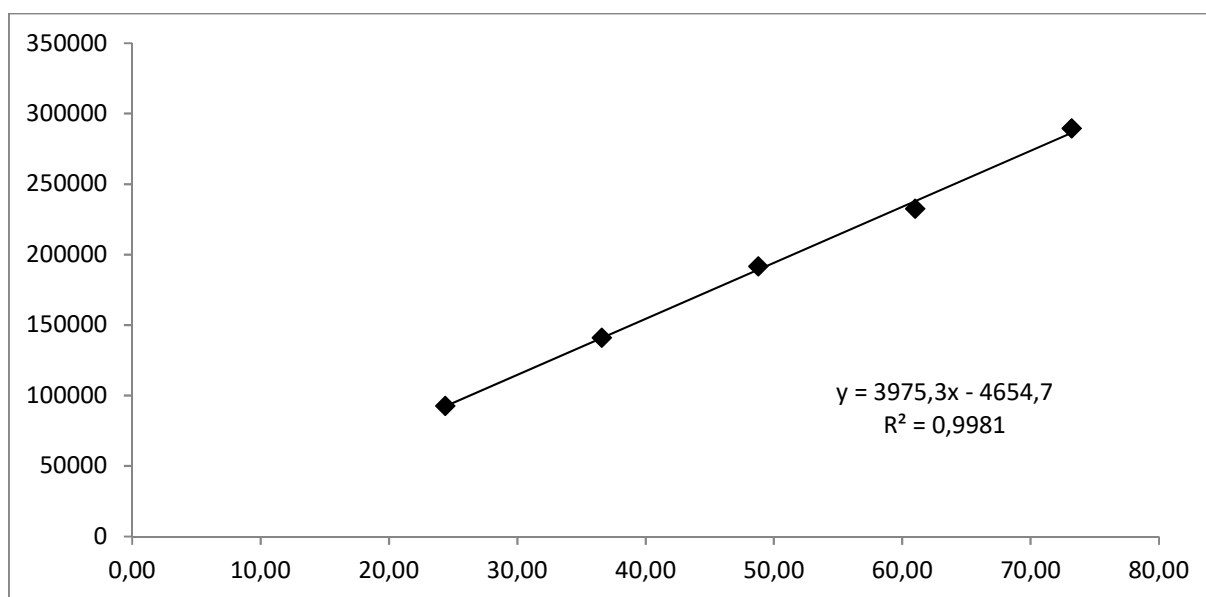


Figura 5.91 - Curva média encontrada a partir da construção de três curvas analíticas para o 3-OBU com detecção UV.

O método foi linear na faixa avaliada, 25 – 75 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9981 e equação de regressão linear $y = 3975,3x - 4654,7$. O desvio padrão do intercepto com o eixo Y, das as três curvas analíticas, foi de 0,12.

O resultado da estatística de regressão linear, para $p > 0,05$, referente ao 3-OBU, com detecção por UV, encontra-se na tabela 5.6.

Tabela 5.64 - Resultado da regressão linear estatística para o 3-OBU com detecção UV.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998915019
R-Quadrado	0,997831216
R-quadrado ajustado	0,997664386
Erro padrão	3434,80103
Observações	15

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	70564654695	70564654695	5981,141	1,05E-18
Resíduo	13	153372155,5	11797858,12		
Total	14	70718026851			

A figura 5.10 apresenta a distribuição dos resíduos plotados.

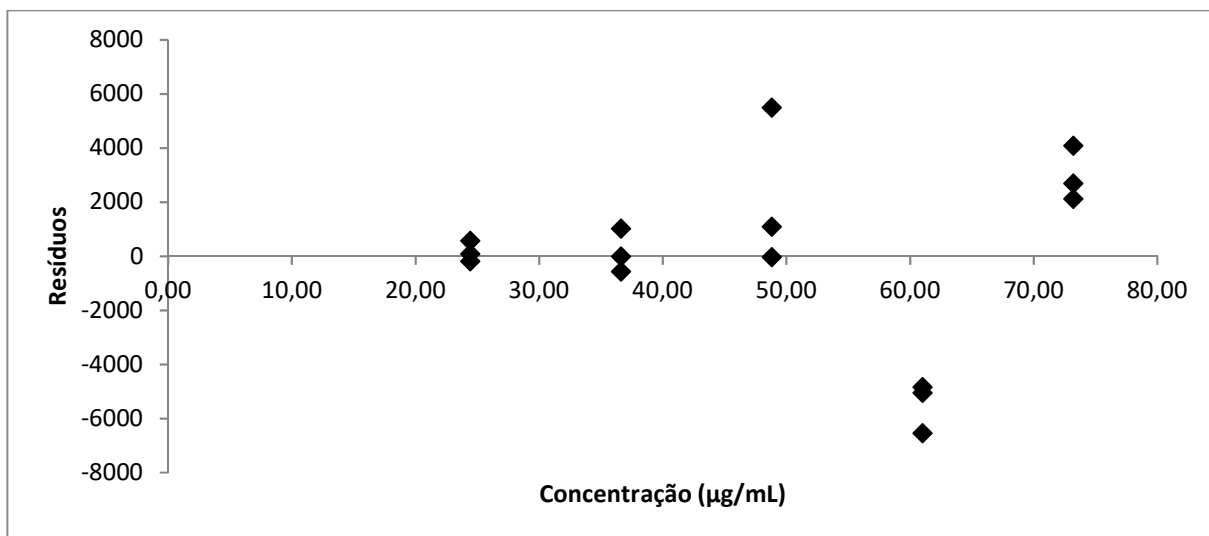


Figura 5.10 - Plotagem dos resíduos encontrados na construção da linearidade para o 3-OBU com detecção UV.

O estudo estatístico demonstrou haver regressão linear para $p > 0,05$, $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ e distribuição normal dos resíduos, sem tendências, e presença de homocedasticidade.

A tabela 5.7 mostra os resultados encontrados na construção da curva média de linearidade para o 3-OBU, com detector por CAD. A figura 5.11 apresenta a curva média construída a partir destes dados.

Tabela 5.7 - Dados analíticos da curva média de linearidade para o composto 3-OBU, com detecção CAD.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Área Média	DPR (%)
A1 - 50%	24,40	2,7982		
A2 - 50%	24,40	2,8192	2,8364	1,7315
A3 - 50%	24,40	2,8918		
A1 - 75%	36,60	4,8124		
A2 - 75%	36,60	4,7908	4,7562	1,6704
A3 - 75%	36,60	4,6653		
A1 - 100%	48,80	6,2161		
A2 - 100%	48,80	6,2176	6,2371	0,5631
A3 - 100%	48,80	6,2776		
A1 - 125%	61,00	7,6743		
A2 - 125%	61,00	7,6456	7,6364	0,5651
13 - 125%	61,00	7,5894		
A1 - 150%	73,20	9,5548		
A2 - 150%	73,20	9,7366	9,6611	0,9805
A3 - 150%	73,20	9,6919		

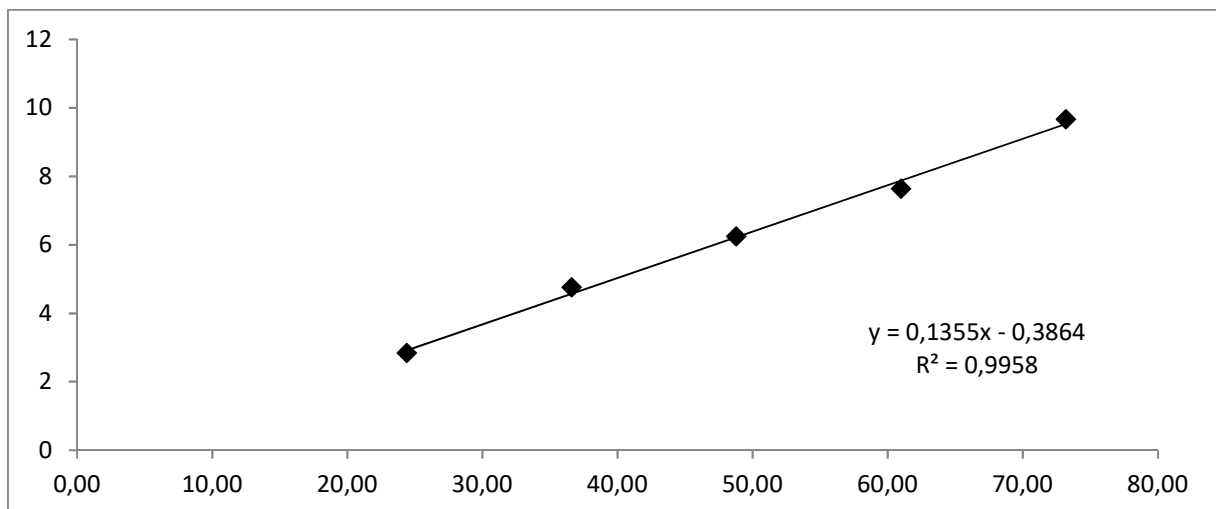


Figura 5.11 - Curva média encontrada a partir da construção de três curvas analíticas para o 3-OBU com detecção CAD.

O método foi linear na faixa avaliada, 25 – 75 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9958 e equação de regressão linear $y = 0,1355x - 0,3864$. O desvio padrão do intercepto com o eixo Y, das as três curvas analíticas, foi de 0,32.

O resultado da estatística de regressão linear, $p > 0,05$, referente ao 3-OBU, com detecção CAD, encontra-se na tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Resultado da regressão linear estatística para o 3-OBU com detecção CAD.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997628655
R-Quadrado	0,995262933
R-quadrado ajustado	0,994898543
Erro padrão	0,173236413
Observações	15

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	81,96907423	81,96907423	2731,314	1,69E-16
Resíduo	13	0,39014111	0,030010855		
Total	14	82,35921534			

A figura 5.12 apresenta a distribuição dos resíduos plotados.

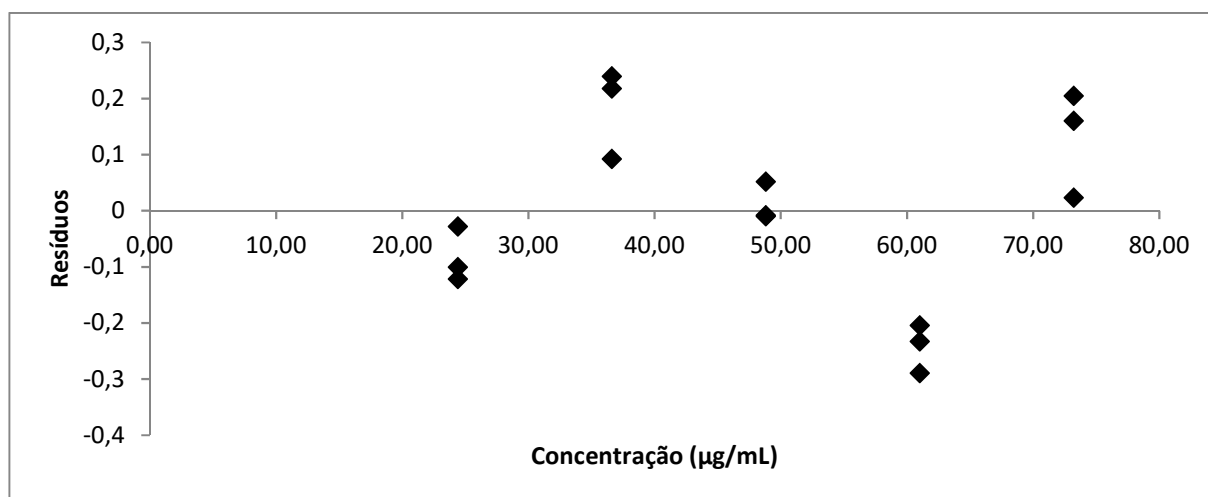


Figura 5.12 - Plotagem dos resíduos encontrados na construção da linearidade para o 3-OBU com detecção CAD.

O estudo estatístico demonstrou haver regressão linear para $p > 0,05$, com $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, distribuição normal dos resíduos, sem tendências e presença de homocedasticidade.

5.3.3 Precisão

Os resultados da repetibilidade e precisão intermediária para o composto 3-OBB, com detecção UV, são listados na tabela 5.9.

Tabela 5.95 - Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBB, com detecção UV.

Amostra	Concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)		Área		Fator de referência	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
A1	49,40	49,00	271721	270891	5500,43	5528,39
A2	46,00	50,40	254596	280061	5534,70	5556,77
A3	54,40	52,00	296970	293046	5459,01	5635,50
A4	53,60	51,00	290348	282743	5416,94	5543,98
A5	46,60	50,00	259618	276944	5571,20	5538,88
A6	50,00	50,40	276575	281045	5531,50	5576,29
Média (6)					5502,30	5563,30
DPR (%)					1,02	0,7014
Média (12)						5532,80
DPR (%)						1,01

De acordo com os resultados apresentados, o desvio padrão relativo das doze amostras, nos dois dias, foi de 1,0135%, inferindo precisão do método analítico, uma vez que o valor é menor do que 2,0% preconizado pelas normativas utilizadas.

Os resultados da repetibilidade e precisão intermediária para o composto 3-OBB, com detecção por CAD, são mostrados na tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBB, com detecção por CAD. (continua)

Amostra	Concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)		Área		Fator de referência	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
A1	49,40	49,00	12,6746	12,2908	0,2566	0,2508
A2	46,00	50,40	11,5610	13,0267	0,2513	0,2585
A3	54,40	52,00	13,8810	13,1783	0,2552	0,2534
A4	53,60	51,00	13,5021	12,8430	0,2519	0,2518
A5	46,60	50,00	12,1003	12,9532	0,2597	0,2591
A6	50,00	50,40	12,8449	13,0016	0,2569	0,2580

Tabela 5.10 - Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBB, com detecção por CAD. (conclusão)

Média (6)	0,2553	0,2553
DPR (%)	1,25	1,4324
Média (12)		0,2553
DPR (%)		1,28

De acordo com os resultados, o desvio padrão relativo das doze amostras, nos dois dias, foi de 1,28%, menor do que 2,0%, preconizado pelas normativas utilizadas.

Os resultados da repetibilidade e precisão intermediária para o composto 3-OBU, com detecção UV, são mostrados na tabela 5.11.

Tabela 5.11 - Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBU, com detecção UV.

Amostra	Concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)		Área		Fator de referência	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
A1	50,20	47,00	177176	165423	3529,40	3519,64
A2	47,20	50,00	166374	171844	3524,87	3436,88
A3	46,40	48,80	160287	170509	3454,46	3494,04
A4	50,00	50,80	172188	180031	3443,76	3543,92
A5	47,00	50,20	164235	175432	3494,36	3494,66
A6	46,00	52,80	161896	182776	3519,48	3461,67
Média (6)					3494,39	3491,80
DPR (%)					1,07	1,1039
Média (12)						3493,09
DPR (%)						1,04

Os resultados mostram que o desvio padrão relativo das doze amostras, nos dois dias, foi de 1,06%, abaixo dos 2,0% preconizado pelas normativas utilizadas.

Os resultados da repetibilidade e precisão intermediária para o composto 3-OBU, com detecção por CAD, são mostrados na tabela 5.12.

Tabela 5.12 - Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBU, com detecção por CAD. (continua)

Amostra	Concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)		Área		Fator de referência	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
A1	50,20	47,00	6,4392	6,1208	0,1283	0,1302
A2	47,20	50,00	6,1201	6,3417	0,1297	0,1268
A3	46,40	48,80	6,0056	6,3280	0,1294	0,1297
A4	50,00	50,80	6,3290	6,5052	0,1266	0,1281
A5	47,00	50,20	6,1134	6,4801	0,1301	0,1291
A6	46,00	52,80	6,0080	6,6992	0,1306	0,1269

Tabela 5.12 - Resultados encontrados na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3-OBU, com detecção por CAD. (conclusão)

Média (6)	0,1291	0,1285
DPR (%)	1,13	1,1173
Média (12)		0,1288
DPR (%)		1,10

Os resultados mostram que o desvio padrão relativo das doze amostras, nos dois dias, foi de 1,10%, abaixo dos 2,0% preconizado pelas normativas utilizadas.

5.3.4 Exatidão

O método foi considerado exato baseado nos resultados de linearidade, seletividade e precisão.

5.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação, para ambas as moléculas 3-OBB e 3-OBU, com detecção UV e CAD encontram-se na tabela 5.13.

Tabela 5.13 - Limites de detecção e quantificação para os compostos 3-OBB e 3-OBU com detecção UV e CAD.

Amostra	Detector UV		Detector CAD	
	Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)
3-OBB	0,92	2,81	1,11	3,37
3-OBU	0,42	1,29	1,16	3,50

A partir da análise dos resultados, pode-se verificar que o método com detecção UV teve maior sensibilidade que o método com detecção por CAD. Todos os limites encontrados estão abaixo do intervalo utilizado na validação do método analítico apresentado (25 $\mu\text{g/mL}$ – 75 $\mu\text{g/mL}$).

5.4 Conclusões

Os resultados analíticos indicam que o método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado, em série, a detectores UV e CAD, apresentou

especificidade, linearidade, precisão e exatidão na quantificação de ambos os compostos em estudo, 3-OBB e 3-OBU, em ambos os detectores.

Apesar de não haver padrão compendial disponível, pode-se avaliar a pureza dos compostos através do balanço de massas. A confiabilidade dos resultados foi comprovada através de estudo estatístico para as finalidades a que se destina.

Assim, o método analítico pode ser considerado estatisticamente validado e pode ser utilizado para a identificação e a quantificação dos compostos 3-OBB e 3-OBU.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, devido à grande importância em se garantir a segurança, qualidade e eficácia dos produtos farmacêuticos. Dados analíticos não confiáveis levam a falsos resultados, dificultando a compreensão dos fenômenos apresentados e levando a decisões desastrosas (RIBANI et al., 2004).

O processo de desenvolvimento de um novo fármaco inicia com a inovação molecular demonstrada através de seu valor terapêutico e ação contra processos patológicos ou sintomáticos. A síntese e caracterização físico-química de tais moléculas levam ao conhecimento necessário para criar fármacos eficazes e seguros, pré-requisitos para um candidato às propostas terapêuticas (VALAGATELI et al., 2013).

A partir do perfil físico-químico estabelecido, pode-se descrever qualitativa e quantitativamente a identidade de um fármaco. Além disso, pode indicar a estabilidade do fármaco diante de condições normais e de intempéries, assim como apontar quais métodos analíticos são adequados para a análise de tais substâncias.

Nesta tese foram apresentados dois protótipos a fármacos, ácido 3-O-butanoilbetulínico (3-OBB) e ácido 3-O-butanoilursólico (3-OBU). Estas moléculas resultaram em boa atividade contra protozoários do gênero *Plasmodium* e, dentro do contexto dado às drogas usuais, se mostraram bons candidatos a antimaláricos e à resolução do problema de resistência farmacológica apresentado. Para contribuir com esta descoberta, o presente estudo teve como objetivo fazer a caracterização físico-química e o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis para assegurar a continuidade dos estudos destes compostos.

Os estudos de caracterização físico-química realizados foram a determinação da faixa de fusão pelo método capilar e análise complementar do comportamento térmico das moléculas por calorimetria diferencial exploratória (DSC). Além disso, identificação e caracterização das moléculas por espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ^1H e ^{13}C .

A faixa de fusão determinada pelo método capilar apresentou como resultados para o composto 3-OBU, temperaturas médias de $256,3 \pm 2,5 \text{ }^\circ\text{C}$ – $283,2 \pm 3,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Este resultado foi corroborado pela faixa resultante da análise feita por DSC, com faixa

de 253,59 °C – 261,75 °C. A variação encontrada se deve, provavelmente, à pureza de 83,38% encontrada para o composto, apesar da curva de aquecimento ter apresentado sinal estreito, sem deformação e sem a presença de outros sinais, características de analitos com bom grau de pureza.

O protótipo 3-OBB apresentou faixa capilar de $312,9 \pm 1,2$ °C – $351,0 \pm 4,5$ °C, porém apresentou degradação visual no capilar ao final da análise. O comportamento térmico na curva de DSC demonstra um pico endotérmico anterior ao fenômeno exotérmico característico da fusão do composto, inferindo também a degradação e consequente liberação energética. A faixa encontrada foi de 303,80 °C – 324,00 °C. A variação entre as faixas se deve provavelmente ao processo de degradação molecular citado, além do seu grau de pureza. Assim, os métodos analíticos realizados obtiveram sucesso na análise do 3-OBU, considerando as impurezas presentes, mas não podem caracterizar o composto 3-OBB. Para a análise de fármacos que se decompõem durante a análise térmica seria indicado o método tipo Kofler, com a utilização de análise visual por microscopia, não realizado neste estudo.

A caracterização pela espectrofotometria na região do ultravioleta (400 cm^{-1} a 190 cm^{-1}) foi compatível com a análise dos arranjos eletrônicos das moléculas, que possuem baixa absorvidade de luz. Os máximos encontrados de 205 nm para o 3-OBB e 128 nm para o 3-OBU foram utilizados para a caracterização e para a definição do comprimento de onda utilizado na metodologia cromatográfica desenvolvida, uma vez que o método utiliza, além da detecção por CAD, detecção UV para a quantificação dos protótipos.

A espectrofotometria na região do infravermelho determinou informações sobre os compostos em estudo. As absorções das ligações presentes nas moléculas são determinadas em faixas do espectro na região do IV, por meio da análise das bandas características dos grupos funcionais e das ligações presentes. É uma técnica muito útil na identificação e caracterização de compostos novos ou desconhecidos (WATSON, 2005). Neste caso, por não haver referência, fez-se a descrição das principais bandas resultantes, que não estão presentes nas moléculas precursoras. Ambas as moléculas apresentaram as bandas de deformação axial de C-O (1463 cm^{-1} para o 3-OBU; 1457 cm^{-1} para o 3-OBB) e deformação axial de C=O de éster alifático (1731 cm^{-1} para o 3-OBU; 1730 cm^{-1} para o 3-OBB) presentes na cadeia lateral substituída, identificando os protótipos a fármaco. Tais absorções são evidenciadas nas figuras 4.9 e 4.10.

As análises de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C permitiram a análise das posições atômicas das moléculas 3-OBB e 3-OBU. Os hidrogênios e carbonos pertencentes às cadeias laterais atribuídas ao resultado da semissíntese para o 3-OBB e o 3-OBU foram evidenciados nas figuras 4.13, 4.14, 4.15 e 4.16. Estas informações são importantes para a obtenção de informações estruturais da molécula, além de confirmar suas identidades químicas.

As análises físico-químicas permitiram a identificação e a caracterização dos compostos 3-OBU e 3-OBB, cumprindo objetivos deste estudo, além de contribuir para a informação de literatura, que pode ser utilizada em futuros estudos para a melhor compreensão e aplicação destes protótipos a fármaco.

Outro objetivo estabelecido foi o desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos para avaliação das moléculas em questão. Para tanto, fez-se uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores no ultravioleta e aerossol carregado.

A técnica que cromatografia líquida de alta eficiência tem sido uma ferramenta analítica do escopo farmacêutico há décadas e, com a disponibilidade de novos detectores, como o detector por aerossol carregado (CAD), utilizado neste estudo, se mostra uma técnica importante que continua evoluindo e suprimindo as demandas analíticas cada vez mais rigorosas da análise farmacêutica.

Metodologias analíticas por CLAE, em rotina laboratorial, dependem de um padrão de referência bem caracterizado como parâmetro de comparação. Neste caso, como são moléculas sintetizadas pelo grupo de estudo e não há disponível substância química para utilização referencial, fez-se uso da técnica de balanço de massas para a análise de pureza. O balanço de massas é um método exato para a determinação de impurezas e recomendado pela OMS e compêndios oficiais para o estabelecimento de substâncias de referência (MA et al., 2009).

O balanço feito foi baseado no estudo de GÖRÖG, 2008, que leva em consideração, também, as impurezas de síntese dos compostos e compreende impurezas voláteis (solventes orgânicos e água), impurezas inorgânicas e orgânicas. A avaliação se mostrou satisfatória e resultou em pureza de 94,56% e 83,38% para os compostos 3-OBB e 3-OBU, respectivamente. Apesar da baixa pureza apresentada pelo composto 3-OBU, não houve interferência significativa nas análises físico-químicas e na aplicação do método analítico desenvolvido. A quantidade limitada dos dois compostos impediu tentativas de purificações subsequentes.

O método cromatográfico foi desenvolvido com detecção UV, técnica mais usual na análise de fármacos que possuem cromóforos, e por detector com aerossol carregado. Neste último caso, o sistema permite a avaliação de moléculas que não absorvem luz, porém é limitado na detecção de compostos voláteis, sendo considerado universal no caso de analitos semi-voláteis e não voláteis. Na avaliação de impurezas orgânicas, é possível observar a presença de picos cromatográficos referentes a impurezas no cromatograma com absorção UV que não são determinados no mesmo tempo de retenção no CAD. Neste caso, é provável que as impurezas sejam voláteis e apresentem temperatura de evaporação maior do que 105 °C, temperatura utilizada na perda por dessecação.

Os parâmetros analíticos definidos para o método CLAE-UV-CAD levaram em consideração velocidade de análise, simplicidade de execução das etapas de preparo das amostras e soluções, requisitos do sistema de detecção (no caso do CAD), consumo de solventes orgânicos e meia-vida da coluna cromatográfica.

A detecção no UV foi registrada em 210 nm devido à baixa absorvidade dos compostos 3-OBU e 3-OBB. Uma coluna PhenoSphere Next[®] octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho de partícula) foi selecionada. Colunas menores não atingiram a resolução adequada entre os picos cromatográficos do 3-OBB e 3-OBU. O sistema cromatográfico, operado isocriticamente e em fase reversa, utilizou fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila : água pH 3,0 ajustado com ácido fórmico (85 : 15, v/v), inspirada nas metodologias encontradas para os ácidos betulínico e ursólico encontradas na literatura e relatadas na tabela 3.3. O fluxo de fase móvel estabelecido foi de 1,2 mL/min para diminuir o tempo de eluição dos analitos de interesse. A temperatura de 50 °C foi utilizada para diminuir a viscosidade da fase móvel e otimizar a eluição dos compostos. O tempo de análise de 30 minutos, com separação adequada entre os compostos, foi considerado satisfatório e pode ser aplicado a rotinas de análise.

O método se demonstrou específico, linear, preciso e exato para o objetivo pretendido de quantificar os analitos 3-OBB e 3-OBU.

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a linearidade foi avaliada por análise de variância (ANOVA) e indicou regressão linear significativa para o nível de significância adotado de 5%. O resultado da precisão foi satisfatória intra e inter-dias e apresentou DPR(%) menor do que 2%. A exatidão foi inferida com os resultados encontrados na especificidade, linearidade e precisão.

Com as validades estatísticas apresentadas, o método foi considerado validado e pode ser utilizado com segurança na avaliação dos compostos 3-OBB e 3-OBU.

Conclui-se, por fim, que os métodos físico-químicos utilizados tiveram sucesso na avaliação da identidade e caracterização dos protótipos apresentados. E, também, que o método analítico desenvolvido e validado pode ser utilizado na quantificação das moléculas 3-OBU e 3-OBB.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, S. Modern Pharmaceutical Analysis: An Overview. In: AHUJA, S.; SCYPINSKI, S.. **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis**. San Diego: Academic Press, v. 3, 2001.

BAGGISH, A.L.; HILL, D.R. Antiparasitic agent atovaquone. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 46, p. 1163 – 1173, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003.

CUI, L.; SU, X.Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. **Expert Ver Anti Infect Ther**. v. 7, p. 999 – 1013, 2009.

CULBERT, B.D. Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals. **Separation Science and Technology Series**. vol. 5, p. 119 – 143, 2004.

DASSONVILLE-KLIMPT, A.; ALEXIA, J.; PILLON, M.; MULLIÉ, C.; SONNET, P. Mefloquine derivatives: synthesis, mechanisms of action, antimicrobial activities. **Science Against Microbial Pathogens**. 2011.

DEEPIKA, F.; CHATURAKA, R.; RAJAPAKSE, S. Primaquine in vivax malaria: na update and review on management issues. **Malaria Journal**. v. 10, p. 351, 2011.

DOMINGUEZ-CARMONA, D.B.; ESCALANTE-EROSAA, F.; GARCIA-SOSA, K.; RUIZ-PINELL, G.; GUTIERREZ-YAPUB, M. J.; CHAN-BACABC, A.; GIMÉNEZ-TURBA, A.; PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. **Phytomedicine**. v.17, p. 379-382, 2010.

DUBEY, K. K. e GOEL, N. Evaluation and optimization of downstream process parameters for extraction of Betulinic Acid from the bark of Ziziphus jujubael L. **The Scientific World Journal**. v. 2013, artigo 469674, 2013.

ECKSTEIN-LUDWIG, U.; WEBB, R.J.; VAN GOETHEM, I.D.; EAST, J.M.; KIMURA, M.; O'NEILL, P.M.; BRAY, P.G.; WARD, S.A.; KRISHNA, S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. **Nature**. v. 424, p. 957 – 961, 2003.

FANG, X.; WANG, J.; YU, X.; ZHANG, G.; ZHAO, J. Optimization of microwave-assisted extraction followed by RP-HPLC for the simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in the fruits of *Chaenomeles sinensis*. **Journal of Separation Sciences**. v. 33, p. 1147-1155, 2010.

FRIEDMAN, R; CAFLISCH, A. Discovery of plasmepsin inhibitors by fragment-based docking and consensus scoring. **Chemical Medicine**. V. 4, p. 1317 – 1326, 2009.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKLE, R. E.; COSENTINO, L. M.; BALLAS, L. M.; JIANG, J. B.; JANZEN, W. P.; CHEN, I.; LEE, K. Anti-AIDS agents, Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**. V. 57, n. 2, p. 243-247, 1994.

GARDNER, P.; GELBAND, H.; GRAVES, P.; JONES, K.; MACLEHOSE, H.; OLLIARO, P. Systematic reviews on Malaria: Global policies need global reviews. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 23, p. 387 - 404, 2009.

GBAGUIDI, F.; ACCROMBESSI, G.; MOUDACHIROU, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. HPLC quantification of two isomeric triterpenic acids isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity on *Dermatophilus congolensis*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v 39, n. 5, p. 990-995, 2005.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality and drug analysis. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**. v. 48, p. 247 – 253, 2008.

HIEBSCH, R.R.; RAUBS, T.J.; WATTENBERG, B.W. Primaquine blocks transport by inhibiting the formation of functional transport vesicles. Studies in cell-free assay of protein transport through the golgi apparatus. **Journal of Biological Chemistry**. v. 266, p. 20323 – 20328, 1991.

HUSSAIN, K.; KHAN, M. T.; ISMAIL, Z.; SADIKUN, A. Separation and determination of betulinic acid from a complex matrix using combination of TLC and RP-HPLC. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 25, n. 2, p. 413-422, 2012.

INNOCENTE, A.M.; SILVA, G.N.S.; CRUZ, L.N.; MORAES, M.S.; NARABASHI, M.; SONNET, P.; GOSMANN, G.; GARCIA, C.R.S.; GNOATTO, S.C.B. Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. **Molecules**. V. 17, p. 12004-12014, 2012.

KASHIWADA, Y.; HASHIMOTO, F.; COSENTINO, M.; CHEN, C.; GARRETT, E.; LEE, K. Betulinic Acid and Dihydrobetulinic Acid Derivatives as Potent Anti-HIV Agents. **Journal of Medical Chemistry**. v. 39, p. 1016-1017, 1996.

KUMAR, D.; MALLICK, S.; VEDASIROMONI, J. R.; PAL, B. C. Anti-leukemic activity of *Dillenia indica* L. fruit extract and quantification of Betulinic Acid by HPLC. **Phytomedicine**. V. 17, p. 431-435, 2010.

LEEEA, M. K.; AHNA, Y. M.; LEEB, K. R.; JUNG, J. H.; JUNG, O. S.; HONG, J. Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of *Prunella Spica*: determination of triterpenic acids. **Analytica Chimica Acta**. v. 633, p. 271-277, 2009.

LEITE, J. P. V.; LOMBARDI, J. A.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. Isolamento e monitoramento de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 11, n. 2, p. 77-87, 2001.

LI, G.; YOU, J.; SONG, C.; XIA, L.; ZHENG, J.; SUO, Y. Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits. **Journal of Food Chemistry**. v. 59, p. 2972-2979, 2011.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 49, p. 57 – 68, 1995.

MA, K.; WANG, H.; ZHAO, M.; XING, J. Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high liquid chromatography and differential scanning calorimetry. **Analytica Chimica Acta**. v. 650, p. 227 – 233, 2009.

MACKAPLOW, M.B. Using a mass balance to determine the potency loss during the production of a pharmaceutical blend. **Pharm. Sci. Tech**. v. 11, p. 1045 – 1053, 2010.
MARTIN, D.E.; SALZWEDEL, K.; ALLAWAY, G.P. Bevirimat: a novel maturation inhibitor for the treatment of HIV-1 infection. **Antiviral chemistry and chemotherapy**. v. 19, p. 107-113, 2008.

MAYAUX, J.; BOUSSEAU, A.; PAUWELS, R.; HUET, T.; HÉNIN, Y.; DEREU, N.; EVERS, M.; SOLER, F.; POUJADE, C.; DE CLERCQ, E.; LE PECQ, J. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type into cells. **Medical Sciences**. v. 91, p. 3564-3568, 1994.

MUKHERJEE, R.; KUMAR, V.; SRIVASTAVA, S. K.; AGARWAL, S. K.; BURMAN, A. C. Betulinic Acid Derivatives as Anticancer Agents: Structure Activity Relationship. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 6, p. 271-279, 2006.

NIXON, G.L.; MOSS, D.M.; LALLOO, D.G.; FISHER, N.; O'NEIL, P.M.; WARD, S.A.; BIAGINI, G.A. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 68, p. 977 – 985, 2013.

OLENICK, J.G.; HAHN, F.E. Mode of action of primaquine: preferential inhibition of protein biosynthesis in *Bacillus megaterium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 1, p. 259 – 262, 1972.

OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, C. A. M. e ESPÍNDOLA, A. P. D. M. Determination of the Triterpenoid Betulinic Acid in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. **Phytochemical Analysis**. V. 13, p. 95-98, 2002.

PAIA, S. R.; NUMBALKARB, M. S.; PAWARC, N. V.; DIXITA, G. B. Optimization of extraction techniques and quantification of Betulinic Acid by Rp- HPLC method from *Ancistrocladus heyneanus* Wall. Ex Grah. **Industrial Crops and Products**. v. 34, p. 1458-1464, 2011.

PAINTER, H.J.; MORRISEY, J.M.; MATHER, M.W.; VAIDYA, A.B. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. **Nature**. v. 466, p. 88 – 91, 2007.

RAMALHETE, C.; DA CRUZ, F.P.; LOPES, D.; MULHOVO, S.; ROSARIO, V.E.; PRUDENCIO, M.; FERREIRA, M.J. Triterpenoids as inhibitors of erythrocytic and liver

stages of *Plasmodium* infections. **Journal of Medical Chemistry**. v. 19, p. 7474 – 7481, 2011.

RYU, S.Y.; OAK, M.H.; YOON, S.K.; CHO, D.I. Antiallergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. **Planta Medica**. v. 66, p. 358 – 360, 2000.

SCHLAGENHAUF, P. Malaria: From prehistory to present. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 18, p. 189-205, 2004.

SCHÜHLY, W.; HEILMANN, J.; ÇALIS, I.; STICHER, O. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. **Planta Med**. v. 65, p. 740-743, 1999.

SILVA, G. N. S.; MARIA, N. R. G.; SCHUCK, D. S.; CRUZ, L. N.; MORAES, M. S.; NAKABASHI, M.; GREABIN, C.; GOSMANN, G.; GARCIA, C. R. S.; GNOATTO, S. C. B. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. **Malaria Journal**. v.12, p. 89, 2013.

SMITH, P.F.; OGUNDELE, A.; FORREST, A.; WILTON, J.; SALZWEDEL, K.; DOTO, J.; ALLAWAY, G.P.; MARTIN, D.E. Phase I and II study of safety, virologic effect, and pharmacokinetics (Pharmacodynamics of single-dose 3-O- (3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid (Bevirimat) against Human Immunodeficiency virus infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. V.51, p. 3574-3581, 2007.

SOLER, D.; POUJATE, C.; EVERS, M.; CARRY, J.; HÉNIN, Y.; BOUSSEAU, A.; HUET, T.; PAUWELS R.; CLERCQ, E.; MAYAUX, J.; PECQ, J.; DEREU, N. Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Specific Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry. **Journal of Medical Chemistry**. v. 39, p. 1069-1083, 1996.

SLATER, A.F. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. **Pharmacology Therapy** v. 57, p. 203 – 235, 1993.

SRIVASTAVA, I.K.; VAIDYA, A.B. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, p. 1334 – 1339, 1999.

SUH, N.; HONDA, T.; FINLAY, H.J.; BARCOWSKY, A. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. **Cancer Research**. v. 58, p. 717 – 723, 1998.

TAN, K.R.; MAGILL, A.J.; PARISE, M.E.; ARGUIN, P.M. Meeting report doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**. v. 84, p. 517 – 531, 2011.

TOKUDA, H.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K.; ITO, Y. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Letters**. v. 33, p. 279 – 285, 1986.

TRAVASSOS, M.A.; LAUFER, M.K. Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacologic and clinical considerations. **Pediatric Research**. v. 65, p. 64 – 70, 2009.

VALDERRAMOS, S.G.; FIDOCK, D.A. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. **Trends on Pharmacological Sciences**. v. 27, p. 594 – 601, 2006.

VAGAPANDU, S.; JAIN, M.; KAUR, K.; PREMANAND, P.; PATEL, S.R.; JAIN, R. Recent advances in antimalarial drug development. **Medicinal Research Reviews**. v. 27, p. 65-107, 2007.

VALAGALETI, R.; BURNS, P.K.; **Drug Inform**. V. 37, p. 407 – 438, 2003.

VERMA, A.K.; SLAGA, T.J.; WERTZ, P.W.; MUELLER, G.C.; BOUTWELL, R.K. Inhibition of skin tumor promotion by retinoic acid and its metabolite 5,6-epoxyretinoic acid. **Cancer Research**. v. 40, p. 2367 – 2371, 1980.

WANG, P.; READ, M.; SIMS, P.F.G.; HYDE, J.E. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* determined by mutations in dihydropteroate synthetase and na additional factor associated with folate utilization. **Molecular Microbiology**. V. 23, p. 979 – 986, 1997.

WANG, H.; WANG, Z.; GAO, W. Comparative determination of ursolic acid and oleanolic acid from *Macrocarpium officinalis* (Sieb. Et Zucc.) Nakai by RP-HPLC. **Industrial Crops and Products**. v. 28, p. 328-332, 2008.

WATSON, D.G. Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. 2^o Ed. Edinburgh. **Elsevier Churchill Livingstone**, 2005.

WHO. World Malaria Report 2013. **World Health Organization**, 2013.

WHO. World Malaria Report 2014. **World Health Organization**, 2014.

WHO. World Malaria Report 2015. **World Health Organization**, 2015.

WHO. World Malaria Report 2016. **World Health Organization**, 2016.

WOODROW, C. J.; KRISHNA, S.. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 63, p. 1586 - 1596, 2006.

XU, H.; ZENG, F.; WAN, M.; S, K. Anti-HIV Triterpene Acids from *Geum japonicum*. **Journal of Natural Products**. v. 59, p. 643-645, 1996.

YOGEE SWARI, P. e SRIRAM, D.; Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties. **Current Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 657-666, 2005.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002.

ZHAO, G.; YAN, W. e CAO, D. Simultaneous determination of Betulin and Betulinic Acid in White birch bark using RP-HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 43, p. 959-962, 2007.

ZHOU, C.; CHEN, K.; SUN, C.; CHEN, Q.; ZHANG, W.; LI, X. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. By HPLC. **Biomedical Chromatography**. v. 21, p. 755-761, 2007.