

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CLEYDSOON FINOTTI CORDEIRO

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA CUMARINA 8-METOXI-3-(4-NITROBENZOIL)-6-PROPIL-2H-CROMAN-2-ONA E ESTUDOS DE IDENTIFICAÇÃO E DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

ALFENAS/MG

2024

CLEYDSON FINOTTI CORDEIRO

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA CUMARINA 8-METOXI-3-(4-NITROBENZOIL)-6-PROPIL-2H-CROMAN-2-ONA E ESTUDOS DE IDENTIFICAÇÃO E DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rudy Bonfilio.

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho.

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Lopardi Franco.

Colaboradora: Prof. Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira.

Colaboradora: Prof. Dra. Lívia de Figueiredo Diniz Castro.

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Cordeiro, Cleydson Finotti .

Avaliação da estabilidade da cumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona e estudos de identificação e do potencial biológico de seus produtos de degradação / Cleydson Finotti Cordeiro. - Alfenas, MG, 2024.

163 f. : il. -

Orientador(a): Rudy Bonfilio.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Cumarina. 2. Produtos de degradação. 3. Estabilidade. I. Bonfilio, Rudy, orient. II. Título.

CLEYDSON FINOTTI CORDEIRO

"AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA CUMARINA 8-METOXI-3-(4- NITROBENZOIL)-6-PROPIL-2H-CROMAN-2-ONA E ESTUDOS DE IDENTIFICAÇÃO E DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO"

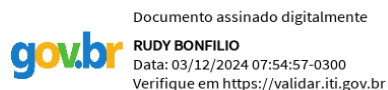
O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovado em: 06 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Rudy Bonfilio

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Profa. Dra. Edith Cristina Laignier Cazedey

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Daniel Henriques Soares Leal

Instituição: Universidade Federal de Itajubá

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Rudy Bonfilio, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2024, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1306611** e o código CRC **D741E279**.

À Daniela pelo apoio, companheirismo, amor e cumplicidade e à Manuela que há 10 anos completa nossas vidas com seus sorrisos, encantos e magia.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por todas as pessoas especiais que coloca ao longo do meu caminho. A todos os professores, desta e de todas as outras jornadas, pelos conhecimentos passados, paciência e dedicação.

Aos meus pais que sempre me incentivaram e que nunca mediram esforços para ajudar no que fosse preciso. Agradeço o amor, carinho, dedicação e paciência.

Aos meus irmãos, que mesmo distantes, estão sempre presentes.

À Daniela pelo apoio e incentivo. Sem você esta etapa não seria possível.

A toda minha família, tios, primos, sobrinhos e agregados por fazerem parte da minha caminhada.

Aos meus orientadores e coorientadores, professores Rudy, Diogo e Lucas por toda ajuda ao longo desses anos.

Aos colegas do LQFar.

Aos colegas do laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed pelo incentivo e ajuda nos momentos em que precisei.

Ao amigo Eduardo por todos os conhecimentos compartilhados.

Ao amigo Juan por todo o apoio.

Às professoras Pollyanna Francielly de Oliveira, Lívia de Figueiredo Diniz Castro e aos demais colaboradores que contribuíram para execução desse trabalho.

Aos membros da banca pela disponibilidade, correções e críticas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

As doenças negligenciadas constituem um conjunto de enfermidades tropicais que afetam principalmente as populações mais vulneráveis. Estudos demonstraram o potencial da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona no combate à doença de Chagas e leishmaniose. Paralelamente, estudos de estabilidade são exigidos pelas agências reguladoras durante as fases iniciais de desenvolvimento de um novo candidato a fármaco, pois a instabilidade de uma molécula pode levar à formação de produtos de degradação (PDs) prejudiciais à saúde humana. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho sintetizar a referida nitrobenzoilcumarina, avaliar sua estabilidade através de estudos de degradação forçada, identificar seus PDs, verificar se o potencial tripanocida será mantido nesses subprodutos e avaliar o potencial citotóxico e mutagênico tanto da cumarina, quanto dos PDs identificados. A síntese da nitrobenzoilcumarina foi realizada utilizando o método de Duff e posterior reação de Knoevenagel entre formil-diidroeuugenol e 4-nitrobenzoilacetato de etila. Os potenciais citotóxico e mutagênico foram avaliados, respectivamente, através do ensaio colorimétrico *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT) e micronúcleo. A avaliação da estabilidade intrínseca foi realizada através de estudos de degradação forçada, conforme condições preconizadas pelos guias ICH Q3A (R2), ICH Q1B e resolução ANVISA RDC n° 53/2015. Adicionalmente, a nitrobenzoilcumarina foi exposta a condições de estabilidade acelerada, sendo incubada a $75 \% \pm 5 \%$ de umidade relativa e temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Foi desenvolvido e validado um método analítico empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção no ultravioleta para doseamento da nitrobenzoilcumarina e quantificação de seus PDs. A elucidação estrutural desses subprodutos foi realizada por espectrometria de massas e seus potenciais mutagênicos preditos por ensaios *in silico* empregando técnicas do tipo QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*). Os estudos biológicos demonstraram citotoxicidade dose dependente da nitrobenzoilcumarina, apresentando concentração inibitória média de $238,98 \mu\text{M} \pm 23,11 \mu\text{M}$, semelhante a valores já reportados para os fármacos benznidazol e anfotericina B, utilizados, respectivamente, no tratamento da doença de Chagas e leishmaniose. Já os estudos de genotoxicidade revelaram ausência de efeito genotóxico em concentrações baixas. Na avaliação da estabilidade intrínseca, foi verificado que a nitrobenzoilcumarina sofre degradação quando exposta à hidrólise alcalina, solução de íons metálicos e em condições oxidativas. Os estudos de estabilidade acelerada demonstraram que a nitrobenzoilcumarina após seis meses de incubação não sofre degradação nas condições de temperatura e umidade preconizadas para o ensaio. Já as avaliações de

mutagenicidade *in silico* indicaram ausência de alertas estruturais nos PDs relacionados ao *endpoint* pesquisado ou ausência de alertas estruturais discrepantes entre a molécula de origem e seus subprodutos, sugerindo que os compostos podem ser considerados seguros. Tais resultados evidenciam o potencial da nitrobenzoilcumarina como um promissor protótipo a fármaco a ser utilizado no combate à doença de Chagas e leishmaniose. Estudos adicionais *in vitro* estão sendo realizados para comprovar a segurança biológica dos PDs.

Palavras-chave: cumarina; produtos de degradação; estabilidade.

ABSTRACT

Neglected diseases are a group of tropical illnesses that mainly affect the most vulnerable populations. Studies have shown the potential of the nitrobenzoylcoumarin 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one against Chagas disease and leishmaniasis. Meanwhile, stability studies are required by regulatory agencies during the initial stages of drug candidate development, as molecule instability can lead to the formation of degradation products (DPs) harmful to human health. Thus, the objective of this work was to synthesize the mentioned nitrobenzoylcoumarin, evaluate its stability through forced degradation studies, identify its DPs, verify if the trypanocidal potential will be maintained in these by-products and assess the cytotoxic and mutagenic potential of both the coumarin and the identified DPs. The synthesis of nitrobenzoylcoumarin was carried out using the Duff method followed by a Knoevenagel reaction between formyl-dihydroeugenol and ethyl 4-nitrobenzoylacetate. The cytotoxic and mutagenic potentials were evaluated, respectively, using the Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide colorimetric assay and the micronucleus test. The evaluation of intrinsic stability was conducted through forced degradation studies following the conditions recommended by ICH Q3A (R2), ICH Q1B guidelines and ANVISA resolution No. 53/2015. Additionally, the nitrobenzoylcoumarin was subjected to accelerated stability conditions, incubated at $75\% \pm 5\%$ of relative humidity and $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. An analytical method employing high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection was developed and validated for the quantification of nitrobenzoylcoumarin and its DPs. The structural elucidation of these by-products was performed by mass spectrometry and their mutagenic potentials were predicted by *in silico* assays employing QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) techniques. Biological studies demonstrated dose-dependent cytotoxicity of nitrobenzoylcoumarin with a mean inhibitory concentration of $238.98 \mu\text{M} \pm 23.11 \mu\text{M}$, similar to values reported for the drugs benznidazole and amphotericin B, that are used, respectively, in the treatment of Chagas disease and leishmaniasis. Genotoxicity studies revealed an absence of genotoxic effects at low concentrations for nitrobenzoylcoumarin. In the evaluation of intrinsic stability, it was found that nitrobenzoylcoumarin undergoes degradation when exposed to alkaline hydrolysis, metal ion solutions and oxidative conditions. Accelerated stability studies demonstrated that nitrobenzoylcoumarin did not undergo degradation after six months of incubation under the recommended temperature and humidity conditions for the assay. *In silico* mutagenicity assessments indicated the absence of structural alerts in the related by-products concerning the researched endpoint or the absence of discrepant structural alerts

between the parent molecule and its by-products. This suggests that the compounds may be considered safe. The results demonstrated the potential of nitrobenzoylcoumarin as a promising prototype of new drug candidate to be used in the treatment of Chagas disease and leishmaniasis. Additional *in vitro* studies are being conducted to confirm the biological safety of the PDs.

Keywords: coumarin; degradation products; stability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i>	31
Figura 2 -	Países onde a doença de Chagas está presente.....	32
Figura 3 -	Ciclo de transmissão da leishmaniose.....	34
Figura 4 -	Núcleo fundamental 2H-1-benzopirran-2-ona ou cumarina simples.	36
Figura 5 -	Estruturas químicas de diferentes tipos de cumarinas.	36
Figura 6 -	Cumarinas sintéticas e naturais com potencial tripanocida.	41
Figura 7 -	Cumarinas sintéticas e naturais com potencial leishmanicida.	43
Figura 8 -	Estrutura química da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.....	56
Figura 9 -	Predição de possíveis produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.....	58
Figura 10 -	Esquema da reação de síntese da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.....	72
Figura 11 -	Mecanismo proposto para a síntese do formil-diidroeuogenol utilizando o método de Duff.	73
Figura 12 -	Mecanismo proposto para a síntese da nitrobenzoilcumarina. Reação de Knoevenagel entre formil-diidroeuogenol e 4-nitrobenzoilacetato de etila.....	73
Figura 13 -	Espectro de absorção no infravermelho na faixa de 4000 a 650 cm ⁻¹ , 32 scans e resolução de 4 cm ⁻¹ obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.....	75
Figura 14 -	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.....	76
Figura 15 -	Subespectro DEPT-135 obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.....	77
Figura 16 -	Espectro de RMN de ¹ H e extensões obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.....	78
Figura 17 -	Espectro de massas de baixa resolução obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	79

Figura 18 -	Espectro de massas de alta resolução obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoi)-6-propil-2H-croman-2-ona. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min ⁻¹ , nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s ⁻¹	80
Figura 19 -	Curvas térmicas TG e DTG na faixa de 25 °C a 1000 °C. Razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 60 mL.min ⁻¹	81
Figura 20 -	Curvas térmicas TG e DTG na faixa de 25 °C a 1000 °C. Razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ em atmosfera de ar sintético com fluxo de 60 mL.min ⁻¹	82
Figura 21 -	Curva DSC na faixa de 100 °C a 170 °C. Razão de aquecimento de 0,5 °C.min ⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min ⁻¹	82
Figura 22 -	Viabilidade celular após 24 horas de exposição da linhagem V79 a diferentes concentrações da nitrobenzoilcumarina.....	84
Figura 23 -	Eventos de genotoxicidade apresentados pelas células V79 após exposição à nitrobenzoilcumarina por 3 horas.....	86
Figura 24 -	Biomarcadores de instabilidade genética observados no ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese após exposição das células V79 à nitrobenzoilcumarina por 3 horas.....	88
Figura 25 -	Espectro de absorção da nitrobenzoilcumarina na faixa de 200 a 600 nm. Amostra preparada na concentração de 0,1 mg.mL ⁻¹ em metanol.....	90
Figura 26 -	Espectro de absorção na região do ultravioleta do benzeno e possíveis estados de energia na molécula.....	91
Figura 27 -	Curva de regressão da nitrobenzoilcumarina na faixa de 0,15 µg.mL ⁻¹ a 1000 µg.mL ⁻¹ em diluente.....	92
Figura 28 -	Cromatograma obtido para a solução da nitrobenzoilcumarina (0,5 mg.mL ⁻¹). Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, volume de injeção 20 µL, fluxo de 2,0 mL.min ⁻¹ e detecção em 259 nm.....	94
Figura 29 -	Gráfico de pureza da solução amostra da nitrobenzoilcumarina preparada na concentração de 0,5 mg.mL ⁻¹ . Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, volume de injeção 20 µL, fluxo de 2,0 mL.min ⁻¹ e faixa de varredura de 200 a 800.....	96

Figura 30 -	Curva analítica para a faixa de trabalho destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina. Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, volume de injeção 20 µL, fluxo de 2,0 mL.min ⁻¹ e detecção em 259 nm.....	99
Figura 31 -	Gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente para a faixa de trabalho destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina.	99
Figura 32 -	Curva analítica para a faixa de trabalho destinada à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina. Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, volume de injeção 20 µL, fluxo de 2,0 mL.min ⁻¹ e detecção em 259 nm.	102
Figura 33 -	Gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente para a faixa de trabalho destinada à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina.....	102
Figura 34 -	Efeitos das variáveis avaliadas na robustez do método analítico destinado à quantificação da nitrobenzoilcumarina.	110
Figura 35 -	Efeitos das variáveis avaliadas na robustez do método analítico destinado à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina.	111
Figura 36 -	Cromatograma do perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta à solução de NaOH 0,1 M por 30 minutos. Fase móvel: água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de 2,0 mL.min ⁻¹ e detecção em 259 nm.....	112
Figura 37 -	Cromatograma do perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta à solução de CuSO ₄ 0,05 M por 6 dias. Fase móvel: água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de 2,0 mL.min ⁻¹ e detecção em 259 nm.....	112
Figura 38 -	Cromatograma do perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta à solução de H ₂ O ₂ 1 % por 10 horas. Fase móvel: água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de 2,0 mL.min ⁻¹ e detecção em 259 nm.....	113
Figura 39 -	Espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando metanol como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de	

- dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C e tensão no cone 10 V... 118
- Figura 40 - Ampliação do espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando metanol como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C e tensão no cone 10 V... 118
- Figura 41 - Estrutura química proposta para o produto de degradação da nitrobenzoilcumarina formado pela metanólise do grupo lactona na condição de hidrólise básica. Fórmula molecular: C₂₁H₂₁NO₇. Massa molecular: 399, 4 g.mol⁻¹..... 119
- Figura 42 - Reação de metanólise da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona exposta à solução de NaOH 0,1M, utilizando metanol como co-solvente..... 120
- Figura 43 - Espectro de massas de alta resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando metanol como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min⁻¹, nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s⁻¹..... 120
- Figura 44 - Espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando metanol deuterado como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V. 121
- Figura 45 - Ampliação do espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica empregando metanol deuterado como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V..... 122
- Figura 46 - Cromatograma do perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta à solução de NaOH 0,1 M utilizando acetonitrila como co-solvente. Fase móvel ácido trifluoroacético 0,1% em água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de

	0,3 mL.min ⁻¹ e detecção em 259 nm.....	123
Figura 47 -	Espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 0,684 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando acetonitrila como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	124
Figura 48 -	Ampliação do espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,684 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica empregando acetonitrila como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	125
Figura 49 -	Estrutura química proposta para o produto de degradação da nitrobenzoilcumarina formado pela hidrólise do grupo lactona. Fórmula molecular: C ₂₀ H ₁₉ NO ₇ . Massa molecular: 385,4 g.mol ⁻¹	125
Figura 50 -	Reação de hidrólise da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona exposta à solução de NaOH 0,1M.....	126
Figura 51 -	Espectro de massas de alta resolução obtido para o PD com TRR de 0,684 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica empregando acetonitrila como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min ⁻¹ , nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s ⁻¹	126
Figura 52 -	Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 1,28 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de CuSO ₄ 0,05 M. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	127
Figura 53 -	Espectro de massas ampliado obtido para o PD com TRR de 1,28 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de CuSO ₄ 0,05 M. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio	

	90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.....	128
Figura 54 -	Espectro de massas de alta resolução obtido para o PD com TRR de 1,28 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de CuSO ₄ 0,05 M. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min ⁻¹ , nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s ⁻¹	129
Figura 55 -	Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H ₂ O ₂ 1 % (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	130
Figura 56 -	Ampliação do espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H ₂ O ₂ 1 % (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	131
Figura 57 -	Estrutura química proposta para o produto de degradação com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina formado em condições oxidativas. Fórmula molecular: C ₁₅ H ₁₈ O ₆ . Massa molecular: 294,3 g.mol ⁻¹	131
Figura 58 -	Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H ₂ O ₂ 1 % (v/v) utilizando metanol deuterado. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	132
Figura 59 -	Espectro de massas de alta resolução obtido para o PD com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H ₂ O ₂ 1 % (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min ⁻¹ , nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s ⁻¹	133

Figura 60 -	Mecanismo proposto para formação do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina quando exposta a condições oxidativas.	133
Figura 61 -	Cromatograma obtido para o 4-nitrofenol. Fase móvel ácido trifluoroacético 0,1% em água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de 0,3 mL.min ⁻¹ e detecção em 259 nm.	134
Figura 62 -	Espectro de massas de baixa resolução obtido para o 4-nitrofenol. ESI (-), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	135
Figura 63 -	Espectro de íons extraídos obtido para o 4-nitrofenol na amostra da nitrobenzoilcumarina exposta à degradação oxidativa. ESI (-), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	135
Figura 64 -	Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,38 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H ₂ O ₂ 1% (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	136
Figura 65 -	Estrutura química proposta para o produto de degradação com TRR de 0,38 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina formado em condições oxidativas. Fórmula molecular: C ₁₂ H ₁₄ O ₂ . Massa molecular: 190,2 g.mol ⁻¹	137
Figura 66 -	Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,53 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H ₂ O ₂ 1% (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.	138
Figura 67 -	Estrutura química proposta para o produto de degradação com TRR de 0,53 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina formado em condições oxidativas. Fórmula molecular: C ₁₁ H ₁₄ O ₃ .	

	Massa molecular: 194,2 g.mol ⁻¹	138
Figura 68 -	Espectro de massas de alta resolução obtido para o PD com TRR de 0,53 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H ₂ O ₂ 1% (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min ⁻¹ , nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s ⁻¹	139
Figura 69 -	Esquema proposto para formação dos produtos de degradação com TRR de 0,38 e 0,53 quando da exposição da nitrobenzoilcumarina a condições oxidativas.	139
Figura 70 -	Produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina identificados durante os estudos de degradação forçada.	140
Figura 71 -	Cromatogramas das amostras do estudo de estabilidade acelerada no tempo 0 e após 3 e 6 meses de incubação à 40 °C ± 2 °C e 75 % ± 5 % de umidade relativa. Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de 2,0 mL.min ⁻¹ e detecção em 259 nm.	141
Figura 72 -	Alerta estrutural nitro-aromático identificado na nitrobenzoilcumarina para o <i>endpoint</i> de mutagenicidade bacteriana.	147
Figura 73 -	Predição de mutagenicidade bacteriana <i>in silico</i> para os produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina realizada utilizando os <i>softwares</i> Derek Nexus® e Sarah Nexus®.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições de degradação utilizadas na avaliação da estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina.	66
Tabela 2 -	Atribuições das bandas do espectro de infravermelho aos grupos correspondentes na molécula da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.	75
Tabela 3 -	Avaliação das curvas de regressão obtidas a partir de da nitrobenzoilcumarina preparadas nas faixas de 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	93
Tabela 4 -	Parâmetros cromatográficos da solução amostra (0,5 mg.mL^{-1}).	94
Tabela 5 -	Testes estatísticos aplicados na avaliação do modelo de regressão linear obtido para a faixa de trabalho destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina pelo método analítico desenvolvido.	100
Tabela 6 -	Testes estatísticos aplicados na avaliação do modelo de regressão linear obtido para a faixa de trabalho destinada à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina pelo método analítico desenvolvido.	103
Tabela 7 -	Resultados dos parâmetros de precisão e exatidão para a faixa do método destinada à quantificação dos produtos de degradação.	105
Tabela 8 -	Resultados dos parâmetros de precisão e exatidão para a faixa do método destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina.	105
Tabela 9 -	Matriz 01 para as variáveis, condições e combinações experimentais avaliadas na robustez do método para quantificação da nitrobenzoilcumarina.	107
Tabela 10 -	Matriz 02 para as variáveis, condições e combinações experimentais avaliadas na robustez do método para quantificação do produto de degradação presente na amostra analisada.	109
Tabela 11 -	Resultados obtidos nos estudos de degradação forçada para a nitrobenzoilcumarina.	114
Tabela 12 -	Parâmetros de resolução calculados entre os picos da nitrobenzoilcumarina e seus produtos de degradação.	116
Tabela 13 -	Resultados do estudo de estabilidade acelerada.	141
Tabela 14 -	Classificação das impurezas com relação à mutagenicidade e	

	medidas de controle preconizadas pelo guia ICH M7 (R2).	143
Tabela 15 -	Matriz decisória para predições in silico utilizando os softwares Derek e Sarah Nexus®.	146

LISTA DE SIGLAS

ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC -	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
ASTM -	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP -	Adenosina trifosfato (do inglês: <i>Adenosine TriPhosphate</i>)
ATR -	Reflectância total atenuada (do inglês: <i>Attenuated total reflectance</i>)
CDC -	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CV -	Coefficiente de variação
Da -	Dalton
DEPT -	Intensificação sem distorção por transferência de polarização (do inglês: <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>)
DNA -	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DSC -	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês: <i>Differential scanning calorimetry</i>)
EMA -	Agência europeia de medicamentos (do inglês: <i>European Medicines Agency</i>)
EPA -	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
ESI -	<i>Electrospray</i>
eV -	Elétron-volt

FDA -	<i>Food and Drug Administration</i>
FM -	Fase móvel
FTIR -	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier Transform infrared</i>)
HPLC -	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC -	Intervalo de confiança
ICH -	<i>International Conference on Harmonization</i>
IC50 -	Concentração inibitória média
IDN -	Índice de divisão nuclear
IFA -	Insumo farmacêutico ativo
K' -	Fator de retenção
Kg -	Kilograma
KV -	Quilovolt
LD -	Limite de detecção
LQ -	Limite de quantificação
LQFar -	Laboratório de pesquisa em Química Farmacêutica
M -	Molar
mg -	Miligrama

MHz -	megahertz
mL -	Mililitro
MSF -	Médicos sem fronteiras
<i>m/z</i> -	Relação massa/carga
nm -	nanômetros
OECD -	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OPAS -	Organização Pan-Americana da Saúde
PA -	<i>Pro analyse</i>
PD -	Produto de degradação
PDA -	<i>Photodiode array</i>
ppm -	Partes por milhão
QSAR -	<i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i>
RDC -	Resolução da Diretoria Colegiada
RE -	Resolução
RMN -	Ressonância magnética nuclear
ROS -	Espécies reativas de oxigênio (do inglês: <i>reactive oxygen species</i>)
rpm -	Rotações por minuto

SOHN -	<i>Self-organising hypothesis network</i>
TG -	Termogravimetria (do inglês: <i>Thermogravimetry</i>)
TMS -	Tetrametilsilano
TRR -	Tempo de retenção relativo (do inglês: <i>relative retention time – RRT</i>)
TTC -	Limiar de preocupação toxicológica (do inglês: <i>Threshold of Toxicological Concern</i>)
UHPLC -	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UNIFAL -	Universidade Federal de Alfenas
UPLC -	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
USP -	Farmacopeia Americana (do inglês: <i>United States Pharmacopeia</i>)
UV -	Ultravioleta
V -	Volt
v/v -	Volume/volume
WHO -	<i>World Health Organization</i>
µg -	Micrograma
µL -	Microlitro
µM -	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DA LITERATURA	30
2.1	DOENÇA DE CHAGAS.....	30
2.2	LEISHMANIOSE	33
2.3	CUMARINAS	35
2.4	CUMARINAS BIOATIVAS FRENTE À DOENÇA DE CHAGAS	38
2.5	CUMARINAS BIOATIVAS FRENTE À LEISHMANIOSE.....	41
2.6	MECANISMOS DE AÇÃO DE CUMARINAS TRIPANOCIDAS E LEISHMANICIDAS	44
2.7	ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE FÁRMACOS	48
2.8	PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	50
2.9	NITROBENZOILCUMARINA 8-METOXI-3-(4-NITROBENZOIL)-6-PROPIL-2H-CROMAN-2-ONA	55
3	OBJETIVOS	59
3.1	OBJETIVOS GERAIS	59
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	60
4.2	REAGENTES.....	61
4.3	SÍNTESE DA CUMARINA ALVO DO ESTUDO.....	61
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA CUMARINA	62
4.4.1	Ressonância magnética nuclear (RMN)	62
4.4.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	62
4.4.3	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução (UPLC-MS).....	63
4.4.4	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS)	63
4.4.5	Caracterização térmica.....	64
4.5	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA ANÁLISE DA NITROBENZOILCUMARINA E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	65

4.6	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE INTRÍNSECA DA NITROBENZOILCUMARINA.....	66
4.7	AVALIAÇÃO DA NITROBENZOILCUMARINA NAS CONDIÇÕES DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	67
4.8	LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS CÉLULAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	67
4.9	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA NITROBENZOILCUMARINA.....	68
4.10	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA NITROBENZOILCUMARINA.....	69
4.11	ESTUDOS <i>IN SILICO</i> PARA PREDIÇÃO DA GENOTOXICIDADE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA NITROBENZOILCUMARINA.....	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	SÍNTESE DA NITROBENZOILCUMARINA 8-METOXI-3-(4-NITROBENZOIL)-6-PROPIL-2H-CROMAN-2-ONA	72
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA CUMARINA	74
5.2.1	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	74
5.2.2	Ressonância magnética nuclear	76
5.2.2.1	Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de ¹³ C).....	76
5.2.2.2	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹ H).....	78
5.2.3	Espectrometria de massas.....	79
5.2.4.	Análise térmica	81
5.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA NITROBENZOILCUMARINA.....	83
5.4	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA NITROBENZOILCUMARINA.....	85
5.5	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR HPLC PARA ANÁLISE DA NITROBENZOILCUMARINA E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	89
5.5.1	Seleção do comprimento de onda do método analítico para detecção por ultravioleta	90
5.5.2	Determinação da concentração de trabalho do método analítico.....	92
5.5.3	Parâmetros cromatográficos	93
5.5.4	Avaliação do parâmetro de seletividade do método analítico	96
5.5.5	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	97
5.5.6	Linearidade.....	98
5.5.7	Precisão e exatidão	104

5.5.8	Intervalo	106
5.5.9	Robustez	106
5.6	ESTABILIDADE INTRÍNSECA DA NITROBENZOILCUMARINA	111
5.7	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	116
5.7.1	Elucidação estrutural do produto de degradação obtido a partir da hidrólise básica da nitrobenzoilcumarina empregando metanol como co-solvente	117
5.7.2	Elucidação estrutural do produto de degradação obtido a partir da hidrólise básica da nitrobenzoilcumarina empregando acetonitrila como co-solvente	122
5.7.3	Elucidação estrutural do produto de degradação formado na exposição da nitrobenzoilcumarina à solução de íons metálicos	127
5.7.4	Elucidação estrutural dos produtos de degradação formados pela exposição da nitrobenzoilcumarina a condições oxidativas	130
5.7.4.1	Elucidação estrutural do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina.....	130
5.7.4.2	Elucidação estrutural do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,38 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina.....	136
5.7.4.3	Elucidação estrutural do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,53 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina.....	137
5.8	ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA DA NITROBENZOILCUMARINA.....	140
5.9	ESTUDOS <i>IN SILICO</i> PARA PREDIÇÃO DE MUTAGENICIDADE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA NITROBENZOILCUMARINA.....	143
6	CONCLUSÕES	151
	REFERÊNCIAS	153

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas constituem um conjunto de enfermidades tropicais endêmicas que afetam principalmente as populações mais vulneráveis localizadas no Continente africano, Ásia e América Latina. Ocorrem principalmente em ambientes rurais remotos, onde as pessoas não têm acesso a serviços básicos de saúde. São causadas por diferentes agentes patogênicos e representam um grande problema em saúde pública, acometendo mais de 1,7 bilhão de pessoas e provocando entre 500 mil a 1 milhão de óbitos anualmente. Dentre essas enfermidades estão a doença de Chagas e a leishmaniose (Médicos sem Fronteiras, 2024).

Estima-se que aproximadamente 8 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo *Trypanossoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Embora a doença seja endêmica da América Latina, diversos casos têm sido reportados nas últimas décadas em países de diferentes continentes. Ao longo de mais de um século desde a sua descoberta, apenas os fármacos nifurtimox e benznidazol foram desenvolvidos para o seu tratamento. Além disso, tais drogas apresentam eficácia limitada e estão associadas a diversos efeitos colaterais (World Health Organization, 2024).

Já a leishmaniose é uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo endêmica em 99 países. Anualmente são relatados cerca de 1 milhão de novos casos da doença, sendo as manifestações clínicas variáveis dependendo da virulência da espécie infectante e suscetibilidade do hospedeiro. Os fármacos utilizados no tratamento da doença incluem antimoniais pentavalentes, pentamidina, anfotericina B, miltefosina e paromomicina, os quais estão relacionados à problemas graves de toxicidade, resistência e alto custo (Organização Pan-Americana da Saúde, 2024; Sierra *et al.*, 2021).

Neste contexto, assume papel relevante a busca por novos agentes terapêuticos capazes de proporcionarem um combate mais efetivo a estas doenças. Pesquisas envolvendo produtos naturais representam uma importante estratégia no desenvolvimento de novos fármacos. Cumarinas sintéticas e naturais têm sido descritas por diversos pesquisadores como potenciais protótipos de novos candidatos a fármacos a serem utilizados no combate à doença de Chagas e à leishmaniose (Basualto *et al.*, 2018; De Figueiredo Peloso *et al.*, 2020; Shahbaz *et al.*, 2024).

Estudos recentes demonstraram o potencial terapêutico da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona. Brancaglioni *et al.* (2018) avaliaram a atividade da substância frente à doença de Chagas. Os autores realizaram ensaios *in vitro*, evidenciando atividade promissora contra a forma amastigota do *Trypanossoma cruzi* e baixa

toxicidade frente a células de mamíferos. Aliado a isso, estudos *in vivo* mostraram a redução da parasitemia em ratos tratados com a substância (Brancaglioni *et al.*, 2018). De Figueiredo Peloso *et al.* (2020) avaliaram o potencial da nova cumarina no combate à leishmaniose. Os autores demonstraram que a substância apresenta atividade leishmanicida semelhante à anfotericina B, sendo capaz de reduzir a carga parasitária em animais (De Figueiredo Peloso *et al.*, 2020). Em vista dos resultados iniciais promissores da nova molécula, estudos mais aprofundados devem ser realizados de modo a comprovar seu potencial terapêutico.

Dentre esses estudos estão aqueles relacionados à estabilidade intrínseca da molécula. Estudos de estabilidade são exigidos pelas agências reguladoras durante as fases iniciais de desenvolvimento de um novo candidato a fármaco. Isso ajuda a garantir sua eficácia e segurança ao ser administrado a pacientes, pois a instabilidade de um fármaco pode comprometer seu efeito terapêutico e levar à formação de produtos de degradação (PD) prejudiciais à saúde humana, relacionados a efeitos adversos variados (International Conference on Harmonisation, 2003).

A identificação da toxicidade de produtos de degradação constitui um desafio importante nas primeiras etapas de desenvolvimento de novos fármacos. A avaliação do perfil de impurezas de uma substância para uso farmacêutico e de seus possíveis efeitos tóxicos é uma etapa crucial no desenvolvimento de medicamentos seguros e que antecede a sua introdução no mercado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil), 2015a).

Apesar da existência de requisitos regulamentares exigentes no controle de produtos de degradação em fármacos e medicamentos, a presença desses subprodutos é por vezes inevitável. Além disso, tais substâncias podem ser reativas, com toxicidade indesejada, apresentando efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. Sendo assim, tais moléculas devem ser consideradas na avaliação do risco-benefício de medicamentos (ANVISA, 2019a).

A qualificação de impurezas e produtos de degradação consiste na avaliação da segurança biológica relativas ao consumo de tais substâncias, considerando a dose máxima diária estabelecida para um fármaco. Essa qualificação deve ser realizada utilizando ferramentas científicas adequadas, estudos apropriados e dados técnicos capazes de comprovar que o risco à saúde associado ao uso humano das substâncias em questão pode ser considerado negligenciável (Pedreiro, 2016; ICH, 2023a).

Na qualificação de uma impureza ou produto de degradação, diversos fatores devem ser considerados, tais como: a população alvo, a condição clínica a ser tratada, a dose diária, a via de administração e o tempo de exposição ao produto. São consideradas provas básicas da segurança biológica de impurezas a avaliação de mutagenicidade e toxicidade em geral.

Entretanto, outros ensaios de toxicidade específicos ou adicionais podem ser aplicáveis (ANVISA, 2019a).

Diversos métodos são descritos para avaliação da segurança biológica de substâncias para uso farmacêutico. Ensaios *in vitro* utilizando culturas de células e estudos de toxicidade *in silico* empregando técnicas computacionais do tipo *Quantitative Structure-Activity Relationships* (QSAR) surgem como alternativas aos convencionais ensaios em animais, permitindo reduzir tempo e custos (ICH, 2023a).

Em função disso, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona através de estudos de degradação forçada, identificar seus produtos de degradação, avaliar se o potencial tripanocida será mantido nesses subprodutos e se os mesmos apresentarão potencial citotóxico e mutagênico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

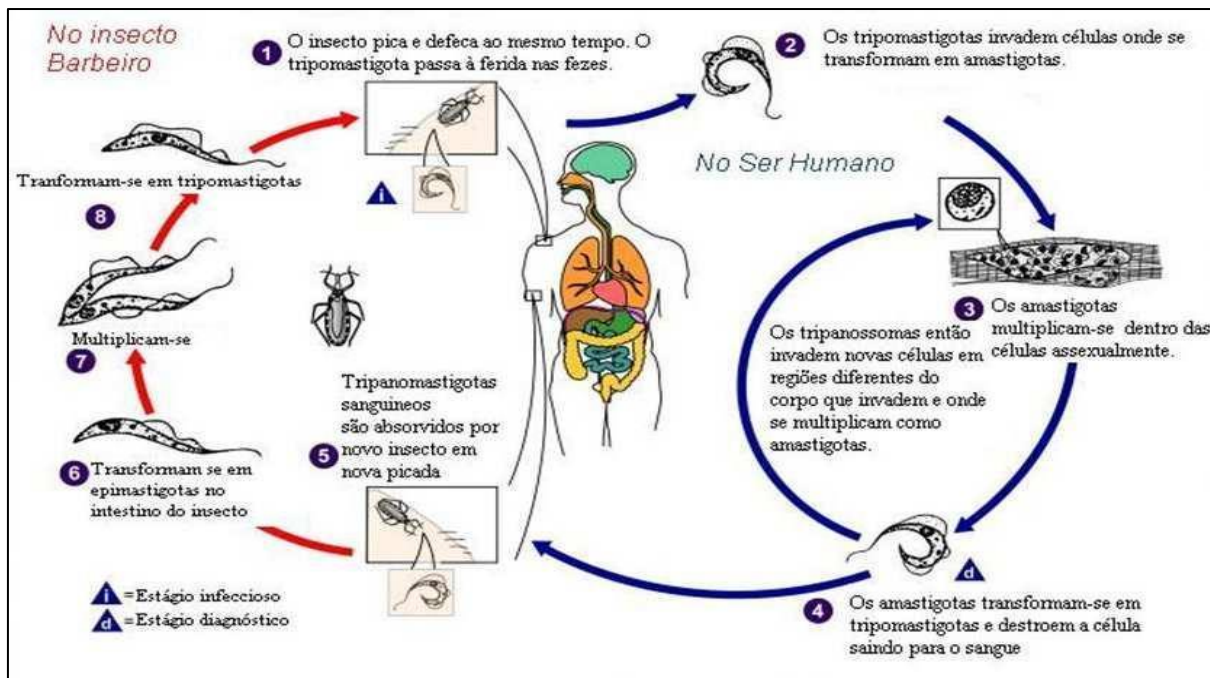
A doença de Chagas foi descrita inicialmente em 1909 pelo médico brasileiro Doutor Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. Em aproximadamente 110 anos, significativos avanços foram obtidos no combate à sua proliferação. Entretanto, a doença continua sendo um dos maiores problemas mundiais em saúde pública (WHO, 2024).

Também conhecida como tripanossomíase americana, a doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A transmissão ocorre pelo inseto vetor conhecido como “barbeiro”, o qual deposita suas fezes contaminadas com o protozoário sobre a pele do hospedeiro no momento da picada. Além disso, a doença também pode ser transmitida em transfusões sanguíneas, através da placenta de mãe para filho ou ingestão de carne contaminada (Rabello *et al.*, 2019).

Até início dos anos de 1960, no Brasil, a via vetorial respondia pela maioria dos casos, que se concentrava em áreas rurais. Em função do êxodo rural ocorrido por conta do modelo de desenvolvimento econômico do país, a doença se urbanizou e a via transfusional passou a ter um importante papel na transmissão da doença. Atualmente no Brasil, a via oral tem se destacado, respondendo pela quase totalidade de novos casos (MSF, 2024).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é ilustrado na Figura 1. O parasito apresenta três formas evolutivas distintas, entre o inseto vetor e o hospedeiro vertebrado. No trato digestivo do inseto vetor, as formas epimastigotas flageladas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que corresponde à forma infectante para o homem. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular. Após um período aproximado de quatro dias, os amastigotas se transformam em tripomastigotas, que rompem as células infectadas e são liberados no meio extracelular. Os tripomastigotas livres podem infectar as células vizinhas ou caírem na circulação sanguínea, podendo ser ingeridos pelo inseto vetor durante a alimentação, ou ainda infectarem células de outros tecidos do hospedeiro vertebrado (Tanowitz *et al.*, 1992). As células infectadas com os amastigotas, além de liberarem os tripomastigotas para infectar outras células, liberam produtos que ativam enzimas, prostaglandinas, citocinas e outros diversos mediadores potenciais da inflamação, provocando variadas e complexas respostas do sistema imune do hospedeiro. O indivíduo, uma vez infectado, permanece como tal por toda a vida (Nogueira, 2009).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*, 2024.

A doença de Chagas é uma doença parasitária negligenciada. Estimam-se aproximadamente 8 milhões de casos em todo mundo, sendo que a maior parte está concentrada na América Latina. A doença é responsável por mais de dez mil óbitos por ano e por aproximadamente trinta mil novos casos anuais. Embora seja originalmente uma doença tropical, o número de pacientes portadores da tripanossomíase tem aumentado em países da Europa, Ásia, Estados Unidos, Canadá e Austrália, conforme mostrado na Figura 2. Nas regiões endêmicas, a doença acomete principalmente os grupos populacionais menos favorecidos, sendo que mais de noventa por cento dos infectados desconhecem a situação por falta de diagnóstico preciso (Schmidt *et al.*, 2012). No Brasil, estima-se de 1,9 e 4,6 milhões de pessoas afetadas pela doença, sendo que 60 % vivem em áreas urbanas, provocando impactos sociais, previdenciários e assistenciais (MSF, 2024). A doença de Chagas mata mais pessoas na América Latina a cada ano do que qualquer outra doença negligenciada, incluindo a malária (WHO, 2024).

Figura 2 - Países onde a doença de Chagas está presente.



Fonte: Adaptado de WHO, 2024.

Legenda: Em laranja escuro, regiões endêmicas. Em laranja claro, países não endêmicos, mas que apresentam casos da doença.

A evolução clínica da doença é normalmente dividida em duas fases. Depois de um período de incubação de 2 a 3 semanas, a fase aguda apresenta sintomas gerais leves e inespecíficos, tais como febre, inflamação no local da inoculação, lesão palpebral unilateral, edema, nódulos linfáticos aumentados e esplenomegalia. Os sintomas desaparecem espontaneamente entre 4 a 8 semanas. Depois de vários meses ou até mesmo décadas, cerca de 30 a 40 % dos pacientes desenvolvem os sintomas clínicos da fase crônica da doença, caracterizada por complicações cardíacas e digestivas que podem levar a morte (Molina, 2018).

O diagnóstico pode ser realizado em ambas as fases da doença. Na fase aguda é feito por microscopia do sangue, buscando-se provas parasitológicas diretas. Já o diagnóstico na fase crônica é feito por sorologia para detectar a presença de anticorpos como resposta do sistema imune contra a infecção (MSF, 2024).

A terapia de combate à doença de Chagas é restrita ao emprego de dois fármacos desenvolvidos entre os anos de 1960 e 1970, denominados de nifurtimox e benznidazol. Ambos apresentam maior eficácia se utilizados na fase aguda da doença e estágios iniciais da fase crônica. Entretanto, estão relacionados à ocorrência de efeitos colaterais graves, tais como, intolerância gástrica, vômitos, anorexia, erupções cutâneas e problemas neuromusculares. Em função disso, ocorre um grande número de abandono da terapia medicamentosa (Hall *et al.*, 2011; Salomon *et al.*, 2012; Patterson *et al.*, 2014; Brancaglioni *et al.*, 2018).

Devido ao impacto econômico e social causado pela doença de Chagas, aliada à falta de vacinas e limitações da terapia disponível, a busca por novos fármacos tem se tornado imprescindível para o seu tratamento. O desenvolvimento de novos candidatos a fármacos assume papel relevante na tratativa da doença e interrupção de seus sintomas clínicos. Neste sentido, diversas moléculas naturais e sintéticas têm sido estudadas, tais como, flavonoides, alcaloides, terpenos, fenilpropanoides, naftoquinonas e triterpenoides (Bezerra Filho *et al.*, 2023; Nekoei *et al.*, 2022; Peres *et al.*, 2023). Dentre essas, a versatilidade dos sistemas cumarínicos também se apresenta com boas perspectivas para obtenção de novos candidatos a fármacos, significativamente menos tóxicos e que permitam desenvolver esquemas terapêuticos mais apropriados e de baixo custo (Brancaglioni *et al.*, 2018; Franco *et al.*, 2021; Molina, 2018; Zeki; Mustafa, 2024).

2.2 LEISHMANIOSE

A leishmaniose representa um importante problema em saúde pública, sendo considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas. Ocorre principalmente no continente americano, norte da África, África oriental, oeste e sudeste asiático, sendo estimadas aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas em todo mundo e uma incidência de 50 mil óbitos por ano (Sandoval Pacheco *et al.*, 2023; WHO, 2024).

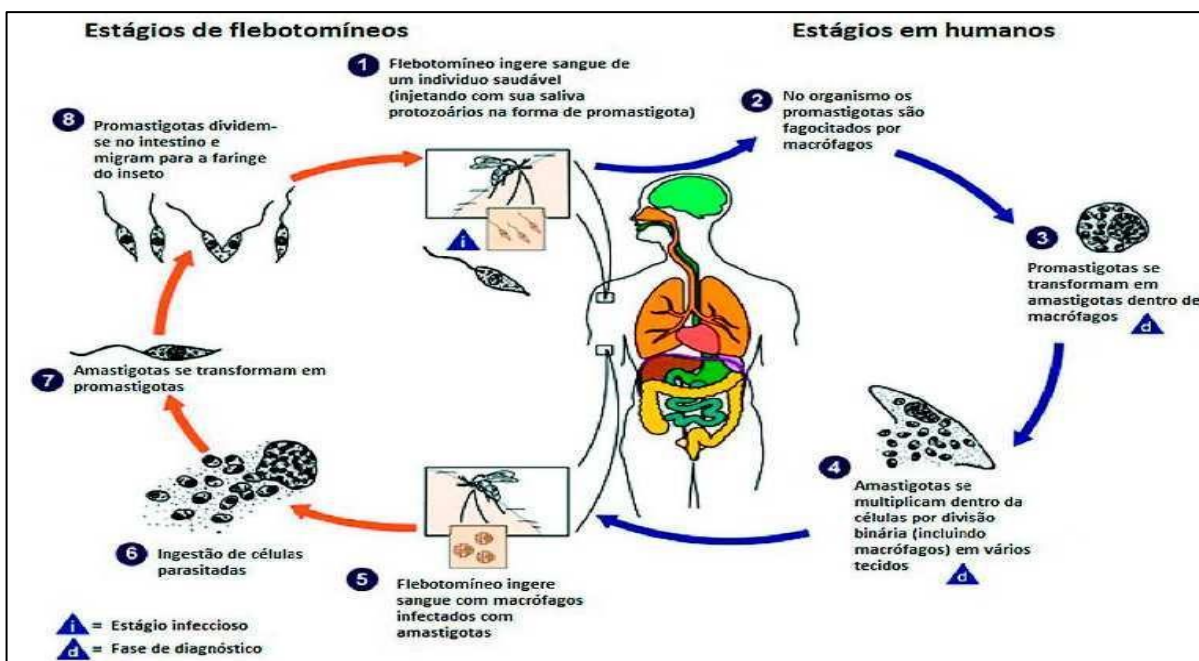
A doença é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos através da picada de insetos vetores hematófagos, os flebotomíneos, em especial as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Dependendo da espécie envolvida e do estado imune do hospedeiro, a doença pode apresentar diferentes manifestações clínicas, sendo as principais a leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa/mucocutânea e leishmaniose visceral (Ansari *et al.*, 2023).

A leishmaniose visceral caracteriza-se por episódios irregulares de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. Se não tratada, pode levar à morte em mais de 90 % dos casos. Já a leishmaniose mucosa/mucocutânea está relacionada à destruição total ou parcial das mucosas do nariz e boca, podendo levar à incapacidade dos pacientes. Por sua vez, a leishmaniose cutânea representa a forma mais comum da infecção, provocando lesões ulcerativas na pele, frequentemente associadas com desfigurações e estigmatização social (Maza Vega *et al.*, 2023).

Embora os ciclos biológicos das diferentes espécies de *Leishmania* apresentem peculiaridades específicas, todos compartilham etapas em comum, sendo a interação entre o

vetor invertebrado e o hospedeiro vertebrado fundamental para a multiplicação e disseminação da doença (OPAS, 2024). O ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* é apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Ciclo de transmissão da leishmaniose.



Fonte: Adaptado de CDC, 2024.

Ao se alimentarem de sangue, os flebotomíneos contaminados inoculam formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, as quais são fagocitadas por macrófagos e outras células mononucleares fagocíticas. Nestas células, as formas promastigotas do protozoário se transformam em amastigotas, as quais, por sua vez, se multiplicam e infectam outras células. Ao se alimentarem de sangue de um hospedeiro infectado, os insetos vetores ingerem as células contendo as formas amastigotas e se contaminam. No intestino médio dos flebotomíneos, as formas amastigotas do parasito se diferenciam em promastigotas. Posteriormente, ocorre a migração do parasito para a faringe do inseto, o qual poderá ser transmitido para um novo hospedeiro vertebrado, iniciando novamente o ciclo de transmissão (Gonçalves *et al.*, 2020).

O arsenal terapêutico disponível para o tratamento da leishmaniose é restrito. Além disso, esses medicamentos apresentam em muitos casos eficácia reduzida e estão associados a diversos efeitos colaterais (Sierra *et al.*, 2021).

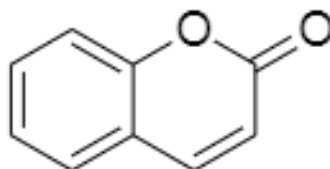
Fármacos antimoniais, tais como estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, constituem normalmente a primeira linha para o tratamento da doença. Tais substâncias apresentam efeitos tóxicos relevantes e casos de resistência do parasito têm sido reportados (Aït-Oudhia *et al.*, 2011). A anfotericina B, por sua vez, é altamente eficaz contra todas as manifestações clínicas da leishmaniose. Entretanto, o fármaco apresenta alto custo e está relacionado ao desenvolvimento de nefrotoxicidade (Sundar; Singh, 2016). A miltefosina constitui o único fármaco de uso oral empregado no combate à leishmaniose, sendo eficaz frente às formas cutânea e visceral da doença. Seus efeitos colaterais incluem distúrbios gastrointestinais, vômito, diarreia e náusea. Além disso, seu potencial teratogênico restringe o uso por gestantes (Dorlo *et al.*, 2012). Sais de pentamidina também são utilizados no tratamento da leishmaniose. Entretanto, estão associados ao desenvolvimento de diabetes mellitus, miocardites e nefrotoxicidade (Tiwari *et al.*, 2017). Por sua vez, o aminoglicosídeo paromomicina é ativo frente à leishmaniose visceral. Entretanto, sua administração intramuscular é muito dolorida e o fármaco está associado à ocorrência de nefrotoxicidade e ototoxicidade (Sundar; Singh, 2016).

Dada a relevância clínica da leishmaniose, aliada à deficiência da terapêutica disponível, torna-se imperativo a busca por novas moléculas capazes de proporcionar um combate à doença de forma mais assertiva e segura. Neste contexto, diferentes classes de compostos químicos apresentam-se como possíveis alternativas, tais como, flavonoides, flavonas, naftoquinonas, óleos essenciais e triterpenos (Ávila Brustolin *et al.*, 2022; Passarini *et al.*, 2022). Além desses, derivados cumarínicos, sintéticos ou naturais, têm demonstrado potencial promissor como futuros candidatos a fármacos, recebendo atenção de vários grupos de pesquisa (Gonçalves *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2023; Shahbaz *et al.*, 2024; Yepes *et al.*, 2024).

2.3 CUMARINAS

As cumarinas são compostos heterocíclicos oxigenados, pertencentes ao grupo das benzo- α -pironas, formadas pela fusão de um anel benzênico com um anel pirona, conforme mostrado na Figura 4. O nome cumarina deriva da palavra tupi “kumarú”, nome popular da árvore *Dipteryx odorata*, de onde foram isoladas as primeiras cumarinas por Vogel em 1820 (Schimidt *et al.*, 2012).

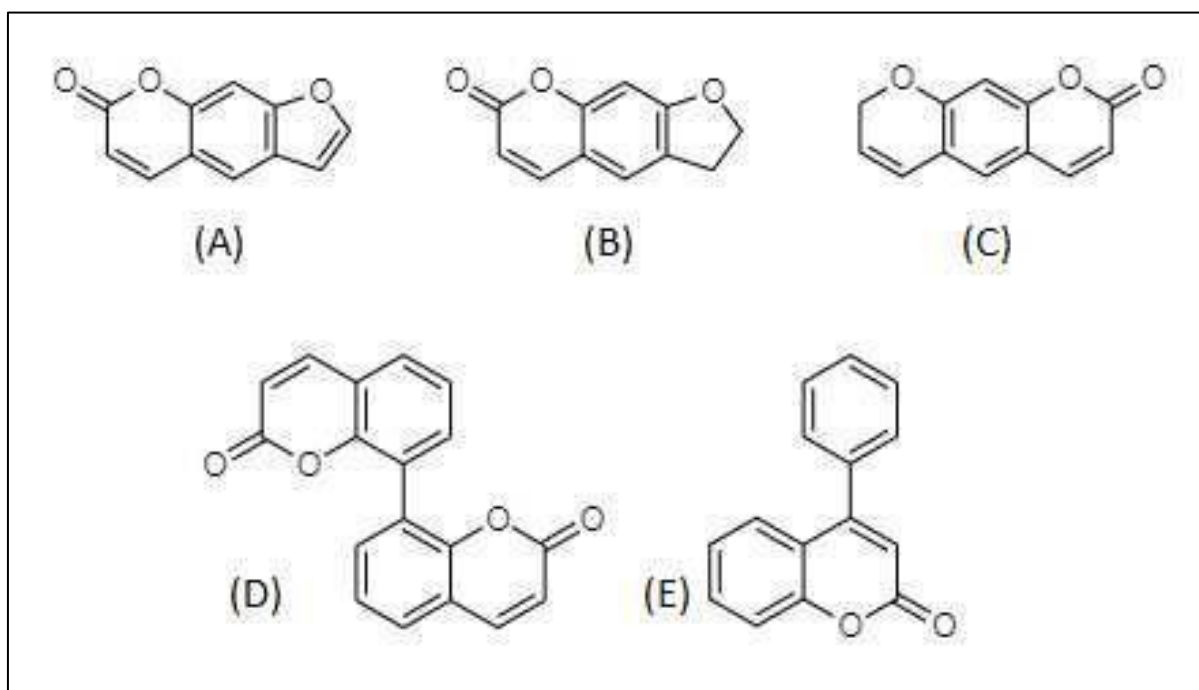
Figura 4 - Núcleo fundamental 2H-1-benzopirano-2-ona ou cumarina simples.



Fonte: Do autor.

O aumento na complexidade do anel base permite classificar as cumarinas em diferentes tipos, tais como, furanocumarinas, diidrofuranocumarinas, piranocumarinas, dicumarinas e fenilcumarinas, conforme estruturas mostradas na Figura 5. Toda essa variabilidade estrutural tem sido aproveitada do ponto de vista da química medicinal (Barot *et al.*, 2015).

Figura 5 - Estruturas químicas de diferentes tipos de cumarinas.



Fonte: Do autor.

Legenda: (A) furanocumarina; (B) diidrofuranocumarina; (C) piranocumarina; (D) dicumarina; (E) fenilcumarina.

Os compostos cumarínicos são metabolitos secundários amplamente encontrados no reino vegetal, sendo biossintetizados por diferentes espécies e estando presentes em diversas partes das plantas, tais como flores, raízes e frutos. Porém, a síntese de cumarinas não é exclusiva de plantas, sendo também encontradas em bactérias e fungos. Embora suas funções

nesses organismos ainda não sejam totalmente conhecidas, acredita-se que desempenham papéis fundamentais como reguladores do crescimento, ação antioxidante, inibidores enzimáticos agentes bacteriostáticos e fungistáticos (Venugopala *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2021).

A variedade de propriedades biológicas atribuídas às cumarinas despertou o interesse da síntese orgânica por essa classe de compostos. Dessa forma, foram desenvolvidos métodos para obtenção dessas moléculas em laboratório e a síntese de derivados com aplicações biológicas e industriais (Stefanachi *et al.*, 2018).

A síntese do primeiro derivado cumarínico em laboratório data de 1868 por Perkins, passando esses compostos a serem utilizados na indústria de perfumaria. Paul Parquet desenvolveu uma fragrância que foi utilizada na produção de perfume e sabonetes à base de óleo de bergamota e cumarinas sintéticas. Esta formulação foi considerada um marco histórico na indústria de perfumaria, pois até então nunca tinham sido utilizados aromatizantes sintéticos (Clark, 1995). Entretanto, somente a partir de 1936 com o desenvolvimento de metodologias clássicas, tais como as reações de Packmann e Knoevenagel, a síntese de derivados cumarínicos passou a ser realizada devido ao seu potencial terapêutico (Barot *et al.*, 2015; Franco *et al.*, 2021).

A estrutura das cumarinas tem despertado atenção de pesquisadores nos últimos anos, pois apresentam a capacidade de estabelecer interações não-covalentes com diferentes biorreceptores em organismos vivos. Dessa forma, apresentam diversas atividades farmacológicas, tais como anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante, anti-HIV, dentre outras. Aliado a isso, sua estrutura molecular apresenta diversos sítios de ligação que podem ser explorados para a síntese de derivados com potencial biológico (Basualto *et al.*, 2018; Shahbaz *et al.*, 2024).

A investigação das propriedades farmacológicas das cumarinas permitiu o desenvolvimento de fármacos como a varfarina, utilizada desde a década de 50 e registrada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento e prevenção de doenças tromboembólicas. Além da varfarina, podemos citar os anticoagulantes acenocumarina e fenprocumarina e o antibacteriano novobiocina, potente inibidor da enzima DNA-girase (Stefanachi *et al.*, 2018; Franco *et al.*, 2021).

Além das propriedades bioativas relacionadas às cumarinas, outra importante característica desses compostos que tem sido explorada é a sua capacidade luminescente, resultante da transferência interna de carga do sistema conjugado π - π rico em elétrons. Dessa

forma, derivados cumarínicos têm sido utilizados como sondas de fluorescência, agentes de monitoramento de reações enzimáticas, corantes, sensores de pH e potenciais agentes de biorredução (Franco *et al.*, 2021).

A ampla variedade de aplicações das cumarinas nos campos biológicos e industriais reforça a importância dessa classe de compostos e estimula o desenvolvimento de novos derivados.

2.4 CUMARINAS BIOATIVAS FRENTE À DOENÇA DE CHAGAS

Pesquisas envolvendo produtos naturais representam uma importante estratégia na busca por novas moléculas candidatas a fármacos. Além disso, o potencial farmacológico dessas moléculas pode ser ampliado utilizando estratégias de modificações estruturais orientadas. Nesse sentido, diversos trabalhos têm demonstrado o emprego de cumarinas naturais e sintéticas como potentes agentes tripanocidas (Basualto *et al.*, 2018).

Com a chegada do século XXI, começaram a aparecer os avanços mais relevantes no campo da química medicinal para a identificação e planejamento de substâncias com potencial tripanocida. Pavão *et al.* (2002) isolaram o derivado cumarínico chalepina do caule da espécie *Pilocarpus spicatus* e, posteriormente, os autores avaliaram seu efeito inibitório contra a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossômica (gGAPDH) de *T. Cruzi*. Essa enzima é fundamental para o metabolismo energético e sua inibição bloqueia a glicólise, alterando a produção de ATP no protozoário e provocando sua morte. No trabalho, foi determinado o valor da concentração inibitória média (IC50) da cumarina frente a atividade da enzima, obtendo-se o valor de 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Além disso, não foi detectada inibição na GAPDH humana. Frente aos resultados obtidos, os autores concluíram que a chalepina poderia ser usada como protótipo para o planejamento de novas substâncias no combate à doença de Chagas. Além disso, os autores conseguiram cristalizar a enzima junto ao derivado cumarínico, permitindo o planejamento *in silico* de derivados otimizados e com maior potência (Pavão *et al.*, 2002).

Guinez *et al.* (2013) avaliaram a atividade antioxidante e antichagásica de cumarinas sintéticas. Dentre os compostos avaliados, o derivado 3-amino-4-hidroxi-2H-cromen-2-ona apresentou maior atividade tripanocida frente às formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi* do que o fármaco nifurtimox, utilizado como referência no trabalho. Além disso, o derivado obtido não apresentou citotoxicidade em estudos *in vitro* utilizando culturas de células (Guinez *et al.*, 2013).

Amin *et al.* (2016) demonstraram a atividade tripanocida das cumarinas feselol e 10⁻R-karatavacinol presentes na espécie *Ferula narthex*. Ambos os compostos foram capazes de interferir nas vias glicolíticas do *Trypanosoma cruzi* (Amin *et al.*, 2016).

Híbridos do tipo cumarina-chalcona têm despertado o interesse de diversos pesquisadores. Usando essa estratégia, o estudo conduzido por Vazquez-Rodrigues *et al.* (2016) levou à obtenção de uma molécula, a qual foi testada contra as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*, obtendo-se valores de IC₅₀ iguais a 46,8, 2,6 e 2,9 µM, respectivamente. O novo híbrido apresentou-se mais potente do que o fármaco nifurtimox. Entretanto, o derivado cumarínico demonstrou efeito citotóxico quando testado em baixas concentrações frente a células de mamíferos. Independentemente desses resultados, os autores destacaram o potencial da nova substância obtida e concluíram que a mesma poderia ser usada como ponto de partida para novos compostos através de processos de otimização molecular (Vazquez-Rodrigues *et al.*, 2016).

Um dos principais objetivos no desenvolvimento de fármacos antichagásicos é o aumento da potência em relação aos fármacos de referência. Sendo assim, Robledo-O’Ryan *et al.* (2017) apostaram no desenvolvimento de hidroxycumarinas visando uma melhor atividade do que o nifurtimox. Ensaio utilizando a forma tripomastigota de *T. cruzi* demonstraram que um dos compostos sintetizados se apresentou mais potente do que o fármaco controle, com valor de IC₅₀ igual a 1,31 µM, contra 17,4 µM para o nifurtimox. Paralelamente, os autores realizaram teste de citotoxicidade do derivado cumarínico empregando macrófagos. Os resultados foram promissores e os autores classificaram o derivado hidroxycumarínico como viável para ser avaliado em testes *in vivo* (Robledo-O’Ryan *et al.*, 2017).

Um exemplo de substâncias cumarínicas que superam a potência do fármaco de referência benznidazol foi apresentado no trabalho de Coelho *et al.* (2019). Os autores planejaram e sintetizaram uma série de 18 cumarinas tricíclicas com potencial de inibição da enzima triose fosfato isomerase de *T. cruzi* (TcTIM). A atividade tripanocida das substâncias foi avaliada frente às formas epimastigota e amastigota do protozoário. Além disso, o potencial citotóxico dos derivados cumarínicos foi testado usando fibroblastos. Dentre as substâncias sintetizadas, 10 apresentaram-se mais potentes do que o fármaco benznidazol. Adicionalmente, os autores testaram a afinidade dos derivados cumarínicos em estudos de *docking* molecular com a estrutura da enzima TcTIM (Coelho *et al.*, 2019).

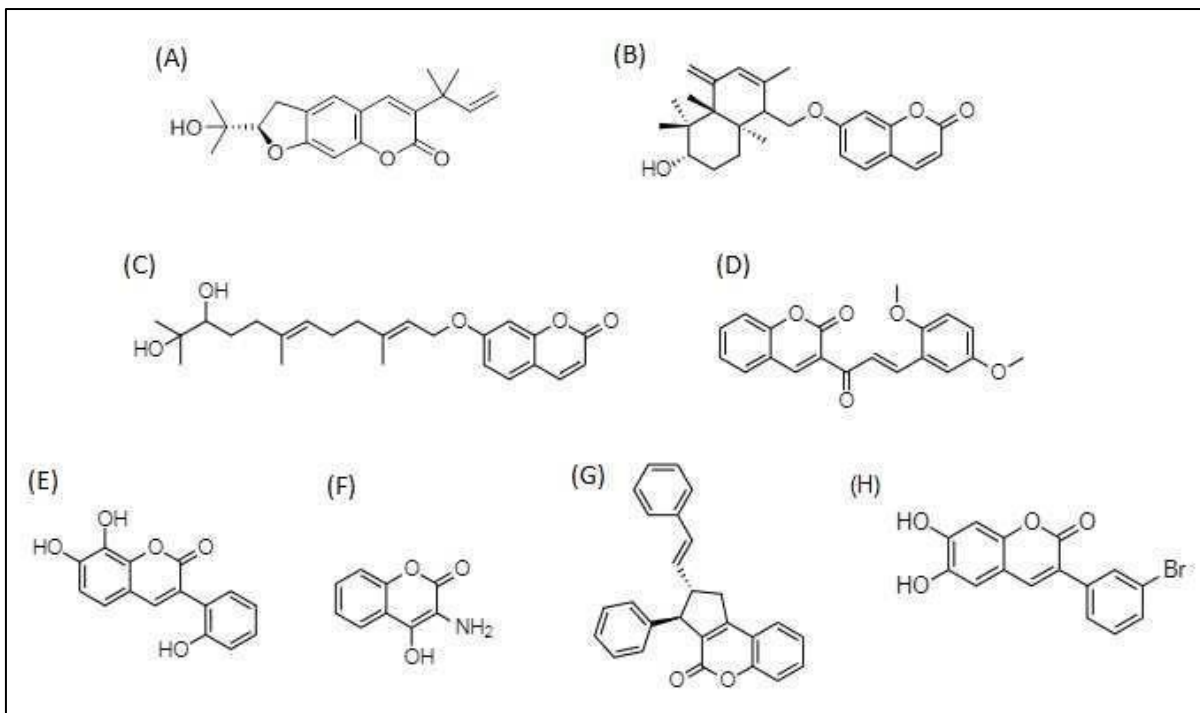
Pozo-Martínez *et al.* (2022) sintetizaram uma série de derivados arilcumarínicos contendo o grupo catecol e avaliaram o potencial tripanocida e citotóxico desses compostos. Os autores também avaliaram a atividade das substâncias quando administradas juntamente com o

fármaco benznidazol. O composto 3-(4'-bromofenil)-6,7-dihidroxicumarina mostrou-se mais promissor, sendo verificado um valor de IC₅₀ = 34 µM nos ensaios realizados. Os autores propuseram que a atividade tripanocida da substância ocorria via estresse oxidativo e verificaram que a associação do derivado cumarínico com o benznidazol apresenta efeito tripanocida sinérgico, permitindo reduzir as doses convencionais do fármaco (Pozo-Martínez *et al.*, 2022).

Krishnan *et al.* (2023) identificaram diferentes tipos de cumarinas com atividade antichagásica frente à forma amastigota do *Trypanosoma cruzi*. Os compostos foram isolados de extratos vegetais de diferentes espécies da família *Apiaceae*. Os autores verificaram que a furanocumarinas imperatorin, isoimperatorin e phellopterin apresentaram efeitos sinérgicos quando testas juntas. Já a cumarina alloimperatorin apresentou atividade promissora isoladamente (Krishnan *et al.*, 2023).

Embora diversos estudos demonstrem o potencial das cumarinas e derivados como agentes tripanocidas, a utilização desses compostos enfrenta dificuldades farmacotécnicas devido à sua baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade no organismo. Aliado a isso, diversos estudos revelam a atividade citotóxica de derivados cumarínicos. Sendo assim, diante do enorme potencial terapêutico apresentado por essa classe de moléculas, torna-se necessário a realização de estudos mais aprofundados de modo a garantir a eficácia e segurança desses produtos (Basualto *et al.*, 2018; Brancaglioni *et al.*, 2018). A Figura 6 apresenta as estruturas de algumas cumarinas sintéticas e naturais com atividade tripanocida.

Figura 6 - Cumarinas sintéticas e naturais com potencial tripanocida.



Fonte: Do autor.

Legenda: (A) chapelina; (B) feselol; (C) 10'-R-karatavacinol; (D) híbrido cumarina-chalcona; (E) derivado hidroxicumarínico; (F) derivado 3-amino-4-hidroxi-2H-cromen-2-ona; (G) derivado cumarínico tricíclico; (H) derivado catecol- arilcumarínico.

2.5 CUMARINAS BIOATIVAS FRENTE À LEISHMANIOSE

O interesse por derivados cumarínicos como agentes leishmanicidas começou a se tornar mais perceptível nas últimas décadas. Tal fato deve-se às limitações e ineficácia da terapia medicamentosa atual aplicada no controle da doença. Sendo assim, estudos envolvendo o núcleo cumarínico como ponto de partida para a obtenção de novas substâncias com potencial leishmanicida tornaram-se relevantes, sendo motivados por relatos do emprego dessa classe de compostos na medicina tradicional (Sierra *et al.*, 2021).

Utilizando a estratégia de obtenção de substâncias bioativas a partir de fontes naturais, Napolitano *et al.* (2004) isolaram a cumarina aurapteno a partir de folhas da espécie *Esenbeckia febrifuga* e avaliaram seu potencial leishmanicida frente à forma promastigota de *Leishmania major*. Os autores verificaram que a cumarina inibiu o crescimento dos parasitas, sendo determinado um valor de IC₅₀ igual a 30 mM. Além disso, foram evidenciadas alterações morfológicas significativas nos protozoários remanescentes, como grandes vacúolos em suas estruturas e perda de motilidade flagelar (Napolitano *et al.*, 2004).

Empregando a mesma estratégia, Sajjadi *et al.* (2016) isolaram das partes aéreas da planta *Ferulago angulata* e dos frutos da espécie *Prangos asperula* as substâncias suberosina, suberosina-epóxido e ostol. Este último mostrou-se ativo frente à forma promastigota de *Leishmania major* da cepa MRHO/IR/75/ER. Nas primeiras horas de exposição à substância, foi verificado IC₅₀ de 14,40 µg.mL⁻¹, sendo esse valor reduzido para 10,79 µg.mL⁻¹ após 48h. Experimentos com três horas de exposição ao ostol, na concentração de 20 µg.mL⁻¹, obtiveram mortalidade de 71 % dos parasitas, sendo que essa taxa foi aumentada para 91 % com o emprego da substância na concentração de 50 µg mL⁻¹ (Sajjadi *et al.*, 2016).

O núcleo cumarínico possui a capacidade de interagir com diferentes alvos biológicos, sendo que a seletividade dessas interações é altamente influenciada pelo seu padrão de substituições. Sendo assim, diversos grupos de pesquisa têm realizado modificações estruturais em derivados cumarínicos objetivando ampliar e otimizar o espectro de ação dessa classe de compostos. Baseando-se nisso, Zaheer *et al.* (2015) sintetizaram derivados 4-hidroxibiscumarínicos e avaliaram seus potenciais leishmanicidas através de estudos *in vitro* empregando a forma promastigota de *Leishmania donovani*. Dentre a série de compostos avaliados, o mais promissor apresentou IC₅₀ de 150 µg.mL⁻¹. O estibogluconato de sódio foi empregado como fármaco de referência no estudo, apresentando IC₅₀ de 490 µg.mL⁻¹. Destaca-se que os novos derivados cumarínicos não apresentaram toxicidade significativa (Zaheer *et al.*, 2015).

Sangshetti *et al.* (2016) planejaram e sintetizaram uma série de indol-cumarinas que foram testadas utilizando formas promastigotas de *Leishmania donovani*. O composto mais promissor apresentou valor de IC₅₀ igual a 95,0 µg.mL⁻¹. Já o estibogluconato de sódio, utilizado como fármaco controle, obteve valor de IC₅₀ igual a 490,0 µg.mL⁻¹ (Sangshetti *et al.*, 2016).

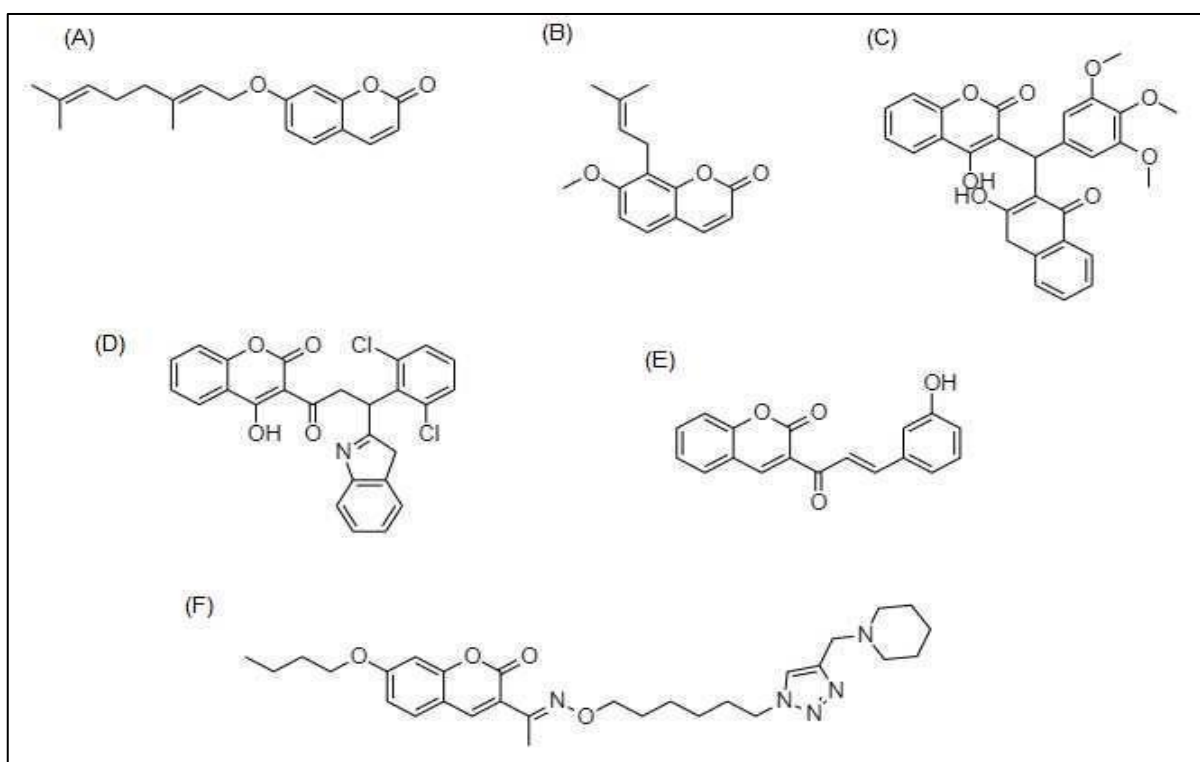
Cuellar *et al.* (2022) sintetizaram uma série de híbridos cumarina-chalconas e avaliaram o potencial leishmanicida, tripanocida e antimalárico dos compostos. Os ensaios foram realizados *in vitro* e, adicionalmente, a atividade citotóxica dos compostos foi desafiada. Três substâncias apresentaram forte potencial inibitório frente às formas amastigotas de *Leishmania panamensis*, com valores de IC₅₀ variando entre 2,1 µM a 3,7 µM. Em função dos resultados promissores, os autores concluíram que os híbridos sintetizados representavam candidatos promissores ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos a serem utilizados no combate à leishmania (Cuellar *et al.*, 2022).

Hassan *et al.* (2023) sintetizaram uma série de híbridos cumarina-1,2,3-triazólicos. Todos os compostos obtidos apresentaram maior atividade do que a miltefosina, utilizada como

fármaco referência, frente às formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania major*. Objetivando elucidar o mecanismo de ação das substâncias sintetizadas, os autores realizaram estudos de *docking* molecular utilizando as enzimas pteridina redutase e diidrofolato redutase-timidilato sintase. Os resultados indicaram que possivelmente o potencial leishmanicida dos compostos ocorria via interferência nas vias metabólicas do ácido fólico no parasita (Hassan *et al.*, 2023).

A diversidade estrutural dos compostos cumarínicos apresenta-se como uma alternativa promissora ao desenvolvimento de novos compostos com atividade leishmanicida. Tal fato é revelado pelo número de estudos envolvendo cumarinas naturais e derivados sintéticos com propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas otimizadas, evidenciando o grande potencial dessa classe de compostos (Gonçalves *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2023; Sierra *et al.*, 2021; Zeki; Mustafa, 2024). Na Figura 7 são apresentadas estruturas de cumarinas naturais e sintéticas com potencial leishmanicida.

Figura 7 - Cumarinas sintéticas e naturais com potencial leishmanicida.



Fonte: Do autor.

Legenda: (A) arapteno; (B) ostol; (C) derivado 4-hidroxibiscumarínico; (D) derivado indol-cumarínico; (E) derivado cinamoilcumarina; (F) derivado cumarina-1,2,3-triazólico.

2.6 MECANISMOS DE AÇÃO DE CUMARINAS TRIPANOCIDAS E LEISHMANICIDAS

Sistemas aromáticos planos, como o presente no núcleo cumarínico, têm a capacidade de gerar interações hidrofóbicas, especialmente do tipo π - π , sugerindo que os biorreceptores aos quais se ligam possuem uma região lipofílica, possivelmente com resíduos de aminoácidos aromáticos tais como fenilalanina, tirosina e triptofano. De forma complementar, tais sistemas também têm a capacidade de formar ligações do tipo cátion- π com aminoácidos carregados positivamente e efetuar interações polares por meio do anel lactona, do tipo ligação de hidrogênio e dipolo-dipolo. Dependendo dos substituintes presentes, o anel lactônico fundido ao benzênico pode levar a inibições covalentes de enzimas ou receptores passíveis de acilação. Além disso, há registros de que o núcleo cumarínico possa ser modificado pela abertura do anel lactona devido à ação de esterases, sugerindo que nestes casos, as cumarinas atuam como um pró-fármaco (Gonçalves *et al.*, 2020).

Qualquer que seja o mecanismo de ação das cumarinas, a força de sua ligação com o alvo molecular é potencializada por interações adicionais envolvendo os substituintes presentes na estrutura. O tipo de substituinte e o padrão de substituição determinam, além da energia de ligação geral e potência, as interações seletivas de derivados cumarínicos com alvos específicos. Toda essa gama de possíveis interações químicas entre derivados cumarínicos e biorreceptores justificam o amplo espectro de atividades farmacológicas dessa classe de compostos (Stefanachi *et al.*, 2018; Davis *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm relacionado a atividade antichagásica das cumarinas à inibição das vias glicolíticas do *Trypanosoma cruzi*, uma vez que o protozoário é altamente dependente da glicólise para produção de ATP. A glicose ocorre em uma organela denominada glicosomo, onde estão presentes a maioria das enzimas que promovem a conversão de glicose em piruvato, como a hexoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, 6-fosfofrutoquinase, 1,6-difosfato aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, glicerol quinase e oxidase alternativa. As cumarinas aparentemente provocam modificações na estrutura dessas enzimas, ocasionando sua inativação e, conseqüentemente, interrompendo o ciclo glicosídico. A morte do protozoário ocorre devido à deficiência na produção de energia (Pavão *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2009; Belluti *et al.*, 2014; Gong; Lei; Liu, 2015; Amin *et al.*, 2016; Coelho *et al.*, 2019; Balogun *et al.*, 2019).

Além do ciclo glicolítico, outras vias metabólicas do *T. cruzi* possuem enzimas que podem ser utilizadas como potenciais alvos moleculares para agentes tripanocidas. A enzima oxidosqualeno ciclase possui papel relevante na síntese de ergosterol pelo protozoário. Sendo

assim, diversos pesquisadores têm realizado estudos objetivando o desenvolvimento de compostos capazes de inibir a sua ação. Oliaro-Bosso *et al.* (2004) obtiveram diferentes derivados da cumarina umbelliferona com ação inibitória frente à enzima oxidosqualeno ciclase. Tais resultados motivaram os autores a realizarem novos estudos de estrutura-atividade envolvendo estes compostos. Os autores verificaram que o tipo de grupo amino e a flexibilidade da cadeia lateral impactavam significativamente na atividade tripanocida. Dentre os 18 derivados cumarínicos sintetizados, três apresentaram efeitos promissores como potenciais inibidores da enzima oxidosqualeno ciclase de *T. cruzi* (Oliaro-Bosso *et al.*, 2004, 2008).

Dentre as diferentes atividades farmacológicas atribuídas às cumarinas, diversos estudos destacam o efeito antioxidante dessa classe de compostos. Derivados cumarínicos têm sido descritos como antioxidantes naturais, cuja presença está relacionada à proteção ou mitigação de danos celulares provocados por espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como, disfunções de membrana e alterações no DNA. Os mecanismos de ação atribuídos aos agentes antioxidantes são variados, incluindo a captura de radicais livres, inibição de enzimas que favorecem o processo oxidativo e quelação de metais de transição. Durante a infecção por *T. cruzi*, ocorre uma elevada produção de ROS como consequência de danos teciduais causados por secreções tóxicas do parasito. Sendo assim, Figueroa-Guiñez *et al.* (2013) propuseram que a ação de cumarinas antioxidantes estaria relacionada à inativação de ROS e, conseqüentemente, de seus efeitos oxidativos, protegendo as células durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Os autores avaliaram a atividade antioxidante, tripanocida e citotóxica de diferentes derivados cumarínicos (Figueroa-Guiñez *et al.*, 2013).

A enzima tripanotiona redutase (TR) é uma enzima presente em protozoários do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania*. Possui papel fundamental no combate ao estresse oxidativo nesses organismos, regenerando seu principal antioxidante, a tripanotiona. Uma vez que os protozoários são sensíveis ao estresse oxidativo e esta enzima se difere do sistema glutaciona redutase presente em humanos, pesquisadores têm buscado o desenvolvimento de inibidores seletivos da TR. Baseando-se nisso, Belluti *et al.* (2014) utilizaram a estratégia de hibridização molecular para sintetizarem uma série de híbridos quinona-cumarina e avaliaram o potencial desses compostos como inibidores seletivos de GAPDH e tripanotiona redutase utilizando cepas de *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da tripanossomíase africana, e cepas de *Trypanosoma cruzi*. Um dos derivados obtidos apresentou IC₅₀ de 5,3 µM frente à enzima GAPDH e de 2,32 µM para TR, demonstrando seu duplo potencial inibitório frente aos alvos moleculares avaliados. Entretanto, em função da falta de correlação entre a inibição GAPDH/TR e os efeitos tripanocidas observados para a maioria dos compostos sintetizados, os

autores concluíram que outros alvos moleculares devam estar envolvidos no mecanismo de ação dessas moléculas (Belluti *et al.*, 2014).

Estudos também relacionam a ação das cumarinas sobre outras enzimas presentes em protozoários. Vila-Nova *et al.* (2012) isolaram a cumarina escaporona de hastes da espécie *Platymiscium loribundum* e avaliaram seu potencial leishmanicida frente às formas amastigota e promastigota de *Leishmania chagasi*. Adicionalmente, os autores verificaram a atividade inibitória do derivado cumarínico sobre a enzima acetilcolinesterase. A cumarina apresentou atividade semelhante ao fármaco pentamidina frente à forma promastigota do protozoário e capacidade de inibição da acetilcolinesterase superior à fisostigmina, utilizado como controle positivo nos estudos. Em função dos resultados obtidos, os autores propuseram que a inibição da acetilcolinesterase provoca uma absorção insuficiente de colina pelo protozoário. Uma vez que a colina é fundamental para a síntese de fosfolipídios presentes na membrana de *Leishmania*, a inibição da acetilcolinesterase pela cumarina compromete a integridade das membranas do protozoário provocando sua morte (Vila-Nova *et al.*, 2013).

A enzima adenina fosforibosil transferase de *Leishmania donovani* constitui uma das enzimas mais importantes para a síntese de DNA do parasita, pois diferentemente das células do hospedeiro, o protozoário não é capaz de sintetizar nucleotídeos de purina. Dessa forma, necessita captá-los já prontos da célula infectada (Boitz; Ullman, 2010). Em função disso, Zaheer *et al.* (2015, 2016) propuseram que sistemas do tipo 4-hidroxi-biscumarínicos apresentavam efeitos leishmanicidas devido à inibição dessa enzima. Nos trabalhos realizados em 2015 e 2016, os autores realizaram estudos de *docking* molecular envolvendo estas moléculas e a enzima adenina fosforibosil transferase de *Leishmania donovani*. Os baixos valores de energia de ligação encontrados nos estudos reforçaram o mecanismo de ação proposto pelos autores. Os estudos cristalográficos revelaram a ocorrência de ligações de hidrogênio e interações do tipo hidrofóbica entre os derivados cumarínicos e a enzima adenina fosforibosil transferase (ZAHEER *et al.*, 2015, 2016).

Outro potencial alvo molecular para ação de cumarinas com atividade leishmanicida é a enzima pteridina redutase 1 (PTR1). Esta enzima funciona como uma via alternativa do protozoário para redução de ácido fólico ou pteridinas não conjugadas, os quais são fundamentais para o crescimento e multiplicação do protozoário. Dessa forma, a PTR1 apresenta papel relevante na metaciclo-gênese do parasito, além de atuar nos mecanismos de resistência a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em *Leishmania ssp* (Cunningham; Beverley, 2001; Moreira *et al.*, 2014).

Além de atuarem como inibidores seletivos de enzimas relevantes em diferentes etapas do ciclo metabólico de protozoários, as cumarinas apresentam outros mecanismos de ação que podem levar a morte dos parasitos. Rodríguez-Hernandés *et al.* (2019) avaliaram a atividade tripanocida das cumarinas mammea A/BA, A/BB e A/BD isoladas da espécie *Calophyllum brasiliense*. Nos estudos foram utilizadas diferentes cepas de *T. cruzi* e o benznidazol empregado como fármaco controle. Os autores verificaram que os derivados cumarínicos apresentaram atividade tripanocida superior ao benznidazol. Além disso, provocaram alterações morfológicas e fisiológicas que resultaram na morte dos parasitos. Os autores atribuíram as deformações, presença de vacúolos, redução da mobilidade e crescimento dos parasitos à desorganização dos microtúbulos do *T. cruzi* por ação das cumarinas. A detecção de formas epimastigotas com formato arredondado, membranas mais delgadas e com a presença de rugas foi atribuída à interferência das cumarinas na biossíntese de fosfolipídios e esteróis de membrana. Já a presença de vesículas exocíticas na membrana celular dos parasitos, os autores relacionaram à excreção aumentada de lipídeos e proteínas provocada pelos derivados cumarínicos. Os estudos também revelaram alterações no núcleo das formas epimastigotas do *T. cruzi*. Ocorreram condensação anormal de cromatina, perda de continuidade da membrana nuclear e danos ao nucléolo das células. Alterações essas devido ação das cumarinas e capazes de provocar a morte dos parasitos por apoptose ou necrose. A nível mitocondrial, os autores verificaram aumento do tamanho dessas estruturas na célula dos parasitos e a ocorrência de vacúolos. Estas alterações por sua vez foram atribuídas a mudanças no balanço oxidativo do parasito, levando à produção exagerada de ROS, peroxidação lipídica e fragmentação do DNA por ação das cumarinas (Rodríguez-Hernandés *et al.*, 2019).

Em função dos resultados promissores, Rodríguez-Hernandés *et al.* (2020) realizaram um outro trabalho, onde objetivaram elucidar melhor o mecanismo de ação da cumarina mammea A/BA, agora utilizada de forma isolada. Foram empregadas nos ensaios as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Os autores verificaram que a cumarina apresenta ação sobre esterases intracelulares do parasita e que produz alterações relevantes em sua membrana plasmática. Além disso, foi verificado aumento no nível de espécies reativas de oxigênio, alterações no potencial de membrana de mitocôndrias, danos no DNA, alterações em fases de replicação celular e ocorrência de vacúolos autofágicos. Os autores relacionaram as alterações verificadas nos parasitos à ação da cumarina e sugeriram que a mammea A/BA induz a autofagia e apoptose do *T. cruzi*, provocando sua morte (Rodríguez-Hernandés *et al.*, 2020).

2.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE FÁRMACOS

A estabilidade pode ser definida como o tempo no qual um produto mantém, dentro dos limites especificados e sob determinadas condições de estocagem, as mesmas propriedades e características que possuía na ocasião em que foi fabricado (Allen; Popovich; Ansel, 2011; ICH, 2003). A estabilidade interfere diretamente na qualidade de um produto farmacêutico, impactando em sua eficácia e segurança ao ser administrado a um paciente. Sendo assim, para que esses parâmetros não sofram alterações, é fundamental a realização de estudos de estabilidade em fármacos e candidatos a fármacos (Kamberi; Raposa, 2016).

A estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser estudada sob cinco diferentes aspectos: químico, físico, microbiológico, terapêutico e toxicológico. Alterações das características e propriedades de um produto farmacêutico que extrapolem os limites aceitáveis e pré-estabelecidos colocam em risco a segurança e eficácia desses produtos (ANVISA, 2012a; ICH, 2003).

A estabilidade de fármacos depende de fatores relacionados ao próprio produto, denominados de fatores intrínsecos, como por exemplo, a presença de impurezas, propriedades físico-químicas e processo de obtenção. Além disso, a estabilidade também é influenciada por fatores relacionados ao ambiente, denominados de fatores extrínsecos. Dentre esses, destacam-se a temperatura, umidade, gases (oxigênio e dióxido de carbono) e luz. O impacto dos fatores extrínsecos pode ser minimizado com o uso de excipientes específicos, embalagens apropriadas e condições adequadas de armazenamento (ANVISA, 2012b).

A temperatura é o fator extrínseco mais relevante para a estabilidade de fármacos. O seu aumento está relacionado, na maioria das vezes, com um incremento na velocidade de degradação química. Em geral, a velocidade de uma reação aumenta exponencialmente com o aumento de temperatura. Essa relação é normalmente verificada para reações de hidrólise de fármacos e algumas reações de oxidação. A influência da temperatura pode ser reduzida pela correta seleção da forma de armazenamento (ANVISA, 2012a).

A umidade é outro fator extrínseco de grande relevância para a estabilidade de fármacos e produtos farmacêuticos. Está relacionada às reações de degradação química catalisadas por moléculas de água. Reações de hidrólise, hidratação, isomerização podem conduzir à decomposição de fármacos. Reações de hidrólise são normalmente observadas em produtos farmacêuticos, uma vez que muitos insumos ativos apresentam em sua estrutura grupamentos funcionais como ésteres, amidas secundárias, lactonas e lactamas. A influência da umidade na

estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser minimizada pela utilização de embalagens impermeáveis (Leite, 2006).

A luz e o oxigênio também são fatores ambientais que podem impactar na estabilidade de produtos farmacêuticos. A luz pode fornecer a energia de ativação necessária para iniciar reações de oxidação, redução, rearranjo de anéis, polimerização, rupturas de ligações, isomerizações e racemizações. Já o oxigênio, por sua vez, além das reações de oxidação de fármacos, pode estar envolvido em reações de fotodegradação (Leite, 2006).

As razões para a determinação da estabilidade de produtos farmacêuticos fundamentam-se, entre outras, na preocupação com a saúde pública. A perda da estabilidade de um fármaco pode estar diretamente relacionada com a ausência do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação tóxicos (Abdallah; Al-Ghobashy; Lotfy, 2015).

Os estudos de estabilidade compreendem um conjunto de ensaios sistematizados que visam garantir que produtos farmacêuticos mantenham suas características durante um determinado período de tempo. Embora extremamente relevantes, esses estudos só foram regulamentados a partir da década de 1980 e passaram a ser adotados por diversas agências reguladoras a partir dos anos 90, influenciadas pela publicação dos primeiros guias do comitê denominado *The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) e guias da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – WHO) (ANVISA, 2012a).

No Brasil, a primeira legislação sobre estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos data de 2002. Nos anos seguintes, novos documentos foram publicados, tornando a legislação brasileira mais abrangente e semelhante à internacional. Semelhança essa que está sendo ampliada com a integração da ANVISA ao comitê gestor do ICH desde novembro de 2019 (ANVISA, 2002a; Facci *et al.*, 2020).

A norma mais recente da ANVISA que trata sobre a realização de estudos de estabilidade é a RDC nº 318/2019. Esta norma estabelece os critérios para a realização de estudos de estabilidade em insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e medicamentos, exceto biológicos, os quais possuem legislação específica para tal finalidade (ANVISA, 2019a).

A RDC 318/2019 classifica os estudos de estabilidade em acelerado, longa duração, acompanhamento, degradação forçada, estabilidade pós-reconstituição ou diluição e estabilidade em uso. O estudo acelerado requer a utilização de condições forçadas de armazenamento, de modo a acelerar a degradação do produto farmacêutico objetivando avaliar o impacto de exposições rápidas a condições fora do estabelecido, o que pode acontecer durante o transporte, por exemplo. O estudo de longa duração é utilizado para determinar o prazo de

validade e as condições de armazenamento adequadas. O estudo de acompanhamento, por sua vez, é realizado após a comercialização do produto, cujo objetivo é verificar se as características previstas nos estudos de estabilidade de longa duração são mantidas. O estudo de degradação forçada visa promover degradação suficiente que permita a avaliação dos produtos de degradação. Para tanto, as condições utilizadas são mais drásticas do que aquelas utilizadas no estudo acelerado. O estudo de estabilidade pós-reconstituição ou diluição destina-se a comprovar o período no qual o medicamento mantém a estabilidade após a reconstituição. Já o estudo de estabilidade em uso é projetado para medicamentos acondicionados em embalagens multidoses, cuja finalidade é comprovar que a estabilidade do produto se mantém após a abertura e subsequentes reaberturas da embalagem primária (ANVISA, 2019b).

A evolução da legislação brasileira no que tange a realização de estudos de estabilidade em IFAs e medicamentos é notória nos últimos anos. Tal fato deve-se a um maior alinhamento à legislação internacional, especialmente aos guias publicados pelo ICH e WHO, os quais serviram de base para elaboração das normas brasileiras. Entretanto, embora a RDC 318/2019 tenha reunido os estudos de estabilidade de IFAs e medicamentos em um único documento, a legislação brasileira não possui uma norma única sobre a condução de estudos de estabilidade, apresentando uma grande quantidade de documentos publicados, o que gera uma fragmentação do assunto e dificulta o seu entendimento (Facci, 2020).

2.8 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os produtos de degradação são definidos como impurezas orgânicas, quimicamente derivadas do fármaco ou candidato a fármaco, que podem ser formadas durante o processo de fabricação ou período de estocagem (ICH, 2006a). Podem ocorrer devido à instabilidade intrínseca da molécula a condições adversas ou devido ao contato com excipientes utilizados em uma formulação. A sua presença na formulação final compromete a qualidade do medicamento e pode significar risco à saúde dos pacientes (Narayanam *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2022).

Estudos indicam que alguns produtos de degradação estão relacionados com efeitos adversos causados pelo uso de medicamentos. Além disso, essas substâncias podem apresentar potencial carcinogênico e genotóxico, causando mutações genéticas, quebra e rearranjo de cromossomos e efeitos tóxicos variados (Singh *et al.*, 2012). Em função do potencial risco à saúde humana, as agências reguladoras de diversos países têm elaborado guias e resoluções que visam controlar a presença desses subprodutos em medicamentos (ICH, 2006b).

Dentre os estudos de estabilidade recomendados pelos órgãos reguladores nas etapas iniciais de desenvolvimento de um novo candidato a fármaco, está a avaliação da estabilidade intrínseca da molécula (Allen; Popovich; Ansel, 2011; ANVISA, 2012a; ICH, 2003). Este tipo de estabilidade está relacionado exclusivamente à própria molécula do fármaco, independentemente da presença de outros componentes que serão usados na formulação do medicamento. É realizada através de estudos de degradação forçada, também chamados de testes de estresse. Nestes testes, ocorre a exposição do fármaco a condições severas, como por exemplo, meios oxidativos, temperatura e umidade elevadas e ampla faixa de pH (ICH, 2003). As condições de estresse são variáveis de acordo com a estrutura química de cada fármaco (Silva *et al.*, 2009). Posteriormente, deve-se desenvolver um método analítico capaz de separar os produtos de degradação formados do fármaco de origem. Geralmente, são empregadas as técnicas de cromatografia líquida ou gasosa a fim de determinar a extensão de degradação do fármaco em cada um dos ambientes a que foi submetido (Singh *et al.*, 2012).

Os estudos de degradação forçada objetivam gerar todos os possíveis produtos de degradação de uma molécula de interesse. Uma vez que as condições de estresse utilizadas são muito agressivas, geralmente aparecerão mais subprodutos do que nos estudos de estabilidade de longa duração. Dessa forma, os ensaios de estresse são capazes de gerar o perfil de degradação potencial do fármaco, no qual possivelmente ocorrerá a formação de mais produtos de degradação do que no perfil de degradação real obtido através do estudo de estabilidade de longa duração. Sendo assim, espera-se que o perfil real esteja contido no perfil potencial e, dessa forma, os métodos indicativos de estabilidade desenvolvidos empregando os estudos de degradação forçada serão capazes de detectar e quantificar com precisão e exatidão todos os subprodutos oriundos de um determinado fármaco (ANVISA, 2015a; Facci *et al.*, 2020; Kathar *et al.*, 2024).

A identificação e caracterização estrutural dos produtos de degradação oriundos do teste de estresse constituem etapa crucial para o controle desses subprodutos em uma formulação final envolvendo o candidato a fármaco. A partir da elucidação estrutural é possível determinar o perfil de degradação do fármaco e propor reações que conduzam à formação de seus subprodutos (Abdallah; Al-Ghobashy; Lotfy, 2015; Mishra; Chauran; Ramajayam, 2024).

A avaliação da estabilidade intrínseca de fármacos através de estudos de degradação forçada é recomendada por agências reguladoras internacionais e pela ANVISA como forma de avaliação da estabilidade química de fármacos. Além disso, esses estudos permitem identificar os produtos de degradação formados e determinar as condições ambientais que poderiam proporcionar sua formação. Dessa forma, fornecem informações extremamente úteis

sobre as vias de degradação de uma molécula e permitem elaborar alternativas farmacotécnicas, logísticas e de embalagem que possam prolongar a vida de prateleira da formulação final (ANVISA, 2013; ICH, 2003).

Diferentes tipos de reações químicas conduzem à formação de produtos de degradação. A susceptibilidade do fármaco a estas reações está relacionada aos grupos funcionais presentes em sua estrutura (Qiu; Norwood, 2007).

Reações de hidrólise envolvem a clivagem de ligações químicas por água. Compreendem o principal tipo de reação de degradação de fármacos. Tal fato pode ser atribuído à suscetibilidade de grupos funcionais normalmente presentes nas moléculas de IFAs a esse tipo de reação e à presença constante de água em insumos farmacêuticos provenientes do processo de fabricação ou adsorvida do meio. Dentre os principais grupos funcionais susceptíveis a reações de hidrólise estão: éster, lactona, amida, lactama, imida, carbamato, acetal, cetal e sulfonamida (Min Li, 2012).

Reações de hidrólise podem ser catalisadas por ácido e base. Além disso, certos metais, principalmente seus cátions bivalentes, como Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} e Co^{+2} , também podem atuar como catalizadores na hidrólise de ésteres, amidas e acetais. Tal fato deve-se à complexação desses cátions com a carbonila, gerando uma maior polarização de cargas e tornando o carbono carbonílico mais susceptível ao ataque nucleofílico da água (Min Li, 2012; Qiu; Norwood, 2007).

A degradação oxidativa de fármacos também constitui uma relevante fonte de PDs em insumos farmacêuticos e medicamentos, sendo que o principal agente oxidante dessas reações é o próprio oxigênio atmosférico. Uma vez que a oxidação de fármacos pelo oxigênio molecular ocorre aparentemente de forma espontânea e não catalisada, este tipo de degradação é chamado de auto-oxidação (Kotha *et al.*, 2022).

A auto-oxidação é o principal tipo de degradação oxidativa em insumos farmacêuticos, sendo normalmente intermediada por espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. A presença de íons metálicos, provenientes do processo de fabricação do IFA ou excipiente, principalmente ferro e cobre, possuem papel relevante na formação das espécies reativas que precede as reações de auto-oxidação (Min Li, 2012).

Reações oxidativas em fármacos também podem ocorrer por mecanismos de transferência de elétrons. Aminas, compostos contendo enxofre e fenóis são susceptíveis a esse tipo de degradação, formando *N*-óxidos, hidroxilaminas, sulfonas e sulfóxidos. Além disso, ligações duplas entre átomos de carbono podem reagir com peróxido de hidrogênio levando à

formação de epóxidos. Adicionalmente, metais pesados podem oxidar insumos farmacêuticos ativos por meio da transferência de elétrons (Kotha *et al.*, 2022).

Produtos de degradação também podem ser formados quando fármacos são susceptíveis a reações fotoquímicas. Esse tipo de reação pode ser dividido em dois grupos. O primeiro compreende as reações fotoquímicas não-oxidativas, tais como, reações induzidas por luz do tipo isomerização, ciclização, dimerização, rearranjo, hidrólise, descarboxilação e clivagem homolítica envolvendo heteroátomos. Já o segundo grupo é constituído pelas reações fotoquímicas oxidativas. Nestas, um radical livre formado a partir da molécula do fármaco reage com espécies de oxigênio. Este tipo de reação ocorre com fármacos que possuem ligações duplas, hidrocarbonetos aromáticos polinucleados e que possuem estruturas heterocíclicas insaturadas (Qiu; Norwood, 2007).

Por último, reações de isomerização e oligomerização também possuem papel relevante na formação de produtos de degradação em insumos farmacêuticos ativos e medicamentos. Reações de isomerização incluem foto-isomerização *cis/trans*, conforme mencionado anteriormente, e reações de racemização ou epimerização de fármacos que apresentam centros estereogênicos. Este tipo de reação pode ocorrer por ação da luz, aquecimento, condições ácidas ou básicas. Já as reações de oligomerização, como por exemplo a formação de dímeros, é comum entre fármacos que apresentam grupo tiol quando expostos a condições oxidativas. Além disso, podem ocorrer entre compostos indólicos expostos a condições ácidas (Min Li, 2012).

Os limites para impurezas e produtos de degradação em medicamentos são classificados em limite de detecção, no qual a impureza deverá ser reportada para a agência reguladora; limite de identificação, no qual a impureza deverá ser identificada por métodos analíticos apropriados e limite de qualificação, no qual a impureza deverá ser qualificada. A qualificação consiste na avaliação da segurança biológica de um produto de degradação ou de um determinado perfil de impurezas. Os três limites são definidos em função da ingestão diária do medicamento. Além disso, não se aplicam para impurezas genotóxicas, as quais são controladas pelo guia ICH M7 (R2) (ICH, 2006a; ICH, 2006b; ICH, 2023a; ANVISA, 2015b; Facci *et al.*, 2020).

Em função do potencial risco à saúde humana, as agências reguladoras de diversos países têm elaborado guias e resoluções que visam controlar a presença dos produtos de degradação em medicamentos. Os primeiros guias foram publicados pela ICH com a intenção de discutir aspectos científicos e técnicos, além de elaborar guias objetivando a harmonização no desenvolvimento de medicamentos seguros, eficazes e de qualidade (ICH, 2006b).

Dentre as diretrizes da ICH relacionadas ao tema, destacam-se os guias Q3A(R2) e Q3B(R2), os quais abordam a identificação, caracterização e qualificação de impurezas para o registro de novos fármacos e medicamentos sintéticos, respectivamente (ICH, 2006a; ICH, 2006b). Além disso, estabelecem parâmetros para a condução dos estudos de estresse. Paralelamente a estes, o guia ICH M7 (R2) estabelece diretrizes para a verificação do potencial mutagênico de impurezas de síntese ou degradação, objetivando controlar os riscos carcinogênicos destes subprodutos. Estudos de toxicidade *in silico*, utilizando a técnica *Quantitative Structure-Activity Relationships* são sugeridos (ICH, 2023a). Neste sentido, a elucidação estrutural de impurezas e produtos de degradação assume papel fundamental na segurança e eficácia de medicamentos.

No Brasil, a ANVISA publicou em 2005 a resolução RE número 1, a qual preconizava a quantificação dos produtos de degradação como parte integrante do relatório de estudo de estabilidade de produtos farmacêuticos (ANVISA, 2005). Entretanto, a norma não explicava sobre como atender à exigência. Sendo assim, em 2008 foi lançado um informe técnico complementando a RE nº 1. Este trazia diretrizes de como proceder aos estudos de degradação forçada, a concentração dos degradantes empregados e a faixa de degradação do fármaco a ser obtida (ANVISA, 2008). Em 2012, foi publicada a resolução RE número 45, a qual preconizava a realização de testes de degradação forçada em fármacos (ANVISA, 2012a). Em dezembro de 2013, inspirada nos guias da ICH, a ANVISA lançou a resolução RDC número 58. Esta estabelecia os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos novos, genéricos e similares. Também preconizava a realização de ensaios de degradação forçada em fármacos como método de avaliação da sua estabilidade intrínseca. A norma previa a elaboração do perfil de degradação do medicamento e definia que o estudo de degradação forçada deveria promover degradação superior a 10 % da concentração do fármaco e inferior à degradação completa da amostra. Os resultados dos ensaios serviriam para o desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade (ANVISA, 2013). Entretanto, atendendo às solicitações das indústrias farmacêuticas nacionais, as quais reivindicaram mais tempo para adequação às novas diretrizes, a RDC 58 foi revogada. Em seu lugar, a ANVISA publicou a resolução RDC número 53, de 04 de dezembro de 2015, a qual também estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos novos, genéricos e similares. Esta norma atualiza e harmoniza as terminologias utilizadas, além disso, estabelece novos prazos para adequação dos produtos já registrados conforme categorias de uso (ANVISA, 2015a).

No mesmo ano de publicação da RDC 53, a ANVISA publicou o Guia 4, intitulado “Guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos”. O novo documento objetivou expor o entendimento da agência com relação às melhores práticas para cumprimento da legislação, mais especificamente para atendimento à RDC 53/2015 (ANVISA, 2015a).

De forma complementar aos documentos anteriormente mencionados, a ANVISA publicou em 2017 uma série de perguntas e respostas sobre a RDC 53/2015 e o Guia 4/2015. Estas objetivaram esclarecer os questionamentos mais comuns recebidos pela agência para cumprimento das normas vigentes. Entre os assuntos abordados, o documento justifica o motivo pelo qual a ANVISA não especifica a concentração e o tempo de exposição aos agentes degradantes durante os ensaios de degradação forçada. Além disso, a agência recomenda algumas referências que podem ser utilizadas para tal fim (ANVISA, 2017c).

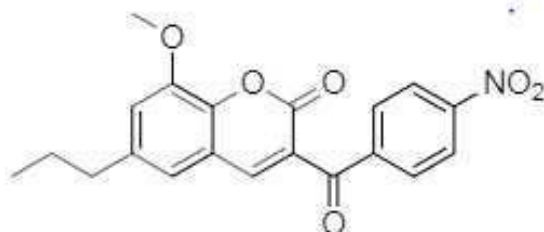
De modo semelhante, em 2019, a ANVISA lançou um conjunto de perguntas e respostas intitulado “Fluxo de análise de qualificação de impurezas e produtos de degradação de medicamentos classificados como sintéticos e semissintéticos”. O documento objetivou prestar maiores esclarecimentos sobre a condução de estudos de qualificação de impurezas presentes em medicamentos sintéticos e semissintéticos descritos no contexto da RDC 53/2015 (ANVISA, 2019a).

2.9 NITROBENZOILCUMARINA 8-METOXI-3-(4-NITROBENZOIL)-6-PROPIL-2H-CROMAN-2-ONA

A doença de Chagas e a leishmaniose constituem infecções graves causadas por protozoários e comprometem a saúde de milhões de pessoas em todo mundo. Os tratamentos de ambas as enfermidades são baseados na utilização de fármacos que apresentam eficácia limitada, efeitos colaterais graves e enfrentam resistência por parte de cepas dos respectivos agentes etiológicos. Sendo assim, existe uma demanda urgente por novas moléculas capazes de tornarem mais eficaz a terapêutica aplicada ao controle dessas doenças (WHO, 2024).

Estudos realizados pelo Laboratório de pesquisa em Química Farmacêutica, LQFar-UNIFAL-MG, demonstraram o potencial terapêutico da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona no combate à doença de Chagas, cuja estrutura está demonstrada na Figura 8 (Brancaglioni *et al.*, 2018). Adicionalmente, estudos realizados pelo laboratório de parasitologia do instituto de ciências biomédicas da UNIFAL-MG comprovaram a atividade leishmanicida da substância (De Figueiredo Peloso *et al.*, 2020).

Figura 8 - Estrutura química da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.



Fonte: Do autor.

Brancaglioni *et al.* (2018) realizaram a síntese da nitrobenzoilcumarina empregando a reação de Knoevenagel entre formil-diidroeugenol e 4-nitrobenzoilacetato de etila. Posteriormente, os autores realizaram ensaios *in vitro* para avaliação da atividade tripanocida do derivado cumarínico frente à forma epimastigota de *T. cruzi*. De forma adicional, foram realizados testes para avaliar a citotoxicidade da nitrobenzoilcumarina empregando células da linhagem H9C2. O fármaco benznidazol foi utilizado como referência nesses estudos. Foi determinado um valor de IC50 igual a $28 \mu\text{M} \pm 3$ para o derivado cumarínico e de $25 \mu\text{M} \pm 10$ para o benznidazol. Os resultados obtidos evidenciaram atividade tripanocida da nitrobenzoilcumarina semelhante à do fármaco controle e baixa citotoxicidade frente a células de mamíferos (Brancaglioni *et al.*, 2018).

Diante dos resultados obtidos, a atividade tripanocida do composto sintetizado foi avaliada frente à forma amastigota de *T. cruzi*. Os autores verificaram uma redução significativa no número de células infectadas quando o tratamento foi realizado tanto com a nitrobenzoilcumarina, quanto com benznidazol, sendo obtidos valores de IC50 iguais a $13 \mu\text{M}$ e $3 \mu\text{M}$, respectivamente. Os resultados obtidos motivaram os autores a realizarem ensaios *in vivo*. A nitrobenzoilcumarina e o fármaco controle foram administrados por via oral, na concentração de 50 mg/Kg, em cobaias infectadas com a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*. O tratamento foi realizado por seis dias. Neste caso, foi observada uma redução na parasitemia em 100% dos animais, de forma semelhante ao grupo tratado com benznidazol (Brancaglioni *et al.*, 2018).

De Figueiredo Peloso *et al.* (2020) avaliaram o potencial da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona como um possível candidato a fármaco a ser utilizado no combate à leishmaniose. Nos ensaios *in vitro*, o derivado cumarínico apresentou atividade leishmanicida semelhante à anfotericina B frente às formas promastigotas e

amastigotas de *L. amazonenses*, com valores de IC₅₀ iguais a 12,0 µM e 3,53 µM, respectivamente. Além disso, nos ensaios envolvendo as formas amastigotas de *L. infantum chagasi*, os resultados de IC 50 obtidos para a nitrobenzoilcumarina e para o fármaco controle foram semelhantes, com valores de 6,8 µM e 4,02 µM, respectivamente. Destaca-se que o derivado cumarínico apresentou baixa atividade citotóxica nos testes realizados (De Figueiredo Peloso *et al.*, 2020).

Nos ensaios *in vivo*, os autores administraram a nitrobenzoilcumarina por via oral e quantificaram as formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* presentes no baço e fígado das cobaias infectadas. A cumarina foi administrada na dose de 20 mg/Kg/dia e foram evidenciadas reduções significativas no número de parasitos viáveis nos órgãos analisados. Os resultados foram equivalentes àqueles empregando o antimoniato de meglumina como fármaco controle. Sendo assim, em função dos resultados obtidos, os autores concluíram que o derivado cumarínico poderia ser utilizado como um futuro candidato a fármaco no combate à leishmaniose (De Figueiredo Peloso *et al.*, 2020).

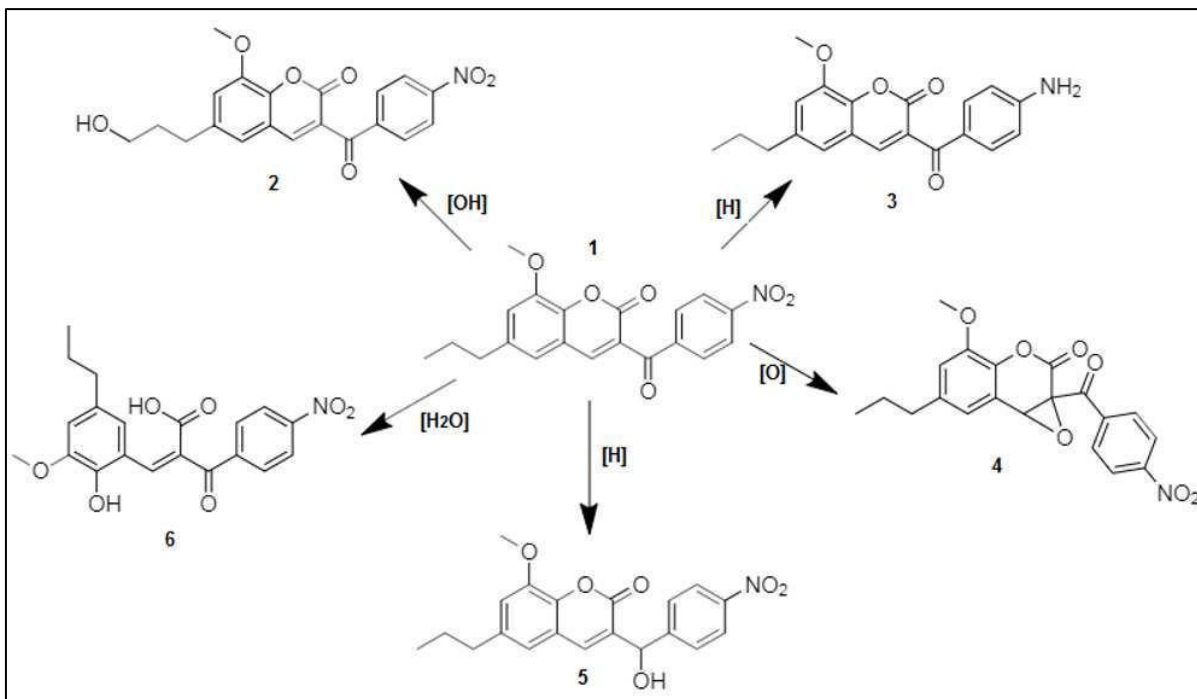
Diante dos resultados iniciais promissores envolvendo a nova cumarina descoberta, torna-se relevante a realização de estudos adicionais de modo a permitir a continuidade do processo que pode conduzir a substância a ser um protótipo de fármaco. Dentre estes estudos, evidenciam-se os de estabilidade, exigidos pelas agências reguladoras durante as fases iniciais de desenvolvimento de candidatos a fármaco e destacam-se aqueles relacionados à estabilidade intrínseca da molécula, envolvendo estudos de degradação forçada (ICH, 2006a).

Nestes ensaios o fármaco é submetido a condições de estresse mais severas do que aquelas previstas em estudos de estabilidade acelerada ou de longa duração. Sendo assim, compreendem uma importante ferramenta na predição de problemas de estabilidade, desenvolvimento de métodos analíticos e identificação de possíveis produtos de degradação. Uma vez que a presença de produtos de degradação pode comprometer a qualidade, segurança e eficácia do fármaco, a identificação e quantificação desses subprodutos é uma exigência das autoridades sanitárias, tanto internacionais quanto brasileiras, para o controle de qualidade de insumos farmacêuticos e obtenção de novos registros (ANVISA, 2015b).

A nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona apresenta em sua estrutura grupos funcionais susceptíveis a reações que podem comprometer a sua eficácia e gerar subprodutos indesejados. Sendo assim, a realização de estudos de degradação forçada torna-se relevante como ferramenta de predição de sua estabilidade, identificação de possíveis produtos de degradação e avaliação dos riscos que esses subprodutos poderiam gerar em uma formulação envolvendo a molécula (Min Li, 2012). Na Figura 9 é

apresentada a predição de alguns dentre os possíveis produtos de degradação oriundos da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.

Figura 9 - Predição de possíveis produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.



Fonte: Do autor.

Legenda: (1) Cumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croma-2-ona; (2) Produto de degradação resultante de oxidação de cadeia alquílica; (3) Produto de degradação resultante de reação de redução; (4) Produto de degradação resultante de reação de oxidação; (5) Produto de degradação resultante de reação de redução da cetona aromática; (6) Produto de degradação resultante de reação de hidrólise.

3 OBJETIVOS

Os objetivos com esse trabalho foram:

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Teve-se por objetivo central a avaliação da estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona por meio de estudos de degradação forçada e a identificação e avaliação do potencial biológico dos seus produtos de degradação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos com esse trabalho foram:

- a) sintetizar a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona e caracterizá-la por ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução (UPLC-MS), cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS), termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial;
- b) desenvolver um método indicativo de estabilidade para análise da nitrobenzoilcumarina e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (HPLC-UV);
- c) avaliar a estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina através de estudos de estresse (degradação forçada), expondo a molécula às condições de hidrólise ácida e alcalina, meio oxidativo, luz, calor, umidade e solução de íons metálicos;
- d) identificar os produtos de degradação formados nos estudos de estresse;
- e) avaliar o perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta às condições de estabilidade acelerada;
- f) avaliar o potencial citotóxico dos produtos de degradação;
- g) avaliar o potencial mutagênico dos produtos de degradação;
- h) avaliar a atividade tripanocida dos produtos de degradação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Foram utilizados na execução deste trabalho:

- a) sistema HPLC (*Shimadzu*, Japão), modelo LC-10A, equipado com detector UV – Núcleo de controle de qualidade, UNIFAL-MG;
- b) sistema HPLC *Alliance*, modelo 2695 (*Waters*, USA), acoplado com detector de arranjo de diodos (PDA) – Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- c) sistema HPLC *Alliance*, modelo 2695 (*Waters*, USA), acoplado com detector UV – Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- d) sistema UPLC *Acquity*, modelo *Hclas* (*Waters*, USA), acoplado a detector PDA e analisador de massas quadrupolo simples com interface *electrospray*, modelo *Acquity* QDa – Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- e) sistema UHPLC *Agilent* 6545 Q-TOF MS (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma interface *electrospray* – Laboratório de produtos naturais – Departamento de química – Universidade Federal de São Carlos;
- f) espectrofotômetro UV/Vis, modelo *Cary* 8454 (*Agilent Technologies*) – Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- g) espectrofotômetro de infravermelho, modelo *FRONTIER* - FTIR (*Perkin Elmer*, USA) - Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- h) espectrômetro de ressonância magnética nuclear *Brucker* AC-300 - Laboratório de ressonância magnética nuclear, UNIFAL-MG;
- i) balança microanalítica *Mettler Toledo*, modelo XPR10 - Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- j) balança analítica *Mettler Toledo*, modelo New classic - Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- k) estufa *Ethiktechnology*, modelo 400/2ND - Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- l) câmara de fotoestabilidade *Mecalor*, modelo EC/0,2/R-F - Laboratório de desenvolvimento farmacotécnico do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;

- m) equipamento de termogravimetria, modelo TGA550 (*TA Instruments*) – Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- n) equipamento de calorimetria exploratória diferencial, modelo DSC250 (*TA Instruments*) - Laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre - MG;
- o) vidrarias de grau analítico.

4.2 REAGENTES

Foram utilizados os seguintes reagentes: hexamina P.A., ácido acético glacial P.A., diidroeuogenol, ácido clorídrico (HCl) P.A., bicarbonato de sódio (NaHCO₃) P.A., diclorometano P.A., 4-nitrobenzoilacetato de etila P.A., etanol P.A., piperidina P.A., hidróxido de sódio (NaOH) P.A., peróxido de hidrogênio (H₂O₂) P.A., sulfato de cobre pentaidratado P.A., água ultrapurificada, metanol grau HPLC, metanol grau LC-MS, acetonitrila grau HPLC, ácido trifluoroacético grau HPLC, ácido fórmico grau HPLC, *N,N*-dimetilformamida grau HPLC, clorofórmio deuterado, 4-nitrofenol P.A., meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), soro bovino fetal (SBF), dimetilsulfóxido (DMSO), estreptomicina, penicilina, *phosphate saline buffer* (PBS), *thiazolyl blue tetrazolium bromide*, dexorubicina, citocalasina B, tripsina, citrato de sódio e solução Giemsa 3 %.

4.3 SÍNTESE DA CUMARINA ALVO DO ESTUDO

A síntese da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona foi realizada conforme descrito por Brancaglioni *et al.* (2018), utilizando o método de Duff e posterior reação de Knoevenagel entre formil-diidroeuogenol e 4-nitrobenzoilacetato de etila. A síntese foi realizada no laboratório de pesquisa em química farmacêutica da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 5 equivalentes de hexamina (aproximadamente 4,2 g) e 40 mL de ácido acético glacial. A mistura foi mantida sob agitação à 125 °C até completa solubilização. Posteriormente, foi adicionado 1 equivalente de diidroeuogenol (1 mL) e a reação foi mantida sob as mesmas condições por mais 6 horas. Após esse período, foram acrescentados ao meio reacional 10 mL de uma solução de ácido clorídrico 2 molar, mantendo-se a agitação por mais 30 minutos. Posteriormente, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente.

Para extração do formil-diidroeuogenol, o material obtido foi transferido para um béquer e foi adicionada solução saturada de NaHCO_3 até obtenção de pH alcalino. Foi realizada a extração com diclorometano. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de uma solução de ácido clorídrico 1 molar à fase orgânica, a qual foi lavada com água purificada. A fase aquosa foi descartada e o diclorometano rotavevaporado. O material obtido foi seco à temperatura ambiente e submetido à reação de Knoevenagel com o reagente 4-nitrobenzoilacetato de etila para obtenção da nitrobenzoilcumarina alvo deste estudo.

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1 equivalente de formil-diidroeuogenol (aproximadamente 0,412 g), o qual foi dissolvido em 20 mL de etanol. Posteriormente, foram acrescentados 1 equivalente de 4-nitrobenzoilacetato de etila (aproximadamente 0,5 g) e 2 gotas de piperidina. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, o precipitado obtido correspondente à nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona foi filtrado, lavado com etanol e seco em dessecador.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA CUMARINA

A nitrobenzoilcumarina sintética 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona foi caracterizada estruturalmente utilizando as técnicas a seguir.

4.4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises por RMN foram realizadas no laboratório de ressonância magnética nuclear da UNIFAL-MG, utilizando um espectrômetro *Brucker* AC-300, com campo magnético de 7,05 Tesla. A amostra foi preparada em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e foram obtidos os espectros de ^{13}C , ^1H e subespectro DEPT-135. Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) e os dados tratados utilizando o *software* MestreNova. Os sinais presentes no espectro de ^1H e ^{13}C foram referenciados, respectivamente, pelos sinais do TMS e clorofórmio.

4.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As bandas de absorção na região do infravermelho características da estrutura química da nitrobenzoilcumarina foram obtidas por FTIR na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , utilizando 32 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas em um espectrofotômetro de

infravermelho, modelo *FRONTIER* (Perkin Elmer, USA) utilizando acessório de refletância total atenuada (ATR), disponível no laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed – Pouso Alegre- MG.

4.4.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução (UPLC-MS)

As análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução (UPLC-MS) foram realizadas utilizando um cromatógrafo UPLC *Acquity*, modelo *HClas* (Waters, USA) acoplado a um detector de arranjo de diodos e a um analisador de massas do tipo quadrupolo simples com interface *electrospray*, modelo *Acquity* QDa, disponível no laboratório de tecnologia analítica do grupo Cimed. As amostras, preparadas na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ em uma mistura de água, metanol e *N,N*-dimetilformamida na razão de 16:48:36 (v/v), foram injetadas no cromatógrafo utilizando uma coluna cromatográfica Triart C18 ExRS de 100 mm de comprimento por 2,0 mm de diâmetro interno e partícula de 1,9 µm. Foi utilizada como fase móvel uma mistura de água ultrapurificada e metanol na razão 33:67 (v/v). Objetivando facilitar a ionização do analito de interesse, foi adicionado ácido trifluoroacético à fase móvel na concentração de 0,1 %. O cromatógrafo foi operado com fluxo de 0,3 mL.min⁻¹ e o detector de arranjo de diodos em 259 nm. Foi utilizado 12 minutos como tempo de corrida, 20 °C como temperatura da amostra, temperatura do forno da coluna a 35 °C e volume de injeção de 1,5 µL. A ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo mostrou-se mais adequada à análise, operando nas seguintes condições: nitrogênio como gás de dessolvatação (90 psi), temperatura da linha de dessolvatação a 600 °C, temperatura da fonte a 120 °C, tensão no capilar de 0,8 kV e tensão no cone de 10 V. As análises foram realizadas na faixa de 100 a 600 daltons (Da).

Este mesmo método cromatográfico foi utilizado na triagem inicial para caracterização estrutural dos produtos de degradação da cumarina, observados durante a avaliação da estabilidade intrínseca da molécula, realizada através de estudos de degradação forçada.

4.4.4 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS)

As análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS) foram realizadas utilizando um cromatógrafo

líquido de ultra e alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas *Agilent 6545 Q-TOF MS* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA) com fonte de ionização por *electrospray*. As análises foram realizadas no laboratório de produtos naturais do departamento de química da Universidade Federal de São Carlos.

As amostras foram preparadas na concentração de 10 ppm utilizando metanol como solvente. Foi utilizada como fase móvel uma mistura de água e acetonitrila na proporção de 45:55 v/v, respectivamente, contendo 0,1 % de ácido fórmico. O cromatógrafo foi operado com fluxo de 0,3 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 3 µL. Para a separação foi utilizada uma coluna *Agilent SB-C18 RRHD* de 50,0 mm de comprimento por 3,0 mm de diâmetro interno e partícula de 1,8 µm. A ionização por *electrospray* foi realizada nos modos positivo e negativo, sendo empregados os seguintes parâmetros para a ionização: nitrogênio como gás de dessolvatação na temperatura de 320 °C e fluxo de 12 L.min⁻¹, pressão do nebulizador de 35 psi, voltagem no capilar de 3200 V, tensão no cone de 700 V, taxa de varredura de 3 espectros.s⁻¹ e processamento utilizando o *software Mass Hunter Workstation*, versão B.08.00. As análises foram realizadas na faixa de 80 a 1000 Da.

As mesmas condições cromatográficas e de ionização foram utilizadas para comprovação das estruturas propostas para os produtos de degradação verificados nos estudos de estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina e previamente analisados por UPLC-MS.

4.4.5 Caracterização térmica

A caracterização térmica da nitrobenzoilcumarina foi realizada utilizando as técnicas de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Na análise por DSC, foram utilizadas cerca de 2 mg de amostra, as quais foram colocadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e analisadas no intervalo de aquecimento de 100 °C a 170 °C, com razão de aquecimento de 0,5 °C.min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹. As análises foram realizadas em um equipamento DSC250 (*TA Instruments*) e objetivaram avaliar o comportamento térmico da nitrobenzoilcumarina e determinar a pureza do material sintetizado. As condições de análise foram definidas conforme preconizado pela *American society for testing and materials* (ASTM) para determinação de pureza utilizando a técnica de calorimetria exploratória diferencial (*American Society for Testing and Materials*, 2019).

A estabilidade térmica da cumarina foi avaliada em uma termobalança, modelo TGA550 (*TA Instruments*), sendo realizada em 2 condições distintas de análise. Na primeira foi

empregada atmosfera dinâmica de nitrogênio na faixa de temperatura de 25 °C a 1000 °C, com razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e fluxo de 60 mL.min⁻¹. Foram utilizados cadinhos de platina abertos e cerca de 2 mg de amostra. Na segunda, foram utilizadas as mesmas condições de análise descritas anteriormente, entretanto, em atmosfera de ar sintético.

A realização das análises por TG empregando as duas condições instrumentais descritas acima objetivou quantificar a presença de água, solventes residuais, outras impurezas voláteis e impurezas inorgânicas possivelmente presentes na nitrobenzoilcumarina sintetizada. As análises foram realizadas conforme preconizado pela ASTM para avaliação composicional de materiais por termogravimetria (ASTM, 2008).

4.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA ANÁLISE DA NITROBENZOILCUMARINA E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Foi desenvolvido um método analítico empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (HPLC-UV) em fase reversa para doseamento da nitrobenzoilcumarina e quantificação de seus produtos de degradação. Este método também foi utilizado para determinação da pureza cromatográfica da cumarina sintetizada. O desenvolvimento do método foi realizado em um equipamento HPLC *Shimadzu*, equipado com detector UV, disponível no Núcleo de Controle de Qualidade da UNIFAL-MG.

O método utilizado para análise da nitrobenzoilcumarina por HPLC-UV empregou como fase móvel uma mistura de água ultrapurificada e metanol na proporção de 33:67 (v/v). Foi utilizado um fluxo de 2,0 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Hypersil ODS, 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e partícula de 5 µm. A temperatura do forno da coluna foi mantida em 35 °C, o amostrador em 20 °C e o comprimento de onda de 259 nm empregado na detecção por ultravioleta. O tempo de corrida foi definido em 12 minutos. As soluções amostra foram preparadas na concentração de 500 µg.mL⁻¹, utilizando como solvente uma mistura de água, metanol e *N,N*-dimetilformamida na razão de 16:48:36 (v/v).

O método desenvolvido foi validado segundo as diretrizes do guia ICH Q2(R2) e resolução ANVISA RDC n°166, de 24 de julho de 2017, sendo utilizado nos estudos de estabilidade acelerada e na avaliação da estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina.

4.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE INTRÍNSECA DA NITROBENZOILCUMARINA

A avaliação da estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina foi realizada através de estudos de degradação forçada. O perfil de degradação da molécula foi obtido a partir de amostras submetidas às condições recomendadas pelos guias ICH Q3A (R2), ICH Q1B e resolução ANVISA RDC n° 53, de 7 dezembro de 2015. O fármaco foi exposto às condições de estresse descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições de degradação utilizadas na avaliação da estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina.

Agente degradante	Condição de estresse	Tempo de degradação
Calor	60°C	10 dias
Umidade	75% de umidade relativa	10 dias
Hidrólise ácida	HCl 0,1M, HCl 0,5M e HCl 1M	10 dias
Hidrólise básica	NaOH 0,1M	30 minutos
Solução de íons metálicos	CuSO ₄ 0,05M	6 dias
Solução oxidativa	H ₂ O ₂ 1% (v/v) e H ₂ O ₂ 3% (v/v)	10 horas
Luz	Ultravioleta (200 W/h/m ²) e fluorescente (1,2 milhões lux/h)	10 dias

Fonte: ANVISA, 2015; ICH, 1996; ICH, 2006a.

O aquecimento, a exposição à umidade e à luz foram realizados com amostras da nitrobenzoilcumarina no estado sólido. Posteriormente, essas amostras foram dissolvidas em diluente para a concentração de trabalho do método analítico. Os estresses por oxidação, hidrólise ácida, básica e íons metálicos foram realizados à temperatura ambiente e com a nitrobenzoilcumarina em solução na concentração de 500 µg.mL⁻¹. Nestas condições, a cumarina foi dissolvida em diluente e, posteriormente, foram adicionados os agentes degradantes de modo a obter as concentrações descritas na Tabela 1. As amostras submetidas à hidrólise básica foram neutralizadas após o período de estresse, utilizando solução de ácido clorídrico. Tal ação foi necessária devido alteração do perfil cromatográfico observado nessas soluções e também objetivando preservar a fase estacionária à base de sílica da coluna

cromatográfica. Já para as amostras submetidas à hidrólise ácida, não foi necessária a neutralização.

As amostras submetidas às condições de degradação forçada foram utilizadas na validação do método desenvolvido por HPLC-UV e empregadas nos estudos de caracterização estrutural dos produtos de degradação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

4.7 AVALIAÇÃO DA NITROBENZOILCUMARINA NAS CONDIÇÕES DE ESTABILIDADE ACELERADA

A nitrobenzoilcumarina foi exposta às condições de estabilidade acelerada conforme preconizado pela resolução ANVISA RDC n° 318, de 06 de novembro de 2019. Sendo assim, amostras foram incubadas em câmara de estabilidade a $75 \% \pm 5 \%$ de umidade relativa e temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, a fim de avaliar a influência desses parâmetros na estabilidade química da molécula.

As amostras foram analisadas empregando o método por HPLC-UV previamente desenvolvido e validado para doseamento da nitrobenzoilcumarina e seus produtos de degradação. Os resultados obtidos após 3 e 6 meses de incubação foram comparados com os resultados das amostras no tempo inicial, ou seja, sem incubação na câmara.

4.8 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS CÉLULAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

Embora estudos de citotoxicidade envolvendo a nitrobenzoilcumarina já tenham sido realizados por Brancaglioni *et al.* (2018), optou-se por realizar novos ensaios com a molécula utilizando a mesma linhagem celular que será empregada nos estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de seus produtos de degradação. Sendo assim, nestes ensaios foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos de pulmão de Hamster chinês (células V79), gentilmente cedida pelo Laboratório de Mutagênese da Universidade de Franca. Esta linhagem é amplamente empregada e recomendada para a realização de ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade em virtude de sua velocidade de proliferação celular e estabilidade genética.

As alíquotas da linhagem encontravam-se estocadas em nitrogênio líquido (-195°C), em solução de congelamento composta de 50 % de meio de cultura “*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *Sigma-Aldrich*), 40 % de soro bovino fetal (SBF, *Nutricell*) e 10 % de

dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma-Aldrich*). Para a realização dos experimentos as células foram descongeladas e colocadas em cultivo em meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SBF, 1,2 g.mL⁻¹ de bicarbonato de sódio (*Sigma-Aldrich*), 0,1 g.mL⁻¹ de estreptomicina (*Sigma-Aldrich*) e 0,06 g.mL⁻¹ de penicilina (*Sigma-Aldrich*).

O cultivo foi realizado em monocamada utilizando frascos de cultura descartáveis de 25 cm² de área, à 36,5 °C em estufa com 5 % de CO₂. A cada dois ou três dias, as células foram subcultivadas conforme protocolo experimental padronizado pelo laboratório de genética humana da UNIFAL-MG. Para a realização dos ensaios, conduzidos em triplicata, foram utilizadas células entre a 4^a e 12^a passagem, com cerca de 80 % a 90 % de confluência celular. O tempo considerado necessário para duplicação da população de células foi de 12 horas.

4.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA NITROBENZOILCUMARINA

A citotoxicidade da nitrobenzoilcumarina foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT). O princípio do teste consiste na redução do sal de tetrazólio de coloração amarelada em cristais insolúveis de formazan, de coloração diferenciada, por meio das células metabolicamente ativas em cultura. Quanto mais escura a solução resultante do ensaio, maior o número de células viáveis. As concentrações da nitrobenzoilcumarina utilizadas para avaliação da citotoxicidade foram definidas a partir de um *screening* com diferentes concentrações que variaram até a maior concentração permitida para ensaios *in vitro* (5000 µg.mL⁻¹) (Galloway *et al.*, 1994).

Na execução do ensaio, foram semeadas em placas de 96 poços de fundo plano 1 x 10⁴ células em 100 µL de meio de cultura DMEM, acrescido de 10 % de soro bovino fetal. Após 24 horas, procedeu-se com o tratamento utilizando as diferentes concentrações da nitrobenzoilcumarina (200 µg.mL⁻¹ a 6,25 µg.mL⁻¹). Passadas as 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com *phosphate saline buffer* (PBS). Em seguida, 100 µL de MTT diluído em PBS foram colocados em todos os poços e as células foram incubadas por 4 horas protegidas de radiação luminosa. Foram acrescidos o controle negativo (DMEM), controle solvente (DMSO 1 %) e controle positivo (DMSO 25 %). Passado o período de incubação, os poços foram aspirados e foram adicionados 100 µL de DMSO puro para dissolução do sal e após 30 minutos a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de multiplacas ELISA em comprimento de onda de 570 nm. Os dados de absorbância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular, considerando o controle negativo como 100 %. Além disso, foi realizado o cálculo da concentração necessária para redução de 50 % da

viabilidade celular (IC50) pelo *software GraphPad Prism*, versão 7.0 (*GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA*).

4.10 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA NITROBENZOILCUMARINA

A genotoxicidade da nitrobenzoilcumarina foi avaliada através do ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese, conforme descrito no guia 487 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2016) e em protocolo adaptado por Fenech (2007). Tal método é considerado robusto para mensurar quebras e perdas cromossômicas, falha no reparo de DNA, fusões teloméricas, amplificação gênica, ocorrência de eventos *misrepair*, excesso de cromossomos em células aneuploides, necrose, apoptose e, até mesmo, citostase (Fenech, 2007; Organisation for Economic Co-operation and Development, 2016).

As concentrações utilizadas foram determinadas a partir do ensaio de citotoxicidade por MTT. Para tanto, aproximadamente 5×10^4 células foram semeadas em placas de 6 poços, utilizando 2 mL de meio DMEM com 10 % SBF e incubadas por 24 h. Após o período de incubação, foram submetidas ao tratamento com a nitrobenzoilcumarina por 3h. Foram incluídos no ensaio um grupo controle negativo (DMEM), controle solvente (DMSO 0,5 %) e controle positivo (doxorrubicina $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Foram testadas concentrações da nitrobenzoilcumarina no intervalo de $0,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $3,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Passado o período de tratamento, o meio foi retirado e as células lavadas com PBS. Em seguida, adicionou-se 2 mL de meio de cultura suplementado com SBF e $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de citocalasina-B por 17 h. Reagente este empregado para o bloqueio da citocinese.

Após o período de incubação, foi realizada a colheita das células. Estas foram lavadas com PBS e tripsina. Após 7 minutos, a tripsina foi inativada com meio de cultura e a solução foi transferida para tubo tipo falcon, sendo realizada a centrifugação por 5 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado e os pellets desfeitos. Posteriormente, foi realizada a hipotonização das células adicionando 2,5 mL de citrato de sódio 1 % à 45 °C. As soluções foram divulsionadas e levadas, procedendo-se novamente a centrifugação por 5 minutos a 900 rpm. Os sobrenadantes foram descartados, os pellets desfeitos e as células submetidas a fixação com 2,5 mL de solução fixadora de metanol e ácido acético (3:1) por aproximadamente 12 horas.

Após a fixação, para confecção das lâminas, a solução foi centrifugada novamente por 5 minutos a 900 rpm, o sobrenadante descartado e os pellets desfeitos. Em seguida, duas a três

gotas da suspensão celular foram colocadas em lâminas para microscopia, previamente mantidas em água destilada gelada. Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas utilizando solução de Giemsa 3 % diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente.

A frequência de células binucleadas contendo micronúcleos, brotos nucleares, pontes nucleoplasmáticas e células em apoptose e/ou necrose foram contabilizadas por meio de microscopia óptica em objetiva de imersão (100 x). Os três primeiros eventos são considerados biomarcadores associados à genotoxicidade. Já a presença de células apoptóticas e necróticas está relacionada à citotoxicidade, acarretando morte celular.

A frequência média dos biomarcadores de genotoxicidade foi determinada utilizando 1000 células por lâmina, totalizando 3000 células por tratamento. Já para o monitoramento da citotoxicidade, foi determinado o número de células apoptóticas e/ou necróticas e calculado o índice de divisão nuclear (IDN). Foram discriminadas as células contendo de 1 a 4 núcleos do total de células contabilizadas e calculado o parâmetro de acordo com Eastmond and Tucker (1989), usando a fórmula descrita abaixo, onde M1 a M4 são células contendo de 1 a 4 núcleos, respectivamente, e N o número total de células contabilizadas.

$$\text{IDN} = [(1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3 + 4 \times M4) / N] \quad (1)$$

A frequência dos biomarcadores de citotoxicidade foi calculada utilizando 500 células com citoplasma preservado, totalizando 1500 células por grupo de tratamento.

4.11 ESTUDOS *IN SILICO* PARA PREDIÇÃO DA GENOTOXICIDADE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA NITROBENZOILCUMARINA

O guia ICH M7 (R2) preconiza a avaliação do potencial mutagênico de impurezas e produtos de degradação, presentes em fármacos e medicamentos, através de estudos *in silico* (ICH, 2023a).

A avaliação toxicológica computacional deve ser realizada empregando metodologias QSAR complementares, as quais objetivam prever o resultado de mutagenicidade bacteriana da substância testada. Dessa forma, por extrapolação, pode-se controlar os riscos carcinogênicos de substâncias químicas possivelmente administradas a seres humanos (ICH, 2023a).

Os modelos QSAR utilizam duas metodologias de previsão. Uma deve ser baseada em regras de especialistas e a segunda fundamentada em estatísticas. Para avaliação do potencial

mutagênico dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina foi utilizado o *software* Derek Nexus (*Deductive estimation of risk from existing knowledge*) como base de conhecimento (*Lhasa Limited*, Reino Unido - *Derek Nexus* - versão 6.3.0). Já para avaliação estatística, foi empregado o *software* Sarah Nexus (*Lhasa Limited*, Reino Unido - *Sarah Nexus* – versão 3.3.0). A avaliação *in silico* foi realizada considerando o *endpoint* de mutagenicidade bacteriana *in vitro*.

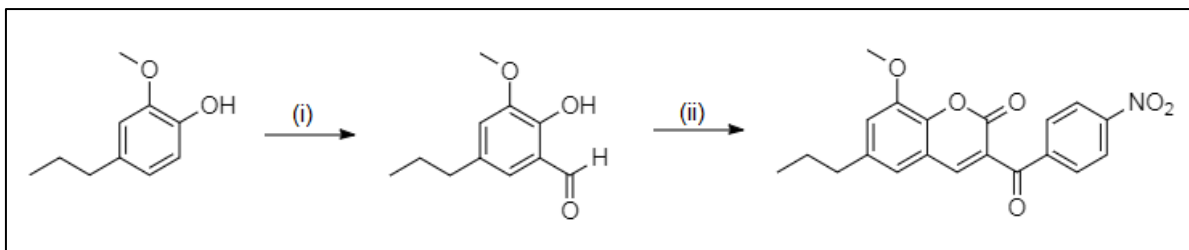
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados obtidos neste trabalho.

5.1 SÍNTESE DA NITROBENZOILCUMARINA 8-METOXI-3-(4-NITROBENZOIL)-6-PROPIL-2H-CROMAN-2-ONA

A síntese da nitrobenzoilcumarina foi realizada em duas etapas conforme descrito por Brancaglioni *et al.* (2018). Na primeira, utilizando o método de Duff, foi obtido o produto formil-diidroeuugenol. Já a segunda etapa, correspondente à reação de Knoevenagel entre formil-diidroeuugenol e 4-nitrobenzoilacetato de etila, deu origem a um precipitado branco amarelado correspondente à nitrobenzoilcumarina alvo deste trabalho. As condições reacionais são apresentadas na Figura 10. Os mecanismos propostos para a síntese do formil-diidroeuugenol e da nitrobenzoilcumarina são apresentados, respectivamente, nas Figuras 11 e 12.

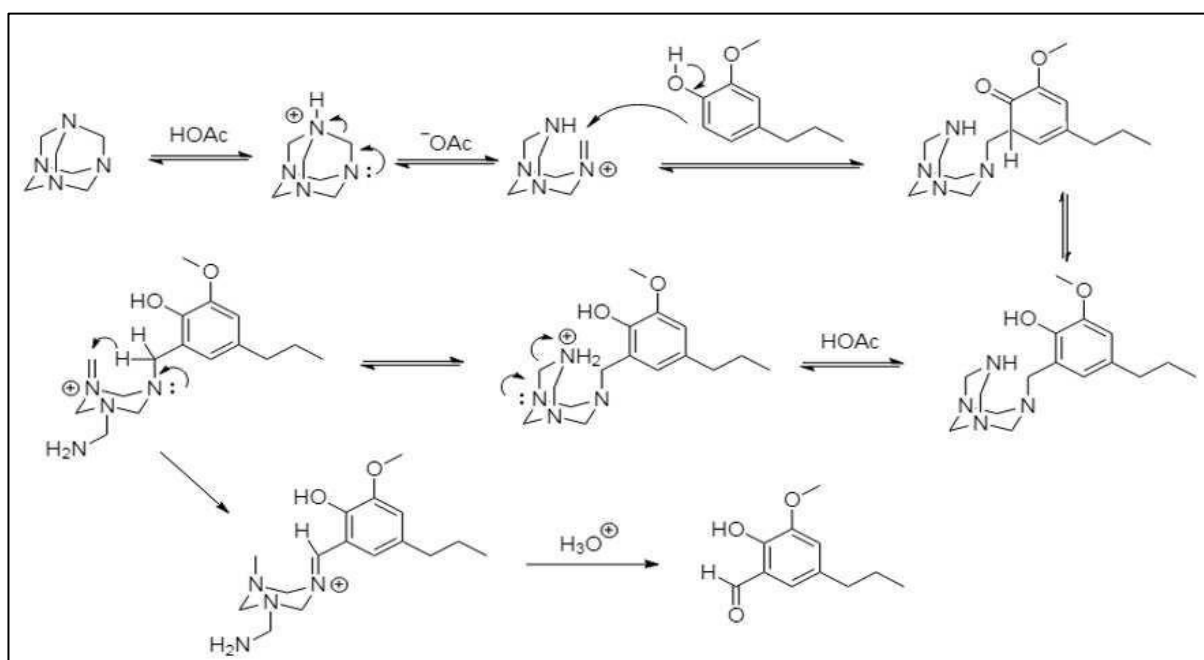
Figura 10 - Esquema da reação de síntese da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.



Fonte: Do autor.

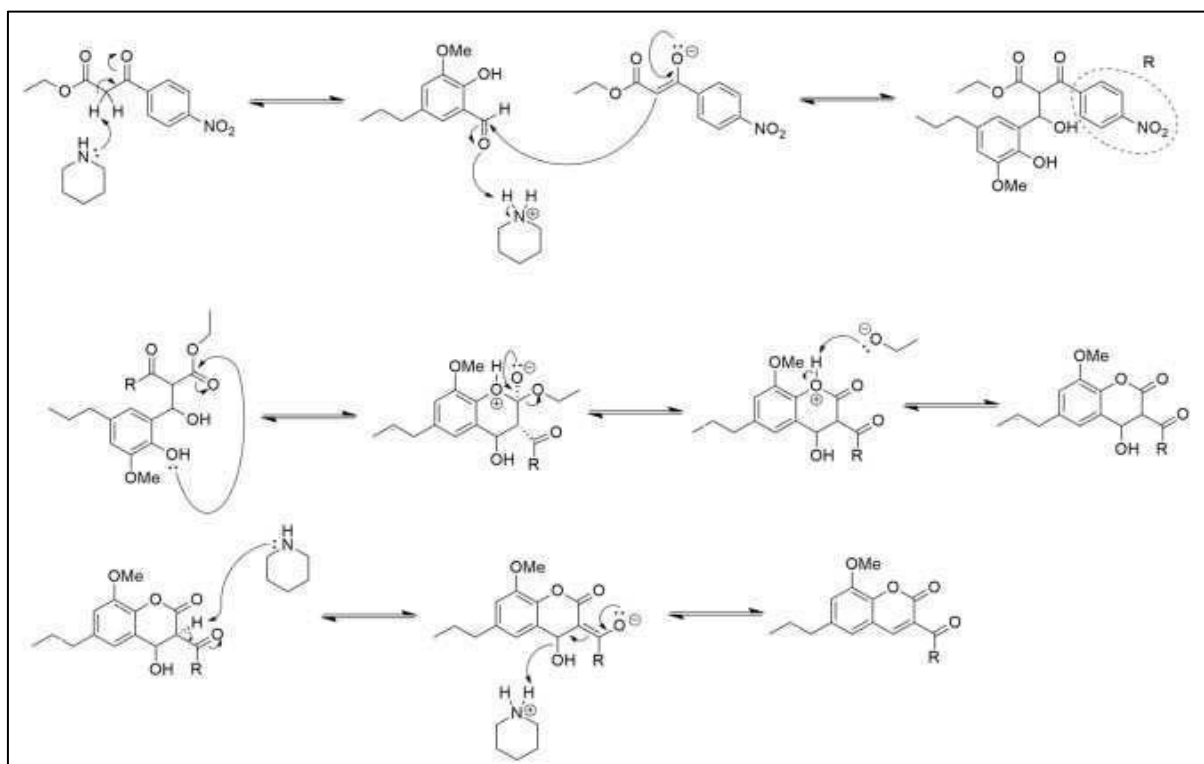
Nota: Reagentes e condições: (i) (1) hexamina, ácido acético glacial, 125 °C, 6 h; (2) HCl 2 M, 0,5 h; (ii) 4-nitrobenzoilacetato de etila, piperidina, etanol, 24 h.

Figura 11 - Mecanismo proposto para a síntese do formil-diidroeuqenol utilizando o método de Duff.



Fonte: Do autor.

Figura 12 - Mecanismo proposto para a síntese da nitrobenzoilcumarina. Reação de Knoevenagel entre formil-diidroeuqenol e 4-nitrobenzoilacetato de etila.



Fonte: Do autor.

A síntese do formil-diidroeuogenol apresentada na Figura 11 foi realizada utilizando o método de Duff, o qual corresponde a uma formilação aromática empregando hexamina como fonte de carbono. A reação requer a presença de substituintes doadores de elétrons ligados ao anel aromático, como por exemplo, um fenol, sendo que a formilação ocorre preferencialmente na posição *orto* a este doador (Karade *et al.*, 2007). No mecanismo proposto, ocorre a protonação da hexamina na presença do ácido acético, levando à formação do íon imínio. Posteriormente ocorre a adição ao anel aromático, seguida de uma reação redox intramolecular, conduzindo o carbono benzílico a um aldeído. Em seguida, a hidrólise ácida catalisada pela adição de ácido clorídrico ao meio reacional proporciona a formação do formil-diidroeuogenol. Esta etapa da síntese da nitrobenzoilcumarina apresentou rendimento de 70,71 %.

A segunda etapa da reação para obtenção da nitrobenzoilcumarina, a qual foi apresentada na Figura 12, corresponde à reação de Knoevenagel entre formil-diidroeuogenol e o reagente 4-nitrobenzoilacetato de etila. No mecanismo proposto, a reação inicia-se com a abstração do hidrogênio metilênico pela piperidina, resultando na formação do enolato nucleofílico que ataca a carbonila do benzaldeído presente no formil-diidroeuogenol. Posteriormente, ocorre o ataque nucleofílico do fenol à carbonila do β -ceto-éster, havendo a liberação do íon etóxido, responsável por abstrair o hidrogênio e estabilizar o composto. Em seguida, a piperidina retira o hidrogênio do carbono assimétrico, levando a uma posterior desidratação e formação da nitrobenzoilcumarina. Objetivando aumentar a pureza do produto final, o material resultante foi transferido para um frasco e foi dissolvido em volume reduzido de etanol à temperatura de 80 °C. Posteriormente, a solução foi resfriada lentamente até a temperatura ambiente. O precipitado foi filtrado e lavado com etanol resfriado. O procedimento foi repetido por mais 2 vezes, sendo verificado um rendimento de 83,0 % para essa etapa da reação. Sendo assim, considerando as duas etapas realizadas para obtenção da nitrobenzoilcumarina, obteve-se um rendimento final de 58,7 % para o procedimento de síntese.

Ao término do processo, o material obtido foi seco em dessecador e caracterizado pelas técnicas de FTIR, RMN, UPLC-MS, UHPLC-HRMS, DSC e TG.

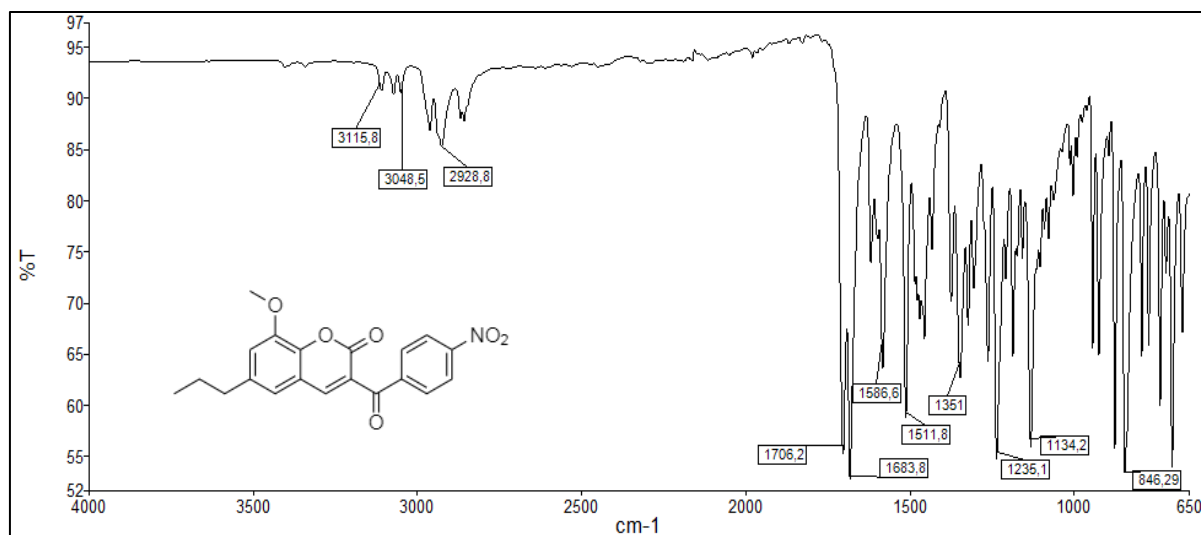
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA CUMARINA

A cumarina alvo deste estudo foi caracterizada pelas técnicas a seguir.

5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O espectro no infravermelho obtido a partir da nitrobenzoilcumarina sintetizada é apresentado na Figura 13. As principais bandas de absorção características da estrutura da molécula estão descritas na Tabela 2.

Figura 13 - Espectro de absorção no infravermelho na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , 32 scans e resolução de 4 cm^{-1} obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.



Fonte: Do autor.

Tabela 2 - Atribuições das bandas do espectro de infravermelho aos grupos correspondentes na molécula da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.

Número de onda (cm^{-1})	Intensidade	Atribuição
3115,8	Média	Estiramento C-H sp^2
3048,6	Média	Estiramento C-H sp^2
3000 - 2850	Média	Estiramento C-H sp^3
1706,2	Forte	Estiramento C=O éster
1683,8	Forte	Estiramento C=O cetona
1586,6	Média	Estiramento C=C anel aromático
1511,8	Forte	Estiramento assimétrico grupo nitro
1351	Forte	Estiramento simétrico grupo nitro
1235,1 e 1134,2	Forte	Estiramento C-O éter fenilalquílico
846,29	Forte	Dobramento C-H fora do plano do anel

Fonte: Do autor.

As atribuições apresentadas acima foram realizadas considerando a região de absorção, o formato e a intensidade das bandas, em comparação com dados de literatura tabelados para os respectivos grupos funcionais (Pavia *et al.*, 2013). Dessa forma, pode-se inferir que o espectro obtido é condizente com a estrutura química da nitrobenzoilcumarina.

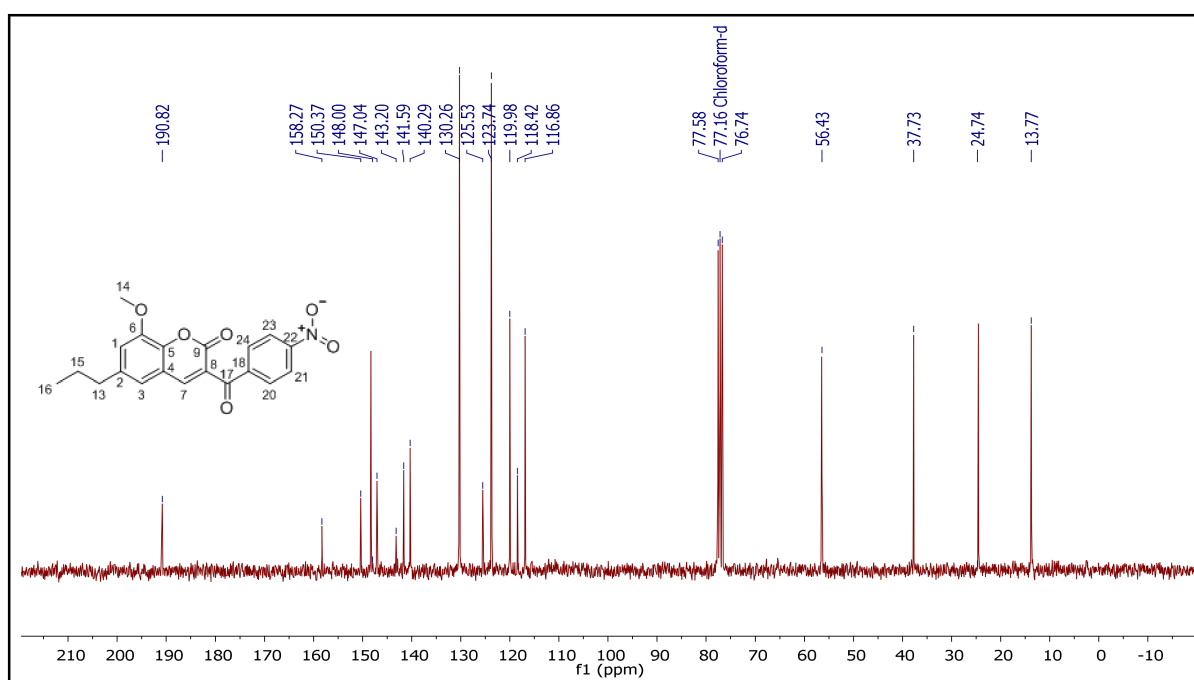
5.2.2 Ressonância magnética nuclear

Os resultados dos experimentos de RMN estão descritos abaixo.

5.2.2.1 Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 da nitrobenzoilcumarina foram obtidos operando o espectrômetro a 75 MHz, sendo apresentados, respectivamente, nas Figura 14 e 15.

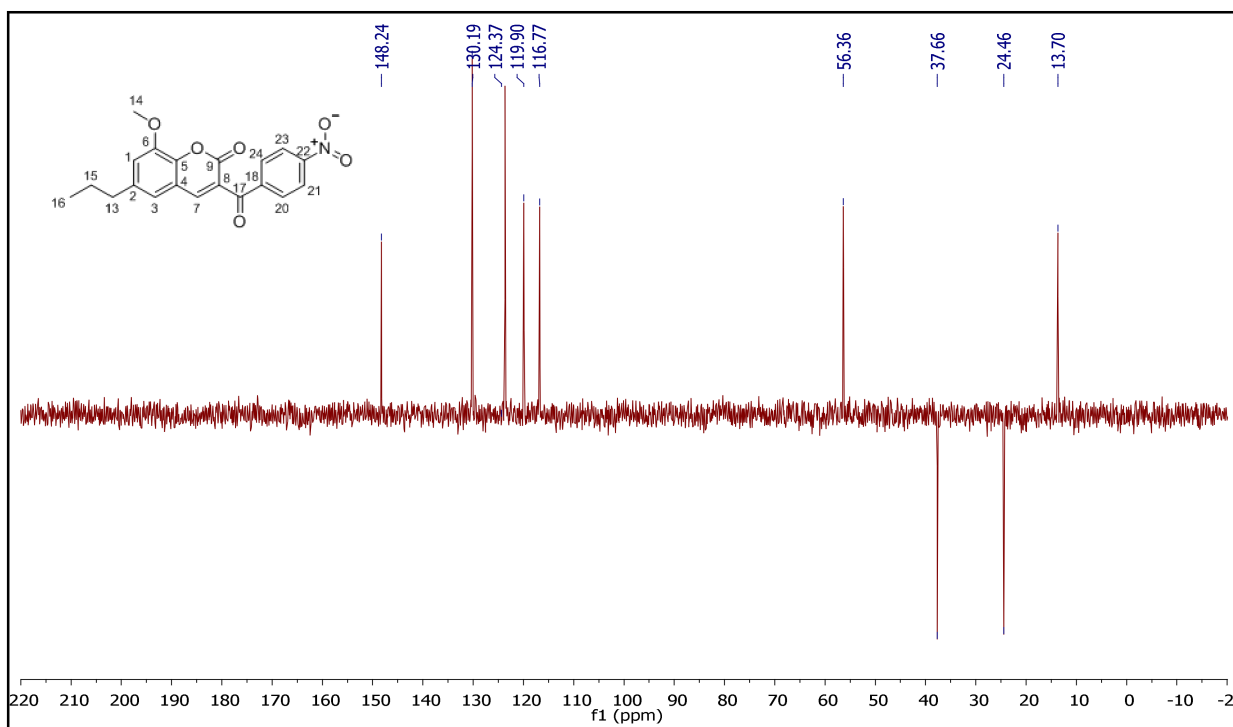
Figura 14 - Espectro de RMN de ^{13}C obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.



Fonte: Do autor.

Nota: RMN ^{13}C (δ ppm, CDCl_3 , 75 MHz): 13,77; 24,74; 37,73; 56,43; 116,86; 118,42; 119,98; 123,74; 125,53; 130,26; 140,29; 141,59; 143,20; 147,04; 148,00; 150,37; 158,27; 190,82.

Figura 15 - Subespectro DEPT-135 obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.



Fonte: Do autor.

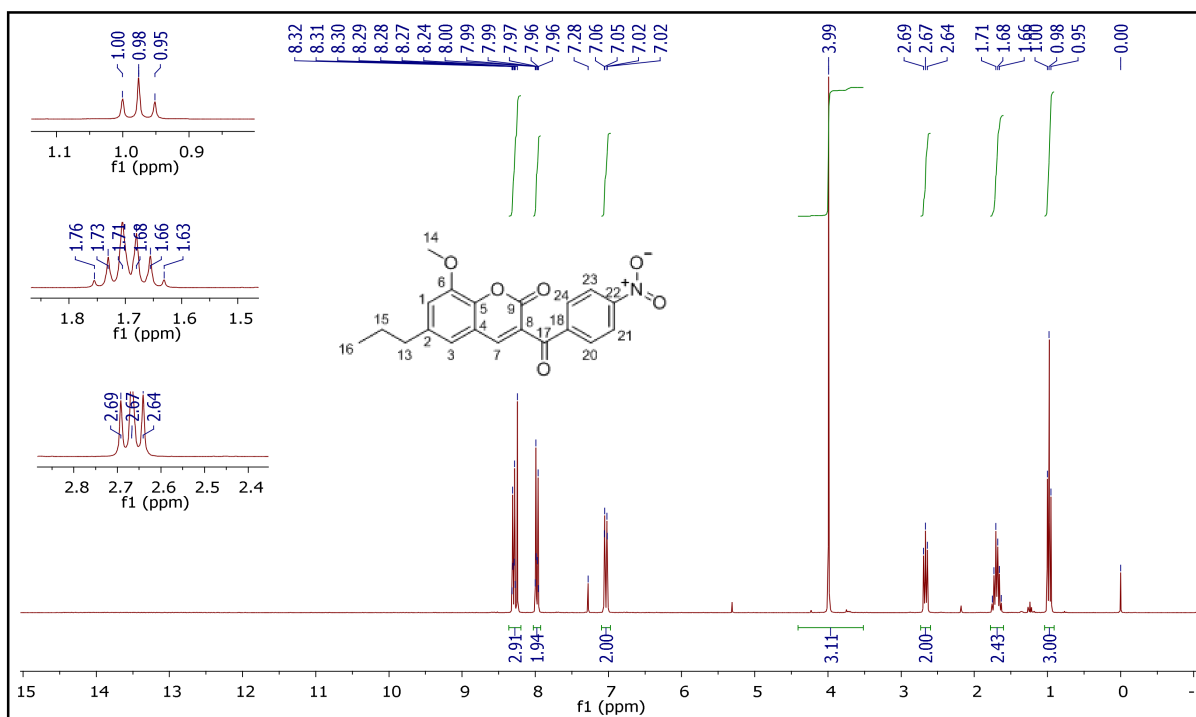
Percebe-se nas figuras acima que os carbonos referentes às carbonilas, identificados como C17 e C9 apresentaram deslocamentos químicos em δ 190,82 ppm e 158,27 ppm, respectivamente. Os carbonos metílicos C16 e C14 aparecem, respectivamente, em δ 13,77 ppm e 56,43 ppm. O carbono metilênico C15 apresentou deslocamento químico em δ 24,74 ppm e o carbono C13 foi verificado em δ 37,73 ppm. As atribuições foram feitas com base nos espectros de ^{13}C e subespectro DEPT-135.

Além das atribuições realizadas, evidencia-se no espectro de ^{13}C a presença de outros 12 sinais com deslocamentos químicos na região correspondente à presença de carbonos aromáticos. Além disso, observa-se no subespectro DEPT-135 que, destes sinais, 5 correspondem a carbonos monoidrogenados. Sendo assim, o número de sinais observados foi condizente com a quantidade de carbonos presentes na molécula da nitrobenzoilcumarina, estando os deslocamentos químicos em conformidade com os valores esperados e concordando com a estrutura química da cumarina alvo deste estudo (Pavia *et al.* 2013; Brancaglion *et al.*, 2018).

5.2.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

O espectro de RMN de ^1H , obtido operando o espectrômetro a 300 MHz, é apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H e extensões obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoi)-6-propil-2H-croman-2-ona.



Fonte: Do autor.

Nota: RMN ^1H (δ ppm, CDCl_3 , 300 MHz): 0,98 (t, $J_{\text{H}_{16}, \text{H}_{15}} = 7,33$ Hz, 3H); 1,70 (sex, $J_{\text{H}_{15}, \text{H}_{16}} = 7,33$ Hz; $J_{\text{H}_{15}, \text{H}_{13}} = 7,61$ Hz, 2H); 2,67 (t, $J_{\text{H}_{13}, \text{H}_{15}} = 7,61$ Hz, 2H); 3,99 (s, 3H, H_{14}); 7,04 (dd, $J = 1,68$ Hz; $J = 10,84$ Hz, 2H); 8,00–7,96 (m, 2H); 8,32–8,24 (m, 3H).

O sinal correspondente a um tripeto centrado em δ 0,98 ppm corresponde aos hidrogênios metila presentes na posição 16, os quais foram integrados para 3 prótons. Já os hidrogênios metila da posição 14 apresentaram-se na forma de um simpleto em δ 3,99 ppm, dando integral para 3 prótons. O sinal correspondente a um sexteto em δ 1,70 ppm foi atribuído aos hidrogênios metilênicos assinalados como 15, apresentando integral para 2 prótons. Já o tripeto em δ 2,67 ppm corresponde aos hidrogênios metilênicos da posição 13, os quais apresentaram integração para 2 prótons.

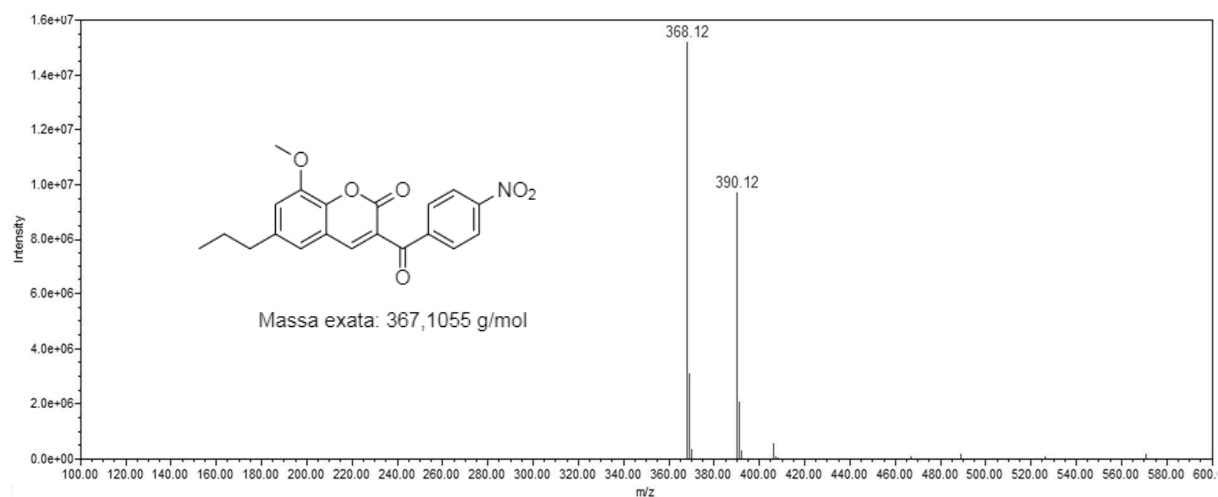
Além das atribuições realizadas, evidencia-se no espectro de ^1H , na região correspondente a hidrogênios aromáticos, a presença de sinais equivalentes a 7 prótons, conforme esperado para a molécula da nitrobenzoilcumarina. Sendo assim, a integração dos

sinais observados foi condizente com a quantidade de hidrogênios presentes na molécula da cumarina alvo deste trabalho. Além disso, os deslocamentos químicos e multiplicidades estão em conformidade com os valores esperados (Pavia *et al.* 2013; Brancaglion *et al.*, 2018).

5.2.3 Espectrometria de massas

Na caracterização da nitrobenzoilcumarina por espectrometria de massas de baixa resolução, foi preparada uma solução do analito na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ em uma mistura de água, metanol e *N,N*-dimetilformamida na razão de 16:48:36 (v/v). A solução foi injetada no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas utilizando o método cromatográfico descrito no item 4.4.3. Foi utilizada uma fonte de ionização por *electrospray*, realizando a varredura da amostra nos modos negativo e positivo. Este último apresentou-se mais adequado à análise. O espectro obtido é apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Espectro de massas de baixa resolução obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoi)-6-propil-2H-croman-2-ona. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.

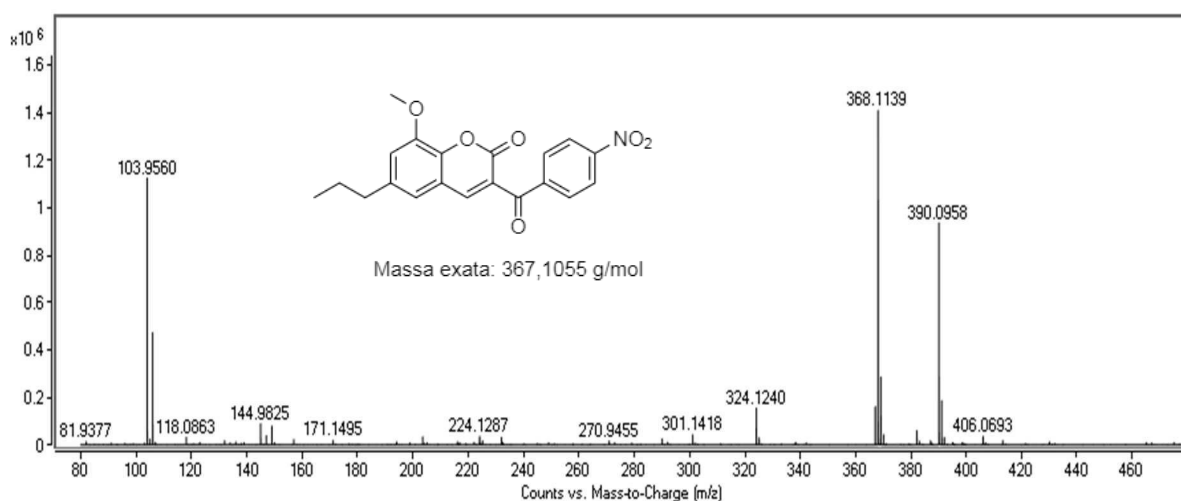


Fonte: Do autor.

No espectro da nitrobenzoilcumarina por espectrometria de massas de baixa resolução foram evidenciadas as presenças dos íons de relação massa/carga (m/z) 368,12 e 390,12. Tais sinais estão em concordância com a estrutura da molécula, representando, respectivamente, a cumarina protonada $[M+H]^+$ e seu aduto de sódio $[M+Na]^+$.

Já na caracterização estrutural da nitrobenzoilcumarina utilizando a técnica de espectrometria de massas de alta resolução, foi preparada uma solução do analito na concentração de 10 ppm utilizando metanol como solvente, a qual foi injetada no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas segundo as condições descritas no item 4.4.4. O espectro de massas obtido utilizando o modo de ionização positivo é apresentado na Figura 18.

Figura 18 - Espectro de massas de alta resolução obtido para a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min⁻¹, nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s⁻¹.



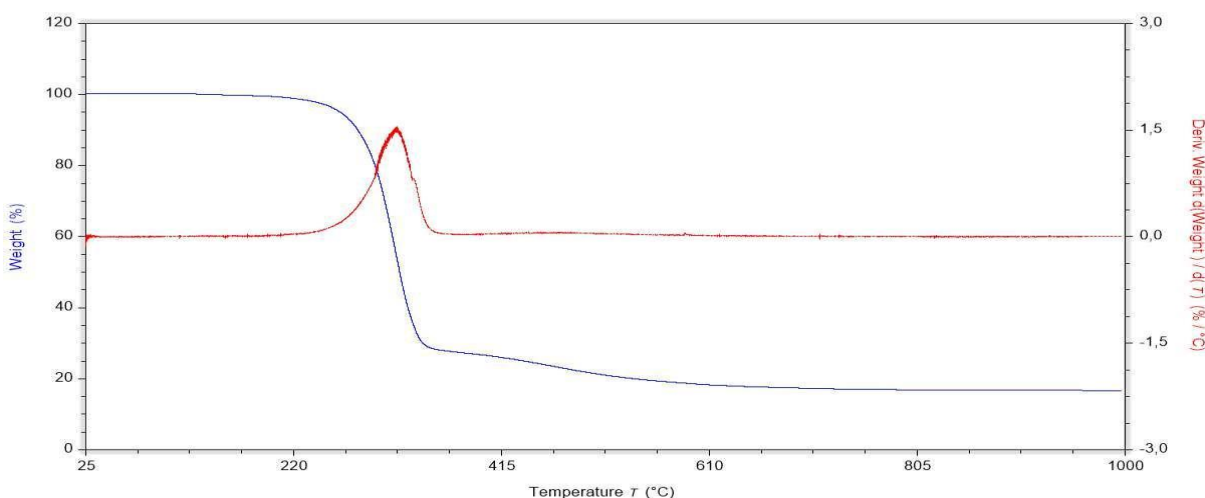
Fonte: Do autor.

Observa-se no espectro de massas de alta resolução a presença dos íons de relação massa/carga 368,1139 e 390,0958, os quais estão em conformidade com a estrutura química da nitrobenzoilcumarina $[M+H]^+$ e de seu aduto de sódio $[M+Na]^+$. Tais sinais apresentam, respectivamente, erros de massa de 2,7166 ppm e 1,0254 ppm, estando dentro do critério de aceitação de 5 ppm preconizados pela FDA para identificação de espécies químicas utilizando a técnica de espectrometria de massas (Food and Drug Administration, 2015). Os resultados obtidos corroboram aqueles verificados por espectrometria de massas de baixa resolução, RMN e FTIR e confirmam a síntese da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.

5.2.4. Análise térmica

A curva TG e sua derivada (DTG) obtidas para a nitrobenzoilcumarina em atmosfera inerte de nitrogênio, segundo as condições instrumentais descritas no item 4.4.5, são apresentadas na Figura 19.

Figura 19 - Curvas térmicas TG e DTG na faixa de 25 °C a 1000 °C. Razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 60 mL.min⁻¹.

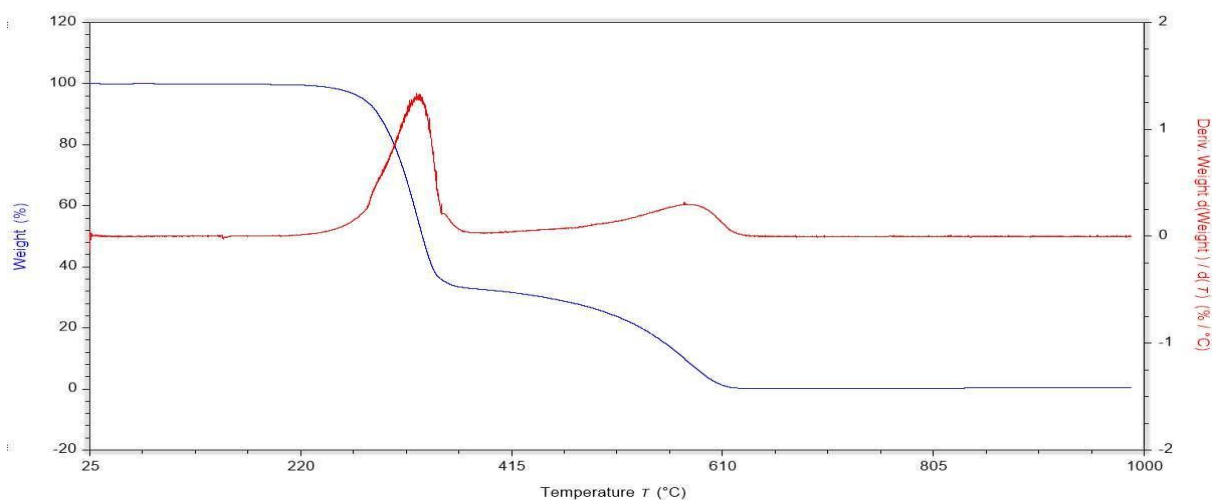


Fonte: Do autor.

Na faixa de temperatura entre 25 °C e 180 °C foi verificada uma perda de massa equivalente a 0,55 %. Esse evento é atribuído à presença de água e solventes residuais presentes na nitrobenzoilcumarina sintetizada. Entre 220 °C e 380 °C evidencia-se o segundo evento de perda de massa, correspondente à degradação térmica do analito. Essa degradação também é verificada na faixa entre 380 °C a 800 °C, entretanto, de forma menos acentuada. Já entre 800 °C e 1000 °C é verificada a estabilização da perda de massa da nitrobenzoilcumarina, sendo evidenciado um resíduo equivalente a 16,3 %.

Uma vez que a amostra mantida à temperatura de 1000 °C até peso constante apresentou um resíduo relativamente alto, a análise foi repetida em atmosfera de ar sintético, conforme recomendado pela norma ASTM E1131-08 para determinação de impurezas inorgânicas presentes em amostras analisadas pela técnica de termogravimetria. As curvas TG e DTG obtidas são apresentadas na Figura 20.

Figura 20 - Curvas térmicas TG e DTG na faixa de 25 °C a 1000 °C. Razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em atmosfera de ar sintético com fluxo de 60 mL.min⁻¹.

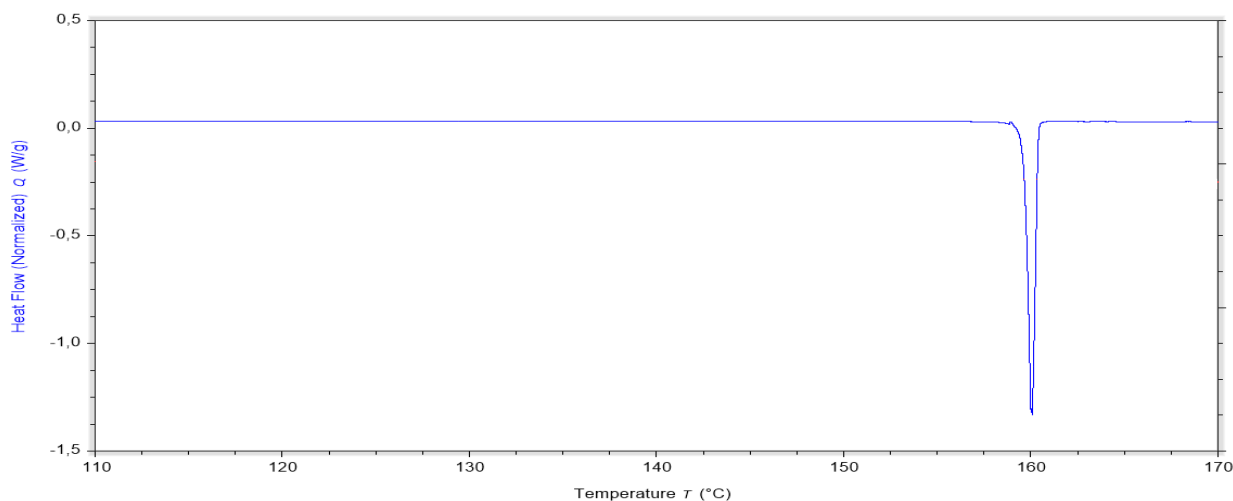


Fonte: Do autor.

Nesta condição, foram evidenciados eventos de perda de massa em temperaturas semelhantes aos verificados em atmosfera inerte de nitrogênio. Entretanto, devido a utilização de ar sintético ocasionando a oxidação do material orgânico remanescente, foi evidenciado um resíduo 0,066 % na amostra mantida a 1000 °C até peso constante. Tal resultado é atribuído à presença de impurezas inorgânicas presentes na nitrobenzoilcumarina.

A curva DSC obtida para a molécula sintetizada é apresentada na Figura 21.

Figura 21 - Curva DSC na faixa de 100 °C a 170 °C. Razão de aquecimento de 0,5 °C.min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹.



Fonte: Do autor.

Foi evidenciado que o evento endotérmico correspondente à fusão da nitrobenzoilcumarina inicia-se em 160,08 °C (*onset*), apresentando temperatura de pico de 160,19 °C e *endset* de 160,39 °C. Além disso, foi determinada para o evento uma entalpia de fusão correspondente a 79,854 J/g. Observa-se que a temperatura de fusão determinada para a nitrobenzoilcumarina neste trabalho diverge significativamente do valor descrito por Brancaglioni *et al.* (2018) (143 °C a 144 °C). Tal diferença pode ser atribuída às condições de análise empregadas pela técnica de calorimetria exploratória diferencial, como por exemplo, a atmosfera de nitrogênio, divergindo substancialmente do equipamento de ponto de fusão convencional.

Uma vez que a nitrobenzoilcumarina apresentou pico de fusão definido e demonstrou ser termoestável na sua faixa de fusão, a técnica de DSC foi utilizada para determinação da pureza do material sintetizado. Foi empregada a metodologia descrita na norma ASTM E928-19, a qual prevê a avaliação da pureza de compostos por meio de uma análise do pico de fusão obtido. Para isso é utilizada a lei de depreciação do ponto de fusão de Van't Hoff, ocasionada pela presença de impurezas no material analisado, a qual é representada pela fórmula abaixo, sendo: T_s a temperatura de fusão observada da amostra, T_0 a temperatura de fusão da amostra pura, R a constante de gases ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), X é a fração molar de impurezas presentes no material analisado, ΔH é o calor de fusão da amostra pura e F é a fração de material fundido, o qual é determinado através das áreas parciais do pico de fusão experimental.

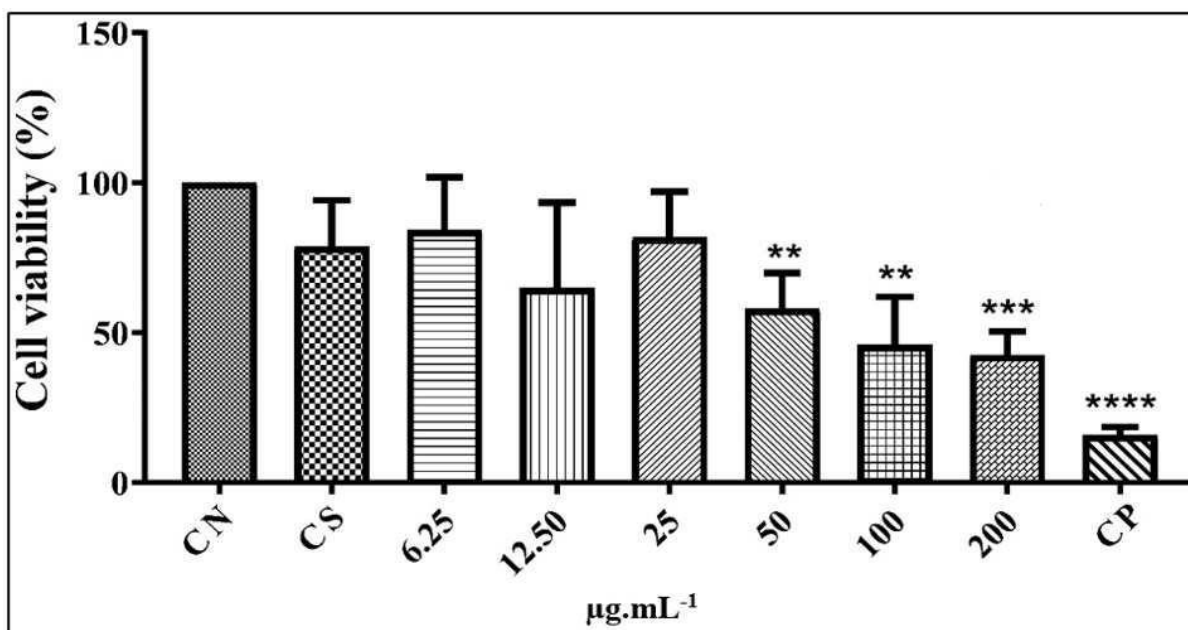
$$T_s = T_0 - RT_0^2 X / \Delta H * 1/F \quad (2)$$

As análises foram realizadas empregando o software TRIOS, versão 5.4.0.300, utilizando 50 áreas parciais do pico de fusão e sendo o valor da altura de corte da primeira área parcial de 0,01 %. Os resultados evidenciaram que a nitrobenzoilcumarina possuía pureza de 99,80 %, demonstrando que o material sintetizado estava apto a ser utilizado nos demais ensaios deste trabalho.

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA NITROBENZOILCUMARINA

Os ensaios de citotoxicidade envolvendo a nitrobenzoilcumarina foram realizados conforme metodologia descrita no item 4.9. A Figura 22 apresenta os resultados de citotoxicidade obtidos após o tratamento das células V79 com diferentes concentrações da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona.

Figura 22 - Viabilidade celular após 24 horas de exposição da linhagem V79 a diferentes concentrações da nitrobenzoilcumarina.



Fonte: Do autor.

Nota: Resultados apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. A proliferação celular foi mensurada pelo ensaio colorimétrico por MTT e a comparação de médias foi realizada de acordo com a análise de variância one-way ANOVA e pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). V79 – linhagem de fibroblastos de pulmão de hamster chinês, CN – controle negativo, CS – controle solvente (DMSO 1%), CP – controle positivo (DMSO 25%).

Conforme mostrado na figura acima, os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significativas a partir da concentração de 50 ug.mL^{-1} , quando comparadas ao controle negativo (sem tratamento), sendo evidenciada citotoxicidade dose-dependente acima desse valor. Baseado nos resultados obtidos, foi calculada a IC₅₀ de $87,79 \pm 8,49 \text{ ug.mL}^{-1}$, o que equivale ao valor de $238,98 \text{ }\mu\text{M} \pm 23,11 \text{ }\mu\text{M}$, considerando a massa molar da molécula.

Os resultados de citotoxicidade obtidos neste trabalho foram semelhantes aos reportados por Brancaglioni *et al.* (2018) e De Figueiredo Peloso *et al.* (2020) para a nitrobenzoilcumarina, embora, em ambos os casos, tenham sido empregadas linhagens celulares distintas nos ensaios realizados. No primeiro estudo, os autores concluíram que a nitrobenzoilcumarina apresentava valor de IC₅₀ superior a $200 \text{ }\mu\text{M}$, de forma semelhante ao determinado para o benznidazol, utilizado como fármaco referência. Já nos ensaios reportados por De Figueiredo Peloso *et al.* (2020), foi calculada a IC₅₀ de $231,0 \text{ }\mu\text{M}$ e $270,5 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente, para a nitrobenzoilcumarina e o fármaco anfotericina B, o qual foi usado como referência.

Desta forma, evidencia-se que os resultados de citotoxicidade obtidos para nitrobenzoilcumarina neste trabalho são semelhantes aos já reportados em estudos anteriores.

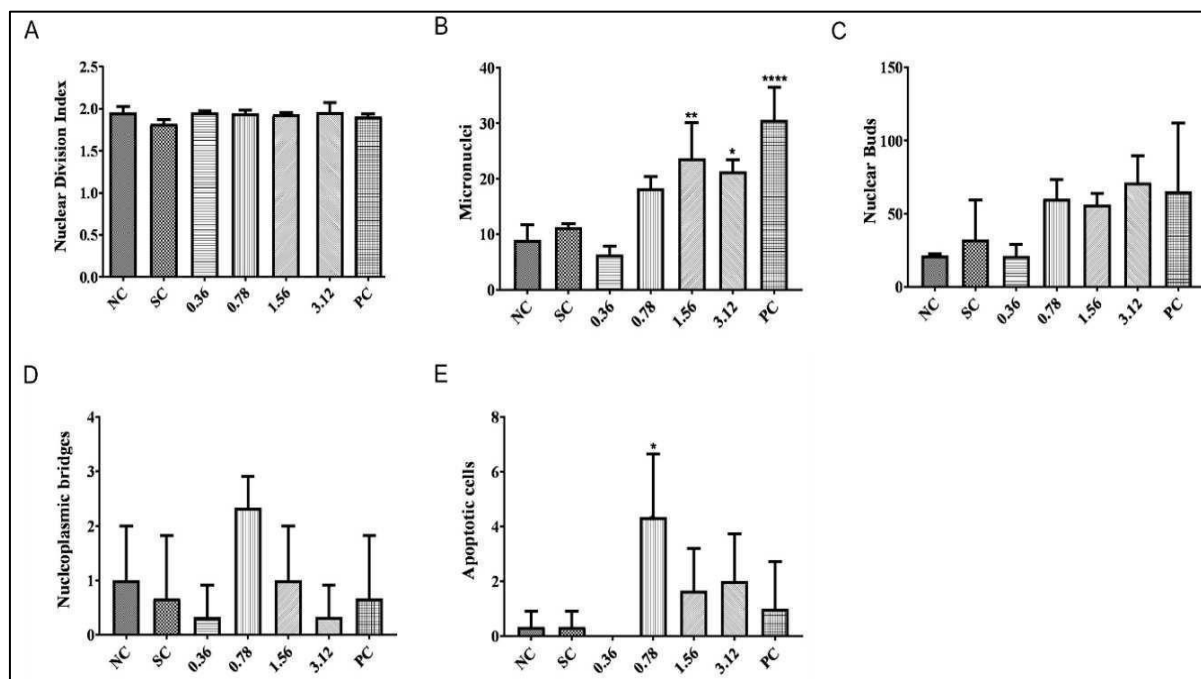
Além disso, tais valores assemelham-se aos relatados para fármacos comercialmente disponíveis para o tratamento da doença de Chagas e leishmaniose. Tal fato reforça o potencial terapêutico da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona como uma promissora molécula a ser empregada no combate a essas doenças ou como um futuro protótipo para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico.

5.4 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA NITROBENZOILCUMARINA

A avaliação da segurança genotoxicológica de substâncias inovadoras, seja em etapas iniciais de desenvolvimento ou após serem sintetizadas, possui papel relevante ao evitar a exposição humana e ambiental a agentes químicos e/ou biológicos nocivos à saúde. Em função disso, órgãos que atuam no controle sanitário de serviços e produtos de diversos países, tais como a FDA, EMA e ANVISA, estabelecem a obrigatoriedade da realização de testes objetivando comprovar a segurança de compostos químicos ao material genético antes de serem lançados no mercado químico e farmacêutico. Tal preocupação é primordial, uma vez que a formação de sítios de instabilidade genética, mutações e alterações epigenéticas, como resultado de exposição aguda ou crônica, pode levar a graves consequências para a saúde humana, incluindo uma grande variedade de doenças, tais como o câncer (Ren *et al.*, 2017).

Os eventos de instabilidade genética observados na avaliação da genotoxicidade da cumarina alvo deste trabalho foram realizados conforme metodologia descrita no item 4.10 e os resultados obtidos são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Eventos de genotoxicidade apresentados pelas células V79 após exposição à nitrobenzoilcumarina por 3 horas.



Fonte: Do autor.

Nota: Frequência média determinada através da contagem de 1000 células por cultura. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Eixo y: número de eventos. Eixo x: concentração em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Comparação de médias através de análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). V79 – linhagem de fibroblastos de pulmão de hamster chinês, NC – controle negativo, SC – controle solvente (DMSO 0,5 %), PC – controle positivo (Doxorrubicina 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); (A): Índice de divisão nuclear; (B): Frequência de micronúcleos; (C): Frequência de brotos nucleares; (D): Frequência de pontes nucleoplasmáticas; (E): Frequência de células apoptóticas.

Na Figura 23A são apresentados os resultados obtidos para o ensaio de índice de divisão nuclear (IDN). Não foram evidenciadas diferenças significativas para este parâmetro entre as diferentes concentrações testadas da nitrobenzoilcumarina. Tal resultado indica ausência de efeito citostático em todas as concentrações testadas, o que assegura que as células sofreram mitose e que foram submetidas a tratamentos em níveis adequados de citotoxicidade (OCDE, 2016). Destaca-se que embora a doxorrubicina tenha sido utilizada como controle positivo, a concentração empregada no ensaio não apresentou efeito citostático, estando adequada para ser utilizada na avaliação de mutagenicidade pelo teste de micronúcleo.

Eventos genotóxicos podem ocorrer a partir de interações diretas ou indiretas de substâncias com o material genético, as quais são capazes de influenciar, de forma positiva ou negativa, na proliferação celular. (Kirsch-Volders *et al.*, 2011). Os micronúcleos têm origem em fragmentos de cromossomos ou cromátídeos acêntricos. Além disso, podem ser formados por cromossomos inteiros que são liberados no interior das células filhas após telófase

(Decordier; Kirsch-Volders, 2006; Fenech *et al.*, 2011). Os dois primeiros casos podem ocorrer devido à reparação incorreta de quebras na fita de DNA, tais como troca de cromossomos, fragmentação, defeitos em enzimas de reparação, excisão errada de bases nitrogenadas, entre outros eventos. Já a ocorrência de cromossomos mal segregados pode estar relacionada à disfunção de ligação das proteínas cinetocóricas ao DNA durante a formação do fuso mitótico (Fenech *et al.*, 2011).

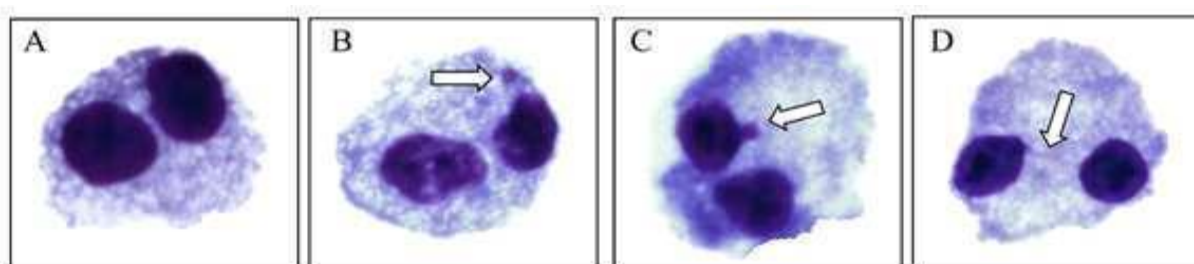
A nitrobenzoilcumarina pode induzir a formação de micronúcleos por diversos mecanismos genotóxicos, sendo possível identificar os alvos e natureza dessas interações através de técnicas de hibridização fluorescente *in situ* ou marcando cinetócoros com substâncias imunoquímicas (OECD, 2016). Como biomarcador de instabilidade genética, os micronúcleos estão associados a eventos de clastogênese (quebra de DNA) ou aneugênese (perda de cromossomos) que podem ser vistos em células interfásicas. Estes danos celulares podem ser transmitidos às células filhas na mitose, podendo ser incompatíveis com a sobrevivência celular (OECD, 2016). A Figura 23B evidencia um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos nos tratamentos com concentrações superiores a $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da nitrobenzoilcumarina, quando comparado aos controles negativo e positivo, sendo observada uma correlação dose-resposta de genotoxicidade.

As frequências de outros biomarcadores de instabilidade genética, tais como brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas, são ilustradas nas Figuras 23C e 23D, respectivamente. Embora os eventos analisados não tenham apresentado significância estatística, sua avaliação é relevante, uma vez que a presença de brotos nucleares está associada à eliminação de amplificação cromossômica do material genético, presença de complexos de reparo de DNA e excesso de cromossomos por células aneuploides. Já o aumento da frequência de pontes nucleoplasmáticas em células binucleadas pode indicar correlação com eventos de reparo incorretos, do inglês, *mismatch*, e/ou fusões finais teloméricas (Fenech *et al.*, 2011). Os resultados obtidos sugerem que a nitrobenzoilcumarina não apresenta efeitos associados a esses eventos de genotoxicidade, os quais podem ser considerados nos estudos realizados como achados biológicos aleatórios.

A frequência de células apoptóticas, como biomarcador de citotoxicidade, é apresentada na Figura 23E. Os eventos de morte celular detectados nos estudos não apresentaram significância estatística. Dessa forma, não é possível relacioná-los à exposição à nitrobenzoilcumarina.

A Figura 24 apresenta os biomarcadores de instabilidade genética evidenciados durante os ensaios.

Figura 24 - Biomarcadores de instabilidade genética observados no ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese após exposição das células V79 à nitrobenzoilcumarina por 3 horas.



Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Célula binucleada sem anormalidades, (B) Célula binucleada micronucleada, (C) Brotos nucleares e (D) Pontes nucleoplasmáticas.

Os estudos realizados demonstraram que a nitrobenzoilcumarina apresentou efeitos genotóxicos somente nas duas maiores concentrações utilizadas no ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que o derivado cumarínico apresenta baixa citotoxicidade e efeito genotóxico somente em concentrações mais altas, podendo ser considerado genotoxicologicamente seguro em baixas concentrações.

Diversos estudos descritos na literatura sugerem que os fármacos benznidazol e nifurtimox, utilizados no combate à doença de Chagas, apresentam efeito mutagênico. Buschini *et al.* (2009) verificaram através do ensaio cometa que ambos os fármacos são capazes de provocar danos ao DNA em concentrações plasmáticas usualmente encontradas em pacientes. Além disso, os autores evidenciaram que os fármacos interagem com o DNA de células de mamíferos, induzindo a formação de micronúcleos. Resultados semelhantes foram obtidos por Santos; Takahashi e Natarajan (1994). Além disso, o fármaco benznidazol faz parte do banco de dados da EPA (*United States Environmental Protection Agency*), a qual apresenta resultados positivos de mutagenicidade para o fármaco, obtidos através do teste de Ames e micronúcleo (*United States Environmental Protection Agency*, 2024).

Embora diversos estudos indiquem o potencial mutagênico dos fármacos disponíveis comercialmente para o tratamento da doença de Chagas e leishmaniose, evidencia-se a ausência de padronização entre os experimentos, tais como, concentração das substâncias analisadas, tempo de exposição aos analitos e modelo celular empregado. Sendo assim, um paralelo entre esses resultados com os obtidos para a nitrobenzoilcumarina perde relevância, não permitindo uma comparação assertiva.

De modo geral, os estudos realizados por Brancaglioni *et al.* (2018) e De Figueiredo Peloso *et al.* (2020) evidenciaram o potencial tripanocida e leishmanicida da

nitrobenzoilcumarina. Além disso, demonstraram a baixa citotoxicidade da molécula frente a células de mamíferos, o que foi confirmado no presente estudo. Adicionalmente, a verificação da segurança mutagênica da nitrobenzoilcumarina em baixas concentrações foi demonstrada por este trabalho. Sendo assim, os ensaios realizados até o momento com a nitrobenzoilcumarina demonstram o potencial da molécula como um promissor candidato a protótipo de fármaco para tratamento da Doença de Chagas e leishmaniose.

5.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR HPLC PARA ANÁLISE DA NITROBENZOILCUMARINA E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, conforme condições descritas no item 4.5, para quantificação da nitrobenzoilcumarina e seus possíveis produtos de degradação. O método foi utilizado para verificar a pureza cromatográfica da cumarina sintetizada e avaliar sua estabilidade intrínseca. Além disso, foi empregado para verificar o perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta às condições de estabilidade acelerada.

Optou-se por utilizar como fase móvel uma mistura de água e metanol, uma vez que a nitrobenzoilcumarina não apresenta grupos ionizáveis, dispensando o uso de soluções tamponantes. Inicialmente foi utilizado um fluxo de $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e fase móvel composta por uma mistura de água ultrapurificada e metanol na razão 40:60 (v/v). Entretanto, a nitrobenzoilcumarina apresentou um fator de retenção elevado, indicando grande interação com a coluna cromatográfica e, conseqüentemente, um tempo de retenção relativamente grande, de aproximadamente 18 minutos. Sendo assim, o conteúdo de metanol na fase móvel foi aumentado para 67 % e o fluxo para $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Nestas condições o pico cromatográfico referente à nitrobenzoilcumarina apresentou tempo de retenção de aproximadamente 7 minutos e parâmetros cromatográficos adequados.

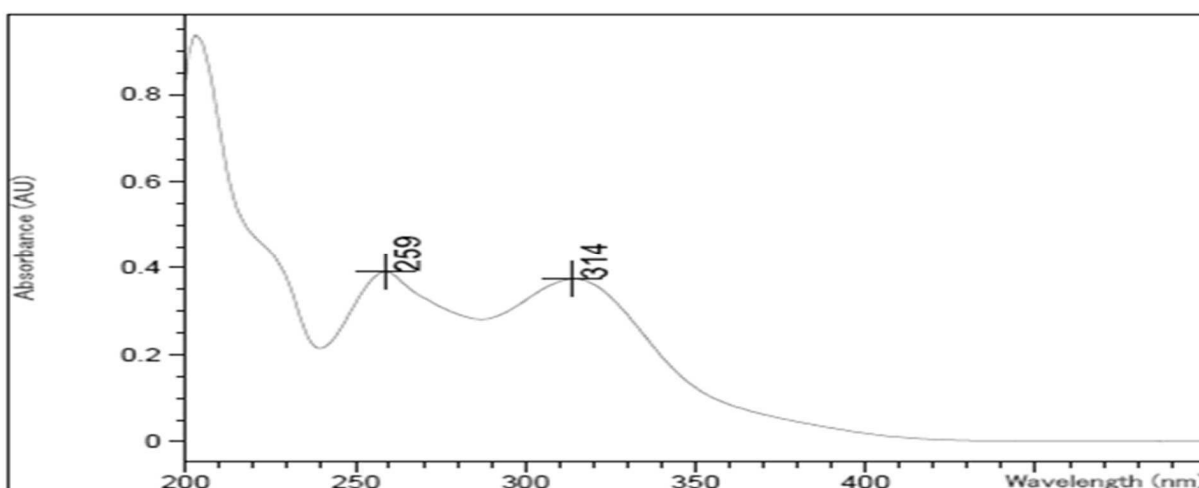
Durante o desenvolvimento do método, foram realizados testes variando a temperatura da coluna cromatográfica. Em função do fluxo relativamente alto ($2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), optou-se por utilizar a temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Dessa forma, a pressão no sistema cromatográfico foi reduzida, permitindo prolongar a vida útil da coluna e obter picos mais simétricos.

O solvente da amostra demonstrou ser um parâmetro crítico para o desenvolvimento do método analítico, uma vez que a nitrobenzoilcumarina apresenta solubilidade relativamente baixa em água e em metanol. Sendo assim, foi adicionada *N,N*-dimetilformamida como co-solvente, permitindo trabalhar com concentrações maiores do analito.

5.5.1 Seleção do comprimento de onda do método analítico para detecção por ultravioleta

Foi desenvolvido um método analítico por HPLC compatível com a detecção dos analitos por ultravioleta e espectrometria de massas. Para determinar o comprimento de onda a ser utilizado, foi preparada uma solução da nitrobenzoilcumarina na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ em metanol e determinado seu espectro de absorbância na faixa de 200 a 600 nm, conforme apresentado na Figura 25.

Figura 25 - Espectro de absorção da nitrobenzoilcumarina na faixa de 200 a 600 nm. Amostra preparada na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ em metanol.

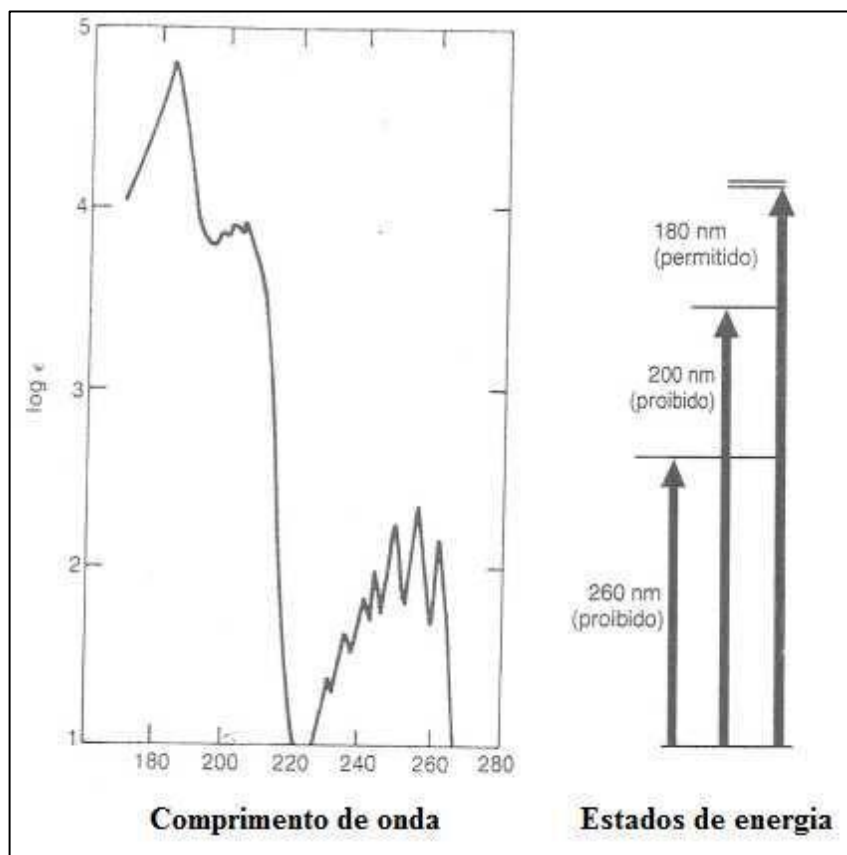


Fonte: Do autor.

O espectro no ultravioleta/visível obtido para a nitrobenzoilcumarina foi condizente com o descrito na literatura para outras moléculas da mesma classe, ou seja, apresentou dois pontos de mínima absorbância em aproximadamente 244 nm e 300 nm e dois pontos de máxima absorção em aproximadamente 260 nm e 315 nm (Ganguly; Bagchi, 1956). Além disso, evidenciou-se um ponto de máxima absorção em aproximadamente 200 nm.

Uma vez que o método desenvolvido objetivou quantificar a nitrobenzoilcumarina e seus produtos de degradação, tornou-se necessário a seleção de um comprimento de onda para o método que fosse adequado para estas duas finalidades. Considerando que os possíveis produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina possivelmente sempre apresentarão anel aromático em suas estruturas, o espectro de absorção do benzeno foi avaliado para a seleção do comprimento de onda do método desenvolvido. O espectro de absorção na região do ultravioleta do benzeno e seus possíveis estados de energia são apresentados na Figura 26.

Figura 26 - Espectro de absorção na região do ultravioleta do benzeno e possíveis estados de energia na molécula.



Fonte: Adaptado de Pavia *et al.*, 2013.

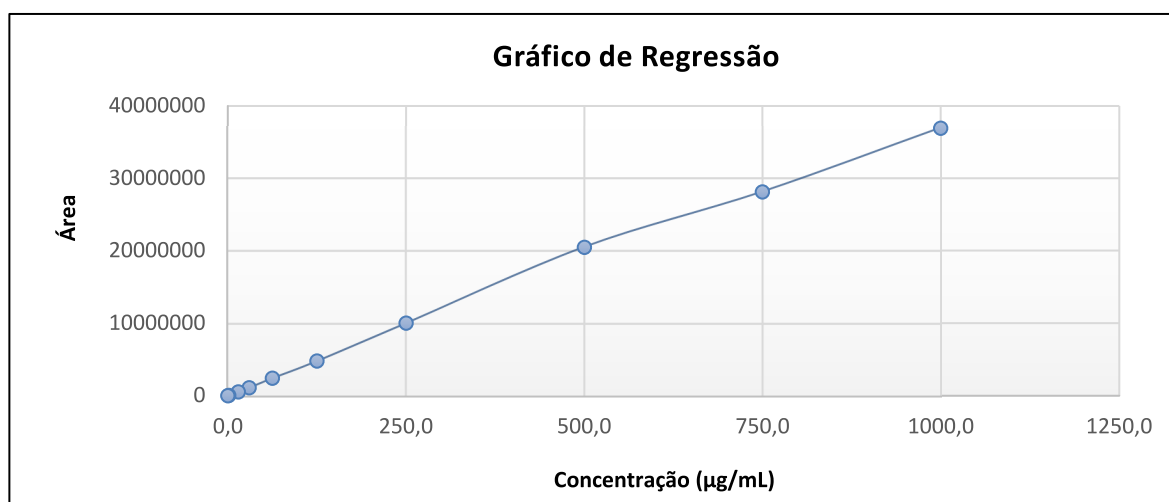
As transições eletrônicas que ocorrem no benzeno são basicamente do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, sendo que seu espectro de absorção no ultravioleta apresenta duas bandas primárias em 180 e 200 nm e uma banda secundária em 260 nm. A banda em 180 nm é a que possui maior absortividade molar (ϵ). Entretanto, normalmente não é observada, pois está fora da faixa de varredura da maioria dos equipamentos disponíveis comercialmente. A banda em 200 nm possui absortividade intermediária, mas encontra-se em uma região onde muitos solventes orgânicos apresentam absorção no ultravioleta, podendo comprometer os ensaios de pureza de pico realizados durante a avaliação do parâmetro de seletividade do método analítico. Já a banda em aproximadamente 260 nm, apesar de ser a mais fraca, está presente tanto no espectro de compostos aromáticos com estruturas mais simples quanto de derivados cumarínicos (Pavia *et al.*, 2013). Sendo assim, optou-se por utilizar o máximo de absorção de 259 nm verificado no espectro da nitrobenzoilcumarina como o comprimento de onda do método desenvolvido por HPLC, permitindo analisar tanto a cumarina quanto seus produtos de degradação.

5.5.2 Determinação da concentração de trabalho do método analítico

O método analítico desenvolvido objetivou quantificar a nitrobenzoilcumarina alvo deste trabalho e seus produtos de degradação, os quais podem estar presentes na amostra em concentrações muito baixas, a nível de traços. Sendo assim, torna-se necessário trabalhar com soluções do analito principal em concentrações adequadas para que o método consiga identificar e quantificar os possíveis produtos de degradação presentes na amostra. Em função disso, optou-se por trabalhar com soluções mais concentradas da nitrobenzoilcumarina, o que só foi possível devido à utilização de *N,N*-dimetilformamida como co-solvente, uma vez que o analito apresenta baixa solubilidade aquosa e em metanol.

Para definição da concentração de trabalho do método, foram preparadas soluções da nitrobenzoilcumarina na faixa de $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diluente, conforme descrito no item 4.5. As respostas do detector foram plotadas contra as respectivas concentrações, conforme mostrado na Figura 27. As análises foram realizadas utilizando um sistema HPLC (*Shimadzu*, Japão) equipado com detector UV, disponível no núcleo de controle de qualidade da UNIFAL-MG.

Figura 27 - Curva de regressão da nitrobenzoilcumarina na faixa de $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diluente.



Fonte: Do autor.

Conforme mostrado no gráfico acima, foi verificada uma aparente redução na inclinação da curva a partir da concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Sendo assim, as curvas de regressão determinadas nas faixas de trabalho entre $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e entre $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram comparadas para definição da concentração de trabalho do método

analítico. As equações das retas, coeficientes de inclinação e determinação de ambas as curvas são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação das curvas de regressão obtidas a partir de soluções da nitrobenzoilcumarina preparadas nas faixas de 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Faixa de trabalho ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Equação da reta	Coefficiente de determinação	Coefficiente de inclinação	Intervalo de confiança da inclinação ($\alpha = 0,05$)
0,15 - 500	$y = 40995x - 107509$	0,9997	40995	40304 - 41686
0,15 - 1000	$y = 37439x + 216394$	0,9979	37439	36023 - 38854

Fonte: Do autor.

A análise estatística apresentada na Tabela 3 demonstra que a inclinação da curva na faixa de 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é estatisticamente menor do que a inclinação na faixa de 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Tal fato é evidenciado pela ausência de interseção dos intervalos de confiança determinados para os coeficientes angulares de ambas as curvas. Além disso, o valor do coeficiente de determinação da reta na faixa de 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é ligeiramente inferior, demonstrando que a partir da concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inicia-se um comprometimento do modelo de regressão linear determinado a partir dos dados obtidos.

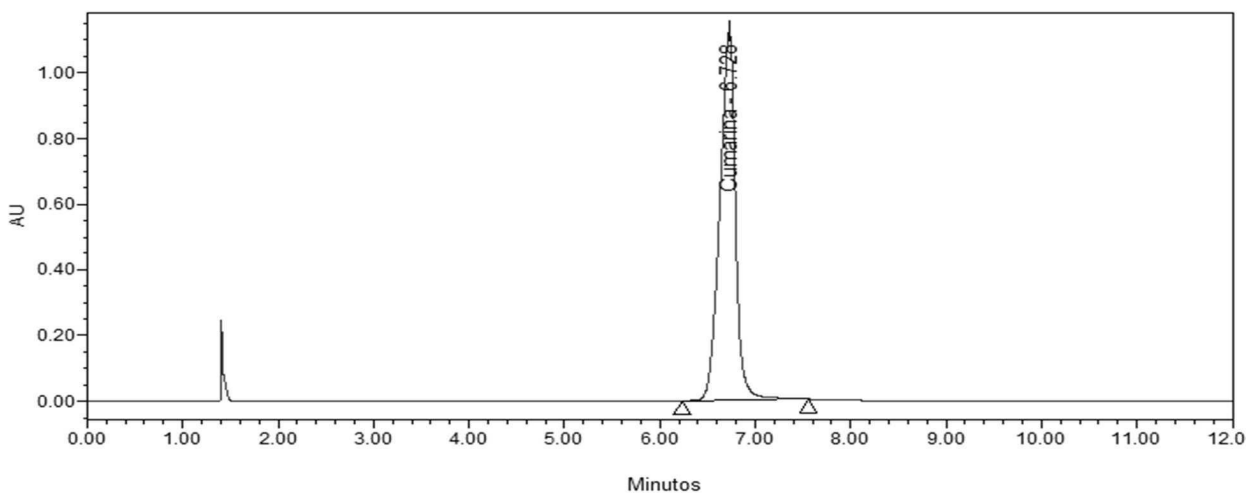
Sendo assim, uma vez que o método desenvolvido objetiva quantificar tanto a nitrobenzoilcumarina quanto seus produtos de degradação, optou-se por trabalhar com a maior concentração possível da cumarina, sem prejudicar a linearidade aparente do método cromatográfico. Dessa forma, o valor de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi definido como a concentração máxima de trabalho do método. Adicionalmente, foi verificado que em concentrações próximas de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ocorre a cristalização da nitrobenzoilcumarina em solução com o passar do tempo, inviabilizando a utilização de concentrações de trabalho maiores para o método desenvolvido.

5.5.3 Parâmetros cromatográficos

Na Figura 28 é apresentado o cromatograma obtido para a solução da nitrobenzoilcumarina preparada na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e injetada no cromatógrafo

conforme método descrito no item 4.5. As análises foram realizadas em um sistema HPLC *Alliance*, modelo 2695 (*Waters, USA*), acoplado com detector UV.

Figura 28 - Cromatograma obtido para a solução da nitrobenzoilcumarina ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$). Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, volume de injeção $20 \mu\text{L}$, fluxo de $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e detecção em 259 nm .



Fonte: Do autor.

Observa-se que a nitrobenzoilcumarina apresentou tempo de retenção de aproximadamente 6,7 minutos. Neste tempo não foram verificados sinais analíticos provenientes do diluente ou fase móvel. Os parâmetros cromatográficos obtidos para a solução amostra são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros cromatográficos da solução amostra ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Picos	Tempo de retenção	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	K'	Pratos teóricos (USP)	Assimetria (USP)
Cumarina	6,728	14782710	6,1	8688	0,9

Fonte: Do autor.

Foi verificado um fator de retenção (K') igual a 6,1 para o pico da nitrobenzoilcumarina. Este parâmetro está relacionado à velocidade com a qual o analito migra através da coluna cromatográfica. É o intervalo de tempo em que um soluto permanece na fase estacionária relativo ao tempo em que permanece na fase móvel. Valores próximos a 1 indicam pouca interação entre analito e coluna. Já valores elevados representam tempos de eluição muito

grandes. O valor obtido no método desenvolvido demonstra uma boa interação da nitrobenzoilcumarina com a fase estacionária utilizada (United States Pharmacopeia, 2023).

O número de pratos teóricos é um parâmetro quantitativo utilizado para expressar a eficiência de uma coluna cromatográfica, sendo que quanto maior o seu valor, maior a eficiência verificada (Collins; Braga; Bonato, 2014). Para o pico da nitrobenzoilcumarina na solução amostra, foi obtido um valor de 8688 pratos, indicando uma boa eficiência da coluna utilizada na análise.

O fator de assimetria é outro parâmetro empregado para expressar a qualidade de um resultado cromatográfico. Valores iguais a 1 indicam uma perfeita simetria do pico analisado, entretanto, resultados até 2 são aceitáveis. Acima disto, a falta de simetria no pico cromatográfico pode prejudicar sua integração e quantificação (WHO, 2016). Na amostra analisada foi verificado um valor de 0,9. Este resultado pode ser atribuído ao solvente utilizado na preparação da amostra, o qual possui caráter mais polar do que a fase móvel, gerando distorção frontal da banda cromatográfica e, conseqüentemente, valores de assimetria inferiores a 1. Entretanto, destaca-se que a distorção verificada é mínima, conforme mostrado pelo parâmetro calculado, não impactando significativamente na simetria do pico da nitrobenzoilcumarina.

A pureza cromatográfica da nitrobenzoilcumarina obtida no processo de síntese foi determinada empregando o método desenvolvido. Foi preparada uma solução da amostra na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a qual foi injetada no cromatógrafo. Todos os sinais analíticos detectados e não provenientes da solução branco, ou seja, do diluente da amostra, foram integrados. Foi determinada a área percentual dos picos observados, a qual indica a pureza cromatográfica dos analitos. Para a nitrobenzoilcumarina foi verificado um valor de 99,7 %.

Baseando-se nesse resultado e nos previamente descritos nas análises termogravimétricas apresentadas no item 5.2.4, a pureza da nitrobenzoilcumarina sintetizada foi determinada utilizando a fórmula:

$$\text{PUREZA (\%)} = [100 - (\text{água} + \text{impurezas orgânicas voláteis} + \text{impurezas inorgânicas})] \times \text{Pureza cromatográfica} / 100 \quad (3)$$

Dessa forma foi calculado um valor de pureza igual 99,1 %, corroborando o previamente determinado pela técnica de calorimetria exploratória diferencial e indicando que a nitrobenzoilcumarina apresenta pureza adequada para ser empregada nos demais estudos desenvolvidos neste trabalho.

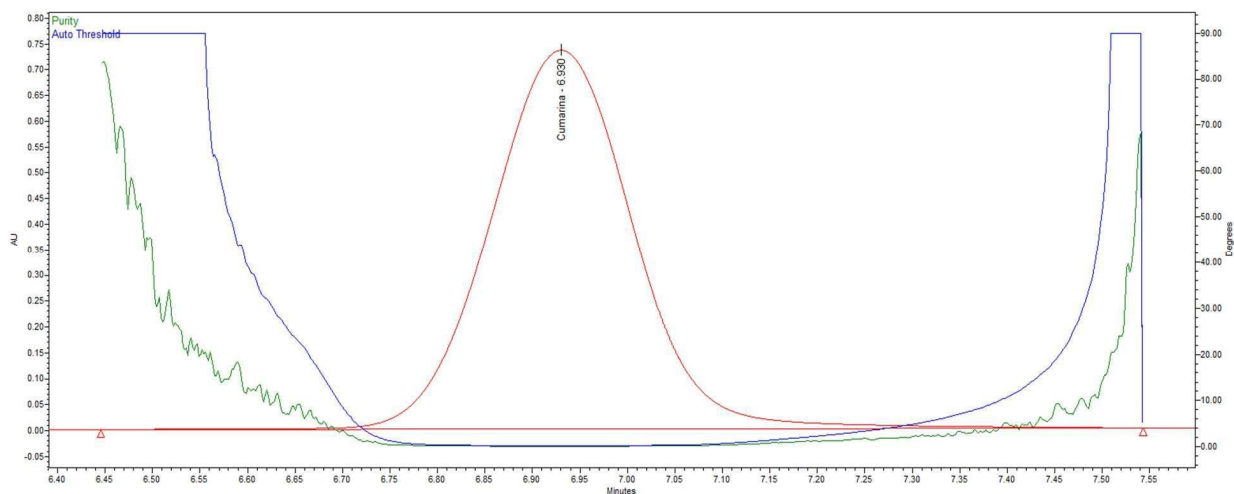
O método analítico desenvolvido foi validado segundo as diretrizes do guia ICH Q2(R2) e resolução ANVISA RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. Foram avaliados os parâmetros de seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez.

5.5.4 Avaliação do parâmetro de seletividade do método analítico

A seletividade é a capacidade de um método em determinar de forma inequívoca um analito na presença de outras substâncias potencialmente presentes na solução analisada (ICH, 2023b).

A seletividade do método cromatográfico foi avaliada através da verificação de sinais analíticos provenientes do branco (diluente da amostra) e da fase móvel no tempo de retenção do pico da nitrobenzoilcumarina. Além disso, as amostras preparadas no estudo de degradação forçada também foram utilizadas para verificar a seletividade do método em quantificar a cumarina na presença de seus produtos de degradação. Todas as preparações foram analisadas utilizando um sistema HPLC *Alliance*, modelo 2695 (*Waters, USA*), acoplado com detector de arranjo de diodos, a fim de avaliar a homogeneidade espectral dos sinais observados. Na Figura 29 é apresentado o gráfico de pureza de pico obtido a partir da solução da nitrobenzoilcumarina preparada na concentração de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e processado utilizando o *software Empower 3*.

Figura 29 - Gráfico de pureza da solução amostra da nitrobenzoilcumarina preparada na concentração de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, volume de injeção $20 \mu\text{L}$, fluxo de $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e faixa de varredura de 200 a 800.



Fonte: Do autor.

Para avaliar a pureza de pico (homogeneidade espectral), o *software Empower 3* compara o espectro obtido a partir do ápice do pico cromatográfico com os demais espectros verificados ao longo de toda a banda cromatográfica. Quando a diferença entre os espectros, indicada pela linha verde, é menor do que a incerteza da medição, indicada pela linha azul, não existem evidências de coeluição, sendo o pico atribuído a um único componente. Destaca-se que a incerteza de medição é calculada a partir de ruídos eletrônicos e interferências provocadas pela fase móvel ou diluente, utilizando uma determinada faixa da linha de base do cromatograma. Na Figura 29, observa-se que os espectros ao longo de todo o pico da nitrobenzoilcumarina são homogêneos, comprovando a seletividade do método analítico desenvolvido.

A avaliação de homogeneidade espectral do pico da nitrobenzoilcumarina também foi realizada nas amostras submetidas ao estudo de degradação forçada, objetivando verificar a interferência dos produtos de degradação com o pico da cumarina. Em todas as amostras analisadas foi verificada a pureza de pico da nitrobenzoilcumarina. Além disso, não foram verificados sinais analíticos provenientes do diluente ou fase móvel no tempo de retenção dos picos de interesse.

5.5.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção é definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação consiste na menor concentração do analito que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis. Concentrações que apresentam relação sinal/ruído de aproximadamente 2:1 e 10:1 podem ser consideradas como estimativas desses parâmetros, respectivamente (ANVISA, 2017a; ICH, 2023b).

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação da nitrobenzoilcumarina pelo método cromatográfico desenvolvido, foi preparada uma solução estoque da substância em diluente na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a qual foi posteriormente diluída de modo a obter diferentes concentrações do analito. Cada solução foi injetada em triplicata no cromatógrafo e calculada a relação sinal/ruído para o pico da nitrobenzoilcumarina. As soluções contendo $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram relação sinal/ruído de 3:1 e 12:1, respectivamente, sendo consideradas como os limites de detecção e quantificação do método. Para a confirmação do LQ estimado para o método cromatográfico, foram avaliados os parâmetros de precisão e

exatidão utilizando preparações da nitrobenzoilcumarina na concentração de $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, conforme descrito adiante.

Destaca-se que os limites de detecção e quantificação calculados utilizando soluções da nitrobenzoilcumarina também são aplicáveis aos produtos de degradação da molécula, considerando que impurezas e ativo terão o mesmo fator resposta, conforme preconizado pela resolução ANVISA RDC 166/2017 e guia ICH Q3A (R2) para quantificação de impurezas desconhecidas.

Segundo a RDC 166/2017 e guia ICH Q3A (R2) o limite de quantificação de um método analítico deve ser menor ou igual ao limite de notificação de uma impureza ou produto de degradação. O limite de notificação é calculado considerando a dose diária máxima de um insumo farmacêutico ativo, sendo que para substâncias administradas até o valor de 2 gramas por dia, deve corresponder a 0,05 % da concentração de trabalho do método analítico. Sendo assim, para o método cromatográfico desenvolvido para quantificação dos PDs da nitrobenzoilcumarina, o valor do limite de notificação corresponde a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, já que a concentração de trabalho do método é de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Dessa forma, evidencia-se que o LQ do método desenvolvido é menor do que o limite de notificação preconizado, estando em conformidade com o exigido pelas agências reguladoras.

5.5.6 Linearidade

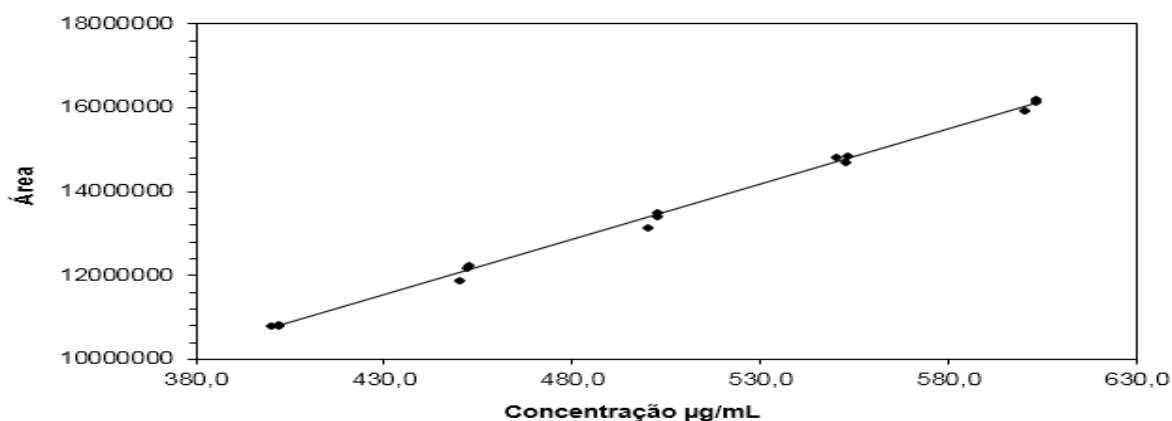
A linearidade consiste na capacidade do método em fornecer respostas diretamente proporcionais à concentração da substância que está sendo analisada (ANVISA, 2017; ICH, 2023b). Uma vez que o método desenvolvido objetivou a quantificação tanto da nitrobenzoilcumarina, quanto dos seus produtos de degradação, os quais estão presentes em concentrações muito diferentes na amostra, optou-se por avaliar a linearidade do método em duas faixas distintas. Uma destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina, na faixa de 80 % a 120 % da concentração de trabalho do método e outra na faixa compreendida entre o LQ e $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$, destinada à quantificação dos possíveis produtos de degradação da cumarina. Dessa forma, as faixas de linearidade foram definidas em função dos objetivos do método cromatográfico, estando em conformidade com o recomendado pela ICH e ANVISA para métodos destinados à quantificação de impurezas e doseamento de fármacos e evitando problemas relacionados à perda de linearidade devido a faixas de trabalho muito amplas. Destaca-se que a avaliação da linearidade na faixa de trabalho destinada à quantificação dos produtos de degradação foi realizada com a nitrobenzoilcumarina, assumindo que seus produtos

de degradação terão absorção no ultravioleta semelhante à molécula de origem e, conseqüentemente, também apresentarão resposta linear.

Para avaliação da linearidade, foram preparadas três soluções estoque da nitrobenzoilcumarina na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diluente, as quais foram posteriormente diluídas para as concentrações desejadas.

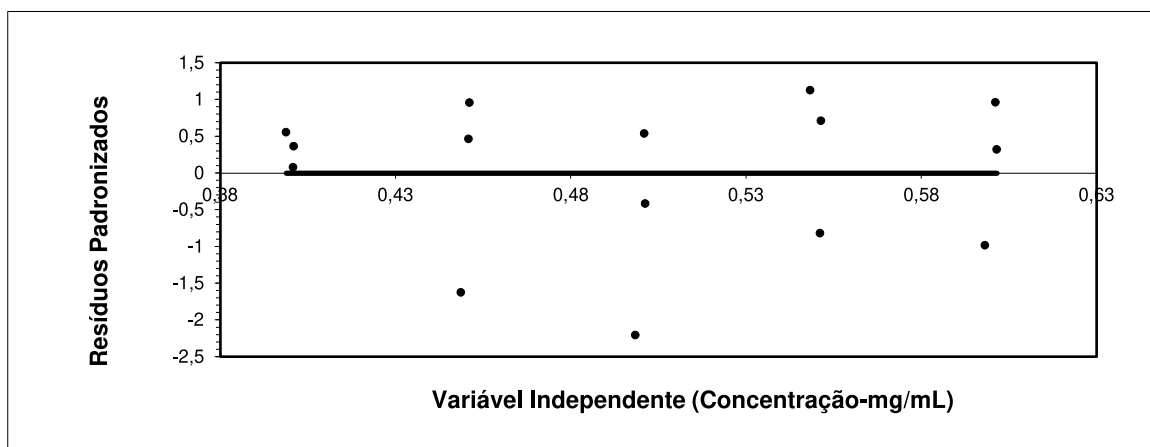
Para a faixa destinada ao doseamento da nitrobenzoilcumarina, foram obtidas as seguintes concentrações: $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $450 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $550 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O gráfico da resposta do equipamento versus a concentração do analito e o gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente são mostrados nas Figuras 30 e 31.

Figura 30 - Curva analítica para a faixa de trabalho destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina. Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, volume de injeção $20 \mu\text{L}$, fluxo de $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e detecção em 259 nm .



Fonte: Do autor.

Figura 31 - Gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente para a faixa de trabalho destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina.



Fonte: Do autor.

A curva de regressão obtida para a faixa de trabalho do método destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina apresentou coeficiente de correlação (R) igual a 0,998519, sendo este superior ao valor mínimo exigido de 0,990 (ANVISA, 2017). Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) calculado foi de 0,997041. A equação da curva obtida utilizando o método dos mínimos quadrados é apresentada abaixo.

$$y = 26502347,6 x + 167431,0 \quad (4)$$

O gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente apresentado na Figura 31 evidencia os pontos distribuídos de forma aleatória nos 2 lados do eixo das abcissas e ausência de um padrão definido, indicando uma aparente independência entre os resíduos. Para confirmar a hipótese, a independência residual foi avaliada pelo teste estatístico de Durbin-Watson. Além desse pré-requisito para modelos de regressão linear, também foram verificadas as hipóteses de homocedasticidade e normalidade residual. Adicionalmente foi avaliada a significância do coeficiente angular através da análise de variância do modelo de regressão obtido e a presença de *outliers* pelo teste de Grubbs objetivando verificar o comprometimento das estatísticas calculadas para a regressão devido a presença de valores aberrantes. Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível de significância de 0,05, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Testes estatísticos aplicados na avaliação do modelo de regressão linear obtido para a faixa de trabalho destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina pelo método analítico desenvolvido.

(Continua)

Parâmetro avaliado	Teste estatístico	Estatística do teste ou valor crítico (tabelado) ($\alpha = 0,05$)	Resultado (valor calculado)	Conclusão
<i>Outliers</i>	Grubbs	G = 1,154	G = 1,136	Ausência de <i>outliers</i> (G calculado < G tabelado)
Independência	Durbin-Watson	1,23 < dw < 2,77	dw = 2,464	Resíduos independentes

Tabela 6 - Testes estatísticos aplicados na avaliação do modelo de regressão linear obtido para a faixa de trabalho destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina pelo método analítico desenvolvido.

(Conclusão)				
Parâmetro avaliado	Teste estatístico	Estatística do teste ou valor crítico (tabelado) ($\alpha = 0,05$)	Resultado (valor calculado)	Conclusão
Normalidade	Shapiro-Wilk	W = 0,881	W = 0,886	Distribuição normal (W calculado > W tabelado)
Homocedasticidade	Cochran	C = 0,6838	C = 0,3286	Resíduos homocedásticos (C calculado < C tabelado)
Significância do coeficiente angular	ANOVA	F = 4,67	F = 4380,1	Coefficiente angular significativo (F calculado > F tabelado)

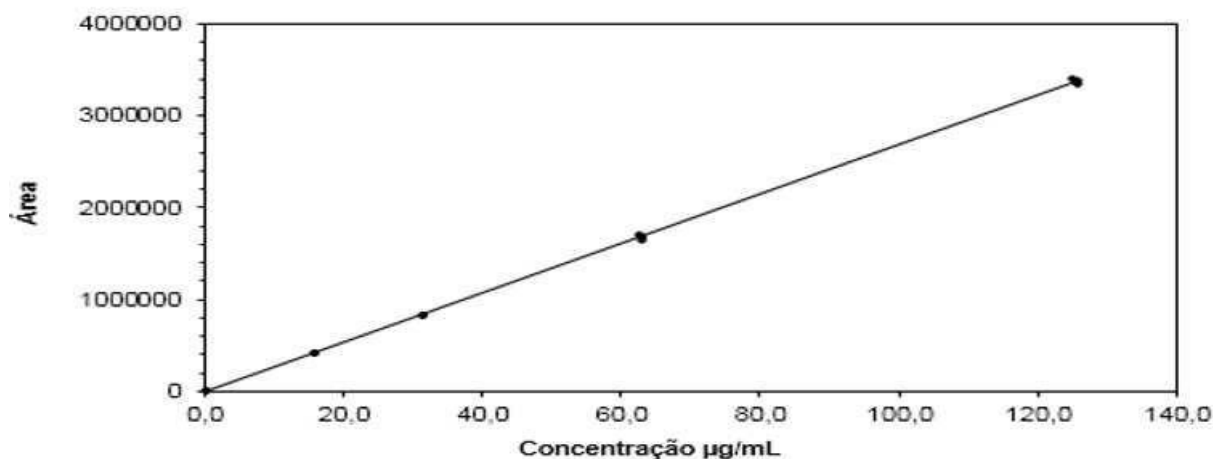
Fonte: Do autor.

Conforme mostrado na Tabela 5, a estatística de Grubbs calculada a partir dos dados de regressão foi inferior ao valor crítico tabelado para o teste, indicando ausência de valores aberrantes que pudessem comprometer as estatísticas do modelo linear obtido. De forma semelhante, o valor calculado para a estatística de Cochran foi menor do que o valor crítico, indicando a igualdade de variância entre os resíduos. Adicionalmente, o teste de Shapiro-Wilk demonstrou que não existem evidências amostrais para rejeitar a hipótese de normalidade residual, uma vez que o valor calculado para a estatística do teste foi superior ao valor tabelado. Além disso, a análise de variância para o modelo de regressão indicou que o coeficiente angular da reta é significativo, ou seja, existe uma correlação entre os valores das variáveis independente e resposta. Dessa forma, pode-se inferir que o modelo de regressão obtido é adequado para os fins pretendidos pelo método analítico.

Para faixa de trabalho destinada à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina, foram utilizadas soluções nas concentrações de 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A curva de regressão obtida pelo método dos

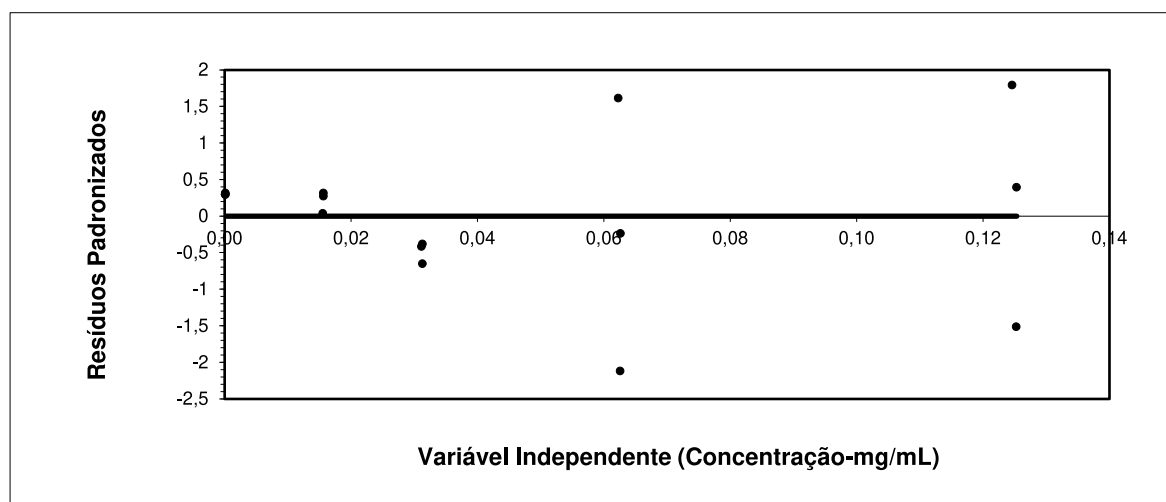
mínimos quadrados e o gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente são apresentados, respectivamente, nas Figuras 32 e 33.

Figura 32 - Curva analítica para a faixa de trabalho destinada à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina. Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, volume de injeção 20 μL , fluxo de 2,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção em 259 nm.



Fonte: Do autor.

Figura 33 - Gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente para a faixa de trabalho destinada à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina.



Fonte: Do autor.

Percebe-se na Figura 32 uma aparente relação linear para o modelo de regressão, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,999845 e coeficiente de determinação de

0,999690, estando em conformidade com o valor mínimo exigido pelas agências reguladoras (ANVISA, 2017). O gráfico dos resíduos padronizados versus a variável independente apresenta os pontos distribuídos aleatoriamente em ambos os lados do eixo das abcissas, aparentando independência entre os resíduos. A curva de regressão obtida é apresentada abaixo.

$$y = 27010959,1 x - 6246,2 \quad (5)$$

A análise estatística aplicada para verificar a adequabilidade do modelo de regressão linear é apresentada na Tabela 6.

Tabela 7 - Testes estatísticos aplicados na avaliação do modelo de regressão linear obtido para a faixa de trabalho destinada à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina pelo método analítico desenvolvido.

Parâmetro avaliado	Teste estatístico	Estatística do teste ou valor crítico (tabelado) ($\alpha = 0,05$)	Resultado (valor calculado)	Conclusão
<i>Outliers</i>	Grubbs	G = 1,154	G = 1,145	Ausência de <i>outliers</i> (G calculado < G tabelado)
Independência	Durbin-Watson	1,23 < dw < 2,77	dw = 2,443	Resíduos independentes
Normalidade	Shapiro-Wilk	W = 0,881	W = 0,925	Distribuição normal (W calculado > W tabelado)
Homocedasticidade	Cochran	C = 0,6838	C = 0,5552	Resíduos homocedásticos (C calculado < C tabelado)
Significância do coeficiente angular	ANOVA	F = 4,67	F = 41858,7	Coefficiente angular significativo (F calculado > F tabelado)

Os testes estatísticos apresentados na tabela acima demonstraram uma boa adequabilidade do modelo de regressão aos dados obtidos experimentalmente. Os pré-requisitos de independência, normalidade e homocedasticidade foram atendidos. Além disso, o coeficiente angular da reta foi estatisticamente significativo, indicando correlação entre as variáveis independente e resposta. Sendo assim, pode-se inferir que o método destinado à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina possui linearidade na faixa de trabalho pretendida.

5.5.7 Precisão e exatidão

Foram avaliadas a exatidão e precisão intra e inter-dia nas duas faixas de linearidade do método analítico. No intervalo destinado à quantificação dos produtos de degradação, foram preparadas soluções da nitrobenzoilcumarina em quatro níveis de concentração: no limite de quantificação ($0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$), a $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na faixa de trabalho destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina, foram preparadas soluções a $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A precisão foi expressa como o coeficiente de variação (CV) entre os resultados e a exatidão como a porcentagem de recuperação do analito.

Destaca-se que a avaliação da precisão e exatidão no limite de quantificação foi realizada objetivando verificar se o valor estimado para esse parâmetro utilizando o método da relação sinal/ruído apresenta reprodutibilidade e recuperação aceitáveis, conforme objetivo do método analítico desenvolvido. Além disso, ressalta-se que a precisão e exatidão na faixa de trabalho destinada à quantificação dos produtos de degradação foi realizada considerando a equivalência de resposta entre as possíveis impurezas desconhecidas da nitrobenzoilcumarina e o ativo, conforme preconizado pela resolução ANVISA RDC 166/2017 e guia ICH Q3A (R2).

Foram preparadas soluções independentes da nitrobenzoilcumarina para cada um dos níveis de concentração avaliados. As soluções foram injetadas no cromatógrafo e quantificadas contra uma curva de calibração preparada a cada dia de análise e nas respectivas faixas de trabalho. Os resultados estão expressos nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 8 - Resultados dos parâmetros de precisão e exatidão para a faixa do método destinada à quantificação dos produtos de degradação.

Níveis	Precisão Intra-dia CV (%)	Precisão Inter-dia CV (%)	Recuperação (%)
LQ (0,15 µg.mL ⁻¹)	0,5	1,0	105,9 ± 1,13
15 µg.mL ⁻¹	0,2	0,3	100,3 ± 0,35
62,5 µg.mL ⁻¹	0,8	0,6	100,2 ± 0,66
125 µg.mL ⁻¹	0,6	0,6	100,1 ± 0,65

Fonte: Do autor.

Notas: Precisão intra-dia: n = 3/nível;

Precisão inter-dia: n = 6/nível;

Resultados da recuperação: média (%) ± intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$ e n = 6).

Tabela 9 - Resultados dos parâmetros de precisão e exatidão para a faixa do método destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina.

Níveis	Precisão Intra-dia CV (%)	Precisão Inter-dia CV (%)	Recuperação (%)
400 µg.mL ⁻¹	0,3	0,8	99,8 ± 0,79
500 µg.mL ⁻¹	0,4	0,4	100,0 ± 0,46
600 µg.mL ⁻¹	0,6	0,7	99,7 ± 0,68

Fonte: Do autor.

Notas: Precisão intra-dia: n = 3/nível;

Precisão inter-dia: n = 6/nível;

Resultados da recuperação: média (%) ± intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$ e n = 6).

No intervalo destinado à quantificação dos produtos de degradação, foram observados desvios ligeiramente maiores na precisão e exatidão para as amostras preparadas no limite de quantificação do método. Tais resultados já eram esperados, uma vez que foram preparadas soluções da nitrobenzoilcumarina ao nível de traços. Entretanto, os valores de precisão e recuperação para essa faixa de trabalho estão dentro de limites considerados aceitáveis. Conforme preconizado pela *AOAC International*, para analitos presentes na concentração do LQ do método desenvolvido, equivalente a 0,03 % da concentração de trabalho (500 µg.mL⁻¹), podem ser utilizados como critérios de aceitação para os parâmetros de precisão e exatidão,

valores de CV de até 5,3 % e valores de recuperação entre 90 e 107 %, respectivamente (Association of Official Agricultural Chemists, 2016).

Na faixa destinada à quantificação da nitrobenzoilcumarina, os resultados variaram entre 98,7 % e 100,7 %. Os coeficientes de variação de cada nível foram inferiores a 2 %, valor considerado como aceitável para analitos em macro quantidades. Conforme preconizado pela *AOAC International*, para essa faixa de concentração, o método analítico pode apresentar variações de até 1,3 % para o ensaio de precisão e recuperação entre 98 e 102 % (AOAC, 2016).

Sendo assim, em função dos resultados obtidos, foi observado que o método desenvolvido apresentou precisão e exatidão adequadas para os fins desejados em cada uma das faixas de trabalho avaliadas.

5.5.8 Intervalo

O intervalo corresponde aos valores de maior e menor concentração da substância em exame que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade do método analítico (ANVISA, 2017a; ICH, 2023b). Sendo assim, após avaliação desses parâmetros, definiu-se a faixa de concentração entre 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ como o intervalo para quantificação da nitrobenzoilcumarina pelo método cromatográfico desenvolvido. Já para a quantificação dos seus produtos de degradação, foi definido o intervalo de 0,15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5.5.9 Robustez

A robustez do método cromatográfico foi avaliada através do teste proposto por Youden e Steiner (AOAC, 1975). Este teste consiste na análise multivariada de sete variáveis que podem impactar no resultado analítico (Gehring *et al.*, 2011). As variáveis selecionadas foram distribuídas aleatoriamente na matriz de combinações proposta para o teste. As condições normais das variáveis foram denotadas pelo sinal (+) e seus valores alternativos pelo sinal (-). Foram utilizadas duas matrizes de combinações para cada faixa de linearidade do método analítico, totalizando um conjunto de dezesseis experimentos por faixa. Foi avaliada a influência das alterações na quantificação da nitrobenzoilcumarina e de seus produtos de degradação, sendo utilizada no ensaio uma solução amostra estocada por longo período, a qual apresentou degradação significativa da nitrobenzoilcumarina e formação de um produto de degradação com tempo de retenção relativo (TRR) de 1,27 em relação do derivado cumarínico, o qual posteriormente foi identificado como um subproduto oriundo da metanólise da cumarina.

A nitrobenzoilcumarina e seu PD foram quantificados utilizando curvas de calibração preparadas no dia da análise e nas respectivas faixas de trabalho do método analítico.

Os resultados das combinações foram codificados por letras maiúsculas, conforme apresentado nas Tabelas 9 a 10. A partir desses resultados, o efeito de cada variável foi estimado pela diferença entre a média dos resultados das 4 análises em que a variável operou segundo às condições nominais do método (sinalizadas por +) e a média dos resultados das 4 análises em que operou segundo às condições alternativas (sinalizadas pelo sinal -). Variáveis com efeito estimado superior a $s\sqrt{2}$ seriam consideradas críticas ao método analítico, onde s representa o desvio padrão entre os resultados dos experimentos de cada matriz (Panda; Bera; Pradhan, 2019).

Tabela 10 - Matriz 01 para as variáveis, condições e combinações experimentais avaliadas na robustez do método para quantificação da nitrobenzoilcumarina.

(continua)

Variável	Condições Nominais	Condições alternativas	Condição experimental							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura da coluna (°C)	35	37	+	+	+	+	-	-	-	-
Fluxo (mL/min)	2,0	2,1	+	+	-	-	+	+	-	-
Lote da coluna	14319	13232	+	-	+	-	+	-	+	-
Comprimento de onda (nm)	259	260	+	+	-	-	-	-	+	+
Lote metanol	I1069907	I1058707	+	-	+	-	-	+	-	+
Conteúdo de metanol na FM (%)	67	69	+	-	-	+	+	-	-	+
Temperatura da amostra (°C)	15	17	+	-	-	+	-	+	+	-
Codificação dos Resultados			A	B	C	D	E	F	G	H

Tabela 11 - Matriz 01 para as variáveis, condições e combinações experimentais avaliadas na robustez do método para quantificação da nitrobenzoilcumarina.

(conclusão)

Variável	Condições Nominais	Condições alternativas	Condição experimental							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Resultados (%)			91	93	93	94	92	91	95	93
Temperatura da coluna (°C)	35	33	+	+	+	+	-	-	-	-
Fluxo (mL/min)	2,0	1,9	+	+	-	-	+	+	-	-
Temperatura da amostra (°C)	15	13	+	-	+	-	+	-	+	-
Comprimento de onda (nm)	259	258	+	+	-	-	-	-	+	+
Fornecedor de metanol	Merck	Dinâmica	+	-	+	-	-	+	-	+
Conteúdo de metanol (%)	67	65	+	-	-	+	+	-	-	+
Membrana filtrante	PVDF 0,45 µm	PTFE 0,45 µm	+	-	-	+	-	+	+	-
Codificação dos Resultados			A	I	J	L	M	N	O	P
Resultados (%)			91	90	94	91	88	88	91	89

Fonte: AOAC, 1975; Gehring *et al.*, 2011; Ribani, 2004.

Tabela 12 - Matriz 02 para as variáveis, condições e combinações experimentais avaliadas na robustez do método para quantificação do produto de degradação presente na amostra analisada.

(continua)

Variável	Condições Nominais	Condições alternativas	Condição experimental							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura da coluna (°C)	35	37	+	+	+	+	-	-	-	-
Fluxo (mL/min)	2,0	2,1	+	+	-	-	+	+	-	-
Lote da coluna	14319	13232	+	-	+	-	+	-	+	-
Comprimento de onda (nm)	259	260	+	+	-	-	-	-	+	+
Lote metanol	I1058707	I1044207	+	-	+	-	-	+	-	+
Conteúdo de metanol na FM (%)	67	69	+	-	-	+	+	-	-	+
Temperatura da amostra (°C)	15	17	+	-	-	+	-	+	+	-
Codificação dos Resultados			A	B	C	D	E	F	G	H
Resultados (%)			5,8	5,8	5,9	6,1	5,3	5,9	5,8	5,8
Temperatura da coluna (°C)	35	33	+	+	+	+	-	-	-	-
Fluxo (mL/min)	2,0	1,9	+	+	-	-	+	+	-	-
Temperatura da amostra (°C)	15	13	+	-	+	-	+	-	+	-
Comprimento de onda (nm)	259	258	+	+	-	-	-	-	+	+
Fornecedor de metanol	Merck	Dinâmica	+	-	+	-	-	+	-	+

Tabela 13 - Matriz 02 para as variáveis, condições e combinações experimentais avaliadas na robustez do método para quantificação do produto de degradação presente na amostra analisada.

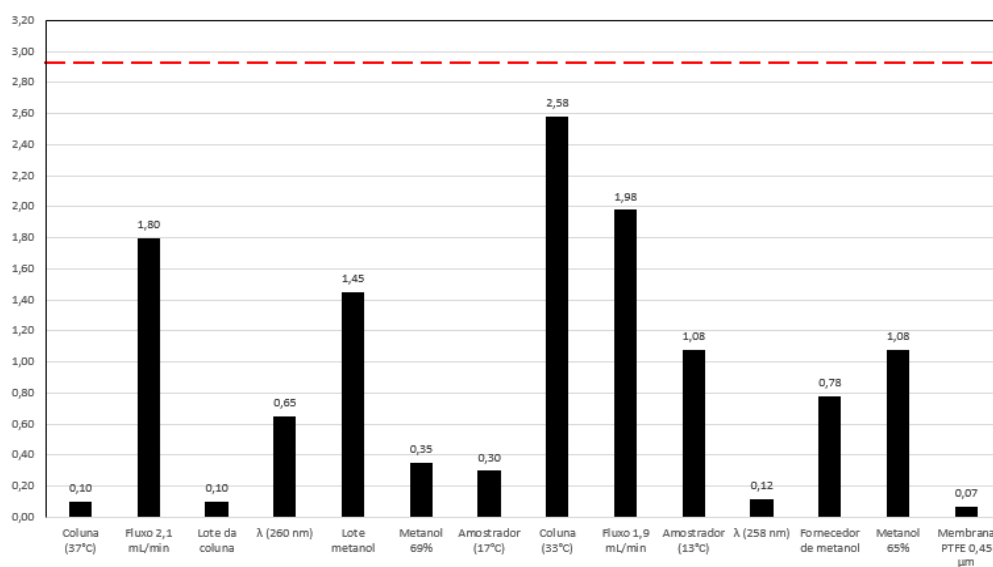
(conclusão)

Variável	Condições Nominais	Condições alternativas	Condição experimental							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Conteúdo de metanol (%)	67	65	+	-	-	+	+	-	-	+
Membrana filtrante	PVDF 0,45 μm	PTFE 0,45 μm	+	-	-	+	-	+	+	-
Codificação dos Resultados			A	I	J	L	M	N	O	P
Resultados (%)			5,8	5,6	5,5	5,5	5,3	5,3	5,5	5,5

Fonte: AOAC, 1975; Gehring *et al.*, 2011; Ribani, 2004.

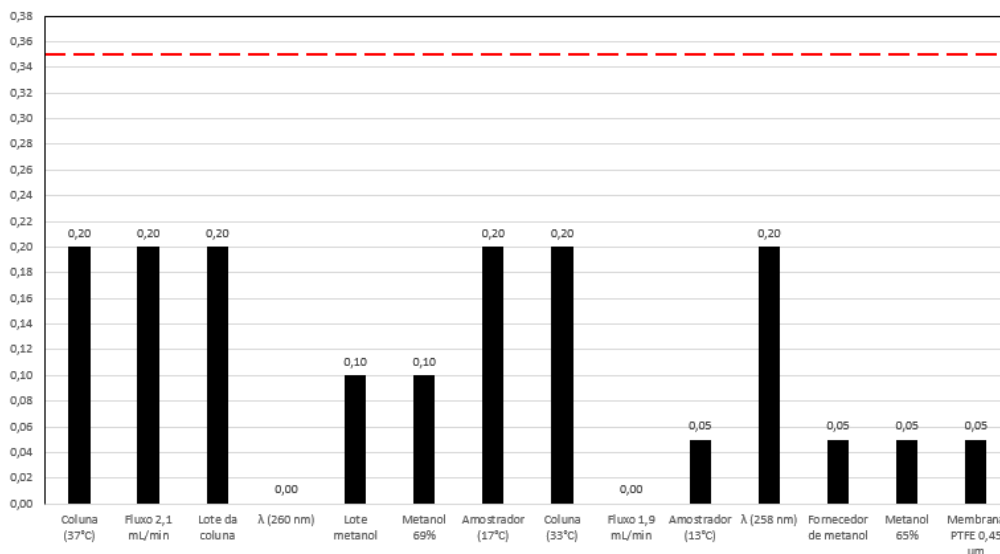
Os resultados das análises presentes nas matrizes de experimentos foram utilizados para calcular o efeito de cada variável na quantificação da nitrobenzoilcumarina e de seu produto de degradação presente na amostra analisada, conforme mostrado nas Figuras 34 e 35.

Figura 34 - Efeitos das variáveis avaliadas na robustez do método analítico destinado à quantificação da nitrobenzoilcumarina.



Fonte: Do autor.

Figura 35 - Efeitos das variáveis avaliadas na robustez do método analítico destinado à quantificação dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina.



Fonte: Do autor.

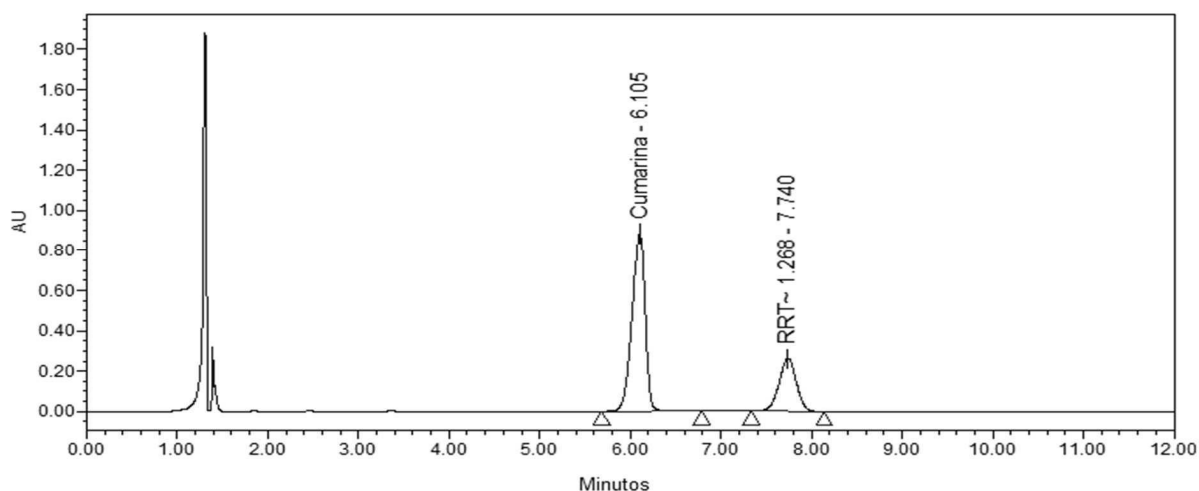
Nas Figuras 34 e 35, são representados os efeitos de cada variável avaliada na robustez do método analítico, em cada uma das faixas de trabalho, através de barras, com os valores descritos acima das barras correspondentes. Além disso, a linha vermelha tracejada representa o limite proposto para o teste, correspondendo aos valores de 2,94 e 0,35 para as faixas de trabalho destinadas à quantificação da nitrobenzoilcumarina e de seus PDs, respectivamente.

Evidencia-se pelas barras horizontais que as influências das variáveis nos resultados das análises em cada matriz de experimentos foram relativamente pequenas, não ultrapassando o limite proposto para o ensaio de $s\sqrt{2}$, indicado pela linha tracejada vermelha. Tais resultados demonstram que o método cromatográfico desenvolvido é robusto para cada alteração testada, tanto para quantificação da nitrobenzoilcumarina, quanto de seus produtos de degradação.

5.6 ESTABILIDADE INTRÍNSECA DA NITROBENZOILCUMARINA

A estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina foi avaliada através de estudos de degradação forçada, conforme as condições descritas na Tabela 1. A molécula demonstrou ser estável às condições avaliadas de calor, umidade, luz e hidrólise ácida. Entretanto, foi verificada a formação de produtos de degradação quando a nitrobenzoilcumarina foi exposta à hidrólise básica, solução de íons metálicos e condições oxidativas. Os cromatogramas obtidos para essas três últimas condições de estresse são apresentados, respectivamente, nas Figuras 36, 37 e 38.

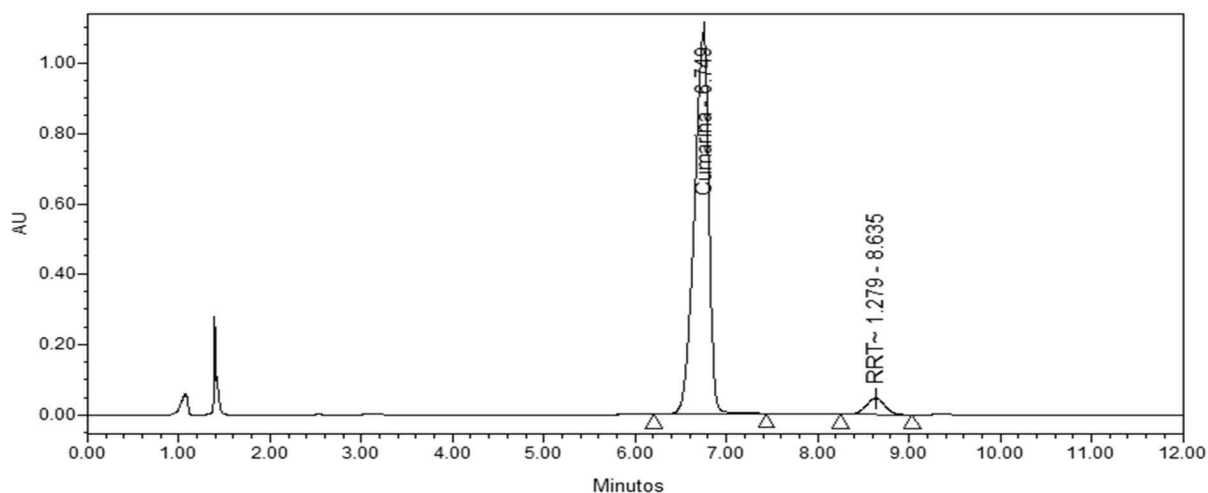
Figura 36 - Cromatograma do perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta à solução de NaOH 0,1 M por 30 minutos. Fase móvel: água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de 2,0 mL.min⁻¹ e detecção em 259 nm.



Fonte: Do autor.

Legenda: Tempo de retenção da cumarina: 6,105 minutos. Tempo de retenção do produto de degradação: 7,740 minutos. Tempo de retenção relativo (TRR) – do inglês: *relative retention time* (RRT) – do produto de degradação: 1,268.

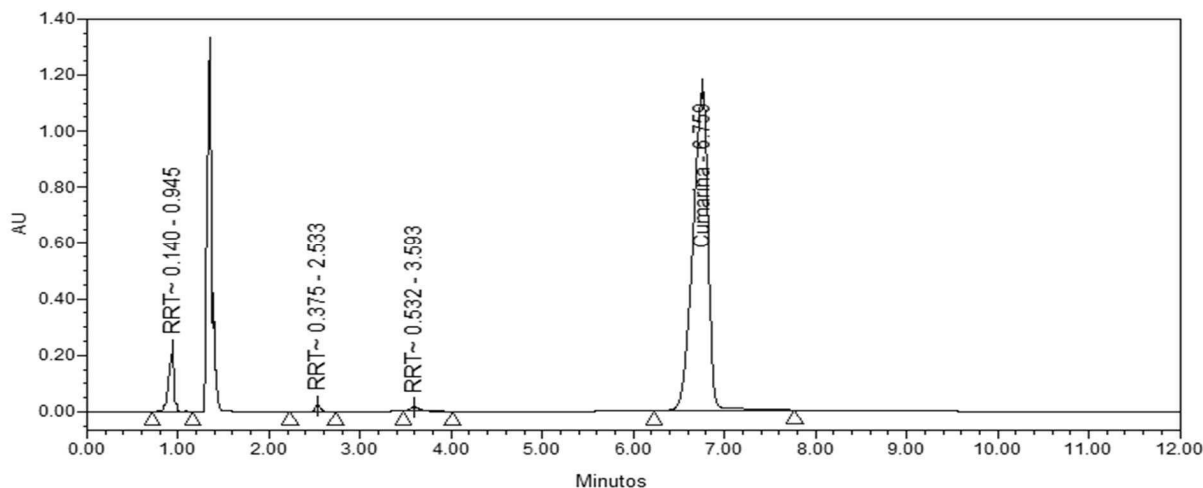
Figura 37 - Cromatograma do perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta à solução de CuSO₄ 0,05 M por 6 dias. Fase móvel: água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de 2,0 mL.min⁻¹ e detecção em 259 nm.



Fonte: Do autor.

Legenda: Tempo de retenção da cumarina: 6,749 minutos. Tempo de retenção do produto de degradação: 8,635 minutos. Tempo de retenção relativo do produto de degradação: 1,279.

Figura 38 - Cromatograma do perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta à solução de H_2O_2 1 % por 10 horas. Fase móvel: água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção em 259 nm.



Fonte: Do autor.

Legenda: Tempo de retenção da cumarina: 6,759 minutos. Tempo de retenção dos produtos de degradação: 0,945 minuto, 2,533 minutos e 3,593 minutos. Tempo de retenção relativo dos produtos de degradação: 0,140; 0,375 e 0,532.

A nitrobenzoilcumarina apresentou degradação de 34,7 % quando exposta à solução de NaOH 0,1M por um período de 30 minutos. Nesta condição, foi verificada a formação de um produto de degradação com tempo de retenção relativo de 1,27 em relação ao pico da cumarina. Em solução de íons metálicos (CuSO_4 0,05M), foi verificada degradação de 12,5 % após um período de 6 dias de estresse e o aparecimento de um PD com tempo de retenção relativo de 1,28. Em estresse oxidativo, a nitrobenzoilcumarina demonstrou ser altamente instável quando exposta à solução de H_2O_2 3 % v/v, mesmo que por curto período de tempo. Sendo assim, a molécula foi exposta ao agente degradante em menor concentração. Foi utilizada solução de H_2O_2 1 % v/v. Deste modo, foi obtida degradação de 14,3 % após 10 horas de estresse e foi verificada a formação de três produtos de degradação com tempos de retenção relativos de 0,14; 0,38 e 0,53. Os resultados obtidos nos estudos de degradação forçada são apresentados na Tabela 11.

Tabela 14 - Resultados obtidos nos estudos de degradação forçada para a nitrobenzoilcumarina.

Agente degradante	Condição de estresse	Tempo de degradação	Status	Teor Cumarina (%)	Degradação (%)	PDs (%)	Balanco de massa (%)
Amostra controle	---	---	---	100,5	---	---	---
Calor	60°C	10 dias	Estável	100,1	---	---	99,6
Umidade	75% de umidade relativa	10 dias	Estável	101,3	---	---	100,8
Hidrólise ácida	HCl 0,1 M	10 dias	Estável	98,0	---	---	97,5
Hidrólise ácida	HCl 0,5 M	10 dias	Estável	101,1	---	---	100,6
Hidrólise ácida	HCl 1 M	10 dias	Estável	98,0	---	---	97,5
Luz	Ultravioleta e fluorescente	10 dias	Estável	100,1	---	---	99,6
Hidrólise básica	NaOH 0,1M	30 minutos	Sensível	65,8	34,5	27,4	92,7
Solução de íons metálicos	CuSO ₄ 0,05M	6 dias	Sensível	88,0	12,4	5,3	92,8
Solução oxidativa	H ₂ O ₂ 1% (v/v)	10 horas	Sensível	86,2	14,2	8,3	94,0

Fonte: Do autor.

As porcentagens de degradação da nitrobenzoilcumarina foram calculadas comparando-se os resultados das soluções submetidas ao estudo de estresse com uma solução referência preparada conforme descrito no item 4.5, a qual foi denominada de amostra controle. Os cálculos foram realizados utilizando a fórmula abaixo.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{(\text{Teor da amostra controle} - \text{Teor da amostra estressada}) \times 100}{\text{Teor da amostra controle}} \quad (6)$$

A nitrobenzoilcumarina e seus produtos de degradação foram quantificados utilizando curvas de calibração distintas, preparadas para cada uma das faixas de trabalho do método analítico. Além disso, os PDs foram quantificados frente à resposta da nitrobenzoilcumarina, assumindo a equivalência de resposta no detector ultravioleta, conforme preconizado pela resolução ANVISA RDC 166/2017 e guia ICH Q3A (R2) para quantificação de impurezas desconhecidas (ANVISA, 2017a; ICH, 2023b).

Foi calculado o balanço de massas das soluções submetidas ao estudo de estresse utilizando como referência a solução amostra controle sem exposição a nenhum agente degradante. O balanço de massas é um conceito baseado na lei de conservação das massas, sendo uma ferramenta útil para avaliar se a metodologia empregada evidencia a capacidade de mensurar a formação de produtos de degradação e o quão próximo esse quantitativo se relaciona à redução de teor do ativo. Valores próximos a 100 % indicam que o método pode ser considerado como indicativo de estabilidade da molécula analisada, ou seja, apresenta capacidade para quantificar os possíveis PDs formados a partir de um analito. Os cálculos foram realizados utilizando a fórmula abaixo.

$$\text{Balanço de massas} = \frac{(\text{Teor amostra estressada} + \text{PDs amostra estressada}) \times 100}{(\text{Teor amostra controle})} \quad (7)$$

Todos os valores foram superiores a 90 %, demonstrando que a degradação da nitrobenzoilcumarina é proporcional à formação dos produtos de degradação e que o método poderá ser utilizado como indicativo de estabilidade da molécula. Destaca-se que as divergências em relação ao valor teórico (100 %) podem ser atribuídas à diferença de absorvidade no ultravioleta entre produtos de degradação e a nitrobenzoilcumarina.

Todas as soluções preparadas na avaliação da estabilidade intrínseca da nitrobenzoilcumarina foram analisadas empregando o método cromatográfico desenvolvido e

utilizando detector de arranjo de diodos, objetivando avaliar a pureza dos picos de interesse. Não foram verificadas evidências de co-eluição de picos em nenhuma das soluções analisadas, comprovando a seletividade do método. A Tabela 12 apresenta os valores do parâmetro cromatográfico de resolução, calculado conforme preconizado pela farmacopeia americana (*United States Pharmacopeia – USP*) entre os picos da nitrobenzoilcumarina e seus produtos de degradação.

Tabela 15 - Parâmetros de resolução calculados entre os picos da nitrobenzoilcumarina e seus produtos de degradação.

Condição de estresse	TRR dos produtos de degradação	Resolução (USP)
NaOH 0,1M	TRR 1,27	5,2
CuSO ₄ 0,05M	TRR 1,28	5,5
	TRR 0,14	32,0
H ₂ O ₂ 1% (v/v)	TRR 0,38	25,1
	TRR 0,53	18,3

Fonte: Do autor.

Os produtos de degradação eluíram em tempos diferentes ao da nitrobenzoilcumarina. Além disso, a resolução entre todos os picos foi satisfatória, com valores superiores a 2,0, indicando uma completa separação entre os compostos e corroborando a seletividade do método cromatográfico desenvolvido (Collins; Braga; Bonato, 2014).

5.7 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Amostras da nitrobenzoilcumarina submetidas às condições de degradação por hidrólise básica, solução de íons metálicos e solução oxidativa foram analisadas por espectrometria de massas de baixa resolução a fim de determinar as relações massa/carga dos picos de interesse. As análises foram realizadas empregando um cromatógrafo UPLC *Acquity*, modelo *HClas* (*Waters, USA*) acoplado a um detector de arranjo de diodos e a um analisador de massas *Acquity QDa*. As condições cromatográficas utilizadas foram descritas no item 4.4.3.

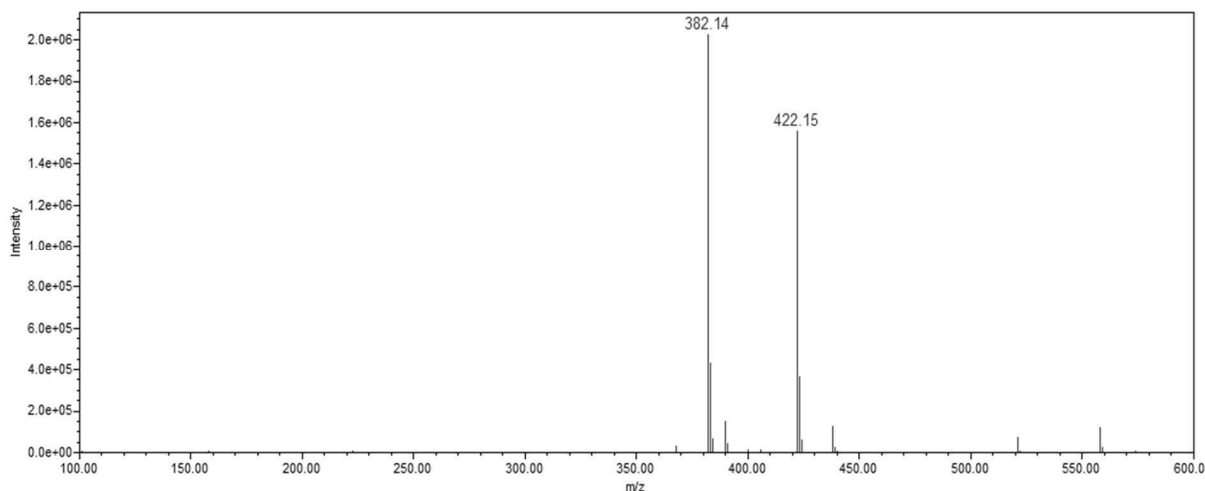
O método empregou a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência. Tal método corresponde a uma adaptação daquele inicialmente desenvolvido e validado pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. A mudança no método foi necessária devido às características do equipamento empregado na análise e otimização das condições de ionização dos analitos. Entretanto, as alterações realizadas não impactaram no perfil cromatográfico das soluções analisadas.

A utilização da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução foi utilizada como uma triagem inicial para se conhecer as relações massa/carga dos produtos de degradação obtidos nos estudos de degradação forçada e permitir a proposição de suas estruturas. Posteriormente, as amostras da nitrobenzoilcumarina submetidas à hidrólise básica, solução de íons metálicos e solução oxidativa foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução, modelo Q-TOF MS, disponível no laboratório de produtos naturais do departamento de química da Universidade Federal de São Carlos. As análises foram realizadas segundo as condições descritas no item 4.4.4, sendo utilizadas para comprovar as estruturas dos produtos de degradação inicialmente propostos a partir dos estudos empregando a técnica de espectrometria de massas de baixa resolução.

5.7.1 Elucidação estrutural do produto de degradação obtido a partir da hidrólise básica da nitrobenzoilcumarina empregando metanol como co-solvente

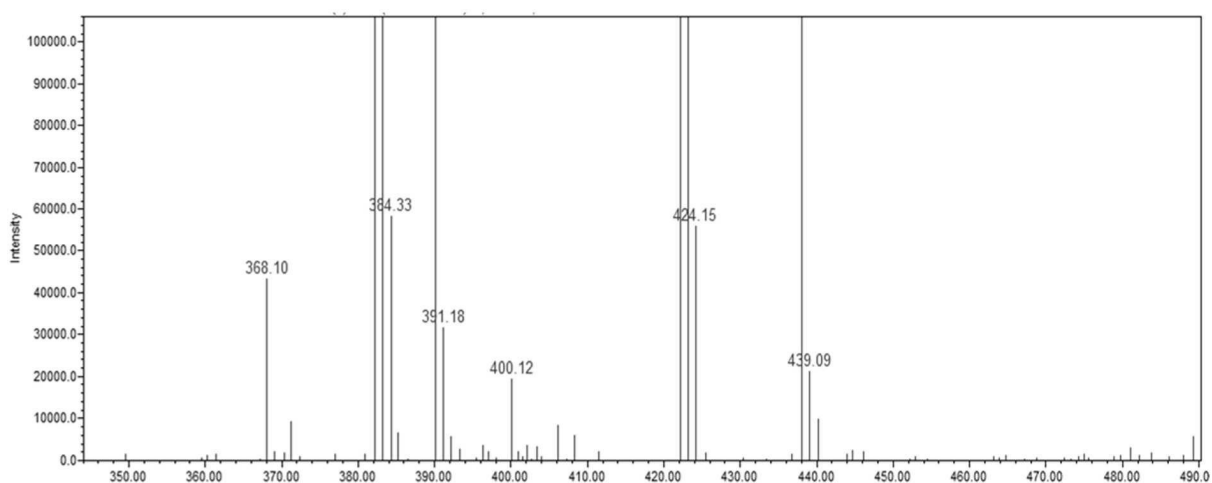
O espectro de massas de baixa resolução do produto de degradação obtido a partir da hidrólise básica da nitrobenzoilcumarina, que foi verificado com tempo de retenção relativo de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina, é apresentado na Figura 39 e sua ampliação na Figura 40.

Figura 39 - Espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando metanol como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C e tensão no cone 10 V.



Fonte: Do autor.

Figura 40 - Ampliação do espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando metanol como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C e tensão no cone 10 V.



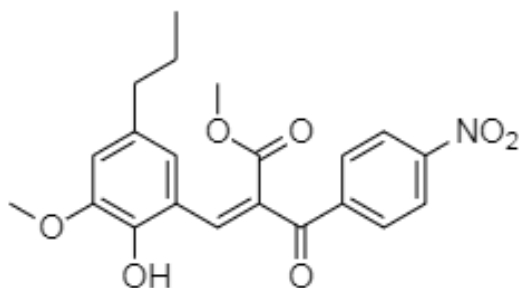
Fonte: Do autor.

Na Figura 39 evidenciam-se os íons de m/z 382,14 e 422,15. As relações massa/carga encontradas são condizentes com o produto de degradação da nitrobenzoilcumarina resultante da metanólise do grupo lactona presente na molécula. O íon 382,14 é resultante da perda de

uma molécula de água durante a ionização do PD. Já o íon 422,15 corresponde ao aduto de sódio do produto de degradação. Na Figura 40, correspondente à ampliação do espectro de massas do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 1,27, é evidenciada a presença do íon de m/z 400,12, o qual é condizente com íon molecular do PD formado devido à metanólise da nitrobenzoilcumarina.

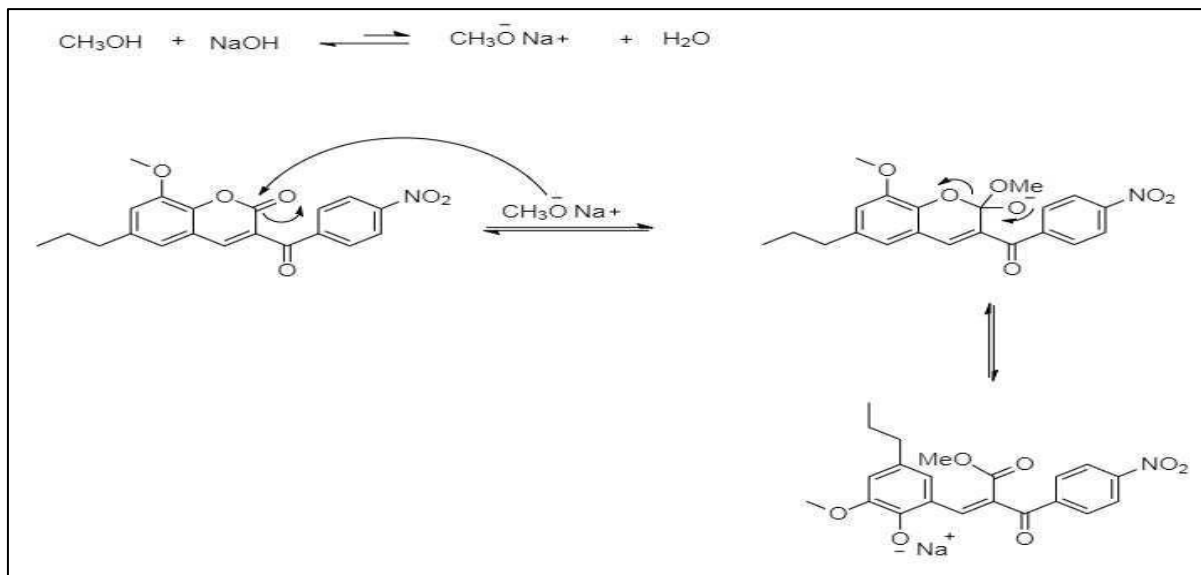
Com base nos resultados obtidos, a estrutura do produto de degradação resultante da metanólise na nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica é apresentada na Figura 41 e o mecanismo proposto para sua formação é ilustrado na Figura 42, corroborando as atribuições realizadas.

Figura 41 - Estrutura química proposta para o produto de degradação da nitrobenzoilcumarina formado pela metanólise do grupo lactona na condição de hidrólise básica. Fórmula molecular: $C_{21}H_{21}NO_7$. Massa molecular: $399,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Fonte: Do autor.

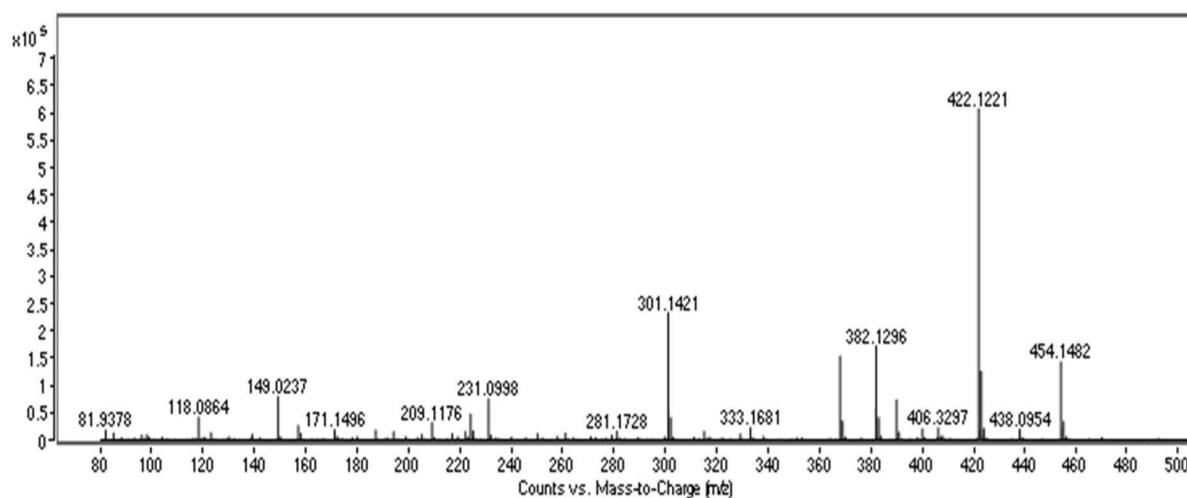
Figura 42 - Reação de metanólise da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona exposta à solução de NaOH 0,1M, utilizando metanol como co-solvente.



Fonte: Do autor.

Objetivando comprovar a atribuição realizada para o produto de degradação resultante da hidrólise básica da nitrobenzoilcumarina, foi obtido o espectro de massas de alta resolução do pico de interesse, o qual é apresentado na Figura 43.

Figura 43 - Espectro de massas de alta resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando metanol como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min⁻¹, nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s⁻¹.



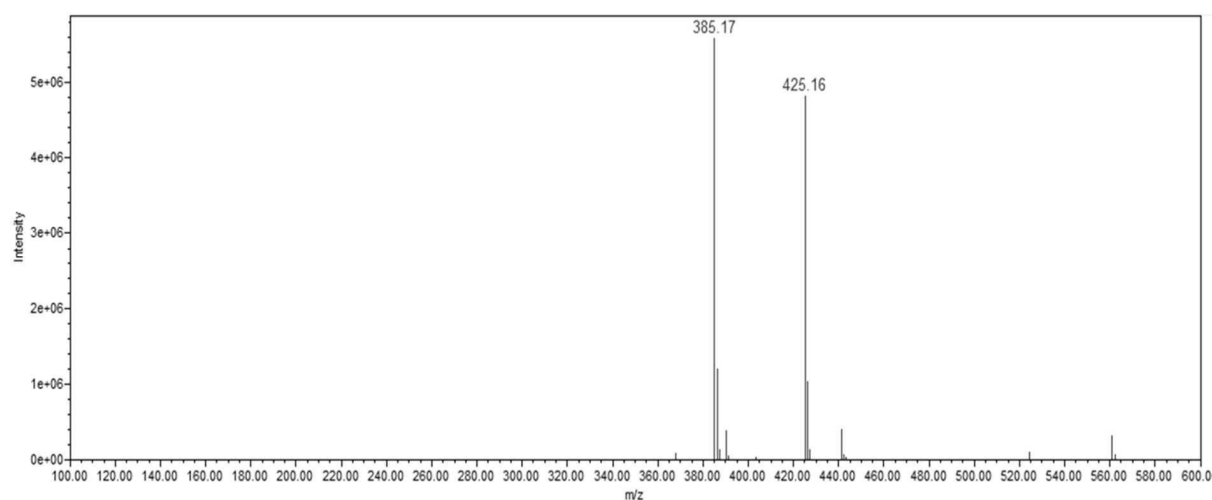
Fonte: Do autor.

Na figura acima, são observados os íons de relação massa/carga 382,1296 e 422,1221, os quais apresentam exatidão de massa (erro) de 1,5702 ppm e 1,1845 ppm, respectivamente, em relação às estruturas do fragmento de perda de água e do aduto de sódio do PD proposto. Conforme preconizado pela FDA para identificação de substâncias químicas pela técnica de espectrometria de massas, para experimentos que envolvam a quebra da molécula (MS/MS) são aceitos erros de até 10 ppm. Já na identificação de substâncias íntegras (MS¹), a exatidão de massa pode variar até o limite de 5 ppm (FDA, 2015). Sendo assim, os íons observados corroboram as atribuições realizadas, estando em conformidade com as estruturas propostas.

Em função dos resultados obtidos por espectrometria de massas, evidenciou-se que o composto formado durante o estudo de degradação forçada da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica equivale a um pseudo produto de degradação, oriundo da metanólise do grupo lactona presente na estrutura do derivado cumarínico. Tal fato deve-se à utilização do metanol como co-solvente durante o preparo da amostra.

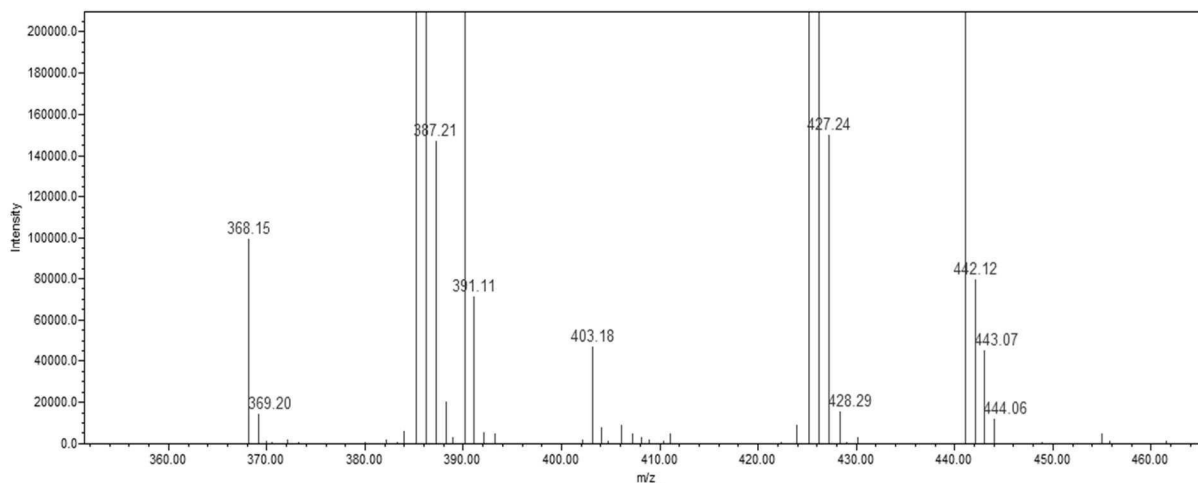
De modo a comprovar a interferência do diluente na formação do pseudo produto de degradação da nitrobenzoilcumarina observado na degradação em meio alcalino, foi preparada uma nova solução amostra. Entretanto, foi utilizado metanol deuterado como co-solvente. O espectro obtido e sua ampliação são mostrados nas Figuras 44 e 45, respectivamente.

Figura 44 - Espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando metanol deuterado como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.



Fonte: Do autor.

Figura 45 - Ampliação do espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 1,27 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica empregando metanol deuterado como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.



Fonte: Do autor.

Na Figura 44 são observados os íons de m/z 385,17 e 425,16. Já na Figura 45 destaca-se o íon de m/z 403,18. Estes resultados evidenciam um aumento de 3 unidades na relação massa/carga dos íons anteriormente discutidos devido à substituição dos átomos de hidrogênio da metoxila por átomos de deutério, comprovando a ocorrência da metanólise na formação do PD observado.

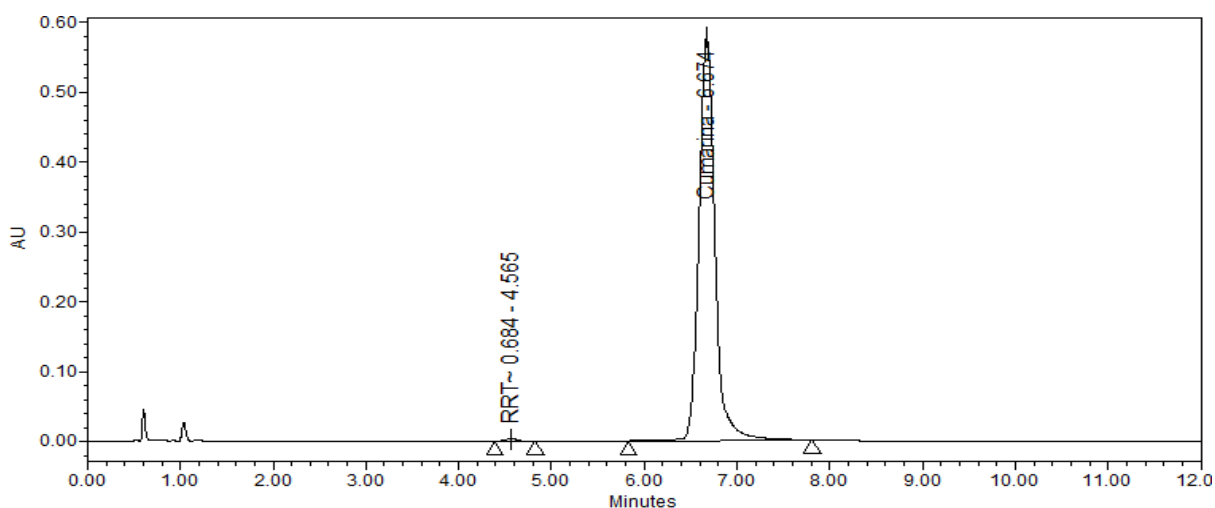
Uma vez que a nitrobenzoilcumarina demonstrou ser susceptível à degradação na presença de metanol, torna-se relevante destacar que o emprego desse solvente deve ser evitado em possíveis rotas sintéticas envolvendo a molécula, caso no futuro a substância venha a ser produzida utilizando uma rota alternativa. Além disso, em caso de processos de fabricação de formas sólidas que envolvam a etapa de granulação úmida, deve-se evitar a utilização de solventes polares nucleofílicos, tais como, etanol e isopropanol, os quais podem reagir com o grupo lactona presente na estrutura da nitrobenzoilcumarina, de forma semelhante ao ocorrido com o metanol.

5.7.2 Elucidação estrutural do produto de degradação obtido a partir da hidrólise básica da nitrobenzoilcumarina empregando acetonitrila como co-solvente

Objetivando eliminar o efeito do metanol na degradação da nitrobenzoilcumarina e avaliar a susceptibilidade da molécula à hidrólise básica, foi preparada uma nova amostra do

analito. Entretanto, foi utilizada acetonitrila como co-solvente, substituindo o metanol no preparo da amostra. Na Figura 46 é apresentado o cromatograma da solução amostra da nitrobenzoilcumarina exposta à hidrólise básica utilizando acetonitrila como co-solvente.

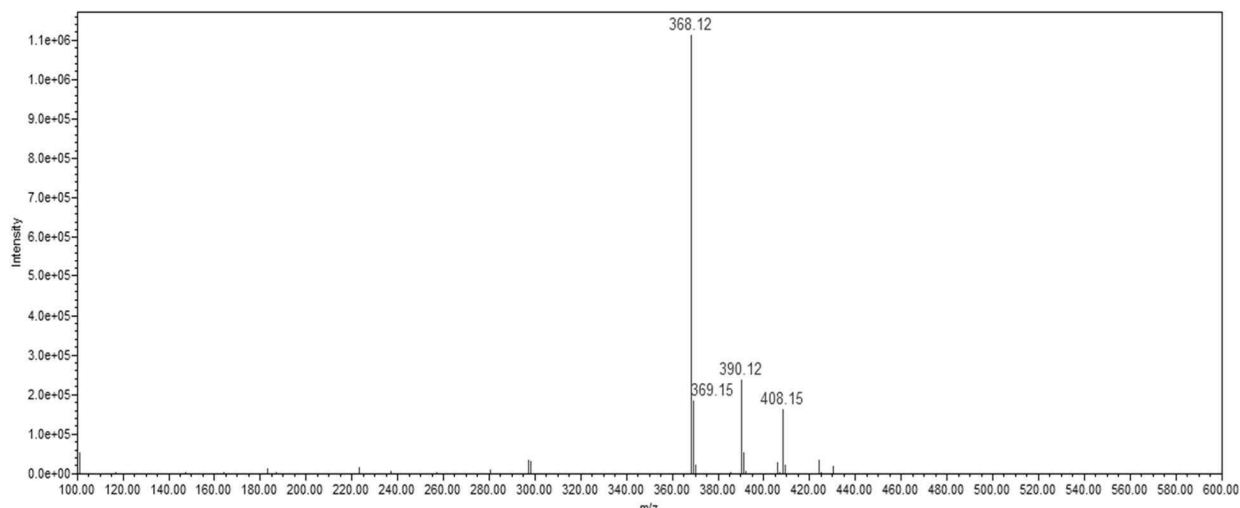
Figura 46 - Cromatograma do perfil de degradação da nitrobenzoilcumarina quando exposta à solução de NaOH 0,1 M utilizando acetonitrila como co-solvente. Fase móvel ácido trifluoroacético 0,1% em água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de 0,3 mL.min⁻¹ e detecção em 259 nm.



Fonte: Do autor.

Conforme apresentado na figura acima, foi verificada a formação de um produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,684 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina, quando a substância foi exposta à hidrólise básica sem utilização do metanol como co-solvente. Tal fato indica a suscetibilidade da nitrobenzoilcumarina a essa condição estresse. Destaca-se que o PD formado não interferiu no tempo de retenção da nitrobenzoilcumarina e dos outros produtos de degradação, não impactando na seletividade do método já validado. O espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,684 é apresentado na Figura 47.

Figura 47 - Espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 0,684 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica utilizando acetonitrila como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.

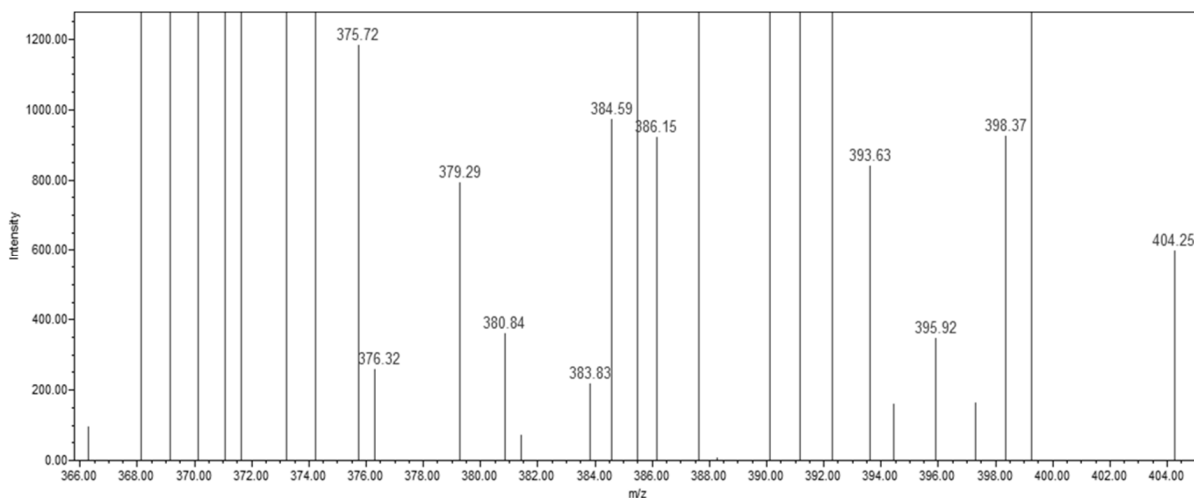


Fonte: Do autor.

No espectro de massas de baixa resolução obtido para o novo PD formado são verificados os íons de m/z 368,12, 390,12 e 408,15, os quais são condizentes com a estrutura proposta para o produto de degradação oriundo da hidrólise do grupo lactona presente na nitrobenzoilcumarina. O íon com m/z 368,12 corresponde à perda de uma molécula de água durante a ionização do PD. O íon de m/z 390,13 é equivalente ao aduto de sódio da molécula desidratada. Já o íon com m/z 408,16 é condizente com o aduto de sódio da estrutura proposta para o produto de degradação $(M+Na)^+$.

O espectro de massas ampliado do PD com TRR de 0,684 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina é apresentado na Figura 48.

Figura 48 - Ampliação do espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,684 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica empregando acetonitrila como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.

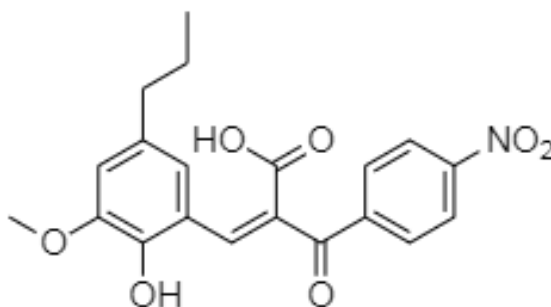


Fonte: Do autor.

Na ampliação do espectro de massas do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,684, é evidenciada a presença do íon de m/z 386,15, o qual é condizente com íon molecular do PD formado devido à hidrólise da nitrobenzoilcumarina $(M+H)^+$.

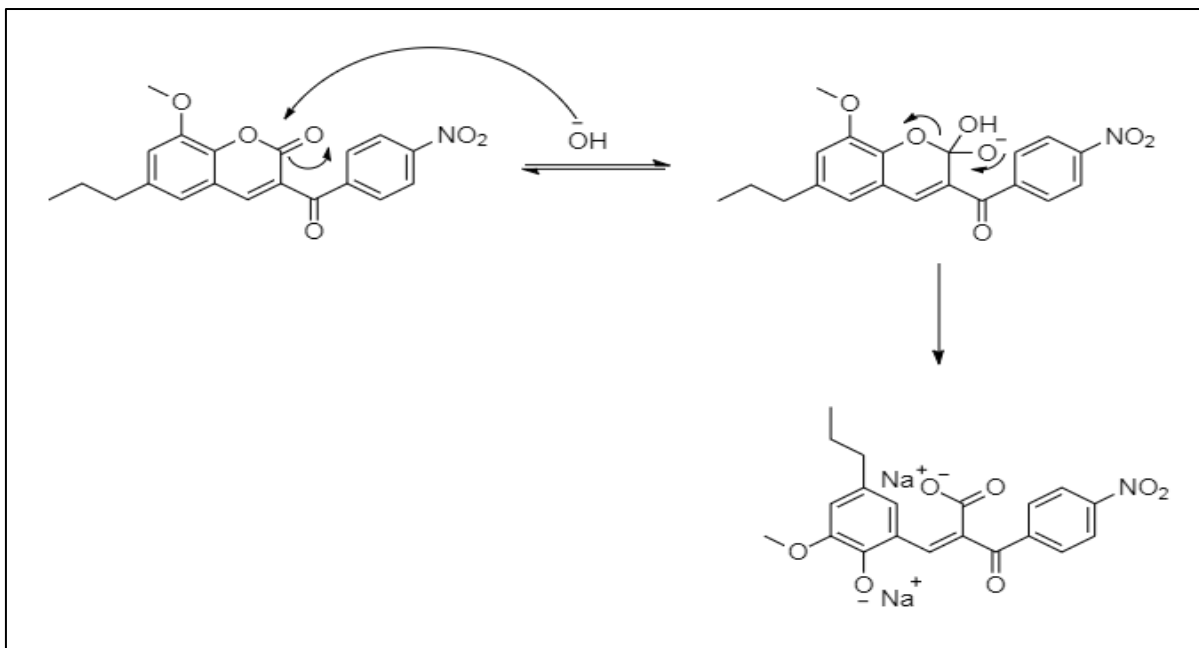
A estrutura do produto de degradação resultante da hidrólise na nitrobenzoilcumarina é apresentada na Figura 49 e o mecanismo proposto para sua formação é ilustrado na Figura 50, corroborando as atribuições realizadas.

Figura 49 - Estrutura química proposta para o produto de degradação da nitrobenzoilcumarina formado pela hidrólise do grupo lactona. Fórmula molecular: $C_{20}H_{19}NO_7$. Massa molecular: $385,4 \text{ g.mol}^{-1}$.



Fonte: Do autor.

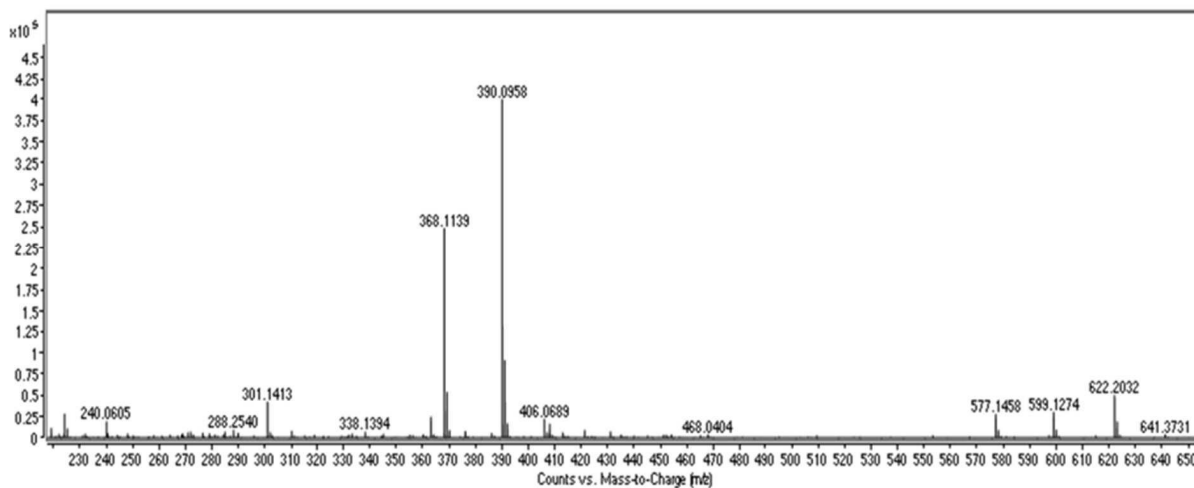
Figura 50 - Reação de hidrólise da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona exposta à solução de NaOH 0,1M.



Fonte: Do autor.

A fim de comprovar a atribuição realizada para o produto de degradação resultante da hidrólise básica da nitrobenzoilcumarina, foi obtido o espectro de massas de alta resolução do pico de interesse, o qual é apresentado na Figura 51.

Figura 51 - Espectro de massas de alta resolução obtido para o PD com TRR de 0,684 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na condição de hidrólise básica empregando acetonitrila como co-solvente. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min⁻¹, nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s⁻¹.



Fonte: Do autor.

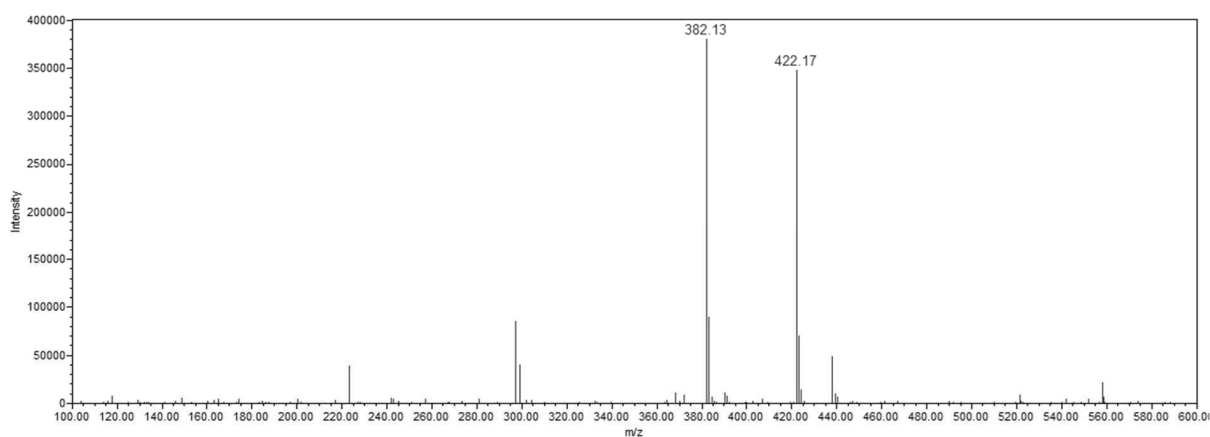
No espectro de massas de alta resolução obtido para o subproduto são observados os íons de relação massa/carga 368,1139 e 390,0958. Tais sinais apresentam erros de 1,3583 ppm e 1,0254 ppm, respectivamente, em relação às atribuições realizadas, confirmando a estrutura do produto de degradação oriundo da hidrólise da nitrobenzoilcumarina quando acetonitrila é utilizada como co-solvente.

Em função dos resultados obtidos por espectrometria de massas, evidenciou-se que o grupo lactona presente na estrutura da nitrobenzoilcumarina é susceptível à hidrólise em condições alcalinas, levando à formação do produto de degradação apresentado na Figura 49. Destaca-se que a reação mostrada na Figura 50 ocorre durante a exposição da nitrobenzoilcumarina ao agente degradante, não estando relacionada à ionização no espectrômetro de massas, uma vez que foi utilizada fase móvel acrescida de ácido durante às análises.

5.7.3 Elucidação estrutural do produto de degradação formado na exposição da nitrobenzoilcumarina à solução de íons metálicos

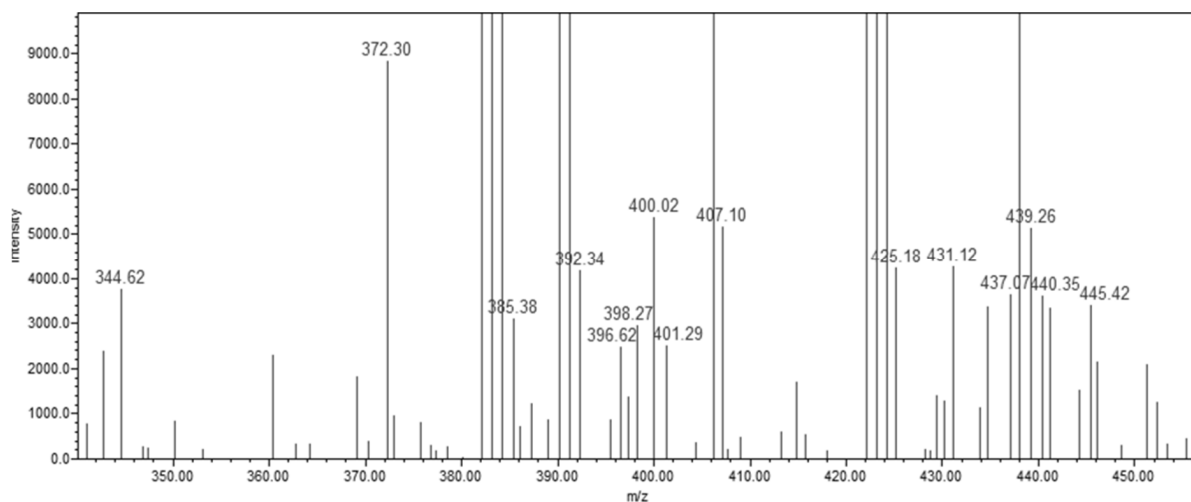
Na amostra exposta à solução de CuSO_4 0,05 M durante os estudos de estresse, foi observada a formação de um PD com tempo de retenção relativo de 1,28 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina. O espectro de massas de baixa resolução obtido a partir desse produto de degradação é mostrado na Figura 52. Já a sua ampliação é apresentada na Figura 53.

Figura 52 - Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 1,28 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de CuSO_4 0,05 M. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.



Fonte: Do autor.

Figura 53 - Espectro de massas ampliado obtido para o PD com TRR de 1,28 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de CuSO_4 0,05 M. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.

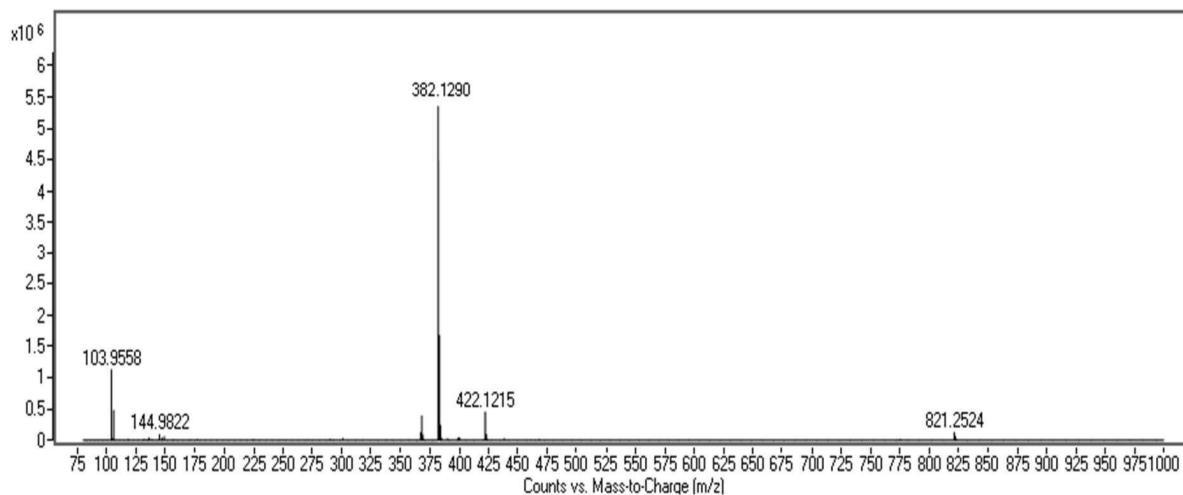


Fonte: Do autor.

Na Figura 52 é observada a presença dos íons de m/z 382,13 e 422,17. Já na Figura 53, destaca-se a presença do íon de m/z 400,02. Evidenciou-se que os espectros de massas obtidos para o produto de degradação da nitrobenzoilcumarina exposta à solução de CuSO_4 são semelhantes aos verificados para o PD formado em condições alcalinas utilizando metanol como co-solvente, sugerindo a formação do pseudo produto de degradação mostrado na Figura 41. Tal fato pode ser atribuído à complexação do cobre com o grupo carbonila, promovendo uma maior polarização da ligação do oxigênio com o carbono carbonílico e, conseqüentemente, favorecendo o ataque nucleofílico da metoxila (Min Li, 2012).

O espectro de massas de alta resolução obtido para o PD é mostrado na Figura 54.

Figura 54 - Espectro de massas de alta resolução obtido para o PD com TRR de 1,28 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de CuSO_4 0,05 M. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros. $\cdot\text{s}^{-1}$.



Fonte: Do autor.

Na figura acima evidencia-se a formação dos íons de relação massa/carga 382,1290 e 422,1215, os quais apresentam, respectivamente, erros de massa de 0,1047 ppm e 0,2369 ppm em relação às atribuições realizadas. Tais desvios estão dentro da margem de erro preconizada pela FDA para identificação de substâncias químicas utilizando a técnica de espectrometria de massas, comprovando a estrutura proposta para o PD.

Diante da suscetibilidade de nitrobenzoilcumarina a reações de metanólise catalisadas por íons metálicos, torna-se relevante o controle de metais, principalmente cátions bivalentes, em excipientes a serem utilizados em possíveis formulações que envolvam o derivado cumarínico. Além disso, uma vez que embalagens primárias também podem ser fonte de íons metálicos, o controle desses elementos deve ser considerado na seleção de materiais adequados. As mesmas precauções acima devem ser consideradas para prevenção da hidrólise da nitrobenzoilcumarina, uma vez que esse tipo de reação, a qual a molécula também é susceptível, pode ser catalisada por íons metálicos.

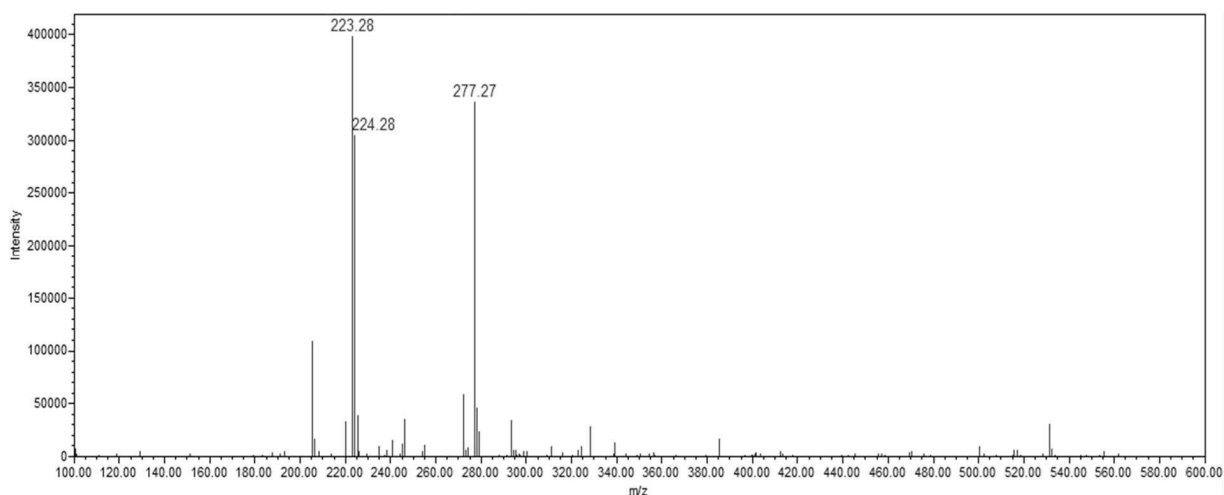
5.7.4 Elucidação estrutural dos produtos de degradação formados pela exposição da nitrobenzoilcumarina a condições oxidativas

Durante os estudos de estresse expondo a nitrobenzoilcumarina à solução de peróxido de hidrogênio 1 % (v/v) foi observada a formação de três produtos de degradação com tempos de retenção relativos de 0,14; 0,38 e 0,53 em relação ao pico da cumarina.

5.7.4.1 Elucidação estrutural do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina

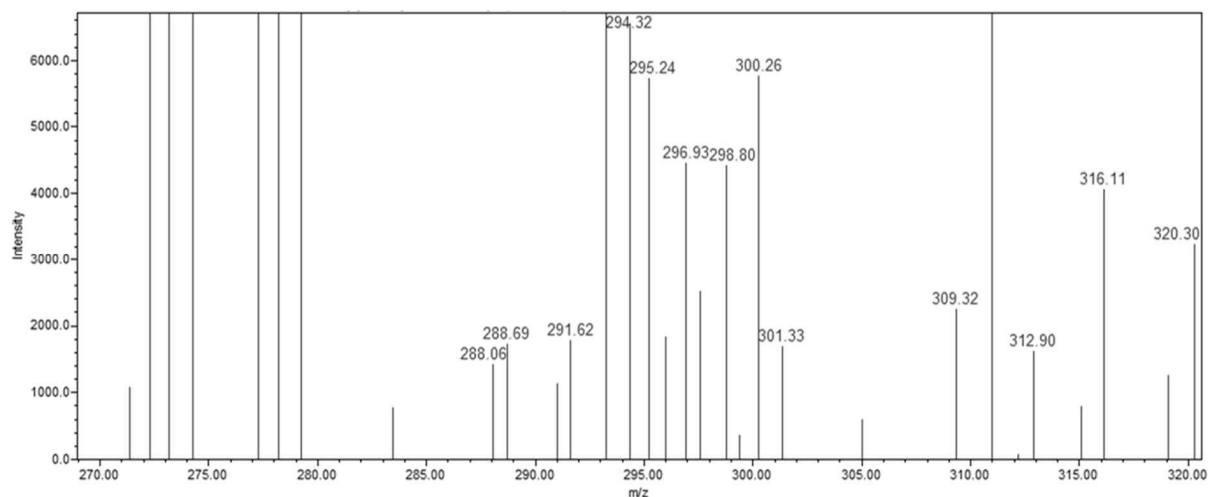
O espectro de massas de baixa resolução do PD com tempo de retenção relativo de 0,14, obtido quando a nitrobenzoilcumarina foi exposta à solução de H₂O₂ 1 % (v/v), é apresentado na Figura 55. Já a sua ampliação é mostrada na Figura 56.

Figura 55 - Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H₂O₂ 1 % (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.



Fonte: Do autor.

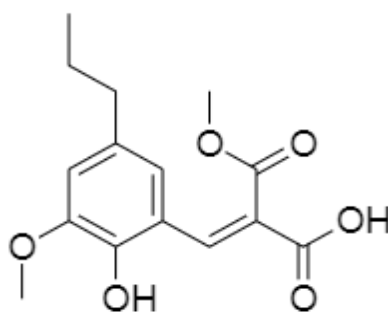
Figura 56 - Ampliação do espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H₂O₂ 1 % (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.



Fonte: Do autor.

Na Figura 55 é observado o íon de relação massa/carga 277,27. Já na Figura 56, destaca-se o íon de m/z 295,24. Tais sinais são condizentes com a estrutura mostrada na Figura 57, a qual é proposta para o produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra analisada. Ressalta-se que o íon de m/z 277,27 é resultante da perda de uma molécula de água durante a ionização do PD. Já o sinal com m/z 295,24 corresponde ao íon molecular do produto de degradação $[M+H]^+$.

Figura 57 - Estrutura química proposta para o produto de degradação com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina formado em condições oxidativas. Fórmula molecular: C₁₅H₁₈O₆. Massa molecular: 294,3 g.mol⁻¹.

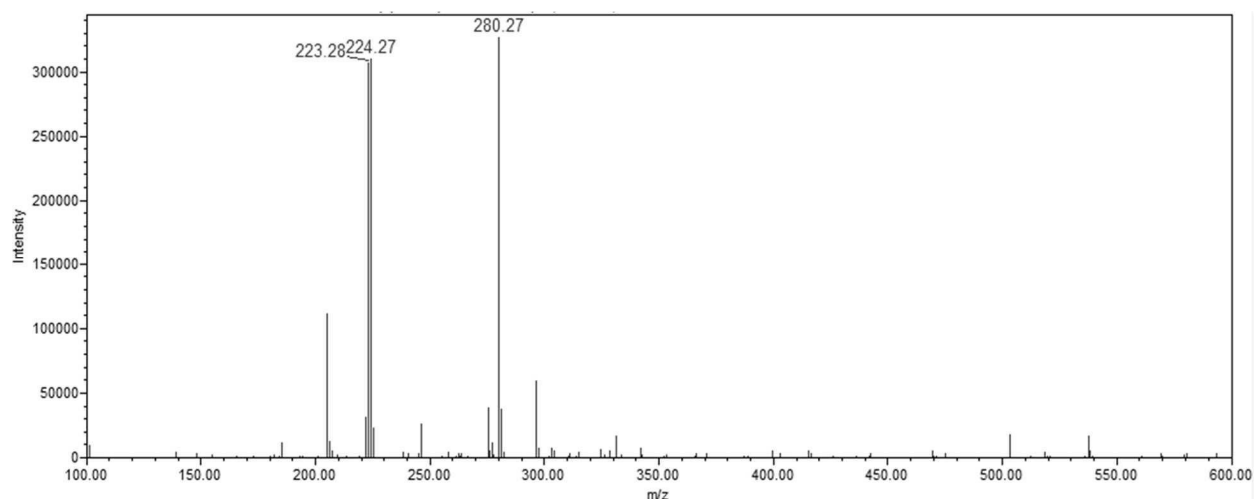


Fonte: Do autor.

A estrutura proposta para o produto de degradação com TRR de 0,14, observado quando da exposição da nitrobenzoilcumarina a condições oxidativas, sugere que o mesmo seja formado a partir da metanólise do grupo lactona e reação oxidativa do grupo cetona presente na estrutura do derivado cumarínico.

Objetivando comprovar a interferência do metanol na formação do pseudo produto de degradação apresentado na Figura 57, foram realizados ensaios utilizando metanol deuterado no preparo da amostra. O espectro de massas de baixa resolução obtido a partir do PD com TRR de 0,14 é apresentado na Figura 58.

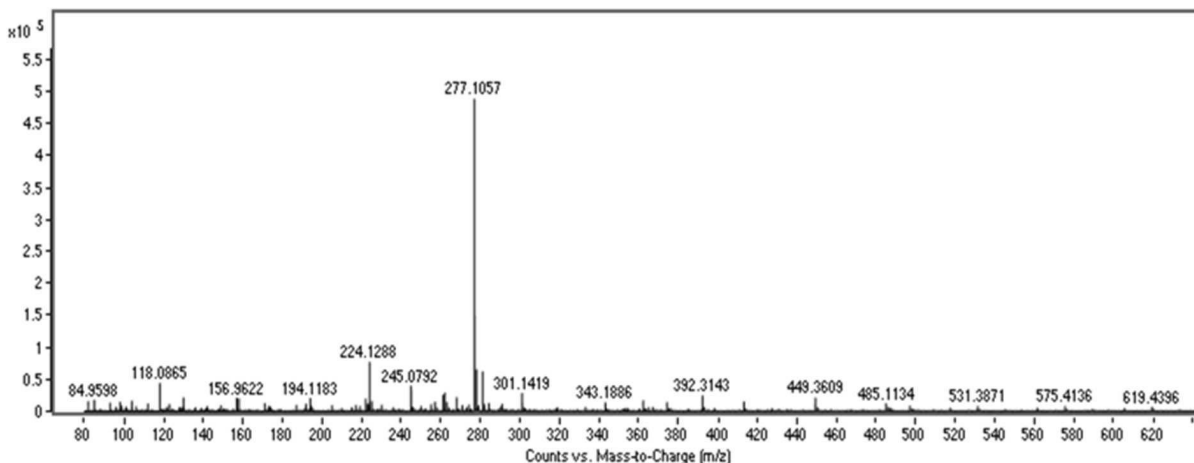
Figura 58 - Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H_2O_2 1 % (v/v) utilizando metanol deuterado. ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.



Fonte: Do autor.

Na figura acima, o íon com m/z 280,27 evidencia o aumento de três unidades na relação massa/carga do pico analisado. Tal fato deve-se à substituição dos hidrogênios presentes na metoxila por átomos de deutério e comprovam a interferência do metanol na formação do pseudo produto de degradação. O espectro de massas de alta resolução obtido para o PD é apresentado na Figura 59.

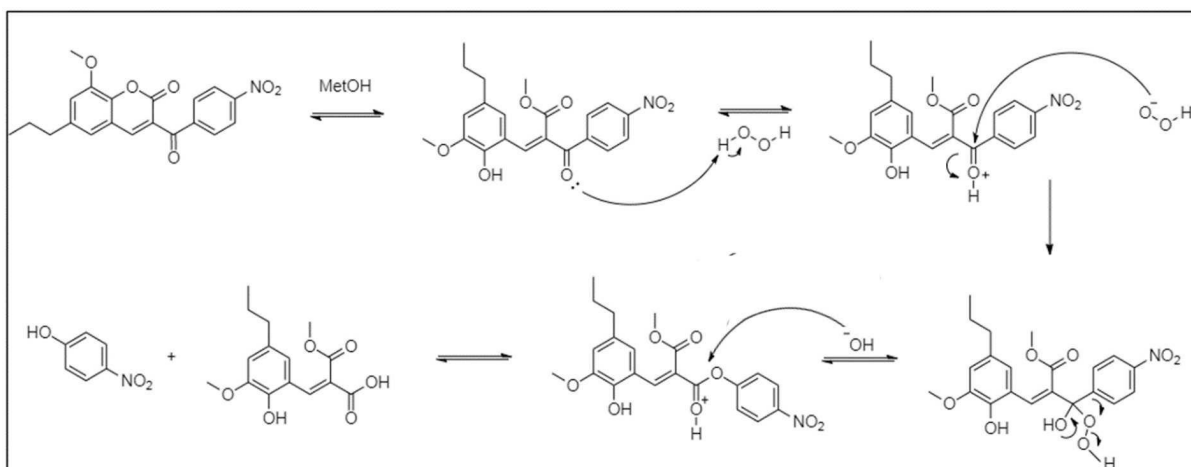
Figura 59 - Espectro de massas de alta resolução obtido para o PD com TRR de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H₂O₂ 1 % (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min⁻¹, nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s⁻¹.



Fonte: Do autor.

Evidencia-se na figura acima a presença do íon de m/z 277, 1057, o qual apresenta erro de massa de 8,3 ppm em relação à atribuição realizada. Conforme preconizado pela FDA para identificação de substâncias químicas pela técnica de espectrometria de massas, para experimentos que envolvam a quebra da molécula (MS/MS) são aceitos erros de até 10 ppm. (FDA, 2015). Sendo assim, o íon observado corrobora a atribuição realizada, estando em conformidade com a estrutura proposta. O mecanismo descrito para a formação do PD é apresentado na Figura 60.

Figura 60 - Mecanismo proposto para formação do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,14 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina quando exposta a condições oxidativas.



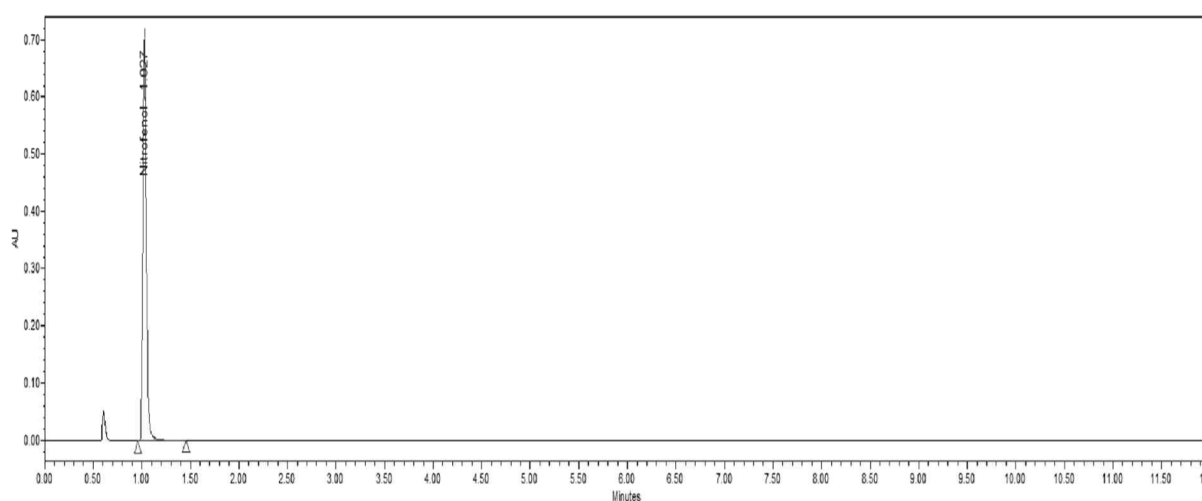
Fonte: Do autor.

Evidencia-se na figura acima a formação do PD com TRR de 0,14 a partir da oxidação do grupo cetona presente no pseudo produto de degradação formado pela metanólise da nitrobenzoilcumarina. O mecanismo apresentado é conhecido por oxidação de *Baeyer–Villiger*, levando à formação não radicalar de ésteres a partir de cetonas, quando da presença de peróxido de hidrogênio ou perácidos como agentes oxidantes. Destaca-se que o éster formado, por sua vez, sofre hidrólise, dando origem ao ácido carboxílico correspondente (Min Li, 2012).

A reação inicia-se com a protonação do oxigênio do grupo cetona presente na estrutura do PD oriundo da metanólise da nitrobenzoilcumarina, aumentando o caráter eletrofílico do carbono carbonílico. Posteriormente, ocorre o ataque nucleofílico do íon peróxido e formação de um intermediário. Em seguida, ocorre um rearranjo com o grupo nitrobenzeno migrando para o oxigênio do íon peróxido e levando à formação do éster, o qual sofre hidrólise, formando o produto de degradação majoritário quando da exposição da nitrobenzoilcumarina a condições oxidativas e a substância 4-nitrofenol.

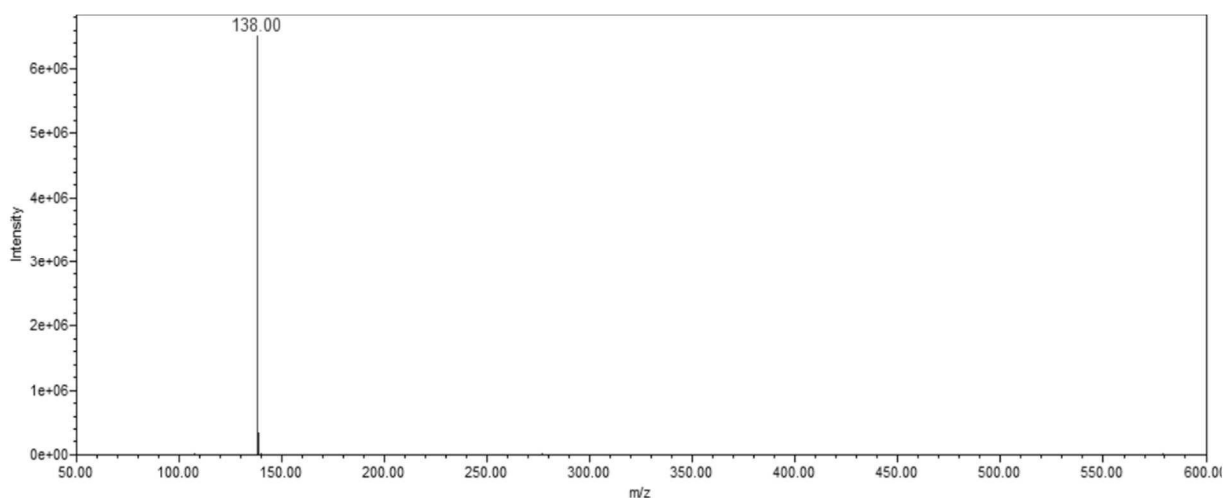
Objetivando comprovar o mecanismo reacional proposto para a formação do PD, foi preparada uma solução de 4-nitrofenol na concentração de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a qual foi injetada no cromatógrafo de ultra eficiência segundo as condições descritas no item 4.4.3. Entretanto, foi utilizada a fonte de ionização por *electrospray* no modo negativo, uma vez que o grupo fenol corresponde a um ácido fraco, facilitando assim a sua ionização. O cromatograma obtido e o espectro de massas do pico de interesse são apresentados nas Figuras 61 e 62, respectivamente.

Figura 61 - Cromatograma obtido para o 4-nitrofenol. Fase móvel ácido trifluoroacético 0,1% em água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção em 259 nm.



Fonte: Do autor.

Figura 62 - Espectro de massas de baixa resolução obtido para o 4-nitrofenol. ESI (-), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.

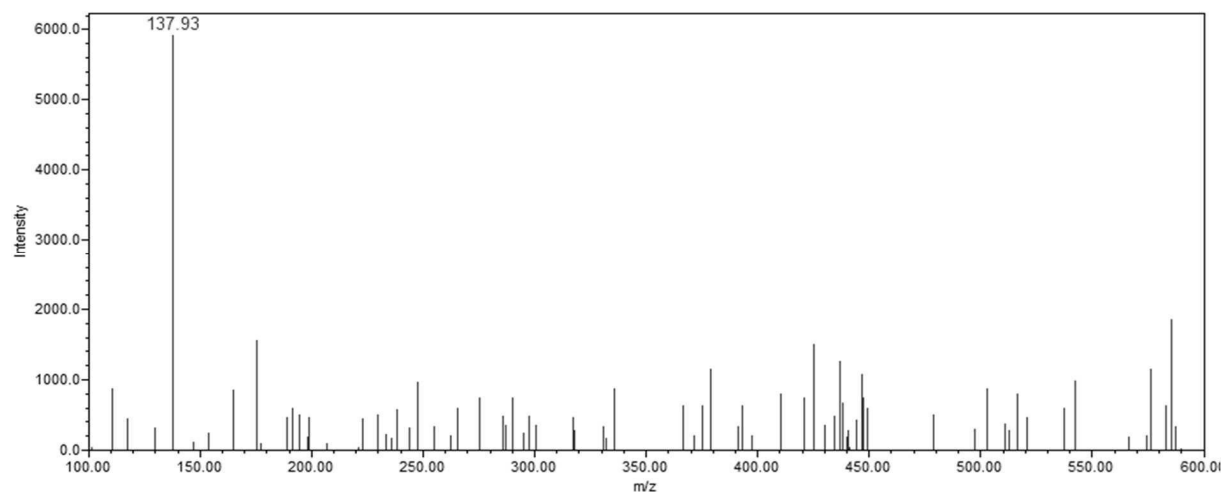


Fonte: Do autor.

Na Figura 61 é verificada a presença do pico do 4-nitrofenol em aproximadamente 1,0 minuto. Já a Figura 62 apresenta o íon de m/z 138,00, equivalente ao íon molecular do analito $[M-H]^-$.

A amostra da nitrobenzoilcumarina exposta à solução de H_2O_2 1 % v/v foi injetada segundo as mesmas condições analíticas. Posteriormente foi pesquisada a presença do íon de relação massa/carga equivalente ao 4-nitrofenol. O espectro de íons extraídos obtido é apresentado na Figura 63.

Figura 63 - Espectro de íons extraídos obtido para o 4-nitrofenol na amostra da nitrobenzoilcumarina exposta à degradação oxidativa. ESI (-), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.



Fonte: Do autor.

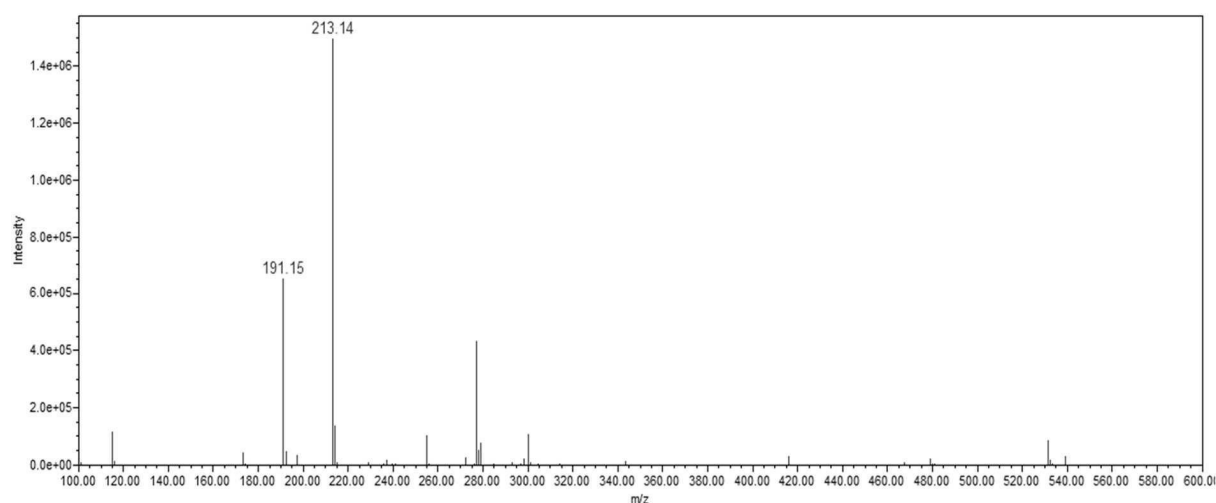
A Figura 63, correspondente ao espectro de íons extraídos da solução da nitrobenzoilcumarina exposta a condições oxidativas, demonstra a presença de um íon com relação massa/carga 137,93 no mesmo tempo de retenção que o 4-nitrofenol. Tal fato comprova que a nitrobenzoilcumarina sofre degradação oxidativa conforme o mecanismo proposto por *Baeyer–Villiger*, o qual é apresentado na Figura 60.

A presença de um segundo pseudo produto de degradação formado devido a utilização do metanol no preparo da amostra ressalta a importância de evitar esse solvente em possíveis rotas sintéticas envolvendo a nitrobenzoilcumarina, caso no futuro a substância venha a ser produzida utilizando rotas alternativas. Dessa forma, pode-se evitar a degradação do derivado cumarínico devido a presença de resíduos remanescentes de metanol no produto final, seja por reação direta ou por vias oxidativas.

5.7.4.2 Elucidação estrutural do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,38 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina

Para o produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,38 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina, quando exposta a condições oxidativas, foi obtido o espectro de massas de baixa resolução apresentado na Figura 64.

Figura 64 - Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,38 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H_2O_2 1% (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.

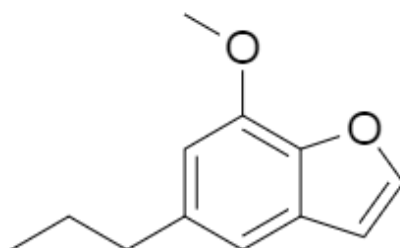


Fonte: Do autor.

Na figura acima é evidenciado o íon de relação massa/carga 191,15, o qual é condizente com a estrutura proposta para o PD mostrado na Figura 65. Já o íon de m/z 213,14 corresponde ao aduto de sódio do íon molecular.

Destaca-se que nos experimentos utilizando a técnica de espectrometria de massas de alta resolução, não foi verificada a presença dos íons relacionados à estrutura proposta para o PD. Tal fato pode ser atribuído ao tempo em que as amostras ficaram preparadas até a realização dos experimentos, uma vez que estas foram executadas em parceria com o laboratório de produtos naturais do departamento de química da Universidade Federal de São Carlos, podendo ter ocasionado a degradação do composto.

Figura 65 - Estrutura química proposta para o produto de degradação com TRR de 0,38 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina formado em condições oxidativas. Fórmula molecular: $C_{12}H_{14}O_2$. Massa molecular: $190,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

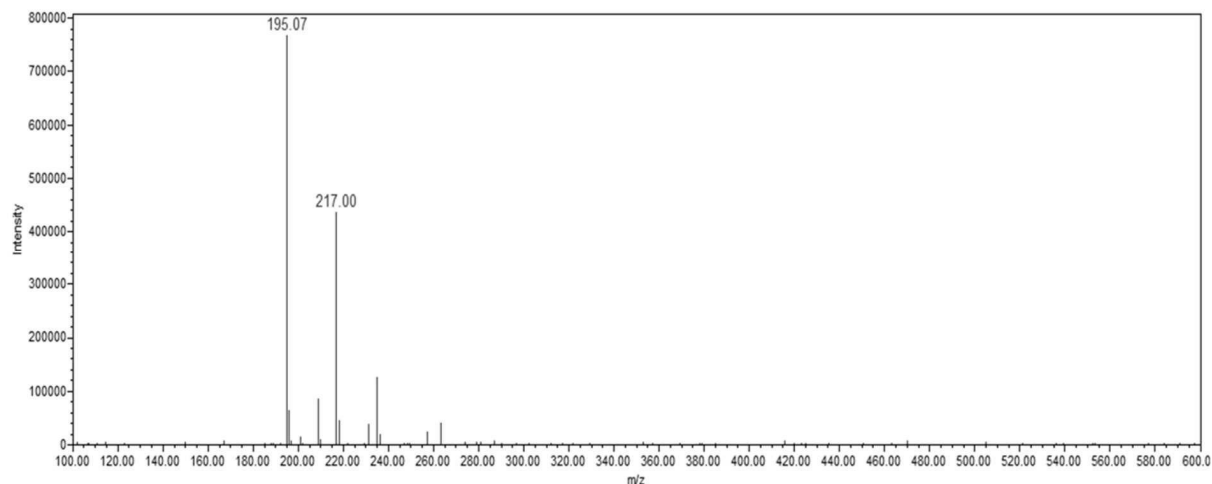


Fonte: Do autor.

5.7.4.3 Elucidação estrutural do produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,53 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina

Para o produto de degradação com tempo de retenção relativo de 0,53 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina, quando exposta a condições oxidativas, foi obtido o espectro de massas de baixa resolução apresentado na Figura 66.

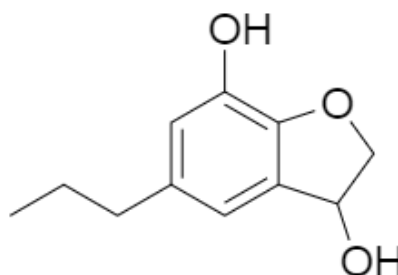
Figura 66 - Espectro de massas de baixa resolução obtido para o PD com TRR de 0,53 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H₂O₂ 1% (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 90 psi, temperatura da linha de dessolvatação 600 °C, temperatura da fonte 120 °C, tensão no capilar 0,8 kV e tensão no cone 10 V.



Fonte: Do autor.

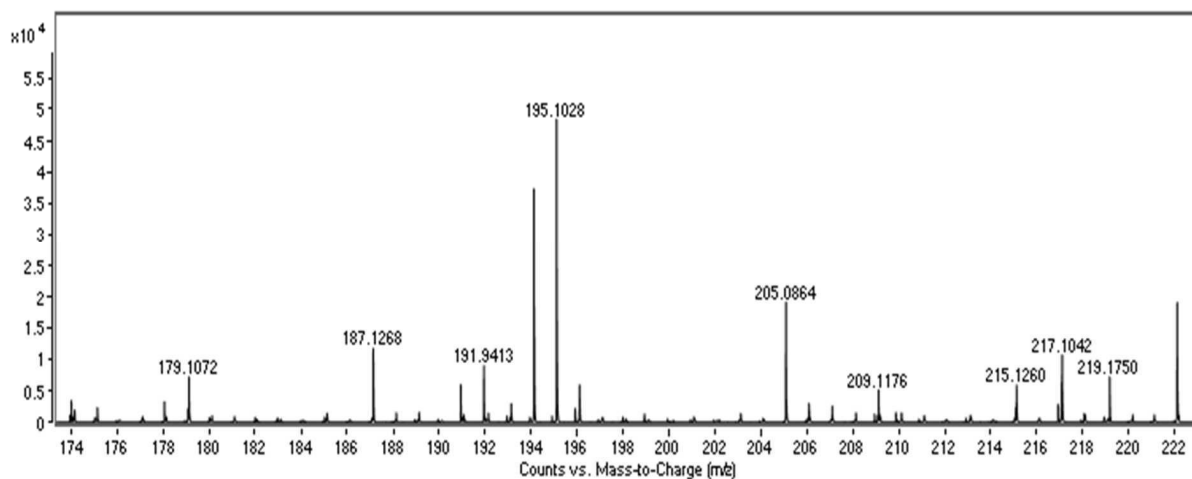
Conforme mostrado acima, foram verificados nos experimentos de massa de baixa resolução a presença dos íons de relação massa/carga 195,07 e 217,00, os quais são condizentes, respectivamente, com o íon molecular $[M+H]^+$ e o aduto de sódio $[M+Na]^+$ da estrutura proposta para o produto de degradação mostrado na Figura 67. Já o espectro de massas de alta resolução obtido para esse subproduto é apresentado na Figura 68.

Figura 67 - Estrutura química proposta para o produto de degradação com TRR de 0,53 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina formado em condições oxidativas. Fórmula molecular: C₁₁H₁₄O₃. Massa molecular: 194,2 g.mol⁻¹.



Fonte: Do autor.

Figura 68 - Espectro de massas de alta resolução obtido para o PD com TRR de 0,53 em relação ao pico da nitrobenzoilcumarina na amostra preparada com solução de H₂O₂ 1% (v/v). ESI (+), gás de dessolvatação nitrogênio 320 °C, fluxo de 12 L.min⁻¹, nebulizador 35 psi, voltagem no capilar 3200 V, tensão no cone 700 V e taxa de aquisição de 3 espectros.s⁻¹.

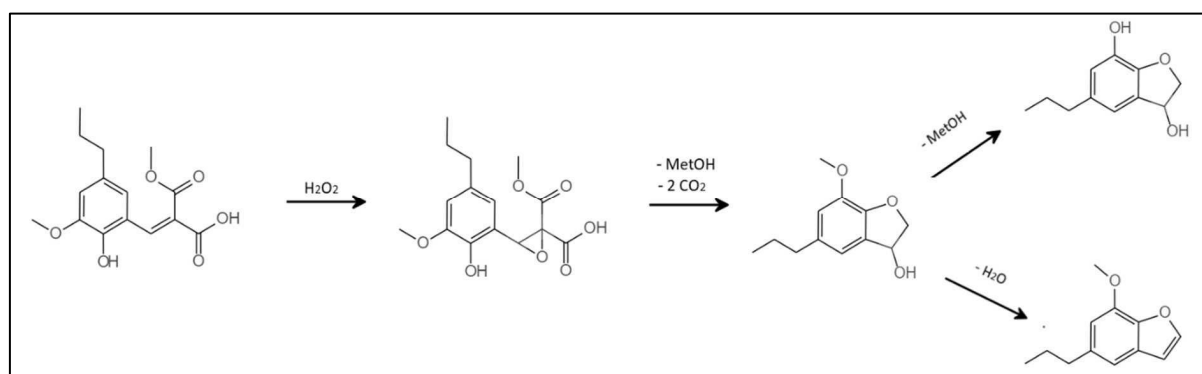


Fonte: Do autor.

Nos experimentos de UHPLC-HRMS, foi evidenciada a presença do íon de m/z 195,1028. Tal resultado é condizente com a estrutura proposta para o produto de degradação, sendo o erro calculado de 3,3828 ppm, o qual está dentro da faixa de aceitação de 5 ppm proposta pela FDA para identificação de substâncias químicas pela técnica de espectrometria de massas, corroborando a atribuição realizada (FDA, 2015).

Os resultados obtidos sugerem que os produtos de degradação com tempos de retenção relativos de 0,38 e 0,53 sejam formados a partir de reações subsequentes envolvendo o produto de degradação com TRR de 0,14, quando da exposição da nitrobenzoilcumarina a condições oxidativas, conforme mostrado na Figura 69.

Figura 69 - Esquema proposto para formação dos produtos de degradação com TRR de 0,38 e 0,53 quando da exposição da nitrobenzoilcumarina a condições oxidativas.

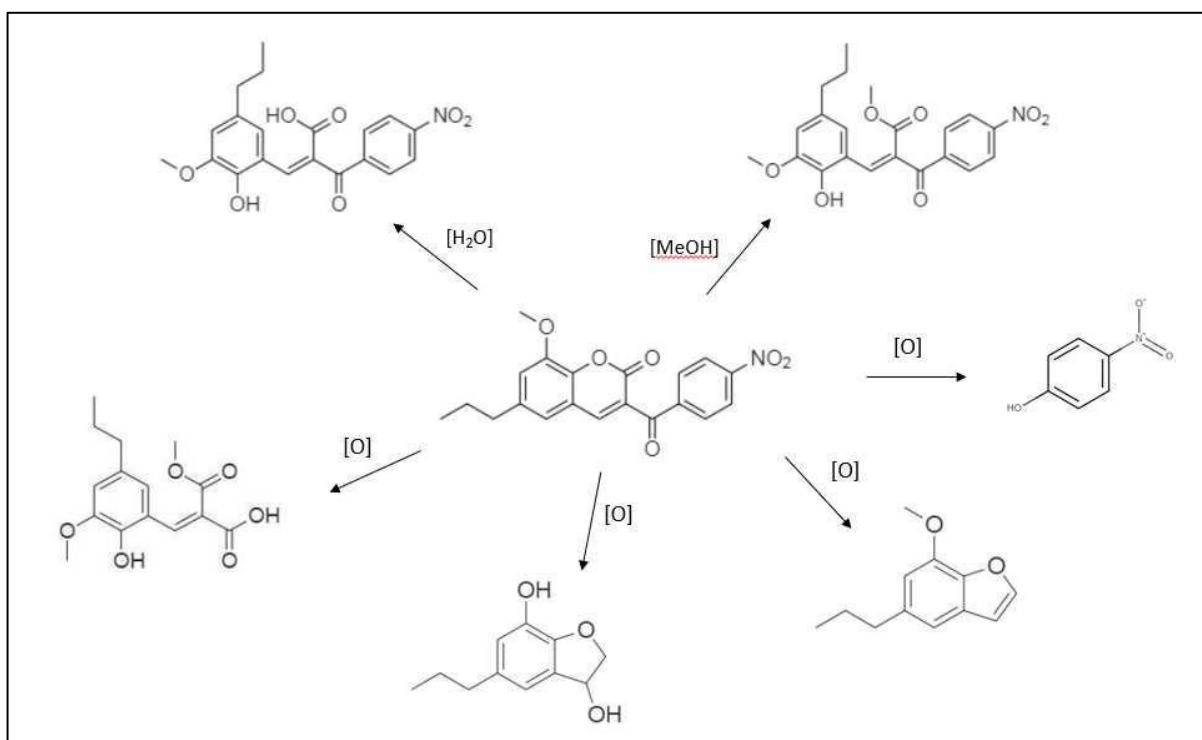


Fonte: Do autor.

No esquema proposto, o PD com tempo de retenção relativo de 0,14 é oxidado devido à presença de peróxido de hidrogênio no meio reacional, dando origem a um epóxido. Posteriormente, ocorre um ataque nucleofílico intramolecular e subseqüentes reações de descarboxilação, hidrólise e desidratação, levando aos produtos de degradação com tempos de retenção relativos de 0,38 e 0,53.

A Figura 70 resume todos os produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina que foram identificados durante os estudos de estresse e suas respectivas vias de formação.

Figura 70 - Produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina identificados durante os estudos de degradação forçada.



Fonte: Do autor.

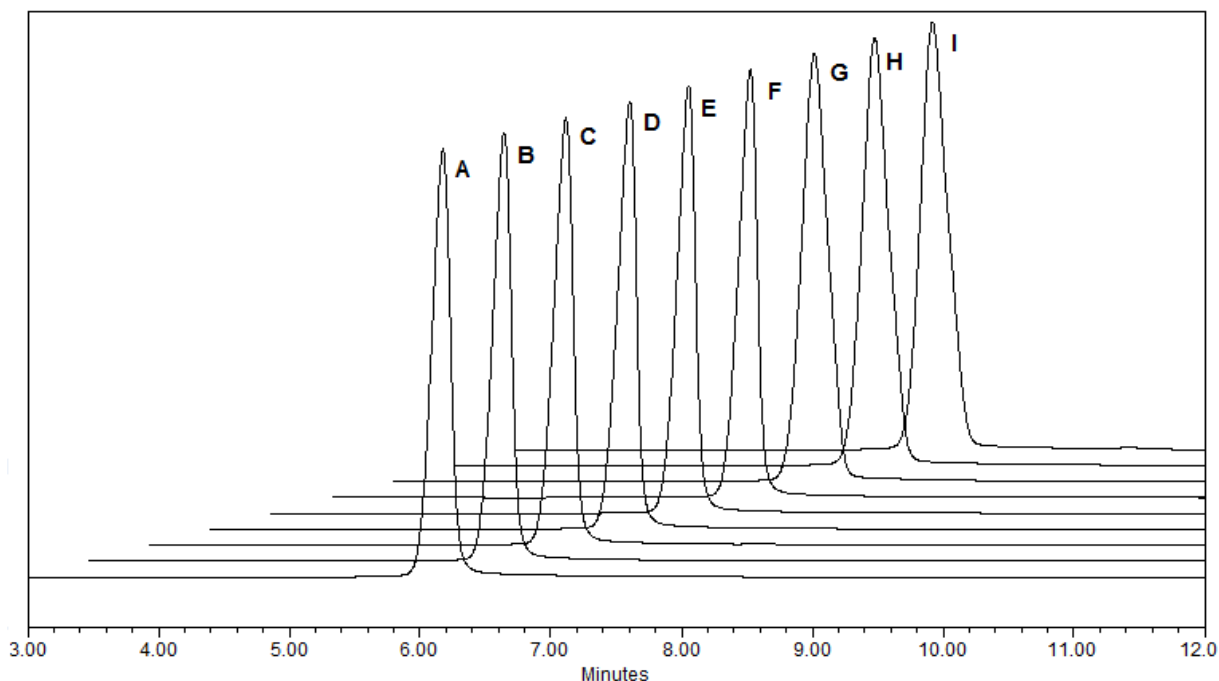
5.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA DA NITROBENZOILCUMARINA

A Figura 71 apresenta os resultados das análises para as amostras da nitrobenzoilcumarina analisadas no tempo zero e após 3 e 6 meses de incubação nas condições de estabilidade acelerada preconizadas pela RDC ANVISA n° 318/2019.

Foram preparadas 3 amostras individuais da nitrobenzoilcumarina para cada tempo de análise, as quais foram injetadas em duplicata no cromatógrafo empregando o método descrito no item 4.5. Foi utilizado um sistema HPLC *Alliance*, modelo 2695 (*Waters, USA*), acoplado

com detector UV. Os resultados das análises realizadas por HPLC durante o estudo de estabilidade acelerada são apresentados resumidamente na Tabela 13.

Figura 71 - Cromatogramas das amostras do estudo de estabilidade acelerada no tempo 0 e após 3 e 6 meses de incubação à $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa. Fase móvel água ultrapurificada e metanol 33:67 (v/v), coluna C18, fluxo de $2,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção em 259 nm .



Fonte: Do autor.

Nota: Resultados: Média (%) \pm coeficiente de variação entre as injeções.

Legenda: (A) Amostra 1 – Sem incubação - Teor: $99,0 \pm 0,71\%$;
 (B) Amostra 2 – Sem incubação - Teor: $100,5 \pm 0,07\%$;
 (C) Amostra 3 – Sem incubação - Teor: $100,7 \pm 0,07\%$;
 (D) Amostra 1 – 3 meses de incubação - Teor: $100,3 \pm 0,07\%$;
 (E) Amostra 2 – 3 meses de incubação - Teor: $100,5 \pm 0,07\%$;
 (F) Amostra 3 – 3 meses de incubação - Teor: $99,9 \pm 0,85\%$;
 (G) Amostra 1 – 6 meses de incubação – Teor: $99,5 \pm 0,51\%$;
 (H) Amostra 2 – 6 meses de incubação – Teor: $100,1 \pm 0,20\%$;
 (I) Amostra 3 – 6 meses de incubação – Teor: $99,3 \pm 0,31\%$.

Tabela 16 - Resultados do estudo de estabilidade acelerada.

(continua)

Tempo de Incubação	Replicatas			Média	IC
	1	2	3		
Inicial	99,0	100,5	100,7	100,1	3,4
3 meses	100,3	100,5	99,9	100,2	1,1

Tabela 17 - Resultados do estudo de estabilidade acelerada.

Tempo de Incubação	Replicatas			Média	IC
	1	2	3		
6 meses	99,5	100,1	99,3	99,6	1,0

Fonte: Do autor.

Notas: Incubação: Temperatura $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa $75\% \pm 5\%$;

Resultados: %;

IC = Intervalo de confiança: $n=3$, $\alpha=0,05$.

Conforme mostrado na Tabela 13, os intervalos de confiança calculados para as amostras demonstram que não há diferenças significativas entre os resultados obtidos no tempo inicial e após 3 e 6 meses de incubação ($p<0,05$). Não foram detectadas reduções significativas do teor da nitrobenzoilcumarina nas amostras analisadas. Paralelamente, não foi verificada a formação de produtos de degradação em nenhuma das amostras.

Os resultados obtidos indicam que a nitrobenzoilcumarina se manteve estável nas condições de temperatura e umidade avaliadas. Os PDs observados durante os estudos de degradação forçada não foram evidenciados. Tal fato é justificado pelas condições de estresse mais drásticas empregadas nos ensaios de degradação forçada, os quais objetivam obter o perfil de degradação potencial da substância analisada, o qual deve englobar o perfil de degradação real da molécula de interesse.

Diante dos resultados dos estudos de estabilidade acelerada, evidencia-se o potencial da nitrobenzoilcumarina como um futuro protótipo a fármaco, apresentando estabilidade satisfatória. Destaca-se que esses ensaios objetivam auxiliar na determinação do prazo de validade de um insumo farmacêutico ativo e avaliar o efeito de curtas excursões fora das condições de conservação recomendadas. Entretanto, para estimar o prazo de validade real da substância, estudos de estabilidade de longa duração devem ser realizados. Além disso, em caso de futuras formulações envolvendo a nitrobenzoilcumarina, devem ser adotadas precauções que minimizem as chances de degradação da molécula através da seleção adequada dos solventes utilizados na rota sintética e adoção de critérios de qualidade rígidos para os excipientes e materiais de embalagem, minimizando assim as chances dos PDs observados nos estudos de estresse serem formados.

5.9 ESTUDOS *IN SILICO* PARA PREDIÇÃO DE MUTAGENICIDADE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA NITROBENZOILCUMARINA

A identificação de impurezas e produtos de degradação com potencial genotóxico nas etapas iniciais de desenvolvimento de um candidato a fármaco constitui uma etapa relevante para obtenção de medicamentos seguros e eficazes. Em função do risco potencial associado à presença de impurezas genotóxicas em produtos farmacêuticos, as agências sanitárias de diversos países elaboraram normas visando o controle dessas substâncias. Os primeiros guias foram redigidos pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em 2006 e, posteriormente, pela FDA em 2008. Em 2017, buscando a harmonização entre as normas relacionadas ao assunto, a ICH publicou o guia ICH M7 (R1), intitulado “*Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceutical to limit potencial carcinogenic risk*”, o qual encontra-se em sua segunda revisão. As três agências citadas adotaram o conceito de limiar de preocupação toxicológica (TTC - *Threshold of Toxicological Concern*), o qual corresponde à ingestão aceitável de impurezas que teoricamente não representa risco à saúde humana para estabelecer limites permitidos de exposição (FDA, 2008; ICH, 2023a).

O guia ICH M7 (R2) divide as impurezas em 5 classes de acordo com seus potenciais mutagênicos e carcinogênicos e sugere medidas de controle a serem adotadas para cada classe. Na Tabela 14 resume-se as 5 classes de impurezas definidas pelo guia ICH M7 (R2) e as propostas de controle para cada tipo (ICH, 2023a).

Tabela 18 - Classificação das impurezas com relação à mutagenicidade e medidas de controle preconizadas pelo guia ICH M7 (R2).

(continua)

Classe	Definição	Ação proposta para controle
1	Carcinogênicos mutagênicos conhecidos	Controle igual ou inferior ao limite aceitável específico do composto
2	Mutagênicos conhecidos, mas com potencial carcinogênico desconhecido (mutagenicidade bacteriana positiva e sem dados de carcinogenicidade em roedores)	Controle igual ou inferior aos limites aceitáveis (TTC apropriado)

Tabela 19 - Classificação das impurezas com relação à mutagenicidade e medidas de controle preconizadas pelo guia ICH M7 (R2).

(conclusão)		
Classe	Definição	Ação proposta para controle
3	Alerta estrutural não relacionado à estrutura do IFA e sem dados de mutagenicidade	Controle igual ou inferior aos limites aceitáveis (TTC apropriado) ou teste de mutagenicidade bacteriana; Se não mutagênico = Classe 5 Se mutagênico = Classe 2
4	Alerta estrutural igual ao do IFA, testados e não mutagênicos	Tratar como impureza não-mutagênica
5	Nenhum alerta estrutural ou estrutura de alerta com dados suficientes para demonstrar falta de mutagenicidade ou carcinogenicidade	Tratar como impureza não-mutagênica

Fonte: Adaptado de ICH, 2023a.

Legenda: TTC = limiar de preocupação toxicológica, do inglês, “*Threshold of Toxicological Concern*”.

Na tabela acima, a classe 1 engloba substâncias químicas com potencial carcinogênico elevado, sendo aceitos valores de ingestão diária inferiores ao limite geral de 1,5 µg/dia. Dentre essas substâncias estão as aflatoxinas, compostos *N*-nitrosos e alquil-azóxicos. Na classe 2 estão agentes mutagênicos reconhecidos por testes de mutagenicidade bacteriana, mas que não possuem dados de carcinogênese em roedores para comprovar a atividade genotóxica *in vivo*. Tais substâncias devem ser controladas através do TTC apropriado, sendo aceita uma ingestão diária de até 1,5 µg/dia para a impureza. A classe 3 engloba substâncias com alerta estrutural relevante e distinto ao da substância medicamentosa de origem. Para esses compostos pode ser utilizado o valor de TTC de 1,5 µg/dia como ação de controle ou serem conduzidos testes adicionais para elucidar o grau de genotoxicidade da substância. Já as classes 4 e 5 englobam compostos comprovadamente não mutagênicos, sendo a exposição diária a tais substâncias controlada através dos limites especificados pelos guias ICH Q3A (R2) – “*Impurities in new drug substances*” e ICH Q3B (R2) – “*Impurities in new drug products*” (ICH, 2023a).

Para avaliação do potencial mutagênico, o guia ICH M7 (R2) preconiza a busca em literatura científica e em bancos de dados por informações relacionadas à carcinogenicidade e mutagenicidade da substância avaliada. Se não existirem dados para a impureza de interesse,

deve ser realizada uma avaliação das relações estrutura-atividade com foco em previsões de mutagenicidade bacteriana. Para tanto, pode ser realizada uma avaliação toxicológica computadorizada empregando metodologias QSAR complementares. Uma metodologia deve ser baseada em regras de especialistas e a segunda fundamentada em estatísticas (ICH, 2023a). Através dos resultados obtidos pelas duas metodologias complementares e por comparação com as predições relativas ao IFA, é possível classificar os compostos investigados segundo a Tabela 14.

A nitrobenzoilcumarina e seus produtos de degradação foram avaliados frente ao *endpoint* de mutagenicidade bacteriana *in vitro* (teste de Ames), utilizando o *softwares* Derek Nexus® e Sarah Nexus® (*Lhasa Limited, Leeds, Reino Unido*).

O *software* Derek Nexus® corresponde ao sistema especialista de predição de toxicidade em mamíferos e bactérias, sendo fundamentado em regras de reconhecimento de alertas estruturais escritas por analistas com habilitação técnico-científica. O programa utiliza dados disponibilizados por consórcio de instituições, dados confidenciais e dados da literatura não-confidenciais nas predições dos vários tipos de toxicidade (*endpoints*), possuindo em seu banco de dados mais de 872 alertas estruturais cadastrados. Caso a substância avaliada apresente algum alerta estrutural para a toxicidade pesquisada, esse alerta é classificado como equívoco, plausível, provável e certo. Estes níveis fornecem uma probabilidade da substância avaliada ser ativa frente ao *endpoint* pesquisado, baseando-se na semelhança estrutural dos compostos presentes no banco de dados do *software*. Em caso de ausência de alertas estruturais, o composto é classificado como negativo (Hemingway; Fowkes; Willians, 2017).

Já o *software* Sarah Nexus® é o sistema estatístico complementar de predição de toxicidade. Baseia-se em hipóteses positivas e negativas a partir de uma metodologia personalizada de fragmentação molecular e uma abordagem conhecida como rede auto-organizada (SOHN - *Self-organising hypothesis network*) em que se utiliza modelos de *machine-learning*. O *software* associa fragmentos moleculares às hipóteses de resultados positivos ou negativos para a toxicidade avaliada através de verificações de similaridade estrutural da molécula em estudo com o seu banco de dados, o qual possui mais de 12000 estruturas cadastradas. Sendo assim, para cada hipótese é atribuído um peso e um parâmetro de confiança. A confiança geral da predição é a média ponderada das hipóteses individuais, estando relacionada com a certeza dos resultados e confiabilidade dos modelos. Caso a confiança geral no resultado obtido fique abaixo de certo limite, o *software* indica uma previsão equívoca. Além disso, caso a molécula avaliada apresente fragmentos não presentes no banco

de dados, o *software* informa que a avaliação ficou fora de seu domínio (Hemingway; Fowkes; Willians, 2017).

As previsões obtidas pelos sistemas especialista e estatístico são combinadas, gerando uma previsão final, a qual segue as orientações da Tabela 15 para classificar o composto em estudo como positivo ou negativo para o *endpoint* pesquisado.

Tabela 20 - Matriz decisória para predições *in silico* utilizando os *softwares* Derek e Sarah Nexus®.

Software especialista	Software estatístico	Matriz decisória
Positivo	Positivo	Positivo para o <i>endpoint</i> pesquisado (Necessária forte evidência para refutar a predição)
Positivo	Fora de domínio ou equívoco	Positivo para o <i>endpoint</i> pesquisado (A ausência de uma segunda predição demonstra evidências insuficientes para refutar a predição realizada)
Positivo	Negativo	Incerto para o <i>endpoint</i> pesquisado (Concluir como positivo na ausência de evidências para refutar a predição)
Negativo	Fora de domínio ou equívoco	Incerto para o <i>endpoint</i> pesquisado (Concluir como positivo como medida conservatória ou apresentar evidências para refutar a predição)
Negativo	Negativo	Negativo para o <i>endpoint</i> pesquisado

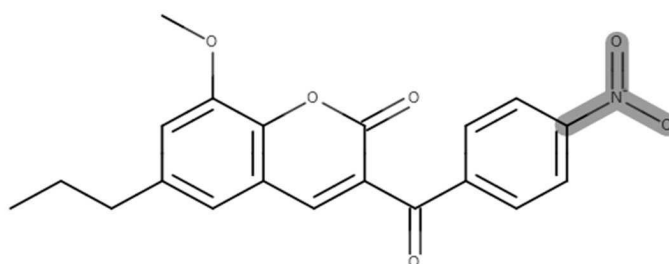
Fonte: Adaptado de Hemingway; Fowkes; Willians, 2017.

A matriz decisória indica uma maior certeza no resultado geral do composto analisado quando as previsões dos sistemas especialista e estatístico são concordantes. Em casos de discordância, devem ser pesquisadas evidências para corroborar a decisão tomada. Entretanto, caso o *software* especialista indique positivo para o *endpoint* pesquisado e o *software* estatístico demonstre resultado equívoco ou fora de domínio, o composto analisado deve ser considerado positivo, devido à grande confiabilidade nas predições do sistema especialista (Hemingway; Fowkes; Willians, 2017; Nakka *et al.*, 2023).

Para a realização dos estudos *in silico*, inicialmente foram avaliados os alertas estruturais presentes na molécula da nitrobenzoilcumarina frente ao *endpoint* de mutagenicidade bacteriana, conforme preconizado pelo guia ICH M7 (R2). A Figura 72 evidencia que o *software* Derek Nexus® identificou a presença do grupo nitro-aromático como

alerta estrutural, sendo a ele atribuído a classificação de plausível para o teste de Ames. Destaca-se que a nitrobenzoilcumarina apresenta alertas estruturais relacionados a outros *endpoints* de toxicidade, como por exemplo, o próprio anel cumarínico e o grupo cetona alfa-beta insaturado. Entretanto, apenas o grupo nitro-aromático está relacionado a casos de mutagenicidade bacteriana.

Figura 72 - Alerta estrutural nitro-aromático identificado na nitrobenzoilcumarina para o *endpoint* de mutagenicidade bacteriana.



Fonte: Derek Nexus® (Lhasa Limited, Leeds, Reino Unido).

Nitrocompostos aromáticos podem apresentar mutagenicidade no teste de Ames, principalmente em ensaios envolvendo cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 e ausência de ativação metabólica. Além disso, essa classe de compostos está relacionada a resultados positivos em ensaios de mutação genética em roedores. Entretanto, os resultados são variáveis em função da espécie animal utilizada, via de administração dos compostos, regime posológico e sensibilidade dos tecidos utilizados nos estudos (Debnath, 1992; Benigni; Andreoli; Giuliane, 1994).

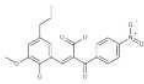





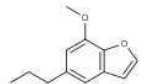


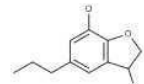


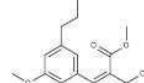


O mecanismo proposto para a mutagenicidade de compostos nitro-aromáticos envolve a redução do grupo nitro por ação de enzimas nitrorredutases, gerando hidroxilaminas e íons capazes de interagir com o material genético das células (Paula; Serrano; Tavares, 2009). O grau de mutagenicidade é dependente de diversos fatores, tais como, a facilidade de redução do grupo nitro, a taxa de remoção de intermediários metabólicos por outras vias bioquímicas e a estabilização dos derivados reativos por substituintes presentes no anel aromático. Sendo assim, embora o grupo nitro-aromático seja considerado um alerta estrutural, vários compostos dessa classe não são ativos no teste de Ames (Debnath, 1992).

Um outro ponto relacionado aos nitrocompostos aromáticos é a relevância do grupo nitro para a atividade biológica de fármacos de diferentes classes terapêuticas. A presença do

grupo nitro está relacionada com mudanças na estabilidade do fármaco intermediada por interações entre este grupo e o seu alvo molecular. Estas mudanças são geradas pela capacidade de redução do grupo nitro devido seu caráter aceptor de elétrons e pelo efeito de ressonância entre o nitrogênio e os dois átomos de oxigênio em sua estrutura. Sendo assim, diversos fármacos disponíveis comercialmente pertencem à classe dos nitrocompostos aromáticos, tais como, o anti-hipertensivo nifedipina, o antiangioso dinitrato de isossorbida, o anticoagulante acenocumarol, o anti-inflamatório nimesulida e os antimicrobianos metronidazol, benznidazol e nifurtimox (Paula; Serrano; Tavares, 2009). Destaca-se que todos os fármacos disponíveis comercialmente devem ser submetidos a rigorosos ensaios de segurança biológica, incluindo testes de mutagenicidade e toxicidade geral. Sendo assim, embora o grupo nitroaromático seja considerado um alerta estrutural, sua presença não é prova definitiva de mutagenicidade, devendo ser avaliada para cada caso (Benigni; Andreoli; Giuliane, 1994).

Para avaliação *in silico* da mutagenicidade dos produtos de degradação observados nos estudos de estresse realizados neste trabalho, foi considerado que a molécula da nitrobenzoilcumarina não apresenta potencial mutagênico e carcinogênico. Entretanto, destaca-se que estudos adicionais devam ser realizados para comprovar essas hipóteses, as quais foram sugeridas pelo teste de micronúcleo *in vitro* realizado com a molécula. Os resultados obtidos para a predição *in silico* da mutagenicidade dos produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina utilizando os *softwares* Derek® e Sarah Nexus® são apresentados na Figura 73, correspondente à saída dos *softwares* Derek Nexus® e Sarah Nexus®.

Figura 73 - Predição de mutagenicidade bacteriana *in silico* para os produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina realizada utilizando os *softwares* Derek Nexus® e Sarah Nexus®.

Structure	ICH M7 Class	Cohort of Concern	Derek Prediction	Sarah Prediction	Other QSAR Prediction	Experimental Data	Similarity to API	Overall In Silico
 PD_Hidrolise	Class 4	No				Carc: Unspecified Ames: Unspecified	All Alerts found in API PLAUSIBLE: Alert329 - Aromatic nitro compound	Positive
 PD_Metanolise	Class 4	No				Carc: Unspecified Ames: Unspecified	All Alerts found in API PLAUSIBLE: Alert329 - Aromatic nitro compound	Positive
 PD_Oxidacao_RRT_0,38	Class 5	No				Carc: Unspecified Ames: Unspecified	No Derek Alerts found	Negative
 PD_Oxidacao_RRT_0,53	Class 5	No				Carc: Unspecified Ames: Unspecified	No Derek Alerts found	Negative
 PD_Oxidacao_RRT_0,14	Class 5	No				Carc: Unspecified Ames: Unspecified	No Derek Alerts found	Negative

Fonte: Do autor.

Para a avaliação *in silico* da mutagenicidade dos produtos de degradação, foi avaliada a presença de alertas estruturais e comparada as estruturas dos PDs com a molécula de origem, considerando que a mesma não possui potencial mutagênico. Destaca-se que, embora os PDs de metanólise e oxidação da nitrobenzoilcumarina sejam considerados como pseudo produtos de degradação, ou seja, formados devido à interferência do metanol utilizado como co-solvente na etapa de preparo das amostras e não devido à instabilidade intrínseca da cumarina, optou-se por incluí-los dos estudos de mutagenicidade. Tal fato é justificado pela possibilidade do uso do metanol em uma futura rota sintética para obtenção da nitrobenzoilcumarina, já que o emprego desse solvente é comum em indústrias farmacêuticas, sendo produtos de degradação

oriundos da metanólise de fármacos descritos em monografias farmacopeicas, tais como, para as substâncias ácido azelaico e glibenclamida (USP, 2023).

Para os produtos de degradação obtidos por hidrólise e metanólise da nitrobenzoilcumarina, o *software* especialista identificou a presença do alerta estrutural nitroaromático, o qual está relacionado a resultados positivos para o *endpoint* de mutagenicidade. Já a previsão pelo *software* estatístico foi divergente, sugerindo ausência de atividade mutagênica. Sendo assim, conforme apresentado na Tabela 15, a previsão geral *in silico* para estes compostos foi positiva para o *endpoint* pesquisado. Entretanto, não foram encontrados nas estruturas dos PDs alertas estruturais diferentes do presente na molécula da nitrobenzoilcumarina. Sendo assim, espera-se que esses compostos não apresentem atividade mutagênica significativamente diferente da nitrobenzoilcumarina, permitindo considerá-los como não mutagênicos e classificá-los como classe 4 segundo o guia ICH M7 (R2) (ICH 2023a).

Para os produtos de degradação formados quando da exposição da nitrobenzoilcumarina a condições oxidativas, não foram encontrados alertas estruturais nas substâncias pesquisadas. Sendo assim, as previsões de mutagenicidade tanto para o *software* especialista quanto para o estatístico foram negativas, sendo estes compostos considerados como classe 5 segundo o guia ICH M7 (R2) (ICH 2023a).

A substância 4-nitrofenol, evidenciada durante os estudos de estresse da nitrobenzoilcumarina exposta a condições oxidativas, não foi inserida nos estudos *in silico* para previsão de mutagenicidade. Tal fato é justificado pela existência de estudos já descritos na literatura para a substância. Segundo Barcu *et al.* (2018), o 4-nitrofenol não apresenta atividade mutagênica em ensaios de mutagenicidade bacteriana. Sendo assim, os autores sugeriram classificá-lo como classe 5 segundo o guia ICH M7 (R2) (Barcu *et al.*, 2018).

Os resultados da avaliação *in silico* para a mutagenicidade de todos os produtos de degradação da nitrobenzoilcumarina demonstraram que não existem evidências para considerar as moléculas como mutagênicas. Tais resultados reforçam o potencial da nitrobenzoilcumarina como um promissor protótipo a fármaco a ser utilizado no combate à doença de Chagas e leishmaniose.

Estudos adicionais de mutagenicidade *in vitro*, de forma análoga ao realizado para a nitrobenzoilcumarina, estão sendo conduzidos para comprovar as predições *in silico* realizadas para os produtos de degradação. Além disso, estudos de citotoxicidade e atividade tripanocida também estão sendo realizados.

6 CONCLUSÕES

A síntese da nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona foi realizada conforme descrito por Brancaglione *et al.* (2018), utilizando o método de Duff e posterior reação de Knoevenagel entre formil-diidroeuogenol e 4-nitrobenzoilacetato de etila. O derivado cumarínico foi caracterizado pelas técnicas de FTIR, RMN, UPLC-MS, UHPLC-HRMS, TG e DSC. Os espectros obtidos por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas foram condizentes com a estrutura química da nitrobenzoilcumarina, comprovando que o produto sintetizado foi realmente a molécula de interesse.

As análises por termogravimetria demonstraram que o material sintetizado apresentava 0,55 % de impurezas voláteis e 0,066 % de impurezas inorgânicas. A análise por calorimetria exploratória diferencial evidenciou que a nitrobenzoilcumarina apresenta temperatura de fusão de 160,19 °C e entalpia de fusão de 79,857 J/g. Além disso, foi determinada uma pureza de 99,80 % para o material sintetizado utilizando a técnica de DSC.

O método cromatográfico desenvolvido para quantificação da nitrobenzoilcumarina e seus PDs foi validado, demonstrando ser adequado para os fins desejados. Na avaliação da estabilidade intrínseca da cumarina, foi verificado que a molécula sofre degradação quando exposta à hidrólise alcalina, condições oxidativas e solução de íons metálicos. Os PDs obtidos eluíram em tempos de retenção diferentes ao da nitrobenzoilcumarina, comprovando a seletividade do método.

Os PDs verificados nos estudos de degradação forçada foram identificados utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Evidenciou-se que o PD formado em condições alcalinas e em solução de íons metálicos corresponde a um pseudo produto de degradação oriundo da metanólise do grupo lactona presente na nitrobenzoilcumarina, devido a utilização do metanol como co-solvente. Entretanto, a substituição do metanol por acetonitrila na etapa de preparo da amostra, evidenciou a suscetibilidade da nitrobenzoilcumarina à degradação em meio básico. A interferência do metanol nos ensaios de degradação forçada também foi evidenciada quando da exposição do derivado cumarínico a condições oxidativas.

Os estudos de estabilidade acelerada demonstraram que a nitrobenzoilcumarina após seis meses de incubação não sofre degradação nas condições de temperatura e umidade preconizadas para o ensaio. Não foram evidenciados decaimentos significativos no teor das amostras analisadas ou a formação de produtos de degradação.

Os estudos biológicos demonstraram uma citotoxicidade dose dependente da nitrobenzoilcumarina frente às células da linhagem V79 empregadas nos ensaios, sendo determinada a concentração inibitória média de $238,98 \mu\text{M} \pm 23,11 \mu\text{M}$, semelhante a valores já reportados na literatura para os fármacos benznidazol e anfotericina B. Já os estudos de genotoxicidade revelaram que a nitrobenzoilcumarina pode ser considerada genotoxicologicamente segura em baixas concentrações.

Os estudos *in silico* para predição de mutagenicidade dos PDs da nitrobenzoilcumarina demonstraram ausência de alertas estruturais relacionados à atividade mutagênica ou ausência de alertas estruturais discrepantes entre a molécula de origem e seus subprodutos. Dessa forma, tais substâncias, quando comparadas à nitrobenzoilcumarina, podem ser consideradas seguras com relação ao potencial mutagênico. Estudos adicionais *in vitro* estão sendo realizados para comprovar a segurança biológica dos PDs.

Os trabalhos já publicados envolvendo a nitrobenzoilcumarina 8-metoxi-3-(4-nitrobenzoil)-6-propil-2H-croman-2-ona demonstraram que a substância possui atividade *in vitro* e *in vivo* semelhante a fármacos disponíveis comercialmente para o combate à doença de Chagas e leishmaniose. Adicionalmente, os estudos realizados neste trabalho comprovaram através de ensaios *in vitro* que a molécula apresenta baixa citotoxicidade e pode ser considerada mutagenicamente segura em baixas concentrações. Aliado a isso, a nitrobenzoilcumarina demonstrou ser estável em estudos de estabilidade acelerada e os PDs formados nos ensaios de estresse não apresentaram potencial mutagênico nas predições *in silico*. Sendo assim, os resultados obtidos estão em conformidade com as características esperadas para novos candidatos a fármacos, demonstrando o potencial da nitrobenzoilcumarina como uma promissora molécula a ser otimizada ou utilizada no combate à doença de Chagas e leishmaniose.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. A.; AL-GHOBASHY, M. A.; LOFTY, H. M. Investigation of the profile and kinetics of degradation of rivaroxaban using HPLC, TLC-densitometry and LC/MS/MS: Application to pre-formulation studies. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo, v. 53, p. 53-61, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RE nº485, de 19 de março de 2002**. Determina a publicação do guia para realização de estudos de estabilidade. Brasília, DF: ANVISA, 2002a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RE nº560, de 02 de abril de 2002**. Determina a publicação do guia para realização de estudos de estabilidade. Brasília, DF: ANVISA, 2002b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RE nº 398, de 12 de novembro de 2004**. Determina a publicação do guia para realização de estudos de estabilidade. Brasília, DF: ANVISA, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005**. Estudos de Estabilidade. Brasília, DF: ANVISA, 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Instrução normativa nº 4, de 11 de abril de 2007**. Determina a publicação do guia para realização de estudos de estabilidade para medicamentos dinamizados industrializados. Brasília, DF: ANVISA, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Informe Técnico nº 1, de 15 de julho de 2008**. Brasília, DF: ANVISA, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **RDC nº 50, de 20 de setembro de 2011**. Dispõe sobre as condições e procedimentos para realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós registro de produtos biológicos. Brasília, DF: ANVISA, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RE nº 45, de 09 de agosto de 2012**. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade em insumos farmacêuticos ativos. Brasília, DF: ANVISA, 2012a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Formulário nacional da farmacopeia brasileira**. Brasília, DF: ANVISA, 2012b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013**. Estabelece parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Brasília, DF: ANVISA, 2013a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 05 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RDC nº 25, de 14 de maio de 2013**. Dispõe sobre as condições e procedimentos para realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações de produtos biológicos. Brasília, DF: ANVISA, 2013b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 05 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RDC nº 53, de 04 de dezembro de 2015**. Estabelece parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Brasília, DF: ANVISA, 2015a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 05 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Guia nº 4, de 8 de dezembro de 2015**. Guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Brasília, DF: ANVISA, 2015b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 05 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília, DF: ANVISA, 2017a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 10 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **RDC nº 171, de 22 de agosto de 2017**. Revisa a aplicabilidade da RDC 53, de 04 de dezembro de 2015 para alterações pós registro e os prazos desta resolução para produtos já registrados. Brasília, DF: ANVISA, 2017b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 05 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Perguntas e respostas de 04 de outubro de 2017**. Assunto: esclarecimentos sobre a RDC 53/2015 e Guia 04/2015. Brasília, DF: ANVISA, 2017c. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Perguntas e respostas de 18 de julho de 2019**. Assunto: fluxo de análise de qualificação de impurezas e produtos de degradação de medicamentos classificados como sintéticos e semissintéticos. Brasília, DF: ANVISA, 2019a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução RDC nº 318, de 09 de novembro de 2019**. Estabelece os critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. Brasília, DF: ANVISA, 2019b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

AÏT-OUDHIA, K. *et al.* Leishmania antimony resistance: What we know what we can learn from the field. **Parasitology Research**, v. 109, n. 5, p. 1225-32, Nov. 2011.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 9th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for compositional analysis by thermogravimetry (E1131-08)**. West Conshohocken: ASTM, 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for purity by differential scanning calorimetry (E928-19)**. West Conshohocken: ASTM, 2019.

AMIN, A. *et al.* Antiprotozoal and antiglycation activities of sesquiterpene coumarins from *Ferula narthex* exudate. **Molecules**, v. 21, p. 1287, 2016.

ANSARI, S. B. *et al.* Design and synthesis of N-acyl and dimeric N-Arylpiperazine derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 137, p. 106593, Aug. 2023.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Appendix F: guidelines for standard method performance requirements**. Rockville: AOAC, 2016. Disponível em: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf. Acesso em: 20 jul. 2024.

ÁVILA BRUSTOLIN, A. *et al.* *In vitro* activity of cinnamaldehyde on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 236–237, May. 2022.

BALOGUN, E. O. *et al.* Discovery of trypanocidal coumarins with dual inhibition of both the glycerol kinase and alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 11, p. 13002-13013, 2019.

BAROT, K. P. *et al.* Recent advances and therapeutic journey of coumarins: current status and perspectives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, p. 2771-2798, 2015.

BASSAN, A. *et al.* *In silico* approaches in organ toxicity hazard assessment: current status and future needs in predicting liver toxicity. **Computational Toxicology**, v. 20, p. 100187, Nov. 2021.

BASUALTO, M. M. *et al.* Supramolecular hydrogels of cyclodextrin linked to calcium homopoly-L-gulonate for release of coumarins with trypanocidal activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 204, p. 170-181, 2018.

BELLUTI, F. *et al.* Toward the development of dual-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/trypanothione reductase inhibitors against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **ChemMedChem**, v. 9, n. 2, p. 371-382, 2014.

BEZERRA FILHO, C. S. M. *et al.* Piplartine-Inspired 3,4,5-Trimethoxycinnamates: trypanocidal, mechanism of action, and *in silico* evaluation. **Molecules**, v. 28, n. 11, p. 4512, June. 2023.

BOITZ, J. M.; ULLMAN, B. Amplification of adenine phosphoribosyltransferase suppresses the conditionally lethal growth and virulence phenotype of *Leishmania donovani* mutants lacking both hypoxanthine-guanine and xanthine phosphoribosyltransferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18555–18564, Jun. 2010.

BRANCAGLION, G. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activities of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one, a new synthetic coumarin of low cytotoxicity against mammalian cells. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 92, n. 5, p. 1888–1898, 1 Nov. 2018.

BUSCHINI, A. *et al.* Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. **Journal of Parasitology Research**, v. 2009, article ID 463575, 2009.

CLARK, G. S. Coumarin: an aroma chemical profile. **Perfumer e Flavorist**, v. 20, p. 23–34, 1995.

COELHO, G. S. *et al.* Design, synthesis, molecular modelling, and *in vitro* evaluation of tricyclic coumarins against *Trypanosoma cruzi*. **Chemical biology & drug design**, v. 93, n. 3, p. 337-350, 2019.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**, 5. ed. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2014.

CONTRERA, J. F. Validation of Toxtree and SciQSAR *in silico* predictive software using a publicly available benchmark mutagenicity database and their applicability for the qualification of impurities in pharmaceuticals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 2, p. 285–293, Nov. 2013.

CUELLAR, J. E. *et al.* Coumaro-chalcones synthesized under solvent-free conditions as potential agents against malaria, leishmania and trypanosomiasis. **Heliyon**, v. 8, n. 2, Feb. 2022.

CUNNINGHAM, M. L.; BEVERLEY, S. M. Pteridine salvage throughout the *Leishmania* infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 113, p. 199–213, 2001. Disponível em: www.parasitology-online.com. Acesso em: 03 jun. 2023.

DAVIS, R. A. *et al.* Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1539-1543, 2013.

DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vitro* micronucleus test: from past to future. **Mutat. Res. – Genet. Toxicol. Environ. Mutagen**, v. 607, n. 1, p. 2–4, 2006.

DE FIGUEIREDO PELOSO, E. *et al.* Investigation of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one as a promising coumarin compound for the development of a new and orally effective antileishmanial agent. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 11, p. 8465–8474, 1 Nov. 2020.

DORLO, T. P. C. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, Nov. 2012.

EASTMOND, D. A., TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 13, p. 34-43, 1989.

FACCI, J. *et al.* Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos. **Química Nova**, v. 43, n. 7, p. 959-973, 2020.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc**, v. 2, n. 5, p. 1084–1104, 2007.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health & Human Services. **Acceptance criteria for confirmation of identify of chemical residues using exact mass data within the office of foods and veterinary medicine**. USA: FDA, 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/foods-program-methods-validation-processes-and-guidelines>. Acesso em: 20 jul. 2024.

FRANCO, D. P. *et al.* A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova**, v. 44, n. 2, p. 180-197, 2021.

FREITAS, R. F. *et al.* Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Bioorg Med Chem**, v. 17, p. 2476-2482, 2009.

GALLOWAY, S. M. *et al.* Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v. 312, p. 241-261, 1994.

GANGULY, B. K.; BAGCHI, P. Studies on the ultraviolet absorption spectra of coumarins and chromones. Part I. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 1415–1419, Nov. 1956.

GEHRING, P. A. F. *et al.* Estabelecimento de condições para ensaio de dissolução de cápsulas de cinarizina empregando planejamento fatorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 455-461, 2011.

GONÇALVES, G. A. *et al.* Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 203, Oct. 2020.

GONG, X. R.; LEI, G.; LIU, Z. Q. Activity of coumarin oxadiazole appended phenol in inhibiting DNA oxidation and scavenging radical. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 6257-6261, 2015.

GUINEZ, R. F. *et al.* Synthesis and evaluation of antioxidante and trypanocidal properties of a selected series of coumarin derivates. **Future Med. Chem**, v. 5, n. 16, p. 1911-1922, 2013.

HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13088-13095, 2011.

HASSAN, N. W. *et al.* Modulating leishmanial pteridine metabolism machinery via some new coumarin-1,2,3-triazoles: design, synthesis and computational studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 253, May. 2023.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Stability testing: photostability testing of new drug substances and products (Q1B)**. Swiss: ICH, 1996. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 16 jun. 2023.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)**. Swiss: ICH, 2003. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 11 jun. 2024.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Impurities in new drug substances Q3A(R2)**. Swiss: ICH, 2006a. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 16 jun. 2023.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Impurities in new drug products Q3B(R2)**. Swiss: ICH, 2006b. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 16 jun. 2023.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potencial carcinogenic risk M7(R2)**. Swiss: ICH, 2023a. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 11 jun. 2024.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures Q2(R2)**. Swiss: ICH, 2023b. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 20 jun. 2024.

ISHYIAMA, M. S. M.; SASAMOTO, K.; MIZOGUCHI, M. A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. **Chemical Pharmacology Bulletin**, v. 41, p. 1118-1122, 1993.

KAMBERI, M.; RAPOZA, R. Stability testing of drug eluting stents. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Lille, v. 35, p. 58-68, 2016.

KARADE, N. N. *et al.* L-proline catalyzed solvent-free knoevenagel condensation for the synthesis of 3-substituted coumarins. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 1686-1689, Nov. 2007.

KATHAR, N. *et al.* Potential degradation products of abemaciclib: identification and structural characterization employing LC-Q/TOF-MS and NMR including mechanistic explanation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 237, p. 115762, Jan. 2024.

KIRSH-VOLDERS, M. *et al.* The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 873-899, 2011.

KRISHNAN, S. R. *et al.* Bioactivity-guided isolation of trypanocidal coumarins and dihydropyranochromones from selected *Apiaceae* plant species. **Phytochemistry**, v. 213, p. 113770, Sept. 2023.

LEITE, E. G. **Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos**. 2006. 178f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

MAZA VEGA, D. *et al.* Nanomaterials for diagnosis, treatment, and prevention of human cutaneous leishmaniasis: A review. **OpenNano**, v. 12, p. 100158, July. 2023.

MIN LI. **Organic chemistry of drug degradation**. United Kingdom: RSC Publishing, 2012.

MISHRA, S.; CHAUHAN, A.; RAMAJAYAM, R. Isolation, identification and structural characterization of forced degradation products of mocertinib using LC-MS/MS and NMR. **Results in Chemistry**, v. 7, p. 101465, Jan. 2024.

MOLINA, J. A.P.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, p. 82-94, 2018.

MOREIRA, G. F. *et al.* Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para Determinação da Pureza de Fármacos. **Produto & Produção**, v. 11, n. 1, Jan. 2010.

MOREIRA, W. *et al.* Proteomic analysis of metacyclogenesis in *Leishmania infantum* wild-type and PTR1 null mutant. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 171–183, Aug. 2014.

MÉDICOS SEM FRONTEIRA. **Doença de Chagas**. Genebra: MSF, 2024. Disponível em: <https://www.msf.org.br/>. Acesso em: 11 jun. 2024.

MYDEN, A. *et al.* Utility of published DNA reactivity alerts. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 77–86, Aug. 2017.

NAPOLITANO, H. B. *et al.* Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1847-1852, Mar. 2004.

NARAYANAM, M. *et al.* Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 191-217, 2014.

NEKOEI, S. *et al.* The anti-*Trypanosoma* activities of medicinal plants: A systematic review of the literature. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, p. 2738-2772, Nov. 2022.

NOGUEIRA, F. B. **Estudo dos genes que codificam as proteínas antioxidantes em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.** 2009. 151f. Tese (Doutorado em Ciências) – Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte - MG, 2009.

OLIARO-BOSSO, S. *et al.* Umbelliferone aminoalkyl derivatives as inhibitors of oxidosqualene cyclases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma cruzi* and *Pneumocystis carinii*. **Lipids**, v. 39, n. 10, 2004.

OLIARO-BOSSO, S. *et al.* Umbelliferone aminoalkyl derivatives as inhibitors of human oxidosqualene-lanosterol cyclase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 589–598, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline for the testing of chemicals 487: *in vitro* micronucleous test.** Paris: OECD, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Doença de Chagas.** Washington: OPAS, 2024.

PANDA, S. S.; BERA, R. K. V. V.; PRADH, S. S. Development and validation of a quality by design enabled robust LC method for estimation of daptomycin in pharmaceutical dosage form. **SSC PLUS**, v. 2, p. 397-404, 2019.

PASSARINI, G. M. *et al.* Natural and semisynthetic triterpenes from *Combretum leprosum* Mart. with antiplasmodial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 5, p. 483–490, 2022.

PAVÃO, F. *et al.* Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 520, p. 13-17, 2002.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289-298, 2014.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia.** 4. ed. São Paulo: Cengage Learnig, 2013.

PEDREIRO, E. S. D. **Análise *in silico* de impurezas provenientes da síntese de fármacos. Pesquisa de estrutura de alerta de genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade.** 2016. 52f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal, 2016.

PERES, R. B. *et al.* Antiparasitic activity of *Plumbago auriculata* extracts and its naphthoquinone plumbagin against *Trypanosoma cruzi*. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, May. 2023.

POZO-MARTÍNEZ, J. *et al.* Synthesis and study of the trypanocidal activity of catechol-containing 3-arylcoumarins, inclusion in β -cyclodextrin complexes and combination with benznidazole. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 3, Mar. 2022.

RABELLO, C. *et al.* The fecal, oral and skin microbiota of children with Chagas disease treated with benznidazole. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, e0212593, 2019.

REN, N.; ATYAH, M.; CHEN, W. Y. The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. **J Transl Med**, v. 15, n. 110, 2017.

RIBANI, M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos**. 2004. 96f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, UNICAMP, Campinas - SP, 2004.

ROBLEDO-O'RYAN, N. *et al.* Synthesis, antioxidant and antichagasic properties of a selected series of hydroxy-3-arylcoumarins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 621-632, 2017.

RODRÍGUES-HERNÁNDES, K. D. *et al.* Coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* produce ultrastructural alterations and affect *in vitro* infectivity of *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 61, 2019.

RODRÍGUES-HERNÁNDES, K. D. *et al.* Mammea type coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* induced apoptotic cell death of *Trypanosoma cruzi* through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, 2020.

SAJJADI, S. E. *et al.* Antileishmanial activity of prenylated coumarins isolated from *Ferulago angulata* and *Prangos asperula*. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 324, 2016.

SALOMON, C. J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 888-894, 2012.

SANDOVAL PACHECO, C. M. *et al.* Role of antigen-presenting cells in non-ulcerated skin lesions caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Parasite Immunology**, v. 45, n. 3, Mar. 2023.

SANGSHETTI, J. N. *et al.* Antileishmanial activity of novel indolyl-coumarin hybrids: design, synthesis, biological evaluation, molecular docking study and *in silico* ADME prediction. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 3, p. 829–835, 2016.

SANTOS, S. J.; TAKAHASHI, C. S.; NATARAJAN, A. T. Cytogenetic effects of the antichagasic benznidazole on human cells *in vitro*. **Mutation Research**, v. 320, p. 305-324, 1994.

SCHIMIDT, T. J. The potencial od secondary metabolites from plants as drugs or leas against protozoan neglected diseases – Part I. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2128-2175, 2012.

SCHROTEROVA, L. *et al.* Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparision of different cytotoxicity assays. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1406-1411, 2009.

SHAHBAZ, M. *et al.* Cocrystals of a coumarin derivative: an efficient approach towards anti-leishmanial cocrystals against MIL-resistant *Leishmania tropica*. **IUCrJ**, v. 11, n. 2, p. 224–236, Mar. 2024.

SIERRA, E. J. T. *et al.* Coumarins as potential antiprotozoal agents: biological activities and mechanism of action. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.31, p. 592-611, Oct. 2021.

SILVA, K. E. R. *et al.* Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Rev. Cienc. Farm. Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, p. 129-135, 2009.

SINGH, S. *et al.* A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Munster, v. 69, p. 148-173, 2012.

SKOOG, D. A. *et al.* **Princípios de análise instrumental**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

STEFANACHI, A. *et al.* Coumarin: a natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 250, 2018.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, p. 98-109, 2016.

TANOWITZ, H. B. *et al.* Chagas' disease. **Clin. Microbiol**, v. 5, p. 400-419, 1992.

TIWARI, N. *et al.* Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, Apr. 2017.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **General chapters <621>: chromatography**. Rockville: USP, 2023.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Benznidazole**. Washington: EPA, 2024.

VAZQUEZ-RODRIGUEZ, *et al.* Facing Chagas' Disease: trypanocidal properties of new coumarin-chalcone scaffolds. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 537-543, 2016.

VENUGOPALA, K. N. *et al.* Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **Bio Med Research International**, v. 2013, n. 963248, 2013.

VILA-NOVA, N. S. *et al.* Different susceptibilities of *Leishmania spp.* promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 334–338, Mar. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease**. Geneva: WHO, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The international pharmacopoeia**. Geneva: WHO, 2016.

YAO, B. *et al.* Characterization of two excipient interaction degradation products in oseltamivir phosphate powder for oral suspension by MS and NMR. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 57, n. 12, Dec. 2022.

YEPES, A. F. *et al.* 3-styrylcoumarin scaffold-based derivatives as a new approach for leishmaniasis intervention: biological and molecular modeling studies. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 48, n. 1, p. 81–94, Mar. 2024.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. **Statistical manual of the AOAC**. 48th ed. Arlington: AOAC International, 1975.

ZAHEER, Z. *et al.* Efficient one-pot synthesis, molecular docking and *in silico* adme prediction of bis-(4-hydroxycoumarin-3-yl) methane derivatives as antileishmanial agents. **EXCLI Journal**, v. 14, p. 935–947, Aug. 2015.

ZAHEER, Z. *et al.* Expeditious synthesis, antileishmanial and antioxidant activities of novel 3-substituted-4-hydroxycoumarin derivatives. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 2, p. 287–294, Feb. 2016.

ZEKI, N. M.; MUSTAFA, Y. F. 6,7-coumarin-heterocyclic hybrids: a comprehensive review of their natural sources, synthetic approaches, and bioactivity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1303, p. 137601, May. 2024.