

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

LEONARDO THOMAZINI

**Quantificação de Ingredientes Farmacêuticos em
um Analgésico Comercial por Ressonância
Magnética Nuclear**

SÃO CARLOS - SP

2024

LEONARDO THOMAZINI

Quantificação de Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFAs) em um analgésico comercial por Ressonância Magnética Nuclear

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Bacharel em Química

Orientador: Prof. Dr. Tiago Venâncio

SÃO CARLOS

2024

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS****DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET**

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 28/2024/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso**Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)****FOLHA DE APROVAÇÃO****LEONARDO THOMAZINI****QUANTIFICAÇÃO DE INGREDIENTES FARMACÊUTICOS EM UM ANALGÉSICO COMERCIAL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR****Trabalho de Conclusão de Curso****Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos**

São Carlos, 06 de setembro de 2024

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Prof. Dr. Tiago Venâncio
Membro da Banca 1	Dra. Fernanda Marins Ocampo
Membro da Banca 2	Dr. Gabriel Henrique Ribeiro



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Samuel Schwab, Professor(a)**, em 17/09/2024, às 10:50, 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.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1574711** e o código CRC **DB575AC2**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.001933/2024-38

SEI nº 1574711

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

Agradecimentos

Ao meu pai, Gilson, à minha mãe, Graziela, e à minha irmã, Gabriela, sem os quais nada disso seria possível.

Aos meus avós, Amâncio, Maria, Odracir e Evani (*in memoriam*), que sempre quiseram me ver formado.

Aos meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado em diversos momentos.

Aos amigos que fiz durante a graduação, Ana, Gustavo, Nathan, Pedro e Rafaela, que me proporcionaram bons momentos durante o curso.

Ao meu orientador, Tiago, por ter aceitado me orientar e pela paciência que teve ao me ensinar em todos os momentos que precisei.

Aos meus amigos do Laboratório de RMN, que me acolheram muito bem desde o primeiro dia.

Resumo

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma potente técnica de análise utilizada em diversas áreas, como na química de polímeros, alimentos e medicamentos, sendo uma técnica tanto qualitativa quanto quantitativa. O uso da técnica de modo quantitativo requer ajuste de alguns parâmetros, tal qual o tempo de espera entre um pulso e outro, D1, de forma que os *spins* tenham tempo para voltar ao estado de equilíbrio térmico. A RMN é uma técnica capaz de analisar misturas sem necessidade de separação. Uma das maneiras utilizadas é chamada “cromatografia de *spins*”, ou DOSY, que pode servir na análise de fármacos, uma vez que podem apresentar mais de um componente. Além do DOSY, abordaram-se técnicas como o TOCSY e o HSQC-TOCSY para a identificação, em especial, dos sinais dos excipientes. A análise de medicamentos é muito regulada e, no Brasil, este papel é conferido à Anvisa, com as regras descritas na Farmacopeia Brasileira. Este trabalho trata da análise por RMN de um analgésico comercial, qualitativa e quantitativamente, com foco nos seus componentes, dipirona, cafeína e isometepteno. Com uso do DOSY, atribuíram-se os sinais em 7.46 ppm à dipirona, em 7.98 ppm à cafeína e em 1.16 ppm ao isometepteno. Os sinais mencionados foram utilizados para a integração e para os cálculos de massa de cada componente. Uma das amostras apresentou degradação, com valores calculados dos três componentes abaixo do esperado. Nas outras duas, dipirona e cafeína estavam dentro do esperado e isometepteno se encontrava menor que o esperado.

Palavras-chave: Ressonância Magnética Nuclear; RMN; RMN quantitativo; RMNq; Fármacos.

Abstract

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is a powerful analytical technique used in various fields, such as polymer chemistry, food, and pharmaceuticals, being both a qualitative and quantitative technique. The quantitative use of the technique requires adjustment of some parameters, such as the relaxation delay time between pulses, D1, so that the spins have time to return to the thermal equilibrium state. NMR is a technique capable of analyzing mixtures without the need for separation. One of the methods used is called 'spin chromatography,' or DOSY, which can be useful in the analysis of drugs, as they may contain more than one component. Besides DOSY, techniques such as TOCSY and HSQC-TOCSY were also used for the identification, especially of the excipient signals. The analysis of pharmaceuticals is highly regulated, and in Brazil, this role is assigned to ANVISA, with the rules described in the Brazilian Pharmacopoeia. This work deals with the qualitative and quantitative NMR analysis of the commercial analgesic, focusing on its components, dipyron, caffeine, and isometheptene. Using DOSY, the signals were assigned as follows: 7.46 ppm to dipyron, 7.98 ppm to caffeine, and 1.13 ppm to isometheptene. These signals were used for integration and for calculating the mass of each component. One of the samples showed degradation, with calculated values for the three components below the expected levels. In the other two samples, dipyron and caffeine were within the expected range, while isometheptene was lower than expected.

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance; NMR; Quantitative NMR; qNMR; Drugs.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Movimento de precessão dos núcleos, originando um vetor magnetização do campo, M_0 , ao longo da direção de B_0 . Fonte: Elaborada pelo autor com base em SILVERSTEIN et al., (2005).....3
- Figura 1.2** - Multiplicidades dos sinais, seus nomes, suas respectivas intensidades e padrões de acoplamento dependendo do número de núcleos acoplados igualmente (n). Fonte: Silverstein (2005).....4
- Figura 1.3** - Sequência de pulso de Inversão-Recuperação e seu efeito sobre a magnetização. Fonte: Elaborada pelo autor.....6
- Figura 4.1** - Estruturas das moléculas principais do analgésico comercial estudado: dipirona, cafeína e isometepteno. Fonte: Autor.....15
- Figura 4.2** - Espectro previsto de RMN de ^1H para a dipirona. Fonte: PATINY, [s.d.].....16
- Figura 4.3** - Espectro previsto de RMN de ^1H para a cafeína. Fonte: Human Metabolome Database.....16
- Figura 4.4** - Espectro previsto de RMN de ^1H para o isometepteno. Fonte: PATINY, [s.d.].....16
- Figura 4.5** - Espectro previsto de RMN de ^1H para o 1,3,5-trimetoxibenzeno, TMB, e sua estrutura. Fonte: PATINY, [s.d.].....17
- Figura 4.6** - Espectro de ^1H (600 MHz, DMSO) de um extrato de um comprimido do analgésico comercial. Fonte: elaborada pelo autor.....18

Figura 4.7 – Mapa DOSY-¹H (600 MHz, DMSO) do extrato de um comprimido do analgésico comercial. Fonte: elaborada pelo autor.....19

Figura 4.8 – Espectros de RMN-¹H (600 MHz, DMSO), do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. (a) e de TOCSY-seletivo-1D com tempo de mistura de 150 ms e irradiação nos seguintes sinais: (b) 5.23 ppm, (c) 5.18 ppm, (d) 4.80 ppm, (e) 4.55 ppm; (f) 1.16 ppm.....20

Figura 4.9 – Mapa de correlação bidimensional RMN-TOCSY-¹H-¹H (600 MHz, DMSO), do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. Expansão entre 5.6 e 0.5 ppm (região dos prótons alifáticos). Em laranja os sinais do isometepteno, em azul os sinais da unidade glicosídica da sacarose e em vermelho os sinais da unidade de frutose da sacarose.....22

Figura 4.10 – Mapa de correlação bidimensional TOCSY-¹H-¹H (600 MHz, DMSO), do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. Expansão entre 5.4 e 2.7 ppm (região dos sinais de açúcar). Em azul os sinais da unidade glicosídica da sacarose e em vermelho os sinais da unidade de frutose da sacarose e em rosa os sinais da unidade de galactose da lactose.....23

Figura 4.11 – Mapa de correlação bidimensional HSQC-TOCSY-¹H-¹³C (600 MHz, DMSO), do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. Em vermelho os sinais do anel aromático da dipirona, em azul, sinais do isometepteno, em rosa os sinais da unidade glicosídica e de frutose da sacarose. Em laranja, sinais dos anômeros da lactose.....24

Figura 4.12 – Mapa de correlação heteronuclear gHMBC (600 MHz, DMSO-d6) do extrato de um comprimido do analgésico comercial. Expansão da região de grupos aromáticos.....26

Figura 4.13 – Mapa de correlação heteronuclear gHMBC (600 MHz, DMSO-d6) do extrato de um comprimido do analgésico comercial. Expansão da região dos sinais das N-metilas da cafeína..... 27

Figura A.1 - Espectro de ^{13}C de um extrato em DMSO-d6 de um comprimido do analgésico comercial (150 MHz, DMSO-d6). Fonte: Elaborada pelo autor.....	40
Figura A.2 - Mapa de contorno COSY de um extrato em DMSO-d6 de um comprimido do analgésico comercial (400 MHz, DMSO-d6). Fonte: Elaborada pelo autor.....	41
Figura A.3 - Mapa de contorno HSQC de um extrato em DMSO-d6 de um comprimido do analgésico comercial (600 MHz, DMSO-d6). Fonte: Elaborada pelo autor.....	42
Figura A.4 - Mapa de contorno HMBC de um extrato em DMSO-d6 de um comprimido de do analgésico comercial (600 MHz, DMSO-d6). Fonte: Elaborada pelo autor.....	43
Figura A.5 - Mapa de contorno TOCSY de um extrato em DMSO-d6 de um comprimido do analgésico comercial (600 MHz, DMSO-d6). Fonte:Elaborada pelo autor.....	44
Figura A.6 - Mapa de contorno HSQC-TOCSY de um extrato em DMSO-d6 de um comprimido do analgésico comercial (600 MHz, DMSO-d6). Fonte: Elaborada pelo autor.....	45
Figura A.7 - Espectro de ^1H (400 MHz, DMSO) de um extrato de um comprimido do analgésico comercial com o padrão TMB. Fonte: Elaborada pelo autor.....	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1** - Números quânticos de *spin* (*I*) de alguns núcleos..... 2
- Tabela 4.1** - Deslocamentos químicos (δ) dos sinais de ^1H e ^{13}C dos analitos na mistura oriunda do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. Para carbono-13 só estão listados os carbonos ligados diretamente a hidrogênios, obtidos do experimento de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -HSQC (ver Figura I.3. da seção de apêndices).....28-29
- Tabela 4.2** - Valores das integrais para as três amostras de um sinal referente a um dos componentes do analgésico comercial..... 30
- Tabela 4.3** - Massas pesadas das amostras e do padrão, em miligramas.....30
- Tabela 4.4** - Massas molares dos componentes e do padrão..... 31
- Tabela 4.5** - Valores calculados das concentrações P(%) de cada componente na amostra, sua massa correspondente obtida (m_{obt}) e sua diferença do informado ($m_{\text{inf}} - m_{\text{obt}}$)..... 31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AQ - Tempo de Aquisição

COSY - Espectroscopia de Correlação (*Correlation Spectroscopy*)

d1 - Tempo de espera entre pulsos

d20 - Tempo de Difusão

DMSO - Dimetilsulfóxido

DOSY - Espectroscopia de Difusão Ordenada (*Diffusion Ordered Spectroscopy*)

ds - Número de *dummy scans*

ERETIC - Referência Eletrônica para Acesso a Concentrações *in Vivo* (*Electronic Reference to Access in Vivo Concentrations*)

FID - Decaimento Livre de Indução (*Free Induction Decay*)

HMBC - Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)

HSQC - Correlação de Único *Quantum* Heteronuclear (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*)

IFA - Ingrediente Farmacêutico Ativo

IV - Infravermelho

ns - Número de *scans*

O1P - Frequência de *offset*

p30 - Duração do Gradiente de Campo

PULCON - Calibração por Gradiente de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gradient Calibration*)

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RE - Resolução Específica

rf - Radiofrequência

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMNq - Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa

SW - Largura da janela espectral (*Spectral Width*)

T1 - Tempo de relaxação longitudinal

T2 - Tempo de relaxação transversal

TMB - 1,3,5-Trimetoxibenzeno

TOCSY - Espectroscopia de Correlação Total (*Total Correlation Spectroscopy*)

UV – Ultravioleta

Sumário

1.Introdução.....	1
1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	1
1.2. RMN quantitativa (RMNq)	4
1.3. RMN em misturas	6
1.4. Análise de fármacos.....	7
2.Objetivos	9
3.Metodologia	11
4. Resultados e discussão.....	15
4.1. Moléculas presentes: espectros previstos	15
4.2. Atribuição dos sinais	27
4.3. Quantificação	29
5. Conclusão	35
6. Referências	37
Apêndice A - Espectros complementares.....	40

1.Introdução

1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é descrita em diversos trabalhos como uma técnica potente de análise, podendo ser utilizada como método tanto qualitativo quanto quantitativo, abrangendo, mas não restrita, a análises nas áreas de polímeros, alimentos e fármacos (DIEHL, 2020; HUANG, 2020; SCETTRI e SCHIEVANO, 2022).

A técnica de espectroscopia por RMN, tal qual as espectroscopias de infravermelho (IV) e de ultravioleta (UV), consiste na absorção de radiação eletromagnética. Sob efeito de um campo magnético, pode-se levar à absorção de radiação na região de radiofrequência (rf) por núcleos de uma amostra. Estes núcleos apresentam uma propriedade chamada *spin*, representada pelo número quântico de *spin*, I , o qual assume valores inteiros e semi-inteiros (0, 1/2, 1, 3/2...) (SILVERSTEIN et al. 2005).

Esta propriedade, intrínseca do núcleo, o *spin*, pode ser entendida, de uma forma macroscópica, como um movimento giratório do núcleo em torno de um eixo, criando um dipolo magnético de intensidade expressa como momento magnético nuclear (μ). A quantidade de estados de *spin* permitidos é dada por $2I+1$ e assumem valores $+I, I-1, \dots, -I+1, -I$. Portanto, para o caso de $I = 1/2$, há dois estados de *spin*, $+1/2$ e $-1/2$, e que apontam em direções opostas (PAVIA et al., 2015).

Núcleos que apresentam $I = 0$ não apresentam momento magnético e angular e não são ativos em RMN. Os núcleos mais comuns de se obter espectros de RMN são os que apresentam $I = 1/2$, com distribuição de carga esférica e uniforme. A **Tabela 1.1** apresenta alguns núcleos e seus números quânticos de *spin* (I) (SILVERSTEIN et al., 2005).

Tabela 1.1 - Números quânticos de *spin* (*I*) de alguns núcleos.

I	Núcleo
0	¹² C, ¹⁶ O
1/2	¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N, ¹⁹ F, ³¹ P
1	² H

Fonte: Pavia *et al.* (2015).

Para núcleos de *spin* $\frac{1}{2}$, há dois níveis de energia, o de menor energia ($I = +\frac{1}{2}$) é referente aos núcleos com *spins* a favor do campo magnético externo (B_0), enquanto que o de maior energia ($I = -\frac{1}{2}$) é referente aos *spins* contrários a B_0 , havendo ligeiramente mais núcleos com *spin* a favor do campo que núcleos com *spin* contrário, uma quantidade que é chamada de excesso populacional. A energia absorvida é quantizada e igual à diferença de energia entre os dois estados, ΔE . Tal diferença é diretamente proporcional a B_0 , ou seja, aumenta quanto maior for o campo magnético aplicado, levando ao aumento do excesso populacional, que é o responsável por ser possível de se observar a ressonância (PAVIA et al., 2015).

Para se entender o fenômeno da ressonância, é necessário visualizar o eixo magnético do núcleo em um movimento de precessão em torno do eixo z na direção do campo B_0 . A frequência angular com que o núcleo precessa é chamada de frequência de precessão ou frequência de Larmor. Esse movimento leva a formação de um campo elétrico com a mesma frequência, que pode se acoplar com o campo elétrico da radiação de radiofrequência e levar a absorção de energia suficiente para a transição entre os estados de *spin*. A junção de núcleos precessando em torno do eixo z gera um vetor magnetização de campo M_0 ao longo de z como resultante, como pode ser visto na **Figura 1.1** (SILVERSTEIN et al., 2005; PAVIA et al., 2015).

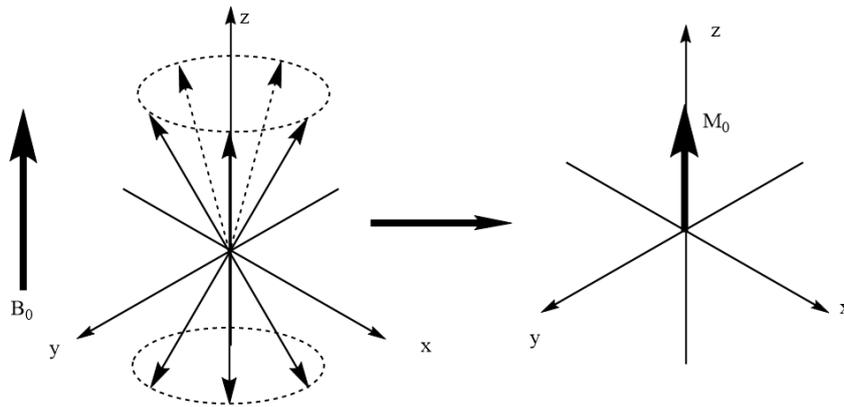


Figura 1.1 - Movimento de precessão dos núcleos, originando um vetor magnetização do campo, M_0 , ao longo da direção de B_0 . Fonte: Elaborada pelo autor com base em SILVERSTEIN et al., (2005).

Aplica-se um pulso de rf que rotaciona M_0 na direção do plano horizontal criando uma componente neste plano (M), que pode ser detectada e é coletada ao longo de um tempo de aquisição (AQ). Durante este período, os sinais que precessam em torno do eixo z retornam até atingir a condição de equilíbrio térmico novamente e os sinais coletados ao longo desse tempo originam o FID (*Free Induction Decay*). Há dois processos de relaxação que podem ser observados no retorno da magnetização ao eixo z. O primeiro é chamado de relaxação longitudinal, T_1 , que resulta no retorno da magnetização, a qual descreve uma espiral decrescente até voltar para z. O segundo processo é a relaxação transversal ou *spin-spin*, T_2 , que resulta da transferência de energia entre os *spins* que estão precessando, que leva ao afastamento dos *spins*, alargamento da linha e perda de sinal (SILVERSTEIN et al., 2005).

Cada próton de uma molécula pode entrar em ressonância em uma frequência diferente, resultado do seu ambiente eletrônico. Os elétrons em um campo magnético circulam e geram seus próprios campos magnéticos, podendo gerar campos na direção oposta a B_0 , levando a uma blindagem dos prótons, ou a favor, levando a uma desblindagem, o que provoca diferentes frequências de absorção, que são características para cada tipo de próton. Quanto maior a blindagem, mais deslocado é o sinal para regiões de menores frequências, para a direita do espectro. Além do campo gerado pelos próprios elétrons, os campos de outros prótons próximos também têm um efeito sobre o sinal gerado, por meio dos acoplamentos dos *spins* destes núcleos, alterando a multiplicidade do sinal. A

multiplicidade é dada pela fórmula geral abaixo, qual l é o número quântico de $spin$ e n , o número de núcleos igualmente acoplados:

$$m = 2nl + 1 \quad \text{(Equação 1.1)}$$

Sendo assim, para o 1H , com $l = \frac{1}{2}$, as multiplicidades são da forma $n+1$. Dessa forma, se não há acoplamento com nenhum outro núcleo ($n = 0$), $m = 1$, que denota um singleto. Para $n = 1$, $m = 2$, denotando um dubleto e assim por diante. A intensidade relativa destes sinais segue os valores do Triângulo de Pascal e podem ser visualizadas na **Figura 1.2**. (SILVERSTEIN et al., 2005).

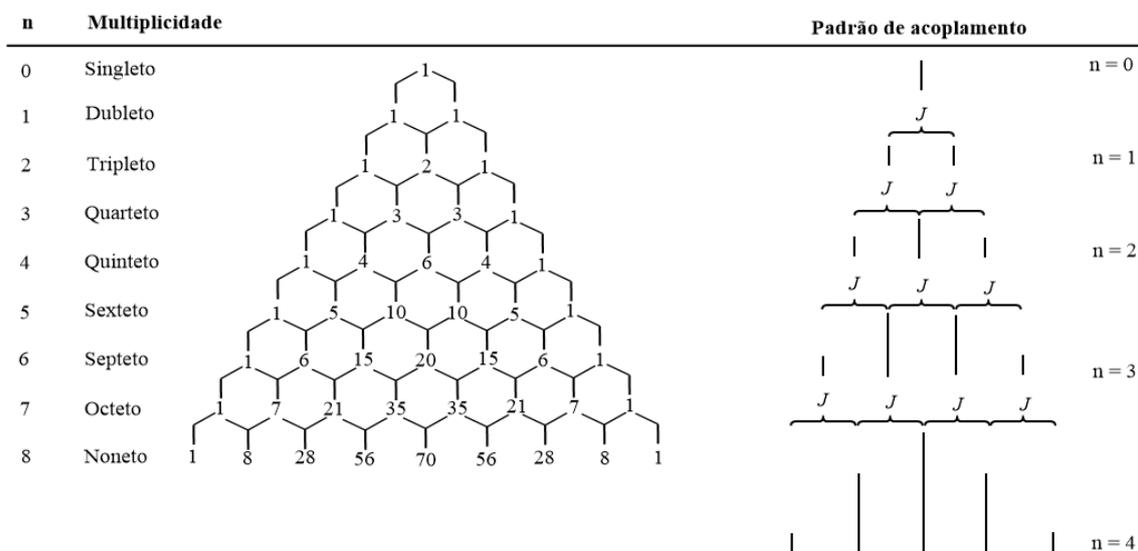


Figura 1.2 - Multiplicidades dos sinais, seus nomes, suas respectivas intensidades e padrões de acoplamento dependendo do número de núcleos acoplados igualmente (n). Fonte: Elaborada pelo autor com base em Silverstein (2005).

1.2. RMN quantitativa (RMNq)

A quantificação por RMN de 1H se baseia na proporcionalidade entre a área sob um sinal, dada pela integral (I), e o número de prótons (N_H) que originam este sinal. Esta relação pode ser representada pela **Equação 1.2**, na qual K_S é uma constante de proporcionalidade dada pelo espectrômetro.

$$I = K_S \times N_H \quad \text{(Equação 1.2)}$$

Para que esta proporcionalidade seja válida, antes, é necessário que seja atendida uma condição. Quando é aplicado um pulso de rf, os núcleos passam para um estado de maior energia e retornam ao estado de menor energia liberando radiação. No entanto, é necessário esperar que todos os *spins* retornem à condição de equilíbrio térmico antes da aplicação de um novo pulso. Este tempo de espera é de 5 a 7 vezes o maior tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos prótons de interesse (SANTOS e COLNAGO, 2013).

Este não é o único cuidado a se ter para realizar quantificação por RMN. Segundo HOLZGRABE (2010), a “pureza do sinal de RMN” deve ser alta, ou seja, não deve haver sobreposições com sinais de qualquer molécula, inclusive ela mesma. Também é citada a preferência por sinais mais simples, ou seja, preferência por singletos a multipletos e por realizar as análises sem girar a amostra. A quantificação pode ser feita utilizando um padrão interno ou por métodos que não necessitam de padrão interno, como ERETIC e PULCON . Contudo, para o caso de se usar um padrão interno, este precisa ser solúvel no solvente utilizado, não interagir com a amostra e ter um T_1 próximo ou menor do que do analito (HOLZGRABE, 2010).

Para uma estimativa do valor de T_1 , utiliza-se uma sequência de pulso chamada Inversão-Recuperação. É aplicado um pulso de 180° , que desloca a magnetização do eixo +z para o -z, aguarda-se um tempo e aplica-se um pulso de 90° , levando a magnetização ao eixo y (CLARIDGE, 1999). A **Figura 1.3** apresenta a sequência de pulso e representa o efeito dela sobre a magnetização.

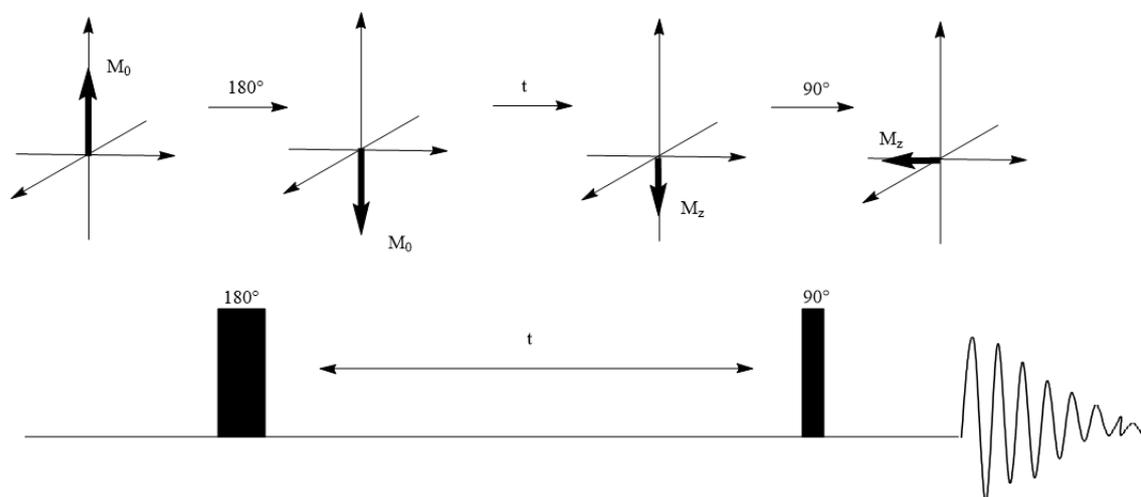


Figura 1.3 - Sequência de pulso de Inversão-Recuperação e seu efeito sobre a magnetização. Fonte: Elaborada pelo autor.

Como mostrado na **Equação 1.2**, existe uma proporcionalidade entre a integral do sinal e número de hidrogênios que o originam, pode-se calcular a pureza de uma amostra pela seguinte expressão:

$$P_{analito} = \frac{I_{analito} N_{padrão} M_{analito} m_{padrão}}{I_{padrão} N_{analito} M_{padrão} m_{amostra}} P_{padrão} \quad (\text{Equação 1.3})$$

Em que P_i é a pureza da espécie i , I_i é a integral do sinal da espécie i , N_i é o número de átomos de hidrogênio correspondente ao sinal integrado para a espécie i , M_i é a massa molar da espécie i e m_i é a massa pesada da espécie i (ou da amostra total) (MALZ e JANCKE, 2005).

1.3. RMN em misturas

Em um espectro de RMN de uma substância pura, seus sinais são facilmente assinalados, uma vez que estão presentes juntamente apenas com o sinal do solvente utilizado, o qual apresenta sinais bem característicos. Em uma mistura, os sinais de RMN das moléculas acabam se tornando complicados de se atribuir a uma ou outra molécula. Portanto, são necessárias técnicas especializadas na identificação e separação de sinais originados por cada componente da mistura

Um método utilizado para resolver misturas de certa complexidade é o DOSY (*Diffusion-Ordered Spectroscopy*). Nesta técnica, uma sequência de ecos de *spin* é medida variando-se a intensidade do gradiente de campo pulsado e o decaimento dos sinais fornece os coeficientes de difusão das moléculas, os quais são usados para discriminar os sinais e atribuí-los a uma mesma molécula para um mesmo valor de difusão (Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy: Manchester NMR Methodology Group, [s.d.]).

O espectro DOSY é um espectro pseudo-2D, com os deslocamentos químicos em uma dimensão e os coeficientes de difusão em outra. O método resultar na separação dos sinais das moléculas por meio da diferença da difusão, levou a técnica a ser denominada também como “cromatografia de *spins*” (SOUZA e LA VERDE JR, 2002).

A técnica DOSY apresenta um importante papel na determinação dos sinais aptos a serem utilizados para a integração, uma vez que pode-se confirmar a pureza dos sinais por meio dos valores de difusão obtidos, essencial na análise quantitativa.

Outras abordagens no estudo de misturas por RMN, destacam-se os métodos como o TOCSY e o HSQC-TOCSY que são utilizados para resolver a complexidade de sinais por meio da transferência da magnetização entre os núcleos de um mesmo sistema de *spins* acoplados, facilitando a identificação e atribuição dos sinais a núcleos que pertençam a uma mesma unidade de uma molécula, ou seja, o mesmo sistema acoplado de *spins*.

1.4. Análise de fármacos

A garantia da qualidade dos medicamentos é de suma importância e é prezada pela indústria farmacêutica e pelos órgãos regulatórios do governo. No cenário brasileiro, os métodos para análise de fármacos são regulamentados pela Anvisa (SANTOS e COLNAGO, 2013).

A RDC nº166 de 2017 substituiu a RE nº899 de 2003, que estabelecia os parâmetros para avaliação, tais quais a “seletividade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação e robustez”, que devem ser abordados na validação dos métodos analíticos. Já a nova resolução adiciona detalhes de como apresentar os parâmetros acima e também prevê o efeito da

matriz no caso de estudos com matrizes complexas (ANVISA, 2003; ANVISA, 2017).

O Brasil tem como código farmacêutico oficial a *Farmacopeia Brasileira* (2019), atualizada em Fevereiro de 2024, onde são estabelecidos “os requisitos mínimos de qualidade para insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos para a saúde.” O documento estabelece os valores para a uniformidade de conteúdo de diversos tipos de medicamentos, inclusive os comprimidos revestidos com açúcar (drágeas), alvo do estudo deste trabalho, que não pode variar além de $\pm 5\%$ em medicamentos com peso maior que 300 mg.

Sendo assim, este trabalho vem como uma forma de mostrar a aplicabilidade da técnica de RMN para produtos farmacêuticos prontos e não apenas aos insumos farmacêuticos puros, sendo uma técnica com potencial para uso, para além das análises qualitativas mais rotineiras, como uma técnica para controle de qualidade e de estabilidade de formulações já prontas.

2.Objetivos

Usar a Ressonância Magnética Nuclear para identificação e quantificação dos IFAs, dipirona, cafeína e isometepteno, em um analgésico comercial. Também realizar a identificação de alguns excipientes, como sacarose, lactose e estearato de magnésio.

3. Metodologia

Três comprimidos do analgésico comercial (300 mg dipirona/ 30 mg cafeína/ 30 mg mucato de isometepteno), do mesmo blíster, foram individualmente pesados e macerados em um almofariz. De cada comprimido, foram pesados 50 mg do sólido macerado, dissolvendo-se em 1 mL de DMSO deuterado. As amostras foram agitadas em banho ultrassônico por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas. Foram coletadas alíquotas de 400 μ L de cada solução, as quais foram transferidas para frascos de Eppendorf com 5 mg de 1,3,5-trimetoxibenzeno (TMB), como um padrão interno, previamente pesado e agitadas em um vórtex. Posteriormente, transferiram-se as amostras para tubos de RMN de 5 mm para a análise quantitativa. Para a análise qualitativa, foi seguido o mesmo procedimento de preparo para uma das amostras, porém sem a adição do TMB.

Os seguintes experimentos foram feitos num equipamento Bruker Avance III 400, operando em um campo de 9.4 T (400 MHz para frequência de hidrogênio), equipado com uma sonda BBI para tubos de 5 mm.

A análise qualitativa foi realizada antes da quantitativa, com a solução da amostra reservada em geladeira até a realização da análise quantitativa. Os parâmetros de aquisição do espectro de ^1H qualitativo foram: número de *scans* (ns) de 8, número de *dummy scans* (ds) de 0, janela espectral (SW) de 10.87 ppm, tempo de aquisição (AQ) de 7.54 s, *offset* (O1P) de 5.045 ppm e tempo de espera (d1) de 1 s. Foram utilizados um pulso de 90° e um equipamento de 9.4 T (399.94 MHz).

Na análise quantitativa foram utilizados o mesmo equipamento e sequência de pulso anteriores e os parâmetros ns = 32, ds = 2, SW = 9 ppm, AQ = 9.12 s, O1P = 4.5 ppm e d1 = 30.88 s.

Os parâmetros do COSY foram ns = 2, ds = 16, SW = 10.87 ppm (em F1 e em F2), AQ = 0.2355 s (em F2) e AQ = 0.0589 s (em F1), O1P = 5 ppm (em F1 e F2) e sequência de pulso *cosygpqf*.

Em todos os casos a aquisição e o processamento dos dados foram feitos no software TopSpin® da Bruker (versão 3.6.5).

Os experimentos seguintes foram feitos num equipamento Bruker Avance Neo 600, operando em um campo de 14.1 T (600 MHz para frequência de hidrogênio), equipado com uma sonda BBI para tubos de 5 mm.

Para o espectro de ^{13}C totalmente desacoplado, foram utilizados ns = 61440, ds = 2, d1=0.1 s, SW = 236.63 ppm, O1P = 100 ppm, TD=32768 (AQ = 0.65 s) e sequência de pulso zgpg30.

No HSQC, os parâmetros utilizados foram ns = 8, ds = 16, SW = 11.90 ppm (em F2), SW = 165 ppm (em F1), TD(F2)=1024 (AQ = 0.072 s), TD(F1)=256 (AQ = 0.005 s), O1P = 5.045 ppm (em F2), O1P = 75 ppm (em F1) e sequência de pulso hsqcedetgp.

Para o HMBC, utilizaram-se os parâmetros ns = 64, ds = 16, SW = 11.90 ppm (em F2) e SW = 220 ppm (em F1), TD(F2)=4096 (AQ = 0.286 s) TD(F1)=256 (AQ = 0.0038 s), O1P = 4.698 ppm (em F2) e O1P = 100 ppm (em F1) e sequência de pulso hmbcgpplndqf (nomenclatura Bruker).

Para o HSQC-TOCSY, utilizaram-se os parâmetros ns = 192, ds = 16, SW = 11.9 ppm (em F2) e SW = 240 ppm (em F1), TD(F2)=1024 (AQ=0.072 s), TD(F1)=256 (AQ=0.0035 s), O1P = 3.477 ppm (em F2) e O1P = 100 ppm (em F1) e sequência de pulso hsqcgpmlph (nomenclatura Bruker).

Em todos os casos a aquisição e o processamento dos dados foram feitos no software TopSpin[®] da Bruker (versão 4.2 para aquisição e versão 3.6.3 para processamento).

O experimento de RMN- ^1H resolvido na difusão também foi realizado num equipamento Bruker Avance Neo 600, operando em um campo de 14.1 T (600 MHz para frequência de hidrogênio), equipado com uma sonda BBI. A sequência de pulsos utilizada foi a ledbgppr2s (nomenclatura Bruker), que inclui a supressão de sinal da água residual do solvente (em 3.477 ppm), realizada durante o tempo de espera entre varreduras (d1 = 2s) além de um período (LED) de 5 ms para supressão de artefatos oriundos dos intensos pulsos de gradiente. Foram adquiridos 32 pontos, variando-se a força do gradiente entre 5 e 95%, sendo que cada ponto foi coletado com 8 varreduras. O pulso de gradiente (δ) foi otimizado para 1.6 ms, e o tempo de difusão (Δ) foi de 80 ms. O processamento dos dados foi feito com o uso dos softwares TopSpin[®] (versão 3.6.3) e Dynamics Center[®] (versão 2.7.2), da Bruker, sendo que as curvas foram traçadas por meio da equação:

$$I(g) = I_0 e^{-\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D} \quad \text{(Equação 3.1)}$$

Em que I é a intensidade do sinal de RMN, g é a intensidade do gradiente (entre 5 e 95%, com gradiente máximo de $55 \text{ G cm}^{-1} \text{ A}^{-1}$), γ é a constante magnetogírica do hidrogênio ($26.75 \text{ rad Hz G}^{-1}$), δ é a largura do pulso de gradiente (1.6 ms), Δ é o tempo de difusão (80 ms) e D é o coeficiente de difusão. O erro foi estimado por simulação de Monte Carlo. Tendo fixos os valores de δ e Δ , a intensidade é medida em função da força do gradiente, g .

4. Resultados e discussão

4.1. Moléculas presentes: espectros previstos

O estudo dos ingredientes ativos de um analgésico comercial tem foco em três moléculas principais: dipirona, cafeína e isometepteno, mostradas na **Figura 4.1**. Para auxiliar na identificação dos sinais dos analitos da mistura fez-se inicialmente uma simulação dos espectros de RMN-¹H, para avaliar as regiões em que os sinais podem aparecer. Para essa simulação foi utilizada a plataforma online https://www.nmrdb.org/new_predictor/. Nessa plataforma são construídas as estruturas, conforme apresentada na **Figura 4.1**, e a simulação pode ser feita variando-se a frequência de ressonância do espectrômetro, a janela espectral em ppm (sw), o parâmetro de largura de linha (lb) e o número de pontos coletados para aquisição (td).

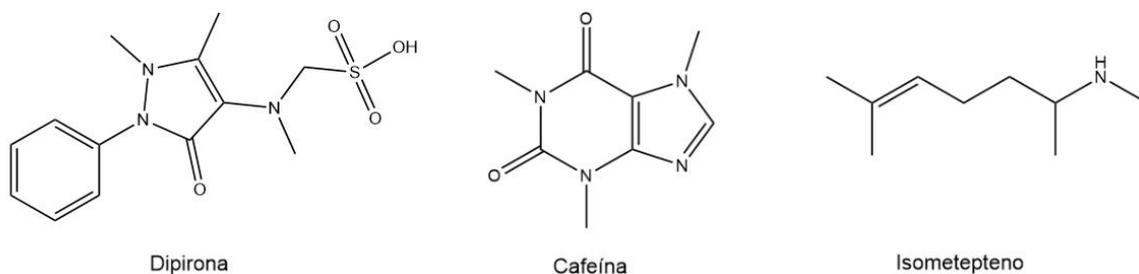


Figura 4.1 - Estruturas das moléculas principais do analgésico comercial: dipirona, cafeína e isometepteno. Fonte: Autor.

Fez-se uso de espectros preditos (**Figuras 4.2, 4.3 e 4.4**) das moléculas de interesse como uma forma de identificar sinais característicos de cada uma para se obter um ponto de partida na análise do espectro da mistura (**Figura 4.5**), assim como do experimento de difusão por RMN, DOSY, apresentado na **Figura 4.6**.

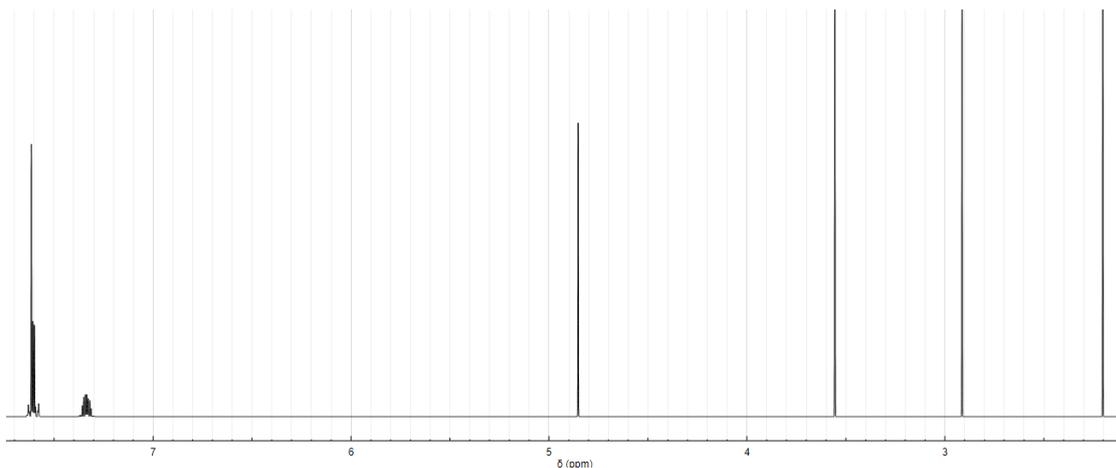


Figura 4.2 - Espectro previsto de RMN de ^1H para a dipirona. Fonte: PATINY, [s.d.].

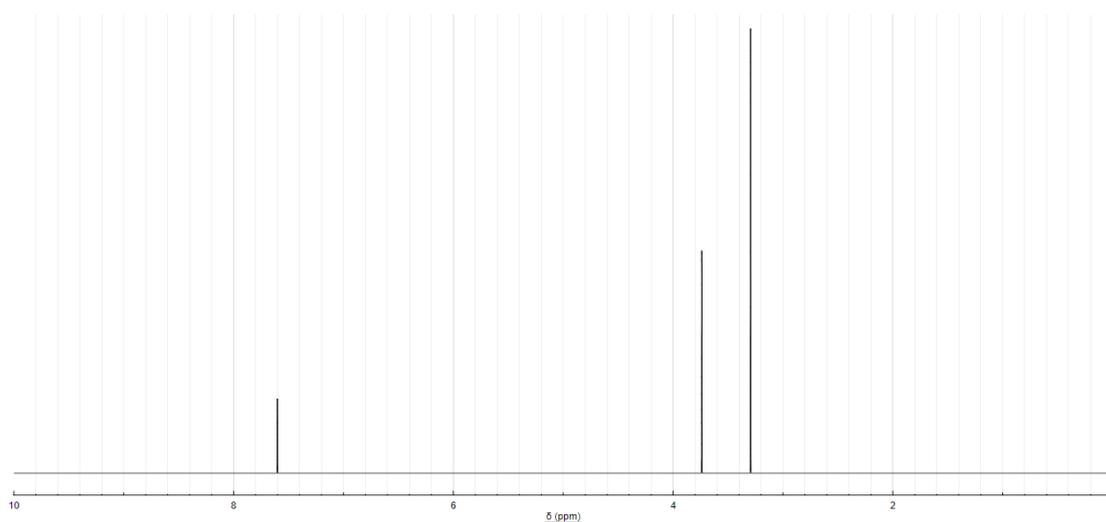


Figura 4.3 - Espectro previsto de RMN de ^1H para a cafeína. Fonte: PATINY, [s.d.].

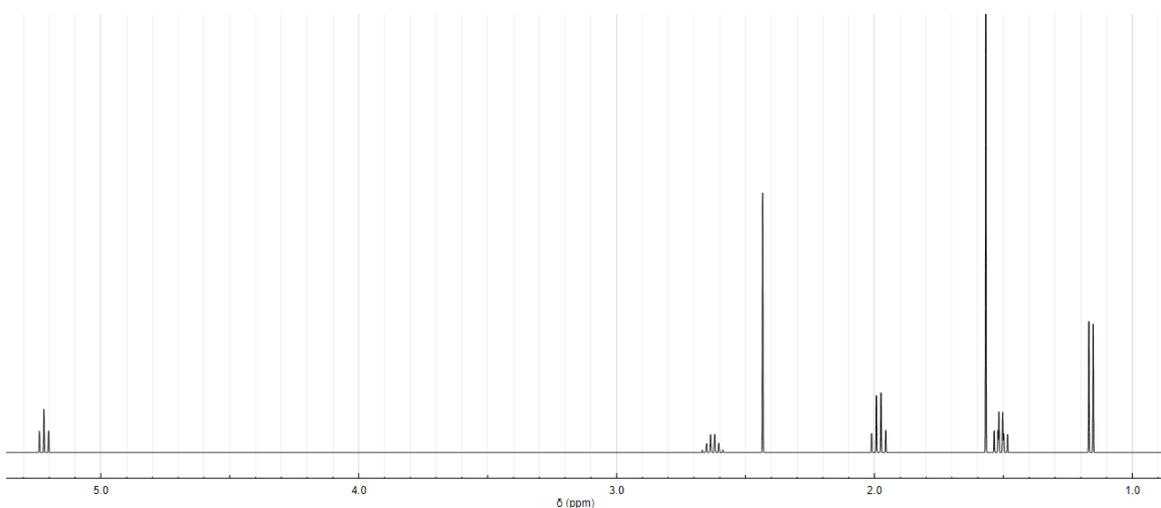


Figura 4.4 - Espectro previsto de RMN de ^1H para o isometepteno. Fonte: PATINY, [s.d.].



Figura 4.5 - Espectro previsto de RMN de ^1H para o 1,3,5-trimetoxibenzeno, TMB, e sua estrutura. Fonte: PATINY, [s.d.].

Na **Figura 4.5** pode ser visto o espectro de ^1H do padrão interno, TMB, com dois sinais, um em ~3.7 ppm, referente a 9H (3 metoxilas), e um referente aos 3H aromáticos em ~6.2 ppm, ambos singletos. Como apontado na Seção 1.2, o padrão escolhido apresenta sinais simples (2 singletos) e o sinal na região de hidrogênios aromáticos não está sobreposto aos sinais da amostra (vide espectro no apêndice **Figura A.7**).

A **Figura 4.6** apresenta o espectro de RMN- ^1H (600 MHz, DMSO), do extrato dos comprimidos. Com os espectros de RMN dos IFAs simulados e apresentados anteriormente foi possível encaminhar a identificação dos analitos de interesse na mistura. Porém, como se trata de uma simulação em que não se leva em conta a natureza do solvente, certamente existe diferença significativa nos deslocamentos químicos.

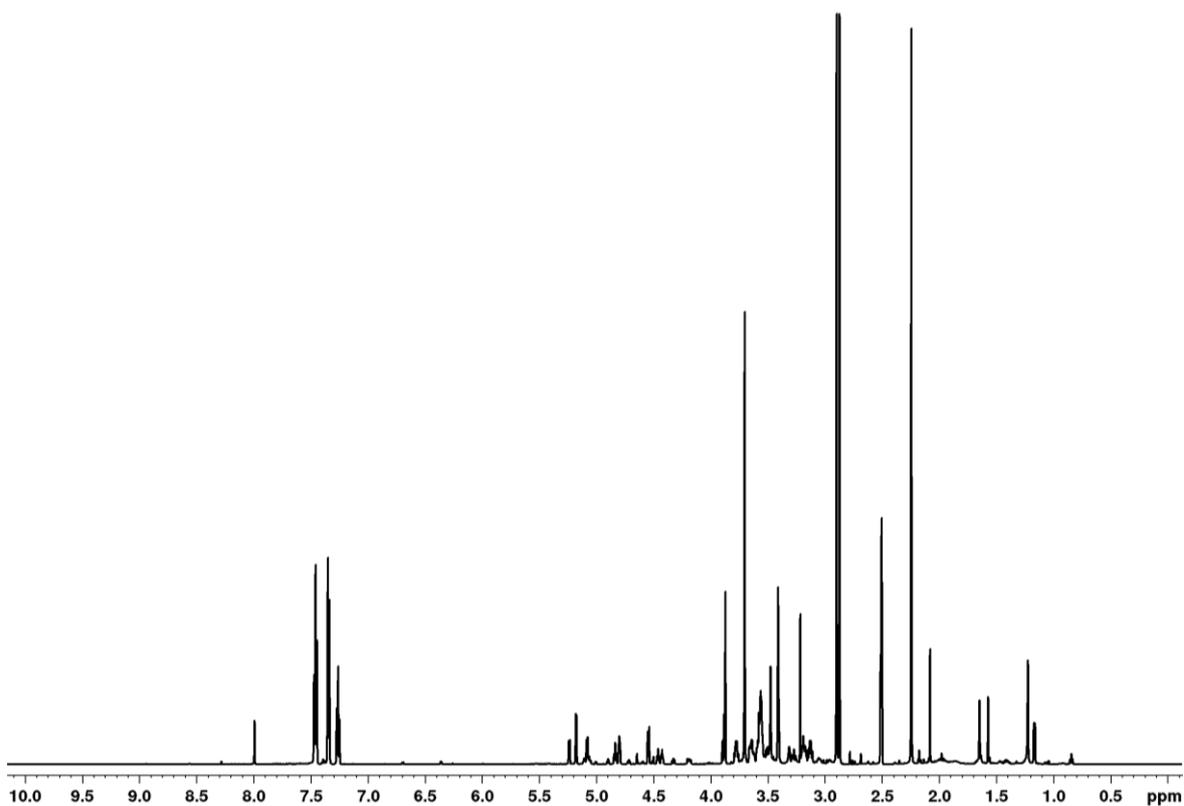


Figura 4.6 - Espectro de ^1H (600 MHz, DMSO) de um extrato de um comprimido do analgésico comercial. Fonte: elaborada pelo autor.

Dessa forma, decidiu-se analisar a mistura por espectroscopia de RMN resolvida na difusão – DOSY-NMR. Assim, a **Figura 4.7** apresenta o mapa de difusão da mistura, também obtido num equipamento de 600 MHz. Além dos analitos de interesse, ainda foi possível observar alguns componentes adicionais da formulação, como sacarose, lactose e estearato de magnésio, além de alguns outros contaminantes.

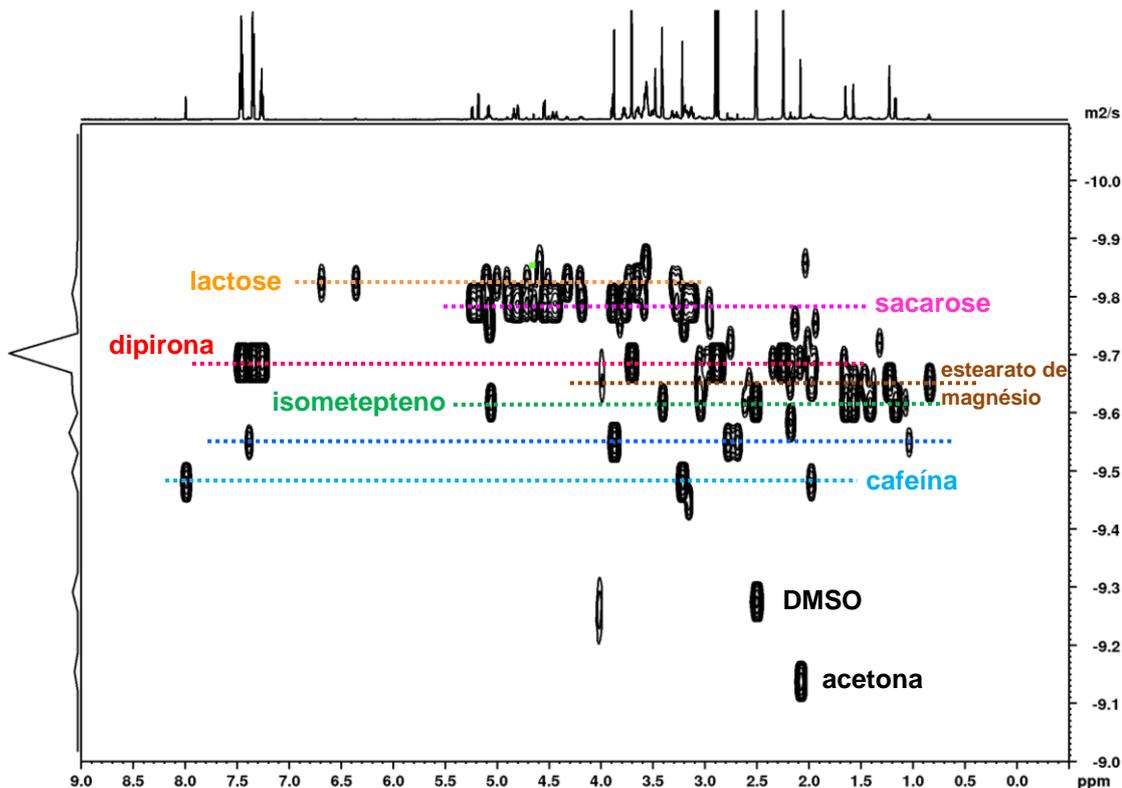


Figura 4.7 – Mapa DOSY-¹H (600 MHz, DMSO) do extrato de um comprimido do analgésico comercial. Fonte: elaborada pelo autor.

Na **Figura 4.7**, analisou-se primeiro os sinais dos três IFAs, sendo possível reconhecer três sinais na região aromática, entre 7.00 e 7.50 ppm, pertencentes à dipirona (em vermelho), um singlete em 7.98 ppm, pertencente à cafeína (em azul claro) e um dubleto em 1.16 ppm atribuído ao isometepteno (em verde). Além destes sinais é possível observar o sinal do solvente, DMSO, em 2.50 ppm, e um sinal em 2.08 ppm, típico de acetona, provavelmente proveniente da lavagem do tubo de RMN.

Adicionalmente, foram identificados alguns dos excipientes do remédio informados na bula, como o dissacarídeo, sacarose (em rosa), com sinais entre 4.00 e 5.50 ppm, sugerindo pertencer a prótons anoméricos desta molécula, além de vários outros sinais na mesma região, mas em um valor de difusão menor, que podem pertencer a lactose (laranja) presente na mistura (MONTEIRO *et al.*, 2012). Como citado por CHIKODE *et al.* (2024), as difusões de sacarose e lactose são ligeiramente diferentes, com a sacarose apresentando maior difusão que a lactose. Outro excipiente identificado foi o estearato de magnésio (marrom), com sinal em 0.84 ppm.

Os sinais da sacarose, da unidade glicosídica, assim como da unidade de frutose, bem como do isometepteno puderam ser confirmados por meio do experimento TOCSY seletivo unidimensional, cujos resultados são apresentados na **Figura 4.8**.

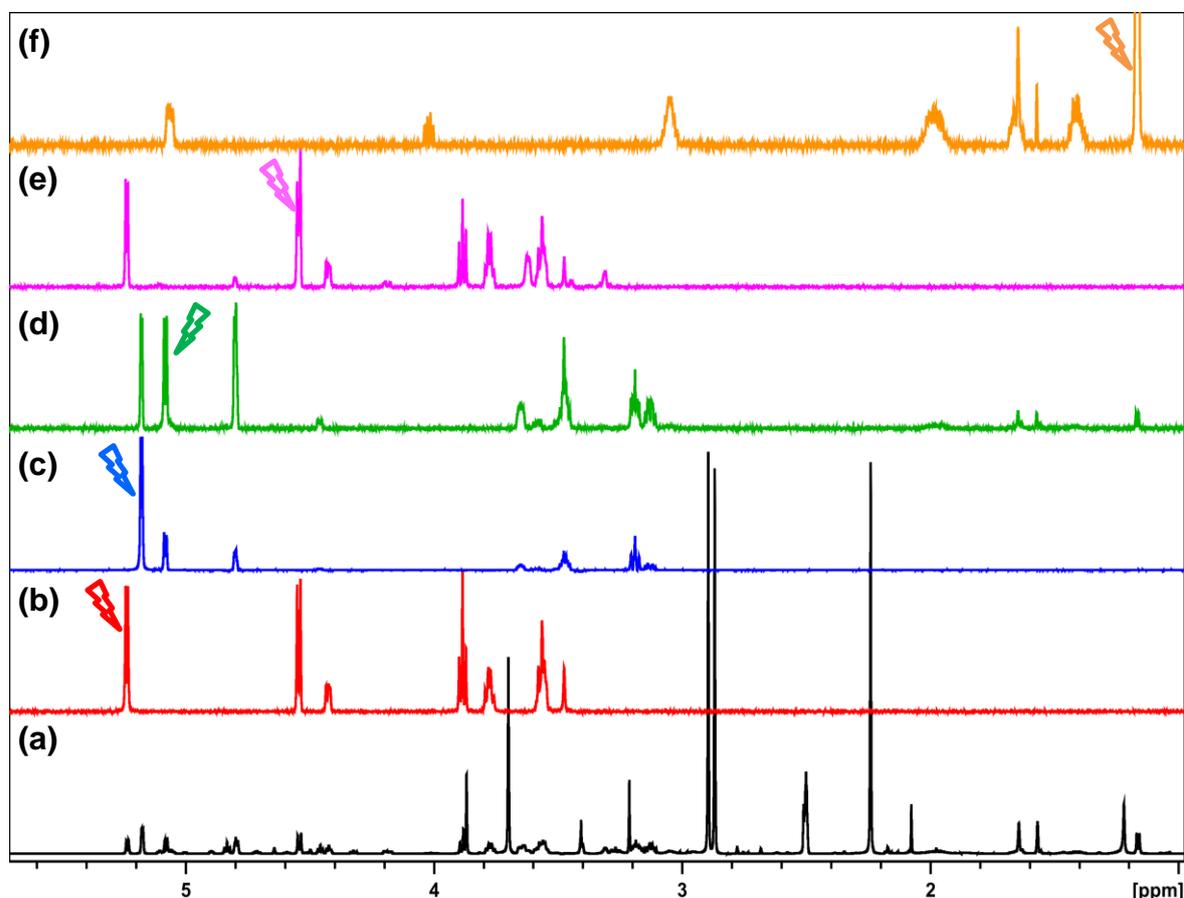


Figura 4.8 – Espectros de RMN-¹H (600 MHz, DMSO), do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial (a) e de TOCSY-seletivo-1D com tempo de mistura de 150 ms e irradiação nos seguintes sinais: (b) 5.23 ppm, (c) 5.18 ppm, (d) 4.80 ppm, (e) 4.54 ppm; (f) 1.16 ppm.

Quando irradiado em 5.23 ppm, que corresponde a um próton hidroxílico da unidade de frutose da sacarose, os sinais em 4.54, 4.42, 3.88, 3.77, 3.56 e 3.47 ppm aparecem no espectro em vermelho, uma vez que fazem parte do mesmo sistema de *spins* acoplados. O mesmo é observado quando se irradia o sinal em 4.54 ppm, uma vez que faz parte do mesmo sistema de spins. Quando o sinal é irradiado em 5.18 ppm, correspondente ao próton anomérico da unidade glicosídica da sacarose, os sinais em 5.08, 4.80, 4.46, 3.65, 3.58, 3.47, 3.19 e 3.13 ppm

aparecem no espectro em azul, porque estão no mesmo sistema de *spins* acoplados (FACEY, 2014).

A irradiação do sinal em 5.08 ppm leva ao aparecimento de sinais adicionais no espectro em verde, além dos que foram observados no espectro em azul. Sendo assim, pode-se presumir a existência de um sinal coincidente neste deslocamento, que foi possível de se identificar como sendo do isometepteno, irradiando-se o sinal em 1.16 ppm, sendo visíveis os sinais em 1.41, 1.57, 1.65, 1.66, 1.99, 3.05, 4.02 e 5.08 ppm, observáveis no espectro em laranja.

Na **Figura 4.9**, observa-se o mapa de correlação bidimensional TOCSY- ^1H - ^1H , o qual expõe as correlações entre hidrogênios acoplados dentro de um mesmo sistema de *spins*.

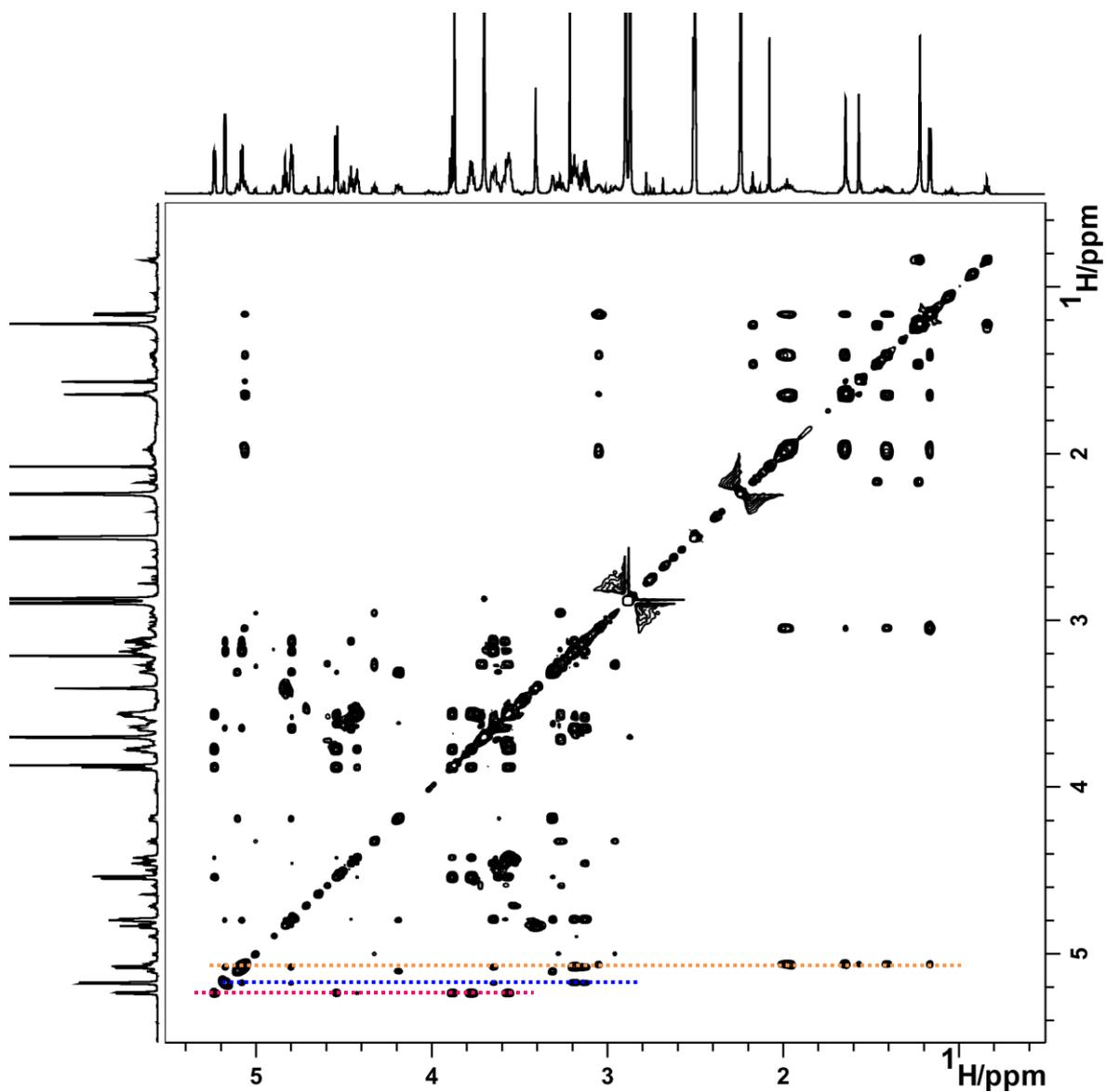


Figura 4.9 – Mapa de correlação bidimensional RMN-TOCSY- ^1H - ^1H (600 MHz, DMSO), do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. Expansão entre 5.6 e 0.5 ppm (região dos prótons alifáticos). Em laranja os sinais do isometepto, em azul os sinais da unidade glicosídica da sacarose e em vermelho os sinais da unidade de frutose da sacarose.

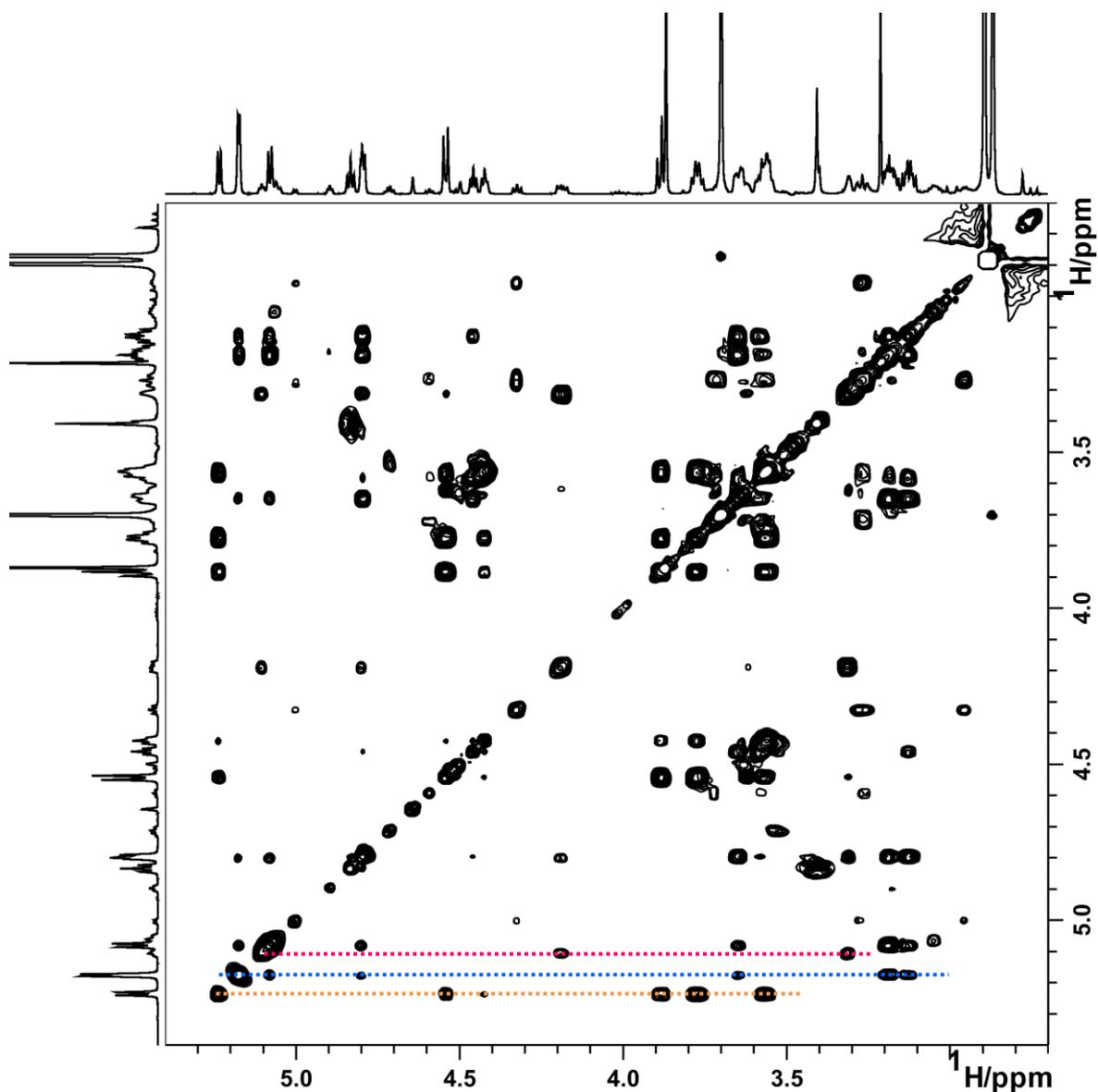


Figura 4.10 – Mapa de correlação bidimensional TOCSY-¹H-¹H (600 MHz, DMSO), do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. Expansão entre 5.4 e 2.7 ppm (região dos sinais de açúcar). Em azul os sinais da unidade glicosídica da sacarose, em vermelho os sinais da unidade de frutose da sacarose e em rosa os sinais da unidade de galactose da lactose.

O experimento de HSQC-TOCSY também foi muito útil na identificação dos sinais dos constituintes majoritários, como mostra a figura a seguir:

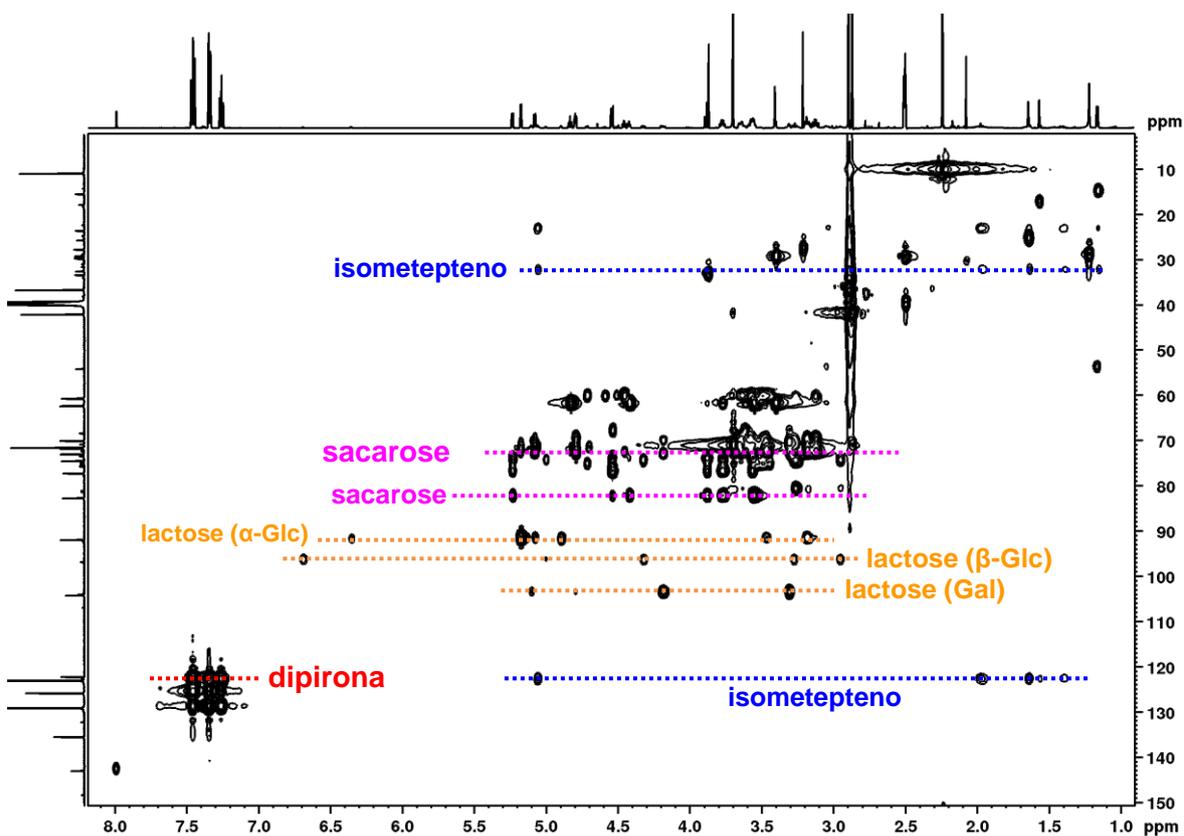


Figura 4.11 – Mapa de correlação bidimensional HSQC-TOCSY- ^1H - ^{13}C (600 MHz, DMSO), do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. Em vermelho os sinais do anel aromático da dipirona, em azul, sinais do isometepteno, em rosa os sinais da unidade glicosídica e de frutose da sacarose. Em laranja, sinais dos anômeros da lactose.

O HSQC-TOCSY consegue resolver melhor sinais sobrepostos ao resolvê-los na dimensão do ^{13}C , facilitando as atribuições, principalmente, para os sinais muito próximos da região de açúcares. Pode-se notar a correlação dos hidrogênios aromáticos com o carbono em 123.0 ppm (vermelho), uma vez que pertencem ao mesmo sistema de *spins* acoplados, porém, não se correlacionam com os outros carbonos da molécula devido ao átomo de nitrogênio separando o anel aromático do restante da molécula.

Em azul, os sinais do isometepteno podem ser vistos correlacionando com os carbonos em 32.4 ppm e 122.2 ppm, que estão no mesmo sistema acoplado de *spins*. Em rosa, podem ser visualizados os sinais da unidade glicosídica da sacarose (Glc) e da unidade de frutose (Fru) se correlacionando com os carbonos em 82.6 e 72.2 ppm, respectivamente, notando-se estarem em diferentes sistemas de *spins*.

Em laranja, correlacionando-se com o sinal em 103.9 ppm, podem ser visualizados sinais da unidade de galactose da lactose (Gal), enquanto que os sinais em 92.1 e 96.7 ppm correspondem às unidades glicosídicas (Glc) dos anômeros α e β da lactose, respectivamente, que se diferenciam pela posição do hidrogênio anomérico, equatorial no anômero alfa e axial no anômero beta. Como mostrado por ALZOUBI et al. (2021), os sinais próximos de 6.3 e 6.7 ppm são indicativos do aparecimento de um ou outro anômero da lactose. Ademais, a informação fornecida pelo DOSY de que os sinais em 6.36 e 6.69 ppm, além de outros sinais, têm a mesma difusão, combinada à informação do HSQC-TOCSY sobre estes mesmos sinais, sugerindo a existência de três sistemas de *spins* diferentes, que podem ser associados à unidade de galactose (comum a ambos os anômeros) e às unidades glicosídicas da α - e β -lactoses.

Já o HMBC (**Figura 4.12**) permitiu identificar de maneira fácil o hidrogênio aromático da cafeína, utilizado mais tarde para fazer a quantificação de cafeína na mistura. A **Figura 4.12** apresenta as correlações que permitiram identificar o hidrogênio aromático da cafeína, sendo possível observar a mesma correlação com a carbonila de amida em 154.7 ppm.

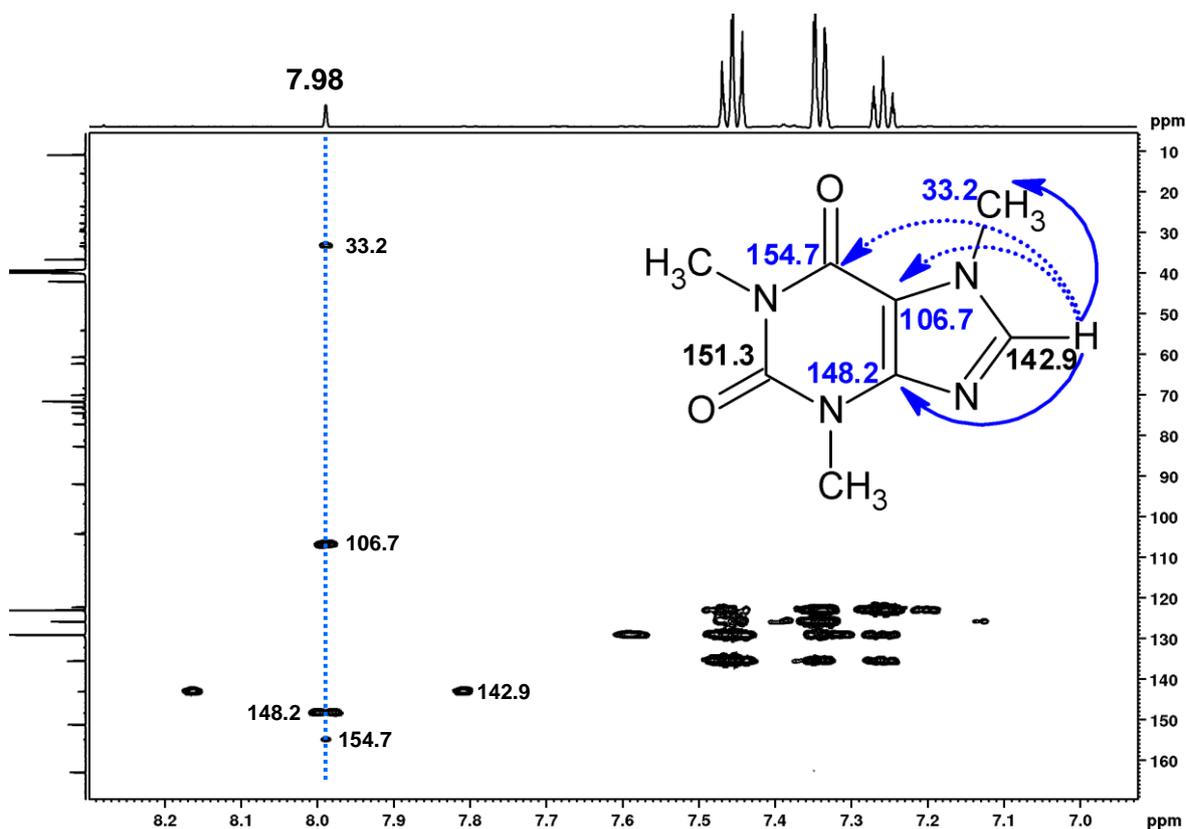


Figura 4.12 – Mapa de correlação heteronuclear gHMBC (600 MHz, DMSO-d₆) do extrato de um comprimido do analgésico comercial. Expansão da região de grupos aromáticos.

Os sinais de RMN-¹H das N-metilas também puderam ser assinalados com ajuda do HMBC (**Figura 4.13**). Os sinais de duas das metilas, em 3.22 e 3.42 ppm, aparecem com suas intensidades reduzidas uma vez que na supressão do sinal de água do solvente (em 3.31 ppm) os sinais próximos podem ser afetados. Dessa forma o sinal escolhido para quantificação foi o do hidrogênio aromático em 7.98 ppm.

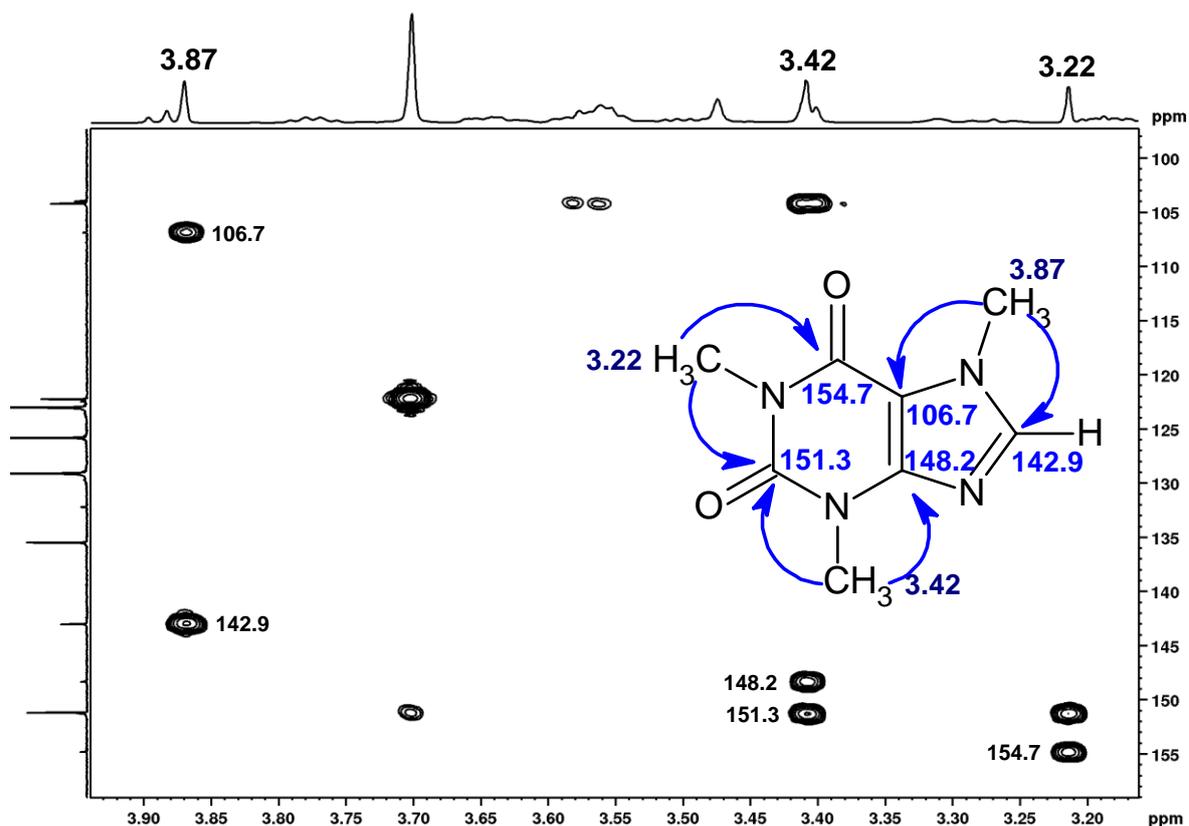


Figura 4.13 – Mapa de correlação heteronuclear gHMBC (600 MHz, DMSO- d_6) do extrato de um comprimido do analgésico comercial. Expansão da região dos sinais das N-metiladas da cafeína.

4.2. Atribuição dos sinais

A atribuição dos sinais de ^1H foi realizada com auxílio de espectros de ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC, que podem ser visualizados no **Apêndice A - Espectros complementares**. As atribuições a cada molécula estão nas **Tabelas 4.1 - 4.3** e suas respectivas moléculas com os hidrogênios identificados podem ser visualizadas nas **Figuras 4.7 - 4.9**.

Tabela 4.1 - Deslocamentos químicos (δ) dos sinais de ^1H e ^{13}C dos analitos na mistura oriunda do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. Para carbono-13 só estão listados os carbonos ligados diretamente a hidrogênios, obtidos do experimento de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -HSQC (ver **Figura A.3** da seção de apêndices). (continua)

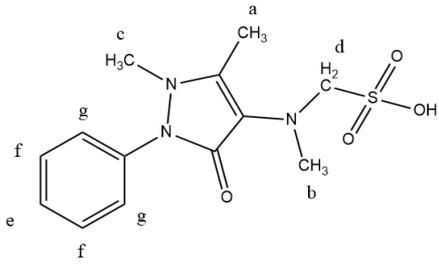
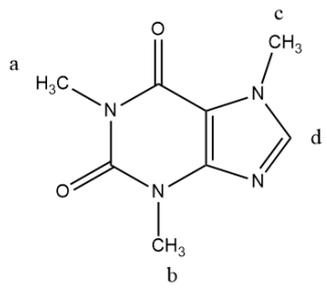
Dipirona			
H	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm, HSQC)	Estrutura
a	2.24	11.1	
b	2.87	42.2	
c	2.89	36.9	
d	3.70	71.8	
e	7.26	126.0	
f	7.34	123.2	
g	7.46	129.3	
Cafeína			
H	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm, HSQC)	Estrutura
a	3.21	27.6	
b	3.40	29.7	
c	3.87	33.3	
d	7.98	143.3	

Tabela 4.1 - Deslocamentos químicos (δ) dos sinais de ^1H e ^{13}C dos analitos na mistura oriunda do extrato em DMSO de um comprimido do analgésico comercial. Para carbono-13 só estão listados os carbonos ligados diretamente a hidrogênios, obtidos do experimento de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C -HSQC (ver **Figura A.3.** da seção de apêndices). (conclusão)

Isometepteno			
H	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm, HSQC)	Estrutura
a	1.16	16.2	
b	1.41	33.4	
c	1.57	18.0	
d	1.65	33.4	
e	1.66	25.9	
f	1.99	24.0	
g	3.05	30.4	
h	4.02	81.6	
i	5.08	92.1	

4.3. Quantificação

Do experimento da Inversão-Recuperação estimou-se $T_1 = 5.5$ s. Como o tempo de espera (D1) acrescido do tempo de aquisição (AQ) deve ser de pelo menos 5 a 7 vezes o T_1 , $7 \times T_1 = 38.5$ s que foi arredondado para 40 s. Com AQ = 9.12 s, então D1 = 30.88 s.

Na quantificação foram utilizados para integração os sinais em 7.98 ppm para a cafeína, o sinal de aromático em 7.46 ppm para a dipirona e o sinal em 1.16 ppm para o isometepteno, referentes a 1, 2 e 3 hidrogênios, respectivamente. O

sinal de referência para integração do TMB utilizado foi o sinal em 6.08 ppm referente a 3 hidrogênios.

O cálculo foi realizado utilizando a **Equação 1.3**, com as informações apresentadas nas **Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4**. Os valores obtidos estão apresentados na **Tabela 4.5**. Também calculou-se a diferença entre os valores informados e os obtidos.

Tabela 4.2 - Valores das integrais para as três amostras de um sinal referente a um dos componentes do analgésico.

	Amostra 1*	Amostra 2	Amostra 3
Dipirona	1.295	3.535	3.644
Cafeína	0.122	0.306	0.302
Isometepteno	0.250	0.584	0.593

*A amostra 1 é referente ao medicamento que foi analisado qualitativamente e que ficou armazenado em geladeira depois de macerado até a análise quantitativa junto com os demais.

Tabela 4.3 - Massas pesadas das amostras e do padrão, em miligramas.

Massas	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Amostra	49.8	50.7	50.3
Total do medicamento	795	778	759
Padrão	5.65	5.57	5.67

Tabela 4.4 - Massas molares dos componentes e do padrão.

Molécula	Massa molar (g/mol)
TMB	168.19
Dipirona	333.34
Cafeína	194.19
Isometepteno	141.25

Tabela 4.5 - Valores calculados das concentrações P(%) de cada componente na amostra, sua massa correspondente obtida (m_{Obt}) e sua diferença do informado ($m_{Inf} - m_{Obt}$).

Amostra	Molécula	P (%)	m_{Obt} (mg)	Diferença ($m_{Inf} - m_{Obt}$)
1	Dipirona	14.41	114.56	185.44
	Cafeína	1.58	12.57	17.43
	Isometepteno	0.79	6.25	23.75
2	Dipirona	38.10	296.23	3.77
	Cafeína	3.84	29.88	0.12
	Isometepteno	1.78	13.82	16.18
3	Dipirona	40.30	305.82	-5.82
	Cafeína	3.89	29.53	0.47
	Isometepteno	1.85	14.06	15.94

Da **Tabela 4.5**, há diversos pontos que podem ser comentados. Primeiramente, é possível notar a grande diferença entre os valores informados e os obtidos na Amostra 1. Como mencionado anteriormente, esta é a amostra que foi usada para a análise qualitativa, que foi realizada antes da quantitativa. Sendo assim, o medicamento foi macerado, usado na parte qualitativa e, posteriormente, armazenado em geladeira. Como apontado por TAMELINI (2022), uma vez macerado, o efeito protetor do invólucro açucarado deixou de agir e os princípios ativos podem ter sofrido degradação com o tempo, levando a salientar que a análise deve ser realizada o mais breve possível após a preparação da amostra.

Em segundo lugar, a quantidade de isometepteno obtida não é referente ao mucato de isometepteno (a substância informada na bula), o qual é formado por duas unidades de isometepteno e uma de ácido galactárico (MM = 492.65 g/mol) (SIEGRIST, 2024). Dessa forma, a massa esperada de isometepteno na amostra passa a ser 17.2 mg e as diferenças para as amostras 1, 2 e 3 se tornam 10.95, 3.38 e 3.14 mg, respectivamente. Como supracitado, o desvio associado à Amostra 1 pode ser decorrente de degradação, porém a solubilidade do isometepteno em dimetilsulfóxido deve ser considerada. Já avaliando as outras duas amostras para ver se atendem ao determinado na *Farmacopeia Brasileira* (2019), nota-se que as diferenças de 3.38 e 3.14 mg correspondem a 19.6% e 18.3%, respectivamente, sendo, portanto, maiores que os 5% indicados. Uma possível explicação para este fato pode ter relação com a solubilidade do isometepteno, o qual é dito ser *levemente* solúvel em DMSO (isometheptene CAS#: 503-01-5", 2023). Esta conclusão chama a atenção para o fato de que, em análises de misturas, em especial quantitativa, é preferível a escolha de um solvente que solubilize todos os componentes da mistura, ou então que sejam feitas análises separadas com diferentes solventes. Portanto, um estudo de solubilidade mais detalhado precisa ser realizado.

Em terceiro lugar, tanto os valores obtidos para a dipirona e para a cafeína estão dentro do permitido nas amostras 2 e 3 e são menores na 1. Para a dipirona, o obtido foi 61.8% menor em 1, 1.26% menor em 2 e 1.94% maior em 3. Já para a cafeína, o valor obtido é 58.1% menor em 1, 0.40% menor em 2 e 1.57% menor em 3. A discrepância entre os valores obtidos para a amostra 1 e para outras amostras pode ser devido à absorção de água pelo material macerado, uma vez que o material ficou vários dias em geladeira.

Por fim, convém ressaltar que a quantidade de amostras analisadas é muito pequena para qualquer conclusão definitiva acerca das quantidades. Dos três comprimidos analisados, somente um apresenta valores abaixo dos indicados (Amostra 1). Nos outros dois, um dos princípios ativos (isometepteno) estaria fora dos limites estabelecidos e apenas a dipirona e a cafeína estariam dentro destes limites. Para a análise de peso, a *Farmacopeia Brasileira* (2019) indica a análise de 20 drágeas, possibilitando o estabelecimento de um valor médio e de desvio padrão muito mais sólidos em comparação com o uso de três amostras, apenas. Uma análise com maior espaço amostral deve ser feita para o caso do trabalho ser revisitado em algum momento.

5. Conclusão

De forma geral, foram contemplados os aspectos teóricos da técnica de RMN e sua versatilidade em ser uma técnica tanto qualitativa quanto quantitativa. Além disso, foram abordados um método de análise de misturas por RMN, a técnica DOSY, e a importância que deve ser dada a uma análise de medicamentos, que devem seguir diversas regras descritas em Farmacopeias, não só no Brasil, mas em diversos países.

Quanto à análise qualitativa do medicamento em estudo, foram atribuídos todos os sinais de ^1H dos princípios ativos. O uso do DOSY, do TOCSY e de técnicas hífenadas, como o HSQC-TOCSY, bem como de espectros previstos por *softwares*, foram imprescindíveis para o assinalamento dos sinais no espectro da mistura, tanto dos princípios ativos, quanto de excipientes presentes no comprimido.

Por fim, pela análise quantitativa foi possível calcular quantidades de dipirona e cafeína dentro das esperadas para duas das três amostras, enquanto que o outro componente ativo, isometepto, estava abaixo do esperado nas três amostras, possivelmente por questões de solubilidade no solvente escolhido. No entanto, com apenas três amostras estudadas convém-se não tomar assertivas definitivas acerca das concentrações, uma vez que o recomendado pela Farmacopeia Brasileira seria o estudo de 20 drágeas, o que pode ser realizado no caso deste trabalho ser revisitado, junto com uma metodologia mais controlada para o preparo e posterior análise, com o menor intervalo de tempo possível e com uma análise de solubilidade para os componentes da mistura.

6. Referências

ALZOUBI, T. et al. Stability of α -lactose monohydrate: The discovery of dehydration triggered solid-state epimerization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 604, p. 120715, 15 jul. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517321005202>. Acesso em: 25 ago. 2024.

Aplicações em RMN. Disponível em: <<https://pgquim.ufc.br/pt/linhas-de-pesquisa/aplicacoes-em-rmn/>>. Acesso em: 23 abr. 2024.

CALIBRAÇÃO EM RMNq GUIA PARA OBTER RESULTADOS RASTREÁVEIS AO SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES (SI). [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.gov.br/inmetro/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/calibracao-em-rmnq-guia-inmetro-2019.pdf>. Acesso em: 05 maio. 2024.

CHIKODE, P. P. et al. Comparative studies of diffusion coefficients of sucrose, lactose, and fructose using double exposure digital holographic interferometry (DEDHI) technique. *AIP Conference Proceedings*, v. 3149, n. 1, 19 ago. 2024. Disponível em: <https://pubs.aip.org/aip/acp/article-abstract/3149/1/050002/3308626/Comparative-studies-of-diffusion-coefficients-of?redirectedFrom=PDF>. Acesso em: 25 ago. 2024.

DIEHL, B. et al. Quo Vadis qNMR?. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 177, p. 112147-112147, 5 jan. 2020. DOI 10.1016/j.jpba.2019.112847. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0731708519316280>. Acesso em: 27 dez. 2023.

Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy: Manchester NMR Methodology Group. Disponível em: <https://www.nmr.chemistry.manchester.ac.uk/?q=node/25>. Acesso em: 23 abr. 2024.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6^a ed. Brasília: Anvisa, 2019. v. 1.

FACEY, G. *University of Ottawa NMR Facility Blog*. Disponível em: <<http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.com/2014/03/>>. Acesso em: 5 ago. 2024.

FLORES, D. W. M.; BIZZANI, M.; COLNAGO, L. A. Fundamentos e aplicações da ressonância magnética nuclear (RMN) em baixo campo em pós-colheita de frutas e hortaliças. Instrumentação pós-colheita em frutas e hortaliças. Parte 4: Análises não destrutivas. Tradução . São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Marcos-Ferreira-2/publication/320852874_Instrumentacao_pos-

colheita_em_frutas_e_hortalicas_Editor_Tecnico_Embrapa/links/59fe053e0f7e9b9968c3cbe7/Instrumentacao-pos-colheita-em-frutas-e-hortalicas-Editor-Tecnico-Embrapa.pdf. Acesso em: 22 fev. 2024.

HUANG, T. et al. Advanced approaches and applications of qNMR. *Metrologia*, v. 57, n. 1, p. 14004-14004, 14 jan. 2020. DOI 10.1088/1681-7575/ab336b. Disponível em: <https://iopscience-iop.ez31.periodicos.capes.gov.br/article/10.1088/1681-7575/ab336b>. Acesso em: 27 dez. 2023.

Human Metabolome Database: 1H NMR Spectrum (1D, 400 MHz, D2O, predicted) (HMDB0001847). Disponível em: https://hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/9648. Acesso em: 19 fev. 2024.

Isometheptene CAS#: 503-01-5. Disponível em: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB9890875_EN.htm. Acesso em: 14 ago. 2024.

MALZ, F.; JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, [s. l.], v. 38, ed. 5, p. 813-823, 10 ago. 2005. DOI 10.1016/j.jpba.2005.01.043. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708505001597>. Acesso em: 11 dez. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). ANVISA. *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA: RDC Nº 166, 24 DE JULHO DE 2017, [S. l.], 25 jul. 2017.*

MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA. *RE nº899 de 29 mai. 2003. [S. l.], 29 mai. 2003.*

MONTEIRO, N. K. et al. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. *Química Nova*, v. 35, n. 4, p. 705–708, 1 jan. 2012.

NEOSALDINA® dipirona, mucato de isometepteno, cafeína. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.sausedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/neosaldina.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2024.

OKUOM, M. O. et al. Intermolecular Interactions between Eosin Y and Caffeine Using 1H-NMR Spectroscopy. *International Journal of Spectroscopy*, v. 2013, p. 1–6, 10 nov. 2013.

PATINY, L. Predict ^1H proton NMR spectra. Disponível em: https://www.nmrdb.org/new_predictor/index.shtml?v=v2.138.0. Acesso em: 19 fev. 2024.

PAVIA, D. L. et al. *Introdução à Espectroscopia*. 4ª. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. p. 101-363.

SANTOS, M. S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de ^1H para análises de formulações farmacêuticas. *Química Nova*, v. 36, ed. 2, 18 mar. 2013. DOI 10.1590/S0100-40422013000200020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/kJBMbcM7TbGmNQBvVt7xLVp/#>. Acesso em: 5 jan. 2024.

SCETTRI, A.; SCHIEVANO, E. Quantification of polyols in sugar-free foodstuffs by qNMR. *Food Chemistry*, v. 390, p. 133125-133125, 1 out. 2022. DOI 10.1016/j.foodchem.2022.133125. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0308814622010871>. Acesso em: 27 dez. 2023.

SIEGRIST, J. NMR Chemical Shifts of Impurities Charts. *Merck*, v. 1, n. 1, 2024. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/usp/1349659?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=19323908135&utm_content=149819585412&gclid=CjwKCAjwx-CyBhAqEiwAeOcTdeADriIN4_duVvqUTliK96tuOCff_tAhjZdQIsBIPa24wwib45f0-RoCfugQAvD_BwE. Acesso em: 24 abr. 2024.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7ª. ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons, 2005. p. 127-315.

SOUZA, A. A. DE; LAVERDE JR., A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. *Química Nova*, v. 25, n. 6a, nov. 2002.

TAMELINI, C. et al. *Como utilizar corretamente as formas farmacêuticas* 1ª edição Alfenas-MG 2022 UNIFAL-MG. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/extensao/wp-content/uploads/sites/96/2022/04/como-usar-corretamenteas-formas.pdf>.

TOCSY | NMR Core Facility. Disponível em: <https://nmr.chem.columbia.edu/content/tocsy>.

Apêndice A - Espectros complementares

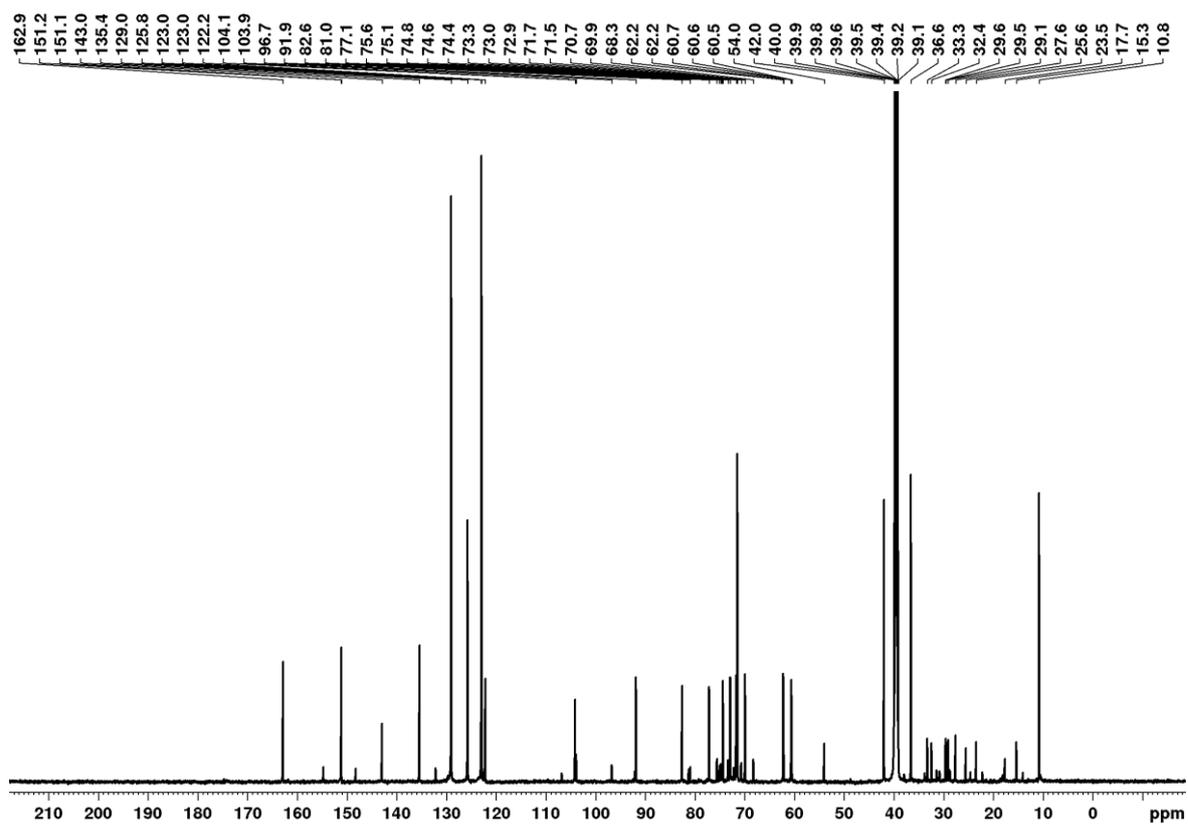


Figura A.1 - Espectro de ^{13}C de um extrato em DMSO- d_6 de um comprimido de do analgésico comercial (150 MHz, DMSO- d_6). Fonte: Elaborada pelo autor.

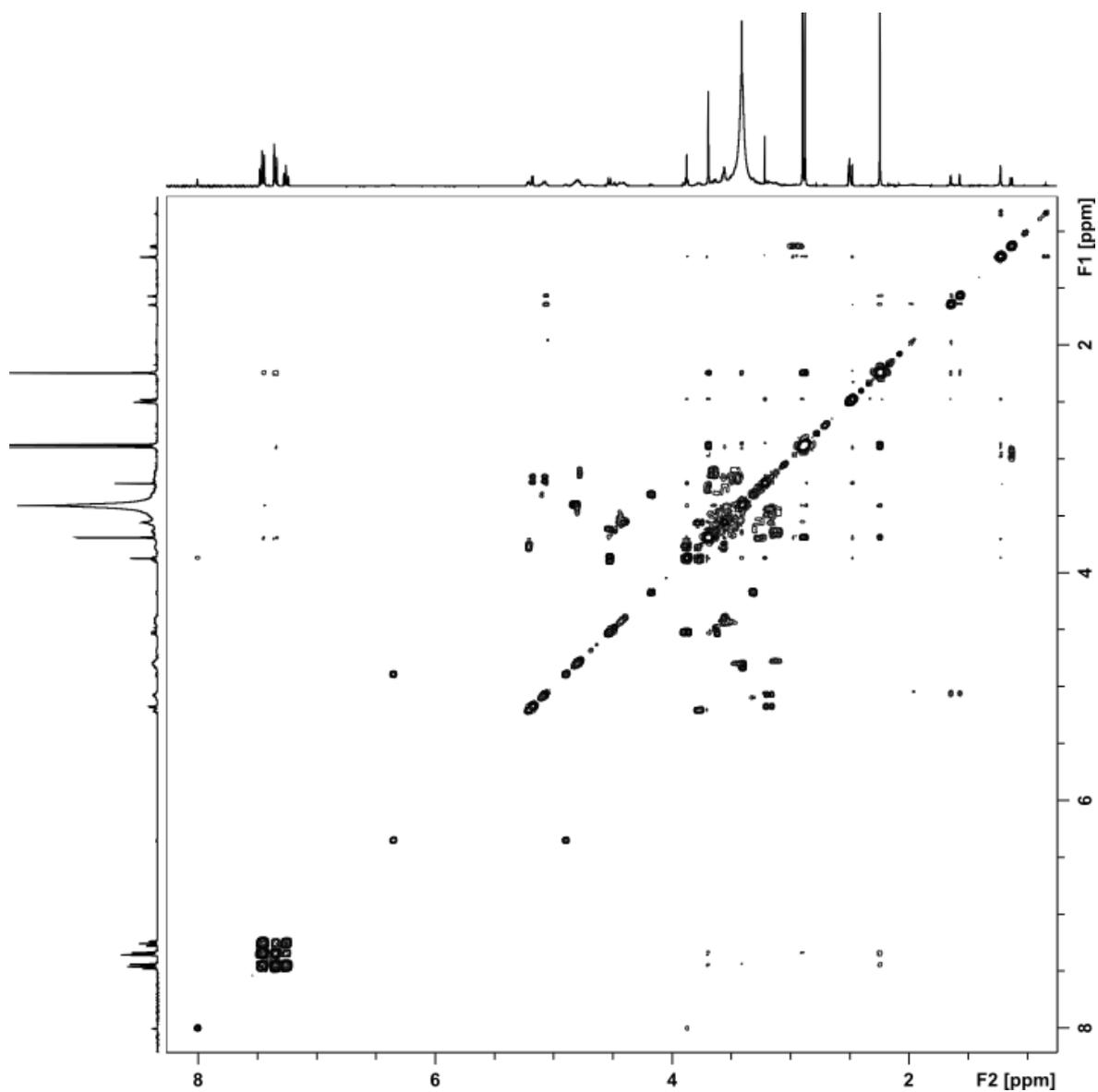


Figura A.2 - Mapa de contorno COSY de um extrato em DMSO-d₆ de um comprimido do analgésico comercial (400 MHz, DMSO-d₆). Fonte: Elaborada pelo autor.

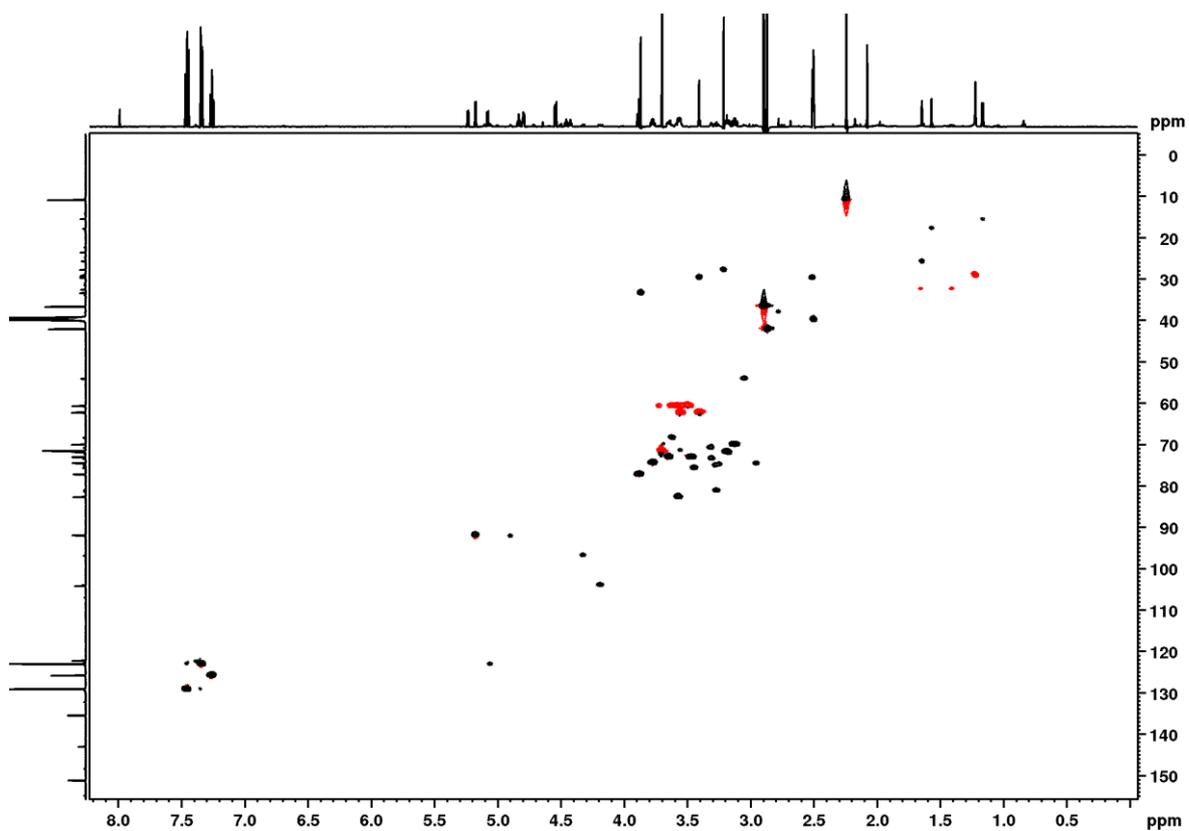


Figura A.3 - Mapa de contorno HSQC de um extrato em DMSO-d6 de um comprimido do analgésico comercial (600 MHz, DMSO-d6). Fonte: Elaborada pelo autor.

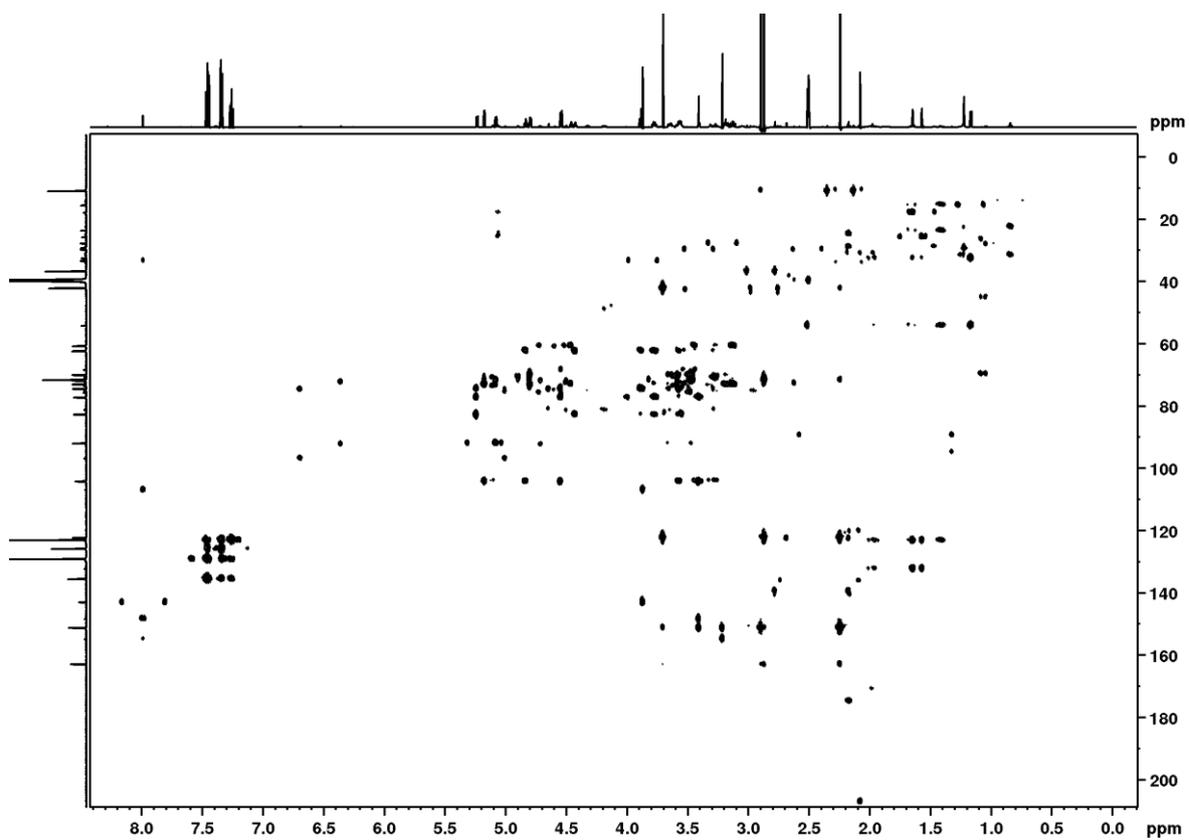


Figura A.4 - Mapa de contorno HMBC de um extrato em DMSO-d₆ de um comprimido do analgésico comercial (600 MHz, DMSO-d₆). Fonte: Elaborada pelo autor.

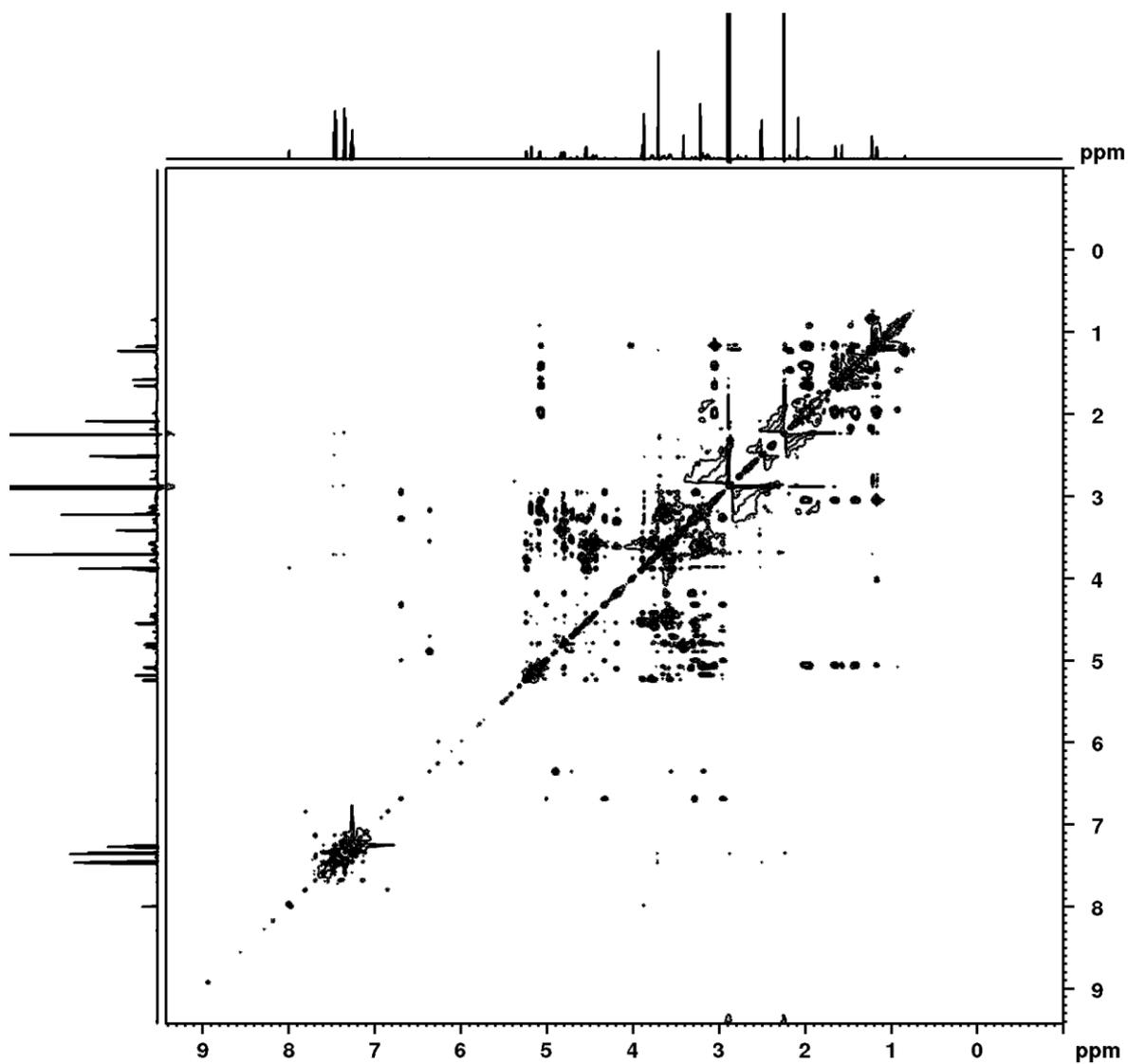


Figura A.5 - Mapa de contorno TOCSY de um extrato em DMSO-d6 de um comprimido do analgésico comercial (600 MHz, DMSO-d6). Fonte: Elaborada pelo autor.

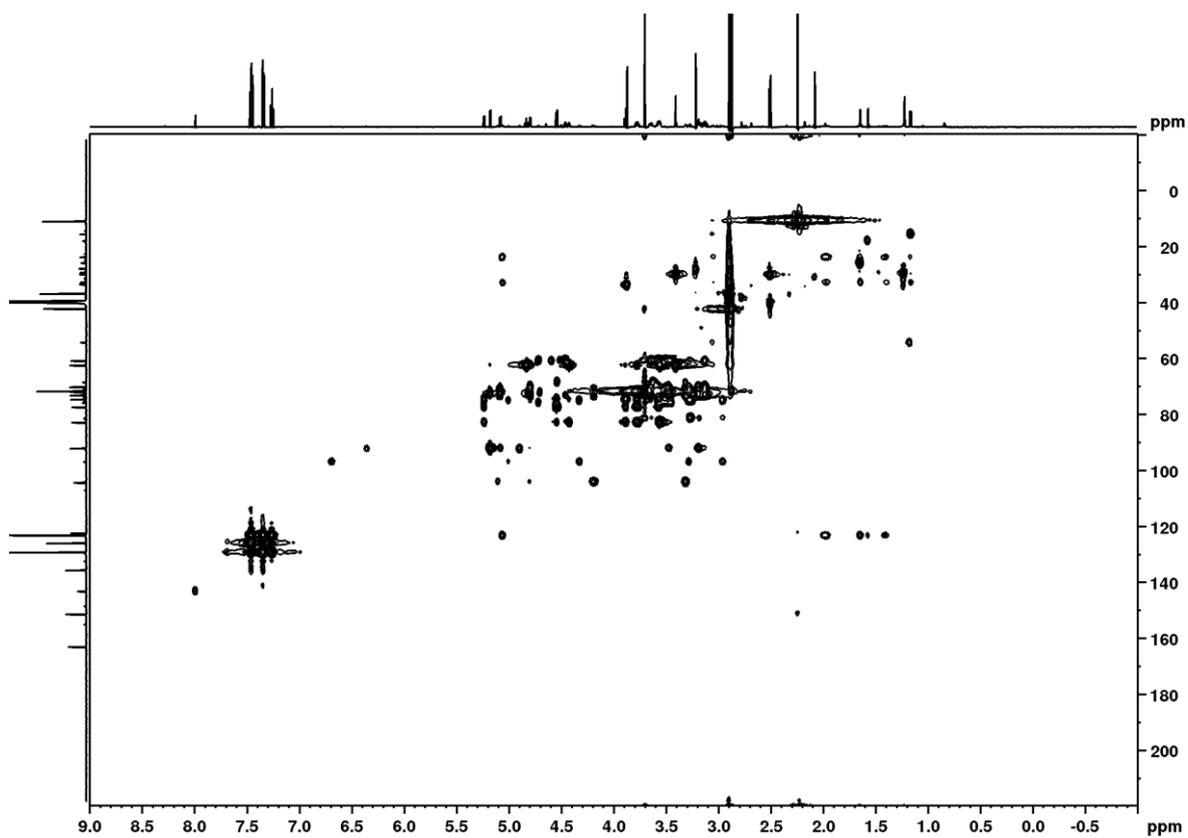


Figura A.6 - Mapa de contorno HSQC-TOCSY de um extrato em DMSO-d₆ de um comprimido do analgésico comercial (600 MHz, DMSO-d₆). Fonte: Elaborada pelo autor.

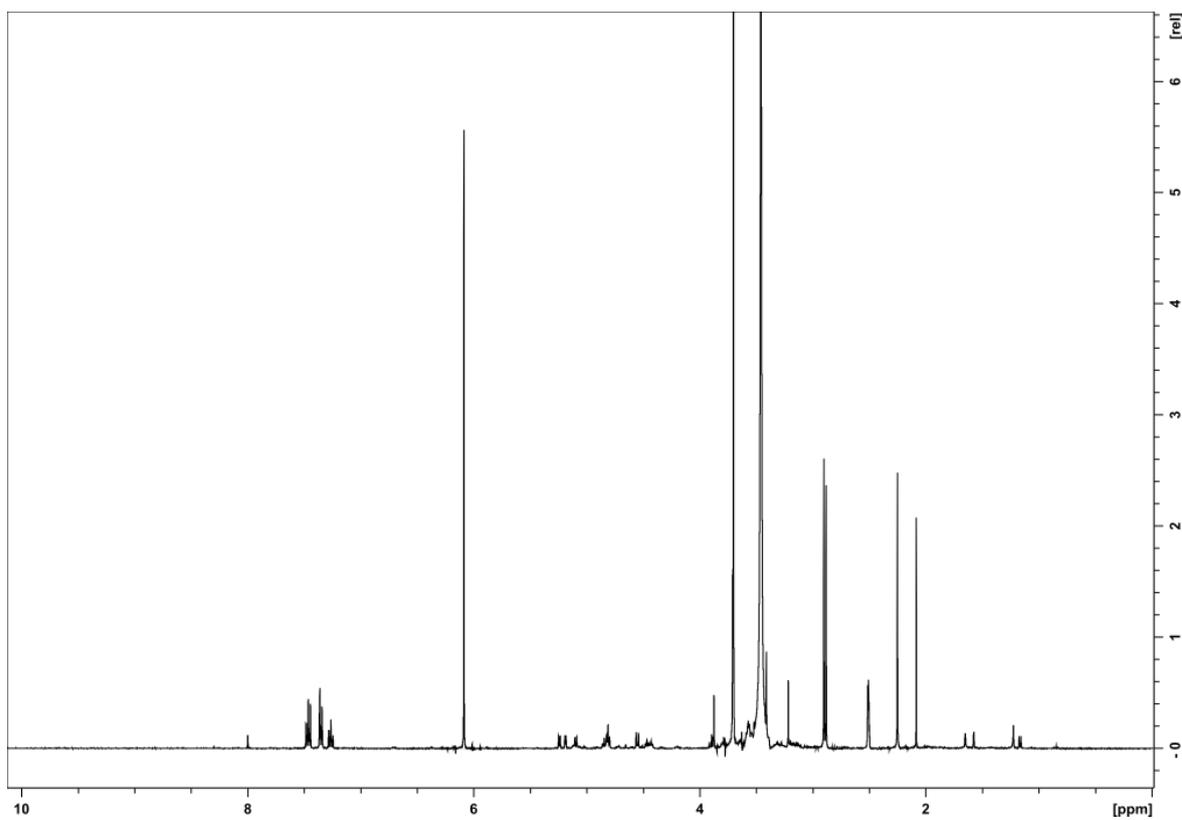


Figura A.7 - Espectro de ^1H (400 MHz, DMSO) de um extrato de um comprimido do analgésico comercial com o padrão TMB. Fonte: Elaborada pelo autor.