

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM QUÍMICA

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS AVANÇADAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA
ANÁLISE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS COM FOCO EM ANÁLISE DE MISTURAS**

Elida Betania Ariza Paez*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Venâncio

bolsista CAPES*

São Carlos - SP

Março 2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Elida Betania Aríza Paez, realizada em 25/10/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Tiago Venâncio (UFSCar)

Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago (EMBRAPA)

Prof. Dr. Ricardo Samuel Schwab (UFSCar)

Prof. Dr. Francisco Paulo dos Santos (UFRGS)

Prof. Dr. Flávio Vinícius Crizóstomo Kock (PUC-Perú)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença em minha vida.

Aos meus pais, Nereida e Omar, pelo apoio, amor, suporte, que mesmo na distância, sempre estiveram presentes e me motivando em cada momento.

A minha avó, Elida, pelo amor e cuidado sempre.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio, pela orientação, confiança e ensinamentos ao longo desses últimos anos.

Ao Prof. Dr. Antônio Ferreira, *Giba*, por todo apoio, contribuições, ensinamentos e conselhos.

Ao Dr. Gabriel Ribeiro, pelos ensinamentos e disposição nas diversas vezes que precisei da sua ajuda, Obrigada.

Aos colegas do Laboratório de RMN, pela ajuda e contribuições.

Aos amigos de Mérida/Venezuela e Brasil, por tantos momentos maravilhosos ao longo desta jornada acadêmica.

A CAPES, CNPq, FAPESP e FAI pelo auxílio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
ADP	Produto de degradação acida do sofosbuvir
AIBN	Azobisisobutironitrilo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
ATDP	Produto de degradação acida do fumarato de tenofovir desoproxila
AQ	Tempo de aquisição
AQ-F1	Tempo de aquisição no domínio indireto
AQ-F2	Tempo de aquisição no domínio direto
BDP	Produto de degradação básica do sofosbuvir
BTDP	Produto de degradação básica do fumarato de tenofovir desoproxila
d1	Tempo de relaxação
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DREAMTIME	Designed Refocused Excitation And optional Mixing for Targets In Vivo and Mixture Elucidation
EDF	Estudo de degradação forçada
F1	Domínio do tempo indireto
F2	Domínio do tempo direto
FDA	Food and Drug Administration
FT	Transformada de Fourier
<i>g</i> COSY	Correlation Spectroscopy
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
<i>g</i> HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
<i>g</i> HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
<i>g</i> TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detection

ICH	International Conference on Harmonization
IFA	Ingrediente farmacêutico ativo
J	Constante de acoplamento
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LC-ESI-MS	Liquid Chromatography-(Electrospray Ionization)-Mass Spectrometry
LC-NMR	Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance
MS	Mass Spectrometry
NOE	Efeito nuclear Overhauser
NS	Número de scans
O1P	Frequência central do pulso
PR	Presaturação
qNMR	Ressonância Magnética Nuclear quantitativa
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SOF	Sofosbuvir
SW	Janela espectral
SW1	Janela espectral do domínio do tempo indireto
SW2	Janela espectral do domínio do tempo direto
TD	Número de pontos de domínio no tempo
TDF	Fumarato de tenofovir desoproxila
UV	Ultravioleta
ZQS	Zero Quantum Spoil

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1	Condições usualmente aplicadas para estudos de degradação forçada.....	5
TABELA 3.1	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN- ¹ H.....	29
TABELA 3.2	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do sofosbuvir puro sem sofrer reação de degradação nenhuma.....	30
TABELA 3.3	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN- ¹ H da mistura de degradação ácida do sofosbuvir.....	31
TABELA 3.4	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) da mistura de degradação ácida do sofosbuvir.....	32
TABELA 3.5	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN- ¹ H da mistura de degradação básica do sofosbuvir.....	34
TABELA 3.6	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) da mistura de degradação básica do sofosbuvir.....	35
TABELA 3.7	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do TDF puro sem sofrer reação de degradação nenhuma.....	37
TABELA 3.8	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do TDF sob condições de hidrólise ácida.....	38
TABELA 3.9	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) da mistura de degradação ácida do TDF.....	39

TABELA 3.10	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de ^1H e ^{13}C da mistura de degradação básica do TDF....	40
TABELA 3.11	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) da mistura de degradação ácida do TDF.....	41
TABELA 3.12	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de DREAMTIME na mistura de composição conhecida	44
TABELA 3.13	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de DREAMTIME na mistura de degradação ácida do Sofosbuvir.....	46
TABELA 3.14	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de DREAMTIME na mistura de degradação básica do sofosbuvir.....	48
TABELA 3.15	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de DREAMTIME na mistura de degradação ácida do TDF...	50
TABELA 3.16	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de DREAMTIME na mistura de degradação básica do TDF..	52
TABELA 4.1	Quantificação ácida do SOF e os produtos de degradação ADP3, ADP4, ADP5 e ADP7.....	96
TABELA 4.2	Quantificação básica do SOF e os produtos de degradação BDP1 e BDP2.....	99
TABELA 4.3	Quantificação dos produtos de degradação ácida do TDF: ATDP2, ATDP3 e ATDP4.....	137
TABELA 4.4	Quantificação dos produtos de degradação básica do TDF: BTDP3 e BTDP5.....	138

TABELA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Sequência de pulso RMN DREAMTIME.....	19
FIGURA 1.2	DREAMTIME aplicada em uma amostra de real de urina e organismo vivo, <i>Daphnia Magna</i>	21
FIGURA 1.3	Estrutura química do Sofosbuvir e fumarato de tenofovir desoproxila.....	24
FIGURA 4.1	Compostos utilizados na preparação da mistura de composição e concentração conhecida para a implementação da técnica DREAMTIME.....	55
FIGURA 4.2	Espectro de ^1H (<i>zgcppr</i>) com supressão de água (e ampliação) da mistura padrão de composição conhecida	56
FIGURA 4.3	Ajuste da largura de pulso 10-40 ms no formato do pulso da nicotinamida.....	58
FIGURA 4.4	Variação do módulo TOCSY na sequência DREAMTIME para a seleção da nicotinamida na mistura de composição conhecida ..	60
FIGURA 4.5	Influência da variação da média da constante de acoplamento da alanina na mistura de composição conhecida	61
FIGURA 4.6	Influência da variação da média da constante de acoplamento da alanina na mistura de composição conhecida	62
FIGURA 4.7	Seleção de um par de spins que não acoplam entre si da molécula de fenilalanina na mistura de composição conhecida variando os módulos de aquisição.....	64
FIGURA 4.8	Espectro de ^1H convencional e ^1H -DREAMTIME do ácido maleico.....	65
FIGURA 4.9	Espectro de ^1H -DREAMTIME da mistura de composição conhecida.....	66
FIGURA 4.10	Espectro ^1H -DREAMTIME na múltipla seleção da mistura de: fenilalanina, ácido aspártico e alanina.....	67

FIGURA 4.11	Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME da fenilalanina, alanina e ácido aspártico sem ativar e ativando os filtros opcionais.....	68
FIGURA 4.12	Centros reativos da molécula do Sofosbuvir em meio ácido e meio básico.....	71
FIGURA 4.13	Expansão do mapa de contorno do $g\text{HMBC}$ com ênfase nos sinais correspondentes aos prótons H26 dos produtos de degradação ADP1, ADP2 e ADP3 da mistura ácida do SOF.....	78
FIGURA 4.14	Expansão do mapa de contorno do $g\text{HMBC}$ com ênfase nos sinais correspondentes ao produto de degradação ADP6 da mistura ácida do SOF.....	79
FIGURA 4.15	Expansão do mapa de contorno do $g\text{COSY}$ com ênfase nos sinais correspondentes ao produto de degradação ADP6 da mistura ácida do SOF.....	81
FIGURA 4.16	Expansão do mapa de contorno do $g\text{COSY}$ com ênfase nos sinais correspondentes ao produto de degradação ADP6 da mistura ácida do SOF.....	82
FIGURA 4.17	Espectros de RMN- ^1H (400 MHz), em DMSO- d_6 e 298K, obtidos para a mistura de degradação ácida (A), básica (B) e sofosbuvir sem degradar (C).....	83
FIGURA 4.18	Espectros de ^1H -DREAMTIME dos produtos de degradação ADP3 e ADP7 variando as larguras de pulso. A e E) Largura de pulso: 10 ms; B e F) Largura de pulso: 20 ms; C e G) Largura de pulso: 30 ms; D e H) Largura de pulso: 40 ms.....	85
FIGURA 4.19	Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação ADP4: A) Selecionando os spins acoplados entre si de todos os subsistemas da molécula. B) Incluindo unicamente	

	o subsistema dos núcleos H29 e H32. C) Selecionando spin que não acoplam entre si	86
FIGURA 4.20	Espectro de ^1H -DREAMTIME dos produtos de degradação ADP1 e ADP2 do SOF com ausência do sinal correspondente ao H14	87
FIGURA 4.21	Média das constantes de acoplamento dos spins correspondentes a cada subsistema dos produtos de degradação ADP5 e BDP3.....	88
FIGURA 4.22	Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BDP2 aplicando os módulos: A) ZQS, PR, TOCSY e AV; B) ZQS, PR e AV; C) ZQS e PR.....	89
FIGURA 4.23	Espectro ^1H -DREAMTIME dos produtos de degradação BDP1 e BDP2 adquiridos simultaneamente aplicando todos os módulos: A) ZQS, PR, TOCSY e AV; B) ZQS, PR e AV. C) Espectro de RMN- ^1H (zg) da mistura básica do sofobuvir.....	90
FIGURA 4.24	Expansão do mapa de contorno do $g\text{HMBC}$ com os deslocamentos químicos dos produtos de degradação ADP4 e ADP5 assinalados.....	91
FIGURA 4.25	Espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação A) ADP5 e B) ADP4. C) Espectro de ^1H (zg) do sofobuvir sob condições ácidas.....	92
FIGURA 4.26	Espectro de ^1H (zg) da mistura de degradação ácida do SOF sob condições quantitativas utilizando como padrão primário ácido maleico para quantificar o SOF e os produtos de degradação ADP3, ADP4, ADP5 e ADP7.....	94
FIGURA 4.27	Ampliação do espectro de ^1H (zg) da mistura de degradação ácida do SOF sob condições quantitativas utilizando como padrão interno o ácido maleico na quantificação do SOF.....	95

FIGURA 4.28	Ampliação do espectro de ^1H (zg) da mistura de degradação básica do SOF sob condições quantitativas utilizando como estândar interno o ácido maleico na quantificação do SOF, BDP1 e BDP2.....	98
FIGURA 4.29	Expansão do mapa de contorno do gCOSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP1 assinalados.....	105
FIGURA 4.30	Expansão do mapa de contorno do gHMBC com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP1 assinalados	106
FIGURA 4.31	Expansão do mapa de contorno do gHMBC com ênfase nos simpletos correspondentes aos prótons H4 e H8 do produto de degradação ATDP1.....	107
FIGURA 4.32	Expansão do mapa de contorno do gHSQC com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP1 assinalados.....	108
FIGURA 4.33	Expansão do mapa de contorno do gHMBC com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP2 assinalados	109
FIGURA 4.34	Expansão do mapa de contorno do gCOSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP3 assinalados	110
FIGURA 4.35	Experimento de difusão DOSY	111
FIGURA 4.36	Expansão do mapa de contorno do gCOSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP4 assinalados	112

FIGURA 4.37	Expansão do mapa de contorno do <i>g</i> HSQC com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP4 assinalados	113
FIGURA 4.38	Expansão do mapa de contorno do <i>g</i> COSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação BTDP1 assinalados	114
FIGURA 4.39	Expansão do mapa de contorno do <i>g</i> COSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação BTDP2 assinalados	115
FIGURA 4.40	Expansão do mapa de contorno do <i>g</i> COSY com os deslocamentos químicos dos produtos de degradação BTDP4 e BTDP5 assinalados	116
FIGURA 4.41	Espectro de RMN- ¹ H convencional (zg) obtido para a mistura de: A) Degradação básica do TDF; B) Degradação ácida do TDF e C) TDF sem sofrer reação de degradação	117
FIGURA 4.42	Influência da largura do pulso e média da constante de acoplamento em J (AV) na intensidade dos sinais dos compostos ATDP2 e ATDP3. Ampliação do espectro de ¹ H-DREAMTIME do ATDP3 com A) AV= 7,5 Hz; B) AV= 7 Hz; C) AV= 6,5 Hz; Largura de pulso D) 40 ms; E) 30 ms; F) 20 ms; G) 10 ms	119
FIGURA 4.43	Influência do mixing time na fase dos sinais nos espectros de ¹ H-DREAMTIME do ATDP2. Ampliação do espectro de ¹ H-DREAMTIME do ATDP2 com os filtros A) ZQS e PR; B) ZQS, PR e AV; C) ZQS, PR e TOCSY; D) largura de pulso 40 ms; E) ZQS, PR, AV e TOCSY	121
FIGURA 4.44	Screening de valores de mixing time e a sua influência na fase dos sinais nos espectros de ¹ H-DREAMTIME. Ampliação do espectro de ¹ H-DREAMTIME com TOCSY de: A) 60ms; B) 120 ms; C) 180 ms; D) 260 ms	122

FIGURA 4.45	Ampliação do espectro de A) ¹ H-DREAMTIME com ausência dos sinais correspondentes aos prótons H4 e H8; B) ¹ H convencional da mistura ácida do TDF.....	124
FIGURA 4.46	Ampliação do espectro de A) e B) ¹ H-DREAMTIME selecionando os produtos de degradação ATDP2 e ATDP3; C e D) ¹ H convencional da mistura ácida do TDF	125
FIGURA 4.47	Ampliação do espectro de: A) ¹ H-DREAMTIME selecionando os produtos de degradação BTDP4 e BTDP5; B) ¹ H convencional da mistura básica do TDF.....	126
FIGURA 4.48	Ampliação do espectro de ¹ H convencional da mistura básica do TDF na proporção: A) TDF: NaOD, 1:1; B) TDF: NaOD, 1:2.	127
FIGURA 4.49	Ampliação do espectro de ¹ H convencional da mistura básica do TDF. Todos os espectros foram realizados em DMSO-d6 a 400 MHz (para o núcleo de ¹ H) e a 298 K	128
FIGURA 4.50	Ampliação do espectro de A) ¹ H-DREAMTIME do produto de degradação BTDP5 aplicando todos os filtros e com os parâmetros de aquisição otimizados. B) ¹ H convencional da mistura ácida do TDF.....	129
FIGURA 4.51	Ampliação do espectro de A) ¹ H convencional do TDF com zoom nos sinais correspondentes aos prótons H27, H26 e H25; B) ¹ H-DREAMTIME do produto de degradação BTDP2 com valores de largura de pulso e ZQS, PR, TOCSY e AV otimizados com ênfase nos sinais dos prótons H26, H27 e H25. C) ¹ H-DREAMTIME do produto de degradação BTDP2; D) ¹ H convencional da mistura ácida do TDF.....	130
FIGURA 4.52	Ampliação do espectro de ¹ H convencional da mistura básica do TDF com ênfase no produto de degradação BTDP5	131

FIGURA 4.53	Ampliação do espectro de A) ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BTDP5. B) ^1H convencional da mistura básica do TDF.....	132
FIGURA 4.54	Ampliação do espectro de A) ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BTDP5. B) ^1H convencional da mistura básica do TDF	133
FIGURA 4.55	Ampliação do espectro de A) ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BTDP3. B) ^1H convencional da mistura básica do TDF	134
FIGURA 4.56	Ampliação do espectro de A) ^1H convencional da mistura de degradação básica do TDF. Ampliação dos espectros de ^1H -DREAMTIME dos produtos de degradação BDT1 (B), BDPT2 (C), BDPT3 (D), BDPT4 (E) e BTDP5 (F)	135
FIGURA 4.57	Ampliação do espectro de ^1H (zg) da mistura de degradação ácida do TDF sob condições quantitativas utilizando como estandar interno o ácido maleico na quantificação do ATDP3 e ATDP4	136
FIGURA 4.58	Ampliação do espectro de ^1H (zg) da mistura de degradação básica do TDF sob condições quantitativas utilizando como estandar interno o ácido maleico na quantificação do BTDP2, BTDP3 e BTDP5	148

TABELA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1	Síntese do carisbamato e a origem da impureza isomérica	14
ESQUEMA 1.2	Produto de degradação alcalino proposto pelos autores Shah e Golla do fármaco ezetimibe	15
ESQUEMA 1.3	Estrutura química do fármaco diacerina e suas impurezas (impureza 1 e 2), ambas identificadas por RMN	15
ESQUEMA 1.4	Produto de degradação identificado por RMN do fármaco telmisartan	16
ESQUEMA 4.1	Produtos de degradação do sofosbuvir sob condições ácidas.....	71
ESQUEMA 4.2	Proposta da rota de degradação do sofosbuvir sob condições ácidas.....	73
ESQUEMA 4.3	Produtos de degradação do sofosbuvir sob condições ácidas	75
ESQUEMA 4.4	Proposta da rota de degradação do sofosbuvir sob condições básicas	76
ESQUEMA 4.5	Produtos de degradação do TDF sob condições de estresse ácido	99
ESQUEMA 4.6	Produtos de degradação do TDF sob condições de estresse básico.....	100
ESQUEMA 4.7	Proposta da rota de degradação do TDF sob condições ácidas	101
ESQUEMA 4.8	Proposta da rota de degradação do TDF sob condições básicas.....	103

RESUMO

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS AVANÇADAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA ANÁLISE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS COM FOCO EM ANÁLISE DE MISTURAS. Neste trabalho, foi aplicada a técnica *Designed Refocused Excitation and optional Mixing for Targets In vivo and Mixture Elucidation* (DREAMTIME) para a análise de misturas de degradação complexas de compostos farmacêuticos, focando em casos com sobreposição espectral e sinais de baixa intensidade em espectros de RMN-¹H. A técnica DREAMTIME melhora a especificidade molecular em comparação aos espectros convencionais, combinando excitação seletiva dupla com formas de onda moduladas em amplitude e fase. O uso de filtros espectrais permite cancelar componentes indesejados, isolando um ou mais compostos simultaneamente dentro de uma mistura. O estudo teve dois objetivos principais: (1) a implementação da sequência DREAMTIME utilizando uma amostra padrão de composição e concentração conhecidas, e (2) a sua aplicação na seleção e separação de produtos de degradação dos fármacos sofosbuvir (SOF) e fumarato de tenofovir desoproxila (TDF), sob condições ácidas e básicas, sem a necessidade de separação física. Os produtos de degradação foram identificados por meio de técnicas bidimensionais de RMN, como COSY, TOCSY, HMBC e HSQC, e os sinais foram isolados seletivamente utilizando DREAMTIME. No caso do SOF, sete produtos de degradação ácida e quatro produtos de degradação básica foram identificados. Para o TDF, foram identificados quatro produtos na degradação ácida e cinco na degradação básica. A técnica DREAMTIME demonstrou ser eficaz na recuperação dos sinais dos compostos, resolvendo a sobreposição espectral entre o fármaco original e os produtos de degradação. A quantificação foi realizada com base nos espectros de RMN-¹H quantitativos, após 48 horas de degradação. A degradação do SOF como princípio ativo foi determinada em condições ácidas (10,10%), devido à presença de sinais isolados. Entretanto, a ausência de sinais isolados em condições básicas para o SOF e em ambas as condições para o TDF impediu a determinação precisa da degradação desses compostos. Importante destacar que a otimização dos parâmetros da técnica DREAMTIME, como o tempo de pulso, a média da constante de acoplamento em J , e o filtro *mixing time*, foi fundamental para

melhorar a seletividade e intensidade dos sinais, garantindo a obtenção de espectros limpos e bem-resolvidos.

ABSTRACT

APPLICATION OF ADVANCED NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE TECHNIQUES FOR ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS WITH A FOCUS ON MIXTURE ANALYSIS. In this work, the Designed Refocused Excitation and optional Mixing for Targets In vivo and Mixture Elucidation (DREAMTIME) technique was applied for the analysis of complex degradation mixtures of pharmaceutical compounds, focusing on cases with spectral overlapping and low intensity signals in $^1\text{H-NMR}$ spectra. The DREAMTIME technique improves molecular specificity compared to conventional spectra by combining double selective excitation with amplitude- and phase-modulated waveforms. The use of spectral filters allows to cancel unwanted components, isolating one or more compounds simultaneously within a mixture. The study had two main objectives: (1) the implementation of the DREAMTIME sequence using a standard sample of known composition and concentration, and (2) its application in the selection and separation of degradation products of the drugs sofosbuvir (SOF) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF), under acidic and basic conditions, without the need for physical separation. The degradation products were identified by two-dimensional NMR techniques, such as COSY, TOCSY, HMBC and HSQC, and the signals were selectively isolated using DREAMTIME. In the case of SOF, seven acidic degradation products and four basic degradation products were identified. For TDF, four products were identified in the acidic degradation and five in the basic degradation. The DREAMTIME technique proved to be effective in recovering the signals of the compounds, resolving the spectral overlap between the parent drug and the degradation products. Quantification was performed based on quantitative $^1\text{H-NMR}$ spectra, after 48 hours of degradation. The degradation of SOF as an active principle was determined under acidic conditions (10.10%), due to the presence of isolated signals. However, the absence of isolated signals under basic conditions for SOF and under both conditions for TDF prevented the accurate determination of the degradation of these compounds. It is important to highlight that the optimization of the DREAMTIME technique parameters, such as the pulse time, the average coupling constant in J , and the *mixing time* filter, was essential to improve

the selectivity and intensity of the signals, ensuring the obtaining of clean and well-resolved spectra.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	<i>iv</i>
Lista de Tabelas	<i>vi</i>
Tabela de Figuras	<i>viii</i>
Tabela de Esquemas	<i>xv</i>
Resumo	<i>xvi</i>
Abstract	<i>xviii</i>
1. Introdução	1
1.1 Degradação forçada e estudos de estabilidade de fármacos	1
1.2 Condução de estudos de degradação forçada sob diferentes condições de estresse.....	3
1.2.1 Degradação Hidrolítica	3
1.2.2 Degradação Oxidativa	4
1.2.3 Degradação Fotolítica	4
1.2.4 Degradação Termolítica	5
1.3 Método de Ensaio de Indicação de Estabilidade (SIAM)	6
1.4 Ressonância Magnética Nuclear	9
1.5 A RMN na indústria farmacêutica	12
1.6 DREAMTIME: <i>Designed Refocused Excitation And optional Mixing for Targets In Vivo and Mixture Elucidation</i>	16
2. Objetivos	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Especificos	25
3. Materiais e equipamentos	26
3.1. Reagente	26
3.2 Preparo de amostras	26
3.2.1 Solventes deuterados	26

3.2.2	Implementação do experimento DREAMTIME: Amostra de composição conhecida	26
3.2.3	Estudos de degradação forçada	27
a.	Amostra da mistura de degradação do sofosbuvir (SOF)	27
b.	Amostra da mistura de degradação do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)	27
3.3	Equipamentos e aquisição de espectros	28
3.3.1	Espectrómetros de RMN	28
3.3.2	Aquisição dos espectros 1D e 2D de cada amostra analisada..	29
3.3.2.1	Amostra padrão de composição conhecida	29
a.	Aquisição dos espectros 1D de hidrogênio da amostra estandar de composição conhecida	29
3.3.2.2	Amostra do sofosbuvir puro sem sofrer reação de degradação	30
a.	Experimentos 1D de hidrogênio e carbono do sofosbuvir puro sem sofrer reação de degradação nenhuma	30
3.3.2.3	Amostra do sofosbuvir sob condições de hidrólise ácida	31
a.	Aquisição dos espectros 1D de hidrogênio e carbono do sofosbuvir sob condições de hidrólise ácida	31
b.	Aquisição e processamento dos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) do sofosbuvir sob hidrólise ácida	31
3.3.2.4	Amostra do sofosbuvir sob condições de hidrólise básica	33
a.	Aquisição e processamento dos espectros 1D de hidrogênio e carbono do sofosbuvir sob condições de hidrólise básica	33
b.	Aquisição e processamento dos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) do sofosbuvir sob condições de hidrólise básica	34

c.	Aquisição de RMN de ^1H para estudo de quantificação absoluta do sofosbuvir em meio ácido e básico	36
3.3.2.5	Amostra do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) sem sofrer degradação	37
a.	Experimentos 1D de hidrogênio e carbono do TDF puro sem sofrer reação de degradação nenhuma	37
3.3.2.6	Amostra do TDF sob condições de hidrólise ácida	37
a.	Experimentos 1D de hidrogênio e carbono do TDF sob condições de hidrólise ácida	37
b.	Aquisição e processamento dos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) do TDF sob condições de hidrólise ácida..	38
3.3.2.7	Amostra do TDF sob condições de hidrólise básica	40
a.	Aquisição dos espectros 1D de hidrogênio do TDF sob condições de hidrólise básica	40
b.	Aquisição e processamento dos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) do TDF sob condições de hidrólise básica..	41
c.	Aquisição de RMN de ^1H para estudo de quantificação absoluta do TDF em meio ácido e básico	42
3.3.3	Aquisição e processamento de experimentos utilizando a sequência de pulso DREAMTIME	43
3.3.3.1	Aquisição dos experimentos de ^1H utilizando DREAMTIME na mistura composição conhecida	44
3.3.3.2	Aquisição dos experimentos de ^1H utilizando a sequência de pulso DREAMTIME da amostra de sofosbuvir sob condições de hidrólise ácida	45
3.3.3.3	Aquisição dos experimentos de ^1H utilizando a sequência de pulso DREAMTIME da amostra de sofosbuvir sob condições de hidrólise básica	48

3.3.3.4	Aquisição dos experimentos de ^1H utilizando a sequência de pulso DREAMTIME da amostra de TDF sob condições de hidrólise ácida	50
3.3.3.5	Aquisição dos experimentos de ^1H utilizando a sequência de pulso DREAMTIME da amostra de TDF sob condições de hidrólise básica	52
4.	Discussão e Resultados	55
4.1	Capítulo I	55
4.1.1	Implementação da sequência de pulso DREAMTIME utilizando uma amostra padrão de aminoácidos para a aquisição dos espectros de ^1H das moléculas de interesse	55
4.1.	Capítulo II	70
4.2.1	DREAMTIME RMN aplicado na identificação dos produtos da degradação ácida e básica do sofosbuvir e tenofovir desoproxila em uma mistura	70
4.2.1.1	Estudo da degradação ácida e básica do sofosbuvir	70
4.2.1.2	Identificação dos produtos de degradação a partir das técnicas de 2D RMN	76
4.2.1.3	DREAMTIME: Seleção de cada um dos produtos de degradação ácida e básica do sofosbuvir	83
4.2.1.4	Quantificação do sofosbuvir e seus produtos de degradação a partir de RMN- ^1H quantitativa	92
4.2.1.5	Estudo da degradação ácida e básica do fumarato de desoproxil tenofovir (TDF)	99
4.2.1.6	Identificação dos produtos de degradação do fumarato de desoproxil tenofovir a partir das técnicas de 2D RMN	104
4.2.1.7	DREAMTIME: Seleção de cada um dos produtos de degradação ácida e básica do fumarato de desoproxil tenofovir (TDF)	116
4.2.1.8	Quantificação do TDF e seus produtos de degradação a partir de RMN- ^1H	135

5. Conclusão	140
6. Referências Bibliográficas	142
7. Anexos	146

1. INTRODUÇÃO

1.5 Degradação forçada e estudos de estabilidade de fármacos

A estabilidade de um produto farmacêutico e/ou matéria prima de forma isolada é definida como a capacidade que ele tem de preservar as mesmas condições e características de quando foi fabricado, dentro dos limites de tempo especificados e durante o tempo o qual o produto permanece estocado ou em uso. Esse período de tempo é compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado e o período em que a sua potência é reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de degradação estejam todos seguramente identificados, quantificados e seus efeitos sejam previamente reconhecidos (CALDEIRA, 2014). Com o objetivo de garantir a segurança da população usuária de medicamentos e fármacos, diversas agências reguladoras ao redor do mundo, vem implementando regulamentos bastante rígidos. Dentre essas agências reguladores, se destaca a FDA (*Food and Drug Administration*) e o ICH (*International Conference on Harmonisation*), cujo papel é a regularização e normatização dos registros de fármacos de uso humano, para proteger a população de danos causados pela presença de impurezas nos fármacos (BLESSY et al., 2014), (ALCÂNTARA et al., 2013).

As diretrizes do ICH tornam essencial organizar os estudos de degradação forçada (EDF) e fazem com que seja obrigatório performar estes testes para o desenvolvimento de novos fármacos (IRAM et al., 2016). As diretrizes, além de oferecer informação no suporte de detecção de potenciais degradantes, também facilitam o desenvolvimento de metodologias analíticas, fornecendo condições de obter uma melhor compreensão do ingrediente farmacêutico ativo (IFA). Permitem, também, ilustrar as rotas de degradação de moléculas farmacologicamente ativas estimando e determinando a estabilidade intrínseca dos fármacos durante a fase de desenvolvimento, além de validar os procedimentos indicadores de estabilidade aplicados (BLESSY et al., 2014), (IRAM et al., 2016). O propósito do estudo de estabilidade é fornecer evidências sobre

como a qualidade de um fármaco varia com o tempo em função de uma variedade de fatores ambientais como temperatura, umidade, pH e luz, possibilitando o estabelecimento das condições de armazenamento, períodos de reteste e prazos de validade (CALDEIRA, 2014). Porém, as diretrizes, em sua maioria, são bastantes gerais em conduzir a degradação forçada e não fornece detalhes sobre a abordagem para os testes de estresse. Muitas indústrias farmacêuticas desenvolveram seus próprios procedimentos operacionais padrão e diretrizes internas para a realização dos EDF, sendo estabelecidos então procedimentos bastantes diversificados (CALDEIRA, 2014).

No Brasil, a ANVISA é o órgão responsável pelo atendimento dos requisitos de condições de estabilidade da indústria farmacêutica do país, que a partir da diretriz RE nº1/2005, regulamentam a realização dos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos com a finalidade de prever, determinar e acompanhar os prazos de estabilidade dos pro-fármacos e/ou fármacos. A resolução foi aplicada para todos os fármacos tanto na sua forma sólida, semissólida, líquida quanto gasosa (CALDEIRA, 2014). A resolução RE nº 1/2005 estabelece a condução dos testes de estabilidade através da realização de três tipos de estudos: estudos de estabilidade acelerada, estabilidade de longa duração e estabilidade de acompanhamento (CALDEIRA, 2014). O objetivo do estudo de estabilidade acelerada em conjunto com o estudo de estabilidade é o de aumentar a velocidade de degradação química e as possíveis mudanças físicas de um produto farmacêutico usando condições forçadas de armazenamento o que permite avaliar o impacto a curto prazo do transporte fora das condições de armazenamento ideais (SILVA 2016). Por outro lado, o estudo de estabilidade de longa duração verifica as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e (as vezes) depois do prazo de validade, com o fim de recomendar as condições de armazenamento do fármaco (CALDEIRA, 2014).

No caso das EDF, a ANVISA define uma série de diretrizes que englobam muito bem os procedimentos de estabilidade e degradação. Por meio do Informe Técnico nº1 são definidas as diretrizes a serem seguidas durante o EDF de uma forma geral, sendo publicadas posteriormente outra série de diretrizes atualizando e detalhando os procedimentos a serem executados. Já a identificação e quantificação dos produtos de

degradação são exigidas no item 2.2.6 da RE nº 560/2002 e no 2.8 da RE nº 398/2004 – regulamentações específicas sobre estudos de estabilidade, vigentes a época, além dos estudos de fotoestabilidade exigidos no item 2.6 da Resolução RE nº398/2004, assim como as recomendações para a sua realização no Anexo II da mesma (ALCÂNTARA et al., 2013), (CALDEIRA, 2014.). Mais recentemente, a ANVISA, publicou a resolução RDC nº53, de abril de 2015, a qual esclarece as condições a serem seguidas para a realização do EDF em medicamentos, além de estabelecer os parâmetros para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação (SILVA 2016). A resolução RDC nº53 preconiza que o medicamento deve ser submetido as condições de estresse de hidrólise ácida, básica, oxidação, aquecimento, umidade, fotólise e íons metálicos, sendo que a não utilização de qualquer uma dessas condições deve ser justificada tecnicamente. A questão de quanto estresse é suficiente, tem gerado certas discussões dentre os especialistas da área. No geral, uma degradação do fármaco entre 2 e 30 % é considerada aceitável (para validação de ensaios cromatográficos). A maior parte da comunidade científica aceita que o objetivo é atingir uma degradação superior a 10% e inferior a aquela que levaria a degradação completa da amostra, já que poderia comprometer o estudo (RAVISANKAR et al., 2017). O objetivo do processo de estresse é gerar produtos de degradação numa quantidade que permita desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificar o fármaco e os seus produtos de degradação (SILVA 2016).

1.5 Condução de estudos de degradação forçada sob diferentes condições de estresse

1.2.1 Degradação Hidrolítica

As reações de hidrólise podem ser catalisadas por ácidos ou bases que podem ser utilizados na indução destas reações hidrolíticas. Este tipo de reação é de grande importância quando a molécula a ser testada tiver grupos funcionais que possam existir em diferentes estados de ionização em meio aquoso (SILVA 2016), (Alcântara et al., 2013), (CALDEIRA, 2014). Uma abordagem comum é expor a amostra a uma ampla faixa de pH de 1 (HCl 0,1 mol.L⁻¹) a 14 (NaOH 0,1 mol.L⁻¹) e a escolha do pH adequado dependerá da reatividade química de cada molécula do fármaco avaliado. Os testes de

degradação hidrolítica devem compreender a exposição do fármaco a condições ácidas, neutras e básicas de preferência em 100% de meio aquoso, exceto quando seja realmente necessário o uso de um solvente para melhorar a solubilidade do fármaco. O uso de temperaturas elevadas é permitido até um limite de aproximadamente 70 °C (RAVISANKAR et al., 2017).

1.2.2 Degradação Oxidativa

As reações de oxidação são conhecidas como auto-oxidações sendo iniciadas via radicalar. O processo tem como fase de iniciação a formação de radicais (passo limitante da velocidade da reação), seguida por uma fase de propagação e, uma fase de terminação. As reações devem ser controladas devido ao fato de que os intermediários da oxidação são, com frequência, termicamente instáveis e podem se decompor através de vias alternativas em temperaturas elevadas. O aumento da temperatura pode conduzir a mudanças não previsíveis nas taxas de degradação, levando a taxas e vias de degradação diferentes daquelas observadas em temperaturas mais baixas. A degradação de um fármaco sob condições oxidativas pode ser avaliada geralmente em solução utilizando um radical iniciador, ou submeter o fármaco à presença de peróxido de hidrogênio por um tempo determinado, a temperatura ambiente e no escuro (CALDEIRA, 2014.).

1.2.3 Degradação Fotolítica

Para que uma degradação sob condições fotolíticas ocorra, deve ser realizada na exposição a luz ultravioleta ou visível na gama de comprimento de onda compreendida entre 300-800 nm, uma exposição a um comprimento de onda menor a 300 nm não é viável devido a que um fármaco não sofre exposição neste valor durante o seu ciclo de vida. Por outro lado, existe a possibilidade de um determinado fármaco sofrer fotodegradação não só pelo componente principal da sua formulação, mas também por algum agente adicional que facilite a absorção de luz (CALDEIRA, 2014), (SILVA 2016). Segundo a ICH (Q1B) a fotodegradação pode ser conduzida a partir de dois tipos de estudo: estudos de degradação forçada e testes confirmatórios. Os testes de degradação forçada são realizados para avaliar a fotossensibilidade do material e assim desenvolver

metodologias analíticas e estudar e elucidar as rotas de degradação dos fármacos. Por outro lado, os testes confirmatórios são realizados sob condições padronizadas com o intuito de ter as informações necessárias e suficientes para a manipulação, embalagem e rotulagem do fármaco (SILVA 2016).

1.2.4 Degradação Termolítica

Devido ao fato que a temperatura representa um fator que influencia a velocidade de reações, as análises que são baseadas em termodegradação são úteis para avaliação da estabilidade térmica. Quando o fármaco é exposto a temperaturas suficientemente elevadas podem ser induzidos processos de pirólise (ruptura de ligações químicas). Destacando-se entre estes processos de pirólise as reações de descarboxilação, hidrólise e rearranjos, por exemplo. O processo de degradação consiste em aumentar a temperatura, de modo que a cada aumento de 10°C aumenta-se em média de duas a três vezes a velocidade da reação. A ANVISA sugere que o intervalo de temperatura em que as amostras são submetidas varie de 40°C a 110°C e, o período de exposição de poucos minutos a meses (RAVISANKAR et al., 2017).

TABELA 1.1. Condições usualmente aplicadas para estudos de degradação forçada.

Tipo de degradação	Condições experimentais	Condições de armazenamento	Tempo de amostragem
Hidrólise	0,1 mol.L ⁻¹ HCl	20°C, 40°C, 60°C	1,3,5 dias
	0,1 mol.L ⁻¹ NaOH		
	3-5% H ₂ O ₂	25°C, 60°C	1,3,5 dias
Oxidativa	Azobisisobutironitrilo (AIBN)	40°C, 60°C	1,3,5 dias
Fotolítica	Luz, 1 X ICH	n.a	1,3,5 dias
	Luz, 3 X ICH	n.a	1,3,5 dias
Térmica	Condições de calor	60°C	1,3,5 dias
	Condições de calor	80°C	1,3,5 dias

1.3 Método de Ensaio de Indicação de Estabilidade (SIAM)

Os métodos de indicação de estabilidade incluem estudos de longo prazo (12 meses), estudos de estabilidade acelerada (6 meses) e estudos intermediários, também chamados de estudos de degradação forçada (>6 meses). Estes últimos estudos, podem ser realizados em condições que permitam gerar produtos de degradação em determinadas condições durante lapsos de tempo menores quando comparados com os estudos de estabilidade acelerada, pelo que a separação, identificação e quantificação dos produtos de degradação pode levar mais tempo. Em comparação com estudos de estabilidade, estudos de degradação forçada ajudam a gerar degradantes em um período de tempo muito menor, geralmente algumas semanas. As amostras geradas a partir da degradação forçada podem ser usadas para desenvolver o método indicador de estabilidade que pode ser aplicado posteriormente para a análise de amostras geradas a partir de estudos de estabilidade acelerados e de longo prazo. O ensaio indicador de estabilidade é um método empregado para a análise de amostras de estabilidade na indústria farmacêutica. Com o desenvolvimento das diretrizes da *International Conference on Harmonisation (ICH)*, o requisito de estabelecimento do método de ensaio indicador de estabilidade (SIAM) tornou-se mais claramente obrigatório. As diretrizes exigem explicitamente a condução de estudos de decomposição forçada sob uma variedade de condições, como pH, luz, oxidação, calor seco, etc. e conseqüentemente a separação do fármaco dos seus produtos de degradação respectivos. Espera-se que o método permita a análise de produtos de degradação individuais (QUADRI et al. 2014), (SWARTZ et al., 2004).

De acordo com a diretriz da FDA (*Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation*, FDA, 2000), um Método Indicador de Estabilidade (SIAM) é definido como um procedimento analítico validado que mede com precisão os ingredientes ativos livres de impurezas do processo, excipientes e produtos de degradação, indicando que o objetivo do teste de estabilidade é fornecer evidências sobre o quanto a qualidade de um API varia com o tempo sob a influência da variedade de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz. A condição de degradação forçada, concentração do agente de estresse e o tempo de estresse devem ser

estabelecidos de tal forma que afetem a degradação de preferência 10-20% do composto original. O principal objetivo de um método indicador de estabilidade é monitorar os resultados durante os estudos de estabilidade para garantir a segurança, eficácia e qualidade (QUADRI et al., 2014), (SEHRAWAT et al., 2010), (SNYDER et al., 1988).

Estudos de degradação forçada ou estresse são realizados para degradar deliberadamente a amostra. Esses estudos são usados para avaliar a capacidade de um método analítico de medir um ingrediente ativo e seus produtos de degradação, sem interferência, gerando potenciais produtos de degradação. Durante a validação do método, além do fármaco ser exposto a ácido, base, calor, luz e agente oxidante para produzir aproximadamente 2% a 30% de degradação do IFA, os estudos também podem fornecer informações sobre as vias de degradação e produtos de degradação que podem se formar durante o armazenamento. Esses estudos também podem ajudar no desenvolvimento da formulação, fabricação e embalagem para melhorar um produto farmacêutico (QUADRI et al., 2014)).

A finalidade da realização dos estudos de degradação forçada se centra principalmente nas seguintes três bases: para o desenvolvimento e validação de metodologias indicadoras de estabilidade, na determinação de vias de degradação de fármacos e na identificação de produtos de degradação que possam surgir durante as rotas de degradação ou possíveis interações com excipientes (QUADRI et al., 2014).

A técnica mais amplamente utilizada no desenvolvimento das metodologias SIAM é a HPLC, sendo a coluna de fase reversa a escolha preferida para iniciar a separação dos componentes da amostra à medida que a degradação é realizada em solução aquosa e muitas das vezes o método pode ser estendido no uso da técnica de LC-MS. Durante o desenvolvimento do método, podem existir impurezas que estejam co-eluídas com o fármaco, nestes casos é necessário análises diretas que podem ser realizados *on-line* usando detecção de matriz de fotodiodo (PDA). O PDA fornece informações sobre a homogeneidade do pico espectral, mas não é aplicável para os produtos de degradação que tem o espectro UV semelhante ao fármaco. Por outro lado, o método indireto envolve mudança nas condições cromatográficas, como razão de fase móvel, coluna, etc., que afetarão a separação do pico. O espectro da condição cromatográfica

alterada é então comparado com os espectros originais. Se os picos dos produtos de degradação e a porcentagem de área do pico do fármaco permanecerem os mesmos, então pode ser confirmado que o pico do fármaco é homogêneo (RIDDHIBEN et al., 2011). O produto de degradação que coeluiu com o fármaco seria aceitável se não fosse encontrado formado em condições de armazenamento aceleradas e de longo prazo (QUADRI et al., 2014). O método é então otimizado para separar picos de eluição próxima alterando a taxa de fluxo, volume de injeção, tipo de coluna e razão de fase móvel.

Os métodos indicadores de estabilidade podem incluir vários métodos como eletroforese (SDS-PAGE, imunoeletroforese, *Western blot*, isoeletrofocalização), cromatografia de alta resolução (por exemplo, cromatografia de fase reversa, SEC, filtração em gel, troca iônica e cromatografia de afinidade) e mapeamento de peptídeos (QUADRI et al., 2014). O método analítico escolhido deve ser sensível o suficiente para detectar impurezas em níveis baixos (por exemplo, 0,05% do analito de interesse ou menos) e as respostas de pico devem estar dentro da faixa de linearidade do detector. O método analítico deve ser capaz de capturar todas as impurezas formadas durante um estudo de estabilidade em ou abaixo dos limites de limiar do ICH (QUADRI et al., 2014), (SINGH et al., 2012). A identificação e caracterização do produto de degradação devem ser realizadas com base nos resultados formais de estabilidade de acordo com os requisitos do ICH. Métodos convencionais (por exemplo, cromatografia em coluna) ou técnicas acopladas (por exemplo, LC MS, LC-NMR) podem ser usados na identificação e caracterização dos produtos de degradação. O uso dessas técnicas pode fornecer melhor percepção da estrutura das impurezas que podem aumentar o espaço de conhecimento de potenciais alertas estruturais para genotoxicidade e o controle de tais impurezas com limites mais rígidos (QUADRI et al., 2014), (SINGH et al., 2012). Deve-se notar que a caracterização estrutural dos produtos de degradação é necessária para as impurezas formadas durante estudos formais de estabilidade de vida útil e acima do limite de qualificação (QUADRI et al., 2014)

Outras tecnologias analíticas também podem ser usadas no desenvolvimento de um método de indicação de estabilidade (QUADRI et al., 2014). A impureza

desconhecida, que é observada durante a análise, desenvolvimento farmacêutico, estudos de estresse e estudos formais de estabilidade dos fármacos, pode ser separada e analisada usando várias técnicas cromatográficas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC), Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Gasosa (CG), Eletroforese Capilar (EC), Cromatografia por Eletroforese Capilar (CEC) e Cromatografia de Fluido Supercrítica (CFS). Uma excelente combinação de técnicas cromatográficas e espectroscópicas acopladas como HPLC-DAD (Detector ultravioleta de matriz de fotodiodos de cromatografia líquida de alta eficiência), LC-MS (Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas), LC-NMR (Cromatografia Líquida-Ressonância Magnética Nuclear) e GCMS (Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas) são usadas quando os degradantes não podem ser isolados na forma pura. HPLC-DAD e LC-MS são usados para comparar o RRT (tempo de retenção relativo), espectros UV, espectros de massa (MS/MS ou MSN) (QIU et al., 2007), (QUADRI et al., 2014).

1.4 Ressonância Magnética Nuclear

Amostras de origem biológica, ambiental, agrícola e farmacêutica são frequentemente encontradas ou manipuladas na forma de misturas. As ciências analíticas se esforçam para fornecer uma caracterização de misturas que seja a mais completa possível. Idealmente, a identidade e a concentração de todos os componentes em uma mistura devem ser acessadas (DUMEZ, 2022).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) vem sendo considerada como uma abordagem poderosa para a análise de misturas. O experimento de RMN mais comum, experimento de RMN-¹H, tem várias características essenciais que são altamente favoráveis para análise de misturas. Este experimento é simples de implementar, pode ser rápido e já produz uma riqueza de informações estruturais, o que é útil para identificar componentes. Também é não invasivo e não destrutivo, o que significa que a amostra pode ser recuperada após análise para armazenamento ou outras análises e, também, no caso de aplicações de monitoramento, que os experimentos podem ser repetidos várias vezes na mesma amostra em função do tempo. A RMN-¹H também fornece acesso direto a informações quantitativas sobre

concentrações. O poder da espectroscopia de RMN também resulta do vasto espaço de experimentos possíveis que podem ser realizados, com um determinado instrumento e uma determinada amostra, por meio do uso de diferentes sequências de pulso. Isso torna possível, por meio de manipulações controladas dos spins nucleares, acessar informações químicas que, de outra forma, permaneceriam invisíveis ou inacessíveis. Porém, no caso da análise de misturas, experimentos 1D clássicos podem se mostrar insuficientes por vários motivos. Um deles é a complexidade da amostra e dos dados espectroscópicos resultantes. Os sinais sobrepostos observados nos espectros 1D podem ser difíceis de interpretar. Como resultado, os sinais detectados nem sempre podem ser analisados. Outra possível razão é a concentração dos componentes. Os limites de detecção para experimentos de RMN são muito desfavoráveis em comparação a outros métodos analíticos. Uma terceira limitação diz respeito à análise de amostras que mudam ao longo do tempo. Embora os experimentos 1D clássicos sejam relativamente rápidos, os métodos disponíveis para abordar a complexidade das misturas geralmente exigem mais tempo, limitando assim o rendimento da análise e tornando-os incompatíveis com análises em tempo real em escalas de tempo curtas.

A complexidade dos espectros de RMN para misturas tem várias origens. Primeiro, compostos estruturalmente semelhantes têm espectros semelhantes e, como resultado, o espectro de uma mistura pode ser complexo mesmo com um número moderado de compostos detectáveis. Segundo, o número de compostos pode ser muito grande (amostras de origem biológico, por exemplo). Nos espectros de misturas, a sobreposição de sinais impede a identificação confiável e a quantificação precisa dos sinais. A atribuição de cada sinal no espectro a um composto específico, mesmo resolvido, também não é trivial. Na atualidade, uma série de técnicas de correlação ou dispersão estão disponíveis para abordar problemas de sobreposição o que simplifica a atribuição dos sinais nos espectros resultando em experimentos menos complexos e com sinais cuja atribuição possa ser mais simples. Experimentos de RMN 2D clássicos, como COSY, TOCSY e HSQC, são técnicas de correlação que ao distribuir sinais ao longo de duas dimensões em vez de uma, tornam possível resolver sinais que se sobrepõem em espectros de RMN-¹H.

Um outro ponto muito importante para considerar é a capacidade de realizar análise de misturas por espectroscopia de RMN sem separação prévia dos componentes, a qual, não foi totalmente explorada. Isso se deve ao paradigma de que os espectros de RMN se tornam muito complexos para analisar quando há muitos compostos presentes. Várias metodologias, até o momento, vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de abordar os problemas de analisar misturas em bruto sem recorrer a sua separação física. Um exemplo deste tipo de metodologias é a abordagem desenvolvida por Shapiro e colaboradores (SHAPIRO et al., 1997) quem desenvolveu uma estratégia para realizar análise de misturas a partir de compostos gerados a partir da síntese combinatória split-mix. A síntese *split and mix*, por sua natureza, gera misturas de compostos. Normalmente, esses compostos contêm uma variedade de substituintes construídos em torno de um modelo comum. O experimento TOCSY é poderoso a este respeito, uma vez que pode identificar redes de prótons acoplados. Em combinação com as correlações TOCSY observadas e dados obtidos a partir de experimentos de HMBC é possível observar a conexão de agrupamentos moleculares separados para identificar moléculas. O experimento HMBC é um experimento particularmente útil, pois conecta prótons a carbonos por meio de dois ou três acoplamentos de ligação. Isso permite a conexão de carbonos protonados a centros não protonados, permitindo assim que os sistemas de spin derivados do experimento TOCSY sejam vinculados. Sendo então possível, percorrer uma conectividade sequencial, para identificar a estrutura usando a ligação a um grupo funcional comum. A estratégia para RMN usando a combinação de HMBC com TOCSY permite a identificação completa de uma mistura complexa sem recorrer à separação física dos componentes (SHAPIRO et al., 1997).

Uma outra técnica, a RMN ordenada por difusão, ou DOSY, visa separar os espectros dos componentes em uma mistura, sem separação física dos próprios componentes. Em experimentos DOSY, a separação é feita de acordo com os coeficientes de difusão translacional das moléculas, onde moléculas maiores vão difundir mais lentamente que as moléculas menores (QUADRI et al., 2014).

Por outro lado, a espectroscopia de correlação total estatística (STOCSY), foi desenvolvida pelo grupo de Nicholson para identificar potenciais biomarcadores e as

moléculas envolvidas na mesma via (QUADRI et al., 2014). A STOCSY é baseada no princípio de que em um conjunto de espectros de RMN, as intensidades dos picos de uma molécula ou das moléculas que estão envolvidas em uma mesma via são linearmente correlacionadas. A covariação pode ser medida estatisticamente e é usada para gerar um gráfico 2D de STOCSY. Além disso, a mobilidade eletrônica também foi utilizada em RMN (espectroscopia de mobilidade, MOSY) para separar as moléculas carregadas em solução. No entanto, devido às faixas dinâmicas limitadas, as moléculas com constantes de coeficiente de autodifusão semelhantes, mobilidade eletrônica ou mudanças de concentração não puderam ser totalmente resolvidas por DOSY, MOSY e STOCSY, respectivamente (QUADRI et al., 2014).

Com o objetivo de separar e quantificar simultaneamente os componentes em uma mistura surge a RMN ordenada por concentração (CORDY) a qual fornece uma nova maneira de quantificação simultânea dos componentes e separação de seus picos de RMN em uma mistura, resultando em alta faixa dinâmica de mais de uma ou duas ordens de magnitude na dimensão de concentração e alta resolução na dimensão de deslocamento químico. Além disso, CORDY pode ser combinado com DOSY para resolver ainda mais os componentes com concentração semelhante ou coeficiente de autodifusão. Deve-se notar que com a ajuda da deconvolução, só é possível resolver os picos parcialmente sobrepostos.

1.5A RMN na indústria farmacêutica

Na indústria química, a RMN é frequentemente utilizada como uma ferramenta no controle de qualidade de produtos ou intermediários de síntese. Este é particularmente o caso na indústria farmacêutica, onde o controle de qualidade desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de medicamentos. A RMN quantitativa é usada para uma ampla variedade de propósitos: Determinação da pureza de um ingrediente farmacêutico ativo (ou determinação de níveis de impurezas), quantificação de níveis residuais de solventes, determinação do conteúdo de excipientes etc. (GIRAUDEAU et al., 2023).

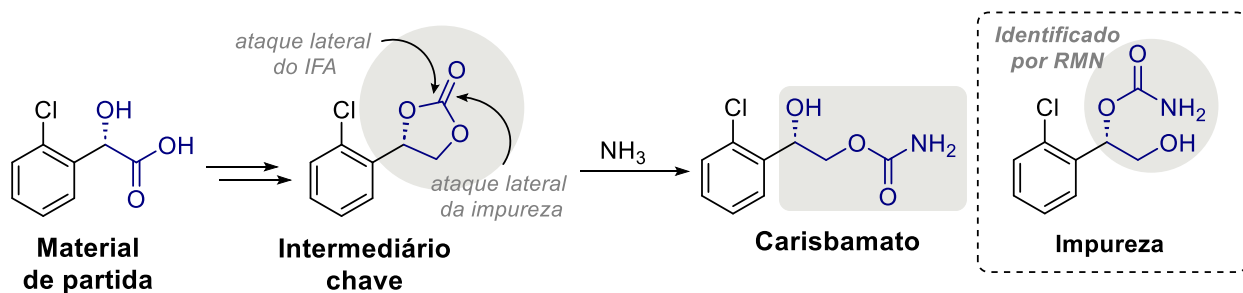
A indústria farmacêutica é provavelmente um dos campos onde os requisitos analíticos são mais bem controlados, devido a fortes regulamentações que impulsionam os diferentes estágios do desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Por exemplo, a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, de *United States Pharmacopeia*) decidiu recentemente revisar seus capítulos de RMN para incluir recomendações fortes e detalhadas sobre RMN quantitativa (QUADRI et al., 2014). No entanto, quantificar amostras por RMN com alta precisão é desafiador, uma vez que elas frequentemente formam misturas complexas. Embora o número de compostos possa ser limitado, a sobreposição espectral pode ser muito difícil de abordar, pois os componentes da mistura geralmente têm estruturas e assinaturas espectrais muito semelhantes (GIRAUDEAU et al., 2023).

Apesar da complexidade da amostra, a grande maioria das aplicações de controle de qualidade na indústria depende da RMN-¹H quantitativa 1D, provavelmente porque o método de quantificação tem que atender os requisitos de validação tradicionais que as indústrias regulamentadas impõem aos métodos de cromatografia líquida. As limitações associadas à complexidade da amostra são geralmente abordadas pela adaptação das condições de preparação da amostra. De fato, os sinais podem ser deslocados ajustando o pH, a concentração e a temperatura da amostra, usando um solvente diferente (ou mistura de solventes) ou adicionando reagentes de deslocamento (no caso da quantificação de enantiômeros). Espectros de RMN de outros núcleos também é, às vezes, uma opção para resolver o problema de sobreposição espectral associado à RMN-¹H. A RMN quantitativa de ¹⁹F ganhou popularidade na descoberta de medicamentos e aplicações biológicas, devido à sua alta sensibilidade e abundância 100% natural. Exemplos recentes incluem a caracterização de um conjunto conformacional do receptor de adenosina A2A humano, ou a quantificação de regioisômeros de anfetamina com RMN quantitativa de bancada de ¹⁹F. A RMN quantitativa de ¹³C também é uma opção, embora sua baixa sensibilidade limite seu uso a amostras altamente concentradas (GIRAUDEAU et al., 2023).

Em geral, a técnica de RMN proporciona um foco imparcial e quase universal para a análise de misturas complexas e na quantificação simultânea dos seus componentes

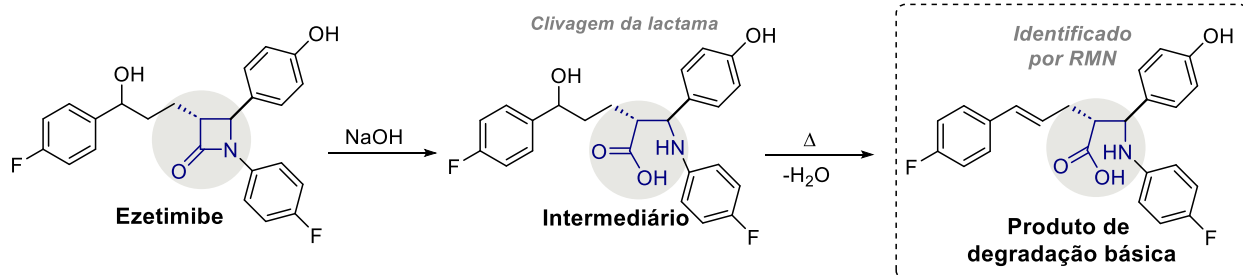
com a mínima preparação de amostras e sem a necessidade de uma separação previa, uma vez que, atualmente, a sensibilidade e precisão dos seus resultados quantitativos são adequados no controle de impurezas presentes em baixo nível e as medições de qNMR são consideradas tão confiáveis e precisas quanto as obtidas por meio de técnicas cromatográficas. Partindo disto, e de acordo com a diretriz ICH Q2A, onde, uma “potencial impureza é uma impureza que teoricamente pode surgir durante a fabricação ou estocagem” respalda o fato de que nos últimos anos vem sendo apontado que a RMN pode identificar impurezas desconhecidas nas preparações farmacêuticas e assim ser aplicada na identificação das impurezas durante o processo de síntese dos IFAs, produtos de degradação, isolamento de fontes naturais, identificação de isômeros, impurezas tóxicas e mutagênicas entre outras (MAGGIO et al., 2014), (HATZAKIS 2019).

O fármaco antiepilético carisbamato passa por um processo significativo de degradação quando é submetido a condições de estresse. Cada produto de degradação foi isolado e caracterizado a partir de MS/MS e RMN 2D (COSY e HSQC), onde também foi determinado que um dos produtos de degradação resultou da isomerização posicional do fragmento de carbamato do IFA (RAO et al., 2013).



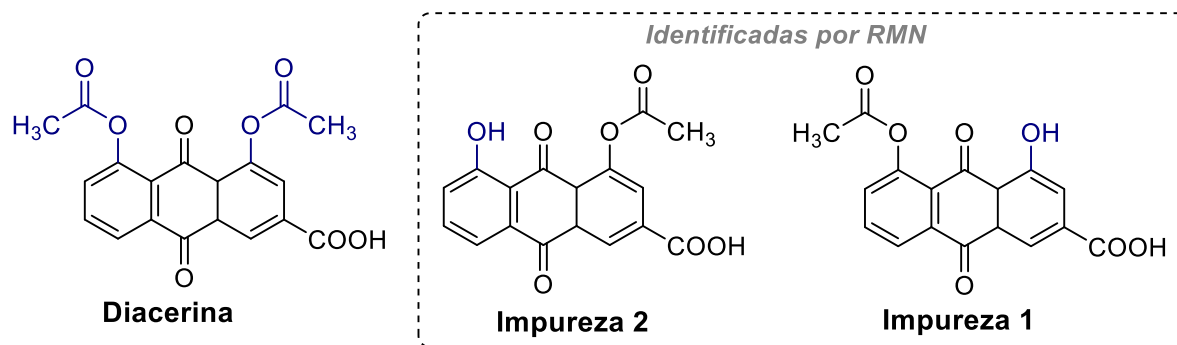
ESQUEMA 1.1. Síntese do carisbamato e a origem da impureza isomérica

No caso do fármaco ezetimibe, a estrutura química do seu produto de degradação maioritário foi proposta a partir de estudos de RMN- ^1H , ^{13}C , ^{19}F , COSY, HSQC, HMBC e NOESY assim como estudos de MS (SHAH et al., 2011).



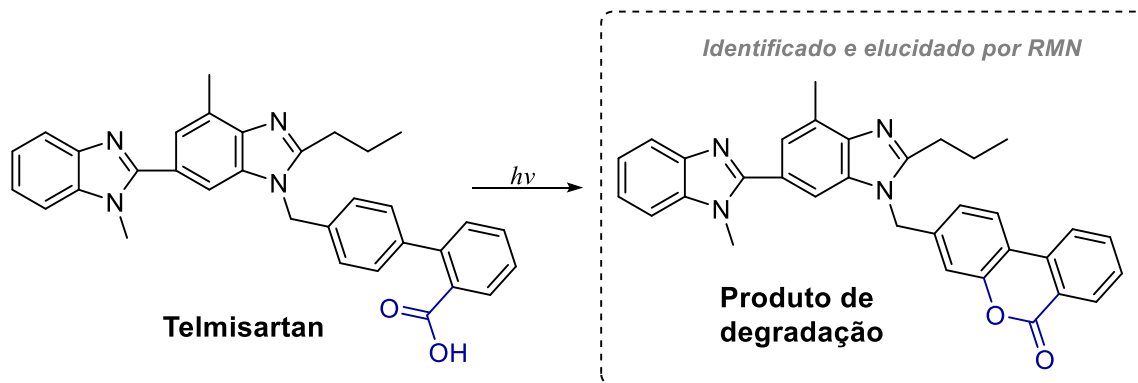
ESQUEMA 1.2. Produto de degradação alcalino proposto pelos autores Shah e Golla do fármaco ezetimibe.

Dois diacereínas isoméricas monoacetiladas (impureza 1 e 2) foram caracterizadas usando RMN-¹H, ¹³C, DEPT 135 e NOESY, confirmando as suas estruturas e revelando a posição exata do grupo acetil em cada caso (LI et al., 2010).



ESQUEMA 1.3. Estrutura química do fármaco diacerein e suas impurezas (impureza 1 e 2), ambas identificadas por RMN.

O produto de degradação fotolítica do telmisartan foram detectados e caracterizados usando LC-MS/TOF, LC-MS, LC-NMR e estudos de troca H/D *on-line* (SHAH et al., 2010).



ESQUEMA 1.4. Produto de degradação identificado por RMN do fármaco telmisartan

Estes são alguns exemplos onde a RMN foi aplicada na identificação e separação dos produtos de degradação das suas misturas de degradação correspondentes. A maior parte das técnicas utilizadas são as técnicas de correlação homonuclear e heteronuclear assim como as técnicas de difusão como DOSY. Porém, nos últimos anos tem sido desenvolvida uma serie de técnicas que permitem superar algumas das limitações que estas técnicas convencionais apresentam. Uma destas limitações é a dificuldade de analisar ou identificar um determinado composto quando existe sobreposição em certas regiões do espectro de RMN- ^1H , dificultando o assinalamento correto dos sinais, assim como também a necessidade de realizar algum tipo de tratamento físico na amostra com o objetivo de melhorar ou eliminar de certo modo a sobreposição. A partir disto, surge uma nova técnica, desenvolvida por Jenne e colaboradores em 2022, chamada DREAMTIME, cujo objetivo resulta em detectar unicamente o que o usuário deseja (JENNE et al., 2022).

1.6 DREAMTIME: *Designed Refocused Excitation And Optional Mixing for Targets In Vivo and Mixture Elucidation*

A técnica DREAMTIME é uma técnica recentemente desenvolvida por Jenne e colaboradores, que a descrevem como uma nova abordagem que combina diversos filtros espectrais com o objetivo de isolar de forma “virtual”, unicamente os compostos desejados de misturas e inclusive de organismos vivos. A técnica permite selecionar um único composto ou vários ao mesmo tempo, enquanto os filtros cancelam os

componentes não desejados. A DREAMTIME produz o que pode ser denominado como magnetização “em fase”, ou seja, a saída da DREAMTIME é paralela a RMN convencional, portanto, pode ser combinada com qualquer experimento de RMN já existente, inclusive RMN bidimensional. Combinando a excitação dupla seletiva com múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase é possível a co-seleção de várias moléculas ao mesmo tempo. Ao passar a magnetização através de um filtro quântico duplo com ciclo de fase, a magnetização unicamente acoplada em J é refocalizada, enquanto o restante dos sinais não desejados é cancelado, produzindo um sinal em fase. Como resultado, a seleção de vários compostos ao mesmo tempo é possível, inclusive com sinais totalmente sobrepostos ao de outros compostos em uma mistura e, portanto, não sendo observados em um espectro de RMN-¹H convencional (JENNE et al., 2022).

Na técnica de DREAMTIME, a evolução dos operadores de spin resultou em um aspecto crítico e fundamental os quais permitiram o direcionamento seletivo de compostos específicos. Como mostrado na figura 1, a técnica de DREAMTIME consta de quatro blocos principais: excitação refocada formatada (1); *zero quantum spoil* (2); *mixing time* (TOCSY) (3) e supressão de água (4), sendo os últimos 3 blocos, opcionais (Figura 1).

O elemento mais importante é a excitação refocada formatada. O bloco possui um único eco, os pulsos de 90° atuam como filtros quânticos duplos, selecionando unicamente a magnetização que surge dos pares de spin acoplados em J. A forma de onda modulada em fase pode ser utilizada para excitar qualquer número de spins emparelhados (máximo 32 spins) ao mesmo tempo, usando uma única forma de onda. A evolução dos operadores de spin da DREAMTIME envolve a passagem da magnetização por um filtro quântico duplo com ciclo de fase. Etapa que foi projetada com o objetivo de reorientar apenas a magnetização acoplada em J e, ao mesmo tempo, cancelar todos os outros sinais indesejados. Essa evolução seletiva acaba sendo crucial para o isolamento dos sinais desejados quando se trata de misturas complexas (JENNE et al., 2022).

Por outro lado, os spins são selecionados em pares acoplados em J, de modo que o filtro quântico duplo seleciona o componente antifase enquanto rejeita o resto das magnetizações. Nessa condição, uma molécula passará por um dos filtros se tiver dois spins acoplados em J e os deslocamentos químicos de ambos os prótons ressoem dentro do tempo de pulso da excitação dual. Neste sentido, podemos discutir sobre o impacto do acoplamento J na análise de compostos de interesse:

Isolamento dos sinais: o acoplamento em J, na DREAMTIME, resultou essencial para isolar sinais de interesse nos experimentos de RMN. Utilizando o acoplamento em J na seleção dos spins específicos das moléculas, permite então a análise focada dos compostos desejados e, ao mesmo tempo, minimizando a interferência de outros. Essa abordagem direcionada aumenta a clareza dos espectros resultantes.

Requisito para rodadas acopladas: a técnica da DREAMTIME requer também especificamente rotações acopladas em J para uma seleção seletiva. Isso significa que compostos com apenas picos singletos, que não exibem acoplamentos J, não podem ser analisados de forma eficaz usando a técnica. Exemplo, moléculas pequenas como metanol ou acetona que contém um único pico no seu espectro de RMN, não são adequadas para aplicações na DREAMTIME (Jenne et al., 2022).

Complexidade em sistemas acoplados: em sistemas fortemente acoplados, a presença de acoplamentos J pode chegar a complicar a análise. No entanto, foi demonstrado que a DREAMTIME funciona de uma forma eficiente nos mencionados sistemas, desde que haja resolução suficiente do sinal, o que vá permitir a seleção de compostos específicos, mesmo em misturas complexas como sangue ou urina.

Impacto na sensibilidade: a capacidade de selecionar spins específicos por meio do acoplamento J pode levar a uma maior sensibilidade na detecção de moléculas de interesse. Ao focar nos sinais relevantes e reduzir a sobreposição espectral, a DREAMTIME pode atingir aumentos de sensibilidade de 7 a 12 vezes em relação a RMN-¹H convencional.

Versatilidade na seleção: o acoplamento J permite a seleção de moléculas inteiras ou sistemas específicos de subspin dentro de uma mesma molécula. Essa versatilidade é benéfica para analisar compostos complexos, como a tirosina, onde diferentes

componentes podem ser direcionados com base nas necessidades do usuário da técnica.

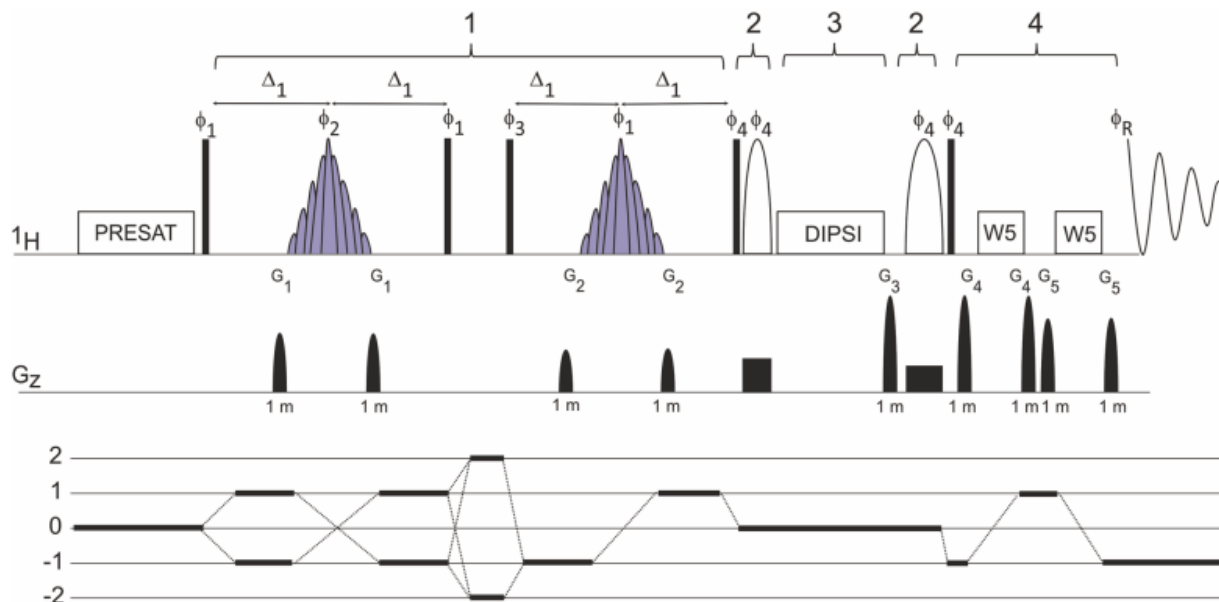


FIGURA 1.1. Sequência de pulso RMN DREAMTIME. **1)** Bloco de Excitação Refocada (DRE), $\Delta_1 = 1/4J$ onde J é a constante de acoplamento $^1\text{H}-^1\text{H}$ relativa ao composto de interesse, para a seleção de vários compostos pode ser calculada a média; **2)** Zero Quantum Spoil (opcional), **3)** DIPSII spinlock (opcional); **4)** W5 WATERGATE que junto com o bloco de pré-saturação (PR), (ambos opcionais) permite a supressão de água quando necessário. (*Autorização de uso de figura solicitada ao autor. License number: 5980171445068*).

Quando o objetivo é a seleção de múltiplas moléculas, cada molécula evolui por separados como diferentes pares acoplados em J , o que permite selecionar várias moléculas ao mesmo tempo. Uma vez que são selecionados dois spins dentro de uma molécula alvo, é possível uma maior manipulação dos spins a través dos blocos opcionais. O primeiro bloco opcional, *zero quantum spoil* (ZQS), ajuda a melhorar as propriedades de fase do espectro final. O seguinte, *TOCSY spinlock*, transfere a magnetização ao redor de todo o sistema de spin, produzindo um resultado semelhante a um espectro de RMN- ^1H convencional do composto único onde se observa todos os spins acoplados aos pares de prótons selecionados (semelhante a um TOCSY 1D

convencional). E finalmente, o último bloco de presaturação, incorpora tanto a presaturação de água quanto do solvente. Portanto, os filtros mencionados, que são altamente discriminantes, vão permitir selecionar a molécula nos seguintes casos:

- i. Um sistema de spin onde ambos os sinais ressoem na frequência selecionada pela forma de onda modulada em amplitude e fase;
- ii. Os spins são vizinhos nas moléculas (J acoplados);
- iii. A constante de acoplamento selecionada coincide com a molécula.

Dando como resultado, um espectro de RMN-¹H selecionando as moléculas de interesse, tanto de forma individual quanto simultânea, apesar da sobreposição no espectro de RMN-¹H convencional. Os autores destacam, que podem ser selecionados spins tanto do sistema total de spins da molécula quanto spins de subsistemas da molécula, neste caso a versatilidade da DREAMTIME é o suficientemente alta para selecionar a molécula de interesse, mesmo sendo irradiado um único subsistema da sua estrutura.

Com o objetivo de demonstrar como funciona a DREAMTIME, os autores aplicaram a técnica em diferentes tipos de amostras, sendo uma delas uma amostra *in vivo* de *Daphnia magna* (sem pré-tratamento físico da amostra), na qual foram selecionados oito compostos de concentração conhecida: colina, glicerol, alanina, valina, uracila, treonina, tirosina e lisina. Durante o experimento, foi realizado, em um primeiro momento, um espectro de RMN-¹H convencional onde foi observada uma importante sobreposição. A partir deste resultado, a DREAMTIME foi aplicada, selecionando os oito compostos ao mesmo tempo, usando uma forma de onda modulada em amplitude e fase com o fim de selecionar 16 diferentes frequências (ou deslocamentos químicos), onde cada par de frequência selecionava um dos oito compostos de forma simultânea (Topo da Figura 2B), e onde foi calculada a média da constante de acoplamento, criando uma lista com estes valores, dando como resultado um espectro com cada molécula de interesse selecionada. Na sequência foram selecionados de forma individual cada um dos oito compostos (Figura 2B), irradiando as frequências correspondentes a cada um dos subsistemas das moléculas de interesse.

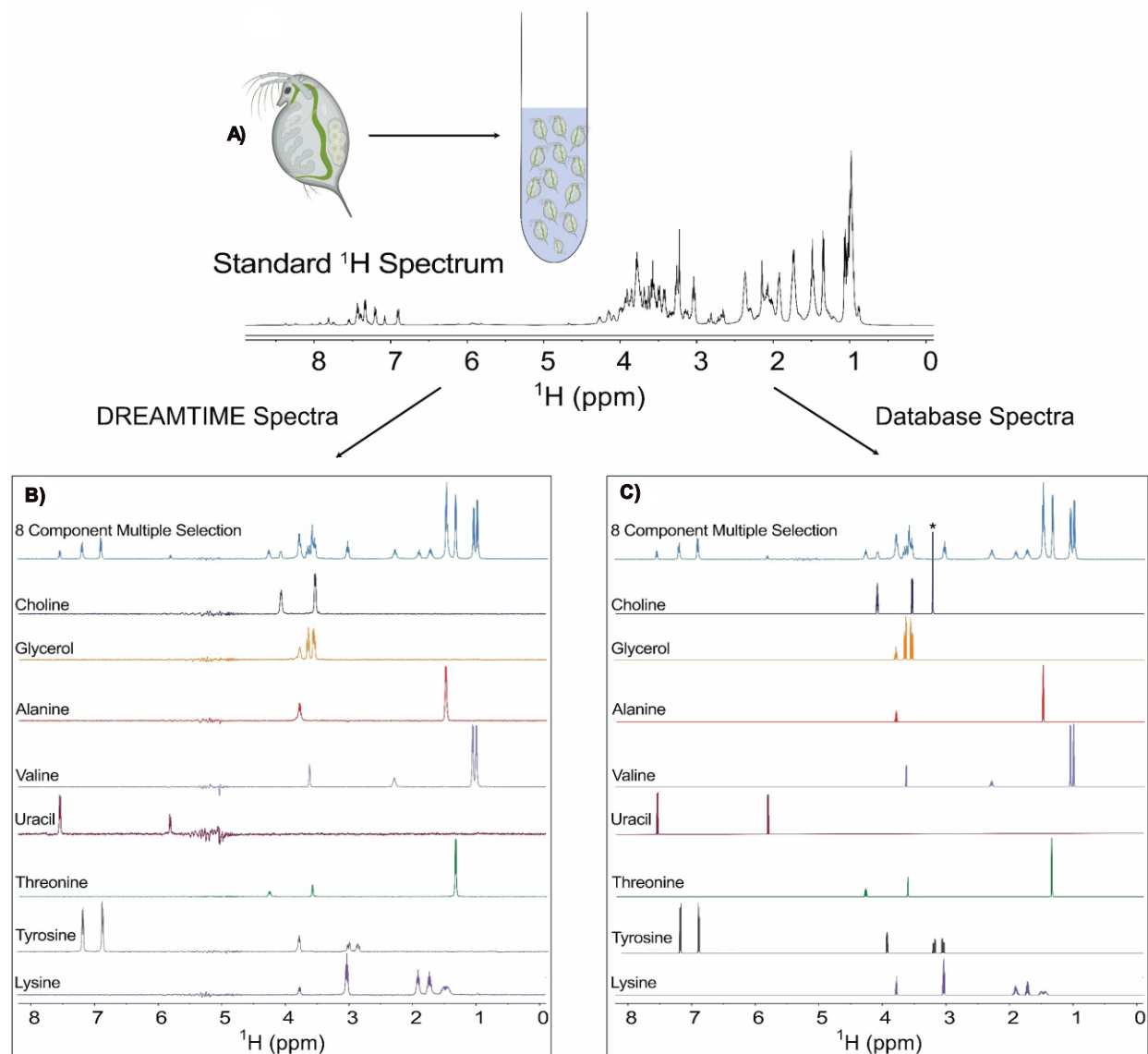


FIGURA 1.2. Espectro de **A)** RMN- ^1H convencional da mistura complexa de *Daphnia magna*; **B)** RMN-DREAMTIME selecionando os oito aminoácidos de forma simultânea e individualmente; **C)** RMN- ^1H referência do banco de dados da Bruker (*Imagem alterada e adaptada de JENNE et al., 2022 para o uso neste trabalho*).

Jenne e colaboradores aplicaram DREAMTIME de outras formas que serão discutidas brevemente (JENNE et al., 2022). Uma das aplicações resultou em monitoramento de processos como o seguimento do fluxo molecular ao longo do tempo em uma amostra de urina humana, onde foram selecionados dois compostos, 2-furoilglicina e ácido hipúrico. A 2-furoilglicina é um indicador do metabolismo do café

enquanto o ácido hipúrico é um metabólito correlacionado à ingestão de frutos e verduras. Determinando que a 2-furoilglicina aumenta rapidamente depois do consumo do café e o ácido hipúrico diminui com o tempo em concordância com a falta de insumos dietéticos. Por outro lado, foi estudado o estresse anóxico dentro de uma amostra viva de *Daphnia magna*. Como a análise foi realizada em organismos vivos, as características físicas da amostra provocaram distorções da susceptibilidade magnética e uma largura de linha maior. A técnica de DREAMTIME então reduz a superposição dos sinais no espectro, permitindo que os sinais da amostra *in vivo* pudessem ser utilizados para assinalar e rastrear as variações metabólicas *in vivo*.

Como o resultado da DREAMTIME é a magnetização em fase, essencialmente qualquer outro experimento de RMN pode concatenar-se de forma simples. Para demonstrar isto, os autores utilizaram uma amostra contendo os oito aminoácidos e coletaram espectros 2D, ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^{13}C HSQC. Neste caso, a DREAMTIME permitiu simplificar os dados 2D no assinalamento dos metabólitos na mistura inicial. Mostrando que a DREAMTIME, futuramente, poderá ser combinada com outras técnicas de RMN, com o objetivo de estudar a interação molecular, como a espectroscopia ordenada por difusão DOSY, e o monitoramento da cinética de ligação e troca (STD) etc.

Neste contexto, a DREAMTIME se torna uma técnica atrativa na análise de misturas, provenientes de processos de degradação forçada de fármacos, brindando uma separação espectral seletiva e isolamento dos compostos de uma amostra determinada. Por tanto, a ideia principal será a aplicação de técnicas convencionais de RMN 1D (^1H , ^{13}C) e 2D (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC e DOSY), assim como também a DREAMTIME com foco na identificação dos componentes individuais das misturas ácidas e básicas dos produtos farmacêuticos sofosbuvir e fumarato de tenofovir desoproxila e dos seus produtos de degradação respectivos, sem que se faça necessária a separação física de seus componentes para a identificação de suas estruturas.

Sofosbuvir é um análogo de nucleotídeo usado no tratamento do vírus de hepatites C (HCV) (SWAIN et al. 2015). Quimicamente, é um pró-fármaco de nucleotídeo de pirimidina monofosforilado e devido a analogia da sua estrutura, o SOF inibe a enzima de RNA polimerase que o vírus utiliza na replicação do seu RNA (SWAIN et al. 2015),

(AGARWAL et al. 2022). Como o SOF é um pró-fármaco, é metabolizado no fígado para formar um análogo de nucleotídeo farmacologicamente ativo. O SOF foi aprovado pela *U.S Food and Drug Administration* (FDA) em 2013 para o uso em pacientes com o vírus HCV, de forma isolada ou em combinação com ribavirina ou ledipasvir. O SOF é desenvolvido pela Gilead Farmacêutica e é comercializado como Sovaldi. Na literatura não existe um método de ensaio na análise do processo de degradação do SOF nem dos seus produtos de degradação, aplicando técnicas como UPLC ou RMN. Embora existam poucos métodos utilizando técnicas como UPLC-ESI MS/MS, os mesmos são desenvolvidos utilizando vários padrões internos e procedimentos que são destrutivos e demorados (POTTABATHINI et al. 2016).

O fumarato de tenofovir desoproxila é um fármaco de classe III do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS). Pertence ao grupo de inibidores seletivos de nucleotídeos da transcriptase inversa (NRTI) o que o torna em um supressor da replicação viral ao inibir a transcriptase inversa do HBV. Em conjunto com a emtricitabina é utilizado no coquetel anti-HIV ou também conhecido como profilaxia pré-exposição para o HIV (PrEP), sendo aprovado pela FDA, nos Estados Unidos, em 26 de outubro de 2001 (GOLLA et al., 2016). Da mesma forma que no sofosbuvir, na literatura, são encontrados poucos trabalhos onde seja descrito o processo de degradação do fármaco assim como o estudo dos seus produtos de degradação por RMN (TALLURI et al. 2014) (KURMI et al., 2014). A maioria dos trabalhos encontrados envolvem estudos de espectrometria de massas isolada ou hifenada com cromatografia como LC-HRMS assim como também estudos aplicando espectrometria de massas multi-etapa (MS^n) (TALLURI et al. 2014) (KURMI et al., 2014).

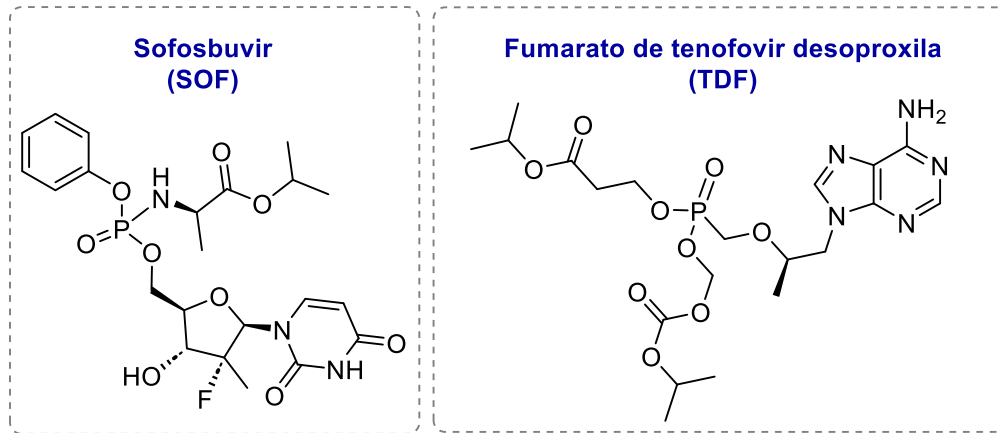


FIGURA 1.3. Estrutura química do sofosbuvir e fumarato de tenofovir desopoxila

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Explorar o uso de técnicas avançadas de Ressonância Magnética Nuclear com foco na identificação dos componentes individuais em uma mistura de produtos farmacêuticos e seus produtos de degradação, sem que se faça necessária a separação física de seus componentes para identificação de suas estruturas.

Para isso foram cumpridos os seguintes objetivos específicos

2.2 Objetivos Específicos

- Implementar a técnica de DREAMTIME utilizando uma amostra contendo substâncias conhecidas;
- Realizar as reações de degradação dos fármacos no próprio tubo de RMN;
- Analisar e identificar os produtos de degradação das misturas correspondentes aos fármacos sofosbuvir e fumarato de tenofovir desoproxila utilizando técnicas de RMN 2D;
- Separar os produtos de degradação das misturas tanto ácida quanto básica aplicando a técnica DREAMTIME sem realizar nenhum pré-tratamento físico na amostra inicial;
- Quantificar por meio RMN-¹H os produtos de degradação formados assim como os ingredientes farmacêuticos ativos.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. L-alanina comercializada por Sigma-Aldrich ($\geq 99,0\%$, HPLC), fenilalanina comercializada por Sigma-Aldrich ($\geq 99,0\%$, HPLC), nicotinamida comercializada por Fluka analytical ($\geq 99,0\%$, HPLC), ácido aspártico comercializada por Sigma Aldrich ($\geq 99,0\%$, TLC), ácido maleico comercializada por Sigma Aldrich ($\geq 99,0\%$, HPCL), ácido malônico comercializada por Sigma Aldrich ($99,0\%$, TLC).

O Sofosbuvir (SOF), como princípio ativo, foi gentilmente cedido pelo Prof. Renato Lajarim Carneiro (DQ-UFSCar) e o fumarato de tenofovir desoproxila (TDF), também como princípio ativo, foi gentilmente cedido pela empresa Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, ácido clorídrico (HCl, 37,7%) comercializado por Qhemis e hidróxido de sódio (NaOH, 98%) comercializado por Neon.

2.2 Preparo de amostras

2.2.1 Solventes deuterados

- Oxido de deutério (D_2O): comercializado pela Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) com pureza de 99,9 %.
- Dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- d_6): comercializado pela Sigma Aldrich com pureza de 99,9 %.

3.2.2 Implementação do experimento DREAMTIME: Amostra de composição conhecida

Oito substâncias foram dissolvidas em 400 μ L de D_2O 99% como solvente deuterado. As quantidades de compostos utilizadas foram as seguintes: fenilalanina (2,89 mg); L-alanina (3,10 mg); ácido aspártico (2,94 mg); ácido malônico (3,09 mg); ácido maleico (3,16 mg); nicotinamida (3,02 mg). O volume total de solvente (400 μ L) foi

transferido para um tubo de RMN de 5 mm e os experimentos foram conduzidos a temperatura ambiente 298 K.

3.2.3 Estudos de degradação forçada

a. Amostra da mistura de degradação do sofosbuvir (SOF):

Todos os estudos de degradação forçada foram realizados em concentrações que permitissem analisar cada mistura de degradação (ácida e básica) dentro de faixa de 10-20% de degradação, conforme estabelecido nas diretrizes da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Sob condições ácidas; 41,47 μL de HCl (37,7%, 12 mol.L^{-1}) foram adicionados a uma solução de SOF 0,1 mol.L^{-1} (30 mg de SOF em 400 μL de DMSO-d6), resultando em uma proporção final de 1:10 (0,1 mol.L^{-1} : 1 mol.L^{-1}) de SOF:HCl. A reação de degradação foi realizada à temperatura ambiente (298 K) e em um tempo de reação de 24-48 horas. Em condições básicas; 40,0 μL de uma solução de NaOH 1 mol.L^{-1} foram adicionados a uma solução de SOF 0,1 mol.L^{-1} (30 mg de SOF em 400 μL de DMSO-d6), resultando em uma proporção final de 1:1. (0,1 mol.L^{-1} : 0,1 mol.L^{-1} , NaOH:SOF). A reação de degradação básica também foi realizada à temperatura ambiente (298 K) e com tempo de reação de 24-48 horas. Cada mistura de degradação resultante foi transferida diretamente para o tubo de RMN de 5 mm e posteriormente analisada.

b. Amostra da mistura de degradação do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF):

Todos os estudos de degradação foram realizados em concentrações específicas que permitissem analisar cada mistura de degradação (ácida e básica) na faixa entre 10-20% de degradação, conforme estabelecido nas diretrizes da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Sob condições ácidas; 44,30 μL de DCI (37,7%, 12 mol.L^{-1}) foram adicionados a uma solução de TDF 0,1 mol.L^{-1} (15,90 mg de TDF em 500 μL de DMSO-d6), resultando em uma proporção final de 1:2 (0,1 mol.L^{-1} : 0,2 mol.L^{-1}) de TDF:DCI. A reação de degradação foi realizada à temperatura ambiente (298 K) e entre

24-48 horas de tempo de reação. Em condições básicas; 0,66 μL de uma solução de NaOD 0,1 mol.L⁻¹ foram adicionados a uma solução de TDF 0,01 mol.L⁻¹ (3,18 mg de TDF em 500 μL de DMSO-d₆), resultando na proporção final de 1:1 (0,01 mol.L⁻¹: 0,01 mol.L⁻¹, NaOD:TDF). A reação de degradação básica também foi realizada à temperatura ambiente (298 K) e em um tempo de reação de 24-48 horas. Cada mistura de degradação resultante foi transferida diretamente para o tubo de RMN de 5 mm e posteriormente analisada.

3.3 Equipamentos e aquisição de espectros

3.3.1 Espectrômetros de RMN

Os estudos, tanto de implementação, quanto de análise dos fármacos (degradações e análise por HRMAS) foram realizados utilizando os equipamentos instalados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente 298 K:

- Equipamento Bruker RMN-600 MHz, operando num campo magnético de 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio), modelo AVANCE III, equipado com uma sonda criogênica TCI (¹H/¹³C/¹⁵N) de 5 mm.
- Equipamento Bruker RMN 400 MHz, modelo AVANCE III, operando num campo magnético de 9,4 Tesla (400,15 MHz para frequência do ¹H e 100,62 MHz para o ¹³C), equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI- *Broadband Inverse*) para tubos com diâmetro de 5 mm, munida de uma bobina de gradiente de campo no eixo z (50 G/cm) e uma unidade de ajuste automático da sintonia – ATMA (*Automatic Tuning and MAtching*).
- Equipamento Bruker RMN 400 MHz, modelo AVANCE III, operando num campo magnético de 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio), equipado com uma sonda BBOF para tubos de 5 mm.

3.3.2 Aquisição dos espectros 1D e 2D de cada amostra analisada

3.3.2.1 Amostra padrão de composição conhecida

a. Aquisição dos espectros 1D de hidrogênio da amostra estandar de composição conhecida:

Os espectros de RMN-¹H foram realizados no espectrômetro Bruker modelo Avance III 400,15 MHz para ¹H equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI- *Broadband Inverse*), adquiridos utilizando-se uma sequência de pulsos com um único pulso para ¹H (zg) numa temperatura de 25°C. Sendo os parâmetros de aquisição os seguintes:

TABELA 3.1. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN-¹H:

Parâmetro*	¹ H
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	65.536
Janela espectral (SW)	17,0 ppm
Tempo de aquisição (AQ)	4,81 s
Número de scans (NS)	8
Duração do pulso de 90° (p1)	11 μs
Frequência central do pulso (O1P)	4,7 ppm
Tempo de relaxação (d1)	1,0 s

*Nomenclatura Bruker

Depois da aquisição de cada espectro, estes foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 65.536 pontos (SI), ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática.

3.3.2.2 Amostra do sofobuvir puro sem sofrer reação de degradação

a. Experimentos 1D de hidrogênio e carbono do sofobuvir puro sem sofrer reação de degradação nenhuma

Os espectros de RMN-¹H foram realizados no espectrômetro Bruker modelo Avance III 400,15 MHz para ¹H equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI- *Broadband Inverse*), adquiridos utilizando-se uma sequência de pulsos com um único pulso para ¹H (*zg*), numa temperatura de 25°C. Os espectros de ¹³C{¹H} foram realizados no mesmo espectrômetro (100 MHz para ¹³C) e mesma sonda, utilizando uma sequência de pulso *hard* para ¹³C com largura de pulso de 30° e desacoplamentos de ¹H considerando o efeito NOE durante o tempo de relaxação (*zgpg30*), sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição estão descritos na tabela 3:

TABELA 3.2. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN-¹H e RMN-¹³C do sofobuvir puro sem sofrer reação de degradação nenhuma:

Parâmetros*	¹ H	¹³ C
Sequência de pulso	<i>zg</i>	<i>zgpg30</i>
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	65.536	32.768
Janela espectral (SW) (ppm)	20,02	238,89
Tempo de aquisição (AQ) (s)	4,09	0,68
Número de scans (NS)	32	8192
Duração do pulso de 90° (p1) (μs)	8,24	8,24
Duração do pulso de 30° (¹³ C) (μs)	-	15 μs
Frequência central do pulso (O1P) (ppm)	6,24	99,98
Tempo de relaxação (d1, s)	2	0,1
Duração do pulso de 90° para desacoplamento (μs)	-	90 μs

*Nomenclatura Bruker

Depois da aquisição de cada espectro, os mesmos foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 65.536 pontos (SI) no caso do ^1H e 32.768 para o ^{13}C , tanto no espectro de ^1H quanto no espectro de ^{13}C ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática em ambos os espectros.

3.3.2.3 Amostra do sofosbuvir sob condições de hidrólise ácida

a. Aquisição dos espectros 1D de hidrogênio e carbono do sofosbuvir sob condições de hidrólise ácida:

Os espectros de RMN- ^1H foram coletados no espectrômetro Bruker modelo Avance III 400,15 MHz para ^1H equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI- *Broadband Inverse*), adquiridos utilizando-se uma sequência de pulsos com um único pulso para ^1H com supressão do sinal da água (*zgpr*) numa temperatura de 25°C. Os espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram coletados no mesmo espectrômetro (100 MHz para ^{13}C) e mesma sonda, utilizando uma sequência de pulso *hard* para ^{13}C com largura de pulso de 30° e desacoplamentos de ^1H considerando o efeito NOE durante o tempo de relaxação (*zgpg30*), sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição estão descritos na tabela 4:

TABELA 3.3. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN- ^1H da mistura de degradação ácida do sofosbuvir:

Parâmetros*	^1H	^{13}C
Sequência de pulso	<i>zg</i>	<i>zgpg30</i>
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	65.536	32.768
Janela espectral (SW) (ppm)	14,46	238,89
Tempo de aquisição (AQ) (s)	5,66	0,68
Número de scans (NS)	8	16.384
Duração do pulso de 90° (p1) (μs)	8,14	15,00
Duração do pulso de 30° (^{13}C) (μs)	-	0,1

Frequência central do pulso (O1P) (ppm)	6,33 ppm	99,99
Tempo de relaxação (d1, s)	1 s	0.1
Duração do pulso de 90° para desacoplamento (μ s)	-	90

*Nomenclatura Bruker

Depois da aquisição de cada espectro, os mesmos foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 65.536 pontos (SI) para o ^1H e 32.768 para o ^{13}C , tanto no espectro de ^1H quanto no espectro de ^{13}C ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática em ambos os espectros.

b. Aquisição e processamento dos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) do sofosbuvir sob hidrólise ácida

Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,15 MHz para ^1H equipado com uma sonda BBI de 5 mm, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição que foram utilizados no experimento estão descritos na tabela 5:

TABELA 3.4. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) da mistura de degradação ácida do sofosbuvir:

Parâmetros*	gCOSY	gHSQC	gHMBC
Sequência de pulso	<i>cosygpprqf</i>	<i>hsqcedetgp</i>	<i>hmbcgplpndqf</i>
Número de pontos de domínio de tempo direto (TDF2)	4.096	4.096	2048
Número de pontos de domínio de tempo indireto (TDF1)	256	256	256
Janela espectral do domínio direto (SW2) (ppm)	12,53	12,53	14,46
Janela espectral do domínio indireto (SW1) (ppm)	12,53	230,00	238,89
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ-F2) (μ s)	0,41	0,41	0,18

Tempo de aquisição no domínio indireto (AQ-F1) (s)	0,025	0,0055	0,0053
Número de scans (NS)	40	80	120
Duração do pulso de 90° (¹ H) (μs)	8,00	8,14	8,00
Duração do pulso de 90° (¹³ C) (μs)	-	15,00	15,00
Frequência central do pulso no canal de ¹ H (O1P) (ppm)	6,33	6,33	6,33
Frequência central do pulso no canal de ¹³ C (O2P) (ppm)	-	99,98	99,98
Tempo de relaxação (d1) (s)	1	1	1

*Nomenclatura Bruker

Depois de adquirir o espectro, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 4096 pontos em F2 (SIF2) e F1 (SIF1) para os experimentos de COSY e HSQC e 2048 pontos para os experimentos de HMBC, utilizando uma função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 0 em ambos eixos. A fase foi ajustada de forma manual.

3.3.2.4 Amostra do sofobuvir sob condições de hidrólise básica

a. Aquisição e processamento dos espectros 1D de hidrogênio e carbono do sofobuvir sob condições de hidrólise básica.

Os espectros de RMN-¹H foram coletados no espectrômetro Bruker modelo Avance III 400,15 MHz para ¹H equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI- *Broadband Inverse*), adquiridos utilizando-se uma sequência de pulsos com um único pulso para ¹H com supressão do sinal da água (*zgpr*) numa temperatura de 25°C. Os espectros de ¹³C{¹H} foram coletados no mesmo espectrômetro (100 MHz para ¹³C) e mesma sonda, utilizando uma sequência de pulso *hard* para ¹³C com largura de pulso de 30° e desacoplamentos de ¹H considerando o efeito NOE durante o tempo de relaxação (*zgpg30*), sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição estão descritos na tabela 6:

TABELA 3.5. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN-¹H da mistura de degradação básica do sofobuvir:

Parâmetros*	¹H	¹³C
Sequência de pulso	<i>zgpr</i>	<i>zgpg30</i>
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	65.536	32.768
Janela espectral (SW) (ppm)	12,49	238,89
Tempo de aquisição (AQ) (s)	6,55	0,68
Número de scans (NS)	8	16.384
Duração do pulso de 90° (p1) (µs)	9.750	
Duração do pulso de 30° (¹³ C) (µs)	-	4,95
Frequência central do pulso (O1P) (ppm)	3,76	99,99
Tempo de relaxação (d1) (s)	1	0,1
Duração do pulso de 90° para desacoplamento (µs)	-	90

*Nomenclatura Bruker

Depois da aquisição de cada espectro, os mesmos foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 65.536 pontos (SI) para ¹H e 32.768 pontos (SI) para o ¹³C, tanto no espectro de ¹H quanto no espectro de ¹³C ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática em ambos os espectros.

b. Aquisição e processamento dos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) do sofobuvir sob condições de hidrólise básica

Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,15 MHz para ¹H equipado com uma sonda BBI de 5 mm, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição que foram utilizados no experimento estão descritos na tabela 7:

TABELA 3.6. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) da mistura de degradação básica do sofosbuvir:

Parâmetros*	gCOSY	gHSQC	gHMBC
Sequência de pulso	<i>cosygpprqf</i>	<i>hsqcedetgp</i>	<i>hmbcgpplndqf</i>
Número de pontos de domínio de tempo direto (TDF2)	4.096	4.096	4.096
Número de pontos de domínio de tempo indireto (TDF1)	256	256	256
Janela espectral do domínio direto (SW2) (ppm)	15,02	15,02	15,02
Janela espectral do domínio indireto (SW1) (ppm)	15,02	230,00	230,00
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ-F2) (s)	0,34	0,34	0,34
Tempo de aquisição no domínio indireto (AQ-F1) (s)	0,021	0,0055	0,0055
Número de scans (NS)	32	64	76
Duração do pulso de 90° (¹ H) (μs)	8,12	8,12	8,12
Duração do pulso de 90° (¹³ C) (μs)	-	15,00	15,00
Frequência central do pulso no canal de ¹ H (O1P) (ppm)	3,53	3,53	3,53
Frequência central do pulso no canal de ¹³ C (O2P) (ppm)	-	75.00	75.00
Tempo de relaxação (d1, s)	1	1	1

*Nomenclatura Bruker

Depois de adquirir o espectro, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 4096 pontos em F2 (SIF2) e F1 (SIF1) para os experimentos de COSY e HSQC e 2048 pontos para os experimentos de HMBC, utilizando uma função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 0 em ambos eixos. A fase foi ajustada de forma manual.

c. Aquisição de RMN de ^1H para estudo de quantificação absoluta do sofosbuvir em meio ácido e básico:

Um espectrômetro de RMN Bruker de 600 MHz equipado com uma sonda Bruker BBO de 600 MHz de 5 mm foi utilizado neste estudo de quantificação. DMSO- d_6 e ácido maleico foram utilizados como solvente e padrão interno, respectivamente. Em condições ácidas o tempo de aquisição foi ajustado para 3,64 s e a janela do espectro foi ajustada para 15 ppm. O T_1 foi determinado (T_1 denota tempo de relaxação longitudinal) resultando em 1,5 s, garantia de $7 \times T_1$, mesmo para hidrogênio/hidrogênios de relaxamento relativamente lento. Foi utilizado um pulso de 90° e o intervalo de tempo entre cada aquisição (d_1) foi definido para 17 s. O número de varreduras foi definido como 128 e o tempo total de execução do instrumento foi de 44 minutos. Em condições básicas o tempo de aquisição foi ajustado para 3,64 s e a janela do espectro foi ajustada para 15 ppm. Nessas condições, o T_1 foi determinado resultando em 3 s, garantindo $7 \times T_1$, mesmo para hidrogênio/hidrogênios de relaxamento relativamente lento. Foi utilizado um pulso de 90° e intervalo de tempo entre as aquisições (d_1) foi definido para 27 s. O número de varreduras foi definido como 128 e o tempo total de execução do instrumento foi de 63 minutos.

3.3.2.5 Amostra do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) sem sofrer degradação.

a. Experimentos 1D de hidrogênio e carbono do TDF puro sem sofrer reação de degradação nenhuma

Os espectros de RMN- ^1H foram coletados no espectrômetro Bruker modelo Avance III 400,15 MHz para ^1H equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI- *Broadband Inverse*), adquiridos utilizando-se uma sequência de pulsos com um único pulso para ^1H (*zg*), numa temperatura de 25°C . Os espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram coletados no mesmo espectrômetro (100 MHz para ^{13}C) e mesma sonda, utilizando uma sequência de pulso *hard* para ^{13}C com largura de pulso de 30° e desacoplamentos de ^1H

considerando o efeito NOE durante o tempo de relaxação (*zgpg30*), sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição estão descritos na tabela 8:

TABELA 3.7. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN-¹H e RMN-¹³C do TDF puro sem sofrer reação de degradação nenhuma:

Parâmetros*	¹H	¹³C
Sequência de pulso	<i>zg</i>	<i>zgpg30</i>
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	32.768	32.768
Janela espectral (SW) (ppm)	20,02	238,89
Tempo de aquisição (AQ) (s)	2.04	0,68
Número de scans (NS)	16	8192
Duração do pulso de 90° (p1) (µs)	8,25	-
Duração do pulso de 30° (¹³ C) (µs)	-	4,95
Frequência central do pulso (O1P) (ppm)	6,00	99,98
Tempo de relaxação (d1, s)	2	0,1
Duração do pulso de 90° para desacoplamento (µs)	-	90

*Nomenclatura Bruker

Depois da aquisição de cada espectro, os mesmos foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 32.768 pontos (SI), tanto no espectro de ¹H quanto no espectro de ¹³C ajustando-se a fase (*apk*) e a linha base (*absn*) de forma automática em ambos espectros.

3.3.2.6 Amostra do TDF sob condições de hidrólise ácida

a. Experimentos 1D de hidrogênio e carbono do TDF sob condições de hidrólise ácida

Os espectros de RMN-¹H foram coletados no espectrômetro Bruker modelo avance III 400,15 MHz para ¹H equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI- *Broadband Inverse*), adquiridos utilizando-se uma sequência de pulsos com

um único pulso para ^1H (*zg*), numa temperatura de 25°C . Os espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram coletados no mesmo espectrômetro (100 MHz para ^{13}C) e mesma sonda, utilizando uma sequência de pulso *hard* para ^{13}C com largura de pulso de 30° e desacoplamentos de ^1H considerando o efeito NOE durante o tempo de relaxação (*zgpg30*), sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C . Os parâmetros de aquisição estão descritos na tabela 9:

Tabela 3.8. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C do TDF sob condições de hidrólise ácida:

Parâmetros*	^1H	^{13}C
Sequência de pulso	<i>zg</i>	<i>zgpg30</i>
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	32.768	32.768
Janela espectral (SW) (ppm)	20,02	238,89
Tempo de aquisição (AQ) (s)	2.04	0,68
Número de scans (NS)	32	16384
Duração do pulso de 90° (p1) (μs)	8,00	-
Duração do pulso de 30° (^{13}C) (μs)	-	4,95
Frequência central do pulso (O1P) (ppm)	6,00	99,98
Tempo de relaxação (d1, s)	2	0,1
Duração do pulso de 90° para desacoplamento (μs)	-	90

*Nomenclatura Bruker

Depois da aquisição de cada espectro, os mesmos foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 32.768 pontos (SI), tanto no espectro de ^1H quanto no espectro de ^{13}C ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática em ambos espectros.

b. Aquisição e processamento dos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) do TDF sob condições de hidrólise ácida

Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,15 MHz para ^1H equipado com uma sonda BBI de 5 mm, sem girar a amostra e numa

temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição que foram utilizados no experimento estão descritos na tabela 10:

TABELA 3.9. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) da mistura de degradação ácida do TDF:

Parâmetros*	gCOSY	gHSQC	gHMBC
Sequência de pulso	<i>cosygpprqf</i>	<i>hsqcetgpprsisp2.2</i>	<i>hmbcgpplpndqf</i>
Número de pontos de domínio de tempo direto (TDF2)	4.096	4.096	2048
Número de pontos de domínio de tempo indireto (TDF1)	256	256	256
Janela espectral do domínio direto (SW2) (ppm)	20,02	20,02	20,02
Janela espectral do domínio indireto (SW1) (ppm)	20,02	230,00	238,89
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ-F2) (s)	0,26	0,26	0,26
Tempo de aquisição no domínio indireto (AQ-F1) (s)	0,016	0,0055	0,0055
Número de scans (NS)	32	64	76
Duração do pulso de 90° (¹ H) (μs)	8,00	8,00	8,00
Duração do pulso de 90° (¹³ C) (μs)	-	15,00	15,00
Frequência central do pulso no canal de ¹ H (O1P) (ppm)	6,00	6,00	6,00
Frequência central do pulso no canal de ¹³ C (O2P) (ppm)	4,63	99,98	99,98
Tempo de relaxação (d1, s)	1	1	2

*Nomenclatura Bruker

Depois de adquirir o espectro, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 4096 pontos em F2 (SIF2) e F1 (SIF1) para os

experimentos de COSY e HSQC e 2048 pontos para os experimentos de HMBC, utilizando uma função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 0 em ambos eixos. A fase foi ajustada de forma manual.

3.3.2.7 Amostra do TDF sob condições de hidrólise básica

a. Aquisição dos espectros 1D de hidrogênio do TDF sob condições de hidrólise básica:

Os espectros de RMN-¹H foram coletados no espectrômetro Bruker modelo avance III 400,15 MHz para ¹H equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI- *Broadband Inverse*), adquiridos utilizando-se uma sequência de pulsos com um único pulso para ¹H (*zg*), numa temperatura de 25°C. Os espectros de ¹³C{¹H} foram realizados no mesmo espectrômetro (100 MHz para ¹³C) e mesma sonda, utilizando uma sequência de pulso *hard* para ¹³C com largura de pulso de 30° e desacoplamentos de ¹H considerando o efeito NOE durante o tempo de relaxação (*zgpg30*), sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição estão descritos na tabela 11:

Tabela 3.10. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 1D de RMN-¹H e RMN-¹³C da mistura de degradação básica do TDF:

Parâmetros*	¹ H	¹³ C
Sequência de pulso	<i>zg</i>	<i>zgpg30</i>
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	32.768	32.768
Janela espectral (SW) (ppm)	15,01	230,03
Tempo de aquisição (AQ) (s)	1,82	0,47
Número de scans (NS)	32	32768
Duração do pulso de 90° (p1) (µs)	8,50	-
Duração do pulso de 30° (¹³ C) (µs)	-	4,95
Frequência central do pulso (O1P) (ppm)	3,56	99,98
Tempo de relaxação (d1, s)	4	0,1

Duração do pulso de 90° para desacoplamento (μs) - 90

*Nomenclatura Bruker

Depois da aquisição de cada espectro, os mesmos foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 32.768 pontos (SI), tanto no espectro de ^1H quanto no espectro de ^{13}C ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática em ambos espectros.

b. Aquisição e processamento dos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) do TDF sob condições de hidrólise básica

Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400,15 MHz para ^1H equipado com uma sonda BBI de 5 mm, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição que foram utilizados no experimento estão descritos na tabela 12:

TABELA 3.11. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) da mistura de degradação ácida do TDF:

Parâmetros*	gCOSY	gHSQC	gHMBC
Sequência de pulso	<i>cosygpprqf</i>	<i>hsqcedetgp</i>	<i>hmbcgp/pndq</i>
Número de pontos de domínio de tempo direto (TDF2)	4.096	4.096	4.096
Número de pontos de domínio de tempo indireto (TDF1)	256	256	.256
Janela espectral do domínio direto (SW2) (ppm)	15,02	15,02	15,02
Janela espectral do domínio indireto (SW1) (ppm)	15,02	230,00	230,00
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ-F2) (s)	0,34	0,34	0,34
Tempo de aquisição no domínio indireto (AQ-F1) (s)	0,021	0,0055	0,0055

Número de scans (NS)	32	64	76
Duração do pulso de 90° (¹ H) (μs)	8,12	8,12	8,12
Duração do pulso de 90° (¹³ C) (μs)	-	15,00	15,00
Frequência central do pulso no canal de ¹ H (O1P) (ppm)	3,53	3,53	3,53
Frequência central do pulso no canal de ¹³ C (O2P) (ppm)	-	75,00	75,00
Tempo de relaxação (d1, s)	1	1	1

*Nomenclatura Bruker

Depois de adquirir o espectro, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 4096 pontos em F2 (SIF2) e F1 (SIF1) para os experimentos de COSY e HSQC e 2048 pontos para os experimentos de HMBC, utilizando uma função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 0 em ambos eixos. A fase foi ajustada de forma manual.

c. Aquisição de RMN de 1H para estudo de quantificação absoluta do TDF em meio ácido e básico:

Um espectrômetro de RMN Bruker de 600 MHz equipado com uma sonda Bruker BBO de 600 MHz de 5 mm foi utilizado neste estudo de quantificação. DMSO-d₆ e ácido maleico foram utilizados como solvente e padrão interno, respectivamente. Em condições ácidas o tempo de aquisição foi ajustado para 3,64 s e a janela do espectro foi ajustada para 15 ppm. O T₁ foi determinado resultando em 1,5 (garantindo 7×T₁, mesmo para hidrogenios com relaxamento lento). Foi utilizado um pulso de 90° e o intervalo de tempo entre as aquisições (d1) foi definido para 17 s. O número de scans foi definido como 128 e o tempo total de execução do instrumento foi de 44 minutos. Em condições básicas o tempo de aquisição foi ajustado para 3,64 s e a janela do espectro foi ajustada para 15 ppm. O T₁ foi determinado resultando em 3 s, garantindo 7×T₁, mesmo para hidrogênios de relaxamento relativamente lento. Foi utilizado um pulso de 90° e o intervalo de tempo entre as aquisições (d1) foi definido para 27 s. O número de

scans foi definido como 128 e o tempo total de execução do instrumento foi de 63 minutos.

3.3.3 Aquisição e processamento de experimentos utilizando a sequência de pulso DREAMTIME

DREAMTIME foi usado como sequência de pulso para adquirir os espectros de ^1H (com supressão de água quando necessário) de cada molécula desejada tanto da amostra padrão de aminoácidos quanto dos produtos de degradação presentes nas misturas de degradação ácida e básica dos fármacos: sofosbuvir e fumarato de tenofovir desoproxila. As frequências, acoplamentos em J e largura de pulso utilizados na aquisição de cada espectro de cada molécula selecionada serão detalhados posteriormente. Em todos os casos, as formas de onda de 180° utilizadas para a seleção dos compostos a serem analisados foram moduladas em múltiplas fases, utilizando uma Gaussiana de 1000 pontos truncados a 1%, e calculadas utilizando a ferramenta de formas da Bruker, conforme descreve Jenne e colaboradores (Jenne et al., 2022).

Os dados espectrais foram coletados usando 65.536 pontos no domínio do tempo, 32 scans e os seguintes filtros opcionais (*flags*) foram ativados: *zero quantum spoil* (ZQR), pré-saturação (PR), *mixing time* (TOCSY) e a média da constante de acoplamento em J (AV). O filtro da média da constante de acoplamento em J é usado para calcular a média da resposta em múltiplos alvos e, em alguns casos, melhorar a supressão de fundo para seleção de uma única molécula. Se mais de uma constante de acoplamento estiver listada, isso indica que foi calculada a média das constantes de acoplamento. Em todos os casos, foram utilizados pulsos com formas de onda moduladas em amplitude e fase com durações na faixa de 10-40 ms e as frequências/acoplamentos em J utilizados para seleção foram individualmente estabelecidos para cada molécula. Os espectros de ^1H utilizando a sequência de pulso DREAMTIME foram realizados no espectrômetro Bruker modelo AVANCE III 400 MHz para ^1H equipado com uma sonda BBI de 5 mm, numa temperatura de 25°C (298 K). Os parâmetros de aquisição são os seguintes:

3.3.3.1 Aquisição dos experimentos de ^1H -DREAMTIME utilizando DREAMTIME na mistura de composição conhecida.

TABELA 3.12. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de DREAMTIME na mistura de composição conhecida.

Parâmetro	^1H
Sequência de pulso	DREAMTIME
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	65.536
Janela espectral (SW, ppm)	15,0
Tempo de aquisição (AQ, s)	3,63
Número de varreduras (NS)	32
Tempo de relaxação (d1, s)	1,5
Número de scans dummy (DS)	8
Gradientes	
Gpz0	11%
Gpz1	17%
Gpz2	11%
Gpz3	31%
Gpz5	1-7%
Gpz7	43%
Gpz11	34%
Gpz12	22%

Tanto na seleção individual de cada aminoácido quanto na seleção múltipla de forma simultânea dos aminoácidos foram ativados diferentes filtros (*flags*). As múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase foram estabelecidas na faixa de 10-40 ms e as frequências específicas de cada aminoácido e suas constantes de acoplamento em J serão descritos a continuação:

Fenilalanina: Frequências (ppm/Hz) 3,01; 3,07; 3,19; 3,24; 3,89; 3,93; 7,25; 7,33 e 7,36 ppm/ 1205,9; 1228,1; 1278,7; 1295,9; 1560,3; 1572,5; 2899,8; 2933,6 e 2947,4 Hz. Largura de pulso: 30 ms. *Flags:* ZQS, PR, TOCSY. Constante de acoplamento (cnst11): 8 Hz. Mixing time: 150 ms.

L-Alanina: Frequências (ppm/Hz) 1,38; 1,40; 1,50; 3,66; 3,68; 3,70 e 3,72 ppm/ 554,3; 561,6; 1467,8; 1475,4; 1482,4 e 1489,9 Hz. Largura de pulso: 30 ms. *Flags:* ZQS, PR, AV e TOCSY. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-8 Hz. Mixing time: 20 ms.

Ácido aspártico: Frequências (ppm/Hz) 2,86; 2,92; 2,96; 3,97; 3,98; 4,00 ppm/ 1145,7; 1167,2; 1187,7; 1589,4; 1595,4 e 1601,1 Hz. Largura de pulso: 30 ms. *Flags:* ZQS, PR, TOCSY, AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-9 Hz. Mixing time: 20 ms.

Nicotinamida: Frequências (ppm/Hz) 7,96; 7,97; 8,69; 8,72; 8,81; 9,07 ppm/ 4775,8; 4789,1; 5221,5; 5229,2; 5288,1; 5293,6; 5443,3 Hz. Largura de pulso: 40 ms. *Flags:* ZQS, PR, TOCSY, AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-9 Hz. Mixing time: 20 ms.

Alanina, nicotinamida e ácido aspártico: Frequências (ppm/Hz) 1,40; 2,86; 2,95; 3,05; 3,76; 3,95; 3,99 ppm/ 841,9; 1718,1; 1772,9; 1833,6; 2262,16; 2374,9; 2398,9 Hz. Largura de pulso: 20 ms. Módulos opcionais “flags”: ZQS, PR, AV. Media de constante de acoplamento (VD list): 7-9 Hz. Mixing time: 0 ms.

Depois da aquisição de cada espectro de ^1H (DREAMTIME), estes foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 65.536 pontos (SI), ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática.

3.3.3.2 Aquisição dos experimentos de ^1H -DREAMTIME utilizando a sequência de pulso DREAMTIME da amostra de sofosbuvir sob condições de hidrólise ácida

A aquisição dos espectros de ^1H (DREAMTIME) dos produtos de degradação da mistura ácida e básica tanto do sofosbuvir quanto do fumarato de tenofovir desoproxila foram realizados no espectrômetro Bruker modelo AVANCE III 400 MHz para ^1H

equipado com uma sonda BBI de 5 mm, adquiridos utilizando-se a sequência de pulso DREAMTIME numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição são os seguintes:

TABELA 3.13. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^1H -DREAMTIME na mistura de degradação ácida do Sofosbuvir.

Parâmetro	Valor
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	65.536
Janela espectral (SW)	15,02 ppm
Tempo de aquisição (AQ)	4,45 s
Número de scans (NS)	32
Tempo de relaxação (d1)	1,5 s
Número de scans dummy (DS)	8
Gradientes	
Gpz0	11%
Gpz1	17%
Gpz2	11%
Gpz3	31%
Gpz5	1%
Gpz7	43%
Gpz11	34%
Gpz12	22%

Depois da aquisição de cada espectro de ^1H -DREAMTIME, estes foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 65.536 pontos (SI), ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática. Na seleção individual de cada produto de degradação foram ativados diferentes módulos opcionais (flags). As múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase foram estabelecidas no rango de 10-40 ms. No caso da seleção simultânea de múltiplos produtos de degradação foram ativados

os quatro módulos opcionais (flags) ao mesmo tempo: ZQS, PR, AV e TOCSY e as múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase foram estabelecidas em 40 ms. Em ambos casos as frequências específicas na seleção de cada produto de degradação tanto de forma individual quanto simultânea e seus acoplamentos em J serão descritos a continuação:

ADP1: Frequências (ppm/Hz) 1,16; 1,21; 3,69; 3,75; 3,94; 4,18; 4,22; 4,30; 4,34; 5,59; 5,61; 7,07; 7,17; 7,27; 7,33; 7,91 e 7,93 ppm/ 460,40; 483,84; 1475,22; 1500,33; 1577,08; 1670,70; 1688,38; 1720,20; 1737,39; 2237,44; 2245,08; 2826,41; 2864,74; 2909,65; 2931,13; 3165,32 e 3173,22 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY, AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-9 Hz. Mixing time: 100 ms.

ADP2: Frequências (ppm/Hz) 1,16; 1,21; 3,69; 3,75; 3,94; 4,18; 4,22; 4,30; 4,34; 5,59; 5,61; 7,91 e 7,93 ppm/ 460,40; 483,84; 1475,22; 1500,33; 1577,08; 1670,70; 1688,38; 1720,20; 1737,39; 2237,44; 2245,08; 3165,32 e 3173,22 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, AV e TOCSY. Media de constante de acoplamento: 7-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

ADP3: Frequências (ppm/Hz) 5,64; 5,66 7,68 e 7,71 ppm/ 2258,88; 2267,11; 3076,54 e 3084,60 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR e AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-8 Hz.

ADP4: Frequências (ppm/Hz) 1,06; 1,08; 1,36; 3,69; 3,77; 3,93; 4,72; 4,77; 4,81 e 8,42 ppm/ 426,59; 432,80; 542,62; 1477,22; 1509,11 1573,64; 1888,61; 1907,22; 1926,04 e 3371,12 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY, AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-9 Hz. Mixing time: 40 ms.

ADP5: Frequências (ppm/Hz) 1,36; 3,69; 3,77; 3,93 e 8,54 ppm/ 542,62; 1477,22; 1509,11 1573,64 e 3420,07 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY, AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

ADP6: Frequências (ppm/Hz) 6,67; 6,73; 7,10 e 7,16 ppm/ 2669,23; 2692,57; 2841,96 e 2866,71 Hz. Largura de pulso: 30 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY. Constante de acoplamento J (cnst11): 8 Hz. Mixing time: 40 ms.

ADP7: Frequências (ppm/Hz) 0,96; 0,98; 3,69; 3,77 e 3,93 ppm/ 385,92; 391,98; 1477,22; 1509,11 e 1573,64 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY. Constante de acoplamento J (cnst11): 7 Hz. Mixing time: 90 ms.

ADP6 e ADP7: Frequências (ppm/Hz) 0,96; 0,98; 3,69; 3,77; 3,93; 6,67; 6,73; 7,10 e 7,16 ppm/ 385,92; 391,98; 1477,22; 1509,11; 1573,64; 2669,23; 2692,57; 2841,96 e 2866,71 Hz. Largura de pulso: 30 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY e AV. Media de constante de acoplamento J (VDlist): 7-8 Hz. Mixing time: 20 ms.

ADP5, ADP6 e ADP7: Frequências (ppm/Hz) 0,96; 0,98; 1,36; 3,69; 3,93; 6,67; 6,73; 7,10; 7,16 e 8,54 ppm/ 385,92; 391,98; 542,62; 2669,23; 2692,57; 2841,96; 2866,71 e 3420,07 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY e AV. Media de constante de acoplamento J (VD list): 7-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

ADP3, ADP4, ADP5 e ADP7: Frequências (ppm/Hz) 0,96; 0,98; 1,36; 3,69; 3,93; 4,72; 4,77; 4,81; 8,42 e 8,54 ppm/ 385,92; 391,98; 1477,22; 1509,11; 1573,64; 1888,61; 1907,22; 1926,04; 3370,80 e 3419,74 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY. Media de constante de acoplamento J (VD list): 7-8 Hz. Mixing time: 20 ms.

3.3.3.3 Aquisição dos experimentos de ¹H-DREAMTIME utilizando a sequência de pulso DREAMTIME da amostra de sofobuvir sob condições de hidrólise básica

TABELA 3.14. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ¹H-DREAMTIME na mistura de degradação básica do sofobuvir.

Parâmetro	Valor
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	65.536
Janela espectral (SW, ppm)	15,02
Tempo de aquisição (AQ, s)	4,45
Número de scans (NS)	32
Tempo de relaxação (d1, s)	1,5

Número de scans dummy (DS)	8
Gradientes	
Gpz0	11%
Gpz1	17%
Gpz2	11%
Gpz3	31%
Gpz5	1%
Gpz7	43%
Gpz11	34%
Gpz12	22%

Depois da aquisição de cada espectro de $^1\text{H-DREAMTIME}$, estes foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 65.536 pontos (SI), ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática. Na seleção individual de cada produto de degradação foram ativados diferentes módulos opcionais (flags). As múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase foram estabelecidas no rango de 10-40 ms. No caso da seleção simultânea de múltiplos produtos de degradação foram ativados os quatro módulos opcionais (flags) ao mesmo tempo: ZQS, PR, AV e TOCSY e as múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase foram estabelecidas em 40 ms. Em ambos casos as frequências específicas na seleção de cada produto de degradação tanto de forma individual quanto simultânea e seus acoplamentos em J serão descritos a continuação:

BDP1: Frequências (ppm/Hz) 1,03; 3,69; 3,77 e 3,93 ppm/ 385,92; 391,98; 1477,22; 1509,11 e 1573,64 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY e AV. Constante de acoplamento J (VDlist): 6-8 Hz. Mixing time: 20 ms.

BDP2: Frequências (ppm/Hz) 6,67; 6,73; 7,10 e 7,16ppm/ 2669,23; 2692,57; 2841,96 e 2866,71 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY. Constante de acoplamento J (cnst11): 8 Hz. Mixing time: 20 ms.

BDP3: Frequências (ppm/Hz) 1,19; 1,20; 3,85; 4,01; 4,87; 4,94; 5,64; 5,66; 7,68 e 7,71 ppm/ 477,4; 483,2; 1544,9; 1606,9; 1949,9; 1976,0; 2258,88; 2267,11; 3076,54 e 3084,60 Hz. Largura de pulso: 30 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY, AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 8-9 Hz. Mixing time: 20 ms.

BDP4: Frequências (ppm/Hz) 1,19; 1,20; 3,69; 3,77; 3,93; 4,72; 4,77; 4,81 5,64; 5,66; 7,16; 7,20; 7,34; 7,38; 7,68 e 7,71 ppm/ 477,4; 483,2; 1477,22; 1509,11 1573,64; 1888,61; 1917,22; 1926,04, 2258,88; 2267,11; 2865,1; 2879,9, 2937,1; 2953,0; 3093.7 e 3099,9 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY, AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-9 Hz. Mixing time: 40 ms.

BDP1 e BDP2: Frequências (ppm/Hz) 0,96; 0,98; 3,69; 3,77; 3,93; 4,72; 4,77; 4,81; 6,67; 6,73; 7,10 e 7,16 ppm/ 385,92; 391,98; 1477,22; 1509,11; 1573,64; 1888,61; 1917,22; 1926,04; 2669,23; 2692,57; 2841,96 e 2866,71 Hz. Largura de pulso: 30 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY. Media de constante de acoplamento J (VD list): 7-8 Hz. Mixing time: 20 ms.

3.3.3.4 Aquisição dos experimentos de ¹H-DREAMTIME utilizando a sequência de pulso DREAMTIME da amostra de TDF sob condições de hidrólise ácida

A aquisição dos espectros de ¹H-DREAMTIME dos produtos de degradação das misturas do TDF analisadas, foram realizados no espectrômetro Bruker modelo AVANCE III 400 MHz para ¹H equipado com uma sonda BBI de 5 mm, adquiridos utilizando-se a sequência de pulso DREAMTIME numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição são os seguintes:

TABELA 3.15. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ¹H-DREAMTIME na mistura de degradação ácida do TDF.

Parâmetro	Valor
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	65.536
Janela espectral (SW, ppm)	15,02

Tempo de aquisição (AQ)	5,45 s
Número de scans (NS)	32
Tempo de relaxação (d1)	1,0 s
Número de scans dummy (DS)	8
Gradientes	
Gpz0	11%
Gpz1	17%
Gpz2	11%
Gpz3	31%
Gpz5	1%
Gpz7	43%
Gpz11	34%
Gpz12	22%

Depois da aquisição de cada espectro de ^1H -DREAMTIME, estes foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 65.536 pontos (SI), ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática. Na seleção individual de cada produto de degradação foram ativados diferentes módulos opcionais (flags). As múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase foram estabelecidas no rango de 10-40 ms. No caso da seleção simultânea de múltiplos produtos de degradação foram ativados os quatro módulos opcionais (flags) ao mesmo tempo: ZQS, PR, AV e TOCSY e as múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase foram estabelecidas em 40 ms. Em ambos casos as frequências específicas na seleção de cada produto de degradação tanto de forma individual quanto simultânea e seus acoplamentos em J serão descritos a continuação:

ATDP1: Frequências (ppm/Hz) 1,01; 1,16; 1,17; 3,88; 3,91; 4,18; 4,33; 4,71; 4,73; 5,53; 5,41; 5,47; 8,38 e 8.42 ppm/ 407,8; 465,1; 469,3; 1554,5; 1568,0; 1673,1; 1735,5; 1885,4; 1892,6; 2131,9; 2165,3; 2186,9; 3357,9 e 3373,2Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros:

ZQS, PR, TOCSY e AV. Média da constante de acoplamento J (VDlist): 7-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

ATDP2: Frequências (ppm/Hz) 1,16; 1,17; 4,70; 4,74; 4,77; 5,37; 5,42; 5,46 ppm/ 464,9; 469,8; 1881,9; 1895,4; 1909,8; 2150,9; 2169,2 e 2185,2 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY e AV. Média de acoplamento J (VDlist): 6-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

ATDP3: Frequências (ppm/Hz) 0,96; 0,98; 3,60; 3,66; 3,73 ppm/ 386,3; 393,9; 1441,8; 1463,7 e 1491,4 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR e TOCSY. Constante de acoplamento (cnst11): 8 Hz. Mixing time: 90 ms.

ATDP2 e ATDP3: Frequências (ppm/Hz) 0,96; 0,98; 1,16; 1,17; 3,66; 3,73; 4,70; 4,74; 4,77; 5,37; 5,42; 5,46 ppm/ 386,3; 393,9; 464,9; 469,8; 1463,7 e 1491,4 1881,9; 1895,4; 1909,8; 2150,9; 2169,2 e 2185,2 Hz. Largura de pulso: 30 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY e AV. Média de constante de acoplamento J (VD list): 6-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

3.3.3.5 Aquisição dos experimentos de ¹H-DREAMTIME utilizando a sequência de pulso DREAMTIME da amostra de TDF sob condições de hidrólise básica

TABELA 3.16. Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ¹H-DREAMTIME na mistura de degradação básica do TDF.

Parâmetro	Valor
Número de pontos de domínio de tempo (TD)	65.536
Janela espectral (SW, ppm)	15,02
Tempo de aquisição (AQ)	5,45 s
Número de scans (NS)	32
Tempo de relaxação (d1, s)	1,0
Número de scans dummy (DS)	8

Gradientes

Gpz0	11%
Gpz1	17%
Gpz2	11%
Gpz3	31%
Gpz5	1%
Gpz7	43%
Gpz11	34%
Gpz12	22%

Depois da aquisição de cada espectro de $^1\text{H-DREAMTIME}$, estes foram processados aplicando uma transformada de Fourier de 65.536 pontos (SI), ajustando-se a fase (apk) e a linha base (absn) de forma automática. Na seleção individual de cada produto de degradação foram ativados diferentes módulos opcionais (flags). As múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase foram estabelecidas no rango de 10-40 ms. No caso da seleção simultânea de múltiplos produtos de degradação foram ativados os quatro módulos opcionais (flags) ao mesmo tempo: ZQS, PR, AV e TOCSY e as múltiplas formas de onda moduladas em amplitude e fase foram estabelecidas em 40 ms. Em ambos casos as frequências específicas na seleção de cada produto de degradação tanto de forma individual quanto simultânea e seus acoplamentos em J serão descritos a continuação:

BTDP1: Frequências (ppm/Hz) 1,06; 1,23; 3,98; 4,02; 4,17; 4,26; 4,81; 5,50; 5,56; 8,15 e 8,26 ppm/ 438,3; 477,1; 480,8; 1575,6; 1594,2; 1609,7; 1668,7; 1702,7; 1924,2; 1938,2; 2200,0; 2223,2; 3262,4 e 3303,3 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY e AV. Média da constante de acoplamento J (VDlist): 7-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

BTDP2: Frequências (ppm/Hz) 1,34; 4,78; 4,81; 4,83; 5,45; 5,49 e 5,52 ppm/ 556,0; 1912,2; 1924,5; 1931,7; 2179,3; 2197,9 e 2209,8 Hz. Largura de pulso: 30 ms. Filtros: ZQS, PR, AV. Média da constante de acoplamento J (VDlist): 7-8 Hz. Mixing time: 0 ms.

BTDP3: Frequências (ppm/Hz) 0,94; 0,95; 3,94; 3,98; 4,02; 4,16; 4,25; 8,15 e 8,25 ppm/ 375,4; 380,7; 1579,3; 1592,7; 1607,4; 1666,4; 1699,8; 3303,0 e 3216,5 Hz. Largura de pulso: 30 ms. Filtros: ZQS, PR e AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 6-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

BTDP4: Frequências (ppm/Hz) 1,19; 1,20; 4,79; 4,82 e 4,84 ppm/ 714,5; 721,7; 2880,3; 2896,2 e 2905,2 Hz. Largura de pulso: 20 ms. Módulos opcionais “flags”: ZQS, PR, TOCSY e AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

BTDP5: Frequências (ppm/Hz) 1,03; 1,04; 3,69; 3,77; 3,93 ppm/ 414,7; 418,6; 1570,8; 1584,1 e 1598,3 Hz. Largura de pulso: 40 ms. Filtros: ZQS, PR, TOCSY e AV. Media de constante de acoplamento (VDlist): 7-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

BTDP2 e BTDP4: Frequências (ppm/Hz) 1,03; 1,04; 1,19; 1,20; 3,69; 3,77; 3,93; 4,78; 4,81; 4,83 ppm/ 414,7; 418,6; 556,0; 1570,8; 1584,1; 1598,3 Hz. Largura de pulso: 30 ms. Módulos opcionais “flags”: ZQS, PR, TOCSY e AV. Media de constante de acoplamento J (vdlist): 7-8 Hz. Mixing time: 90 ms.

3. DISCUSSÃO E RESULTADOS

4.1 Capítulo I

4.1.1 Implementação da sequência de pulso DREAMTIME utilizando uma amostra constituída de uma mistura conhecida para a aquisição dos espectros de ¹H-DREAMTIME das moléculas de interesse

A amostra estabelecida como mistura padrão na implementação da sequência DREAMTIME é uma mistura de composição e concentração conhecida, constituída pelas seguintes substâncias: *L*-fenilalanina, *L*-alanina, nicotinamida, ácido maleico e ácido aspártico (Figura 4.1). A mistura apresenta sobreposição de sinais em algumas regiões do espectro de ¹H, especificamente na região entre 2,70-4,10 ppm (Figura 4.2). Um dos principais objetivos da técnica DREAMTIME é que, mesmo existindo uma notável sobreposição espectral dos sinais e independente da natureza da amostra, seja possível separar os sinais por meio da técnica espectral em si e não por técnicas de separação física da amostra inicial como cromatografia ou precipitação, por exemplo. Isto, permite que seja superada a limitação de algumas outras técnicas de RMN convencionais, onde o assinalamento dos sinais de moléculas alvo se torna difícil devido a uma alta complexidade da mistura o que leva a que exista sobreposição dos seus sinais.

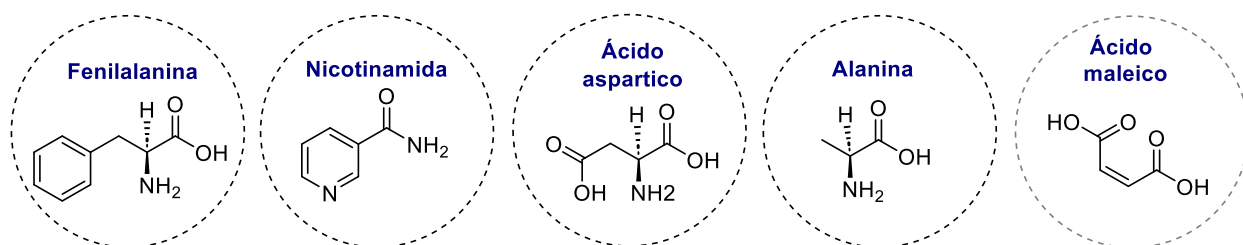


FIGURA 4.1. Estrutura químicas dos compostos utilizados na mistura de composição e concentração conhecida para a implementação da técnica DREAMTIME.

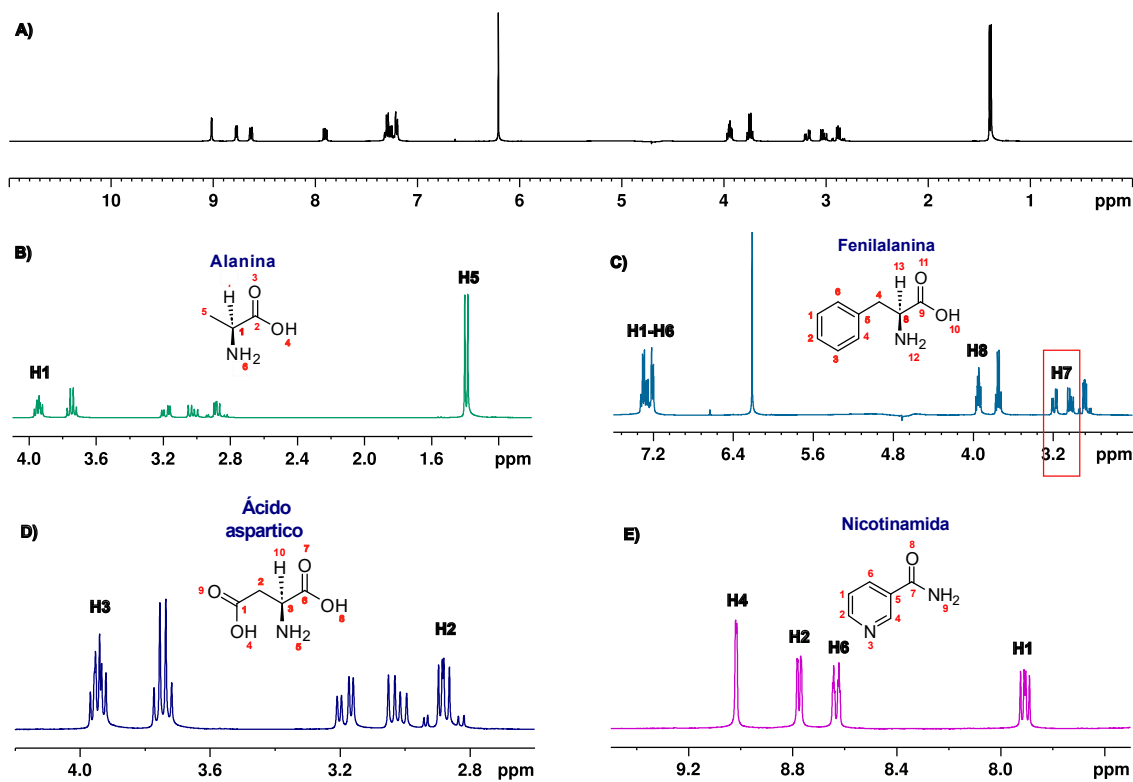


FIGURA 4.2. **A)** Espectro de ^1H (*zgcppr*) com supressão de água da mistura padrão de composição conhecida; **B)** Ampliação do espectro de ^1H da L-alanina; **C)** Ampliação do espectro de ^1H da L-fenilalanina; **D)** Ampliação do espectro de ^1H do ácido aspártico; **E)** Ampliação do espectro de ^1H da nicotinamida. Todos os espectros foram realizados em D_2O a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Como já foi descrito anteriormente, a técnica de DREAMTIME possui quatro blocos principais: (1) excitação refocada projetada (DRE), (2) *zero quantum spoil*, (3) *mixing time* e (4) supressão de água, sendo os últimos 3 filtros considerados como opcionais. O elemento mais importante é a excitação refocada projetada (bloco 1). O bloco 1 possui um único eco o qual permite trabalhar com uma forma de onda modulada em amplitude e fase, excitando qualquer número de spins acoplados de forma simultânea usando uma única forma de onda. A evolução dos operadores de spin na DREAMTIME envolve a passagem da magnetização por um filtro quântico duplo com ciclo de fase (pulsos de 90°). Esse processo é projetado com o fim de reorientar apenas

a magnetização acoplada em J e, ao mesmo tempo, cancelar todos os outros sinais indesejados. Essa evolução seletiva é crucial para isolar os sinais desejados de misturas complexas. Quando a seleção é estendida a múltiplas moléculas, cada uma delas evolui de forma individual como diferentes pares de spin acoplados em J o que faz possível a seleção de várias moléculas simultaneamente num mesmo espectro. A forma de onda é modulada a partir dos deslocamentos químicos dos spins acoplados em J e da seleção da largura do pulso. Uma vez que são conhecidas as frequências de excitação (deslocamentos químicos), é necessário configurar a forma do pulso determinando o tempo de pulso, que pode variar de 10 até 40 ms e o seu valor dependerá da molécula a ser analisada. De forma geral 40 ms é um tempo de pulso seguro, eficiente e seletivo, porém para moléculas simples ou únicas pode ser utilizada um tempo de pulso de 10 ou 20 ms. Na seleção de múltiplas moléculas é recomendado usar 40 ms para aumentar a seletividade (Figura 4.3). De forma geral, foi observado que para tempos de pulso de 10 ms a seletividade era baixa e a relação sinal/ruído é consideravelmente alta o que ficava evidente no espectro final (Figura 4.3), em alguns casos foram observados outros sinais que não correspondiam a molécula que estava sendo analisada ou não eram observados todos os sinais da molécula de interesse, porém não pode ser considerado como uma regra absoluta devido a que em alguns casos o tempo de pulso de 10 ms resultou seletiva e permitiu, junto com o uso dos outros filtros, adquirir espectros altamente seletivos.

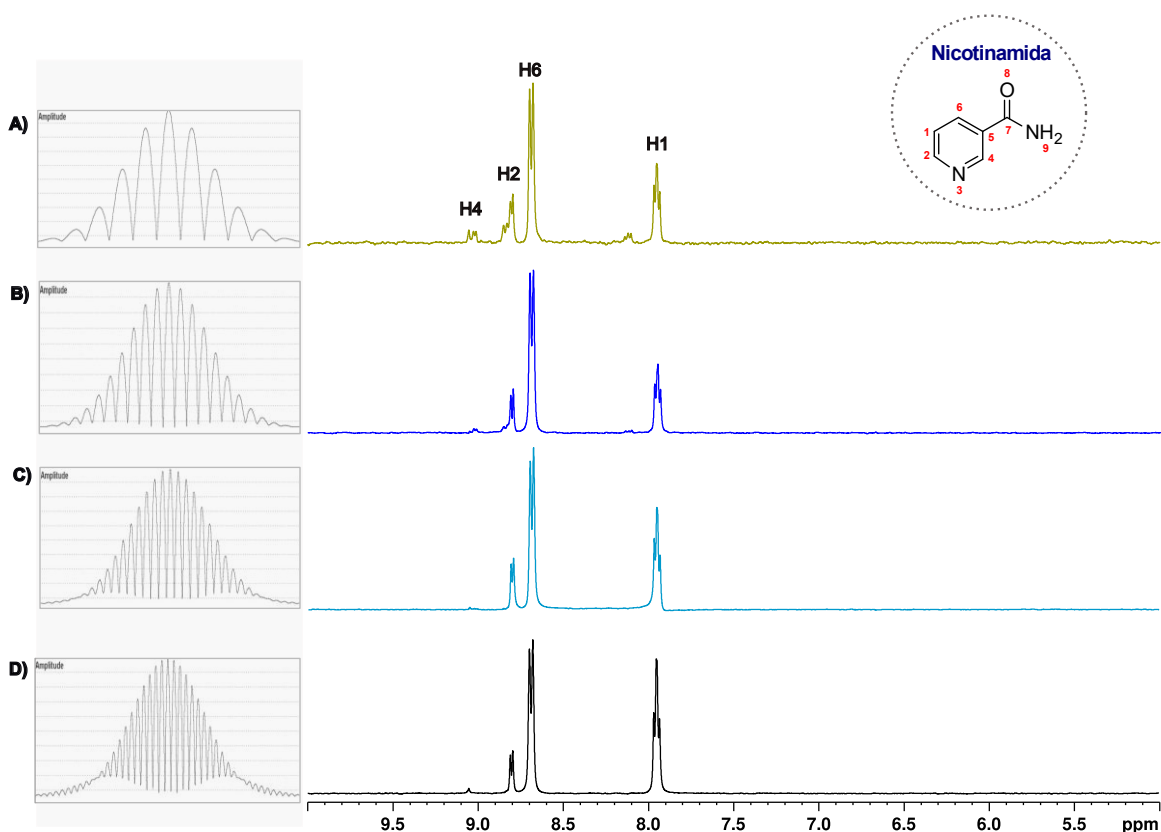


FIGURA 4.3. Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME com tempo de pulso ajustado em **A)** 10 ms; **B)** 20 ms; **C)** 30 ms e **D)** 40 ms. Todos os espectros foram realizados em D_2O a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K. À esquerda é apresentado o diagrama obtido a partir da formatação do pulso.

Durante a aquisição dos espectros de ^1H -DREAMTIME devem ser ativados os filtros opcionais, chamados também de *flags*, com o objetivo de aumentar a seletividade da técnica logrando uma maior manipulação dos spins da amostra a ser analisada. A média da constante de acoplamento J é aplicada para obter a média da resposta sobre múltiplas moléculas e melhorar a supressão de fundo na seleção de compostos únicos. No caso de aplicar a média da constante de acoplamento J , o total de *scans* vai resultar no número de valores de constantes de acoplamento vezes o número de *scans* pelo valor de J . O filtro correspondente ao *mixing time* (TOCSY) tem como objetivo transferir a magnetização ao longo de todo o sistema de spin e, como resultado, é obtido um espectro de ^1H de um composto único onde são observados todos os spins acoplados

aos pares de hidrogênios selecionados e em conjunto com o filtro ZQS (*zero quantum spoil*) podem ser melhoradas as propriedades de fase no espectro final. Por último o filtro PR (*presaturation*) e o W5 (*watergate*) permitem pressaturar o sinal da água ou o sinal do solvente. Os filtros, mesmo sendo considerados opcionais, são parâmetros de aquisição que permitem alcançar uma alta seletividade e, de fato, manipular os pares de spins o suficiente para adquirir espectros com alta resolução, alta intensidade dos sinais e resolver problemas de fase que são comuns nos espectros onde não são aplicados esses filtros.

Quando utilizado o módulo *mixing time* é possível manipular tanto a intensidade quanto a resolução dos sinais observados no espectro de ^1H . Um outro fator que pode ser melhorado no espectro final aplicando o TOCSY são as propriedades de fase, como é observado na Figura 4.4. Nesse caso foi selecionada a nicotinamida da mistura de composição conhecida que, após ajustar e otimizar o tempo de pulso em 40 ms, foi variado o valor de *mixing time* de 0 até 240 ms. À medida que este valor aumenta pode ser observado o aumento da intensidade dos sinais, porém num determinado valor começa a se observar tanto defasagem dos sinais quanto diminuição da intensidade dos sinais. No caso do *mixing time* de 0 ms o sinal correspondente ao H4 em 9,06 ppm mostra uma intensidade muito baixa, quase imperceptível no espectro final. Quando ajustado o *mixing time* em 150 ms as intensidades dos sinais se igualam no espectro de ^1H convencional da mistura. Porém, quando o valor sobrepassa os 150 ms a intensidade do sinal em 8,86 ppm começa a diminuir (Figura 4.4). O melhor espectro obtido para nicotinamida em relação a intensidade e propriedade de fase foi ajustando o *mixing time* em 150 ms (espectro F, Figura 4.4). Nos espectros de ^1H adquiridos utilizando a DREAMTIME o sinal correspondente ao NH_2 , singleto em 7,80 ppm, não é observado, possivelmente ao uso do modulo de PR o qual pode suprimir esse sinal assim como suprime o sinal do HDO.

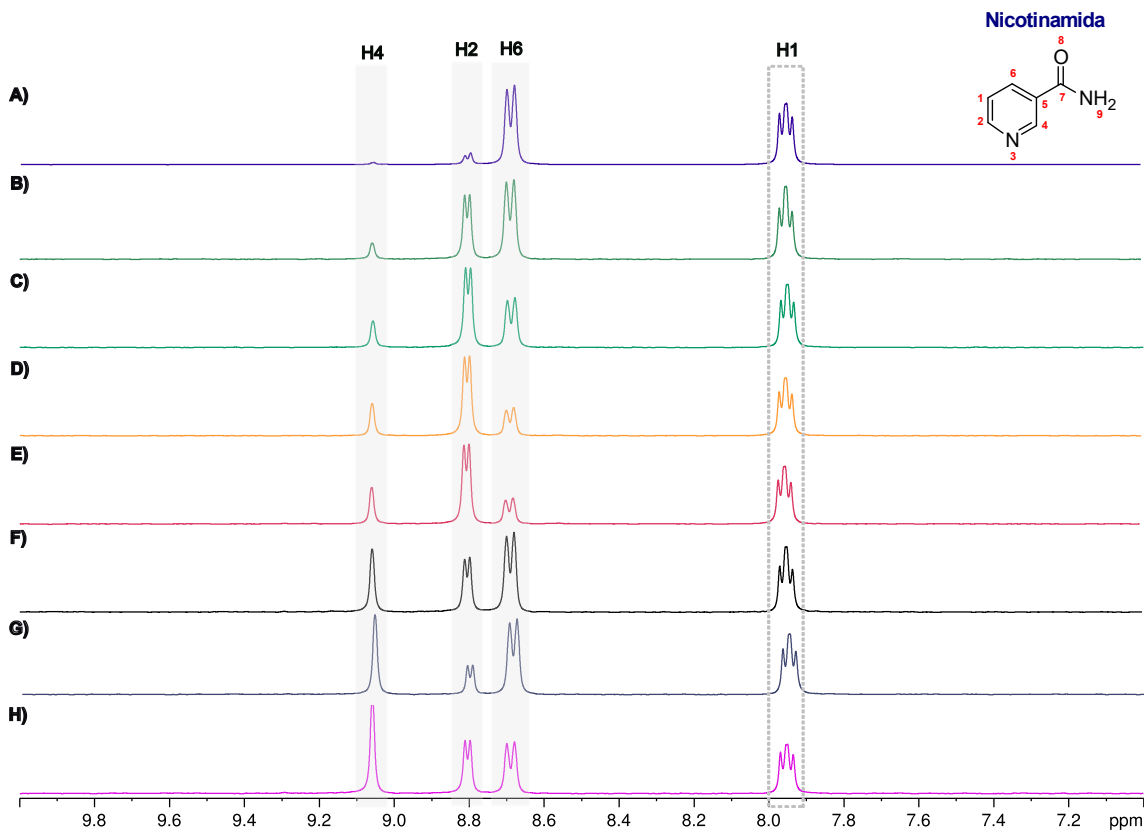


FIGURA 4.4. Variação do módulo TOCSY na sequência DREAMTIME para a seleção da nicotinamida na mistura de composição conhecida. Ampliação do espectro de ^1H aplicando um valor de *mixing time* (em ms) de: A) 0; B) 40s; C) 60; D) 80; E) 100; F) 150; G) 200 e H) 240. Todos os espectros foram realizados em D_2O a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

A média da constante de acoplamento J é um filtro que permite aumentar a seletividade durante o melhoramento da supressão de fundo na seleção de objetivos únicos, e assim que exista uma maior especificidade, e também permite aumentar a intensidade dos sinais, estabelecendo diferentes faixas de constantes de acoplamentos e obter, assim, espectros com intensidades mais elevadas. Na figura 4.5 pode ser observada a influência do estabelecimento de diferentes médias de constante de acoplamento, J , e como a seleção de um valor da média pode resultar no aumento das intensidades dos sinais no espectro final. Um aspecto importante destes filtros é a capacidade de ter como resultado espectros com problemas de intensidade ou

propriedades de fase por exemplo, mas quando aplicados em conjunto, esses módulos dão como resultados espectros de melhor qualidade, onde esses problemas podem ser facilmente resolvidos. Na figura 4.5 pode ser observado o caso da alanina, no espectro A, a média de constante de acoplamento foi estabelecida para 6,5 Hz e, no espectro B, foi adquirido o espectro sem ativar os filtros de AV e sim os filtros de ZQS e PR (Figura 4.5).

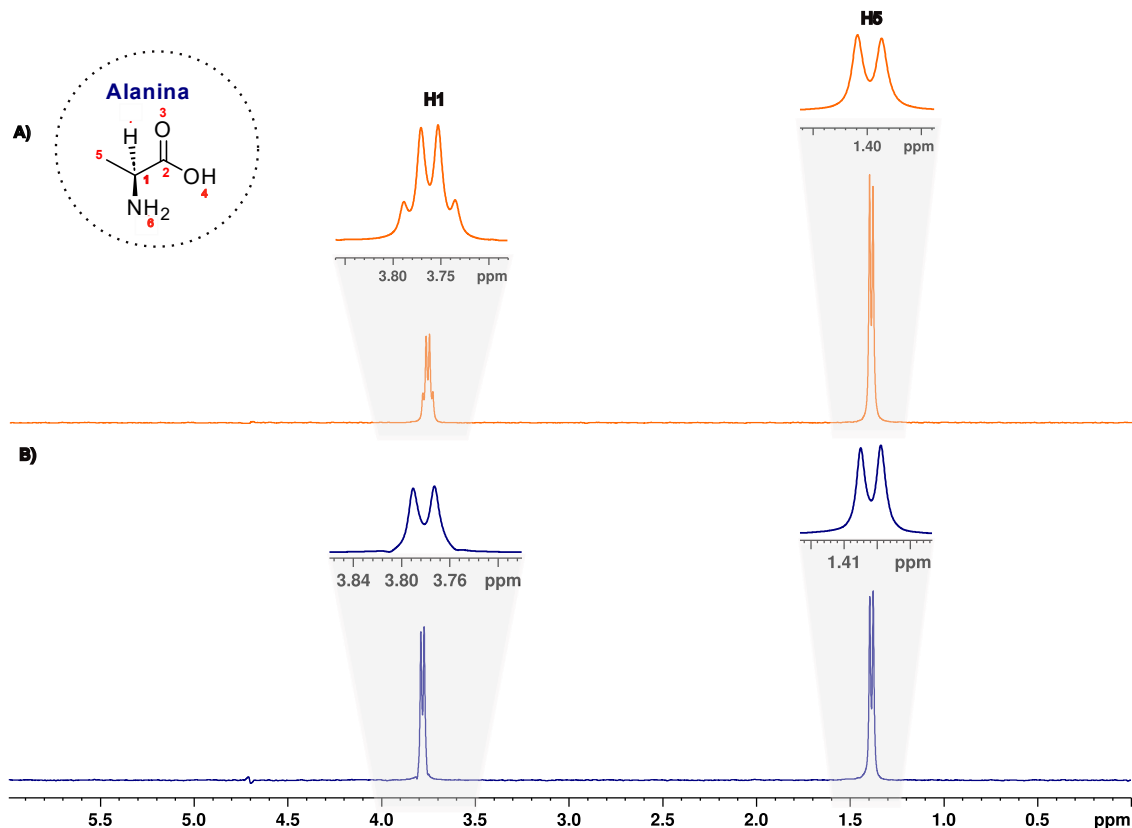


FIGURA 4.5. Ampliação do espectro de ¹H-DREAMTIME da alanina estabelecendo uma média de constante de acoplamento de 6,5 Hz (A) e sem a média da constante de acoplamento (B). Todos os espectros foram realizados em D₂O a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

Quando aplicado simultaneamente, os filtros de *mixing time* e a média da constante de acoplamento *J* é possível resolver problemas de fase dos sinais. Estabelecendo o melhor valor de constante de acoplamento em *J* e o valor de *mixing time* que faça com que todos os sinais estejam na mesma fase depois da aquisição do

espectro, sem ter que fazer uso de ferramentas de processamento espectral, é possível obter então um espectro tanto com a intensidade dos sinais quanto com a fase dos mesmos, otimizadas. Isto pode ser observado no caso da alanina, quando aplicado unicamente a média da constante de acoplamento em J. Assim, o sinal do CH correspondente ao H5 em 3,76 ppm resulta com problemas de fase, como observado nos espectros **B** e **D** da figura 4.6. Nesses casos foi variado o valor da constante de acoplamento de 6,5 e 7,5 Hz respectivamente. Porém, quando aplicado nos mesmos experimentos um valor de *mixing time* de 20 ms este problema de fase é claramente resolvido, obtendo-se espectros otimizados com todos seus sinais em fase e intensidade considerada boa (espectros **A** e **C**) (Figura 4.6).

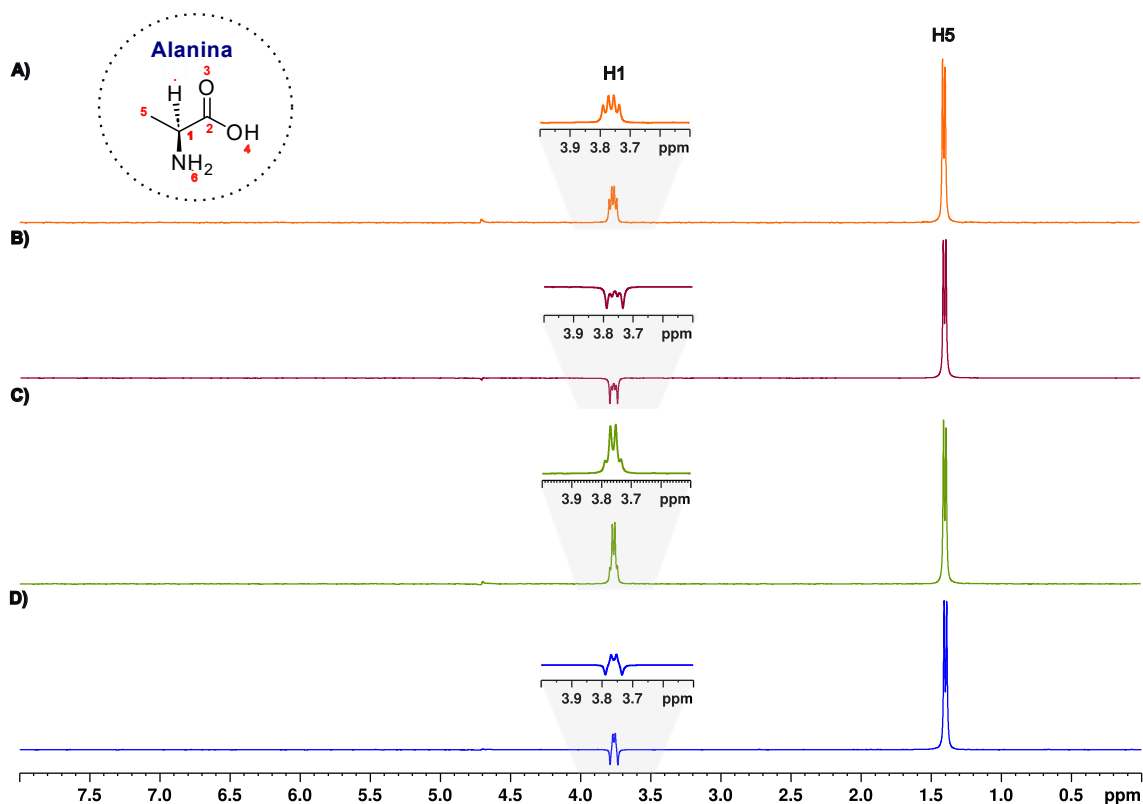


FIGURA 4.6. Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME da alanina estabelecendo a média de constante acoplamento (AV): **A**) AV de 7,5 Hz sem ativar o modulo de *mixing time*; **B**) AV de 7,5 Hz e *mixing time* de 20 ms; **C**) AV de 6,5 Hz sem ativar o modulo de

mixing time; **D**) AV de 6,5 Hz e *mixing time* de 20 ms. Todos os espectros foram realizados em D₂O a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

Como mencionado anteriormente, os spins selecionados - deslocamentos químicos dos hidrogênios - devem acoplar entre si para adquirir um espectro com os sinais correspondentes a todos os hidrogênios dos subsistemas da molécula analisada. A forma de onda deve ser desenhada com a maior quantidade de frequências (deslocamentos químicos) de cada subsistema da molécula selecionada para assim obter um espectro de ¹H seletivo para essa molécula. Quando a seleção inclui spins que não estão acoplados entre si, a magnetização não evolui de forma homogênea ao longo da molécula e, como consequência, o espectro de ¹H obtido não possui todos os sinais correspondentes a molécula analisada, e sim os sinais só do subsistema da molécula utilizado na formatação do pulso, de forma similar a um TOCSY 1D. Na figura 4.7 pode ser analisado o caso do aminoácido fenilalanina. No espectro A é observado o espectro correspondente a um experimento com um pulso desenhado incluindo todos os pares de spins da molécula e como resultado é obtido um espectro com todos os sinais da fenilalanina, tanto os hidrogênios H4-H6 quanto os hidrogênios H7 e H8. No caso dos espectros B até o espectro E, todos foram adquiridos desenhando um pulso, com os pares de spins do subsistema fenílico do aminoácido sem incluir o resto da cadeia ligada ao anel benzênico. Os espectros obtidos resultaram unicamente no aparecimento dos sinais do subsistema fenílico, mesmo variando em cada um deles os diferentes parâmetros de aquisição com o objetivo de manipular o sistema de spins o suficiente para “forçar” que o resto dos sinais aparecessem no espectro, porém o resultado foram espectros com os sinais correspondentes aos hidrogênios em 7,25 ppm do sistema fenílico da fenilalanina (únicos deslocamentos químicos utilizados no desenho do pulso) (Figura 4.7).

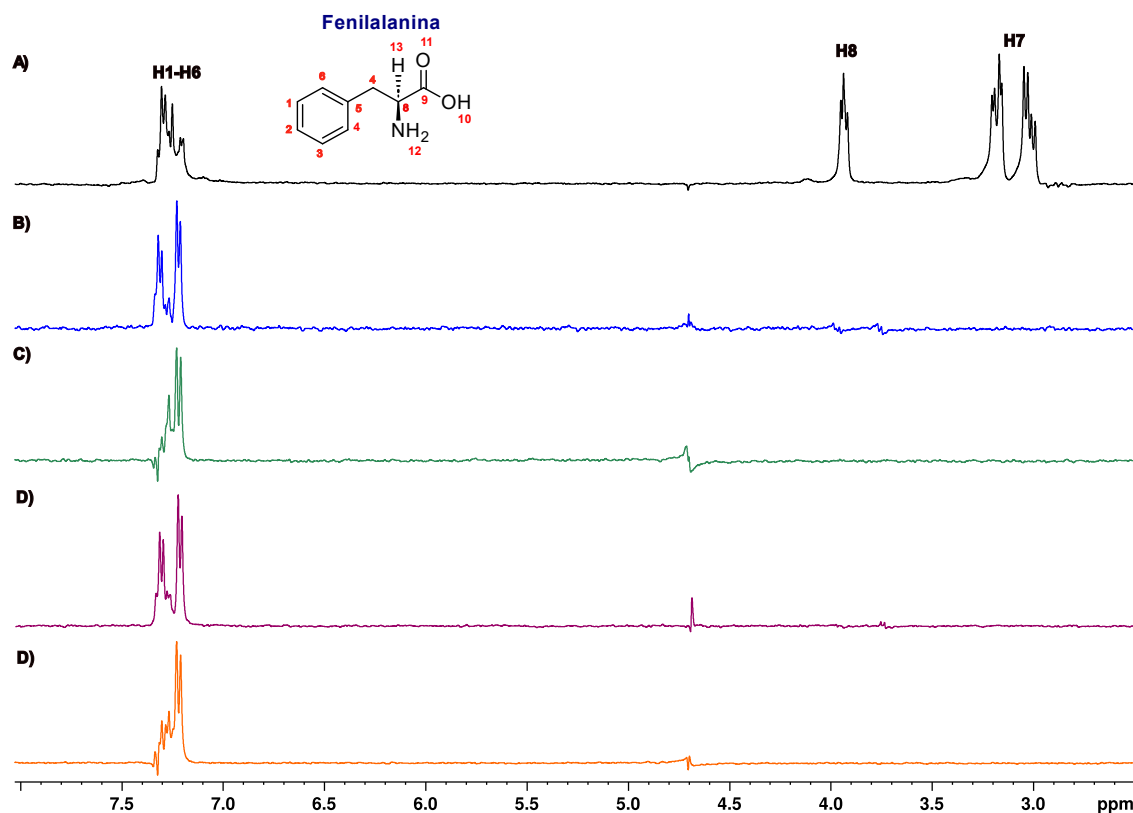


FIGURA 4.7. Seleção de um par de spins que não acoplam entre si da molécula de fenilalanina na mistura de composição conhecida variando os módulos de aquisição. Espectro de ^1H -DREAMTIME da fenilalanina selecionando todos seus pares de spins aplicando os módulos: **A)** ZQS, PR, TOCSY e AV e selecionando pares que não acoplam entre si: **B)** ZQS, PR e TOCSY; **C)** ZQS e PR; **D)** ZQS, PR, TOCSY e AV; **E)** ZQS, PR e AV. Todos os espectros foram realizados em D_2O a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Um exemplo interessante de analisar é o caso do ácido maleico, estruturalmente uma molécula que possui pares de spins acoplados entre si, porém que não é observada no espectro de ^1H -DREAMTIME. Dentro da mistura de composição conhecida utilizada para implementação da sequência foi adicionada uma quantidade desse ácido. No caso do ácido maleico existem um par de spins acoplados entre si, porém são hidrogênios equivalentes e trata-se de uma molécula simétrica o que leva a que o par de spins possua o mesmo deslocamento químico ($\delta = 6,62$ ppm) e cujo sinal

seja um único singlete e o fenômeno observado seja o mesmo que no caso do não existir acoplamento entre o par de spins da molécula alvo. Na tentativa de adquirir os espectros respectivos desse aminoácido, aplicando todos os módulos opcionais, no espectro final não eram observados os sinais correspondentes a esse ácido o que pode ser explicado a necessidade de ter acoplamentos nos spins vizinhos e assim também desenhar o pulso ajustando a sua potência respectiva (Figura 4.8).

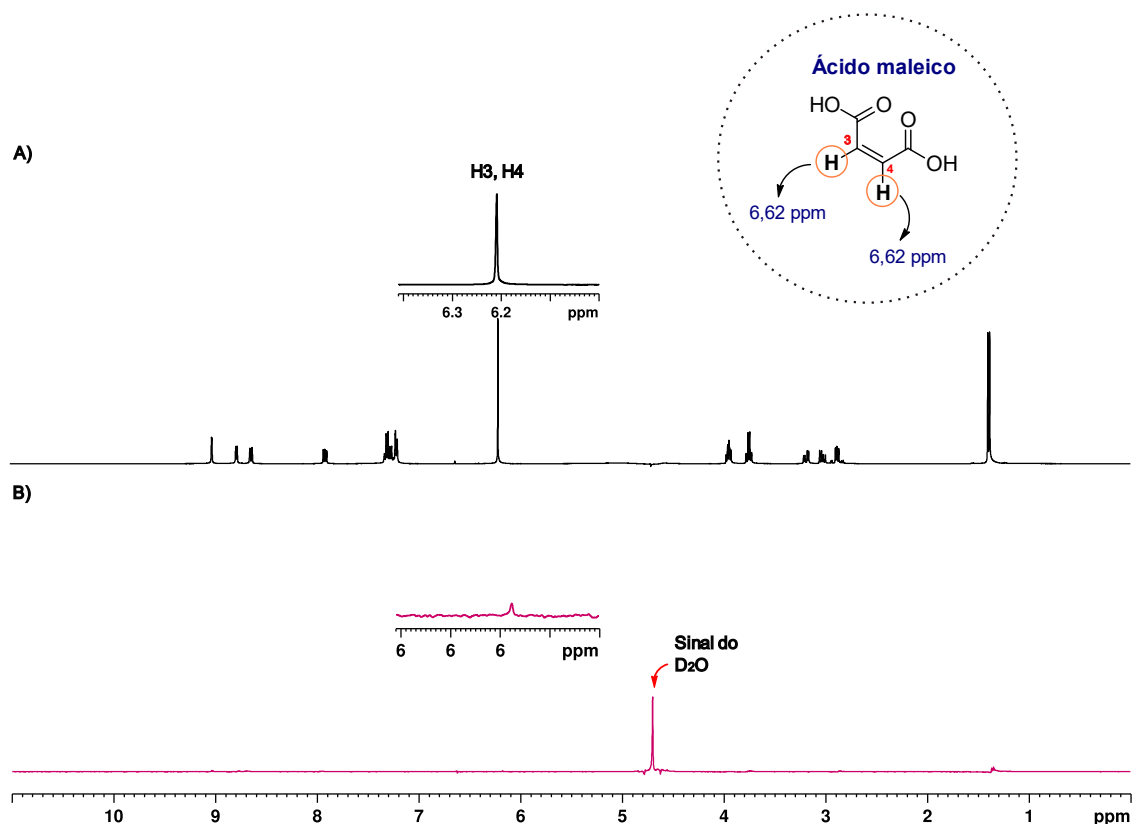


FIGURA 4.8. **A)** Espectro de ^1H convencional da mistura de composição conhecida; **B)** Espectro ^1H -DREAMTIME do ácido maleico Espectro foi realizado em D_2O a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Uma vez ajustados todos os parâmetros de aquisição: largura de pulso, média da constante de acoplamento em J e o valor de *mixing time* para cada uma das moléculas, e desenhando os pulsos incluindo os spins acoplados entre si de cada subsistemas das moléculas alvos, foi possível adquirir os seus espectros de ^1H

individuais utilizando a sequência de pulso DREAMTIME como é observado na figura 4.9.

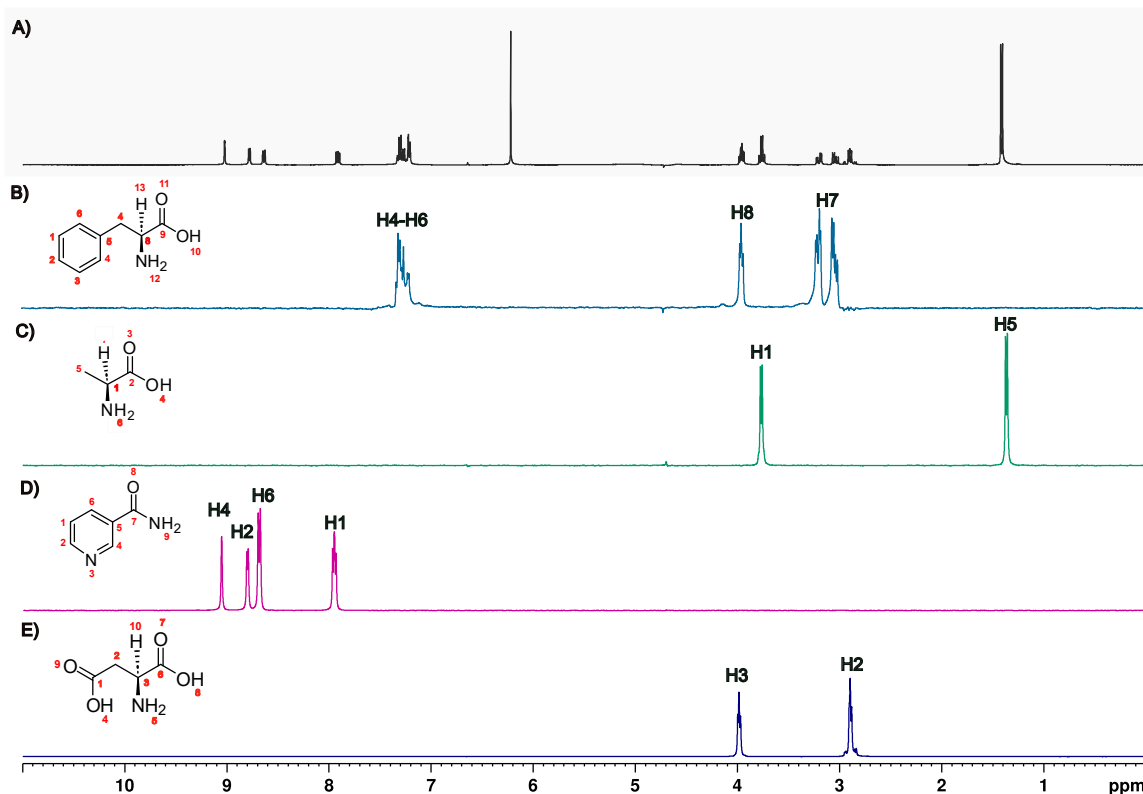


FIGURA 4.9. **A)** Espectro ^1H convencional da mistura de composição conhecida. Espectro de ^1H -DREAMTIME da(o): **B)** fenilalanina; **C)** alanina; **D)** nicotinamida; **E)** ácido aspártico. Todos os espectros foram realizados em D_2O a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

A sequência DREAMTIME permite realizar a seleção de moléculas alvo não somente de forma individual, mas também de forma simultânea. Para demonstrar isto, foram selecionados da mistura os compostos conhecidos: fenilalanina, alanina e ácido aspártico. Como foi observado nos experimentos anteriores, se for necessária uma seletividade maior então a largura de pulso deve ser ajustada em 40 ms. Essa largura vai permitir além de ser mais seletiva, melhorar a relação sinal/ruído e suprimir mais eficientemente o sinal da água. O pulso deve ser desenhado incluindo o maior número de pares de spins correspondentes a cada molécula e realizar uma média da constante

de acoplamento que abarque as constantes de acoplamento dos spins das moléculas alvo. O valor de *mixing time* (TOCSY) irá depender de cada molécula que será analisada; portanto, devem ser realizados vários espectros variando os valores de *mixing time* até ajusta-o e obter o melhor espectro, com todos os sinais em fase (Figura 4.10).

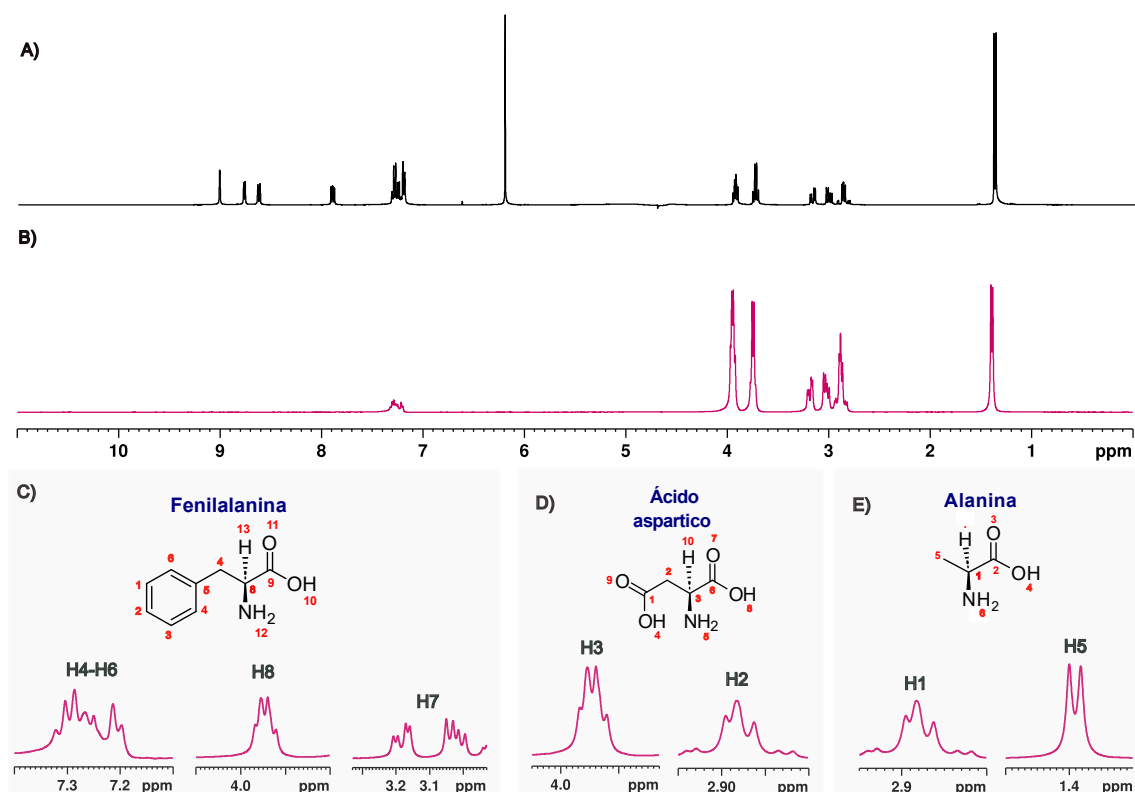


FIGURA 4.10. **A)** Espectro ¹H convencional da mistura de composição conhecida; **B)** Espectro de ¹H-DREAMTIME na seleção simultânea dos compostos: fenilalanina, alanina e ácido aspártico; **C)** Ampliação do espectro **B** de ¹H-DREAMTIME da fenilalanina; **D)** Ampliação do espectro **B** de ¹H-DREAMTIME do ácido aspártico; **E)** Ampliação do espectro **B** de ¹H-DREAMTIME alanina. Todos os espectros foram realizados em D₂O a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

Quando comparados os espectros obtidos com os filtros ativados e sem ativação dos filtros é observada uma diferença notável sobretudo nas propriedades de fase. Sem

o uso dos módulos, nítidos problemas de antifase dos sinais são observados assim como baixa intensidade dos mesmos (espectro A, figura 4.11). Quando aplicados todos os filtros incluindo a média da constante de acoplamento em J e o *mixing time* os problemas de antifase desaparecem (espectro B, figura 4.11). Porém, os sinais correspondentes ao H7 da fenilalanina têm suas intensidades consideravelmente reduzidas. Quando, além dos filtros de pressaturação e *zero quantum spoil*, é aplicado o filtro da constante de acoplamento (espectro C) ou o módulo *mixing time* (espectro D) são obtidos os melhores espectros, com intensidade e todos os seus sinais em fase (Figura 4.11).

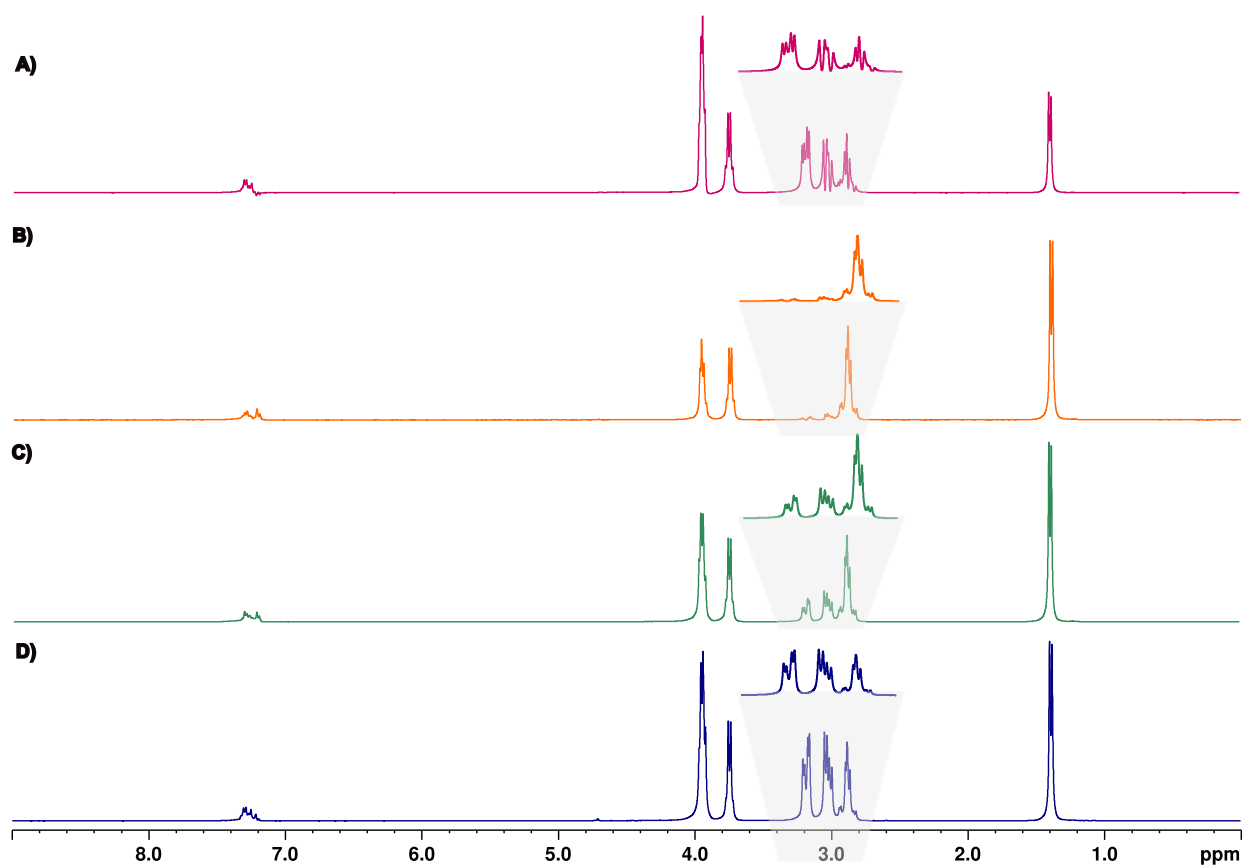


FIGURA 4.11. **A)** Ampliação do espectro de ¹H-DREAMTIME da fenilalanina, alanina e ácido aspártico sem ativar os filtros opcionais. Ativando os módulos: **A)** ZQS, PR, AV e TOCSY; **C)** ZQS, PR e AV; **D)** ZQS, PR e TOCSY. Todos os espectros foram realizados em D₂O a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

Na aquisição dos espectros de ^1H por DREAMTIME é necessário, para cada componente da mistura, ajustar-se os parâmetros e filtros opcionais. Para cada caso os parâmetros devem ser otimizados realizando um *screening* de experimentos variando tanto constantes de acoplamentos quanto valores de *mixing time* até conseguir os parâmetros ideais que proporcionem os melhores espectros correspondentes aos componentes das misturas analisadas. Considerando que a aplicação dos filtros permitirá aumentar a seletividade da técnica, resultando em espectros de ^1H semelhantes a espectros adquiridos por técnicas convencionais, porém sem a necessidade de separar os componentes da mistura a partir de técnicas físicas de separação.

4.2 CAPÍTULO II

4.2.1 DREAMTIME RMN aplicado à identificação dos produtos da degradação ácida e básica do sofosbuvir e tenofovir desoproxila em uma mistura.

Como mencionado, um dos objetivos deste trabalho foi o de identificar, por técnicas avançadas de RMN, os produtos de degradação em meio ácido e básico, tanto do sofosbuvir (SOF) quanto do fumarato de desoproxil tenofovir (TDF). Foram utilizadas as técnicas de RMN (COSY, TOCSY, HSQC e HMBC) sem realizar nenhum tipo de pré-tratamento físico na mistura de degradação. Uma vez identificados os produtos de degradação de ambas as misturas, foi utilizada a técnica DREAMTIME para realizar a separação espectral de cada um dos produtos de degradação de forma individual e simultânea. Também foi realizado um estudo de quantificação dos IFA's e dos produtos de degradação de cada um dos fármacos em ambas as condições (ácida e básica).

4.2.2.1 Estudo da degradação ácida e básica do sofosbuvir (SOF).

O sofosbuvir foi submetido a condições de degradação ácida e básica. Em ambas as condições foram gerados diferentes produtos de degradação. No caso da degradação ácida, foram identificados sete produtos (Esquema 4.1) e no caso da degradação básica foram identificados quatro produtos de degradação (Esquema 4.3). Após a análise das misturas respectivas, a partir da técnica de DREAMTIME, cada um desses produtos foi separado de forma espectral da sua mistura e foram adquiridos os seus espectros de RMN-¹H respectivos.

O SOF, na sua estrutura química, possui centros reativos que dependendo das condições de reação, seja ácida ou básica pode apresentar uma maior sensibilidade para degradar-se em outras moléculas (Figura 4.12). Sob condições ácidas, o SOF possui, estruturalmente, centros mais reativos e susceptíveis a sofrer protonação (Figura 4.12).

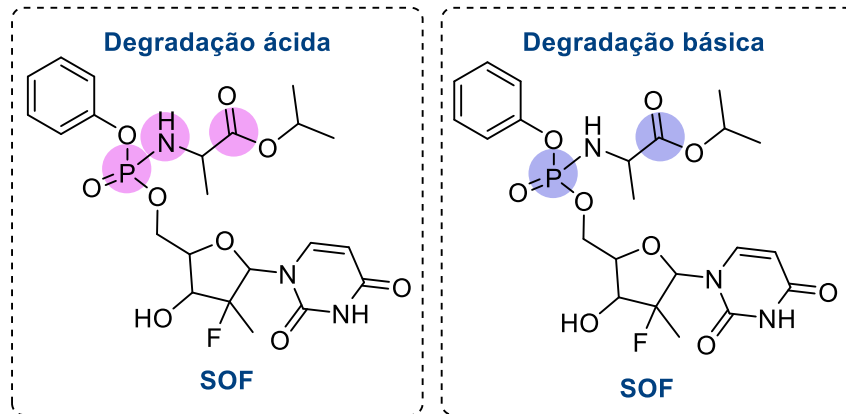
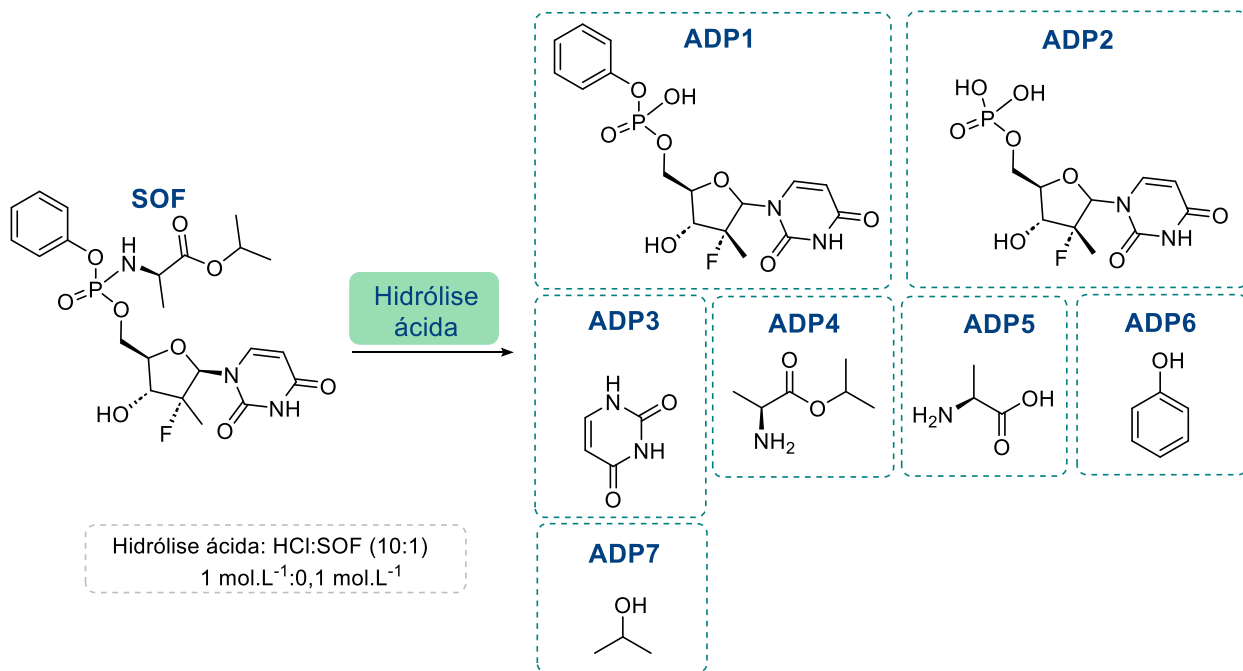


FIGURA 4.12. Centros reativos da molécula do SOF em meio ácido e meio básico.

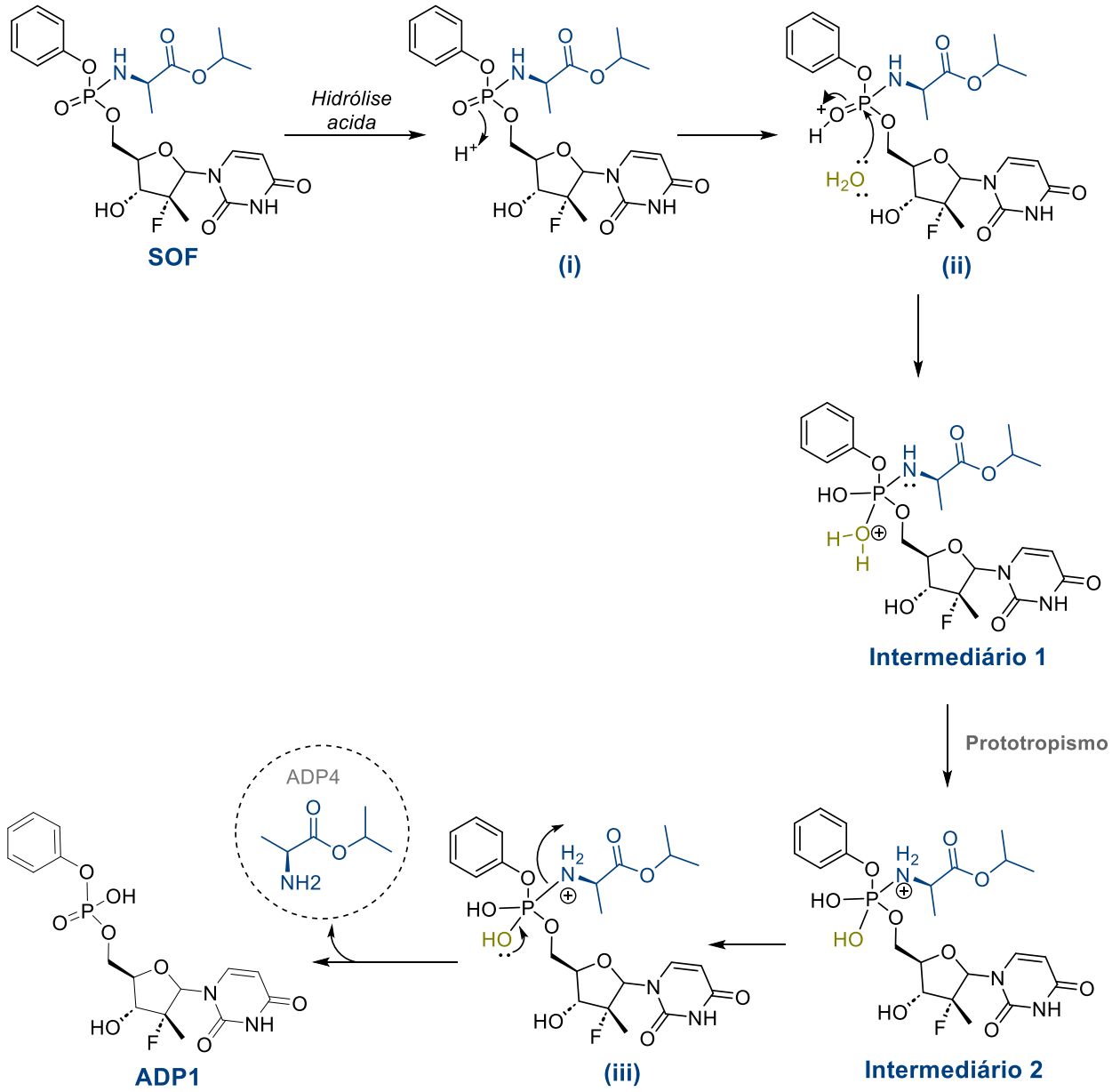
Em termos da degradação em meio ácido os grupos: fosfato, o alaninato e os grupos carboxílicos, representam os centros mais suscetíveis a sofrerem protonação, se tornando em grupos eletrofílicos, que podem sofrer hidrólise na presença de um meio ácido aquoso. Já no caso da degradação sob condições básicas o grupo fosfato e a carboxila podem sofrer ataque nucleofílico por parte da base (OH^-) e conseqüentemente sofrer degradação, levando a formação de outros produtos no meio reacional (Esquema 4.1) (SWAIN et al., 2015).



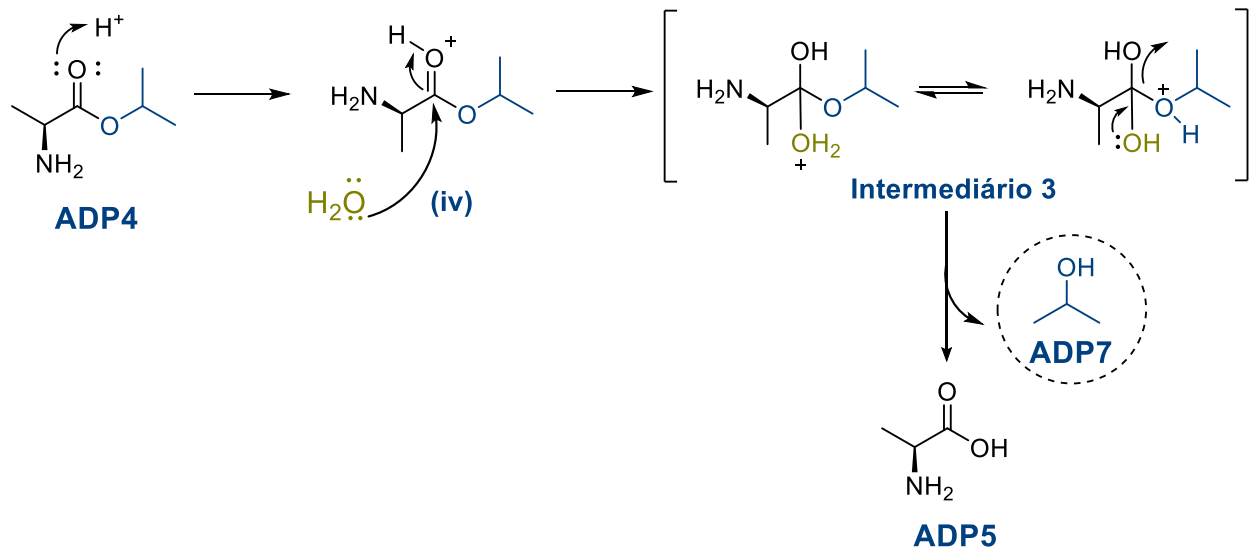
ESQUEMA 4.1. Produtos de degradação do sofosbuvir sob condições ácidas.

O mecanismo da reação de degradação em meio ácido e básico encontra-se descrito na literatura, um destes trabalhos corresponde a uma pesquisa realizada pelos pesquisadores Swain e colaboradores (SWAIN et al., 2015), que descrevem este mecanismo iniciando em uma hidrólise ácida do grupo fenil fosforamidato, transformando-o em fenil monohidrogenofosfato (i). Uma vez hidrolisado, este grupo fenil monohidrogenofosfato pode sofrer um ataque nucleofílico por parte de uma molécula de água (ii) gerando o intermediário 1. Este intermediário 1 após sofrer uma reação de prototropismo ou transferência de hidrogênio (intermediário 2) promove a liberação do grupo alaninato isopropílico ou ADP4 (iii), etapa que permite a formação do produto de degradação ADP1. Na etapa 2, o ADP4 liberado, que continua em meio ácido, sofre hidrólise e um ataque nucleofílico por parte de uma molécula de água (iv). Neste ponto, ocorre novamente uma reação de prototropismo (intermediário 3) permitindo a liberação do grupo isopropílico ADP7 e formação do produto de degradação ADP5. Na etapa 3, o grupo fenil fosforamidato do ADP1, após hidrólise ácida sofre ataque nucleofílico por parte de uma molécula de água (v) o que leva a uma transferência de prótons intramolecular (intermediários 4) liberando uma molécula de fenol (ADP6) e gerando ADP2 como produto de degradação (Esquema 4.2) (SWAIN et al., 2015).

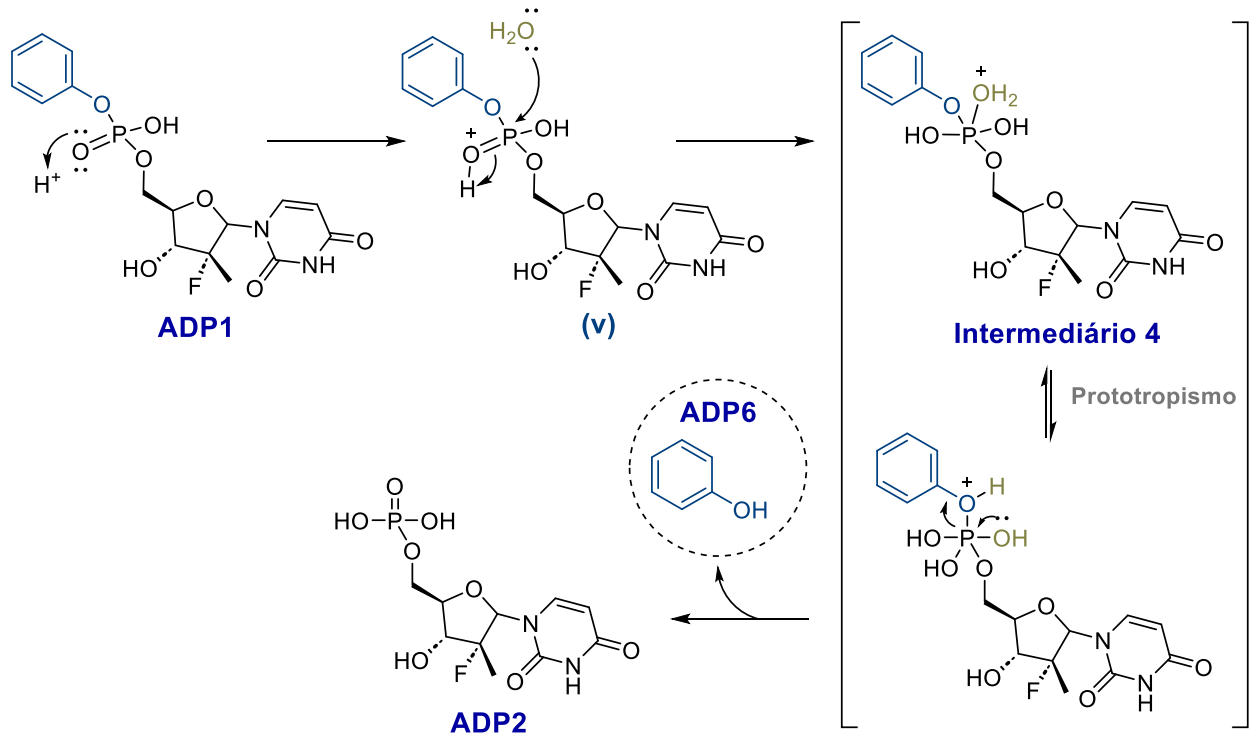
Etapa 1: Degradação do SOF nos produtos ADP4 e ADP1



Etapa 2: Degradação do ADP4 nos produtos ADP7 e ADP5

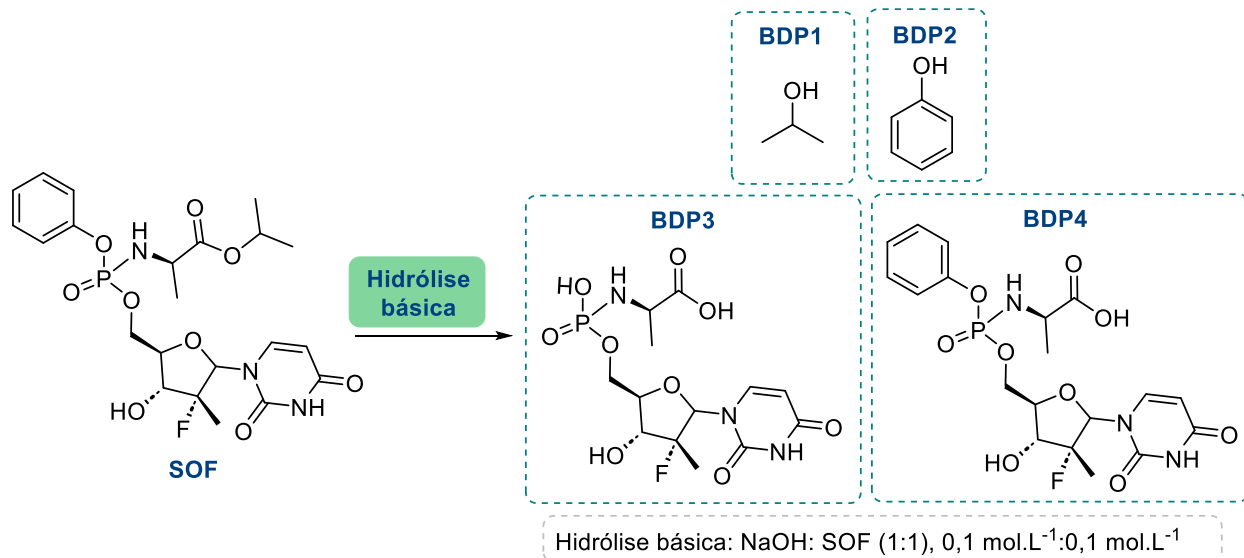


Etapa 3: Degradação do ADP1 nos produtos ADP6 e ADP2



ESQUEMA 4.2. Proposta da rota de degradação do sofosbuvir sob condições ácidas.

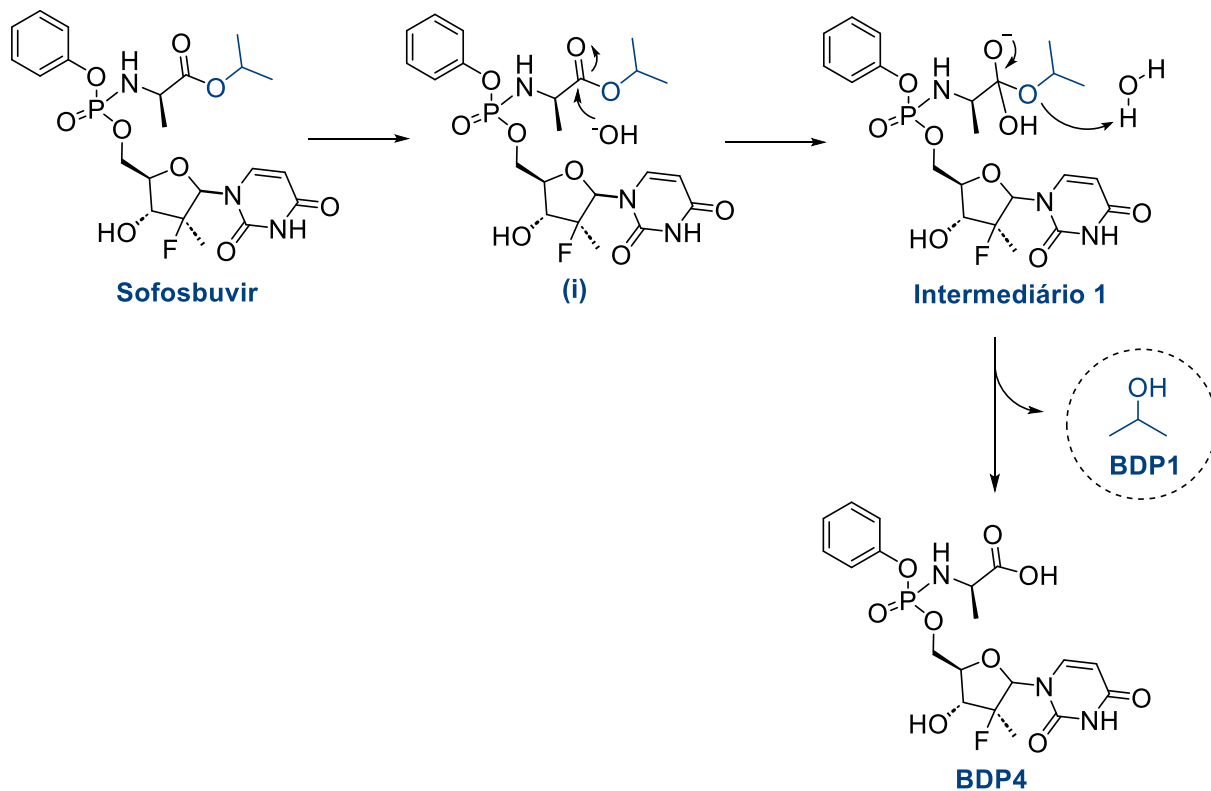
A degradação sob condições básicas, foi utilizado o NaOH como base, gerando quatro produtos de degradação (BDP1, BDP2, BDP3 e BDP4), que forma identificados por técnicas de RMN 1D e 2D (Esquema 4.3).



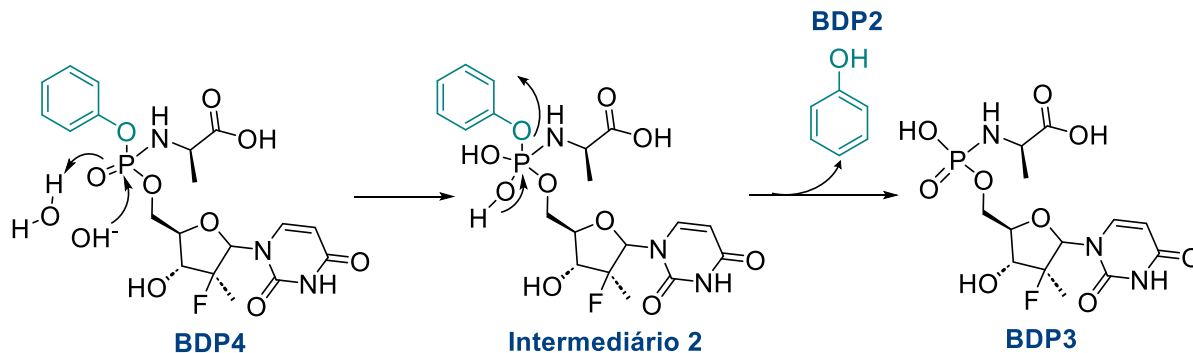
ESQUEMA 4.3. Produtos de degradação do sofosbuvir sob condições ácidas.

Em médio básico o grupo carboxila do éster experimenta hidrólise básica, promovendo assim um ataque nucleofílico por parte da base (i), causando a ruptura da ligação do éster e formando desta forma o íon carboxilato (intermediário 1) onde é liberada uma molécula de isopropanol como produto de degradação BDP1 e formado o produto BDP4. Nesta reação o OH^- atua como nucleófilo atacando o carbono do grupo carboxila do éster. Na etapa 2, o grupo fosforamidato em médio básico aquoso sofre hidrólise básica, o grupo OH^- atua como nucleófilo, atacando o grupo fosfato promovendo a quebra das ligações $\text{P}=\text{O}$ (intermediário 2) e desta forma promove a liberação de uma molécula de fenol como produto de degradação BDP2, gerando finalmente o BDP3 (Esquema 4.4) (SWAIN et al., 2015).

Etapa 1: Degradação do SOF nos produtos BDP1 e BDP4



Etapa 2: Degradação do BDP4 nos produtos BDP2 e BDP3



ESQUEMA 4.4. Proposta da rota de degradação do sofosbuvir sob condições básicas

4.2.1.2 Identificação dos produtos de degradação a partir das técnicas de 2D RMN

Como discutido anteriormente, sob condições ácidas, foram identificados sete produtos de degradação (ADP1-ADP7) (Esquema 4.1). Sob condições básicas, o SOF

resultou em quatro produtos de degradação (BDP1-BDP4) (Esquema 4.3). Cada produto de degradação sob condições ácidas e básicas foi identificado através da análise de experimentos de RMN 1D (espectro de RMN-¹H convencional) e 2D (*g*TOCSY, *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC). Os experimentos *g*COSY, *g*TOCSY, *g*HMBC e *g*HSQC permitiram a identificação dos produtos ADP3-ADP7 e BDP1-BDP2. Apesar da sobreposição observada em regiões entre 3,57 e 4,34 ppm, esses mesmos experimentos permitiram identificar produtos com estrutura mais complexa como ADP1, ADP2 e BDP4 e BDP3. Todos os produtos de degradação ácidos e básicos (ADP1-ADP7, BDP1-BDP4) identificados neste trabalho estão de acordo com os resultados relatados na literatura (SWAIN et al., 2015).

A partir do mapa de contorno *g*HMBC e *g*HSQC foi possível identificar e atribuir os produtos ADP1, ADP2 e ADP3. No mapa de contorno *g*HMBC (Figura 4.13), observamos a correlação do duplete em δ_H 7,92 ppm ($J = 8,21$ Hz), com seus carbonos vizinhos C22 (δ_C 150,8 ppm), C26 (δ_C 140,4 ppm), C25 (δ_C 163,2 ppm) e C16 (δ_C 88,9 ppm). Nesta região é possível observar a presença de mais de uma espécie com carbonos que possuem ambientes químicos semelhantes correspondentes aos dois produtos ADP1 e ADP2. Por outro lado, o duplete em δ_H 7,62 ppm ($J = 8,21$ Hz) apresentou correlação com seus carbonos vizinhos C22, C26 e C25 sem apresentar correlação com C14, atribuindo assim este sinal ao composto de degradação ADP3 e o duplete em δ_H 7,92 ppm aos compostos ADP1 e ADP2. No caso do produto de degradação ADP3, a partir do mapa de contorno do *g*TOCSY assim como do *g*COSY foram estabelecidas as correlações entre os hidrogênios H25 e H26 (Figura 4 e 5, Anexos). Por outro lado, o mapa de contorno do *g*HMBC permitiu estabelecer que o duplete em δ_H 7,62 ppm ($J = 8,21$ Hz) corresponde ao hidrogênio H26. Sendo observado também que o duplete em δ_H 7,62 ppm mostra correlação com os carbonos em δ_C 102,7 ppm (C26), δ_C 150,7 ppm (C22) e δ_C 163,4 ppm (C25) menos com o carbono C16 em δ_C 88,4 ppm (Figura 4.13).

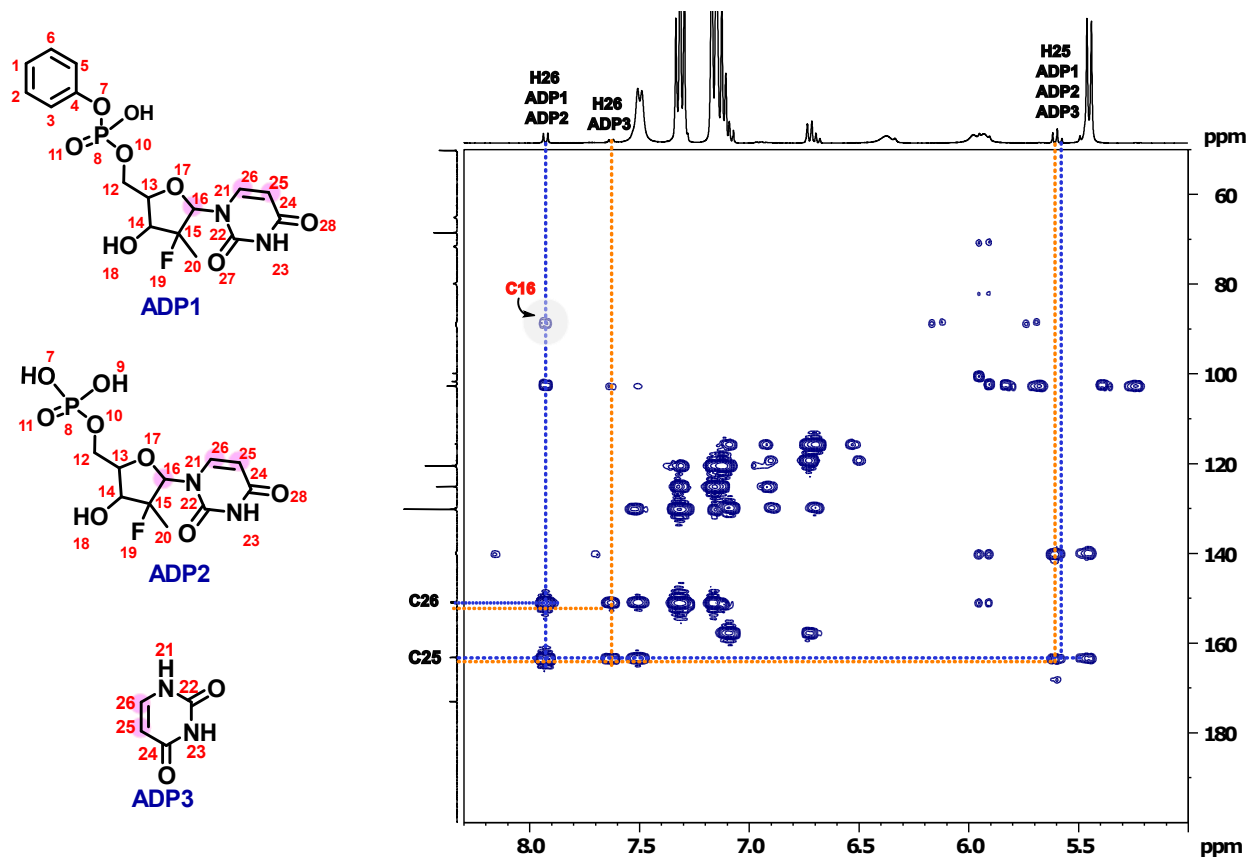


FIGURA 4.13. Expansão do mapa de contorno do gHMBC com ênfase nos sinais correspondentes aos hidrogênios H26 dos produtos de degradação ADP1, ADP2 e ADP3 da mistura ácida do SOF. Espectro realizado em DMSO-d6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Os compostos de degradação ADP4 e ADP5 foram identificados a partir dos sinais correspondentes ao carbono C30. No mapa de contorno gHMBC, no ADP4, o sinal H34 mostra correlação com o grupo carbonila C30 a δ_c 169,0 ppm, que por sua vez mostra correlação com H29 e os grupos metil H32, H35 e H36 (Figura 4.24). No caso do ADP5, o sinal H29 apresenta correlação apenas com o grupo metila a 1,35 ppm correspondente a H32 e a respectiva carbonila a δ_c 171,9 ppm. A partir do mapa de contorno do gCOSY e do gTOCSY foi estabelecida a correlação entre o hidrogênio H29 com o grupo metila H32 em ambos os produtos ADP4 (H29 em δ_H 3,89 ppm e H32 em δ_H 1,34 ppm) e ADP5 (H29 em δ_H 3,84 e H32 δ_H 1,36 ppm) (Figura 6, Anexos).

No caso do composto ADP6, a partir do seu mapa de contorno do *g*COSY e *g*TOCSY, os sinais correspondentes aos hidrogênios das posições *orto* (H3, H5) e *para* (H1) permitiram sua identificação e sinalização em δ_H 6,69 e 6,71 ppm respectivamente. O sinal de δ_H 7,07 ppm corresponde então aos hidrogênios das posições *meta* (H2, H6). O mapa de contorno do *g*HMBC permitiu assinalar os deslocamentos químicos correspondentes aos hidrogênios do ADP6 (Figura 4.14) mesmo existindo sobreposição dos sinais do SOF, ADP1 e ADP2.

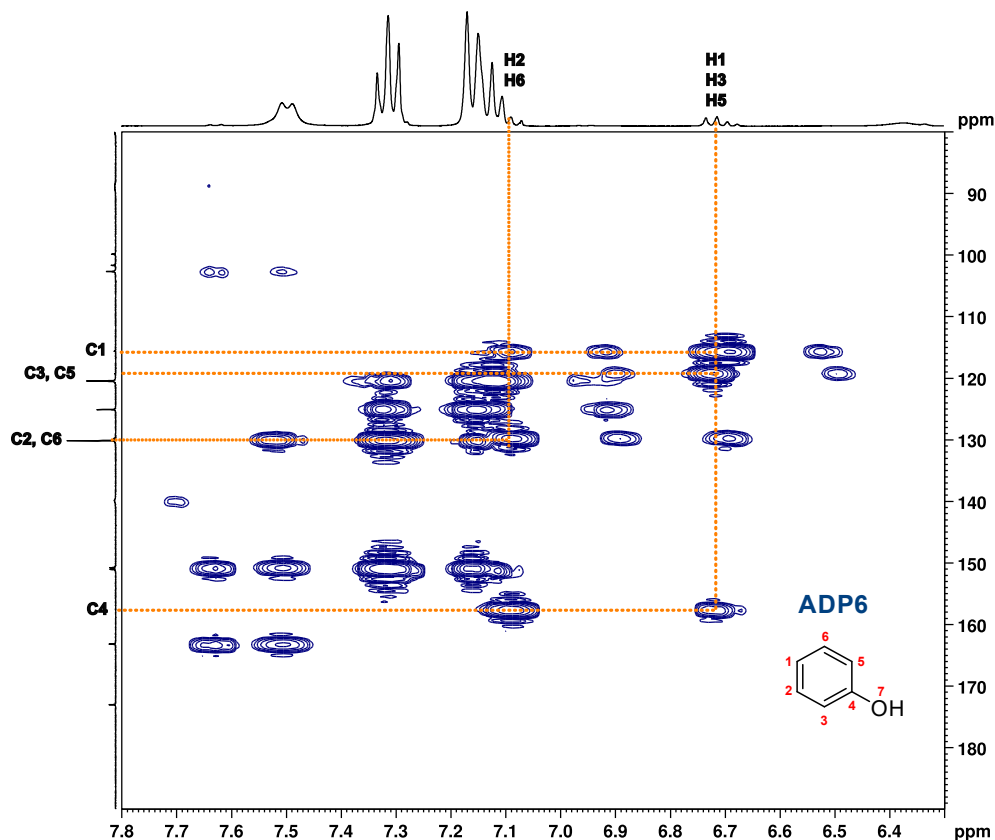


FIGURA 4.14. Expansão do mapa de contorno do *g*HMBC com ênfase nos sinais correspondentes ao produto de degradação ADP6 da mistura ácida do SOF. Espectro realizado em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

O produto de degradação ADP7 foi identificado a partir dos estudos de COSY, *g*TOCSY e *g*HSQC. A partir do mapa de contorno do *g*COSY e *g*TOCSY foi estabelecida

a correlação entre os grupos metilas H35 e H36 com o hidrogênio H34 correspondente ao grupo CH do isopropanol (Figura 7 e 8, Anexos). O mapa de contorno do *g*HSQC permitiu assinalar o C34 em δ_c 63,1 ppm e os carbonos correspondentes aos grupos metilas em δ_c 25,5 ppm (Figura 9, Anexos).

No caso dos produtos de degradação básica BDP1 e BDP2, os mapas de contorno do *g*COSY respectivos (Figura 4.15 e 4.16) permitiram estabelecer as correlações correspondentes a cada um dos deslocamentos químicos destes produtos. No caso do BDP1 foi estabelecida a correlação entre o hidrogênio H35, H36 em δ_H 1,03 ppm com H34 em δ_H 3,69 ppm (Figura 4.15). Por outro lado, no BDP2 foi estabelecida a correlação entre os hidrogênios H3, H5 (*orto*), H1 (*para*) com H2 e H6 (*meta*) (Figura 4.16). Os mapas de contorno tanto do *g*HMBC quanto do *g*HSQC permitiram estabelecer as correlações dos sinais de hidrogênio com seus respectivos carbonos não só dos produtos de degradação BDP1 e BDP2 mas também dos produtos de degradação BDP3 e BDP4 (Figura 16 e 17, Anexos)

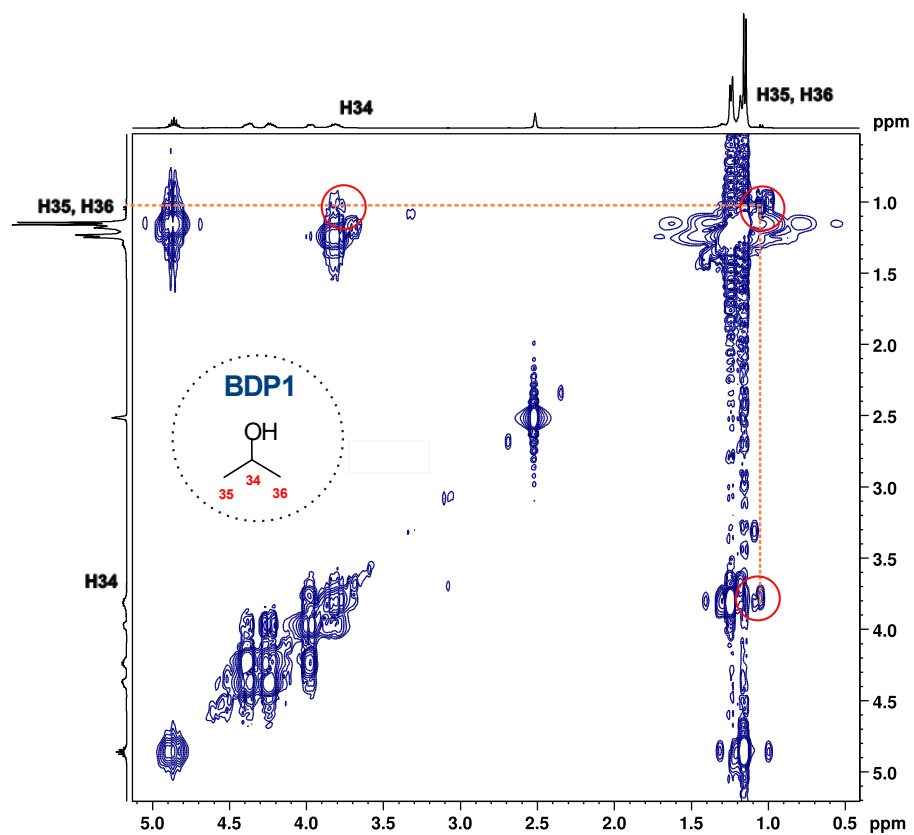


FIGURA 4.15. Expansão do mapa de contorno do g COSY com ênfase nos sinais correspondentes ao produto de degradação BDP1 da mistura básica do SOF. Espectro realizado em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

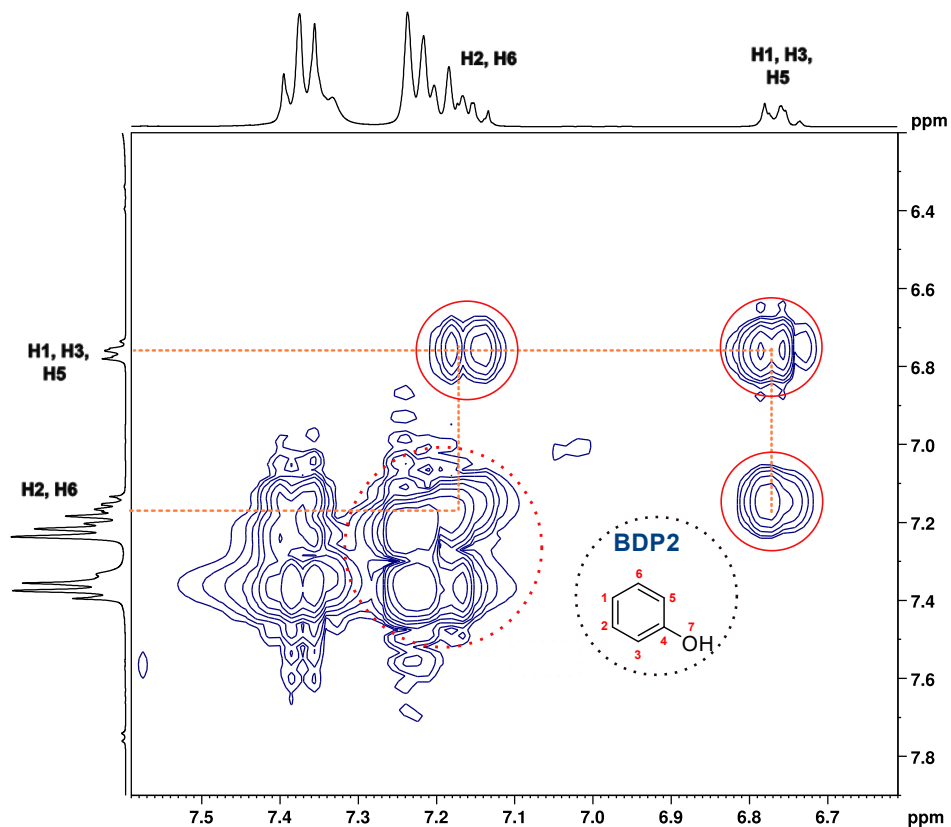


FIGURA 4.16. Expansão do mapa de contorno do g COSY com ênfase nos sinais correspondentes ao produto de degradação BDP2 da mistura básica do SOF. Espectro realizado em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

A partir de resultados observados na literatura (VILELA 2024) de experimentos de difusão (DOSY) do núcleo de fósforo, foi confirmada a formação e presença dos produtos de degradação isopropanol e fenol na mistura ácida e básica do sofosbuvir assim como também a formação do fenol como produto de degradação gerado de forma livre na mistura ácida e básica do TDF. Produtos que foram então observados nas misturas de degradação analisadas no presente trabalho, corroborando a sua presença a partir da sua identificação a través dos experimentos 1D e 2D de RMN. Identificação que foi comparada com os resultados reportadas por VILELA 2024.

4.2.1.3 DREAMTIME: Seleção de cada um dos produtos de degradação ácida e básica do sofosbuvir

Uma vez identificados os produtos de degradação das misturas de degradação a partir experimentos de RMN 2D foi aplicada a técnica de DREAMTIME na separação espectral destes produtos sob condições tanto ácida quanto básica do fármaco sofosbuvir. A Figura 4.17 mostra o espectro de RMN-¹H convencional do sofosbuvir (Espectro C, Figura 4.17) sem degradar vs os espectros da mistura ácida (Espectro A, Figura 4.17) e básica (Espectro B, Figura 4.17) do fármaco.

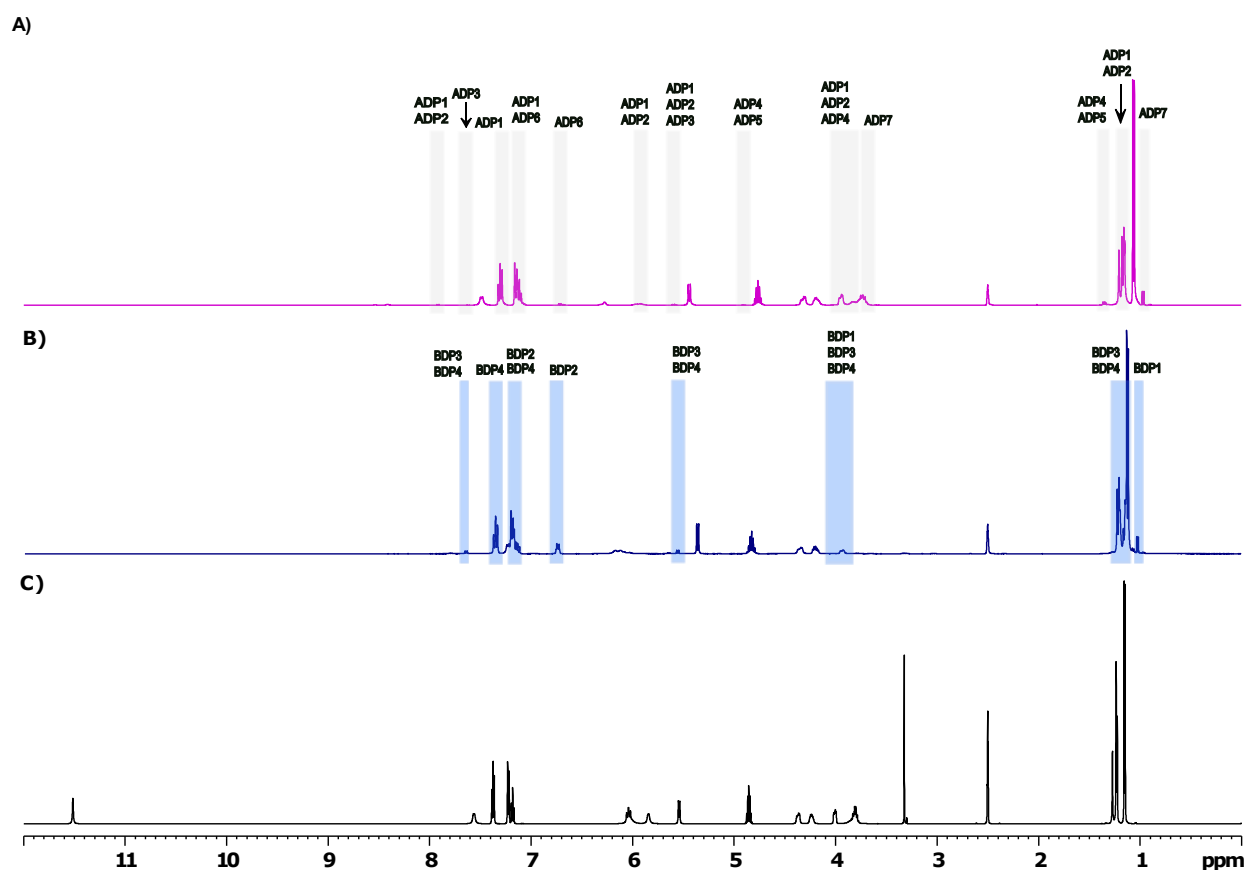


FIGURA 4.17. Espectros de RMN-¹H (400 MHz), em DMSO-d₆ e 298K, obtidos para a mistura de degradação ácida (A), básica (B) e sofosbuvir sem degradar (C). Todos os espectros foram realizados em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

Cada produto de degradação ácida e básica foi individualmente selecionado e identificado dentro das suas misturas de degradação aplicando a técnica de DREAMTIME. A maior parte dos sinais dos produtos de degradação encontra-se sobrepostos com os sinais do sofobuvir sem degradar, porém, aplicando a DREAMTIME foi possível recuperar/ separar seletivamente cada produto da sua mistura de reação sem a necessidade de realizar algum tipo de separação física.

Para a aquisição dos espectros seletivos, os parâmetros de tempo de pulso (10-40 ms) e os filtros opcionais (*zero quantum spoil*, pressaturação, média da constante de acoplamento J, *mixing time*) foram ajustados. Observou-se que uma largura de pulso de 40 ms e uma média da constante de acoplamento de 7 Hz forneceram os melhores resultados em termos de seletividade e intensidade dos sinais.

O ajuste dos parâmetros de aquisição se inicia com a seleção de um tempo de pulso. Este tempo de pulso seletivo foi estabelecido da mesma forma que na amostra de composição conhecida resultando na faixa entre 10-40 ms. No caso da mistura de degradação do sofobuvir, tanto ácida quanto básica, a maior parte dos produtos de degradação foram ajustados no tempo de pulso de 40 ms. Mesmo nas moléculas menores foi necessário o uso de 40 ms de largura de pulso, devido, provavelmente, à complexidade da amostra e o meio reacional de cada uma (Figura 4.18).

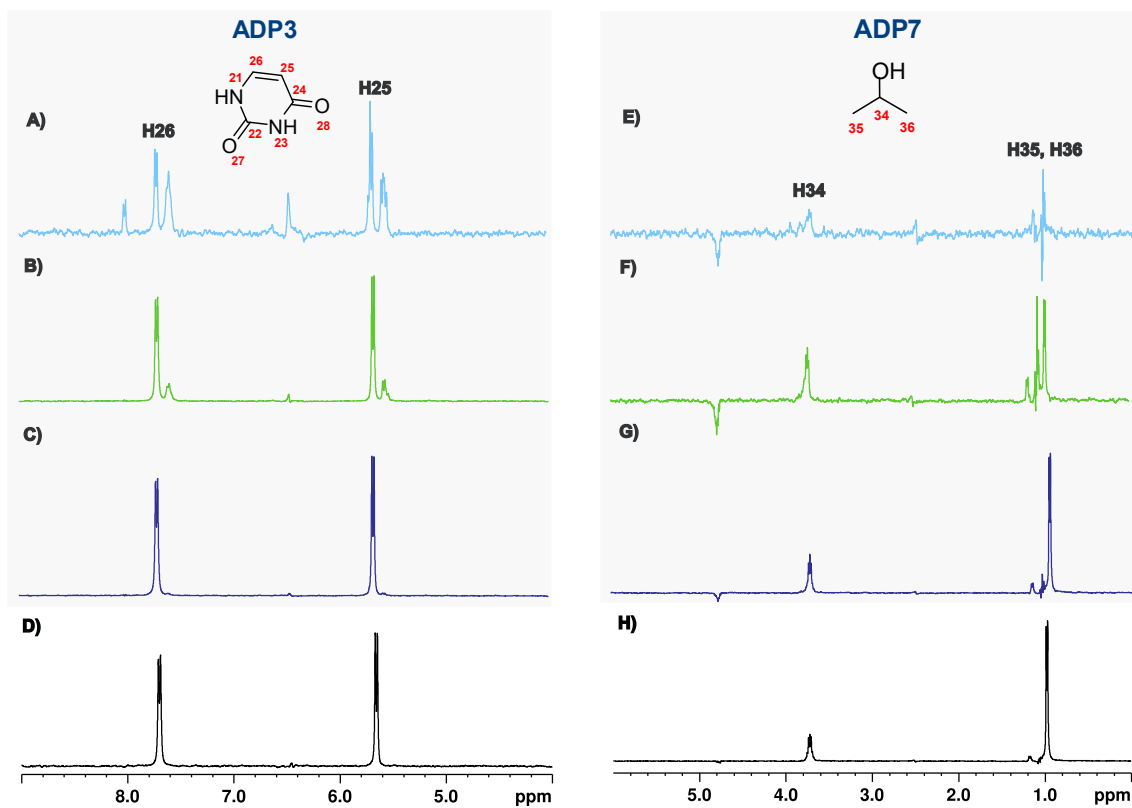


FIGURA 4.18. Espectros de ^1H -DREAMTIME dos produtos de degradação ADP3 e ADP7 variando os tempos de pulso. **A** e **E**) Tempo de pulso: 10 ms; **B** e **F**) Tempo de pulso: 20 ms; **C** e **G**) Tempo de pulso: 30 ms; **D** e **H**) Tempo de pulso: 40 ms. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Conseqüentemente, uma vez ajustados os tempos de pulso de uma forma seletiva, a separação espectral seletiva de cada produto de degradação por DREAMTIME é alcançada pela aplicação dos filtros opcionais discutidos anteriormente; os quais permitem selecionar um par de spin acoplado em J da molécula de interesse, permitindo a detecção do sistema de spin completo. Certos pontos importantes devem ser levados em consideração ao selecionar as moléculas desejadas, tais como seu sistema de spin acoplado em J, onde ambos seus sinais ressonam nas frequências selecionadas pela forma de onda modulada em amplitude e fase, os spins devem ter acoplamento entre si, e a constante de acoplamento selecionada deve corresponder aproximadamente à da molécula de interesse. Para aumentar a seletividade na seleção

dos produtos de degradação, é necessário selecionar múltiplos subsistemas dentro de uma mesma molécula, selecionando assim o maior número de frequências correspondentes a cada região da molécula, o que permite a criação de formas de onda moduladas em fase que incluem cada um desses subsistemas. Quando são selecionadas frequências que correspondem a subsistemas isolados que não possuem hidrogênios acoplados, a molécula em si não é recuperada e apenas o subsistema da molécula que corresponde aos deslocamentos químicos aplicados é observado conforme mostrado na Figura 4.19.

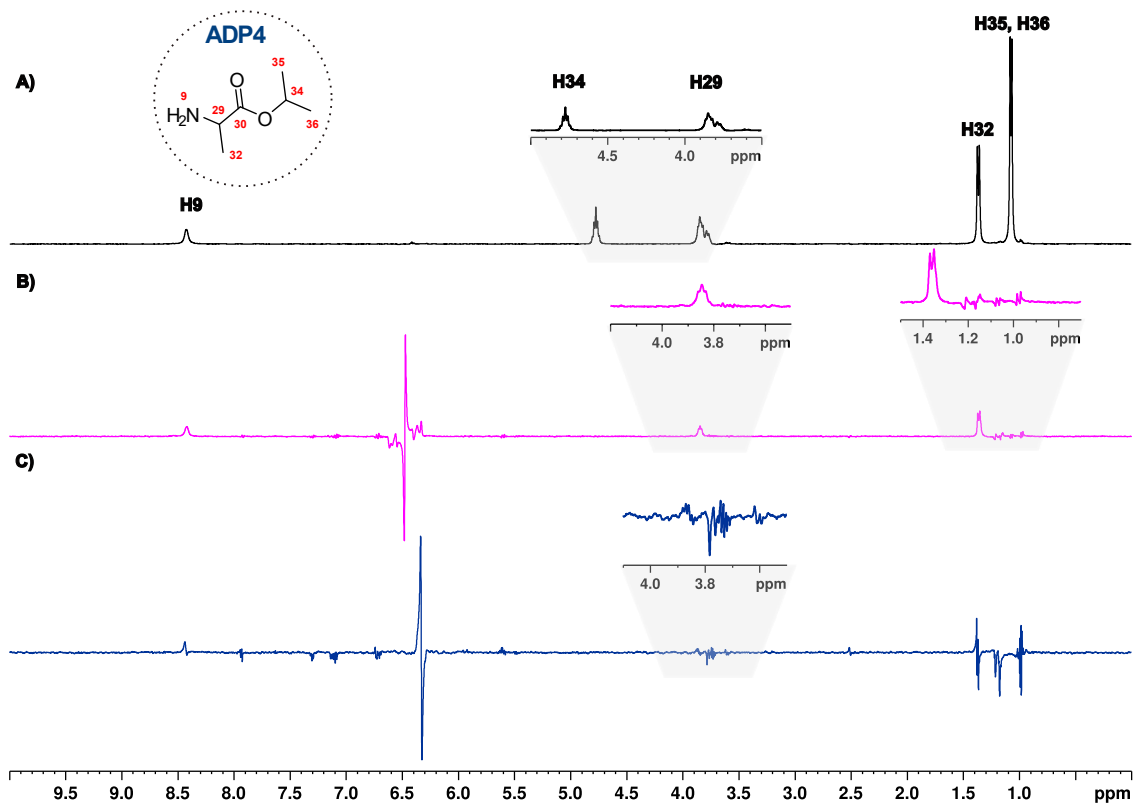


FIGURA 4.19. Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação ADP4: **A)** Selecionando os spins acoplados entre si de todos os subsistemas da molécula. **B)** Incluindo unicamente o subsistema dos núcleos H29 e H32. **C)** Selecionando spin que não acoplam entre si. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

A falta de acoplamento entre os spins se reflete no espectro final das moléculas de interesse, observando-se a falta dos sinais dos spins em estudo. Como exemplo, os produtos de degradação ADP1 e ADP2 onde o sinal correspondente ao hidrogênio H16, não é observado em nenhum dos seus espectros ^1H -DREAMTIME, o que se justifica pelo fato da falta de acoplamento entre H16 com nenhum hidrogênio, portanto, a molécula não possui um par de spin que passe através dos filtros quânticos e que se observe no espectro final (Figura 4.20).

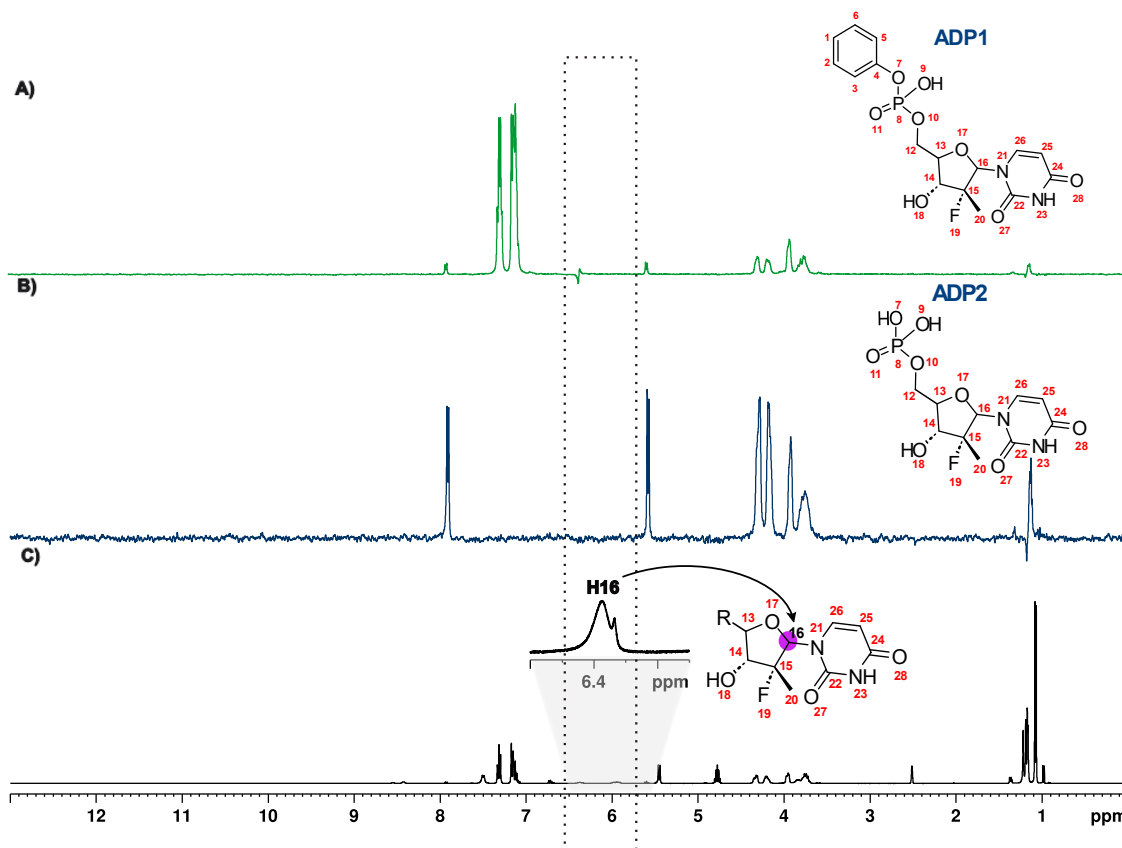


FIGURA 4.20. Espectro de ^1H -DREAMTIME dos produtos de degradação ADP1 e ADP2 do SOF com ausência do sinal correspondente ao H14. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Uma vez que são selecionados todos os spins acoplados entre si, passam a ser ajustados tanto as propriedades de fase quanto a intensidade dos sinais. Estas propriedades podem ser manipuladas e ajustadas aplicando os filtros *mixing time* e a média da constante de acoplamento em J. Ambos os filtros, quando aplicados

simultaneamente ou de forma individual, levam à aquisição de espectros limpos com alta resolução e seletividade. Os valores de *mixing time* devem ser ajustados para cada molécula, assim como a média da constante de acoplamento, a qual deve incluir os valores de constantes de acoplamento dos spins de cada subsistema selecionado da molécula de interesse (Figura 4.21). Aplicar a média da constante de acoplamento melhora o cancelamento de fundo quando o objetivo é selecionar uma única molécula, e a sensibilidade da técnica.

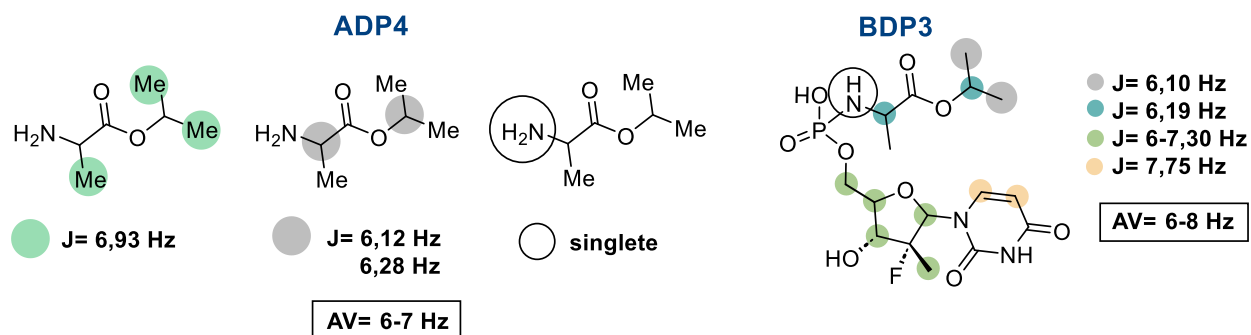


FIGURA 4.21. Média das constantes de acoplamento dos spins correspondentes a cada subsistema dos produtos de degradação ADP4 e BDP3.

Por tanto, ajustando cada um desses filtros, *mixing time* e a média da constante de acoplamento em J, incluindo também os filtros de pressaturação do sinal da H₂O e o *zero quantum spoil*, é possível adquirir espectros altamente seletivos, inclusive com multiplicidades semelhantes ao espectro de RMN-¹H convencional. Quando é necessária a extração máxima de sinais de uma molécula e, ao mesmo tempo, existem problemas das propriedades de fase, deve ser aplicado o filtro de *zero quantum spoil* em conjunto com o filtro do *mixing time*, o qual, ao transferir a magnetização ao redor de todo o sistema de spins da molécula de interesse, é obtido como resultado um espectro de RMN-¹H convencional (semelhante ao espectro *g*TOCSY convencional) da molécula individual, em que é observado todos os spins acoplados aos pares de hidrogênio selecionados (Figura 4.22).

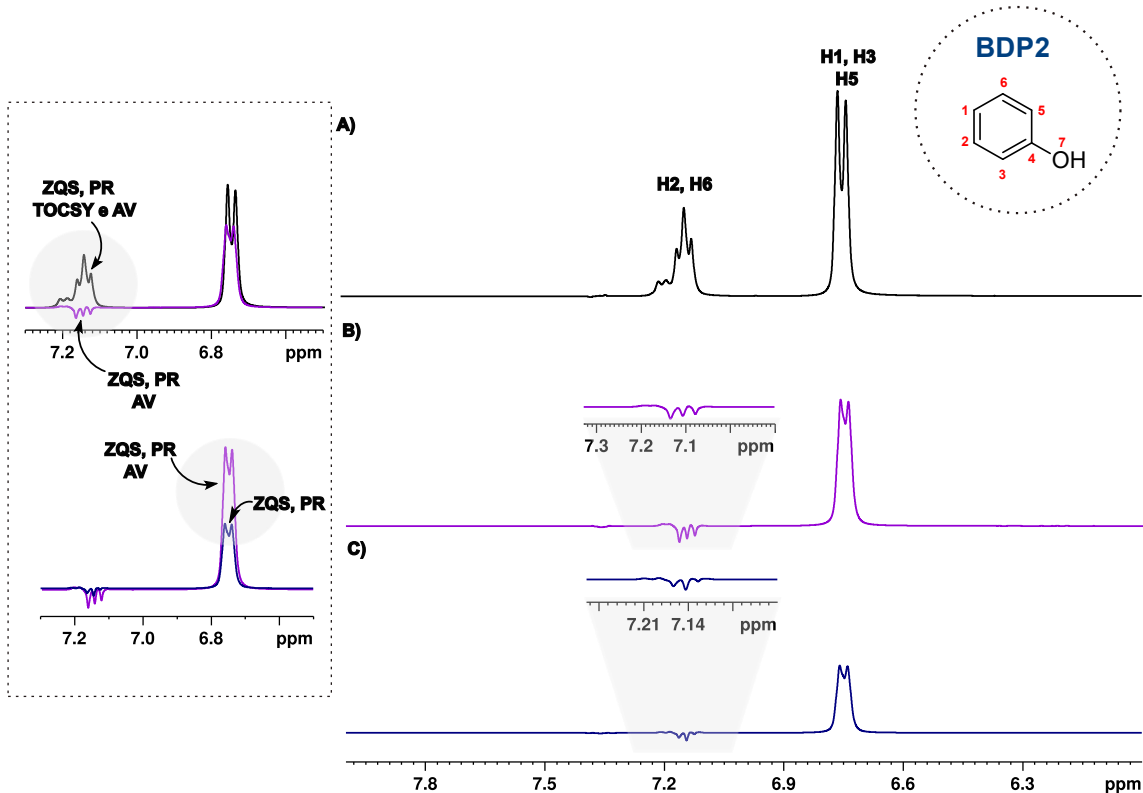


FIGURA 4.22. Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BDP2 aplicando os módulos: **A)** ZQS, PR, TOCSY e AV; **B)** ZQS, PR e AV; **C)** ZQS e PR. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

A aquisição dos espectros de ^1H -DREAMTIME na seleção de múltiplos produtos de degradação de forma simultânea foi realizada a partir da aplicação dos filtros: *zero quantum spoil*, *presaturação*, *mixing time* e a média da constante de acoplamento. Aplicando todos os filtros mencionados ao mesmo tempo foram obtidos espectros altamente seletivos e com alta resolução. Na figura 4.23 pode-se analisar o caso dos produtos BDP1 e BDP2 que quando adquirido o espectro sem o filtro do *mixing time* o sinal correspondente aos hidrogênios H2 e H6 apresentam problemas de fase no espectro final. Após aplicar todos os filtros incluindo *mixing time*, é obtido um espectro com alta resolução e seletivo, com todos os sinais em fase (Figura 4.23).

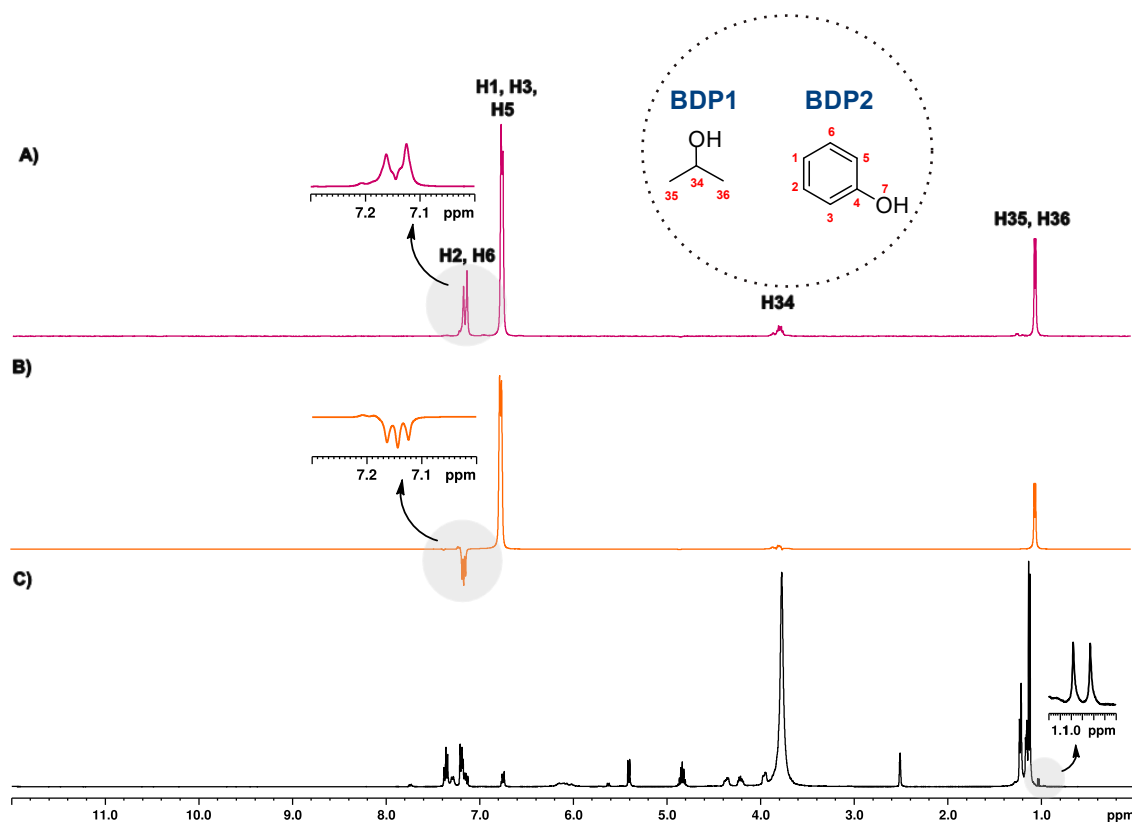


FIGURA 4.23. Espectro de ^1H -DREAMTIME dos produtos de degradação BDP1 e BDP2 adquiridos simultaneamente aplicando todos os módulos: **A)** ZQS, PR, TOCSY e AV; **B)** ZQS, PR e AV. **C)** Espectro de RMN- ^1H (zg) da mistura básica do sofosbuvir. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

A concentração de amostra é um fator importante para ter em consideração quando a DREAMTIME for aplicada. Quando as moléculas de interesse se encontram presentes numa concentração relativamente baixa (<1mg em 400uL solvente), a DREAMTIME demonstrou ter uma baixa sensibilidade e seletividade. Como é demonstrado no caso dos produtos de degradação ADP4 e ADP5, ambos possuem um grupo NH_2 nas suas estruturas, porém a partir do mapa de contorno do HMBC foi demonstrado que ambos diferem nos seus deslocamentos químicos, sendo de δ_{H} 8,43 ppm (ADP5) e δ_{H} 8,54 ppm (ADP4), Figura 4.24.

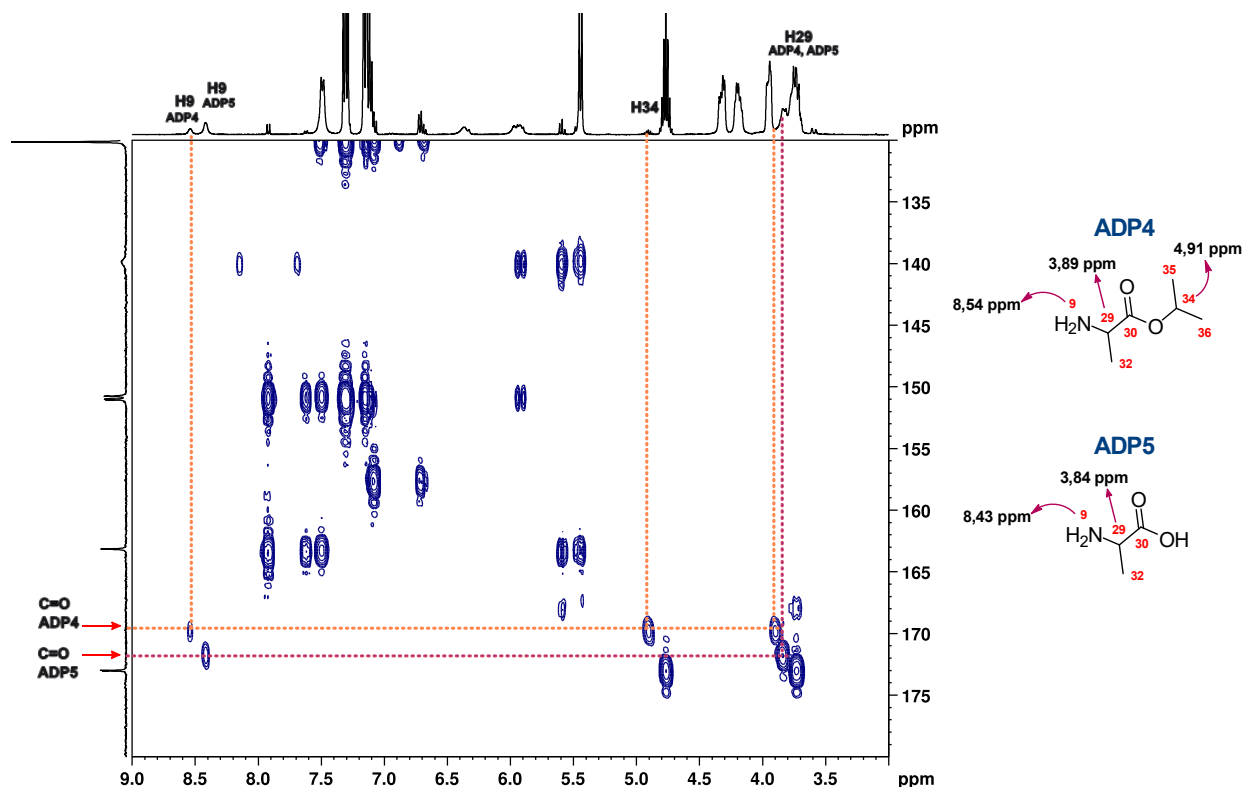


FIGURA 4.24. Expansão do mapa de contorno do gHMBC com os deslocamentos químicos dos produtos de degradação ADP4 e ADP5 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

O sinal do NH₂ do ADP5 é observado com maior intensidade no espectro de ¹H em relação ao sinal do mesmo grupo do ADP4, o que é coerente com o observado ao longo das 48 horas de degradação, em que o ADP4 degrada no ADP5 para gerar isopropanol como ADP7, e após 48 horas de degradação o isopropanol é produzido em maior quantidade, se comparado com o restante dos produtos de degradação observados. Na aquisição dos espectros de ¹H-DREAMTIME, a forma de onda foi desenhada para cada produto de degradação assinalando com ênfase os deslocamentos correspondentes aos picos do NH₂ de cada produto de degradação. Porém, nos espectros adquiridos tanto para o ADP4 quanto para o ADP5 o único sinal observado nos espectros finais de cada produto foi em δ_H 8,43 ppm. O sinal em δ_H 8,43 ppm, como foi mencionado, resultou ser o mais intenso em relação ao sinal em δ_H 8,54

ppm, além de apresentar sinais muito próximos entre si, o que quer dizer que a concentração do ADP4 é menor em relação ao ADP5 e a DREAMTIME não consegue ser o suficientemente seletivo e sensível para irradiar o sinal menos intenso (Figura 4.25).

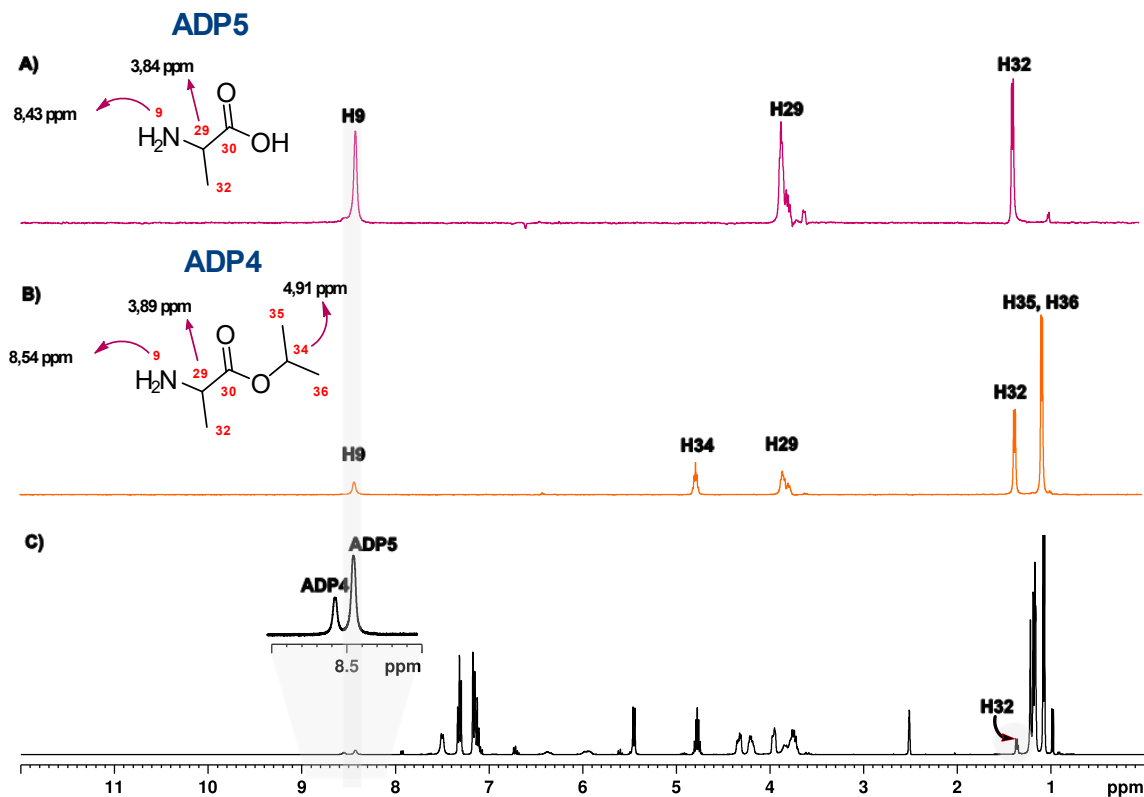


FIGURA 4.25. Espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação **A)** ADP5 e **B)** ADP4. **C)** Espectro de ^1H (*zgcppr*) do sofosbuvir sob condições ácidas. Os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

4.2.1.4 Quantificação do sofosbuvir e seus produtos de degradação a partir de RMN- ^1H quantitativa.

No presente estudo foi escolhido o experimento de RMN- ^1H convencional sob condições quantitativas com o objetivo de determinar a concentração do fármaco sofosbuvir, nas suas misturas de degradação ácida e básica, assim como a dos produtos de degradação gerados em cada uma delas. Assim, seria possível demonstrar como a

RMN também pode resolver problemas no balanço de massa, uma vez que os produtos são identificados. O balanço de massa é um dos problemas recorrentes na indústria farmacêutica. O espectro de RMN-¹H sob condições quantitativas da mistura ácida e básica do SOF mostrou os picos correspondentes tanto do SOF quanto dos seus produtos de degradação. A integração desses picos permitiu calcular a concentração do fármaco na amostra e os seus produtos de degradação. Foi utilizado como padrão o ácido maleico, em que seu único sinal que é independente da concentração do fármaco, serviu como referência interna para corrigir as variações nas condições experimentais e garantir uma quantificação precisa. O sinal do ácido maleico não interfere na análise quantitativa, devido a que se trata de um sinal isolado que possui deslocamento químico numa região do espectro (δ_H 6,31 ppm) onde não existem sinais correspondentes aos fármacos nem aos produtos de degradação. Os produtos de degradação ADP1, ADP2, BDP3 e BDP4 não foram quantificados devido a sobreposição dos seus sinais nos espectros de RMN-¹H. Porém no caso da degradação ácida, os produtos ADP3, ADP4, ADP5, ADP6 e ADP7 foram quantificados a partir do padrão interno já mencionado (Figura 4.26).

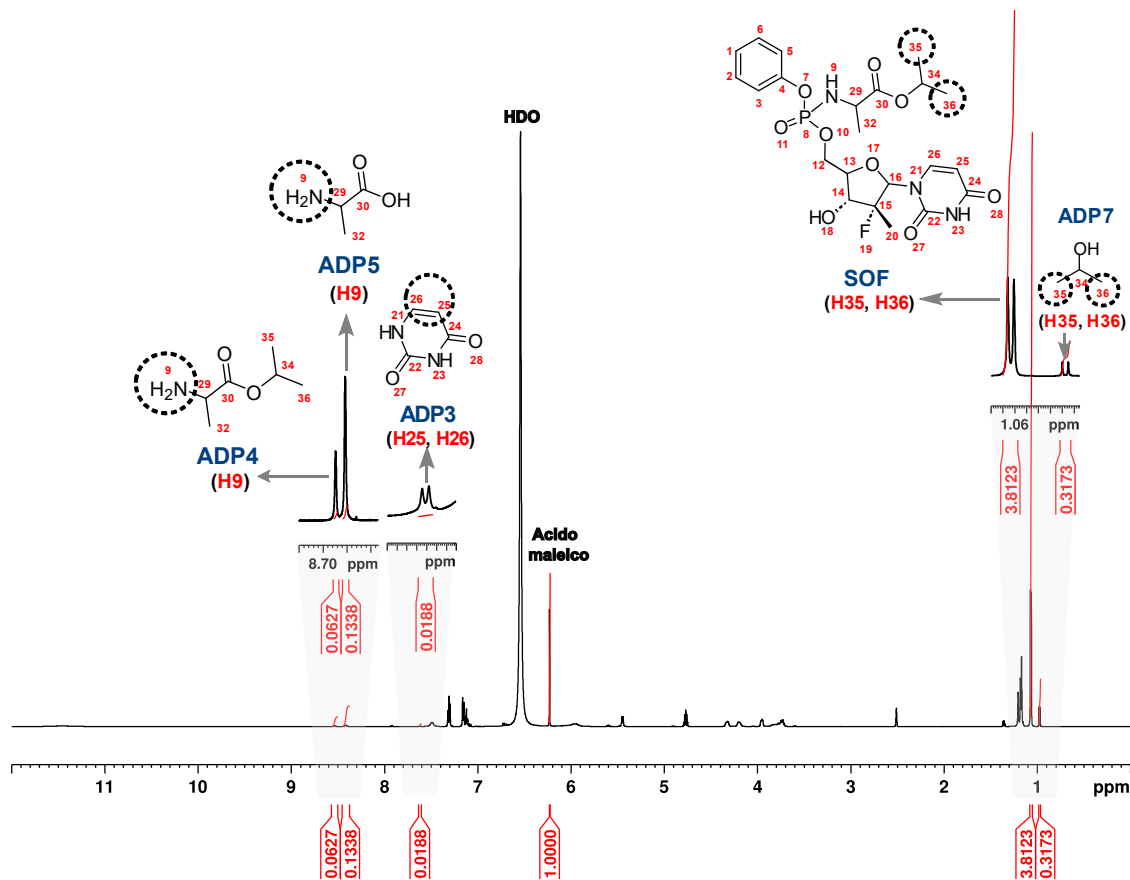


FIGURA 4.26. Espectro de RMN- ^1H (zg) da mistura de degradação ácida do SOF sob condições quantitativas utilizando como padrão primário ácido maleico para quantificar o SOF e os produtos de degradação ADP3, ADP4, ADP5 e ADP7. O espectro foi realizado em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Aplicando a equação 2 foi possível realizar o balanço de massa relacionando a área dos picos selecionados do analito (fármaco e produto de degradação) com o padrão interno utilizado diretamente para calcular a quantidade do analito presente na mistura analisada, equação 2:

$$\text{Equação 2} \quad C_{\text{analito}} = N_{\text{padrão}} \left(\frac{I_{\text{analito}}}{I_{\text{padrão}}} \right) \cdot \left(\frac{C_{\text{padrão}}}{N_{\text{analito}}} \right)$$

I = Intensidade do sinal; N = Número de núcleos; C = Concentração (mol.L^{-1})

No caso da degradação ácida, a quantificação do SOF como ingrediente ativo, foi realizada a partir da integração da área do duplete correspondente aos hidrogênios H35 e H36 dos grupos metilas com deslocamento químico em δ_H 1,06 ppm. A concentração inicial do SOF (IFA) na mistura de degradação ácida foi determinada em $0,1376 \text{ mol.L}^{-1}$ (29,14 mg) com 0 horas de reação de degradação. Após 48 horas de reação, a concentração calculada foi de $0,1254 \text{ mol.L}^{-1}$ (26,56 mg) com uma margem de erro de 1,10%. Isto indicou que o SOF foi degradado em um 10,10 % após um tempo de degradação de 48 horas (Figura 4.27).

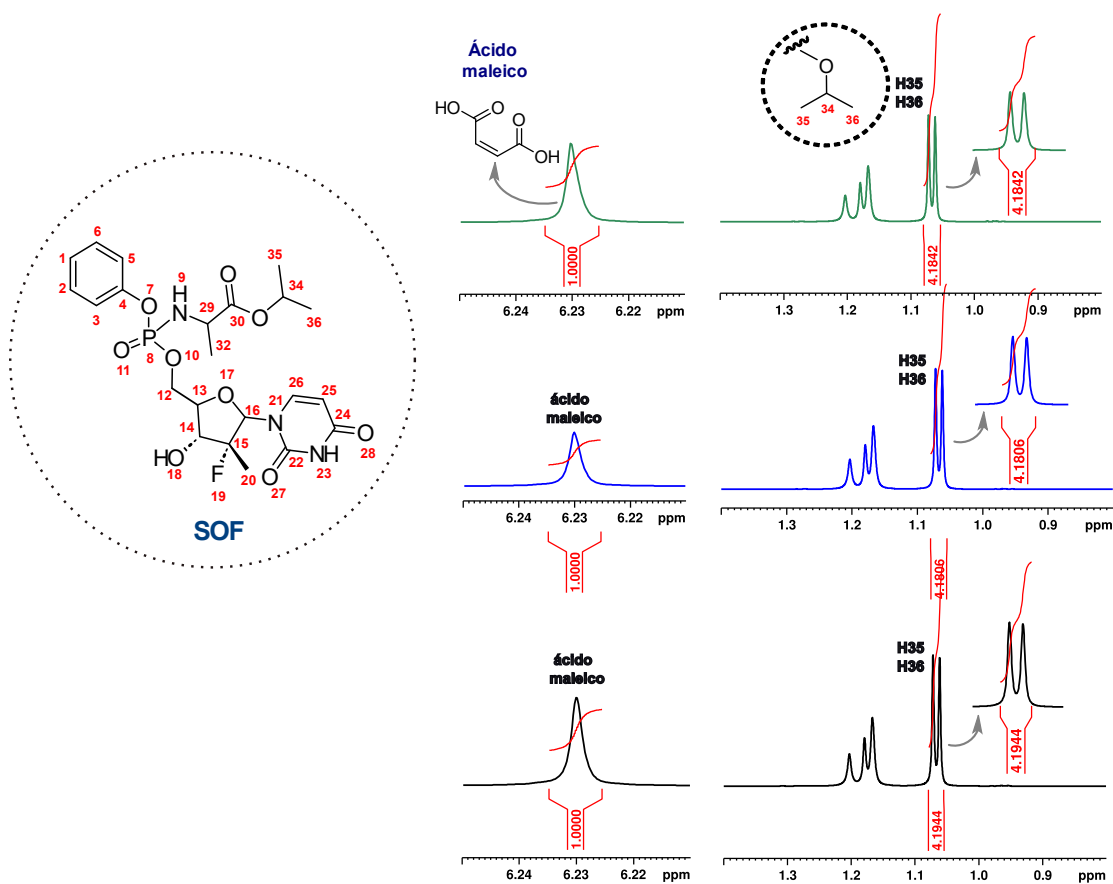


FIGURA 4.27. Ampliação do espectro de ^1H (zg) da mistura de degradação ácida do SOF sob condições quantitativas utilizando como estândar interno o ácido maleico na quantificação do SOF. Os espectros foram realizados em triplicata, DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Da mesma forma, selecionando um sinal específico e isolado de cada um dos produtos de degradação, as concentrações de cada produto de degradação ácida foram calculadas, sendo para: ADP3 0,0037 mol.L⁻¹; ADP4 0,013 mol.L⁻¹; ADP5 0,0061 mol.L⁻¹ e ADP7 0,010 mol.L⁻¹, todos sendo calculados após 48 horas de reação de degradação ácida (Tabela 4.1). Todos os cálculos de massa foram realizados em triplicata para cada produto de degradação. A soma das massas dos quatro produtos de degradação quantificados é, portanto, de 1,346 mg. Considerando a massa do SOF com 0 horas de degradação (29,48 mg) e a massa após 48 horas de degradação (26,56 mg) é observada uma perda de massa onde a somatória das massas dos produtos de degradação analisados (1,346 mg) não corresponde a perda total calculada (2,58 mg) e que pode ser relacionado ao fato de que outros produtos de degradação (ADP1, ADP2 e ADP6) não puderam ser quantificados pela ausência de sinais isolados que pudessem ser consideradas de referência no espectro de ¹H respectivo.

TABELA 4.1. Quantificação ácida do SOF e os produtos de degradação ADP3, ADP4, ADP5 e ADP7.

SOF ou ADP	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	N° H	% Erro	Tempo de reação: 48 h	
				Concentração (mol.L ⁻¹)	Massa (mg)
SOF	1,07	H35, H36	0,07	0,1254	26,56
ADP3	7,62	H26	0,66	0,003715	0,167
ADP4	8,53	H9	1,10	0,00619	0,221
ADP5	8,43	H9	1,34	0,01342	0,704
ADP7	0,96	H35, H36	0,13	0,0104	0,251

No caso da degradação básica, foram quantificados tanto o SOF, como ingrediente ativo, quanto os produtos de degradação BDP1 e BDP2, a partir dos seus sinais isolados (Tabela 4.2). A partir da integração da área do duplete em δ_{H} 1,13 ppm, foi determinado que o SOF inicialmente encontrava-se em uma concentração de 0,1279 mol.L⁻¹ o que corresponde a 27,09 mg de fármaco, e após 48 horas de reação o SOF degradou em 1,17%, o que pode ser traduzido em uma massa resultante de 26,77 mg de SOF, após

esse tempo reacional (48 h). Portanto, a perda de massa foi de 0,32 mg. Por outro lado, foi realizada apenas a determinação das massas dos produtos de degradação BDP1 e BDP2, devido ao fato de que são os únicos dois produtos dentro da mistura de degradação que possuem sinais isolados no espectro de ^1H convencional.

No caso do BDP1, a partir do duplete em δ_{H} 0,97 ppm, foi realizado o balanço de massas, sendo determinada a quantidade em massa (mg) degradada após 48 horas de reação, determinando-se uma concentração de $0,0026 \text{ mol.L}^{-1}$ o que equivale a 0,060 mg de produto de degradação BDP1. Por outro lado, para o produto de degradação BDP2 foi determinada a concentração do produto degradado formado, sendo de $0,0049 \text{ mol.L}^{-1}$ após o mesmo tempo reacional, 48 horas, que em massa equivale a 0,18 mg de produto de degradação formado. A somatória das massas dos dois produtos quantificados é, portanto, de 0,24 mg. Considerando a perda de massa do material de partida (0,32 mg), nota-se uma diferença de 0,07 mg, que pode ser relacionada não puderam ser quantificados pela ausência de sinais isolados que pudessem ser consideradas de referência no espectro de RMN- ^1H respectivo (Figura 4.28, Tabela 4.2).

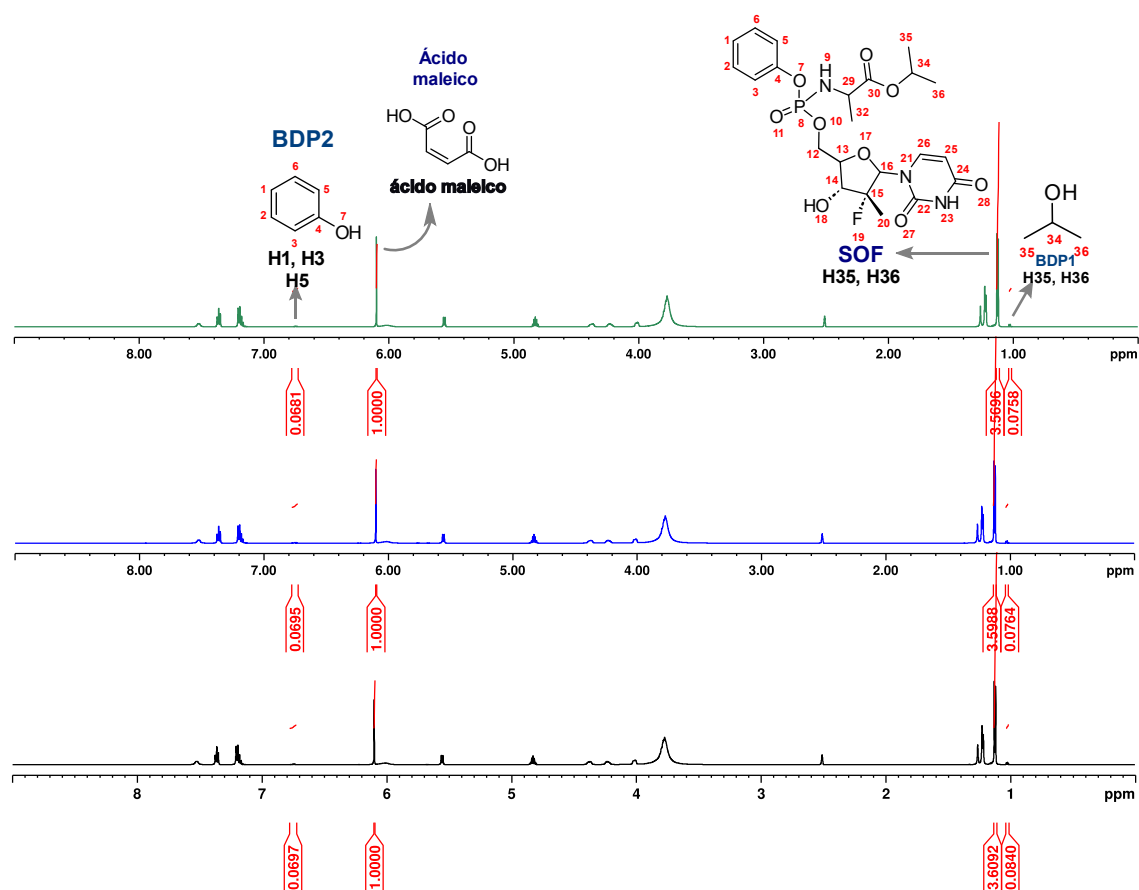


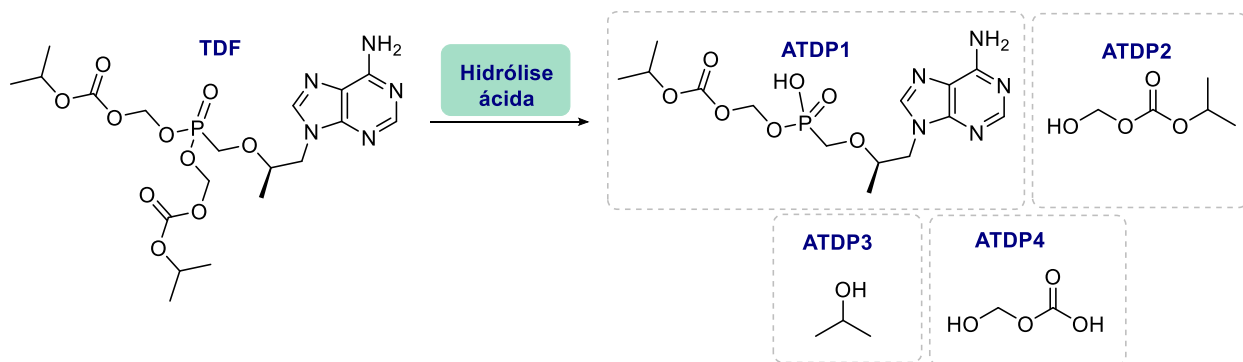
FIGURA 4.28. Ampliação do espectro de RMN- ^1H (zg) da mistura de degradação básica do SOF sob condições quantitativas utilizando como estândar interno o ácido maleico na quantificação do SOF, BDP1 e BDP2. Os espectros foram realizados em triplicata, em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

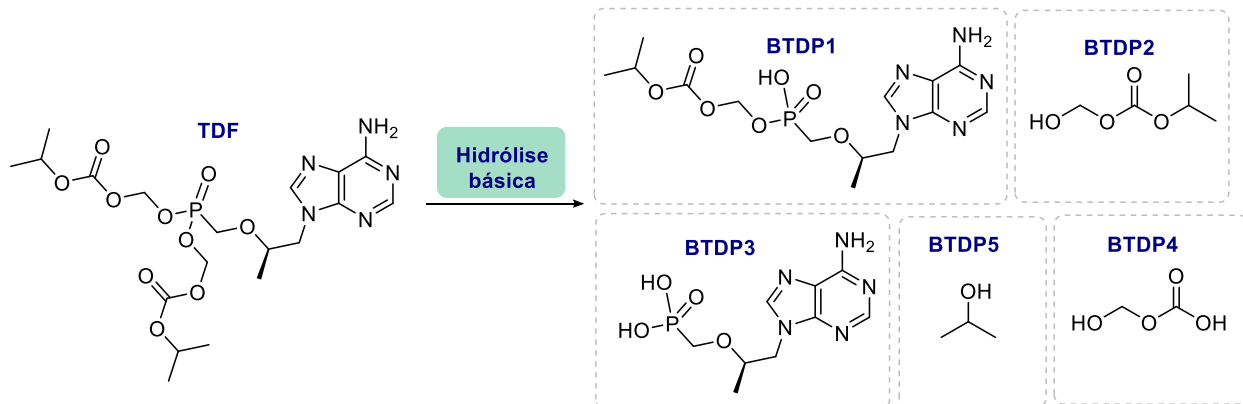
TABELA 4.2. Quantificação básica do SOF e os produtos de degradação BDP1 e BDP2.

SOF ou BDP	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	N° H	% Erro	Tempo de reação: 48 h	
				Concentração (mol.L ⁻¹)	Massa (mg)
SOF	1,13	H35, H36	0,46	0,1264	26,77
BDP1	1,02	H35, H36	2,01	0,00494	0,186
BDP2	6,75	H1, H3, H5	2,06	0,00265	0,067

4.2.1.5 Estudo da degradação ácida e básica do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)

Da mesma forma que no caso do sofosbuvir, a degradação do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) foi conduzida sob condições ácidas e básicas, sendo gerados, no caso da degradação ácida, quatro produtos de degradação: ATDP1, ATDP2, ATDP3 e ATDP4 (Esquema 4.5) e sob condições de estresse básico, cinco produtos de degradação: BTDP1, BTDP2, BTDP3, BTDP4 e BTDP5 (Esquema 4.6).

**ESQUEMA 4.5.** Produtos de degradação do TDF sob condições de estresse ácido.

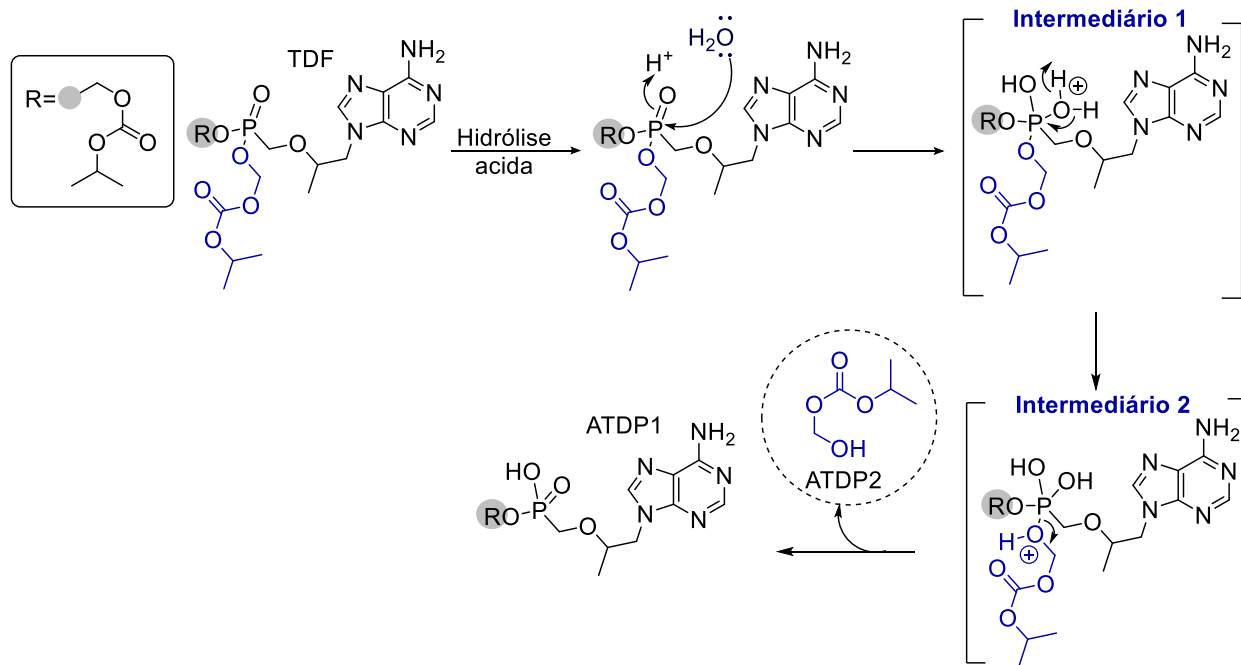


ESQUEMA 4.6. Produtos de degradação do TDF sob condições de estresse básico.

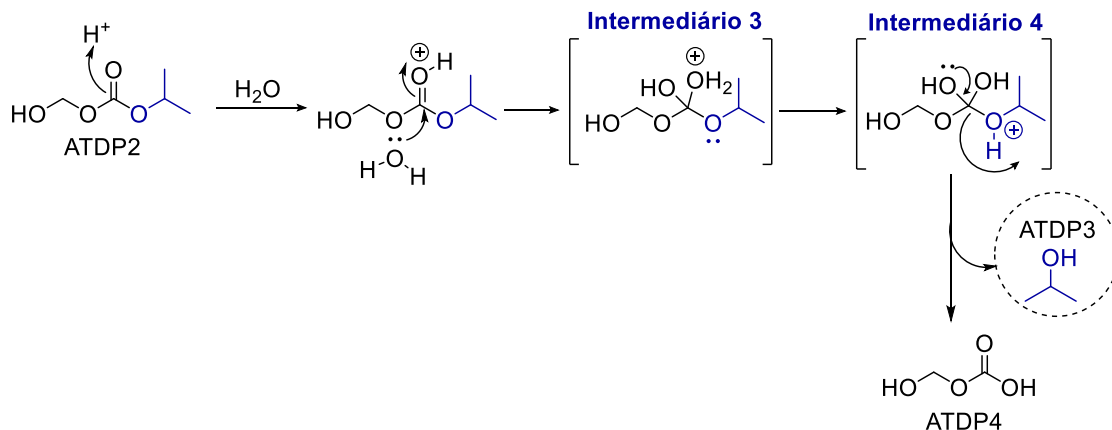
Os produtos de degradação sob condições ácidas e básicas identificados nesse trabalho coincidem com os reportados na literatura por Anandgaonkar e colaboradores (ANANDGAONKAR et al., 2015). Os intermediários descritos nos mecanismos das reações de degradação tanto ácida quanto básica, nesse trabalho, foram propostos baseados nos resultados reportados na literatura (KURMI et al., 2015), (ANANDGAONKAR et al., 2015). A estrutura química do TDF possui um único centro reativo (grupo fosfato) tanto em condições básicas quanto sob condições ácidas. O grupo fosfato reage rapidamente em ambas as condições promovendo a quebra das ligações P-O, liberando os fragmentos de éster (ATDP2 e BTDP2), formando os produtos ATDP1 e BTDP1 e conseqüentemente o fragmento éster dos produtos ATDP1 e BTDP1 liberam isopropanol gerando os produtos de degradação ATDP4 e BTDP4 e assim formar os produtos ATDP3 e BTDP3.

No caso da degradação ácida, durante a primeira etapa o grupo fosfato é protonado em meio ácido (DCI) e conseqüentemente é promovido um ataque nucleofílico da água gerando o intermediário 1. Após o processo de migração de um hidrogênio dentro da mesma molécula (nesse caso, a três ligações) (intermediário 2) é liberado o produto de degradação ATDP2 e formado o produto de degradação ATDP1. Uma vez liberado o produto de degradação ATDP2, o mesmo pode sofrer, da mesma forma, um ataque nucleofílico da água após ser protonado (intermediário 3 e 4). Nesta segunda etapa de reação é liberado o isopropanol como produto de degradação ATDP3 e formado o produto ATDP4 (Esquema 4.7).

Etapa 1: Degradação do TDF nos produtos ATDP1 e ATDP2



Etapa 2: Degradação do ATDP2 no ATDP3 e ATDP4

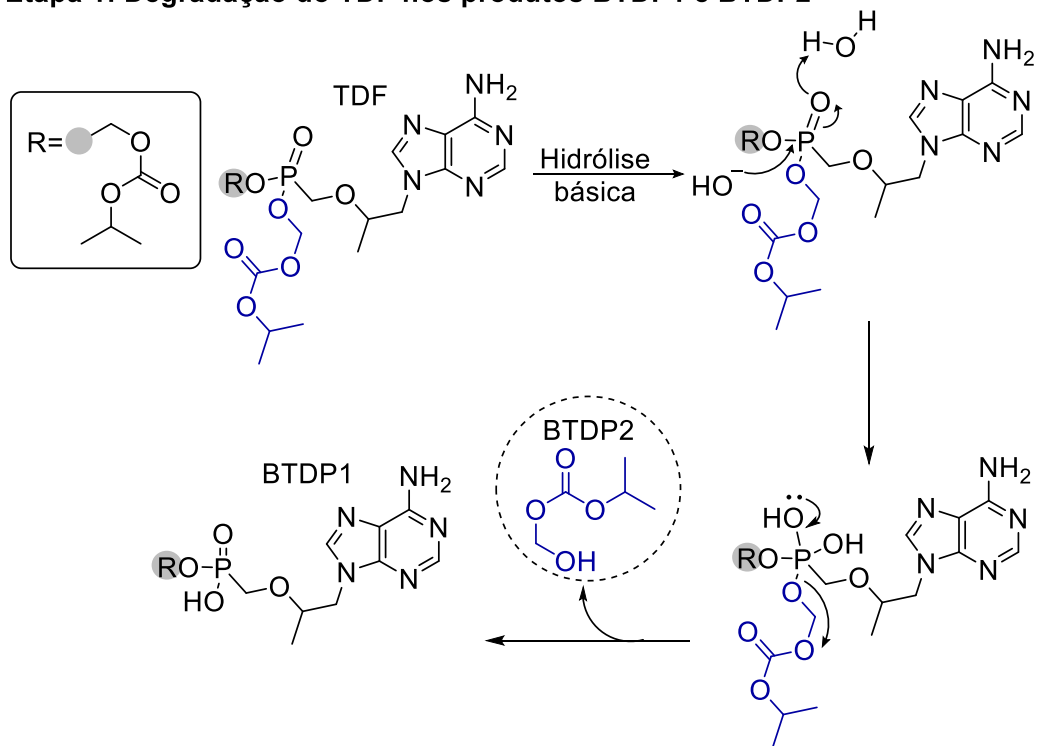


ESQUEMA 4.7. Proposta da rota de degradação do TDF sob condições ácidas.

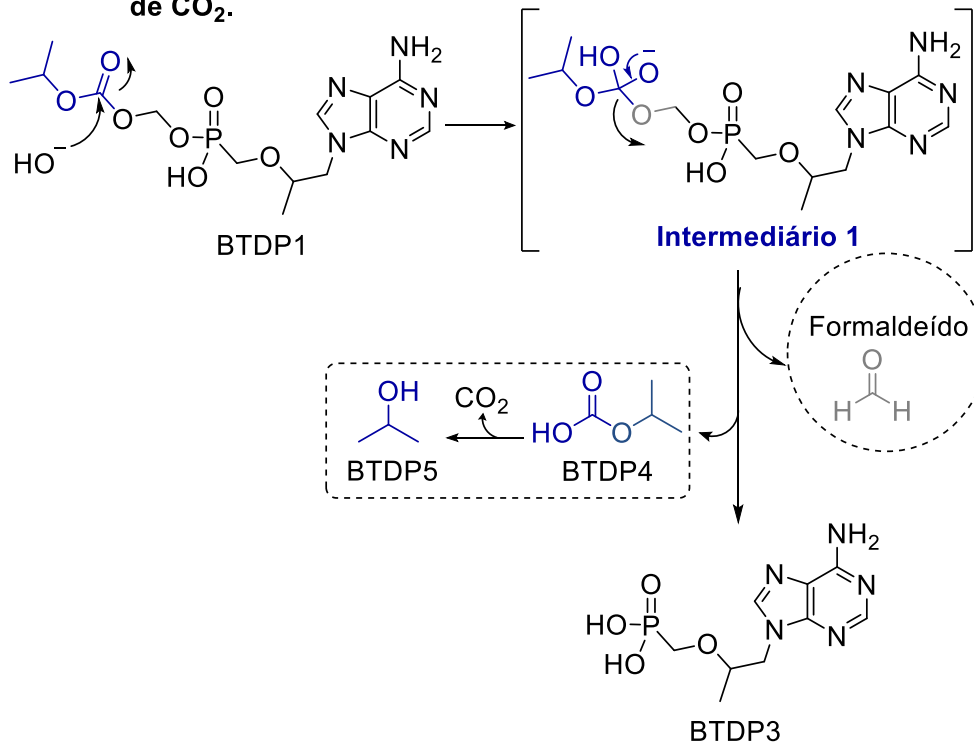
No caso da degradação básica, ocorrem uma série de reações que são catalisadas no meio reacional levando a formação dos produtos de degradação descritos, baseados na literatura (ANANDGAONKAR et al., 2015). Na primeira etapa a base (NaOD) em meio aquoso gera um ataque nucleofílico no átomo de fosforo do grupo fosfato e conseqüentemente forma o produto de degradação BTDP1 liberando o produto de degradação BTDP2. Por outro lado, a partir do produto de degradação BTDP1 (Etapa 2), é formado o produto de degradação BTDP4 por meio de um ataque nucleofílico por

parte da base, mas dessa vez no grupo carbonila do fragmento isopropil. Após esse ataque é liberada uma molécula de formaldeído e gerado o produto de degradação hidrogenocarbonato de isopropila, BTDP4. Uma vez formado o produto BTDP4, em meio básico aquoso ainda pode ser promovida a liberação de uma molécula de CO_2 formando assim o isopropanol como produto de degradação BTDP5 (Esquema 4.8).

Etapa 1: Degradação do TDF nos produtos BTDP1 e BTDP2



Etapa 2: Degradação do BTDP1 no BTDP3, BTDP4 e BTDP5 com liberação de CO₂.



ESQUEMA 4.8. Proposta da rota de degradação do TDF sob condições básicas.

4.2.1.6 Identificação dos produtos de degradação do fumarato de tenofovir desoproxila a partir das técnicas de 2D RMN

Sob condições de degradação ácida foram identificados quatro produtos de degradação, os quais foram identificados e os seus sinais assinalados a partir dos seus espectros de RMN 2D (*g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC) respectivos. Os sinais correspondentes ao produto de degradação ATDP1 formado como consequência da liberação do produto ATDP2 encontram-se em sobreposição com os sinais do TDF como IFA. Os sinais correspondentes aos grupos metilas H13 em δ_H 1,04 ppm e H26, H27 em δ_H 1,16 ppm são observados sobrepostos parcialmente com os sinais correspondentes aos mesmos grupos do TDF sendo dupletos de menor intensidade quando comparados com os dupletos do TDF. A partir do mapa de contorno *g*COSY (Figura 4.29) é observada a correlação existente entre os hidrogênios H13 (δ_H 1,04 ppm) e H12 (δ_H 3,98 ppm) assim como a correlação existente entre H26 e H27 com H25 (duplete em δ_H 4,82 ppm). Informação que foi confirmada a partir do mapa de contorno *g*HMBC onde é observada a correlação do H25 com C22 (δ_C 153,0 ppm) e H12 com C13 (δ_C 17,1 ppm) e C11 em δ_C 48,1 ppm (Figura 4.30). O sinal correspondente ao hidrogênio H20 um multiplete em δ_H 5,54 ppm, apresenta sobreposição com o sinal do TDF, porém a partir do mapa de contorno *g*COSY (Figura 4.29) pode ser observada a presença de mais de um núcleo nessa região que no mapa de contorno de *g*HMBC (Figura 4.30) mostra a correlação com C22 em δ_C 153,0 ppm. O singleto com deslocamento em δ_H 8,42 ppm, devido a sua intensidade quando comparada com a intensidade dos sinais do TDF é atribuído ao produto de degradação ATDP1. No mapa de contorno *g*HMBC (Figura 4.30), o singleto com deslocamento químico em δ_H 8,42 ppm mostra correlação a longa distância com C2 (δ_C 150,2 ppm) e C6 (δ_C 156,4 ppm) e não mostra correlação a longa distância com C11 (δ_C 48,9 ppm) o que poderia indicar que o singleto em δ_H 8,42 ppm corresponde ao H4. Por outro lado, o sinal do H8 não pode ser atribuído devido a sobreposição existente nessa região (Figura 4.30).

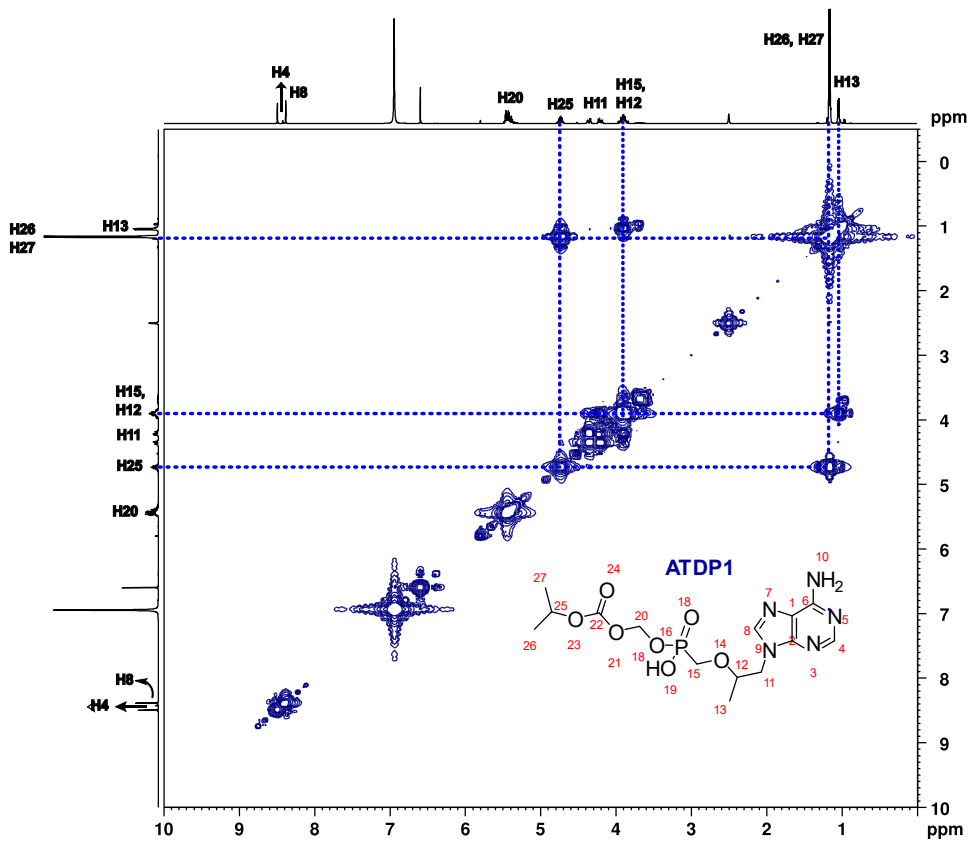


FIGURA 4.29. Expansão do mapa de contorno do gCOSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP1 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

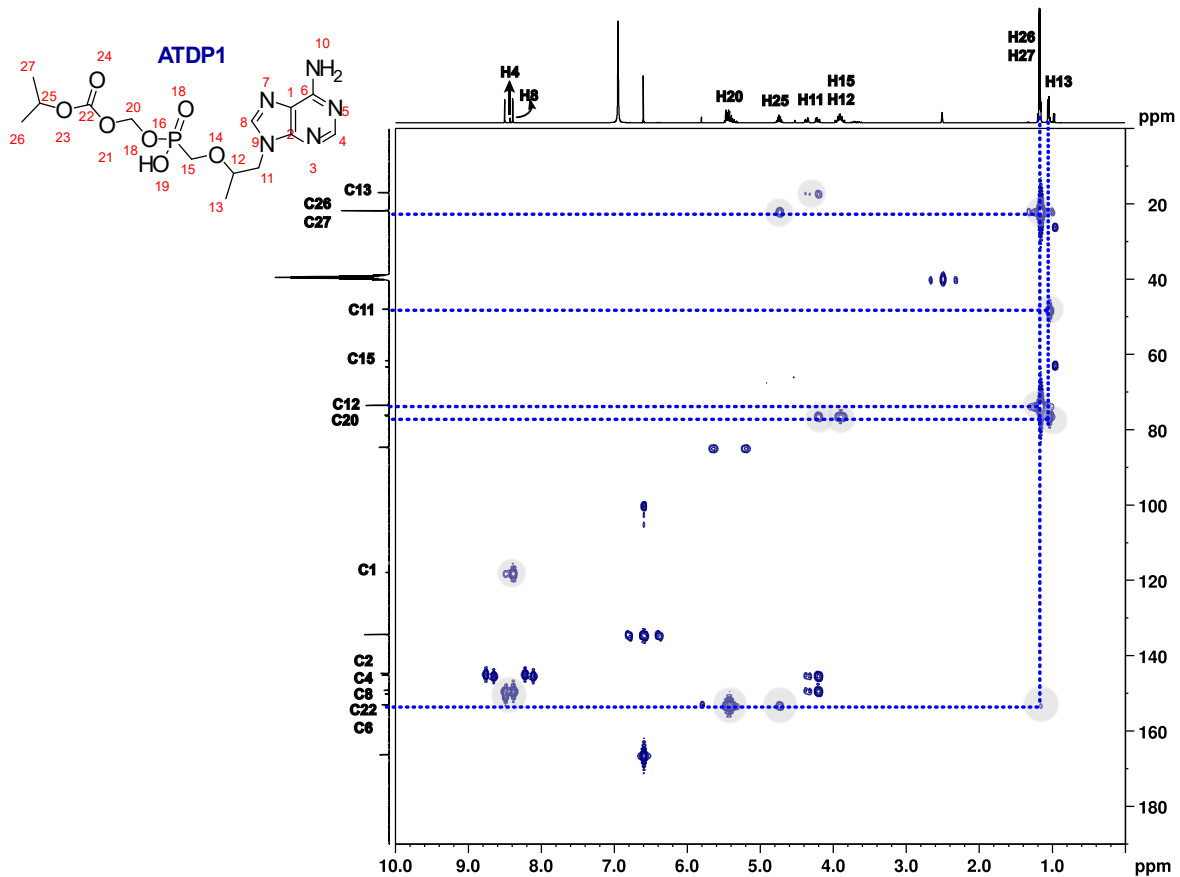


FIGURA 4.30. Expansão do mapa de contorno do gHMBC com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP1 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

Na figura 4.31 pode ser observado, a partir da ampliação do mapa de contorno gHMBC, a presença de mais de uma espécie no deslocamento químico (espectro vermelho) correspondente ao H4 e pode se observar também uma maior intensidade desse singlete em δ_{H} 8,48 ppm quando comparado com o singlete H8 em δ_{H} 8,40 ppm (na figura 4.31, do lado direito, representa o mesmo mapa de contorno gHMBC com o menor zoom possível, isto com o intuito de observar a aparição do segundo sinal com deslocamento químico semelhante). Isto pode indicar que o singlete atribuído ao produto de degradação ATDP1 corresponde também ao sinal do mesmo hidrogênio do TDF como IFA em δ_{H} 8,40 ppm, encontrando-se ambos em sobreposição. Sendo então o singlete em δ_{H} 8,40 ppm ao hidrogênio H8 do produto de degradação ATDP1 e o sinal em δ_{H} 8,38 ppm ao TDF como IFA. Os deslocamentos químicos dos carbonos do produto

de degradação ATDP1 foram assinalados a partir tanto do mapa de contorno $gHMBC$ quanto do mapa de contorno $gHSQC$ (Figura 4.31 e 4.32).

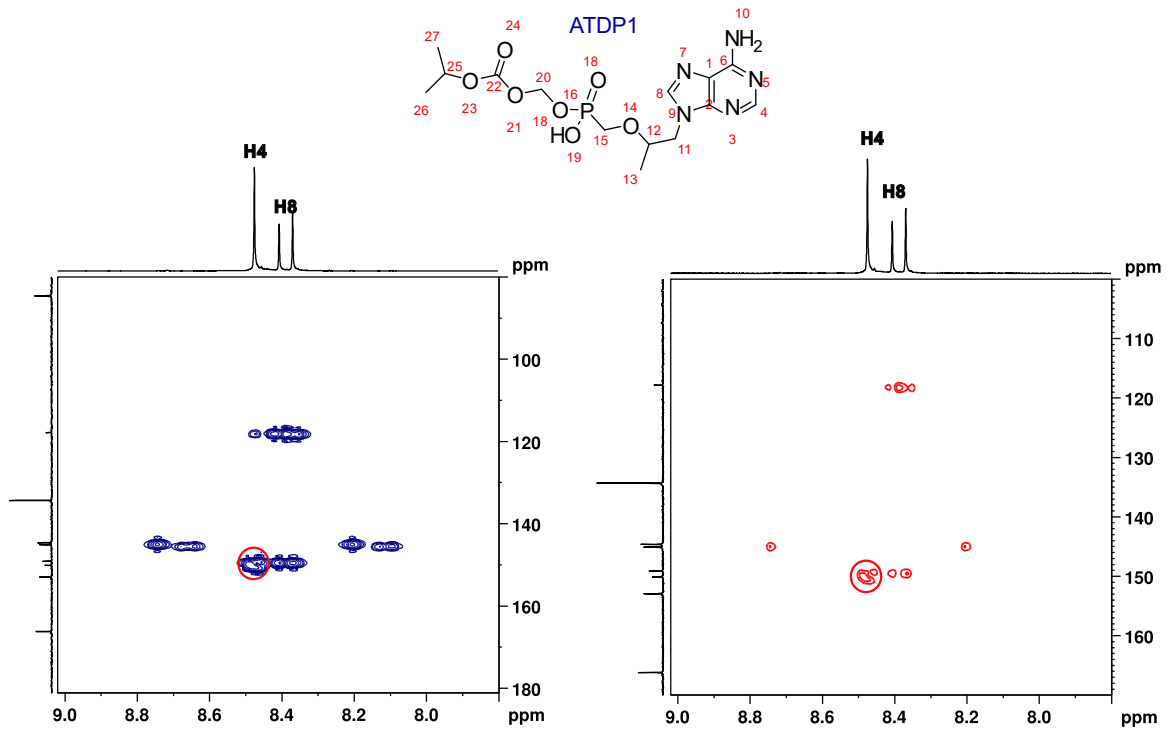


FIGURA 4.31. Expansão do mapa de contorno do $gHMBC$ com ênfase nos singletes correspondentes aos hidrogênios H4 e H8 do produto de degradação ATDP1. O espectro foi realizado em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de 1H) e a 298 K.

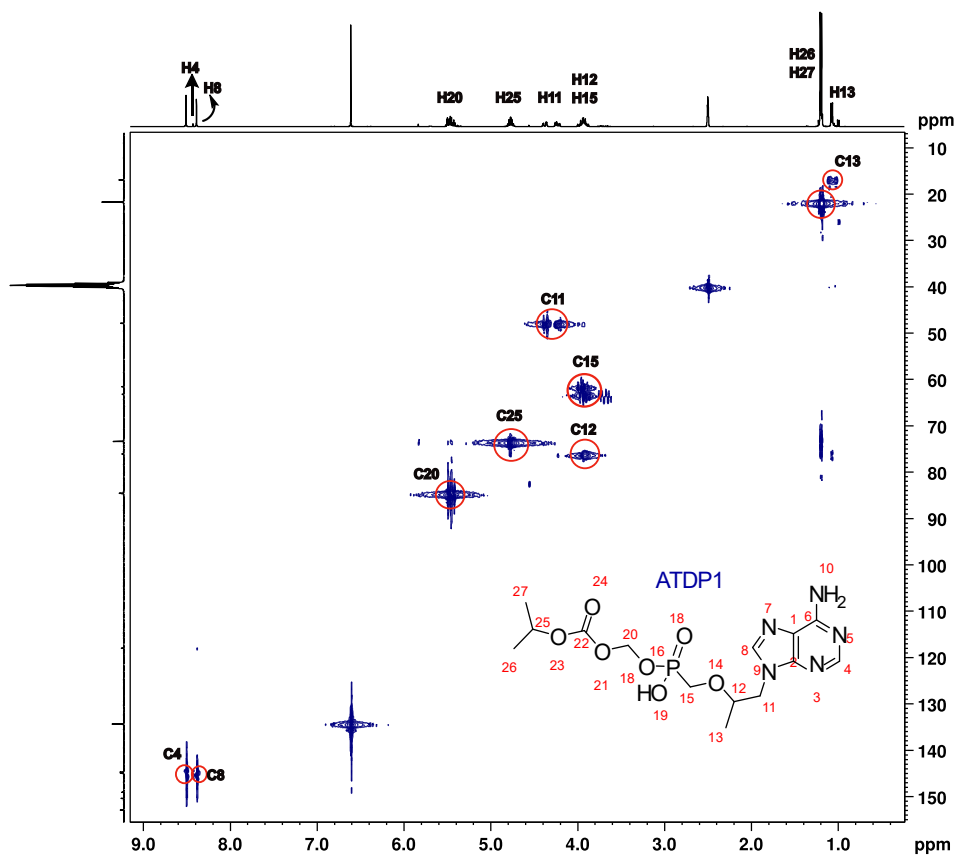


FIGURA 4.32. Expansão do mapa de contorno do gHSQC com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP1 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO-d6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

No caso do produto de degradação ATDP2, o duplete dos grupos metilas H26 e H27 em δ_{H} 1,19 ppm mostrou, no mapa de contorno gCOSY (Figura 21, Anexos), uma correlação com o multiplete correspondente ao H25 em δ_{H} 4,73 ppm que, por sua vez, no mapa de contorno gHMBC, mostra correlação com o carbono C25 em δ_{C} 76,4 ppm. O mapa de contorno gHMBC mostrou a correlação entre o multiplete em H20 com os carbonos em δ_{C} 84,6 ppm e C22 em δ_{C} 153,4 ppm (Figura 4.33).

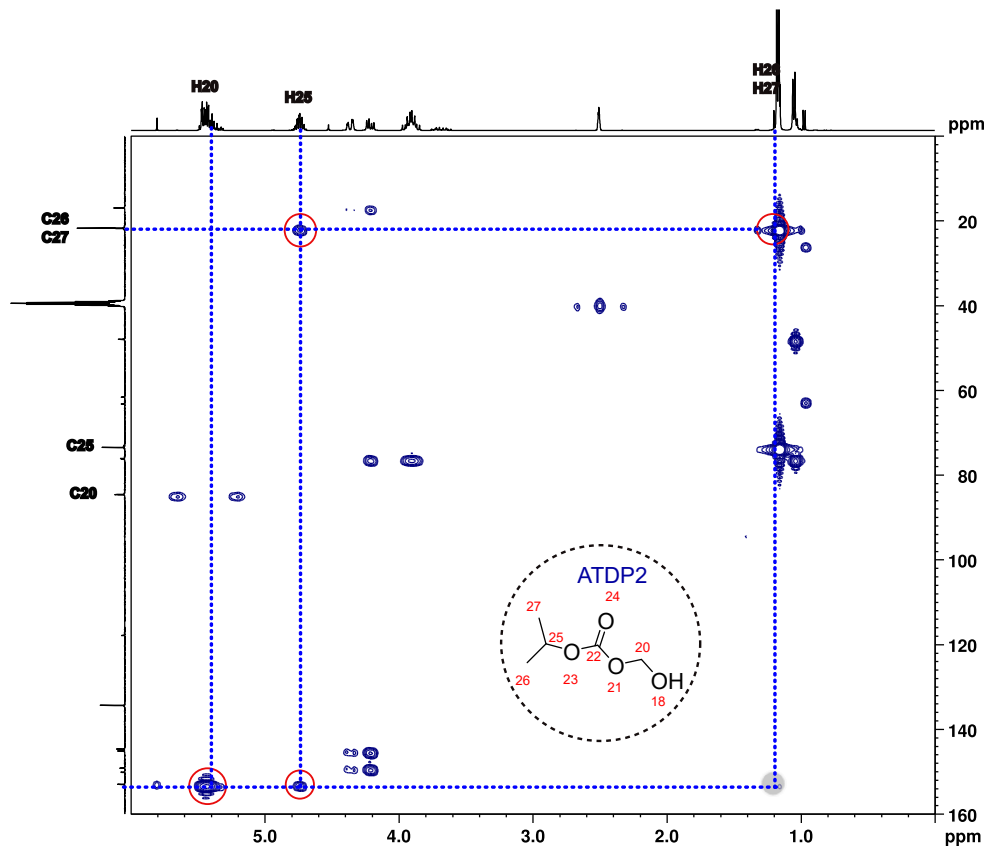


FIGURA 4.33. Expansão do mapa de contorno do gHMBC com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP2 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

A partir do mapa de contorno gCOSY (Figura 4.34) foram atribuídos os sinais do ATDP3 correspondentes aos hidrogênios H26 e H27 duplete em δ_H 0,97 ppm com constante de acoplamento $J = 6,09$ Hz, que mostraram correlação com o hidrogênio H25 em δ_H 3,69 ppm e ao mesmo tempo no mapa de contorno gHMBC foi observada a correlação entre 3,69 ppm com C26, C27 em δ_C 25,4 ppm (Figura 22, Anexos). A presença de isopropanol como produto de degradação ATDP3 foi confirmado analisando a mistura ácida por meio do experimento de DOSY de hidrogênio onde foi identificado a partir da diferença dos coeficientes de difusão do ATDP3 e o resto dos produtos presentes na mistura ácida (Figura 4.35).

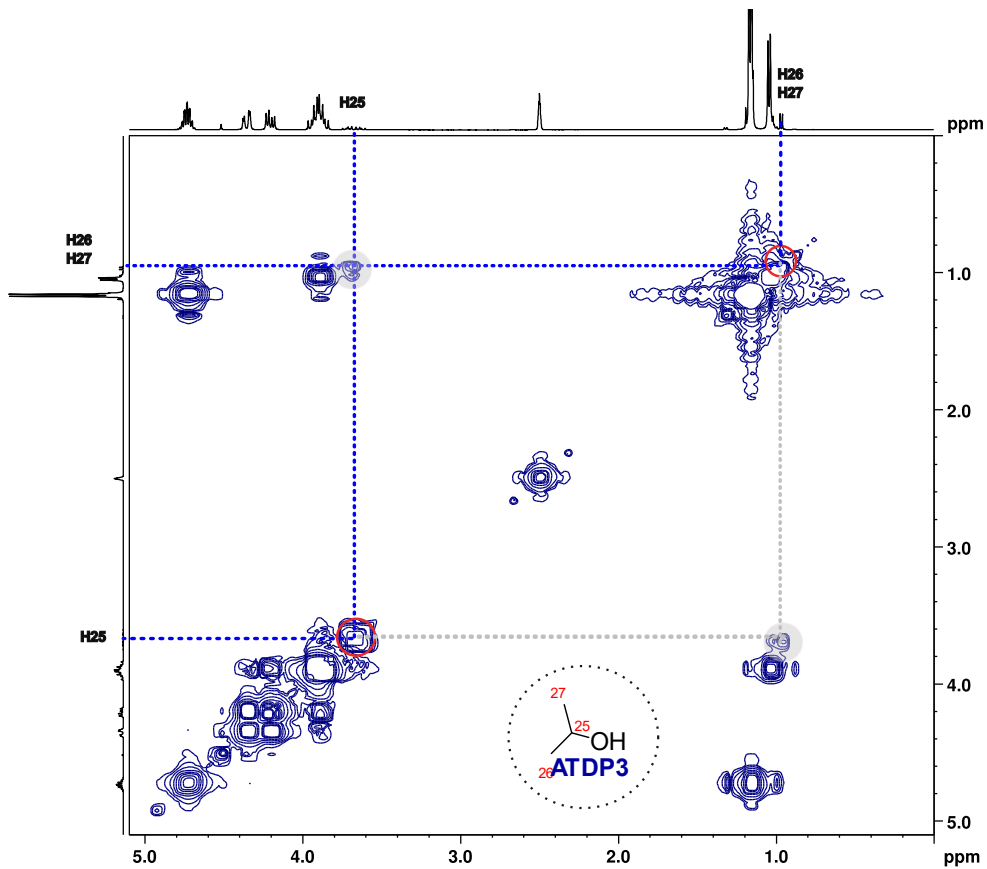


FIGURA 4.34. Expansão do mapa de contorno do *g*COSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP3 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO-*d*₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

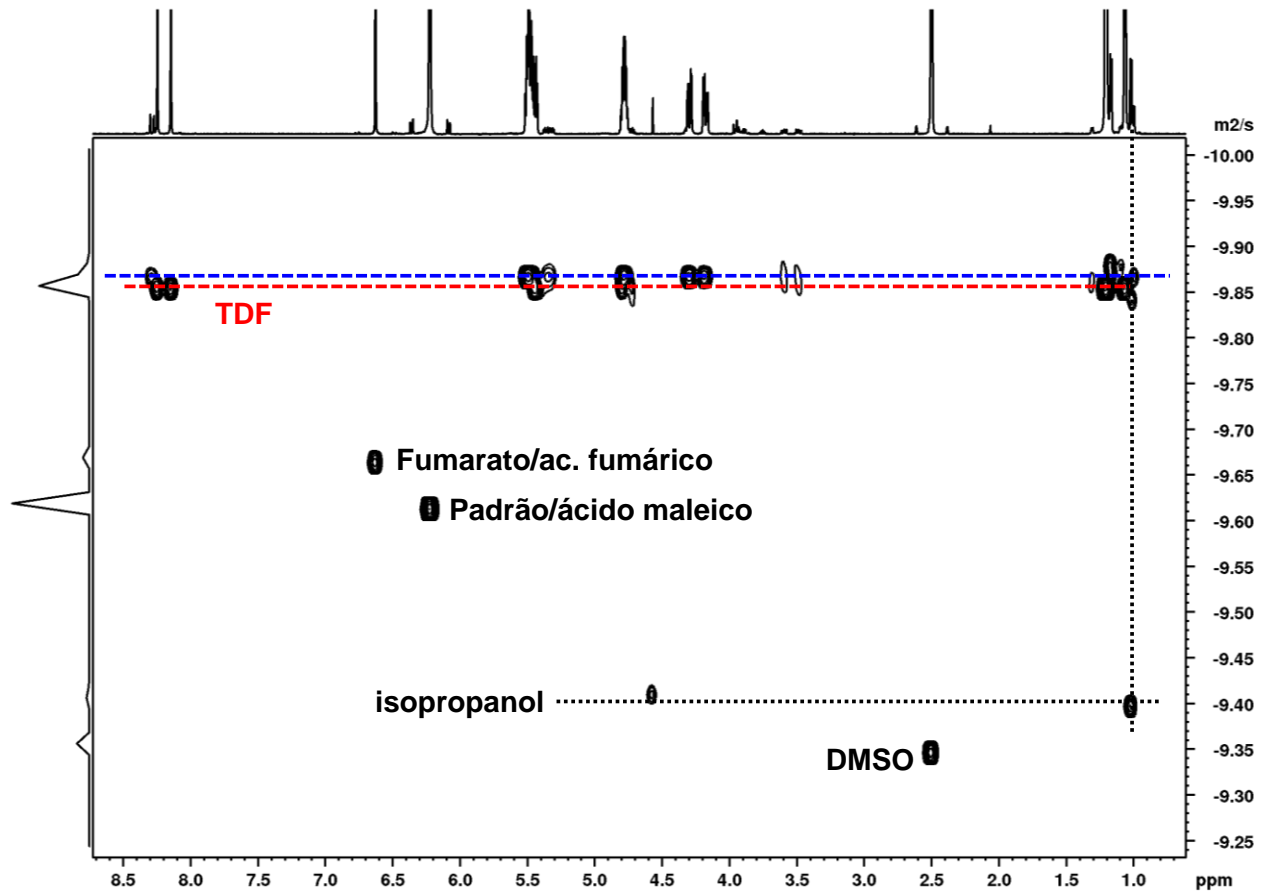


FIGURA 4.35. Experimento de difusão DOSY. O espectro foi realizado em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

No caso do ATDP4, o singlete aparece em δ_H 5,79 ppm no mapa de contorno *g*COSY (Figura 4.36) e que, no mapa de contorno *g*HMBC (Figura 4.37), o mesmo sinal mostrou a correlação com C20 em δ_C 73,2 ppm e com C22 em δ_C 152,8 ppm.

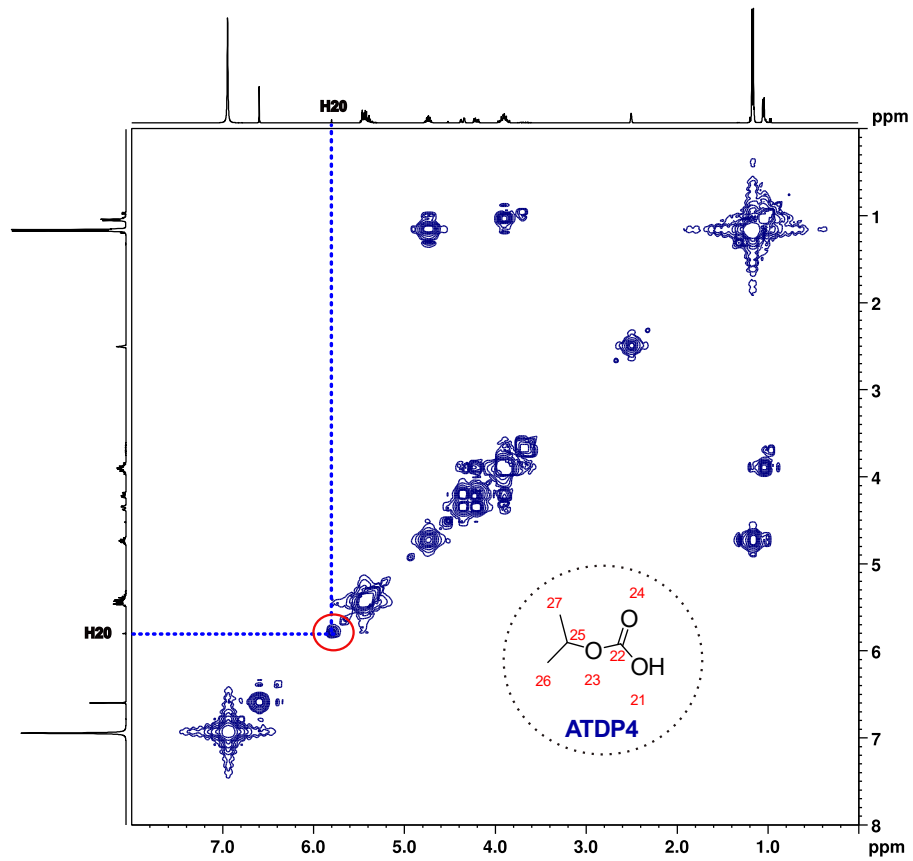


FIGURA 4.36. Expansão do mapa de contorno do gCOSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP4 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

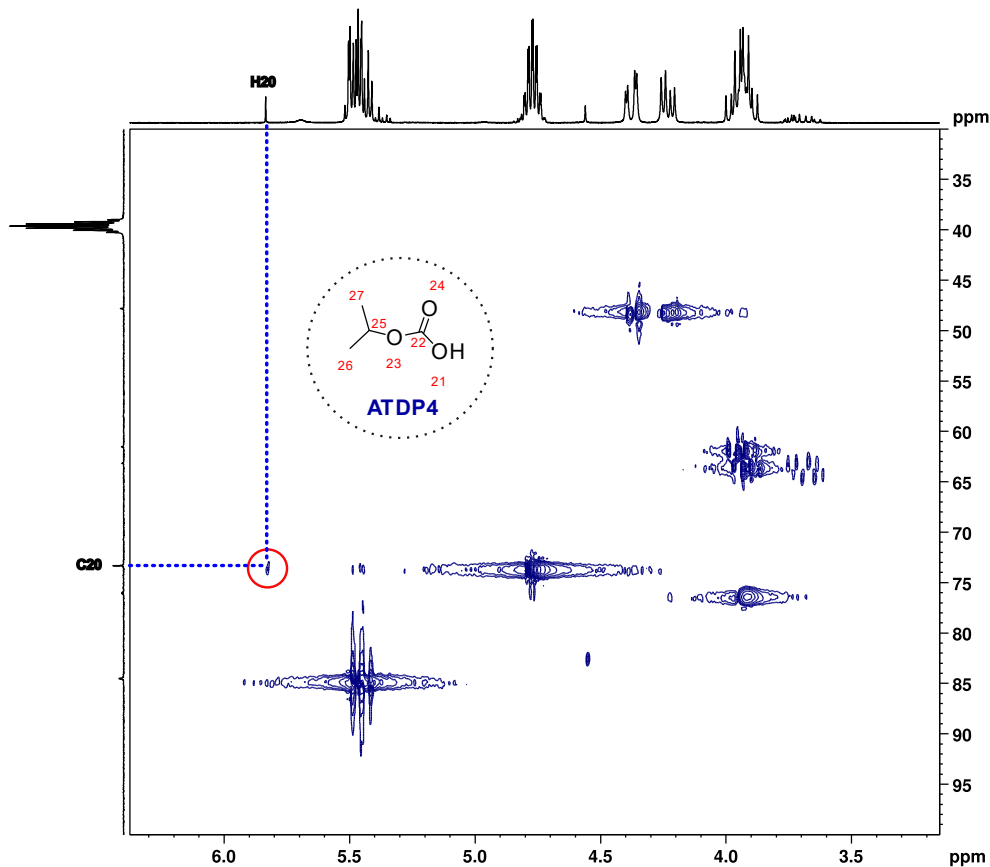


FIGURA 4.37. Expansão do mapa de contorno do *g*HSQC com os deslocamentos químicos do produto de degradação ATDP4 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

Sob condições de degradação básica foram identificados cinco produtos de degradação, e os seus sinais foram atribuídos a partir dos seus respectivos experimentos de RMN 2D (*g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC). O produto de degradação BTDP1 mostrou sobreposição dos seus sinais em relação aos sinais do TDF (IFA), porém dentre os sinais isolados encontram-se os sinais do fragmento isopropil. A partir do mapa de contorno *g*COSY (Figura 4.38) foi observada a correlação entre os hidrogênios H26, H27 um duplo duplete em δ_H 1,19 ppm ($J = 6,27$ Hz) e H25, multiplete em δ_H 4,73 ppm e a partir do mapa de contorno *g*HMBC foi observada a correlação do H26, H27 com C25 em δ_C 73,3 ppm (Figura 28, Anexos). O resto dos sinais apresentaram sobreposição com os sinais do TDF.

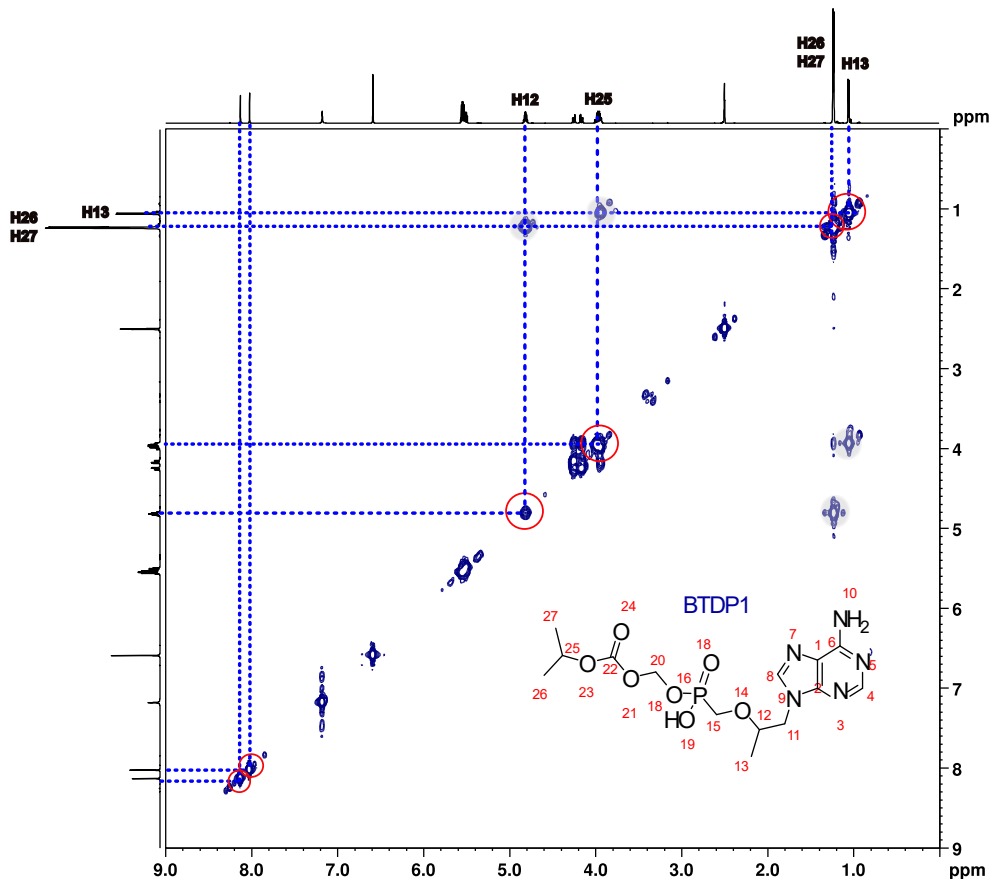


FIGURA 4.38. Expansão do mapa de contorno do g COSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação BTDP1 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

No caso do produto de degradação BTDP2 os sinais dos hidrogênios H26 e H27, duplete com deslocamento químico em δ_{H} 1,38 ppm mostraram correlação com H25 no mapa de contorno g COSY (Figura 4.39) e a partir do mapa de contorno g HMBC foi estabelecida a correlação entre H26, H27 com C25 em δ_{C} 72,2 ppm (Figura 29, Anexos).

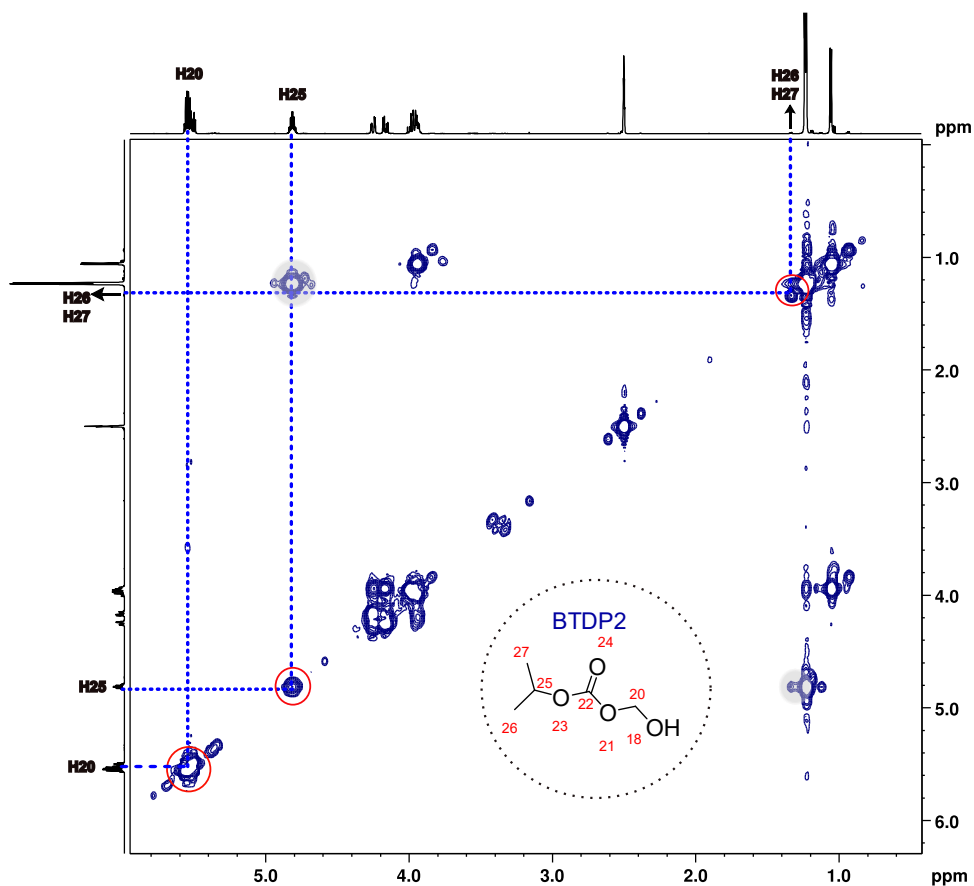


FIGURA 4.39. Expansão do mapa de contorno do gCOSY com os deslocamentos químicos do produto de degradação BTDP2 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

Os sinais do produto BDPT3 foram assinalados a partir do mapa de contorno gHMBC, cujo duplete atribuído ao hidrogênio H13, em δ_H 0,93 ppm ($J = 6,27$ Hz), mostrou correlação com os carbonos C11 e C12 em δ_C 46,9 ppm e 76,0 ppm, respectivamente. O restante dos sinais H11 (δ_H 4,22 ppm), H12 (δ_H 3,98 ppm), H15 (δ_H 3,98 ppm), H4 (δ_H 8,19 ppm) e H8 (δ_H 8,30 ppm) correspondentes ao produto de degradação BDPT3 apresentam sobreposição com os sinais do TDF (Figura 30, Anexos). Por outro lado, os sinais do produto de degradação BDPT4 e BDPT5 foram claramente atribuídos a partir do mapa de contorno gCOSY (Figura 4.40) onde foram observadas no caso do produto BDPT4 a correlações dos hidrogênios H26, H27, duplete em δ_H 1,19 ppm ($J = 6,06$ Hz) com o H25 em δ_H 4,81 ppm. Já no caso do produto de degradação BDPT5 foi observada

também. a partir do mapa de contorno g COSY. a correlação entre o duplete correspondente aos hidrogênios H26 e H27 em δ_H 1,02 ppm ($J= 6,07$ Hz) e o hidrogênio H25 em δ_H em 3,76 ppm, e por sua vez através dos mapas de contorno tanto do g HSQC e g HMBC foram atribuídos os sinais dos carbonos C26, C27 em δ_C 21,7-25,0 ppm e C25 em δ_C 62,34 ppm (Figura 33 e Figura 34, Anexos).

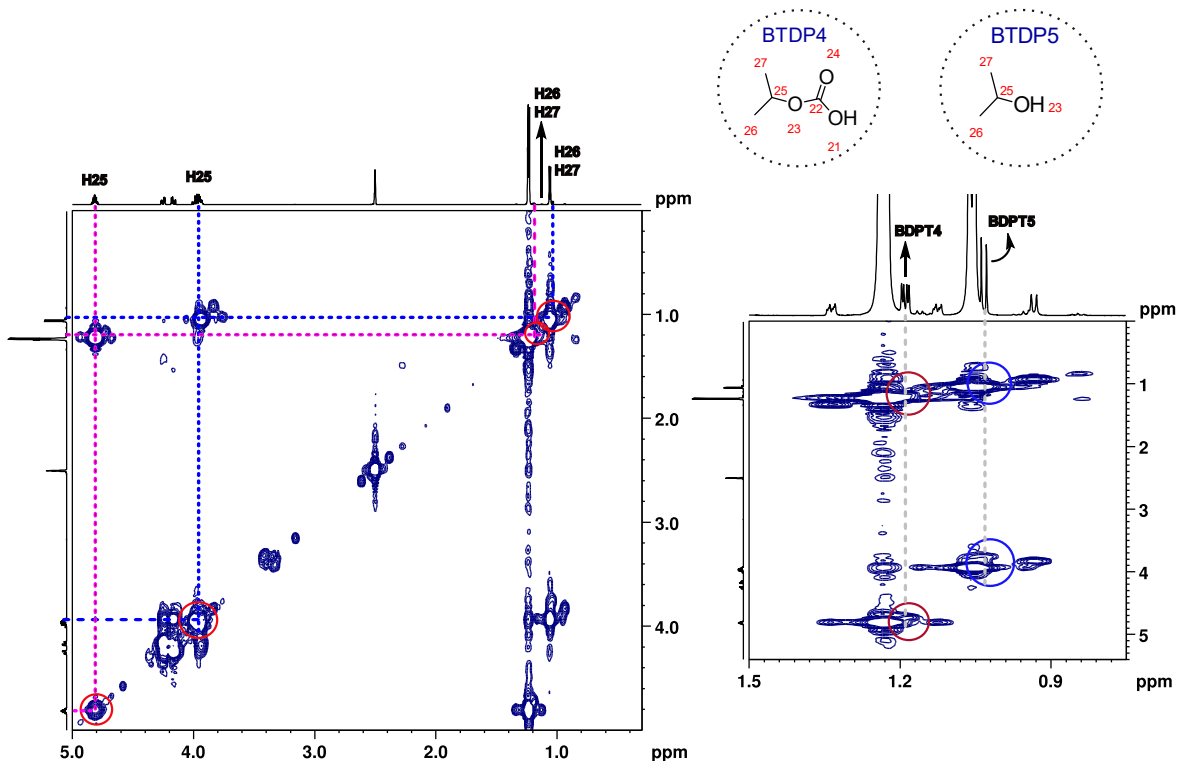


FIGURA 4.40. Expansão do mapa de contorno do g COSY com os deslocamentos químicos dos produtos de degradação BTDP4 e BTDP5 assinalados. O espectro foi realizado em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de 1H) e a 298 K.

4.2.1.7 DREAMTIME: Seleção de cada um dos produtos de degradação ácida e básica do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF).

Assim como no caso do sofosbuvir, uma vez identificados os produtos de degradação a partir da análise de cada uma das misturas a partir dos experimentos de RMN 2D foi aplicada a técnica de DREAMTIME na seleção dos produtos de degradação

tanto da mistura ácida quanto da mistura básica do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF). A Figura 4.41 mostra o espectro de RMN- ^1H convencional do TDF (Espectro C, Figura 4.41) sem degradar vs os espectros da mistura dos produtos de degradação em meio básico (Espectro A, Figura 4.41) e ácido (Espectro B, Figura 4.41) do fármaco.

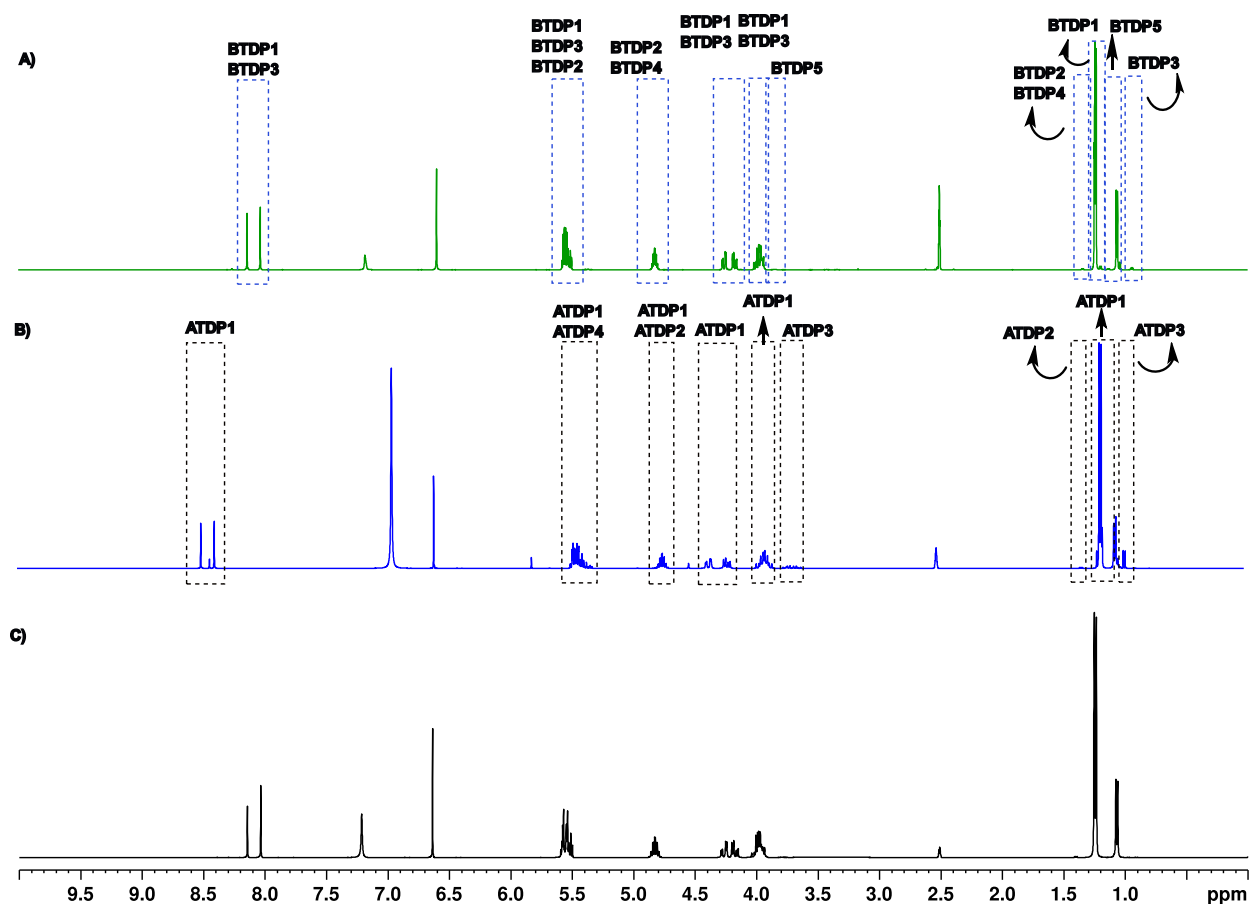


FIGURA 4.41. Espectro de RMN- ^1H convencional (zg) obtido para a mistura de: **A)** Degradação básica do TDF; **B)** Degradação ácida do TDF e **C)** TDF sem sofrer reação de degradação. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Como resultado dos espectros convencionais de ^1H (zg) adquiridos para cada mistura (ácida e básica) foi observado que a maior parte dos sinais dos produtos de degradação (ATDP) encontram-se sobrepostos com os sinais do TDF sem degradar. Como no caso do sofosbuvir, o objetivo deste estudo é a aplicação da técnica de

DREAMTIME para separar seletivamente cada produto da sua mistura de reação sem a necessidade de realizar nenhum tipo de separação física. Inicialmente, na análise da mistura ácida do TDF foi observado, comparando inclusive a intensidade dos sinais correspondentes aos produtos de degradação com os sinais do TDF, a baixa proporção dos ATDP identificados, ou a baixa relação sinal/ruído. A seleção dos produtos de degradação, apesar da baixa intensidade dos sinais foi possível aplicando a técnica da DREAMTIME.

Como foi discutido anteriormente, durante a aquisição dos espectros de RMN-¹H utilizando a técnica de DREAMTIME, devem ser ajustados uma série de parâmetros que permitam obter espectros seletivos para cada produto de degradação. Primeiro parâmetro de aquisição que precisa ser ajustado é o tempo do pulso formatado, o qual pode ser variado entre 10 e 40 ms, sendo que um valor de 40 ms resultará, na maioria dos casos, em espectros mais limpos, ou seja, com maior seletividade. O tempo de pulso é um parâmetro ajustado dentro da formatação do pulso, onde é desenhada a forma de onda em amplitude e fase (própria para de molécula alvo) a partir de pares de spin estritamente acoplados entre si. Consequentemente, como já foi descrito anteriormente, os filtros opcionais, resultam em parâmetros de aquisição importantes de serem ativados e ajustados (*zero quantum spoil*, presaturação, meia da constante de acoplamento em J e o *mixing time*) que permitem obter espectros limpos, com boa presaturação do sinal da água e/ou sinal do solvente e com todos os sinais em fase.

O tempo do pulso não só permite, assim como já foi mencionado anteriormente, adquirir espectros com maior seletividade, mas também aumentar a intensidade dos sinais. Por outro lado, quando é ativado o filtro da média da constante de acoplamento em J , uma das características que se observa nitidamente afetada nos espectros resultantes é o aumento da intensidade dos sinais. A média da constante do acoplamento, permite adquirir espectros apontando seletivamente as constantes de acoplamento de todos os deslocamentos químicos ou sinais da molécula alvo, eliminando problemas de sobreposição dos sinais e aumentando a relação sinal/ruído. Na figura 4.42 pode ser observada a influência tanto da variação do tempo de pulso quanto da média da constante de acoplamento, quando o pulso é desenhado ajustando

o tempo de pulso para 10, 20, 30 e 40 ms e quando a média da constante de acoplamento é variada desde 6,5; 7 e 7,5 Hz. Quando é variada o tempo de pulso de 10 até 40 ms no caso do ATDP2, a máxima intensidade dos sinais, é alcançada quando o pulso é desenhado ajustando uma largura de pulso de 40 ms. Lembrando que 40 ms é um tempo de pulso que garante seletividade e resolução dos sinais. Por outro lado, quando a média da constante de acoplamento em J é variada em uma faixa maior, quer dizer, em uma faixa que inclua todas as constantes de acoplamento da molécula a intensidade dos sinais aumenta assim como também a seletividade na hora de selecionar unicamente a molécula desejada.

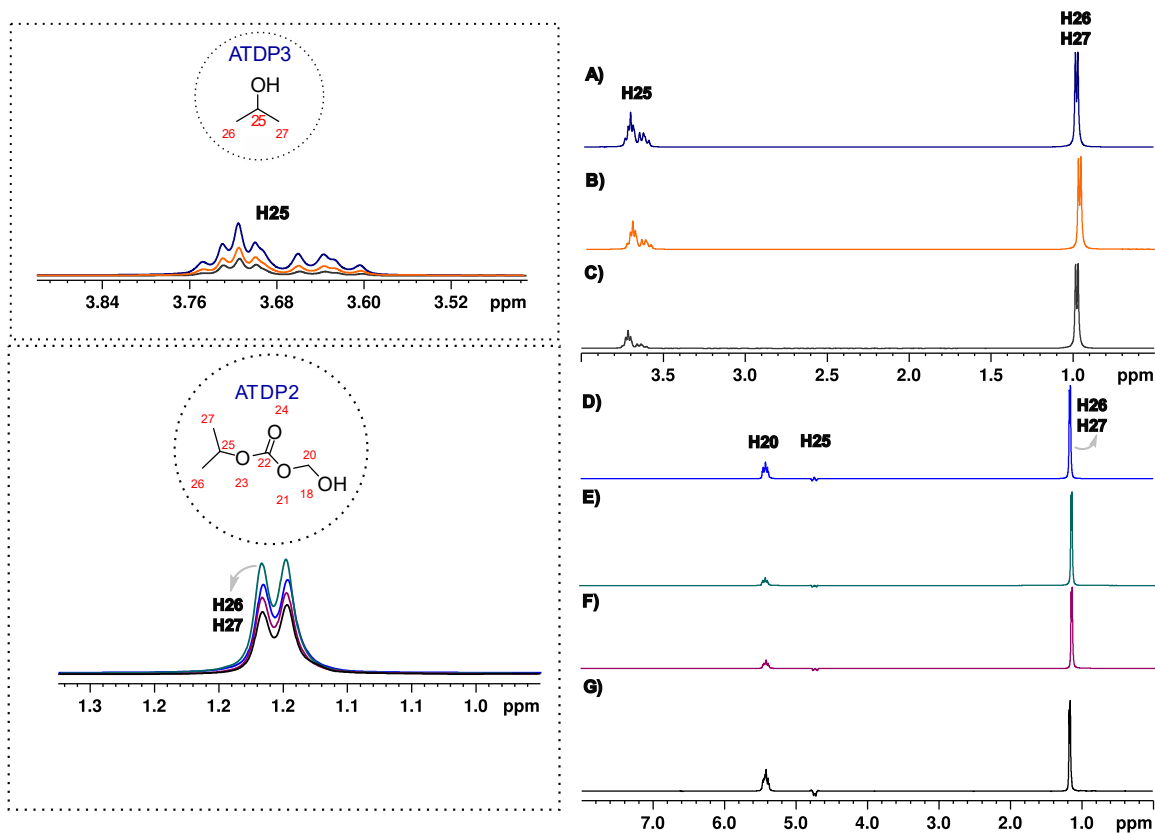


FIGURA 4.42. Influência do tempo de pulso e média da constante de acoplamento em J (AV) na intensidade dos sinais dos compostos ATDP2 e ATDP3. Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do ATDP3 com **A)** AV= 7,5 Hz; **B)** AV= 7 Hz; **C)** AV= 6,5 Hz; **D)** tempo de pulso 40 ms; **E)** tempo de pulso 30 ms; **F)** tempo de pulso 20 ms; **G)** tempo de

pulso 10 ms. Todos os espectros foram realizados em DMSO-d6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

O uso da média da constante de acoplamento em J , apesar de aumentar a intensidade dos sinais, apresenta, em muitos dos casos, problemas de fase dos sinais nos espectros finais. O filtro de *mixing time*, como já foi demonstrado anteriormente, permite resolver problemas de fase durante a aquisição dos espectros e não como uma ferramenta de processamento nos espectros resultantes. O *mixing time*, quando aplicado, tanto ele só quanto em conjunto com a média da constante de acoplamento em J , permite obter espectros finais “ideais”, onde são observados todos os sinais em fase e com intensidades semelhantes aos sinais dos espectros de ^1H convencionais. Na figura 4.43 é comparada uma série de espectros na ausência do filtro tanto do *mixing time* quanto da média da constante de acoplamento em J (**A**), onde é observada defasagem dos sinais correspondentes ao hidrogênio H25, sendo que o mesmo é observado quando é comparado com o espectro **B**, onde foi ativado apenas o filtro da média da constante de acoplamento em J . Porém, quando aplicado o filtro *mixing time* em ambos os casos é eliminada essa defasagem (**C** e **D**). Assim, o melhor resultado é alcançado quando são aplicados ambos os filtros *mixing time* e média da constante de acoplamento (além dos filtros ZQS e PR), tendo como resultado um espectro com intensidade semelhante ao seu espectro de ^1H convencional respectivo e com todos os sinais em fase.

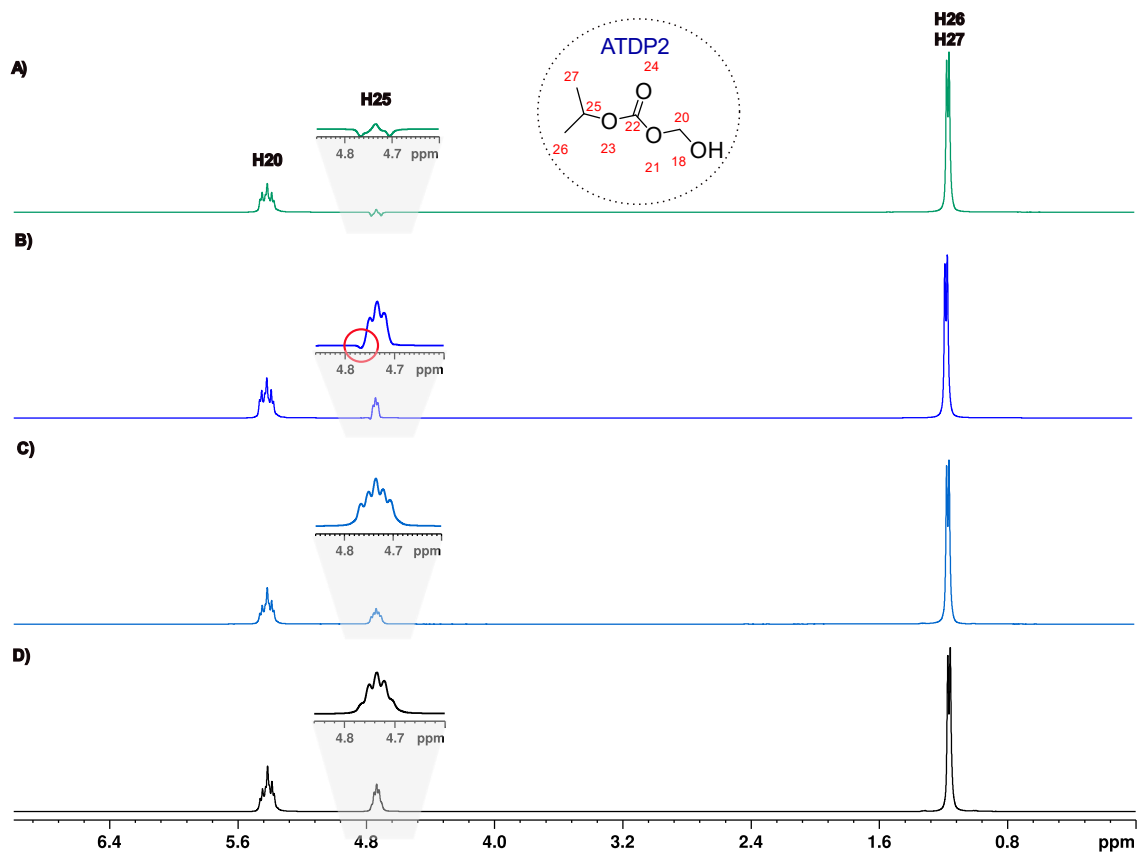


FIGURA 4.43. Influência do *mixing time* na fase dos sinais nos espectros de ^1H -DREAMTIME do ATDP2. Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do ATDP2 com os filtros **A)** ZQS e PR; **B)** ZQS, PR e AV; **C)** ZQS, PR e TOCSY; **D)** largura de pulso 40 ms; **E)** ZQS, PR, AV e TOCSY. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Na figura 4.44 foi observada a influência do *mixing time* na correção da fase dos sinais nos espectros finais das moléculas desejadas, porém, o *mixing time* é um parâmetro que deve ser ajustado, realizando uma varredura ou janela de valores (0-260 ms) que será intrínseco para cada molécula alvo. No caso do produto de degradação ATDP2, para a aquisição do seu espectro de ^1H -DREAMTIME respectivo, foi variado o valor de *mixing time*, desde 0 até 260 ms. Na figura 4.44 é observado o efeito de diferentes valores do *mixing time* nos sinais dos espectros. Inicialmente foi testado um valor de *mixing time* de 60 ms (**A**) observando-se defasagem dos sinais, os espectros **B** e **C** mostram espectros com valores de *mixing time* de 120 e 180 ms com todos os sinais

em fase, o que significa que a partir de valores de 100 até 200 ms aproximadamente a magnetização é distribuída de forma homogênea ao longo de todo o sistema de spin da molécula, porém no caso do último espectro **D** é observado de novo uma defasagem do mesmo sinal com um valor de *mixing time* de 260 ms, quer dizer que mesmo existindo uma magnetização homogênea ao longo do sistema de spin da molécula, submeter esse sistema de spin a períodos mais prolongados provoca uma maior relaxação (do sistema de spin) e até redução do sinal tendo como resultado assim espectros com problemas de fase novamente (Figura 4.44).

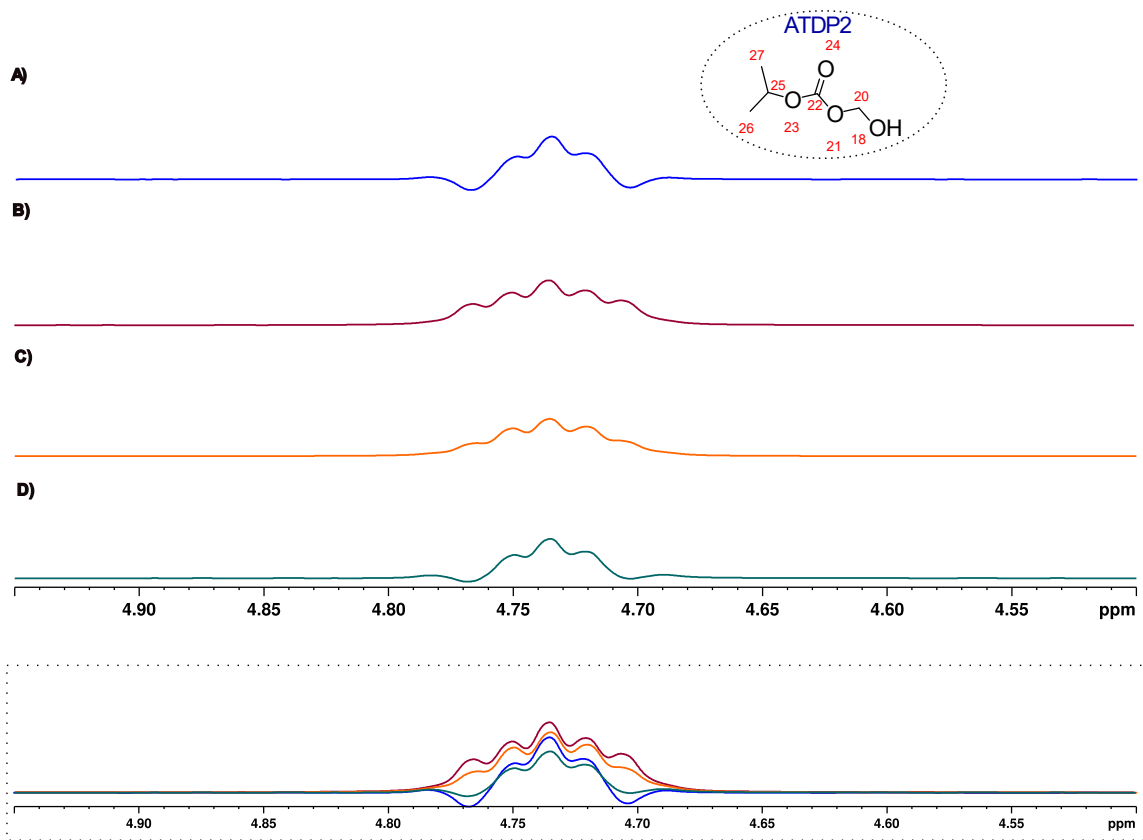


FIGURA 4.44. Variação de valores de *mixing time* e a sua influência na fase dos sinais nos espectros de ^1H -DREAMTIME. Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME com TOCSY de: **A)** 60ms; **B)** 120 ms; **C)** 180 ms; **D)** 260 ms. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Assim como no caso da degradação do SOF, nas misturas de degradação do TDF existem produtos de degradação que apresentam spins sem acoplamentos entre si como

é o caso do produto de degradação ATDP4, que possui um par de hidrogênios equivalentes sem outro par de spin vizinhos ou spins que estejam acoplados a ele. No espectro da mistura ácida do TDF foi atribuído o sinal em δ_H 5,79 ppm como o simpleto correspondente ao hidrogênio H20, o que foi confirmado também a partir dos experimentos de RMN 2D (mapas de contorno *g*HMBC, *g*HSQC e *g*COSY); atribuição discutida na seção anterior deste capítulo. Por tanto, não foi possível selecionar o produto de degradação ATDP4 utilizando a técnica DREAMTIME.

Os produtos de degradação com estruturas mais complexas como ATDP1 também foram selecionados a partir da DREAMTIME, após o ajuste de todos os parâmetros de aquisição já mencionados. Para estruturas mais complexas, com sobreposição dos sinais do espectro de ^1H convencional, a forma de onda deve ser desenhada a partir dos sistemas de spin que possuam os seus sinais mais intensos com o objetivo de aumentar a razão sinal/ruído no espectro de ^1H -DREAMTIME resultante. Durante o desenho da forma de onda, devem ser utilizadas larguras de pulso de 30 e 40 ms uma vez que são mais eficientes e seletivas, assim como o uso dos filtros de *mixing time* e ajustando a média da constante de acoplamento em *J*; estes, em conjunto com os filtros *zero quantum spoil* e pressaturação do sinal de HDO. Nos espectros de ^1H -DREAMTIME resultantes do ATDP4, o multiplete correspondente ao H11 em δ_H 4,28 ppm foi observado como o sinal com menor intensidade, o que é observado também no espectro de ^1H convencional. Os hidrogênios H4 e H8 não são hidrogênio equivalentes e também não estão acoplados entre si; portanto, mesmo a forma de onda deste produto de degradação sendo desenhada incluindo as frequências correspondentes aos sinais do H4 e H8, estes não são observados nos seus espectros de ^1H -DREAMTIME resultantes como é observado na figura 4.45 (Espectro A).

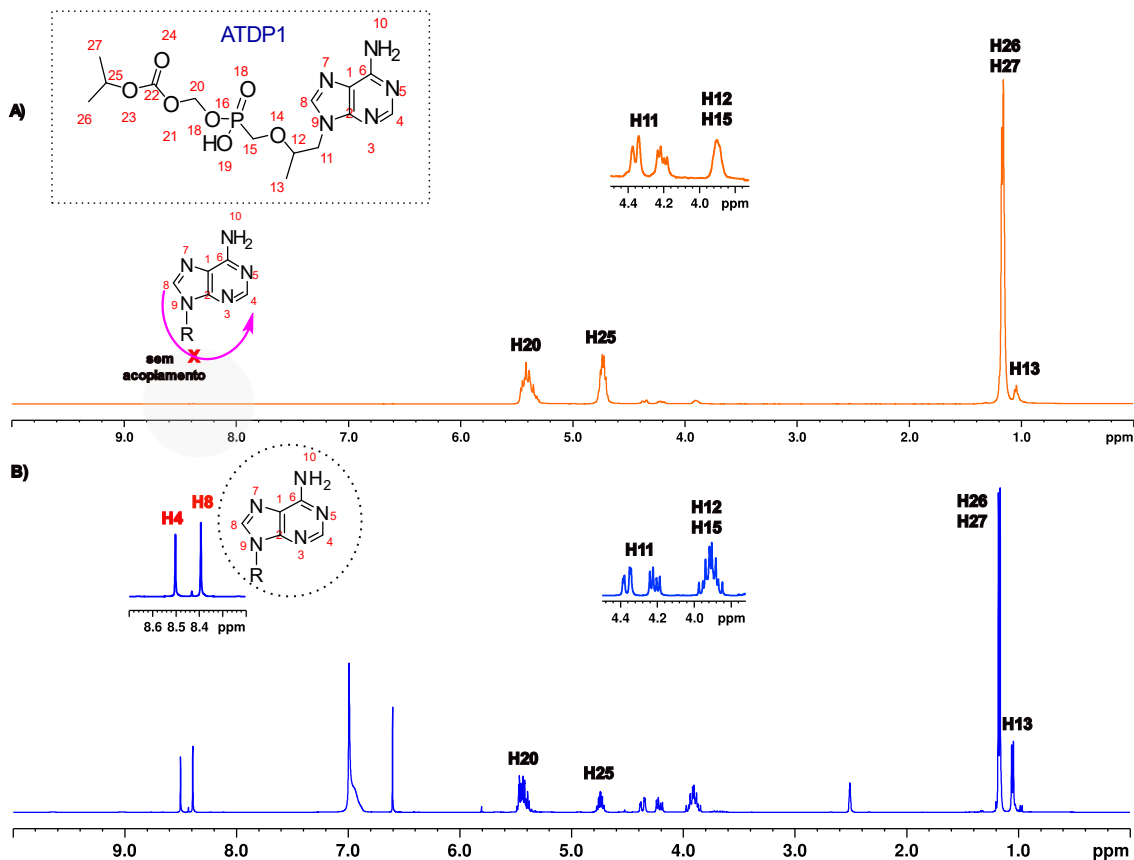


FIGURA 4.45. (A) Ampliação do espectro de ¹H-DREAMTIME com ausência dos sinais correspondentes aos hidrogênios H4 e H8; (B) Ampliação do espectro de ¹H convencional da mistura ácida do TDF. Todos os espectros foram realizados em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

A seleção de múltiplos compostos utilizando a DREAMTIME foi possível a partir do desenho da forma de onda selecionando o maior número de frequências, e que incluam o maior número de spins acoplados entre si das moléculas alvo, com ênfase nos sinais mais intensos e garantindo uma maior razão sinal/ruído no espectro de ¹H-DREAMTIME resultante. Na seleção dos produtos de degradação ATDP2 e ATDP3 (Figura 4.46) no caso da degradação ácida, e BTDP4 e BTDP5 (Figura 4.47) na degradação básica foram selecionados tanto os sinais mais intensos quanto os menos intensos de cada composto. Os sinais correspondentes ao produto de degradação ATDP2 possuem sobreposição com os sinais do TDF, portanto são sinais que vão mostrar uma maior intensidade quando comparados com os sinais isolados do ATDP3.

Observando-se uma razão sinal/ruído do produto ATDP3 menor, quando comparada com os sinais do ATDP2, o que se reflete nos espectros de ^1H -DREAMTIME obtidos, onde são observados sinais poucos intensos, porém existentes. Ajustando os parâmetros de aquisição: tempo de pulso para 30 ms e os filtros *zero quantum spoil*, *pressaturação*, *mixing time* de 90 ms e 7 Hz como média da constante de acoplamento, foi obtido o melhor espectro na seleção de múltiplos compostos simultaneamente através da técnica de DREAMTIME na mistura ácida do TDF.

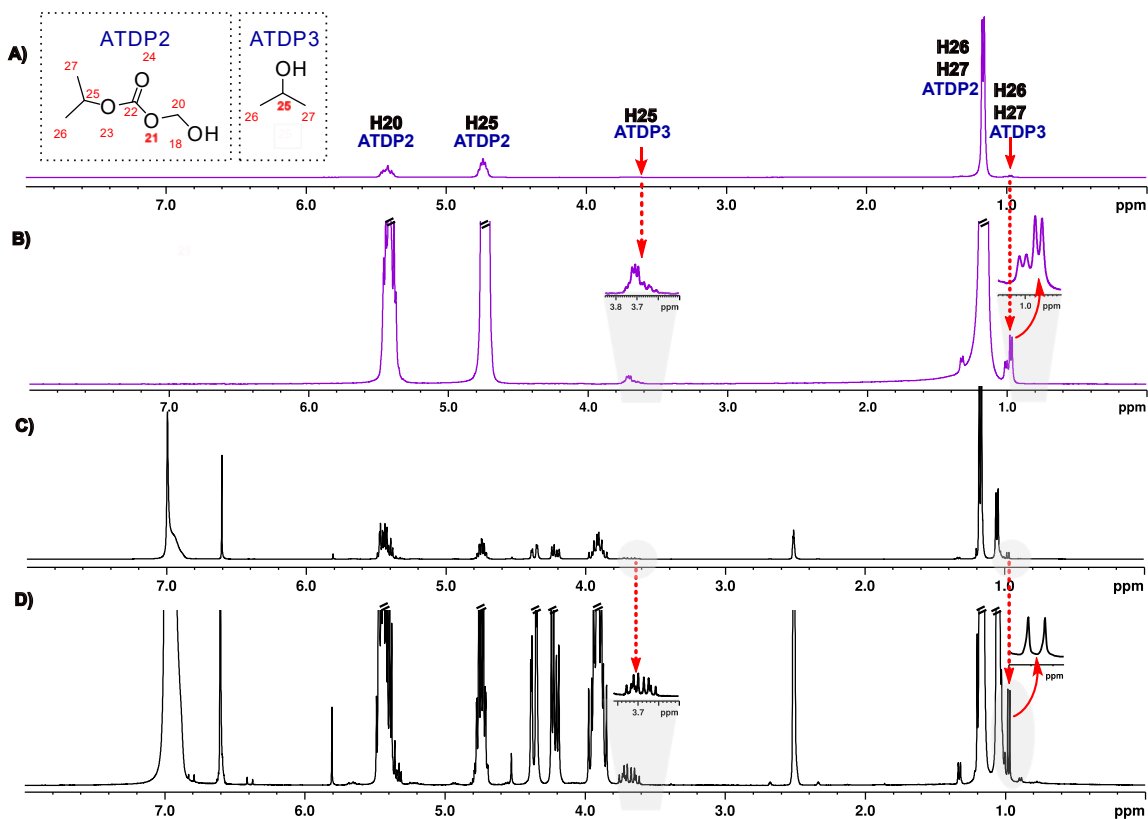


FIGURA 4.46. (A e B) Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME selecionando os produtos de degradação ATDP2 e ATDP3; (C e D) Ampliação do espectro de ^1H convencional da mistura ácida do TDF. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Por outro lado, no caso dos produtos de degradação BTDP4 e BTDP5, foram selecionados os sinais mais intensos de cada composto, porém, mesmo ajustando e otimizando os parâmetros de aquisição (filtros), os sinais selecionados no espectro final

não correspondem aos sinais dos produtos de degradação e sim aos sinais mais intensos que correspondem ao TDF (Figura 4.44).

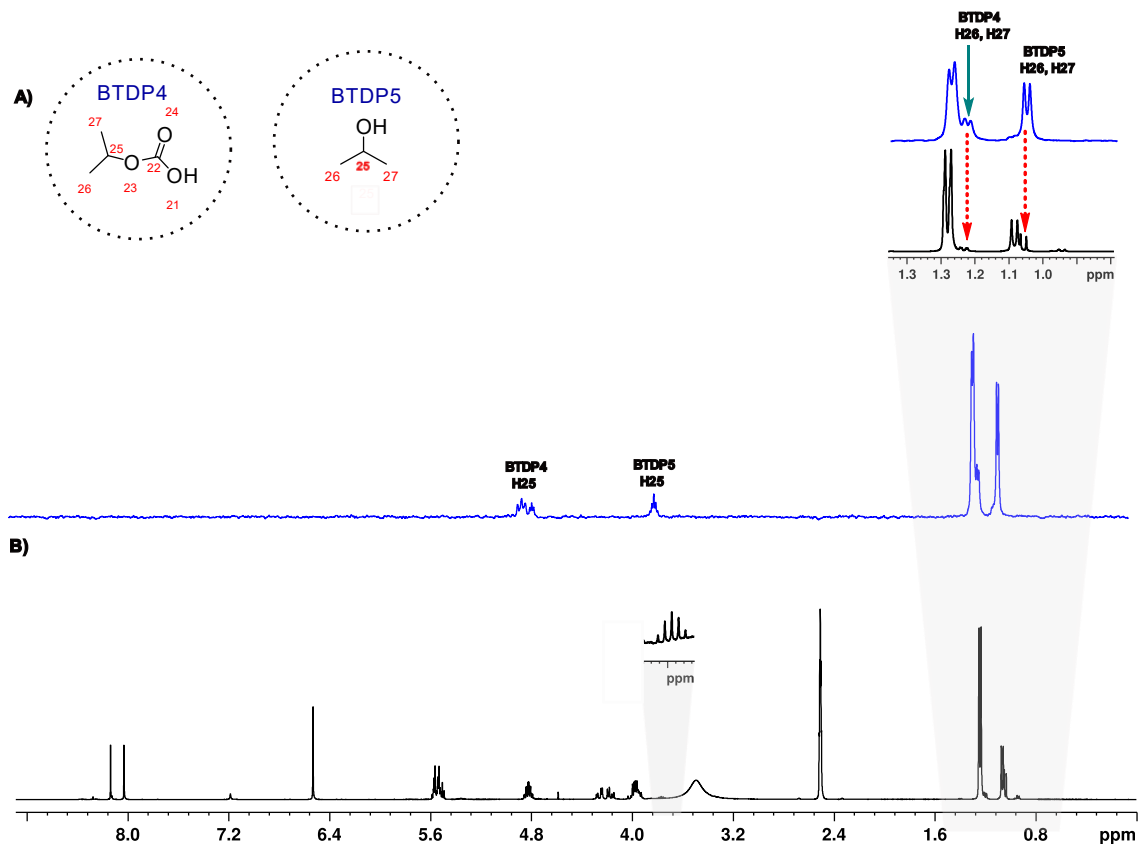


FIGURA 4.47. **A)** Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME selecionando os produtos de degradação BTDP4 e BTDP5; **B)** Ampliação do espectro de ^1H convencional da mistura básica do TDF. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

No caso da degradação básica do TDF, os sinais correspondentes aos produtos de degradação encontram-se em sobreposição parcial com os sinais do TDF, especialmente na região entre 0,90-1,30 ppm, região dos grupos metilas. Com o objetivo de avaliar a sensibilidade da técnica DREAMTIME na seleção dos compostos quando os sinais de interesse possuem baixa intensidade, foram realizados experimentos variando as concentrações da base, selecionando em cada uma delas os mesmos produtos de degradação. Foram testadas 2 concentrações: $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ da base

NaOD, que em proporção molar com o TDF (TDF:NaOD) resultaria em 1:1 e 1:2 respectivamente. Quando analisada a amostra (^1H , zg) na proporção de 1:1 foi observado que primeiramente os produtos de degradação começam a se formar, porém resultando numa intensidade baixa quando comparado com os sinais do TDF (Figura 4.48). A medida do aumento da concentração do NaOD, como é de esperar-se, a intensidade dos sinais dos produtos de degradação aumenta e os sinais correspondentes ao TDF diminui (Figura 4.48).

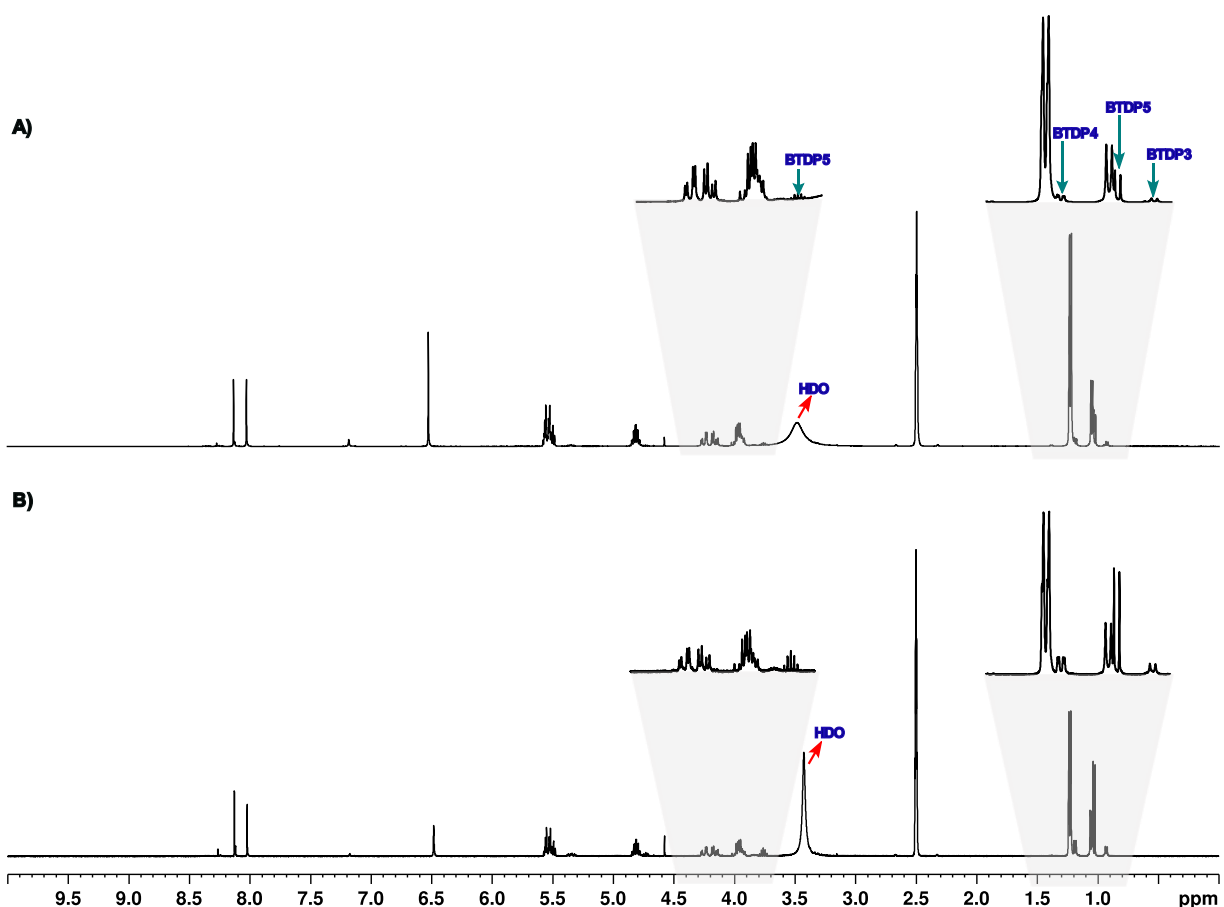


FIGURA 4.48. Ampliação do espectro de ^1H convencional da mistura básica do TDF na proporção: **A)** TDF: NaOD, 1:1; **B)** TDF: NaOD, 1:2. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

A DREAMTIME foi aplicada em cada uma das reações de degradação. Primeiramente, na reação com proporção 1:1, foram selecionados individualmente os

produtos de degradação BTDP5 e BTDP2, devido a que são moléculas pequenas e com seus sinais definidos no espectro de ^1H convencional da mistura básica. O duplete correspondente aos grupos metilas H26 e H27 em δ_{H} 1,04 ppm é observado na Figura 4.49 com baixa intensidade quando comparada com o restante dos dupletos (H26, H27 e H13) correspondentes aos grupos metilas da molécula do TDF e o multipletto que corresponde ao H25 em δ_{H} 3,98 ppm encontram-se em sobreposição parcial com vários hidrogênios do TDF assim como de outros produtos de degradação.

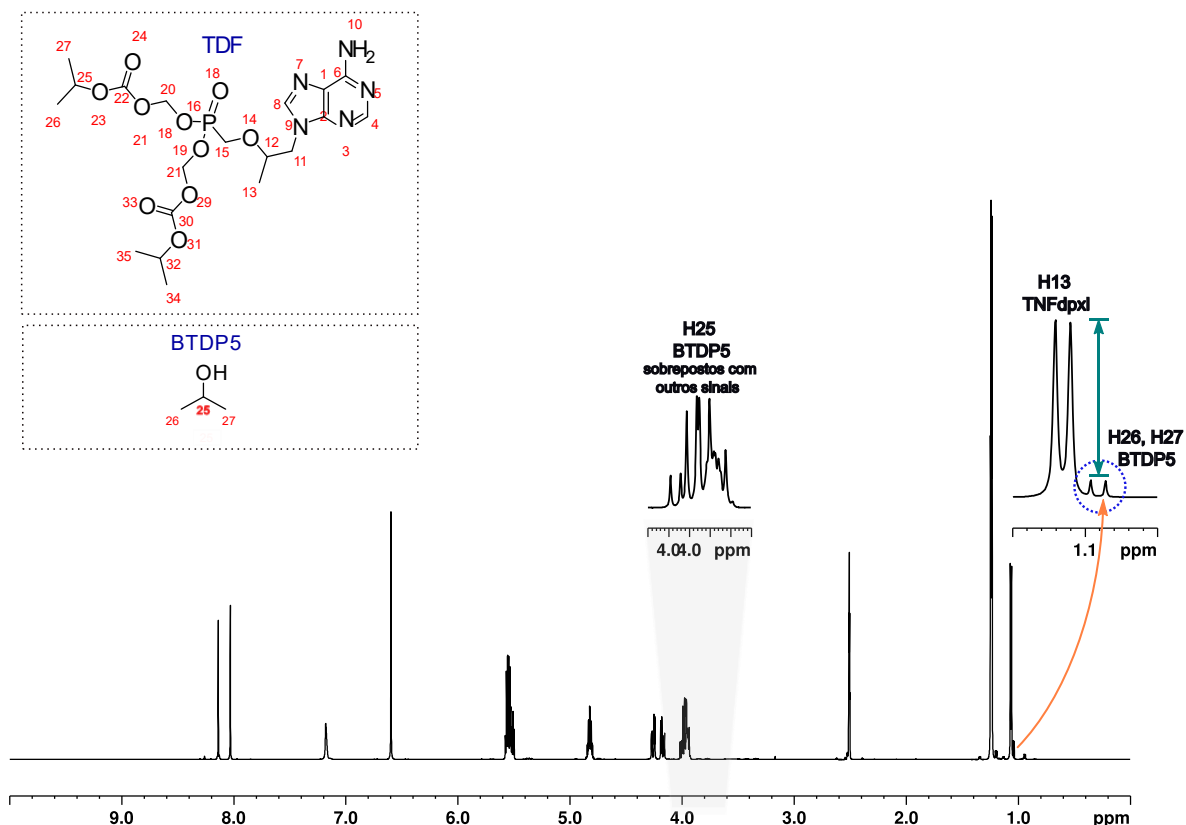


FIGURA 4.49. Ampliação do espectro de ^1H convencional da mistura básica do TDF. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Aplicando e ajustando os mesmos parâmetros de aquisição já discutidos anteriormente, na tentativa de selecionar o duplete de menor intensidade em δ_{H} 1,04 ppm foi observado que a técnica DREAMTIME não selecionou esse duplete e sim o sinal vizinho a ele, o duplete em δ_{H} 1,07 ppm correspondente ao H13 do TDF. A forma de

onda em amplitude e fase foi desenhada com uma largura de pulso de 40 ms, com o objetivo de aumentar a seletividade assim como também utilizando o maior número de frequências correspondentes a todos os deslocamentos químicos da molécula. Foram ativados os filtros *mixing time* e a média da constante de acoplamento em J . No caso do *mixing time* foram testados vários valores desde 0 até 280 ms e no caso da média da constante de acoplamento, os valores testados encontram-se na faixa de 6-8 Hz. Apesar do ajuste e da tentativa de otimizar os parâmetros já mencionados, não foi possível selecionar espectralmente o sinal que corresponde ao duplete em δ_H 1,03 ppm (Figura 4.50).

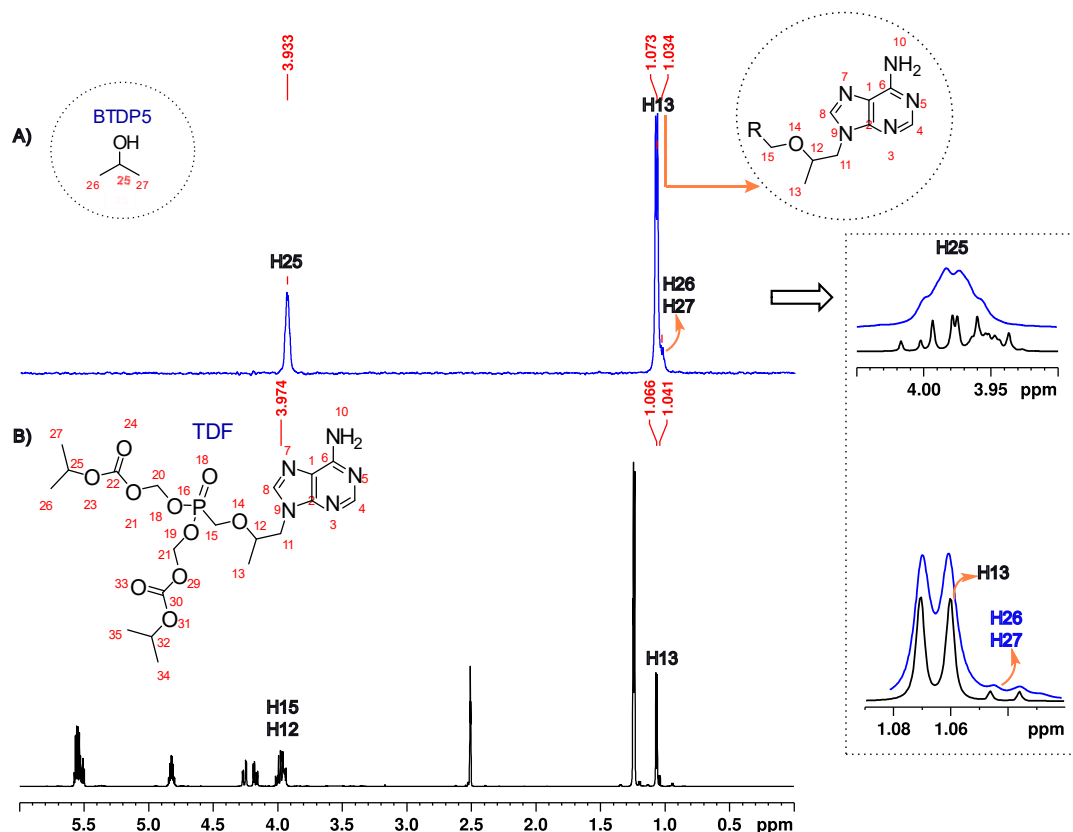


FIGURA 4.50. **A)** Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BTDP5 aplicando todos os filtros e com os parâmetros de aquisição otimizados. **B)** Ampliação do espectro de ^1H convencional da mistura ácida do TDF. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Como já foi discutido anteriormente, a DREAMTIME selecionará com ênfase o sinal mais intenso e a intensidade no espectro resultante serão equivalente a intensidade observada para o sinal selecionado no espectro de ^1H convencional. Isto foi novamente observado no espectro de obtido para o produto de degradação BTDP2, onde o sinal correspondente aos hidrogênios H26 e H27 mostra uma intensidade consideravelmente menor quando comparada com a intensidade do multipeto correspondente ao hidrogênio H20 em δ_{H} 5,48 ppm (Figura 4.51).

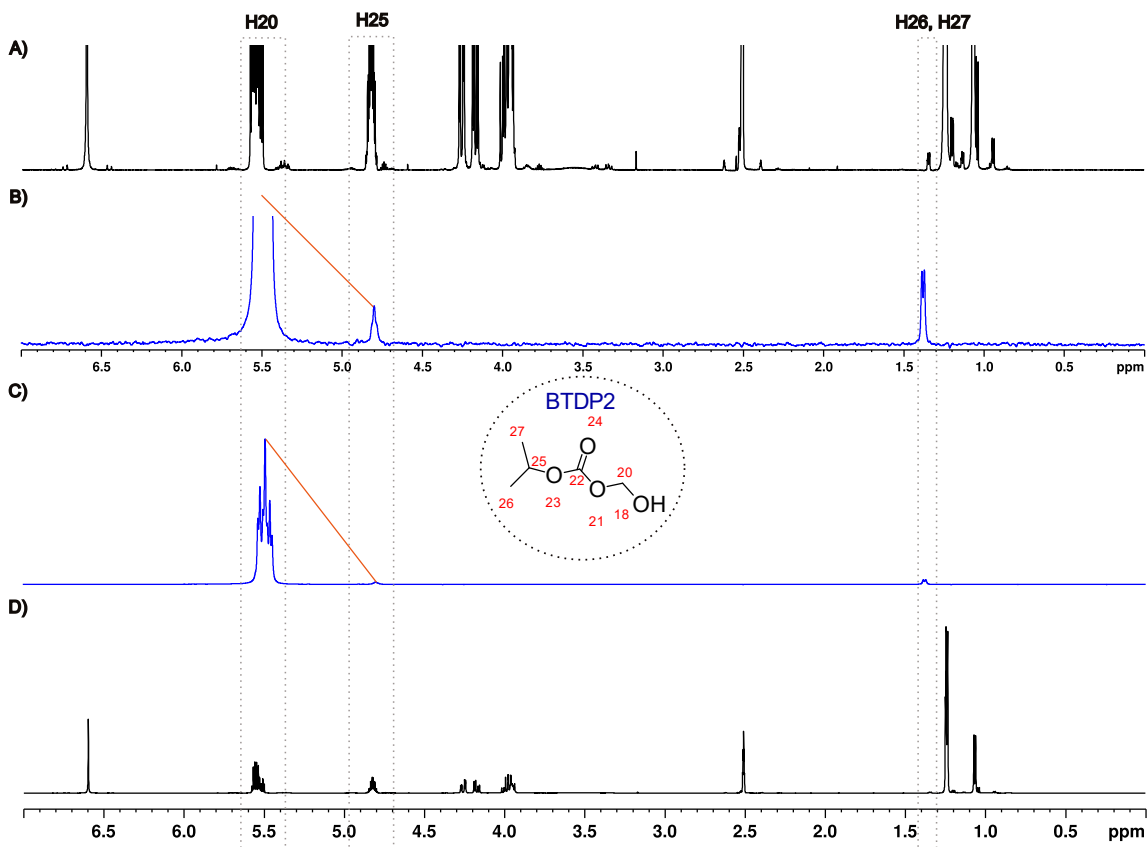


FIGURA 4.51. Ampliação do espectro de ^1H : **A)** convencional do TDF com zoom nos sinais correspondentes aos hidrogênios H27, H26 e H25; **B)** ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BTDP2 com valores de largura de pulso e ZQS, PR, TOCSY e AV otimizados com ênfase nos sinais dos hidrogênios H26, H27 e H25. **C)** ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BTDP2; **D)** ^1H convencional da mistura ácida do TDF. Todos

os espectros foram realizados em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

Após aumentar a concentração da base (NaOD) de 0,01 mol.L⁻¹ para 0,02 mol.L⁻¹, com o objetivo de forçar ainda mais a degradação e aumentar assim a intensidade dos sinais dos produtos de degradação, foi observado um aumento considerável da intensidade dos sinais dos produtos de degradação, especialmente no produto BTDP5 (Figura 4.52).

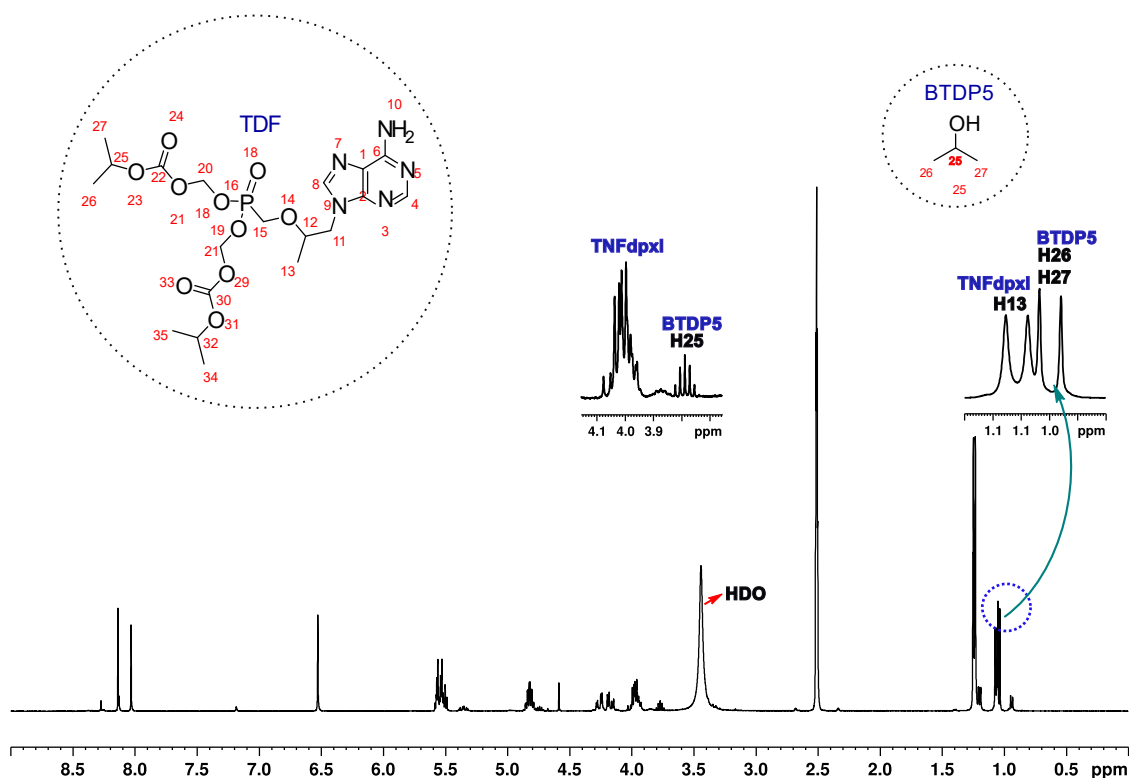


FIGURA 4.52. Ampliação do espectro de ¹H convencional da mistura básica do TDF com ênfase no produto de degradação BTDP5. Todos os espectros foram realizados em DMSO-d₆ a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

A DREAMTIME foi aplicada na seleção do produto de degradação BTDP5 cujo duplete correspondente aos hidrogênios H26 e H27 em δ_H 1,03 ppm foi seletivamente selecionado da mistura apesar da “sobreposição” parcial existente, ressaltando que,

nessa concentração, o sinal do duplete dos grupos metila do BTDP5 são observados numa maior intensidade quando comparado com o duplete vizinho a ele no espectro de ^1H convencional da mistura básica (Figura 4.53).

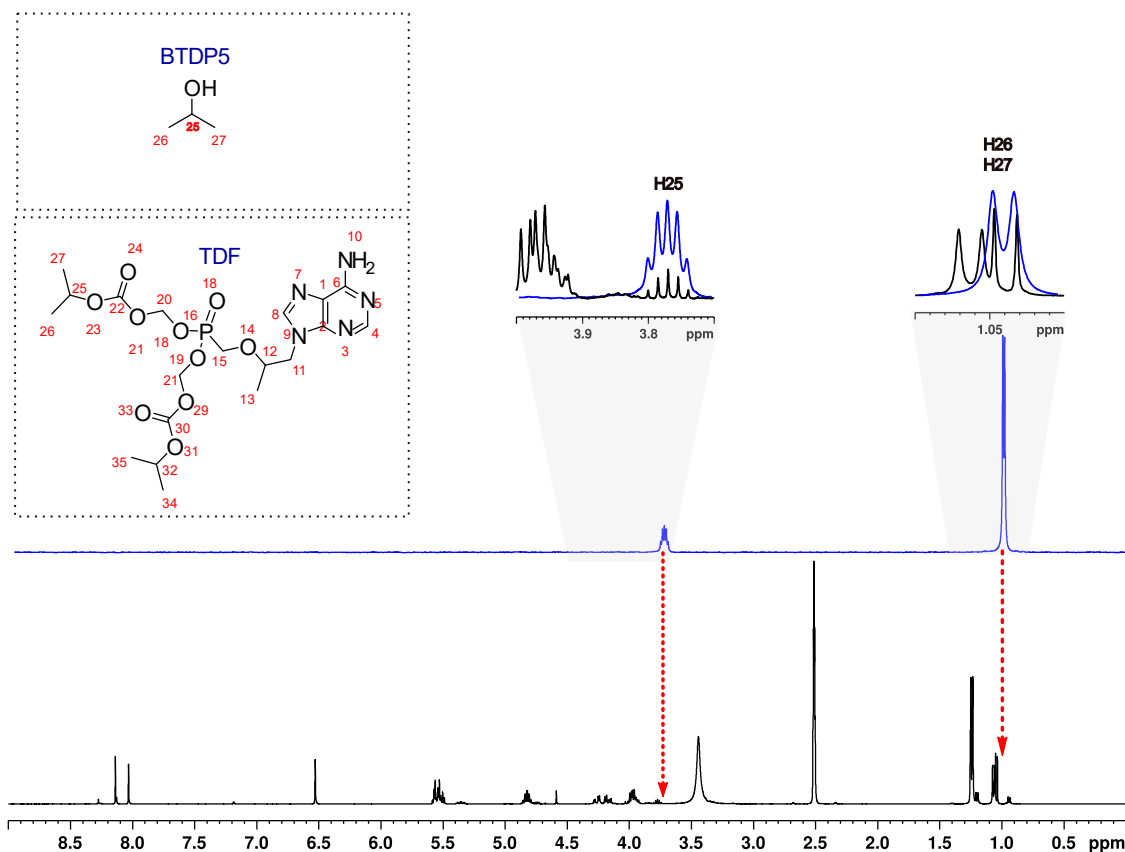


FIGURA 4.53. **A)** Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BTDP5. **B)** Ampliação do espectro de ^1H convencional da mistura básica do TDF. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

No caso do produto de degradação BTDP4, o duplo duplete em δ_{H} 1,19 ppm correspondente aos hidrogênios H26 e H27 estão muito próximo do duplo duplete correspondente aos hidrogênios H26 e H27 do TDF dando como resultado, mesmo aumentando a concentração da base e assim a intensidade do sinal, a DREAMTIME não selecionasse o sinal correspondente aos hidrogênio H26 e H27 do BTDP4 em δ_{H} 1,19 ppm e sim o duplo duplete em δ_{H} 1,24 ppm e no caso do multiplete, este sinal apresenta

sobreposição com o TDF e no espectro resultante de ^1H -DREAMTIME é observado o deslocamento químico correto, em δ_{H} 4,81 ppm (Figura 4.54).

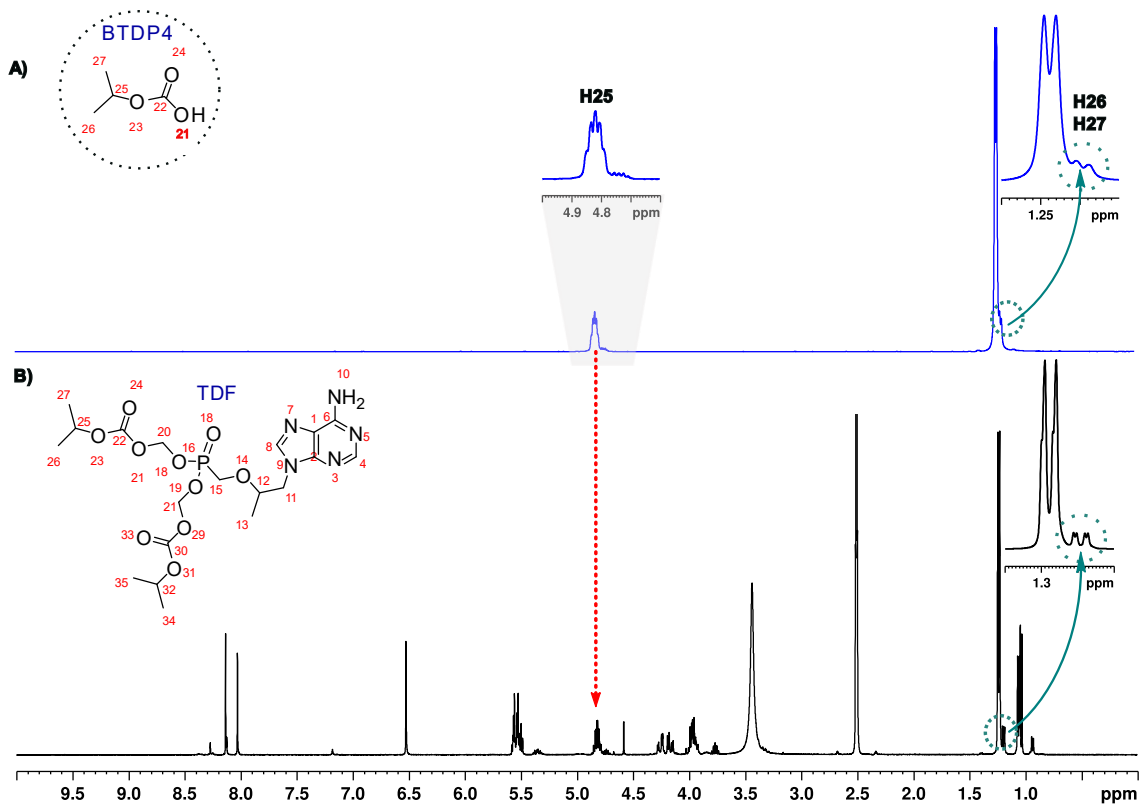


FIGURA 4.54. **A)** Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BTDP5. **B)** Ampliação do espectro de ^1H convencional da mistura básica do TDF. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Da mesma forma, no produto de degradação BDPT3 foi observado também a baixa seletividade quando o objetivo era selecionar o duplete correspondente ao hidrogênio H13 e, como resultado final, era observado um espectro final com seleção do duplete vizinho, o duplete em δ_{H} 1,05 ppm (H13 do TDF) e não do H13 do BTDP3 em δ_{H} 0,94 ppm. O resto dos sinais, multipletos na região de 3,90-4,50 ppm (H11, H12 e H15) aparecem nos seus deslocamentos químicos respectivos (Figura 4.55).

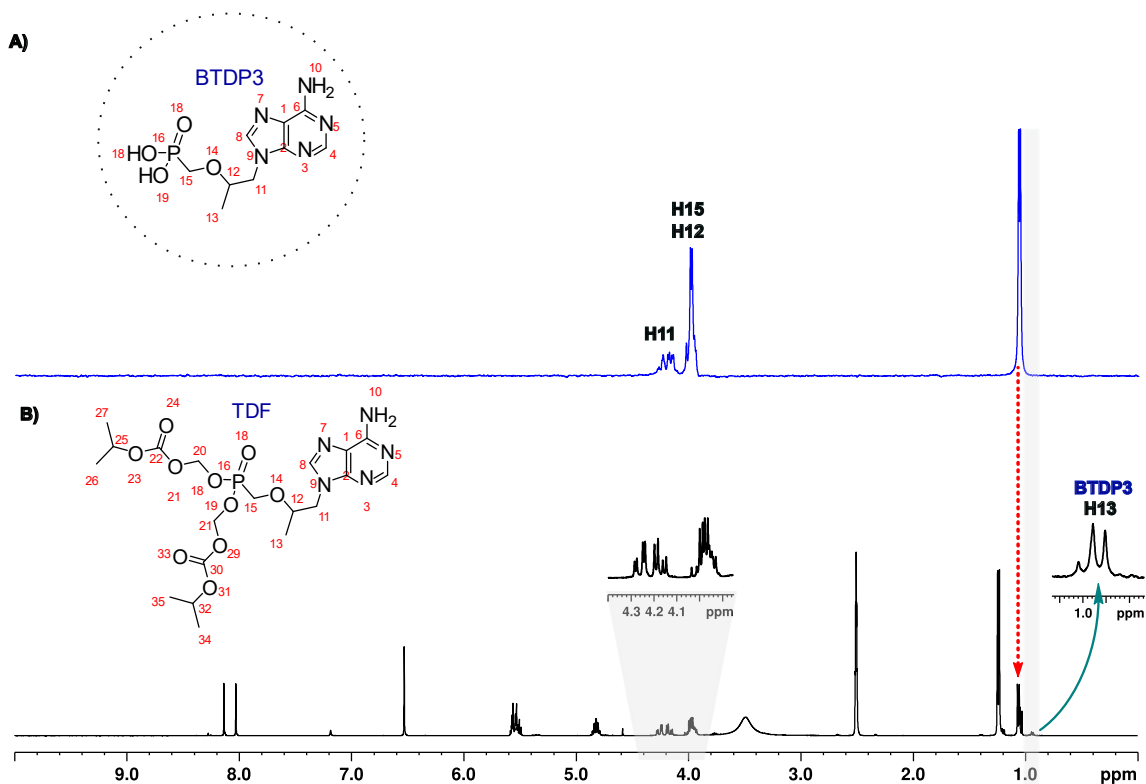


FIGURA 4.55. **A)** Ampliação do espectro de ^1H -DREAMTIME do produto de degradação BTDP3. **B)** Ampliação do espectro de ^1H convencional da mistura básica do TDF. Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Desta forma, ajustando todos os parâmetros (largura de pulso, filtros e número de frequências) e otimizando a concentração da mistura de degradação básica foi possível aumentar a intensidade dos sinais correspondentes aos produtos de degradação e com isto aumentar a seletividade da técnica DREAMTIME obtivendo espectros finais de ^1H -DREAMTIME de cada produto de degradação básica (Figura 4.56).

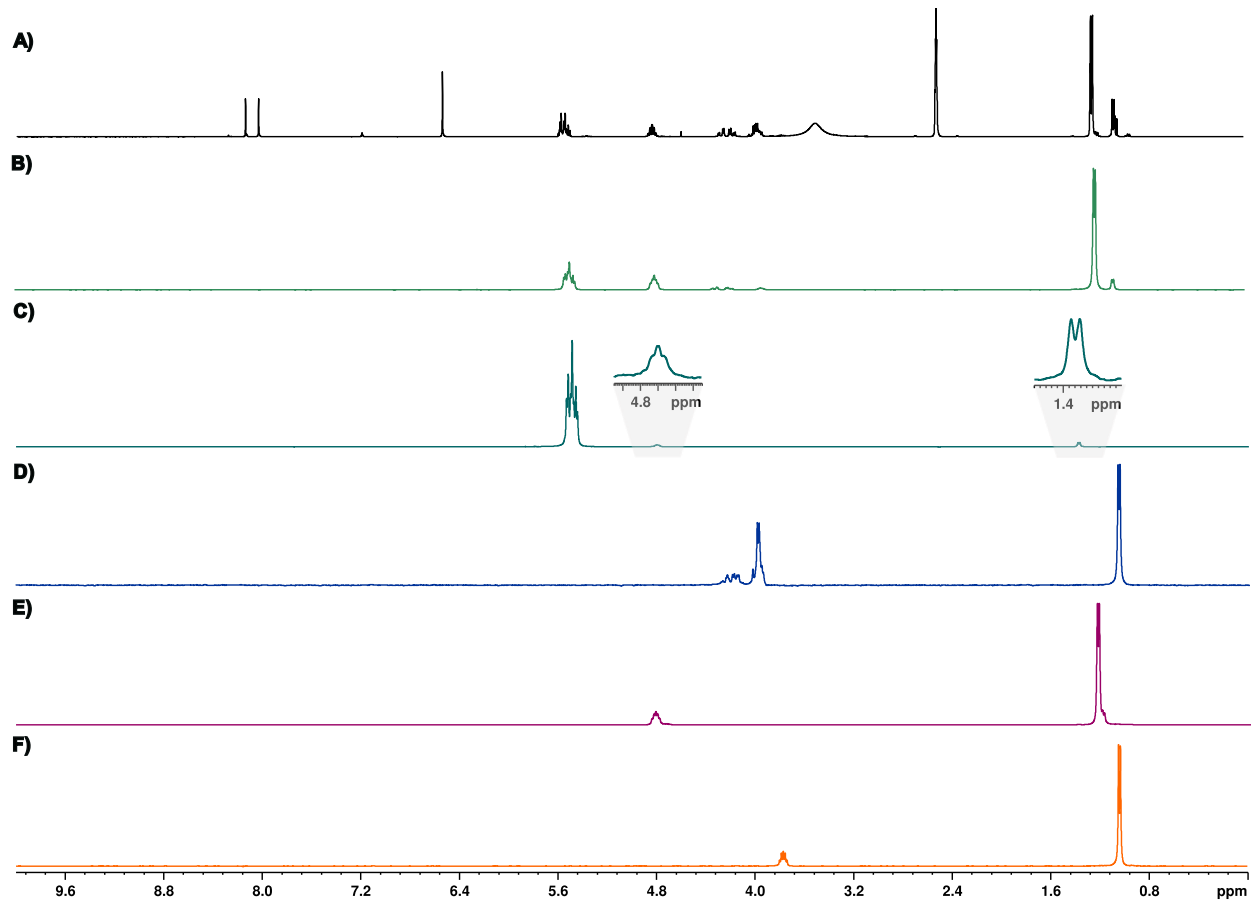


FIGURA 4.56. **A)** Ampliação do espectro de ^1H convencional da mistura de degradação básica do TDF Ampliação dos espectros de ^1H -DREAMTIME dos produtos de degradação BDT1 (**B**), BDPT2 (**C**), BDPT3 (**D**), BDPT4 (**E**) e BTDP5 (**F**). Todos os espectros foram realizados em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

4.2.1.8 Quantificação do TDF e seus produtos de degradação a partir de RMN- ^1H .

A quantificação do TDF e seus produtos de degradação foi realizado aplicando a mesma equação (equação 2) e a partir dos seus sinais isolados. Nos espectros de RMN- ^1H (sob condições quantitativas), tanto da mistura ácida quanto da mistura básica, o TDF apresentou sobreposição em todos os seus sinais, sem a presença de sinais isolados que permitissem a determinação da massa degradada após 48 horas como tempo de degradação. Portanto, foi realizada a quantificação apenas dos produtos de degradação

ATDP3 e ATDP4, para o caso da degradação ácida e para o caso da degradação básica, foram quantificados os produtos de degradação BTDP2, BTDP3 e BTDP5.

Como mencionado, sob condição ácida, foi possível determinar a massa gerada após 48h de degradação do produto ATDP3 a partir do duplete correspondente aos hidrogênios H26 e H27 em δ H 0,97 ppm ($J= 6,13$ Hz), único sinal isolado do produto. Determinando-se uma concentração de $0,002 \text{ mol.L}^{-1}$ o que equivale a $0,059 \text{ mg}$ de produto de degradação. A intensidade dos sinais do ATDP3 resultou consideravelmente menor quando comparada com a intensidade dos sinais correspondentes ao TDF, o que leva a ter uma baixa relação sinal ruído (SNR) e por conseguinte o que leva também a uma margem de erro maior (2-4 %), porém dentro do valor aceitável (5 %). No caso do ATDP4, a determinação da massa gerada após 48h de degradação foi a partir do simpleto em δ H 5,79 ppm correspondente ao hidrogênio H20. Foi determinada uma massa de $0,070 \text{ mg}$ ($0,0015 \text{ mol.L}^{-1}$), Figura 4.57, Tabela 4.3.

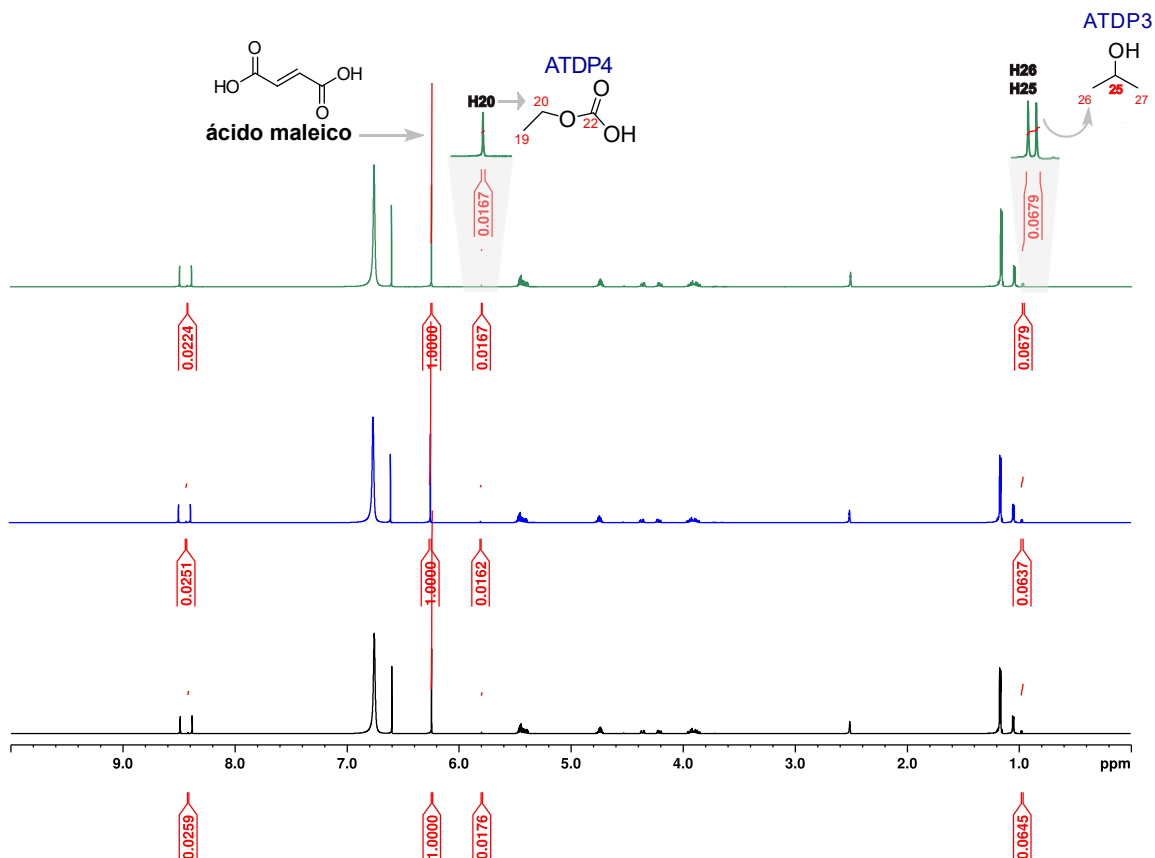


FIGURA 4.57. Ampliação do espectro de ^1H (zg) da mistura de degradação ácida do TDF

sob condições quantitativas utilizando como estandar interno o ácido maleico na quantificação do ATDP3 e ATDP4. Os espectros foram realizados em triplicata, em DMSO-d6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

TABELA 4.3. Quantificação dos produtos de degradação ácida do TDF: ATDP2, ATDP3 e ATDP4.

ATDP	δ ^1H (ppm)	N° H	% Erro	Tempo de reação: 48 h	
				Concentração (mol.L $^{-1}$)	Massa (mg)
ATDP3	0,97	H26, H27	2,78	0,001963	0,059
ATDP4	5,79	H20	3,43	0,001517	0,070

Após 48 horas de degradação sob condições básicas, o TDF mostrou a formação dos seus produtos de degradação em uma menor concentração, o que foi demonstrado através da quantificação realizada a partir dos seus espectros respectivos, realizados em triplicata. Os produtos de degradação BTDP2, BTDP3 e BTDP5 apresentaram sinais isolados nos seus espectros de hidrogênio respectivos, o que possibilitou a sua quantificação dentro da margem de erro menor ou igual a 5% (Tabela 4.4). No caso do produto BTDP2, quantificação foi realizada a partir do seu sinal do duplete correspondente aos hidrogênio H26 e H27 em δH 1,32 ppm ($J= 6,14$ Hz), único sinal isolado do produto, determinando-se uma concentração de 0,000023 mol.L $^{-1}$ e 0,0015 mg de produto de degradação. No caso do produto de degradação BTDP3, o seu sinal em δH 1,01 ppm correspondente ao hidrogênio H13 permitiu determinar a sua concentração, a qual resultou em 0,00021 mol.L $^{-1}$ o que equivale a 0,0018 mg de produto de degradação. Por outro lado, o produto de degradação BTDP5 foi gerado em uma concentração de 0,00018 mol.L $^{-1}$, o que equivale a 0,0054 mg a partir do seu sinal em δH 1,03 ppm (Tabela 4.4, Figura 4.58). No caso do TDF não foi possível determinar o quanto dele foi degradado/consumido durante o tempo reacional de 48 horas e a geração

dos produtos de degradação devido à ausência de sinais que fossem totalmente isolados e que correspondessem unicamente ao TDF como princípio ativo.

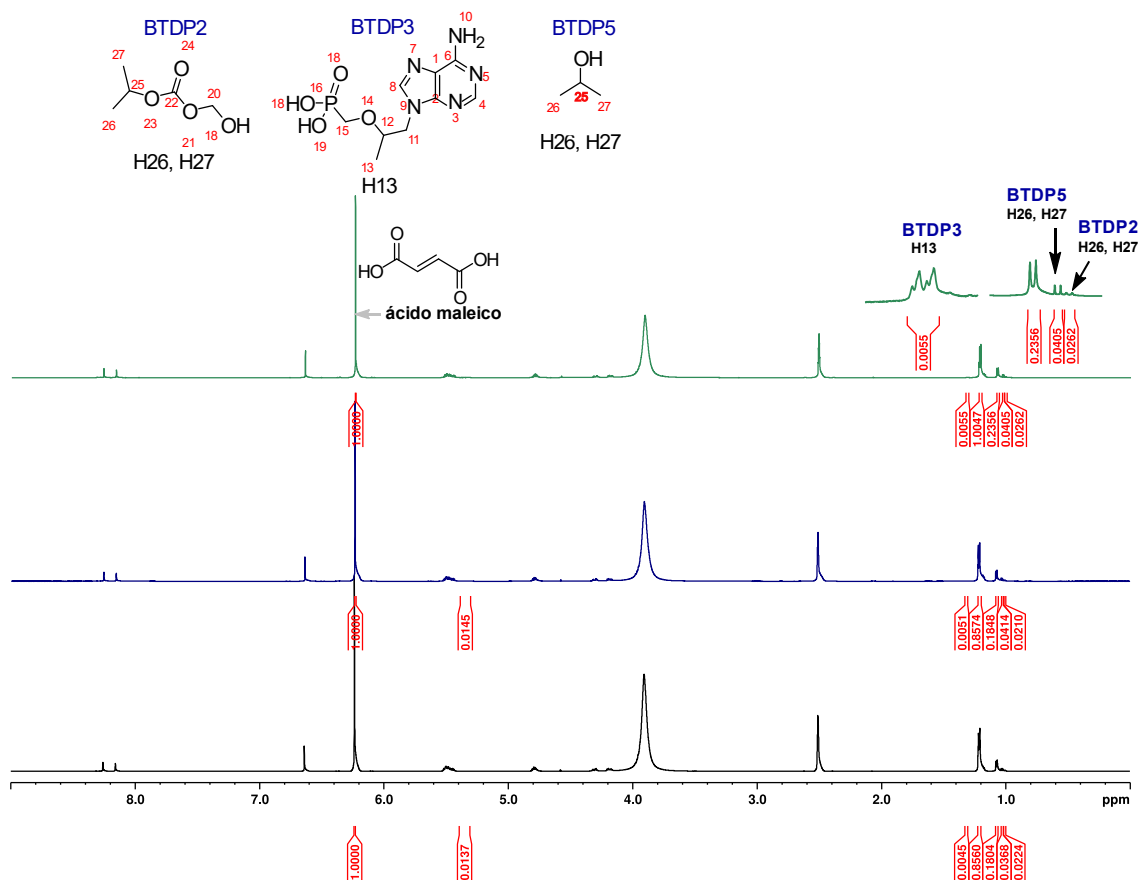


FIGURA 4.58. Ampliação do espectro de ^1H (zg) da mistura de degradação básica do TDF sob condições quantitativas utilizando como estândar interno o ácido maleico na quantificação do BTDP2, BTDP3 e BTDP5. Os espectros foram realizados em triplicata, em DMSO- d_6 a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Tabela 4.4. Quantificação dos produtos de degradação básica do TDF: BTDP2, BTDP3 e BTDP5.

BTDP	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	N° H	% Erro	Tempo de reação: 48 h	
				Concentração (mol.L $^{-1}$)	Massa (mg)
BTDP2	1,32	H26, H27	2,87	0,0000228	0,00152

BTDP3	1,01	H13	1,52	0,000211	0,00179
BTDP5	1,03	H26, H27	5,06	0,00018	0,00541

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, foi implementada a técnica avançada DREAMTIME para a análise de misturas complexas, como as misturas de degradação ácida e básica dos fármacos sofosbuvir (SOF) e fumarato de tenofovir desoproxila (TDF). A técnica que inicialmente aplicada para uma amostra de composição conhecida (L-alanina, L-fenilalanina, ácido maléico, nicotinamida e ácido aspártico), mostrou-se eficaz na separação espectral dos produtos de degradação sem a necessidade de separação física.

Otimização dos filtros: Foi necessário otimizar filtros espectrais, como ZQS, PR, AV, e TOCSY, para cada molécula ou grupo de moléculas. O filtro TOCSY eliminou problemas de fase, enquanto o filtro AV ajustou a intensidade dos sinais no espectro de ^1H -DREAMTIME.

Degradação dos fármacos: As reações de degradação ácida e básica do SOF e do TDF foram realizadas de acordo com as diretrizes da ANVISA (RDC nº58, 2013). Sete produtos de degradação ácida (ADP1, ADP2, ADP3, ADP4, ADP5, ADP6 e ADP7) e cinco básica (BDP1, BDP2, BDP3 e BDP4) foram identificados para o SOF, enquanto quatro produtos de degradação ácida (ATDP1, ATDP2, ATDP3 e ATDP4) e cinco produtos de degradação básica (BTDP1, BTDP2, BTSP3, BTDP4 e BTDO5) foram identificados para o TDF.

Separação espectral com DREAMTIME: A técnica DREAMTIME foi eficaz para separar espectralmente os produtos de degradação das misturas ácida e básica, tanto individualmente quanto simultaneamente. No entanto, a quantificação via DREAMTIME mostrou-se inviável com padrões primários, sendo necessárias amostras enriquecidas.

Quantificação dos produtos de degradação:

Sofosbuvir: Após 48 horas de degradação, houve uma perda de 10,10% (2,58 mg) na degradação ácida e 1,17% (0,32 mg) na degradação básica. Foram quantificados quatro produtos de degradação ácida (ADP3, ADP4, ADP5, ADP7) e dois produtos básicos (BDP1 e BDP2).

TDF: Na degradação ácida, foram quantificados dois produtos (ATDP3 e ATDP4), e na degradação básica, três produtos (BTDP2, BTDP3 e BTDP5). A ausência de sinais isolados impediu a quantificação completa do TDF como princípio ativo.

Limitações: A falta de sinais isolados de alguns produtos de degradação (como ADP1, ADP2, ADP6, BDP3 e BDP4) impediu a quantificação total, levando a uma diferença entre a massa dos produtos de degradação e a massa do princípio ativo degradado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL B., JAGDALE S. & GANDHI S. Forced degradation study of Sofosbuvir: Identification of degradation products by LC-ESI-MS. *Indian J. Pharm. Edu. Res.* 56(2), 2022.
- AGUILAR J., FAULKNER S., NILSSON M. & MORRIS G. Pure shift ¹H NMR: a resolution of the resolution problem?. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49(23), 3901-3, 2010.
- ALCÂNTARA F. C., RESCIA V. C., SANTOS M. A. & VALDUGA C. J. Testes de degradação forçada para fármacos e medicamentos. *Ver. Pesq. Inov. Farm.* 5 (1), 38-48, 2013.
- ANANDGAONKAR V., GUPTA A., KONA S. & TALLURI M. Isolation, LC-MS/MS and 2D-NMR characterization of alkaline degradants of tenofovir disoproxil fumarate. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107, 175-185, 2015.
- BACKER L., BUSCHMANN H., KINZIG M., SORGEL F., SCHERF-CLAVEL O. & HOLZGRABE U. Application of advanced high resolution mass spectrometric techniques for the analysis of losartan potassium regarding known and unknown impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 240, 115955, 2024.
- BLESSY M., RUCHI D. P., PRAJESH N. P. & AGRAWAL Y. K. "Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review". *J. Pharm. Anal.*, 4 (3), 159-165, 2014.
- BLOCH F., HANSEN W. W., PACKARD M. The nuclear induction experiments. *Phys. Rev.*, 70 (7-8), 474-485, 1946.
- BOTANA A., HOWE P., CAER V., MORRIS G. & NILSSON M. High resolution ¹³C DOSY: The DEPTSE experiment. *J. Magn. Res.* 211, 25-29, 2011.
- CALDEIRA, A. S. P. Estudo de Degradação Forçada, Desenvolvimento e Validação de Método Analítico de Teor e Substâncias Relacionadas para Avaliação da Estabilidade de Comprimidos de Leflunamida. Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – FIOCRUZ, 2014, 194 p.
- DUMEZ J-N. NMR methods for the analysis of mixtures. *Chem. Commun.* 58, 13855, 2022.
- FOROOZANDEH M., MORRIS G. & NILSSON M. PSYCHE pure shift NMR spectroscopy. *Chem. Eur. J.* 2009.
- GABRIC A., HODNIK Z., PAJK S. Oxidation of drugs during drug product development: problems and solutions. *Pharmaceutics*, 14, 325, 2022.
- GAJJAR A. & SHAH V. Isolation and structure elucidation of major alkaline degradant of Ezetimibe. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 225-229, 2011.

- GOLLA V., KURMI M., SHAIK K. & SINGH S. Stability behavior of antiretroviral drugs and their combinations. 4: characterization of degradation products of tenofovir alafenamide fumarate and comparison of its degradation and stability behaviour with tenofovir disoproxil fumarate. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 131, 146-155, 2016.
- HATZAKIS E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy in food science: a comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 189-220, 2019.
- IRAM F., IRAM H., IQBAL A. & HUSAÍN A. Forced degradation studies. *J. Anal. Pharm. Res.* 3 (6), 2016.
- JEHANGIR M. Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development. *J. Med. Org. Chem.* 1, 1, 2018.
- JENNE A., BERMEL W., MICHAL C., GRUSCHKE O., SOONG R., BISWAS G. R., BASTAWROUS M. & SIMPSON A. DREAMTIME NMR spectroscopy: targeted multi-compound selection with improved detection limits. 61 (19), 2022.
- KATHAR N., RAJPUT N., JADAV T., SENGUPTA P. Potential degradation products of abemaciclib: identification and structural characterization employing LC-Q/TOF-MS and NMR including mechanistic explanation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 237, 115762, 2024.
- KHERA S., GRILLO M., SCHNIER P. & HOLLIS S. Application of diffusion-edited NMR spectroscopy for the structural characterization of drug metabolites in mixtures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 164-169, 2010.
- KIRALY P., SWAN I., NILSSON M. & MORRIS G. Improving accuracy in DOSY and diffusion measurements using triaxial field gradients. *J. Magn. Res.* 2016
- KURMI M., GOLLA V., KUMAR S., SAHU A & SINGH S. Stability behavior of antiretroviral drugs and their combinations. 1: Characterization of tenofovir disoproxil fumarate degradation products by mass spectrometry. *RSC Adv.* 2015.
- LHOSTE C., LORANDEL B., PRAUD C., MARCHAND A., MISHRA R., DEY A., BERNARD A., DUMEZ J-N., GIRAUDEAU P. Ultrafast 2D NMR for the analysis of complex mixtures. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 130-131, 1-46, 2022.
- LI K., LIU M., ZHANG M., LI Q., YU K., LI J., SHANG Z. & CAI W. Rapid characterization of the potential active metabolites of diacerin in rat plasma based on UHPLC-Q-exactive orbitrap mass spectrometry and molecular docking. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 233, 115447, 2023.
- MAGGIO R. M., CALCO N. L., VIGNADUZZO S. E. & KAUFMAN. Pharmaceutical impurities and degradation products: uses and applications of NMR techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014.

MCKENZIE J., DONARSKI J., WILSON J. C. & CHARLTON A. Analysis of complex mixtures using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 59, 336-359, 2011.

MOUTZOURI P. *New and Improved Methods for Mixture Analysis by NMR*. Manchester, Faculty of Science and Engineering, University of Manchester, 2018, 220 p.

NGWA G. Forced degradation studies. Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development. *Drug Delivery Techn.* 10 (5), 2010.

PATRA S. R., BALI A., SAHA M., SINGH., SHEKHAR S. Method validation and characterization of stress degradation products of gefitinib through UPLC-UV/PDA and LC-MS/TOF studies. *Int. J. Mass Spectrom.* 490, 117070, 2023.

POTTABATHINI V., GUGULOTHU V., KALIYAPERUMAL, BATTU S. Identification, isolation and structure confirmation of forced degradation products of Sofosbuvir. *Am. J. Anal. Chem.* 7, 797-815, 2016.

PURCELL E. M., TORREY H. C. & POUND R. V. "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid". Radiation Laboratory, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, 1945. p. 37-38.

QIU F., NORWOOD D. Identification of pharmaceutical impurities. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (5), 877-935, 2007.

RABI I. I., ZACHARIAS J. R., MILLMAN S., KUSH P. "A new method of measuring nuclear magnetic moment". Hunter College, Columbia University, New York, 1938. p. 318.

RAO R. N., RAMAKRISHNA K., SRAVAN B., SANTHAKUMAR K. RP-HPLC separation and ESI-MS, ¹H, an ¹³C NMR characterization of forced degradants including process related impurities of carisbamate: method development and validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 77, 49-57, 2013.

RAVISANKAR P., SWATHI V., BABU P. S., SULTANA S. & GOUSEPEER SK. Current trends in performance of forced degradation studies and stability indicating studies of drugs. *J. Pharm. Biol. Sci.* 12 (6), 17-36, 2017.

SALVADOR M. V.; ALEGRE, P. *Análise de misturas e monitoramento da troca isotópica h/d em fármacos por ressonância magnética nuclear*. Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Química - UFRGS, 2024, Tese de Doutorado, 149 p.

SILVA G. *New rules about forced degradation studies in Brazil*. Analytical Science AnALYST, GSK Brazil. 2016

SHAH R. & SINGH S. Identification and characterization of a photolytic degradation product of telmisartan using LC-MS/TOF, LC-MS_n, LC-NMR and on-line H/D exchange mass studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 755-761, 2010.

SWAIN D., SAMANTHULA G., BHAGAT S., BHARATAM P. V., AKULA V. & SINHA B. Characterization of forced degradation products and in silico toxicity prediction of sofosbuvir: a novel HCV NS5B polymerase inhibitor. J. Pharm. Biomed. Anal. 2015.

6. Anexos

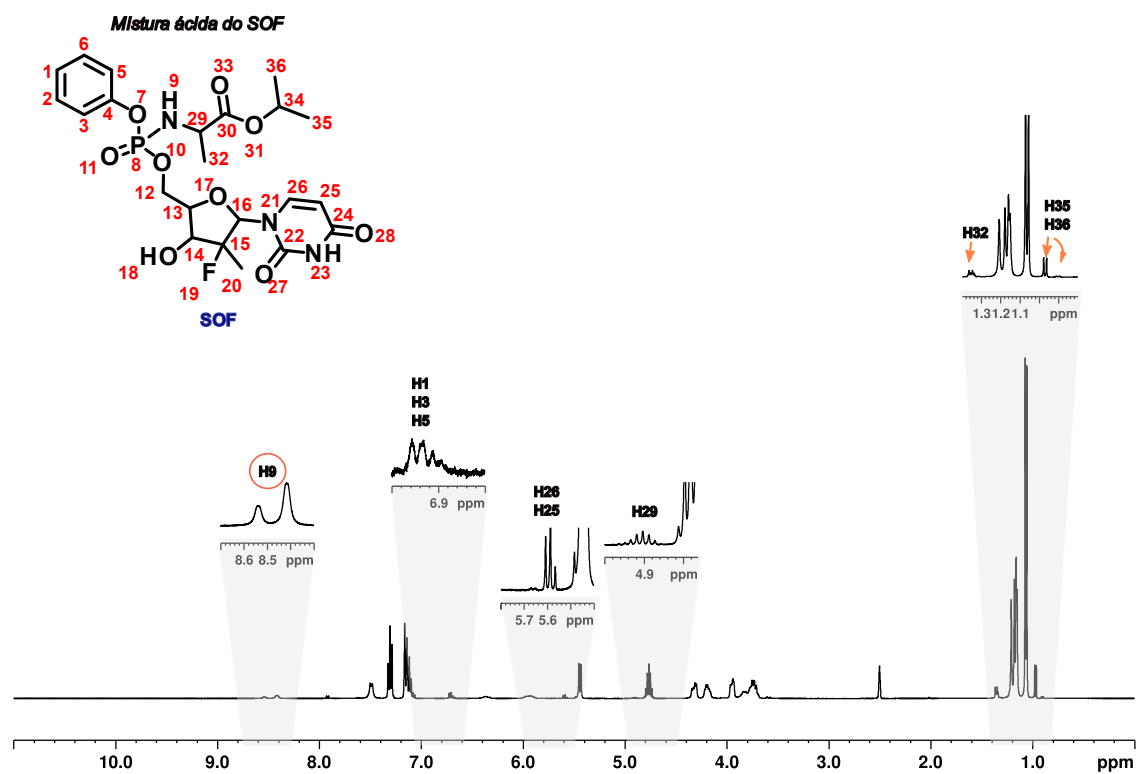


Figura 5. Espectro de RMN- ^1H convencional da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

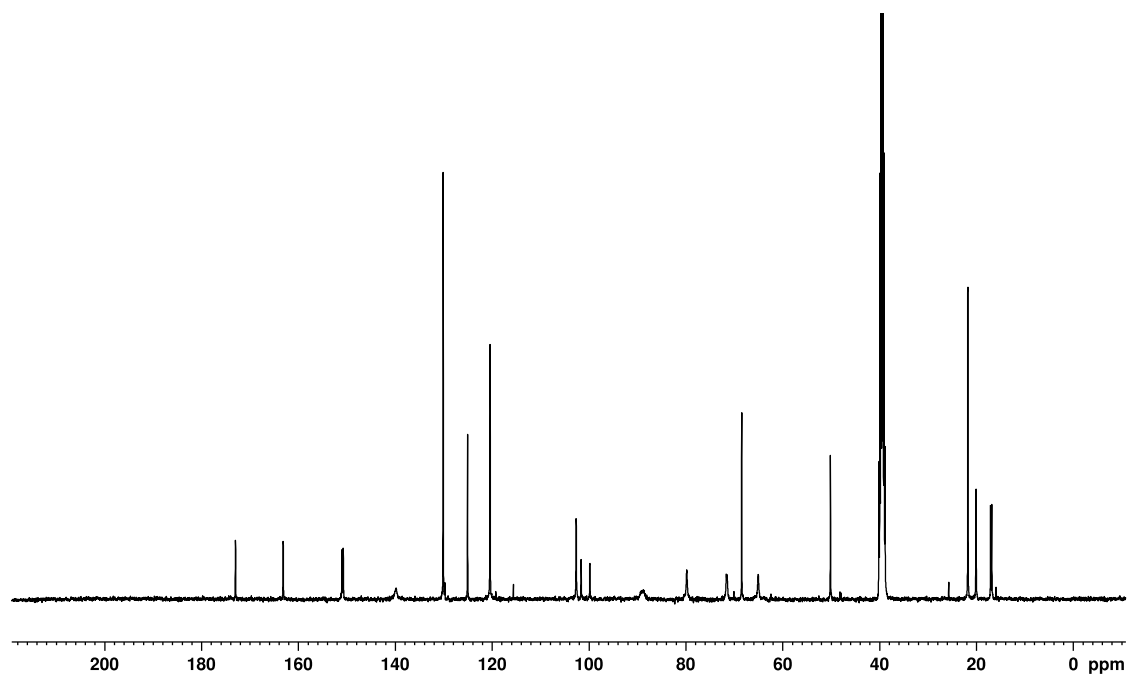
Mistura ácida do SOF

Figura 6. Espectro de RMN- ^{13}C da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 100 MHz (para o núcleo de ^{13}C) e a 298 K.

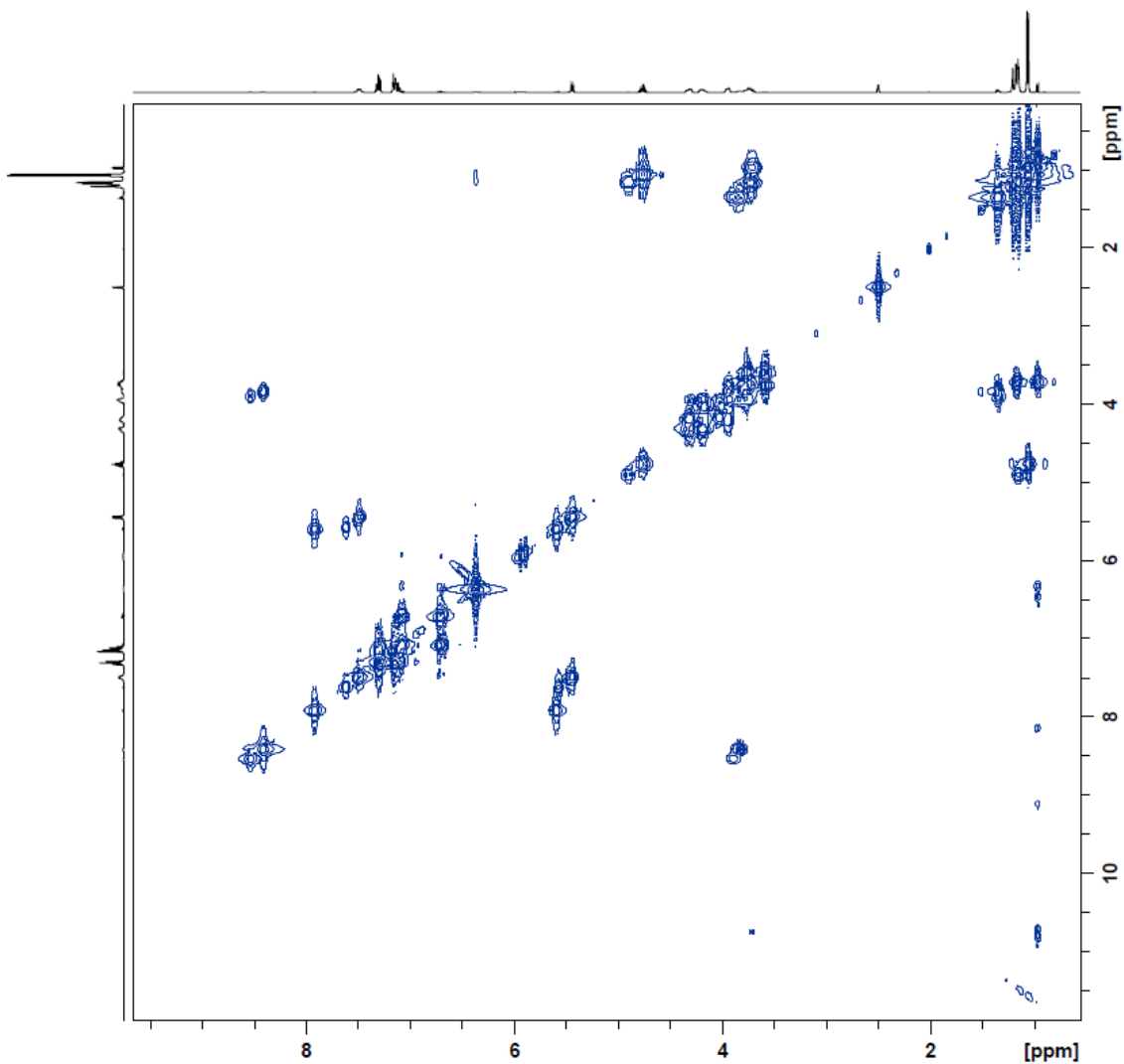


Figura 7. Mapa de contorno do gCOSY da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

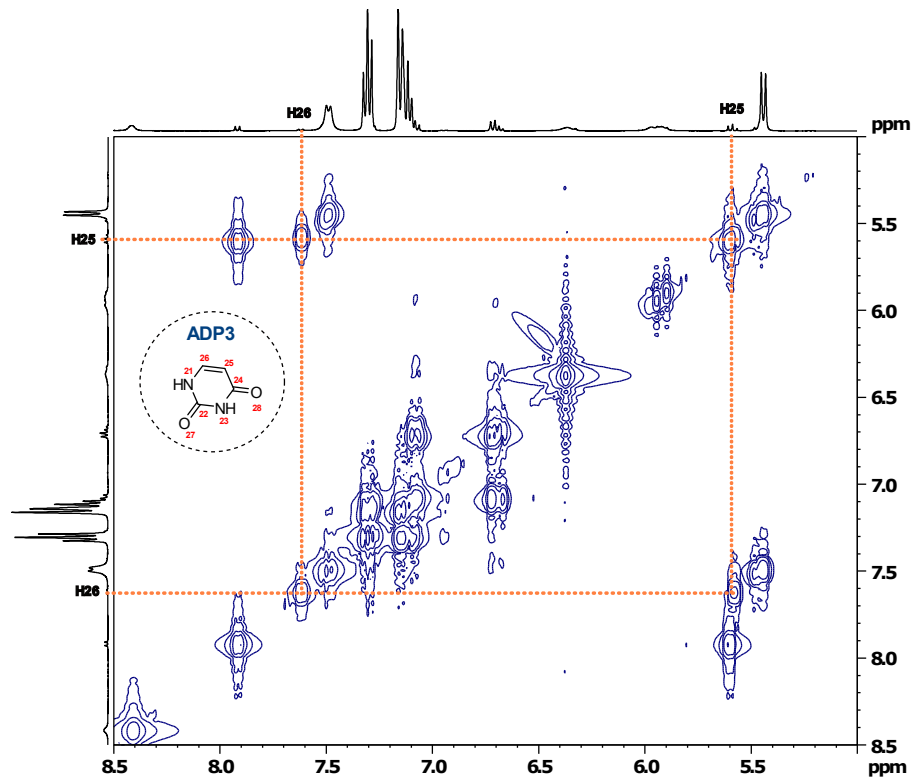


Figura 8. Ampliação do mapa de contorno do gCOSY do produto de degradação ADP3 da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

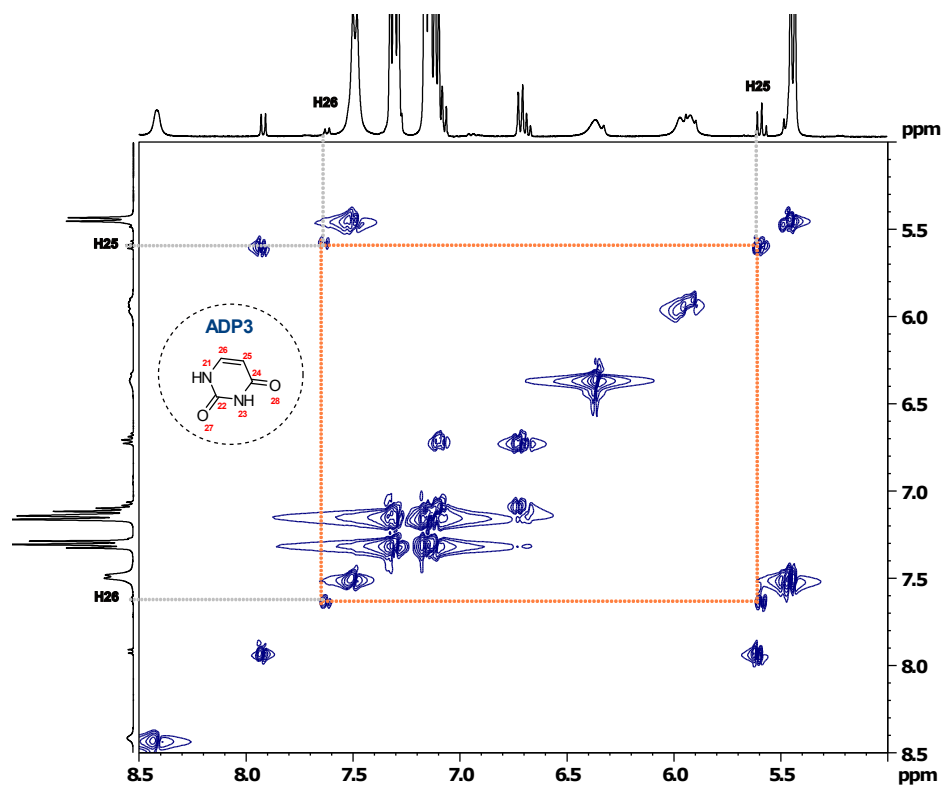


Figura 9. Ampliação do mapa de contorno do gTOCSY do produto de degradação ADP3 da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

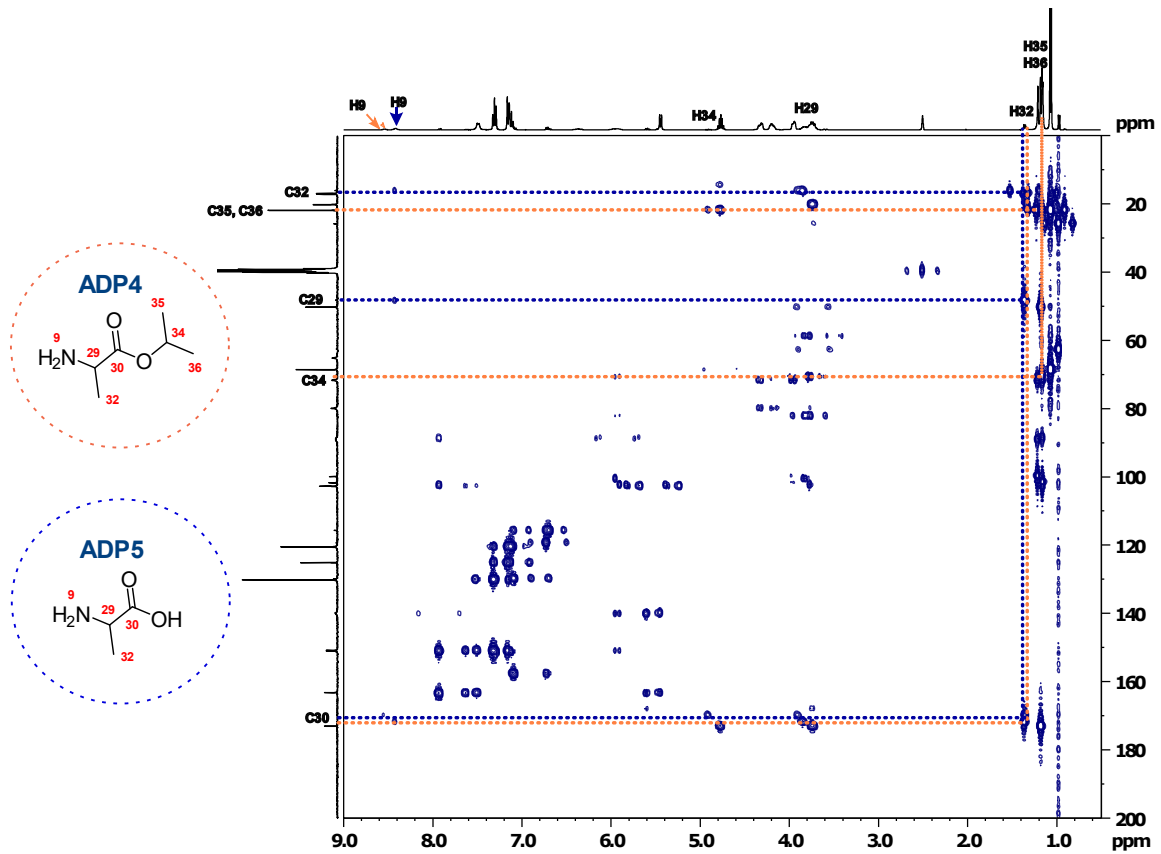


Figura 10. Ampliação do mapa de contorno do gCOSY do produto de degradação ADP4 e ADP5 da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a

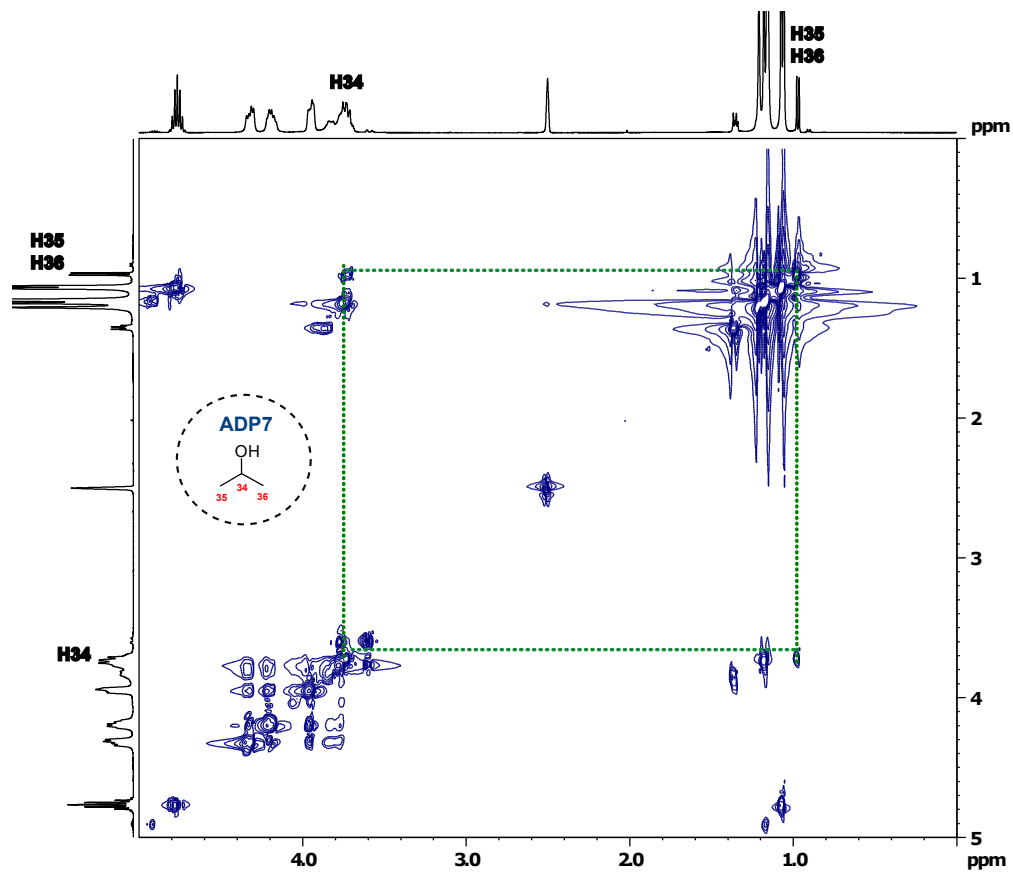


Figura 11. Ampliação do mapa de contorno do gTOCSY do produto de degradação ADP7 da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K. 298 K.

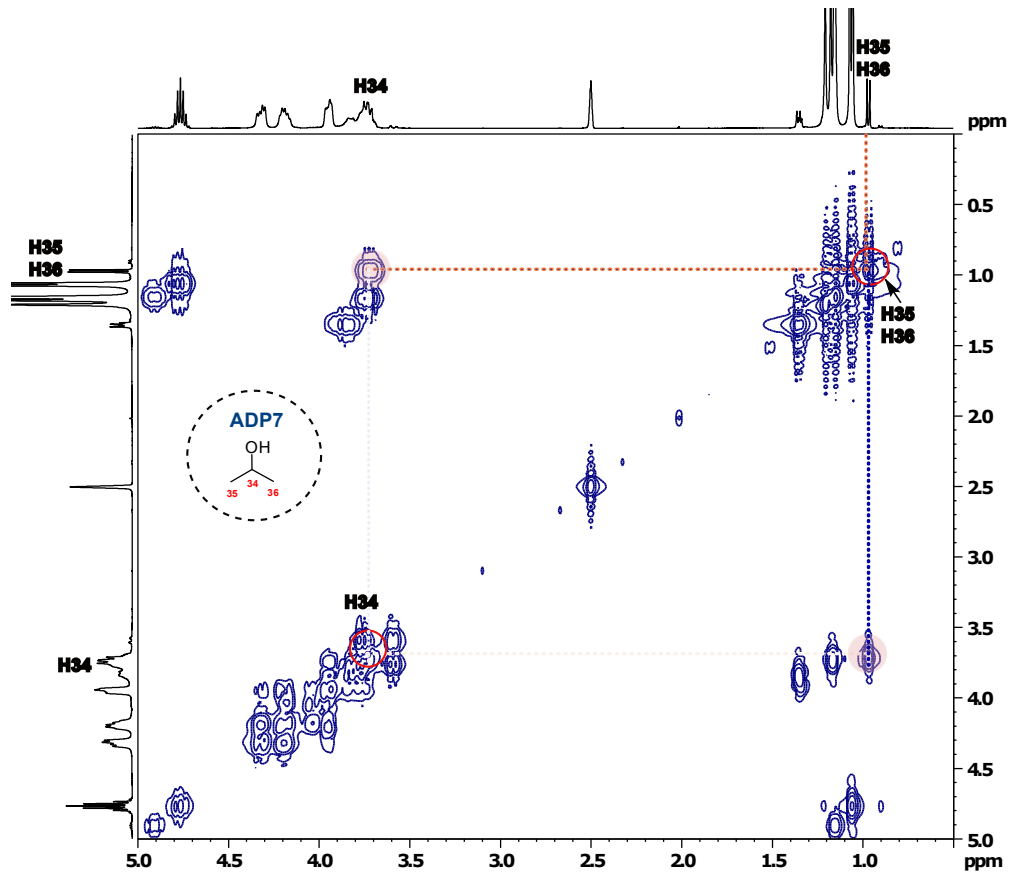


Figura 12. Ampliação do mapa de contorno do gCOSY do produto de degradação ADP7 da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K. 298 K.

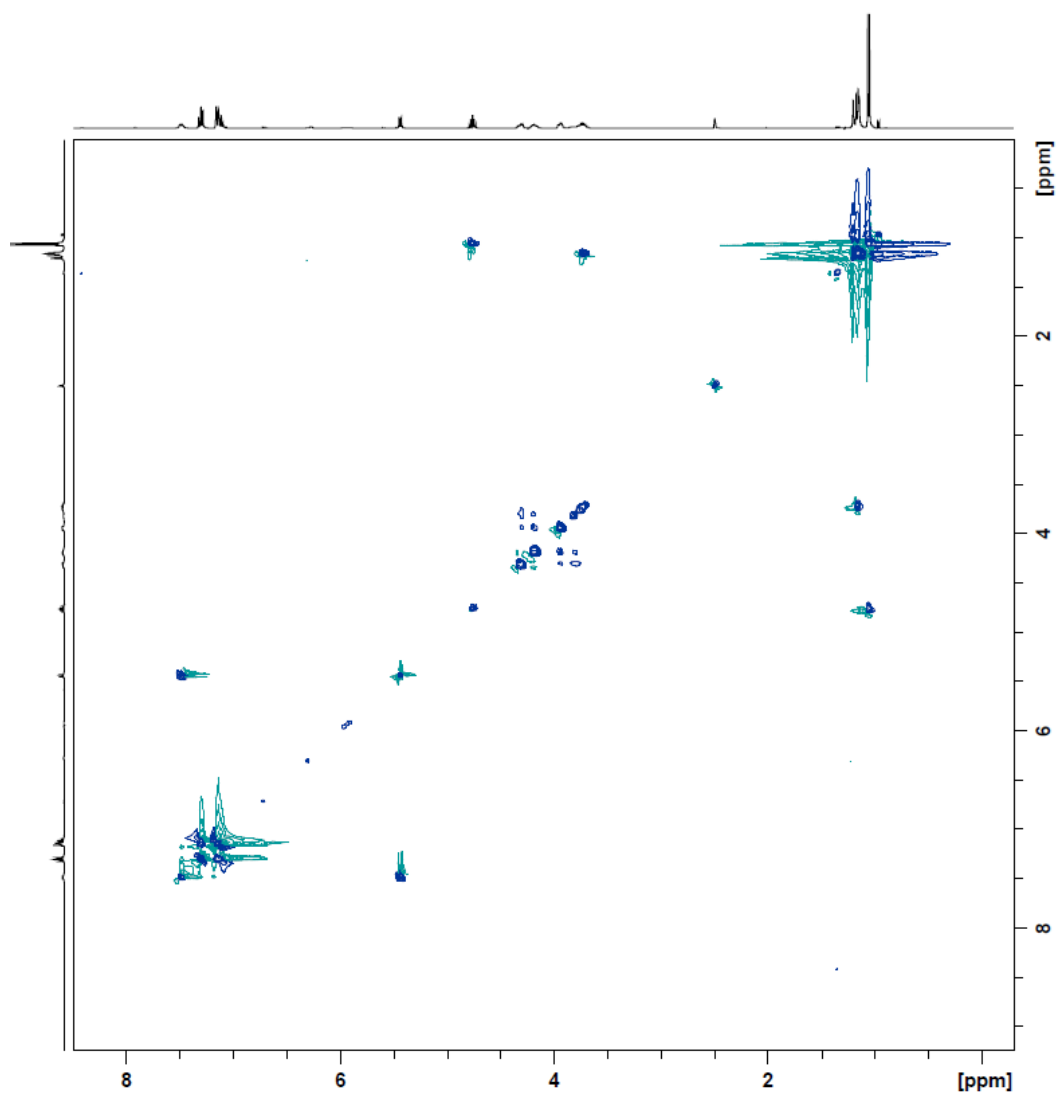


Figura 13. Mapa de contorno do gTOCSY da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

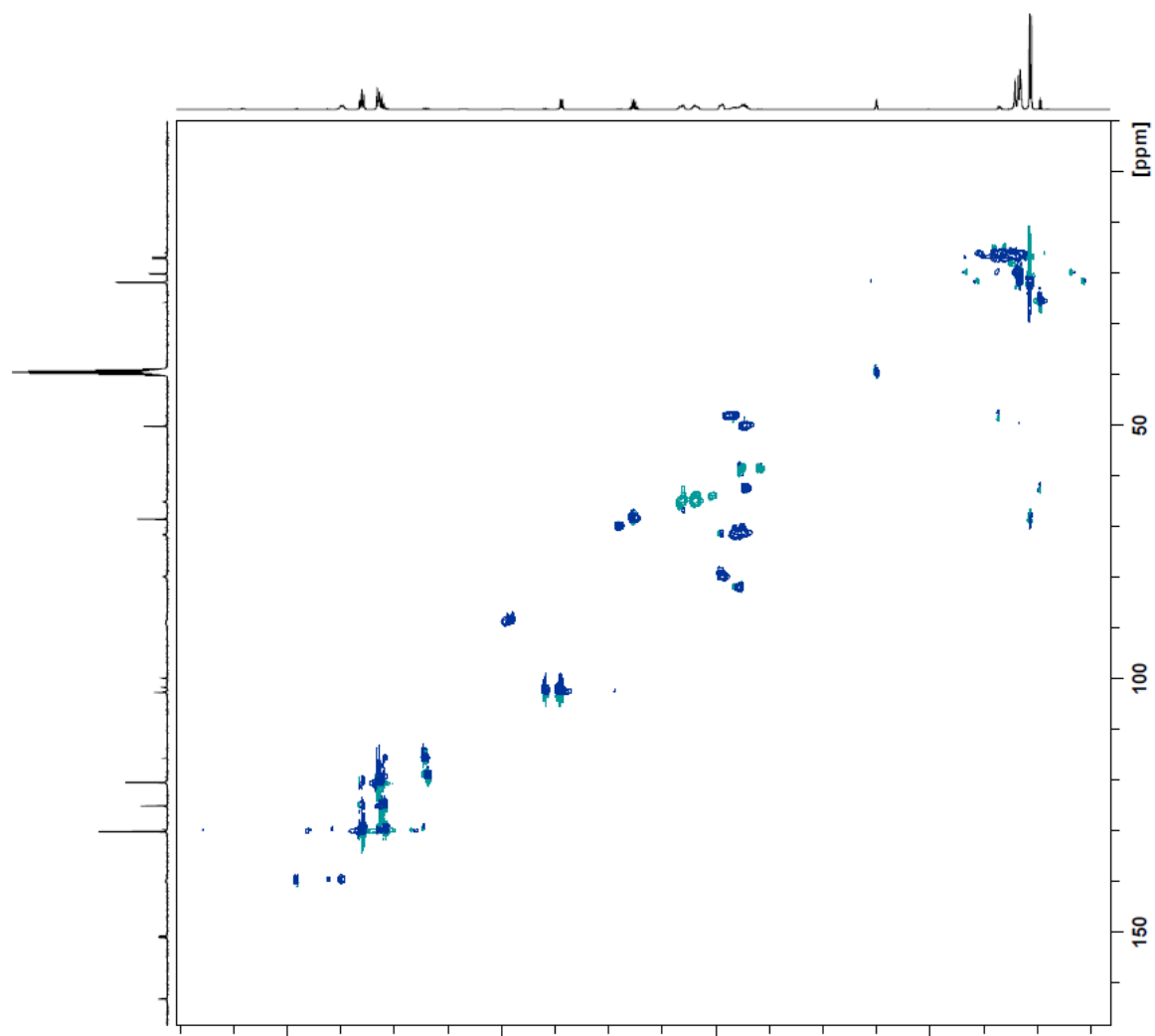


Figura 14. Mapa de contorno gHSQC da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

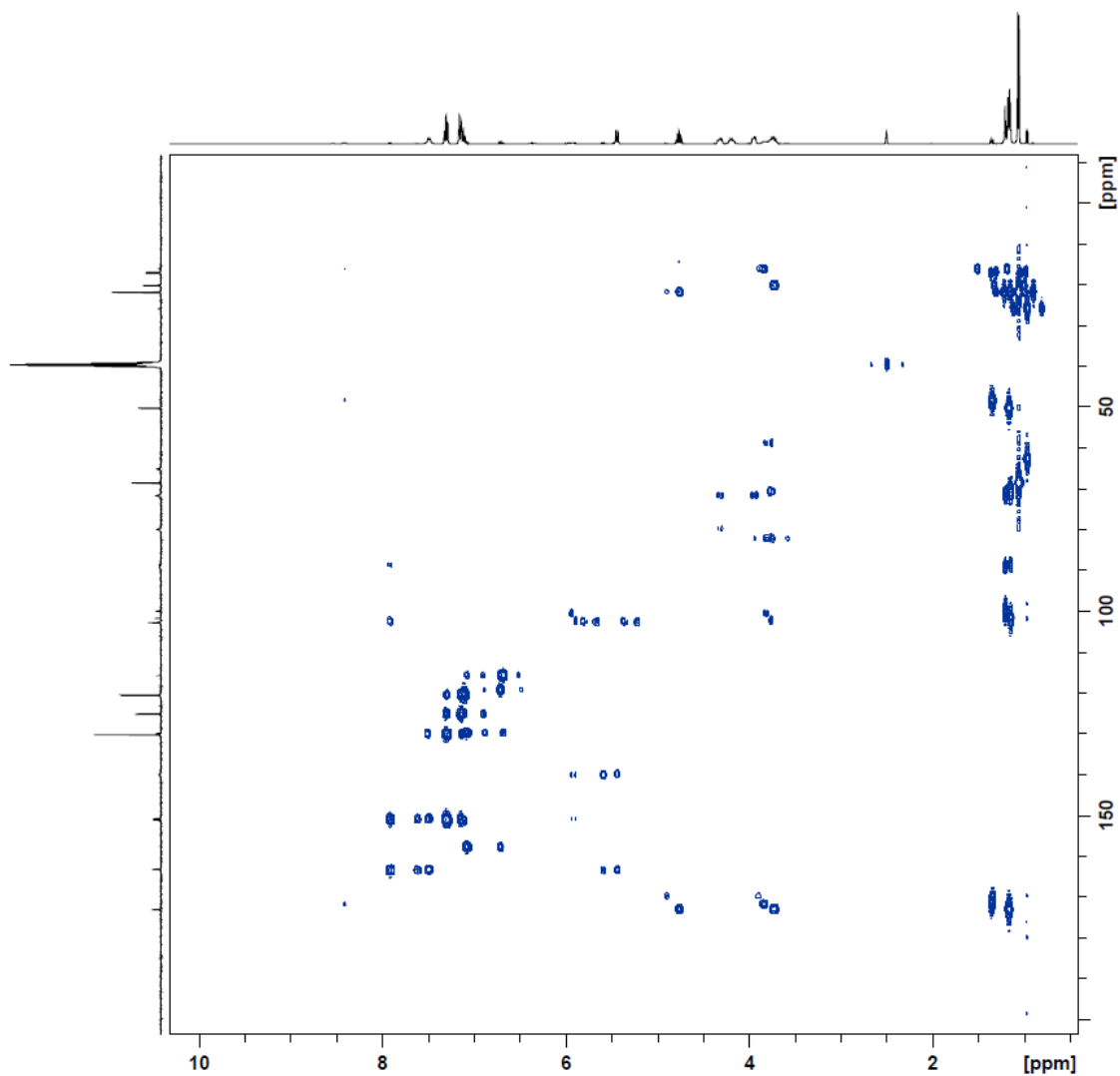


Figura 15. Mapa de contorno gHMBC da mistura ácida do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

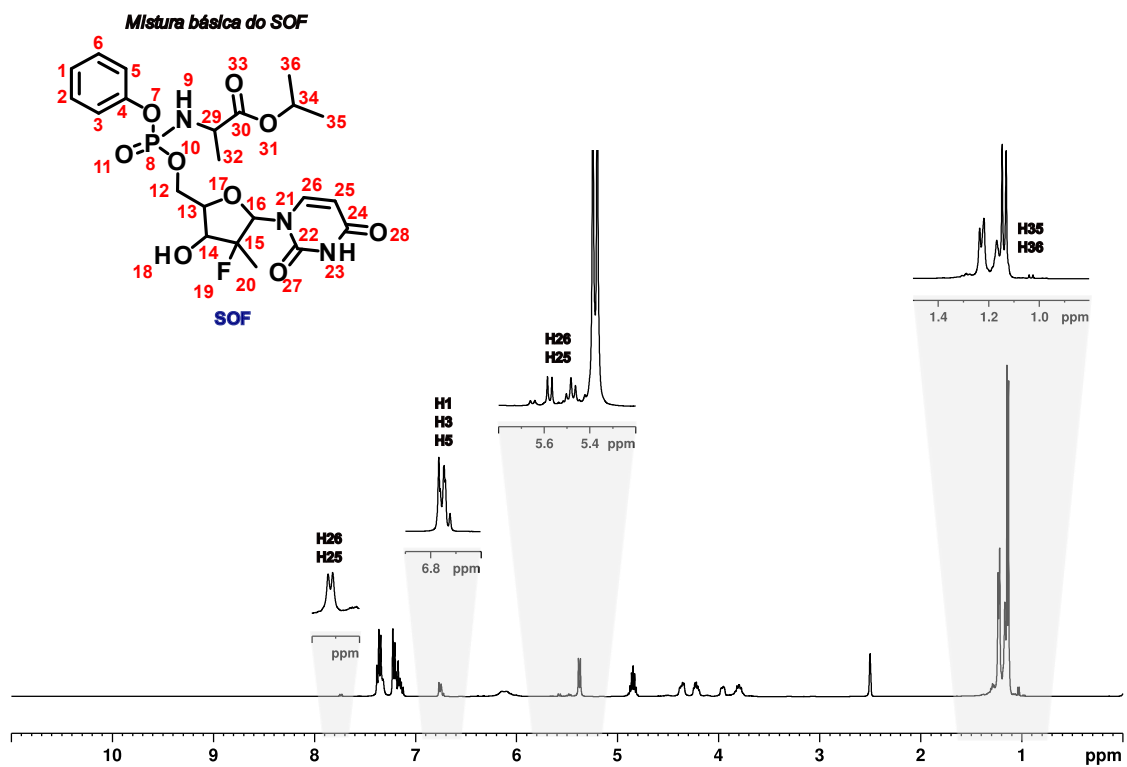


Figura 16. Espectro de RMN- ^1H convencional da mistura básica do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

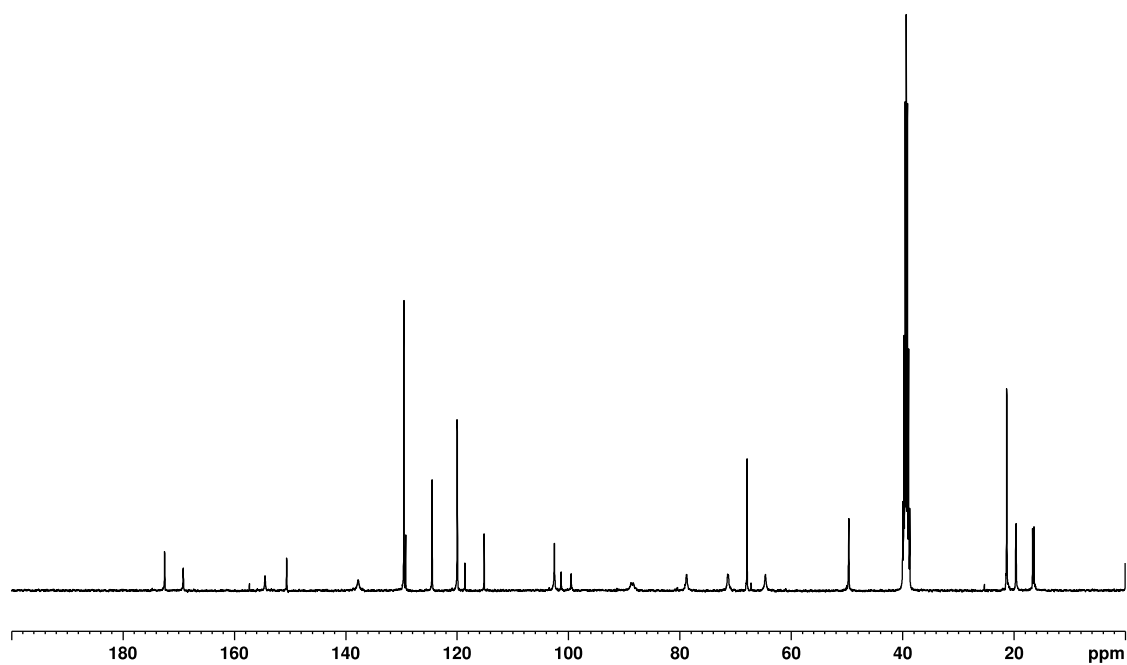
Mistura básica do SOF

Figura 17. Espectro de RMN- ^{13}C da mistura básica do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 100 MHz (para o núcleo de ^{13}C) e a 298 K.

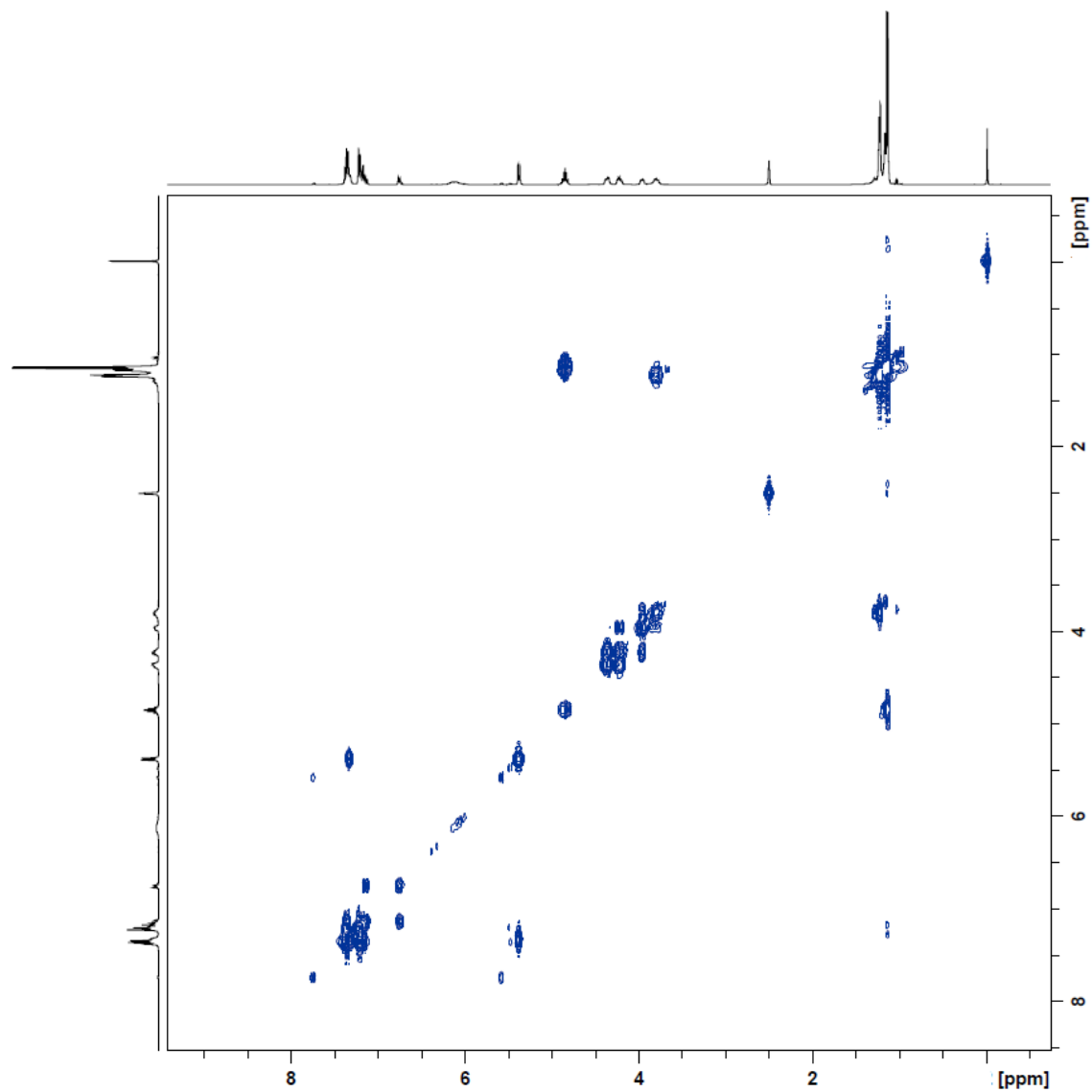


Figura 18. Mapa de contorno gCOSY da mistura básica do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

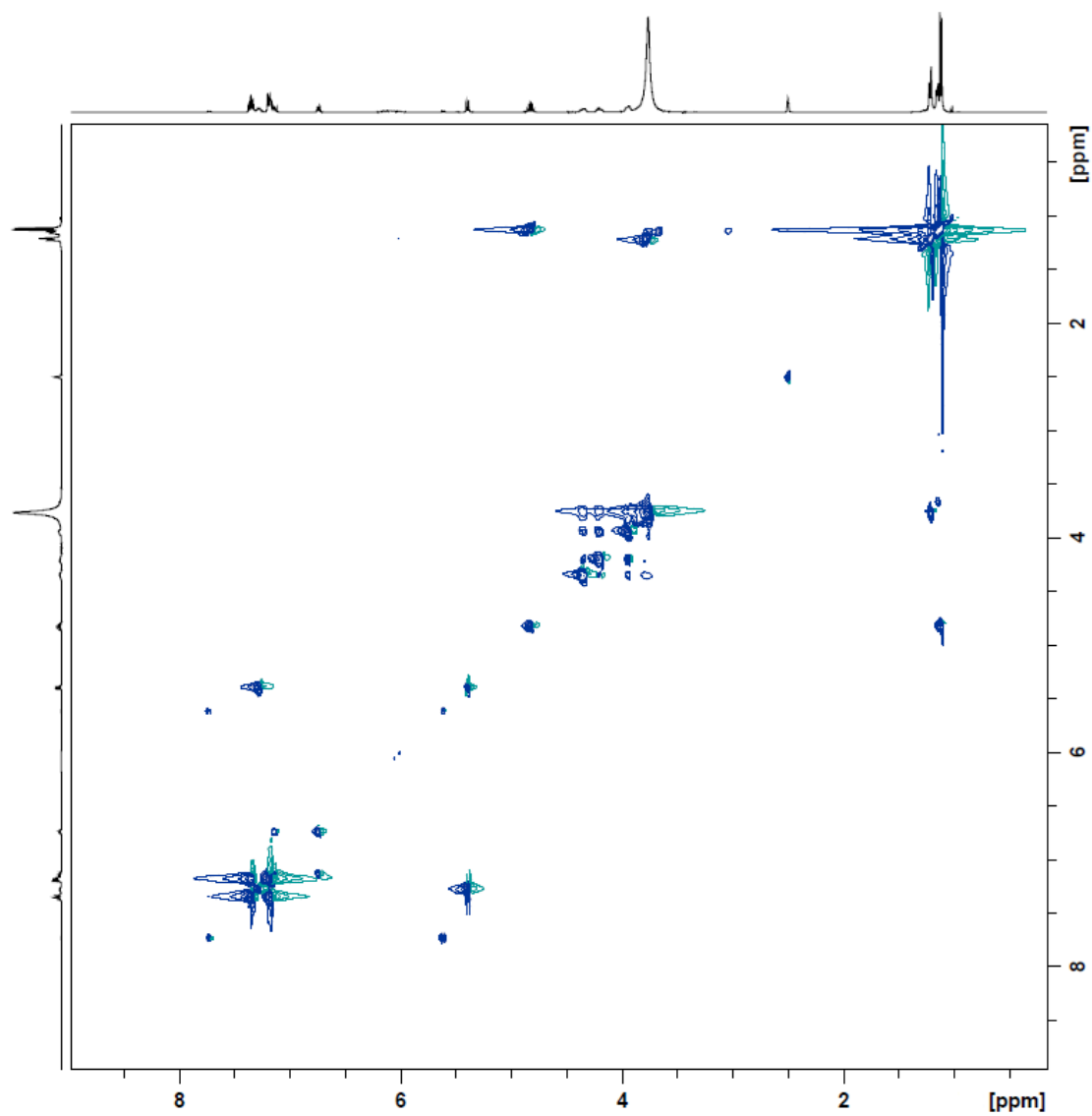


Figura 19. Mapa de contorno *g*TOCSY da mistura básica do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

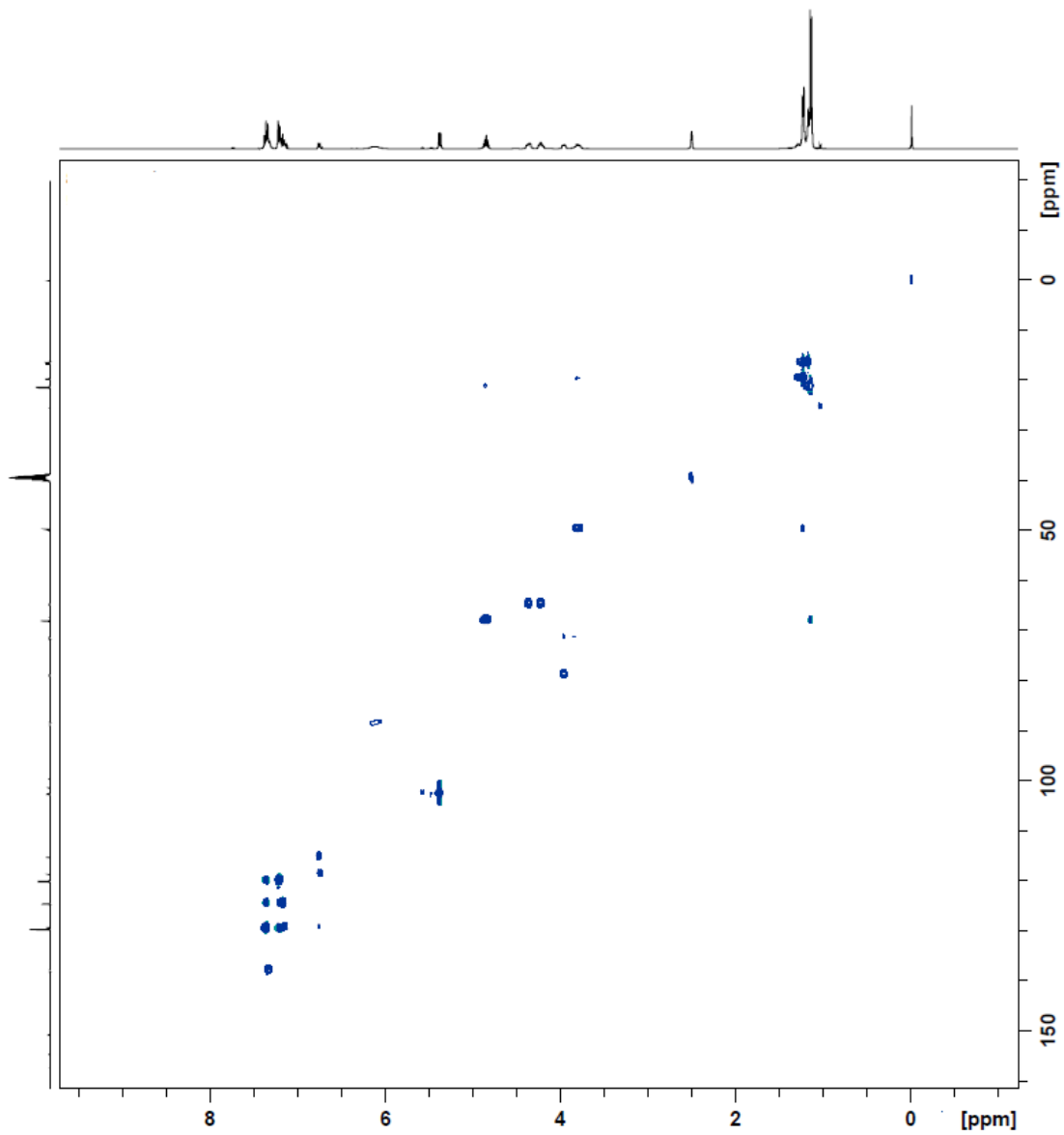


Figura 20. Mapa de contorno gHSQC da mistura básica do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

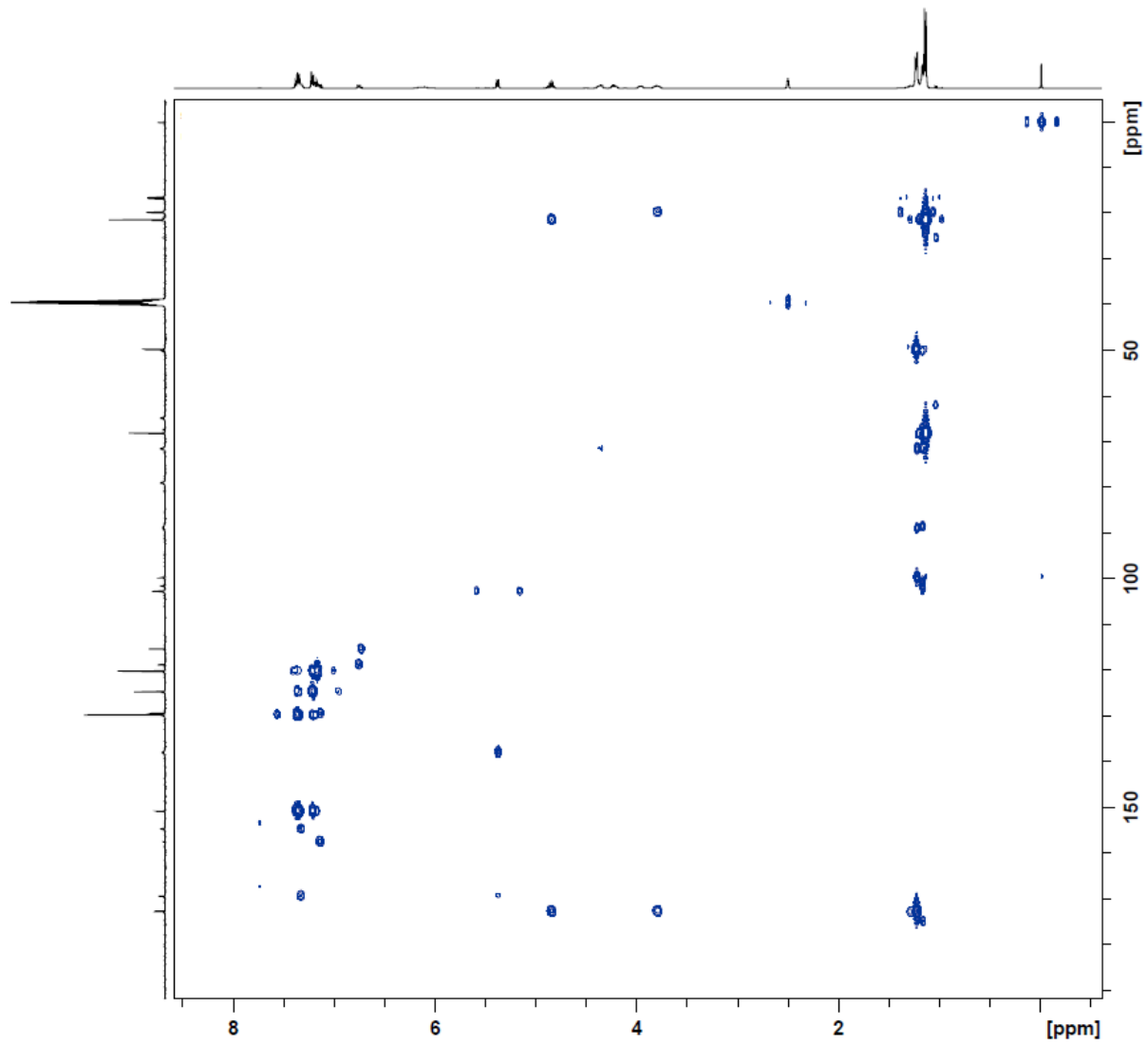


Figura 21. Mapa de contorno gHMBC da mistura básica do SOF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

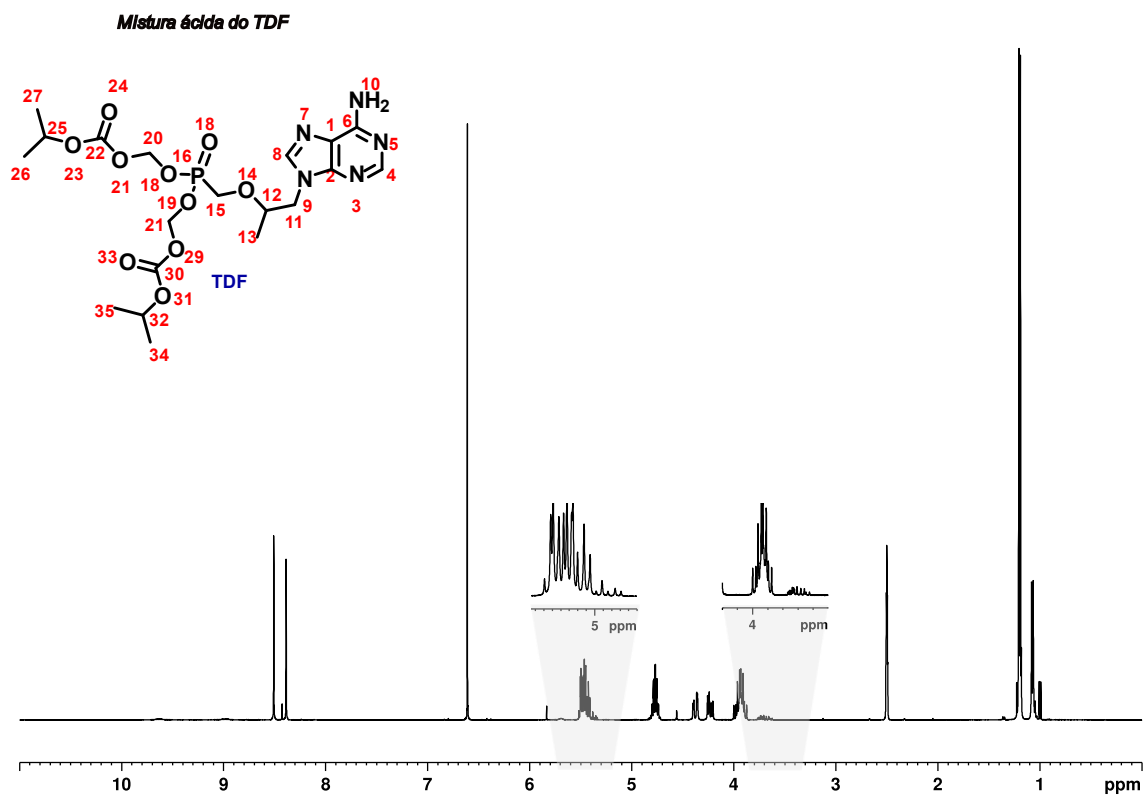


Figura 22. Espectro de RMN- ^1H convencional da mistura ácida do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

Mistura ácida do TDF

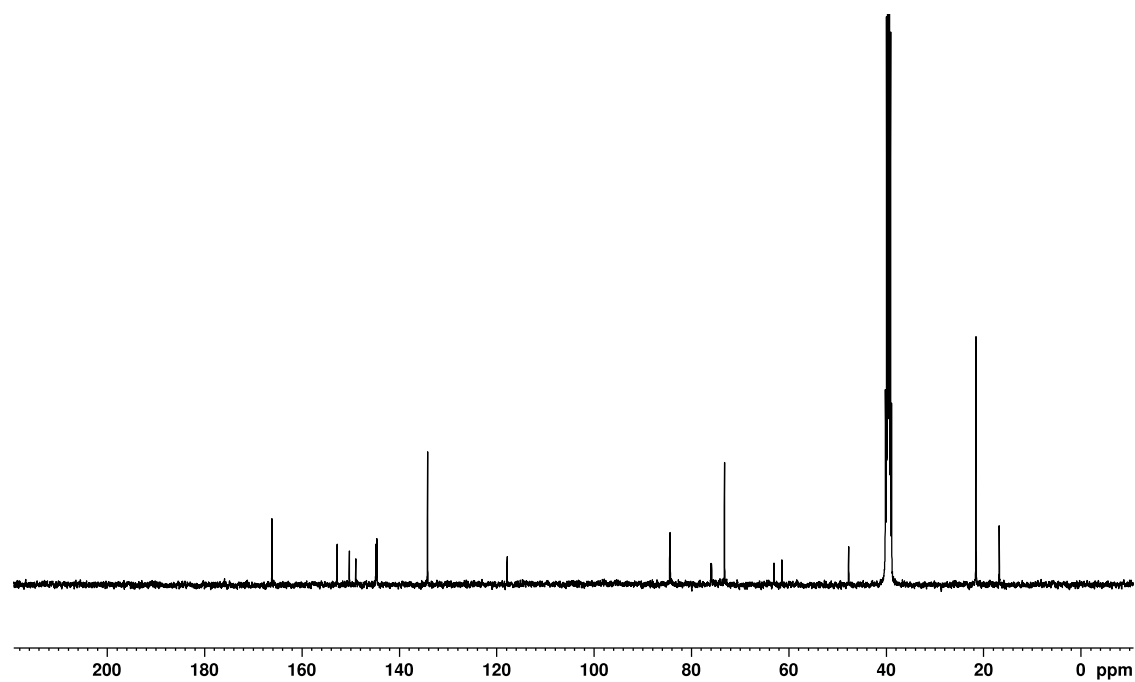


Figura 23. Espectro de RMN- ^{13}C da mistura ácida do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 100 MHz (para o núcleo de ^{13}C) e a 298 K.

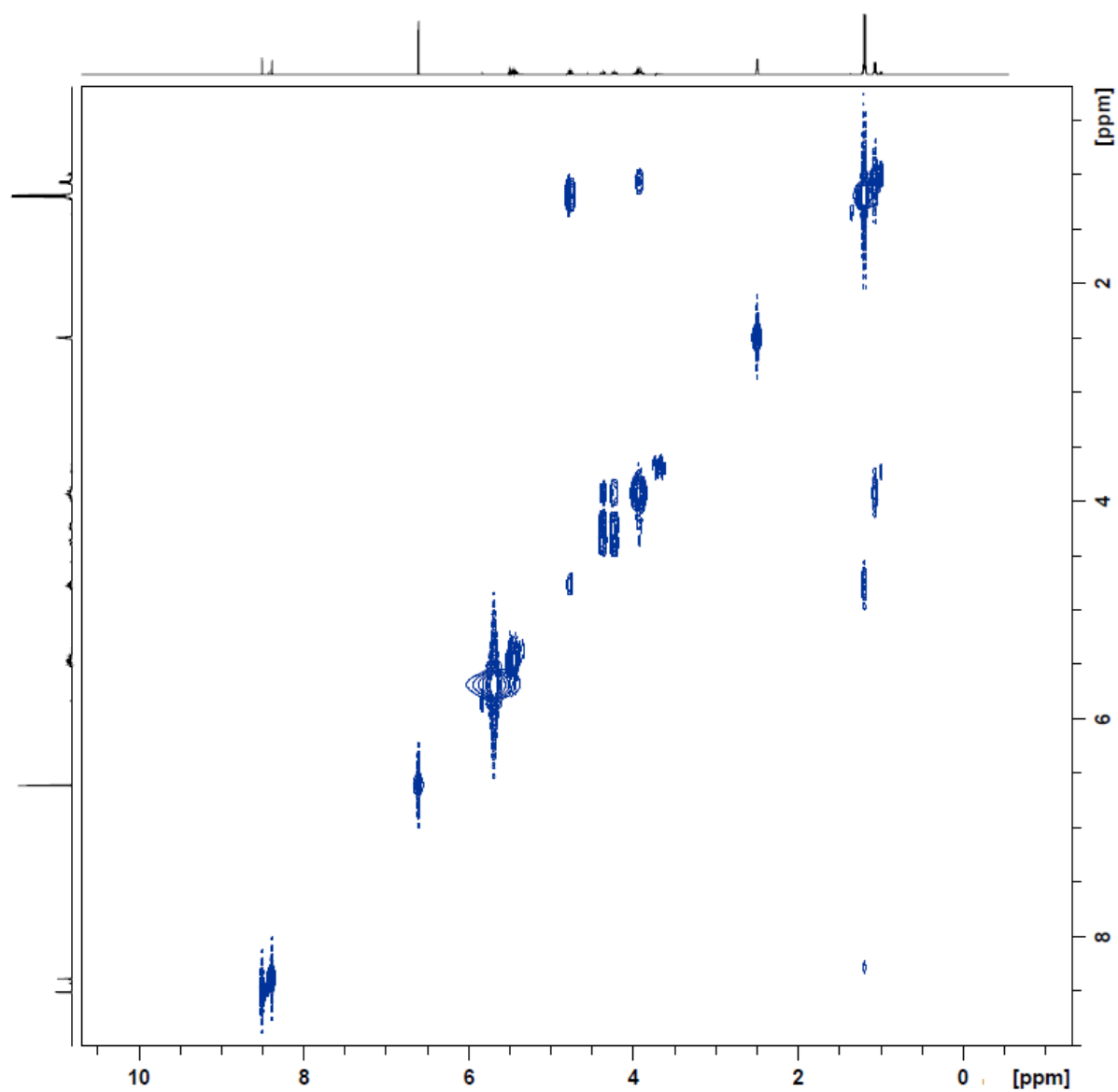


Figura 24. Mapa de contorno gCOSY da mistura ácida do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

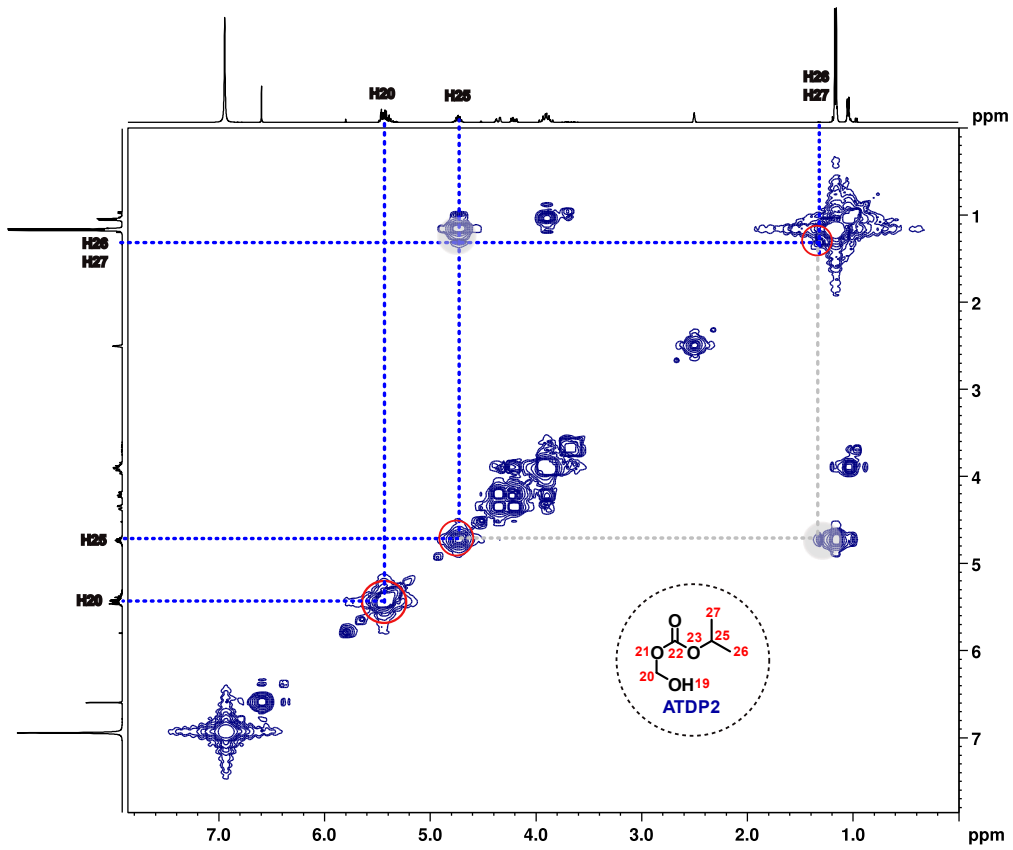


Figura 25. Ampliação do mapa de contorno gCOSY do produto de degradação ATDP2 da mistura ácida do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

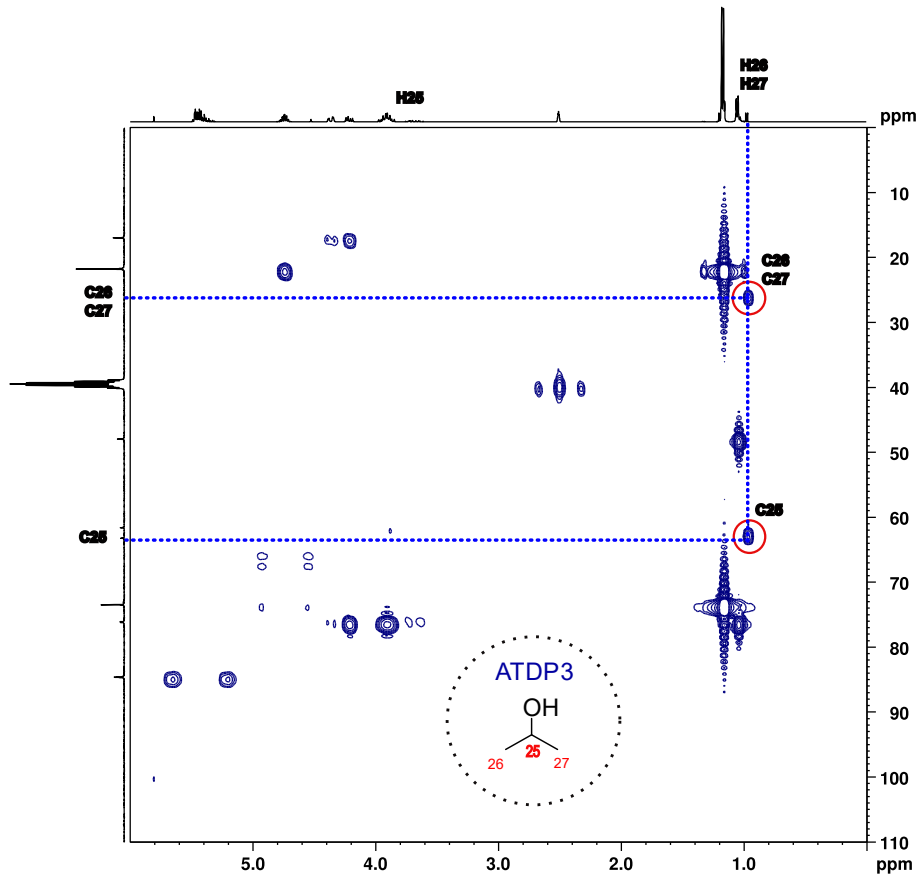


Figura 26. Ampliação do mapa de contorno gCOSY do produto de degradação ATDP3 da mistura ácida do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

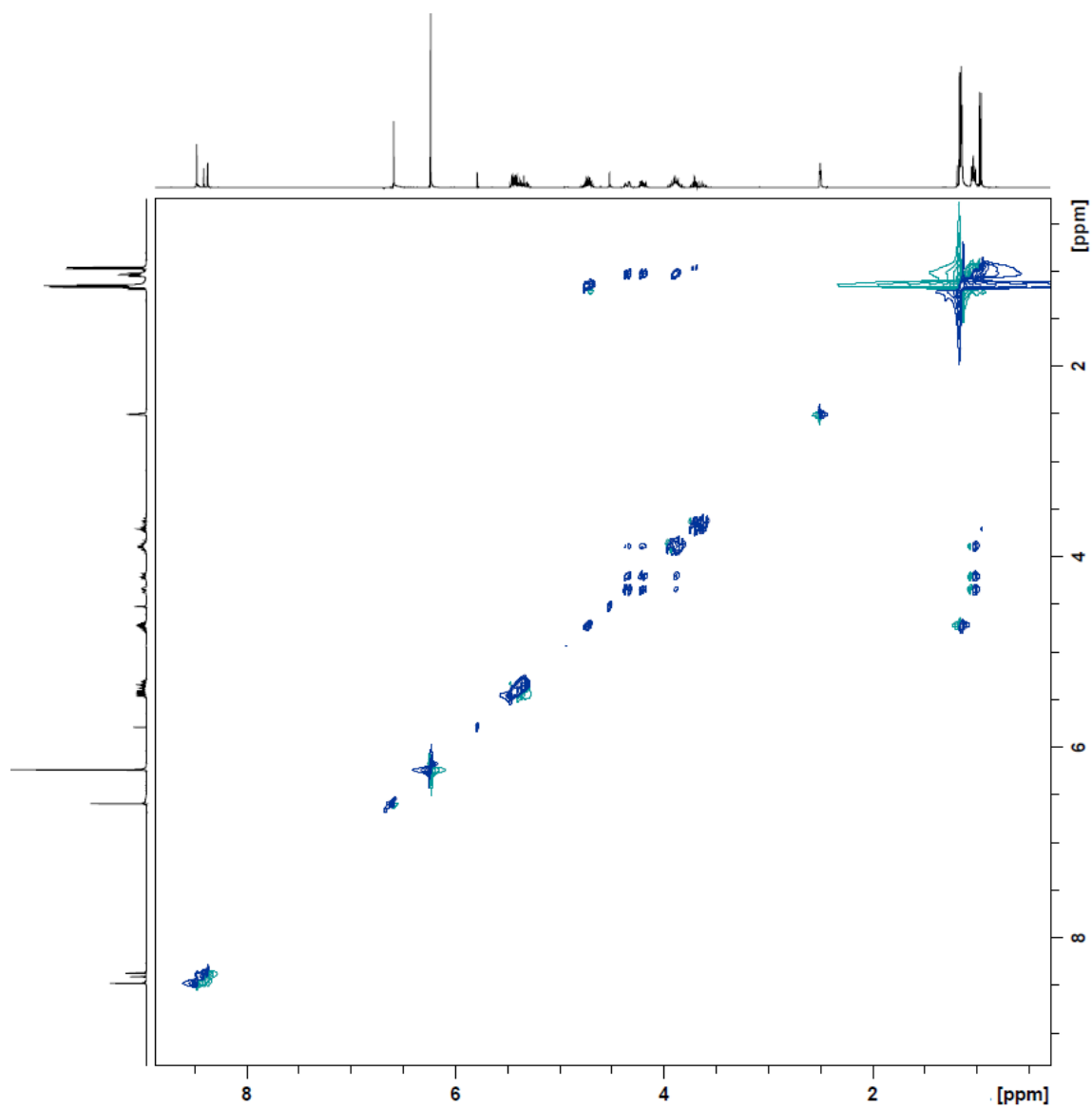


Figura 27. Mapa de contorno gTOCSY da mistura ácida do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

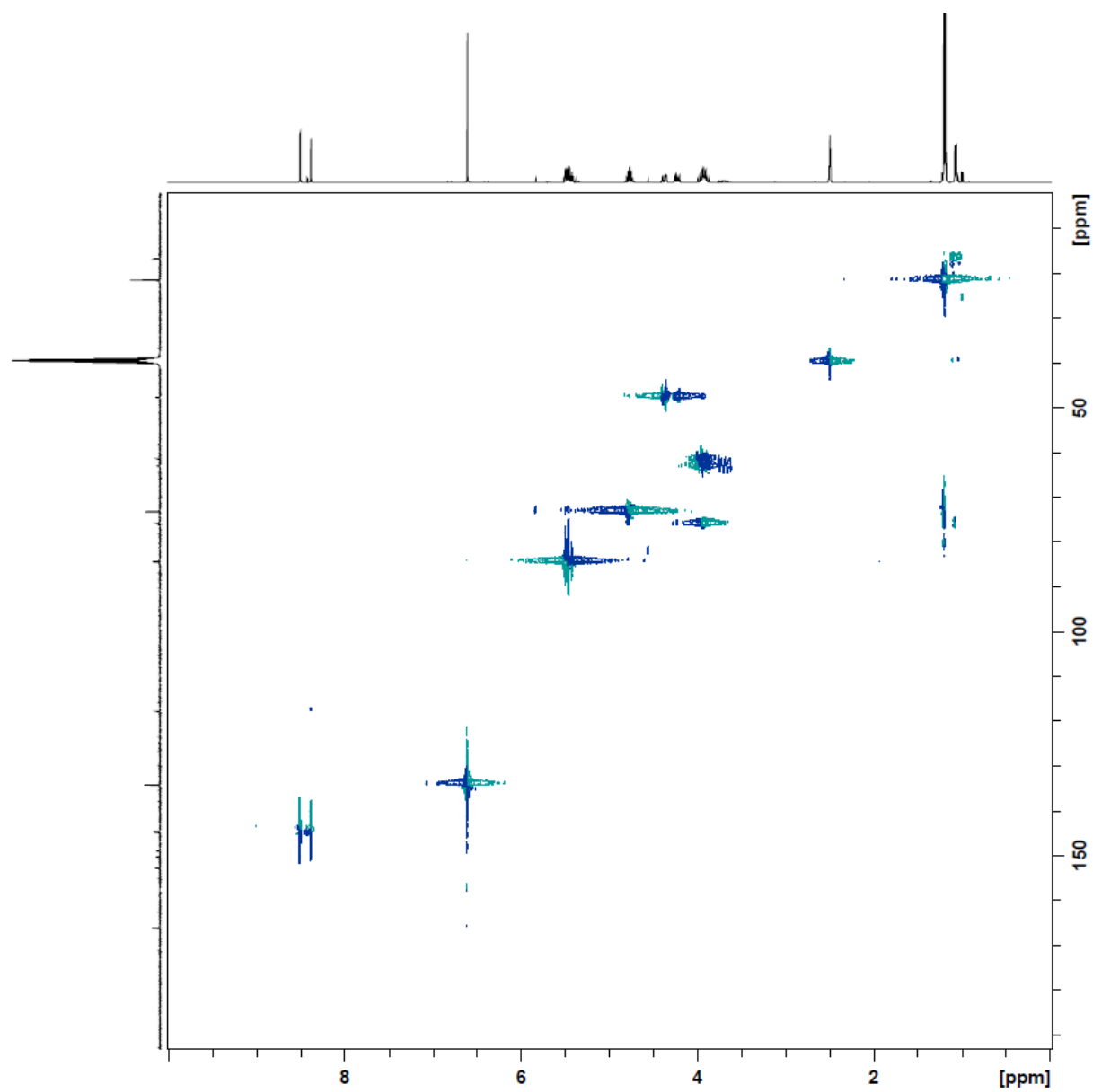


Figura 28. Mapa de contorno gHSQC da mistura ácida do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

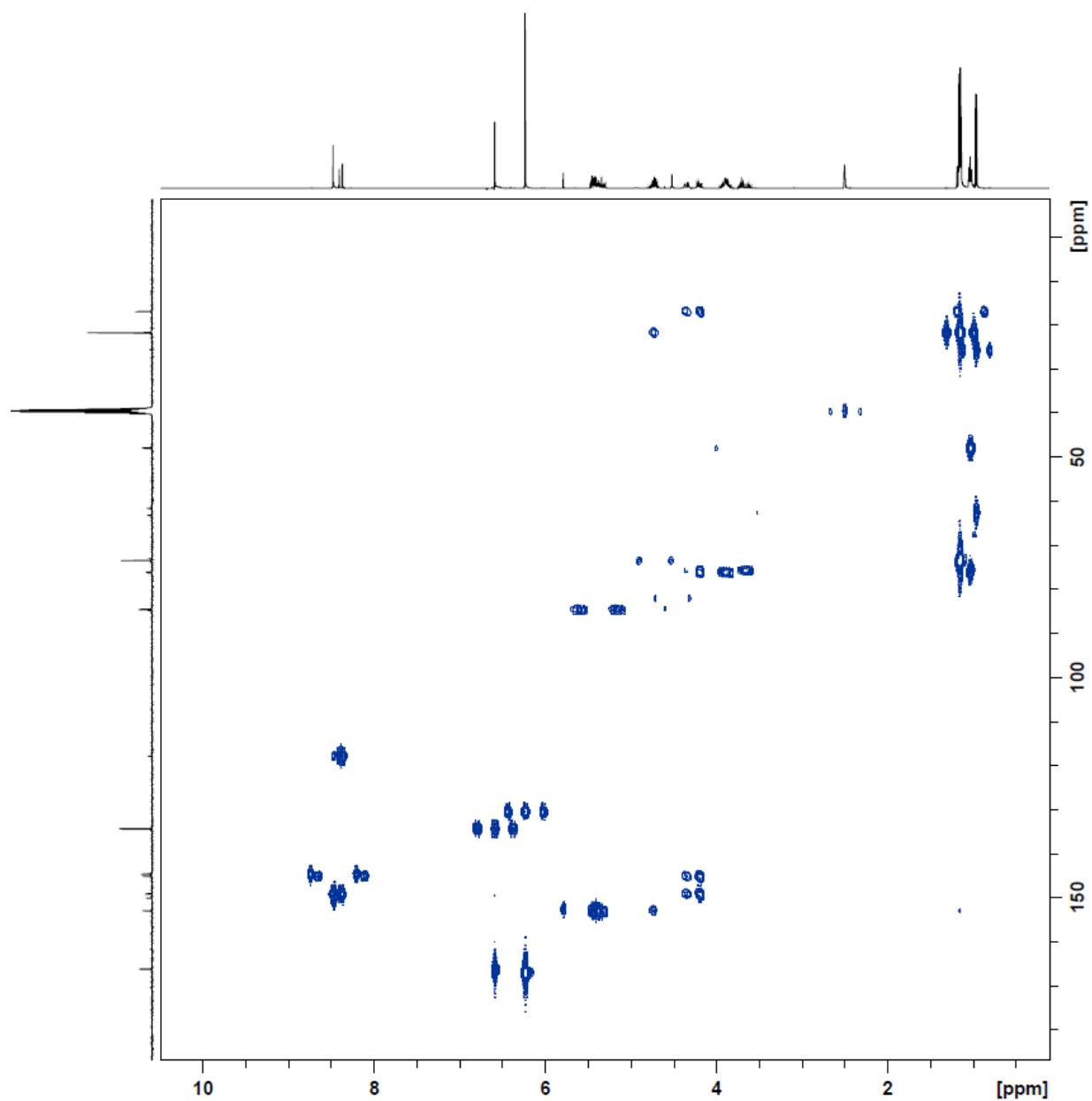


Figura 29. Mapa de contorno gHMBC da mistura ácida do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

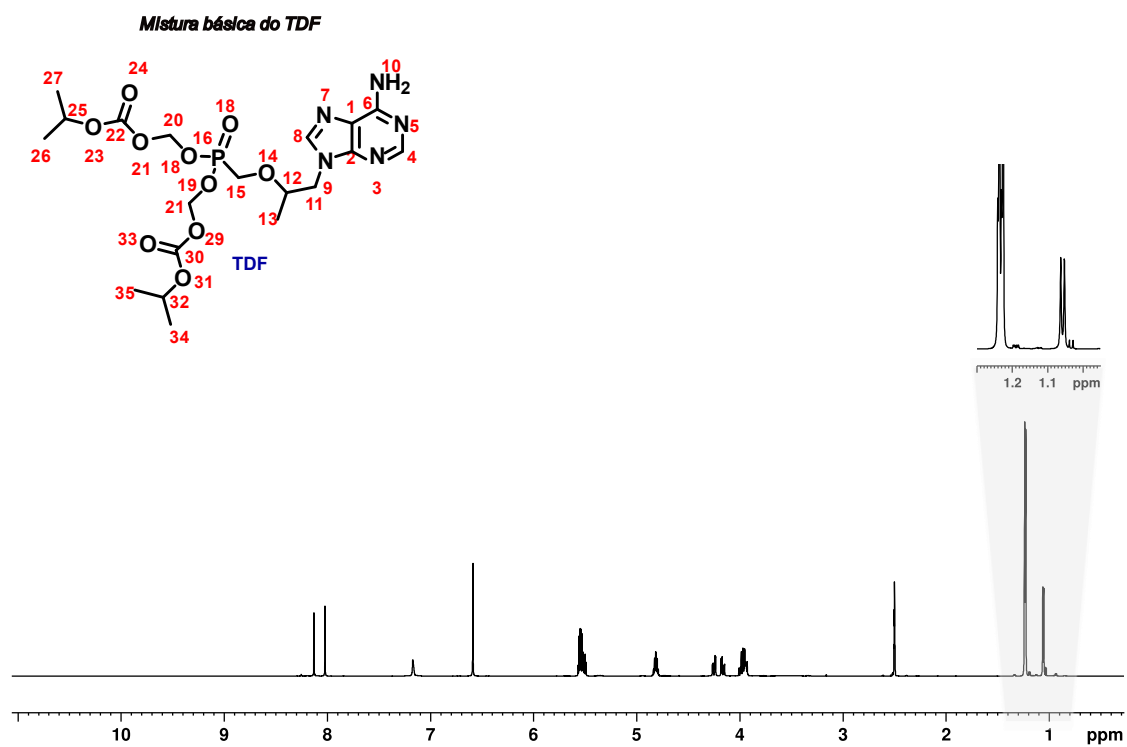


Figura 30. Espectro de RMN-¹H convencional da mistura básica do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

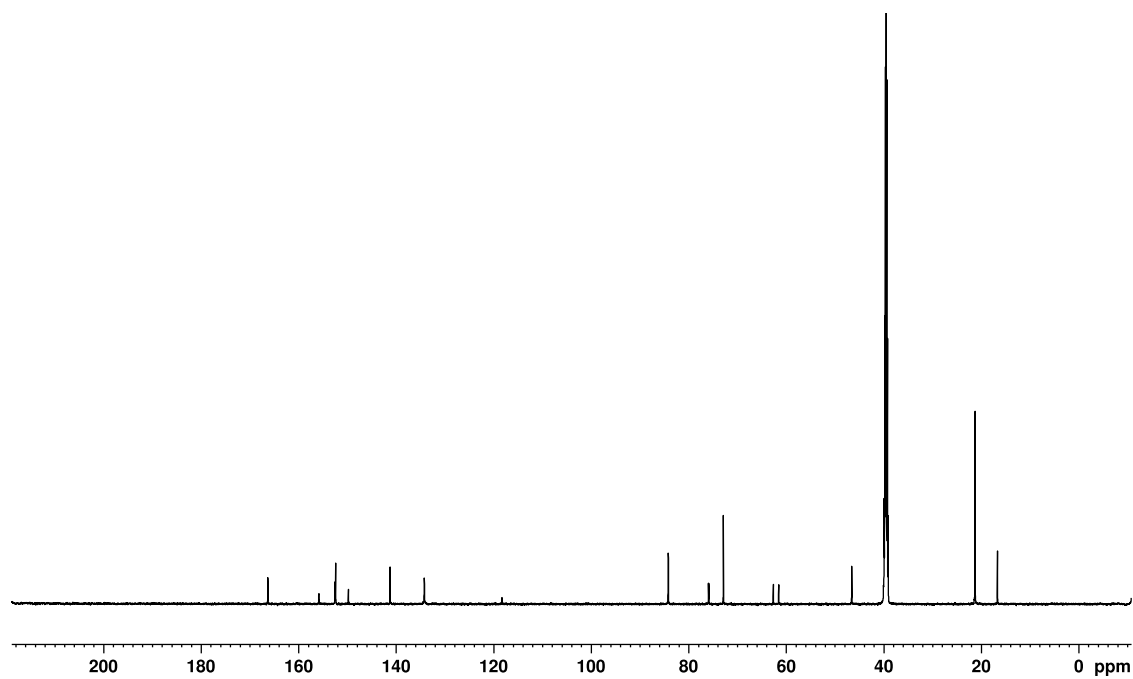
Mistura básica do TDF

Figura 31. Espectro de RMN- ^{13}C da mistura básica do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 100 MHz (para o núcleo de ^{13}C) e a 298 K.

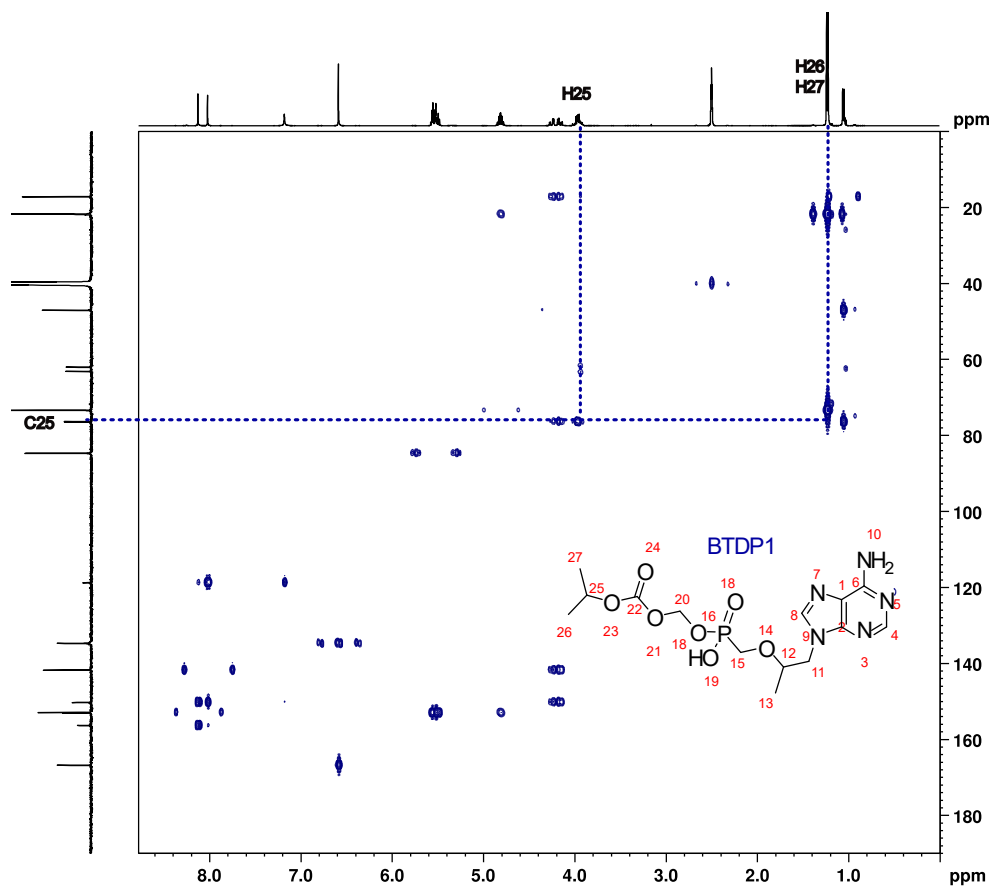


Figura 32. Ampliação do mapa de contorno $g\text{HMBC}$ do produto de degradação BTDP1 da mistura básica do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 100 MHz (para o núcleo de ^{13}C) e a 298 K.

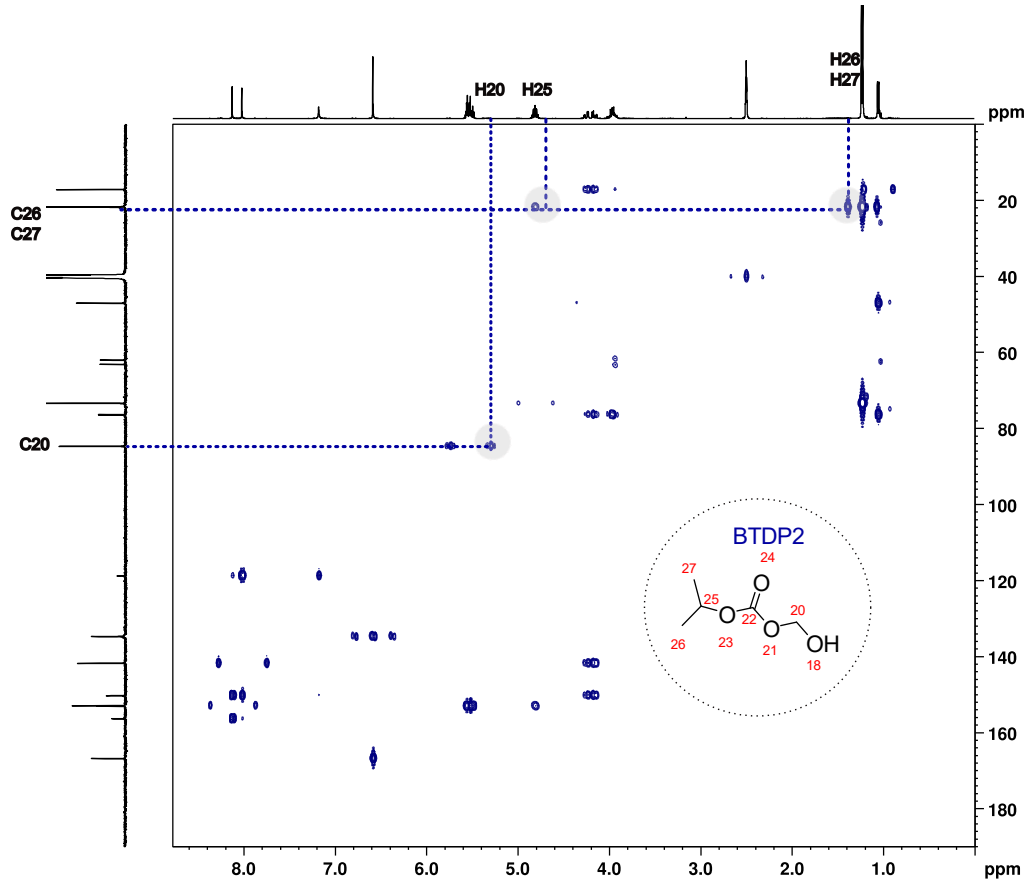


Figura 33. Ampliação do mapa de contorno gHMBC do produto de degradação BTDP2 da mistura básica do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 100 MHz (para o núcleo de ^{13}C) e a 298 K.

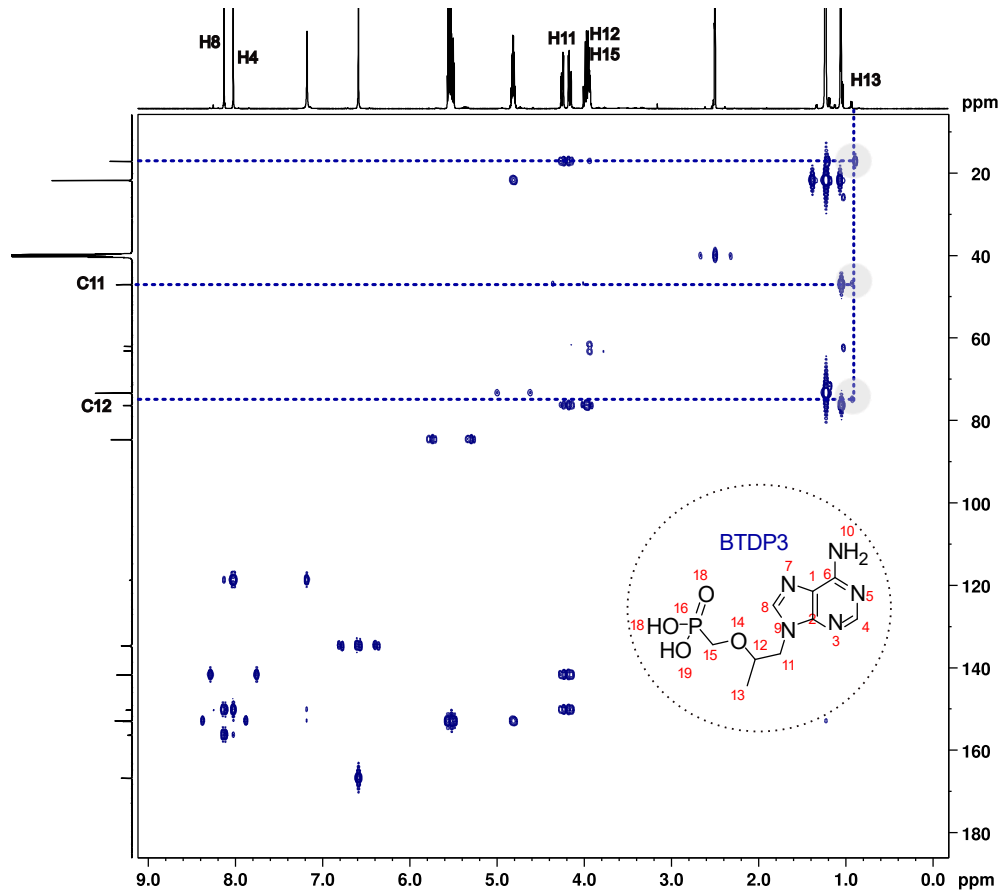


Figura 34. Ampliação do mapa de contorno gHMBC do produto de degradação BTDP3 da mistura básica do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 100 MHz (para o núcleo de ^{13}C) e a 298 K.

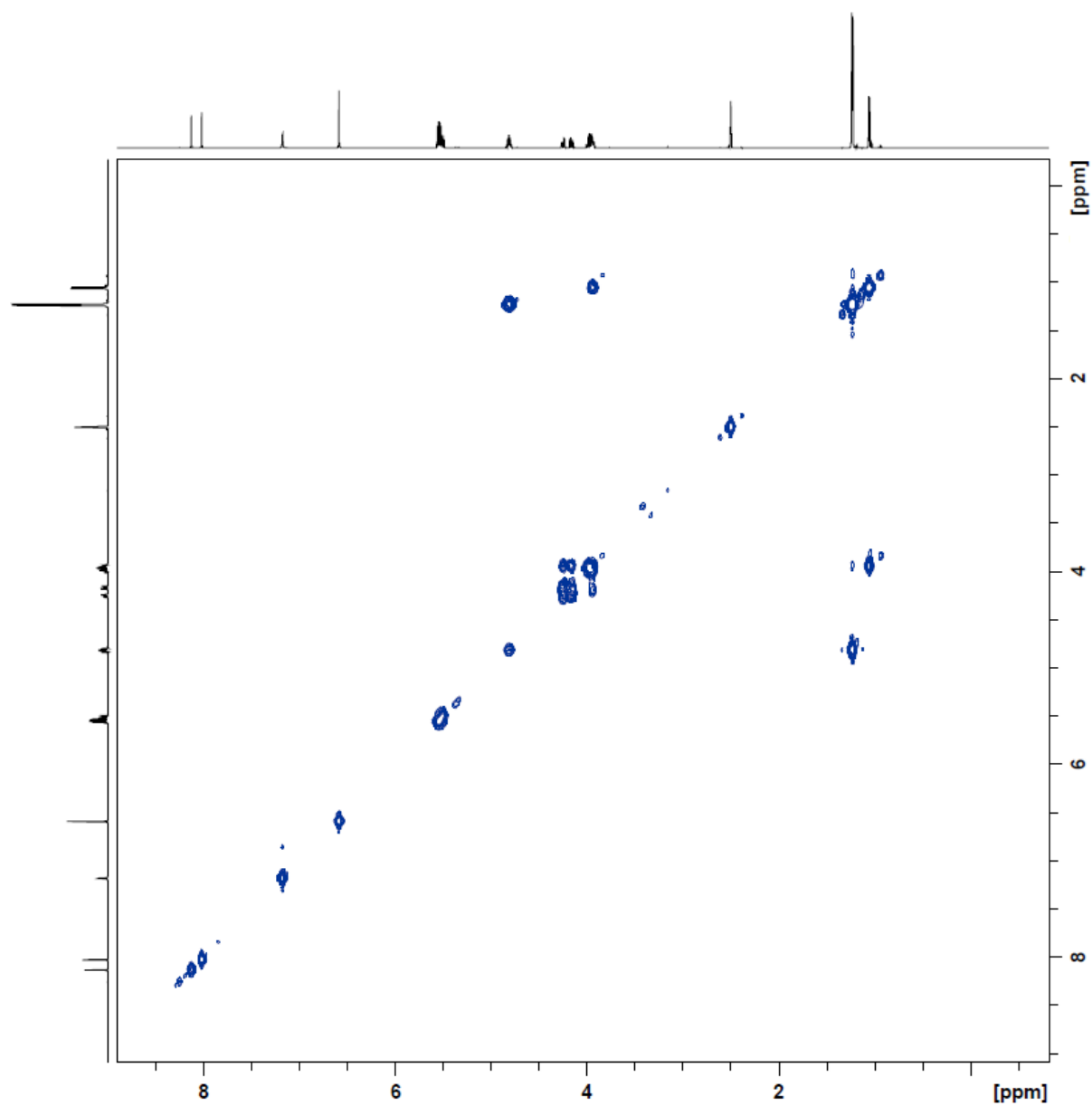


Figura 35. Mapa de contorno gCOSY da mistura básica do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

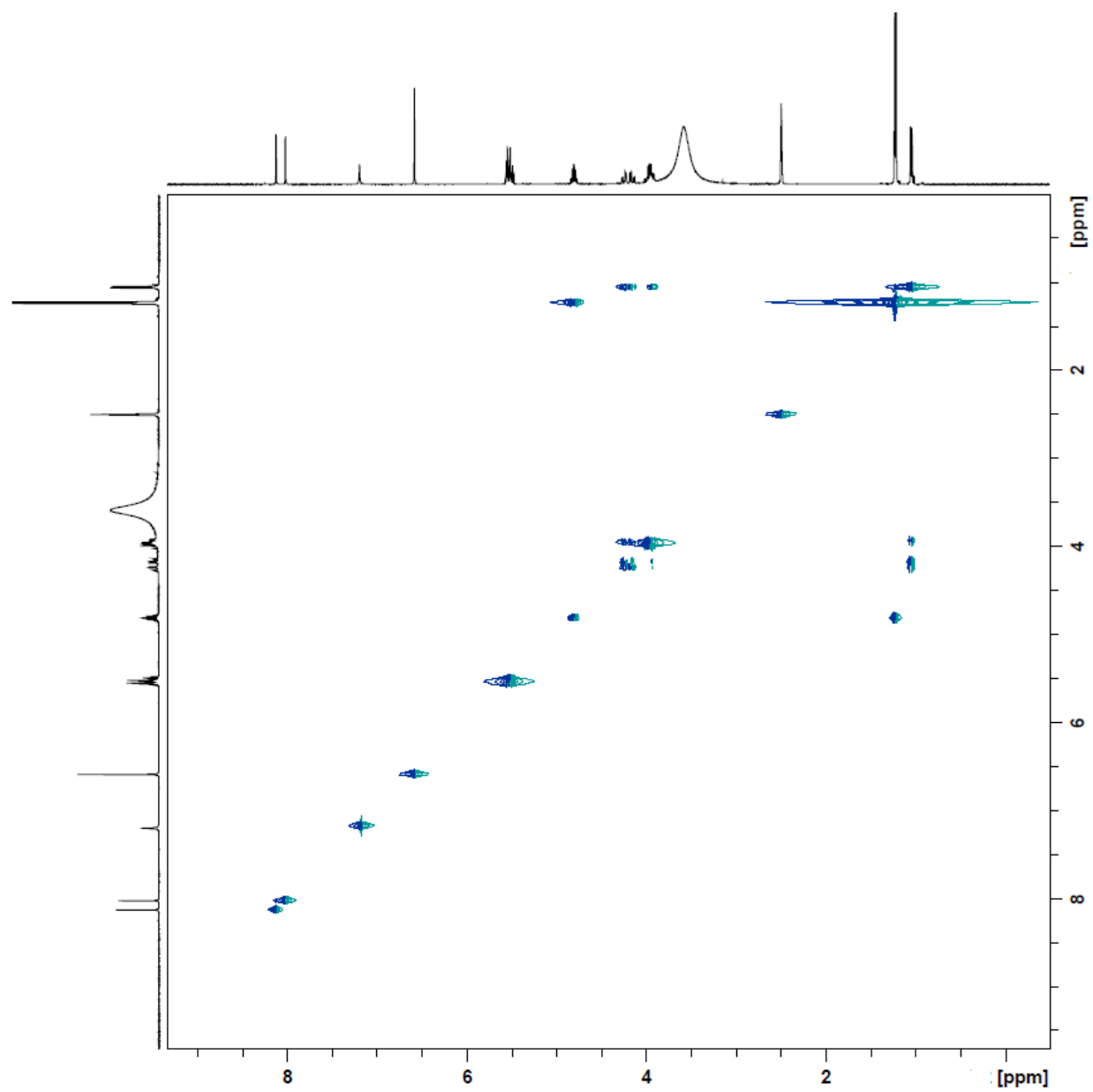


Figura 36. Mapa de contorno *g*TOCSY da mistura básica do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ¹H) e a 298 K.

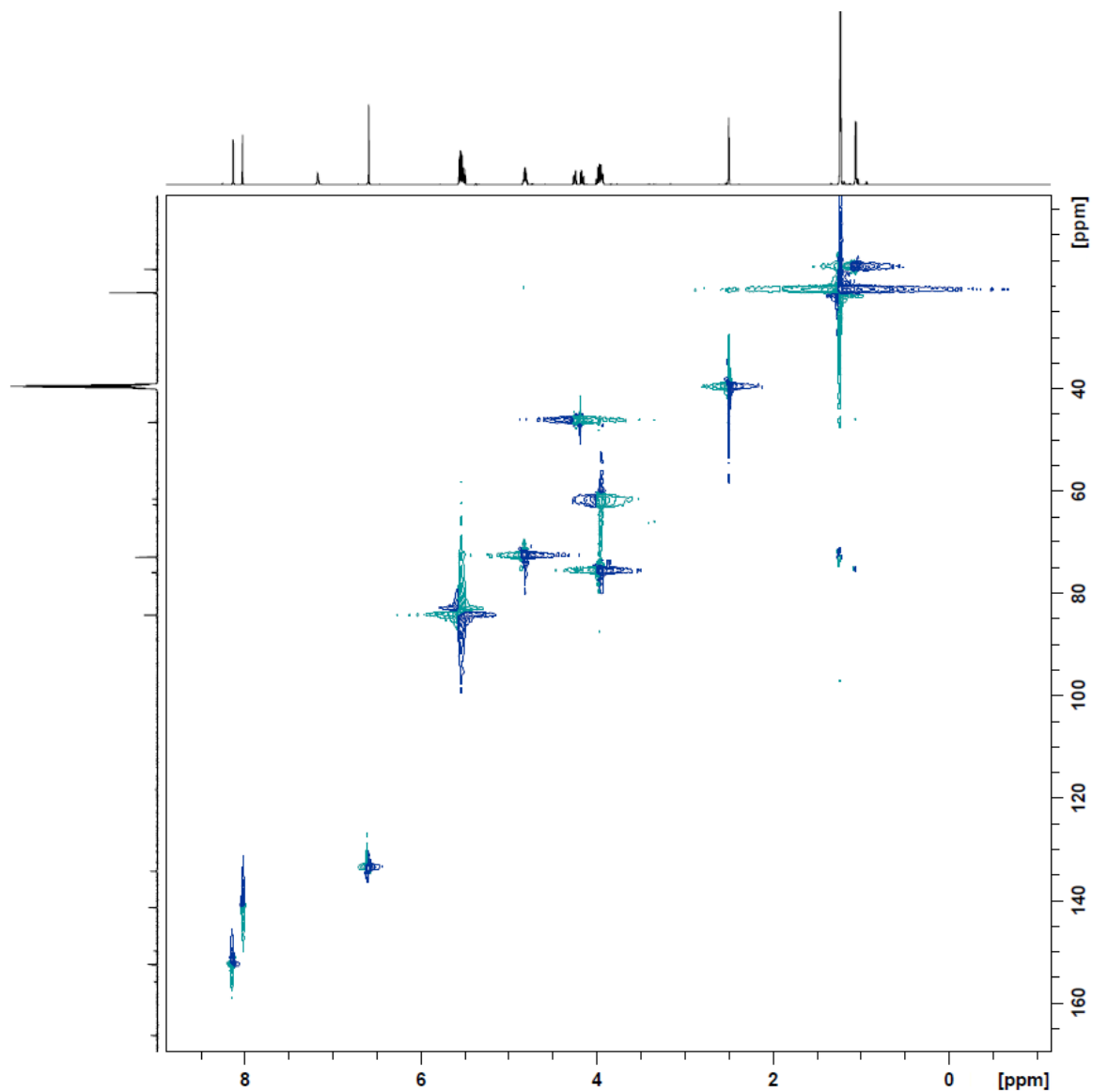


Figura 37. Mapa de contorno gHSQC da mistura básica do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

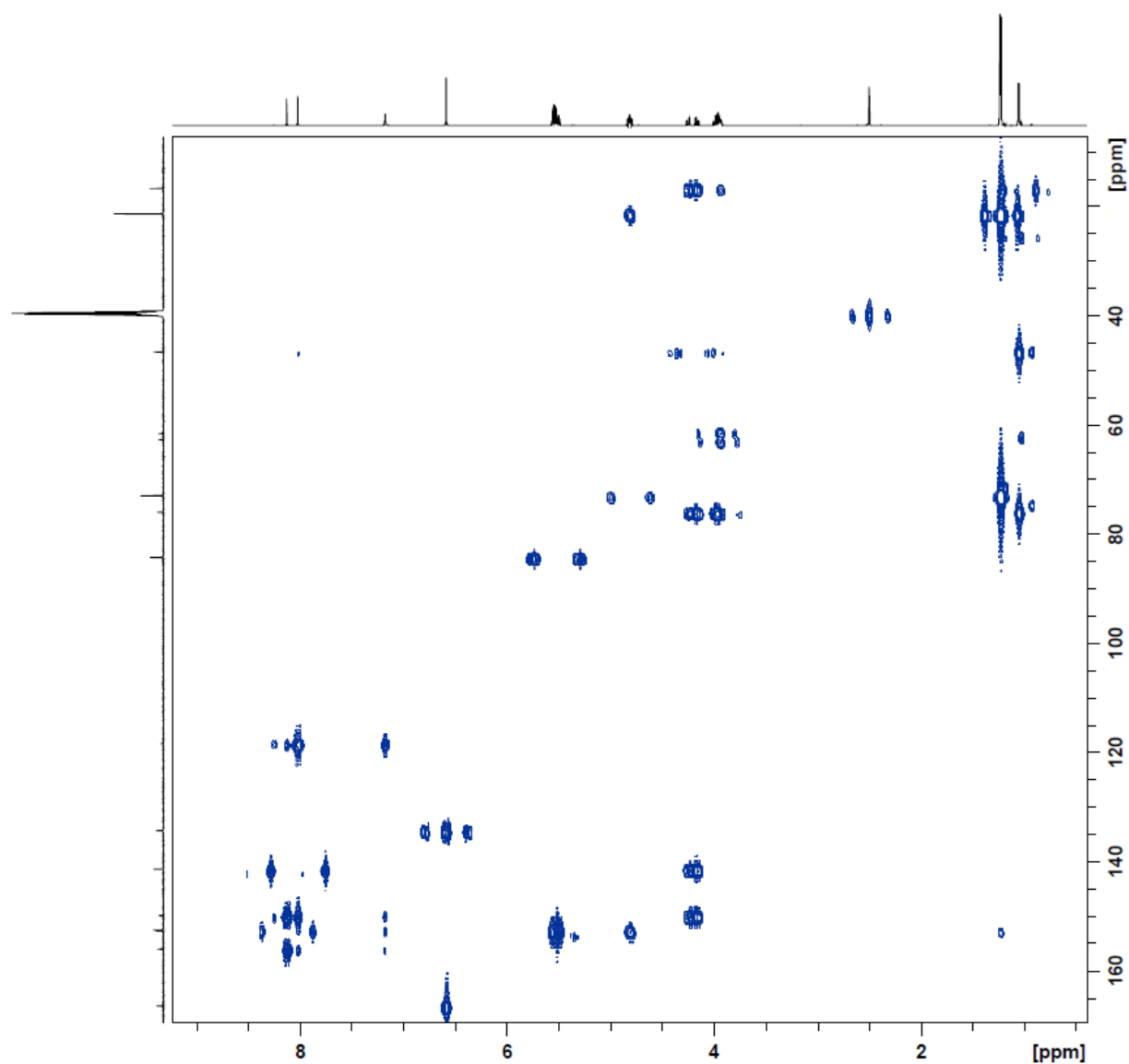


Figura 38. Mapa de contorno gHMBC da mistura básica do TDF. Espectro foi realizado em DMSO a 400 MHz (para o núcleo de ^1H) e a 298 K.

