



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**ANÁLISE DE MISTURAS E MONITORAMENTO DA TROCA ISOTÓPICA H/D
EM FÁRMACOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

MARILIA VILELA SALVADOR

Porto Alegre, agosto de 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARILIA VILELA SALVADOR

**ANÁLISE DE MISTURAS E MONITORAMENTO DA TROCA ISOTÓPICA H/D EM
FÁRMACOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química.

Prof. Dr. Francisco Paulo dos Santos
Orientador

Porto Alegre, agosto de 2024

CIP - Catalogação na Publicação

Salvador, Marília Vilela
Análise de misturas e monitoramento da troca isotópica H/D em fármacos por Ressonância Magnética Nuclear / Marília Vilela Salvador. -- 2024.
140 f.
Orientador: Francisco Paulo dos Santos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Insumo farmacêutico ativo. 2. Degradação. 3. Análise de misturas. 4. Deuteração. 5. Líquido iônico.
I. dos Santos, Francisco Paulo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Às amadas mulheres da minha vida: minha avó Geraldina Venâncio Vilela, minha mãe Maura Venâncio Vilela (*in memoriam*), com quem convivi tão pouco, minha tia-avó Maria Venâncio de Jesus (*in memoriam*) e minha avó paterna Dorvalina Maria de Jesus. Dedico esta tese a essas mulheres que tiveram poucas oportunidades, mas que me ensinaram tanto sobre força e resiliência.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos, em especial ao professor Antônio Gilberto Ferreira, por ter me dado a oportunidade e por fazer meus olhos brilharem pela técnica de RMN. Muito obrigada por sempre me aceitar de volta.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realizar meu doutorado. Ao grupo LAMOCA e, em especial, ao meu orientador Francisco Paulo dos Santos, por aceitar o desafio de me orientar com o doutorado em andamento, pela sua disponibilidade e discussões fundamentais na conclusão do meu doutorado, e também a Leandro Scorsin por toda a ajuda científica ao longo do meu doutorado e por me ensinar tanto sobre cinética química.

A todos do laboratório de RMN da UFSCar, em especial aos meus amados amigos Flávio Kock, Wellington Pio, Rafael Esteves e Paula Scarabotto, do Laboratório de RMN da UFSCar, pelos inúmeros cafés, risadas e bebidinhas. A minha mais que especial amada amiga Gabriela Carosio, por todos os conselhos, broncas, inúmeras viagens e jantares.

Ao professor Tiago Venâncio, pelas inúmeras aulas práticas de instrumentação no JUICE, pelas aulas de química orgânica e, em especial, pelas horas de conversas sobre músicas, viagem, comida, experiências profissionais e de vida, você deixou esse período mais sereno.

Ao meu amado companheiro de vida, Samuel Silva, por toda a paciência, carinho, motivação, além das explicações técnicas de matemática e computação, e por ter segurado as pontas nesta reta final.

Aos meus amigos/irmãos que a vida me deu em Goiás, São Paulo e no Rio Grande do Sul. As minhas amigas presentes desde a época do mestrado Marília Sonogo, Mariana Floria. As meninas gaúchas da CS (Construção Socialista) pelas inúmeras conversas, estudos e discussões nos nossos encontros online durante a pandemia, em especial desse mesmo grupinho a minha amiga Vivi Zamboni por todo apoio e conversas na reta final e a todo o grupo das Festas Épicas. Vocês tornaram tudo isso mais leve.

A Alexandra Elbakyan fundadora do Sci-Hub. Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS, pela bolsa de doutorado e pelos auxílios financeiros nos projetos, e à FAPESP, pela estrutura do Laboratório de RMN da UFSCar.

Vem por aqui, dizem-me alguns com olhos doces
Estendendo-me os braços, e seguros
De que seria bom se eu os ouvisse
Quando me dizem: Vem por aqui
Eu olho-os com olhos lassos
(E há, nos meus olhos, ironias e cansaços)
E eu cruzo os braços
E eu nunca vou por ali

A minha glória e está
Criar desumanidade!
É não acompanhar ninguém
Que eu vivo com o mesmo sem-vontade
Com que rasguei o ventre a minha mãe

Se é ao que busco saber nenhum de vos responde
Por que me repetis: Vem por aqui?
Eu prefiro escorregar nos becos lamacentos
Redemoinhar aos ventos
Feito farrapos, arrastar os pés sangrentos
A ir por aí

Se vim ao mundo, foi
Somente para desflorar florestas virgens
E desenhar os meus próprios pés na areia inexplorada!
E o mais que faço não vale nada

E como, pois, sereis vos
Que me dareis machados, ferramentas, e coragem

Para eu derrubar os meus obstáculos?
Corre, nas vossas veias, sangue velho dos avós
E vos amais o que e fácil
Eu amo o longe e a miragem
Amo os abismos, as torrentes, os desertos

Eu tenho a minha loucura
Levanto-a, como um facho, a arder na noite escura
E eu sinto espuma, e sangue, e cânticos nos lábios

Ah, que ninguém me dê piedosas intenções
Ninguém me peça definições
Ninguém me diga: Vem por aqui
A minha vida é um vendaval que se soltou
É uma onda que se alevantou

Um átomo a mais que se animou

Não sei por onde vou
Não sei para onde vou
Mais sei que não vou por aí

Me larga, não enche
Você não entende nada
E eu não vou te fazer entender
Me encara, de frente
É que você nunca quis ver
Não vai querer, nem vai ver

Meu lado, meu jeito
O que eu herdei de minha gente
Eu nunca posso perder
Me larga, não enche
Me deixa viver, me deixa viver
Me deixa viver, me deixa viver

(Maria Bethânia, Cântico Negro/Não enche)

Artigo publicado durante o período de doutoramento

Artigo relacionado à Tese

M. Vilela Salvador, L. Scorsin, R. De Oliveira Gonçalves, T. Venâncio, F.P. Dos Santos. Innovative deuteration strategies: Ionic liquid catalyzed synthesis of deuterated pharmaceuticals. *Journal of Molecular Liquids* **2024**, 401, 124653.

Trabalhos publicados em anais de congressos

Poster

SALVADOR, M.V.; Venâncio, T.; Dos Santos, F.P. The degradation of sofosbuvir under acid stress: a mixture analysis approach by NMR spectroscopy. *18th NMR Meeting*, held online, 2021.

ARIZA, E.; Venâncio, T.; Salvador, M.V.; Kock, F.V.C. Identificação de produtos de degradação de fármaco em uma mistura a partir da técnica DREAMTIME – um estudo preliminar. *XVII Jornada Brasileira de Ressonância Magnética*, Fortaleza- CE, 2022.

SALVADOR, M.V.; Ribeiro, G.H.; Scorsin, L.; Venâncio, T.; Dos Santos, F. P. Mapping the interaction of the flunitrazepam and its deuterium labelled form with the HSA protein by STD-NMR. *19th NMR Meeting*, Rio de Janeiro- RJ, 2023.

ARIZA, E.; Venâncio, T.; Kock, F.V.C.; Salvador, M.V. DREAMTIME NMR used for identifying the products of the acid and basic degradation of sofosbuvir in a mixture – a complete study. *19th NMR Meeting*, Rio de Janeiro- RJ, 2023.

Apresentação Oral

SALVADOR, M.V.; Scorsin, L.; Venâncio, T.; Dos Santos, F.P. Monitoramento de reações de H/D em fármacos por espectroscopia de RMN. *XVII Jornada Brasileira de Ressonância Magnética*, Fortaleza- CE, 2022.

RESUMO

Esta tese de doutorado investiga duas áreas cruciais para a ciência farmacêutica utilizando técnicas avançadas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). No primeiro capítulo, estudamos a degradação dos Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs) Sofosbuvir e Tenofovir disoproxil fumarato em diferentes condições, como meio ácido e básico. A degradação dos IFAs é um problema significativo na indústria farmacêutica, pois pode afetar a eficácia e a segurança dos medicamentos. Nossos resultados demonstraram que a RMN, especialmente com o núcleo de ^{31}P , é uma ferramenta poderosa para monitorar reações de degradação sem necessidade de separação prévia dos componentes. A técnica permitiu a identificação e quantificação de vários produtos de degradação, proporcionando uma análise detalhada das misturas complexas. Observamos a formação de vários produtos de degradação e a técnica de RMN permitiu a análise detalhada das misturas complexas, fornecendo informações sobre o número de componentes e suas naturezas moleculares. Além disso, a metodologia desenvolvida pode ser aplicada para outros IFAs, oferecendo uma abordagem universal para o estudo de degradação de medicamentos. No segundo capítulo, focamos no monitoramento de reações de troca isotópica H/D em fármacos utilizando RMN. A substituição de hidrogênio por deutério em compostos orgânicos é uma estratégia importante na modificação de medicamentos para melhorar sua estabilidade e perfil farmacocinético. Nossos estudos mostraram que a RMN é uma técnica sensível e precisa para acompanhar essas reações, facilitando o desenvolvimento de novos fármacos deuterados. O método possibilitou o monitoramento em tempo real das reações de troca isotópica, proporcionando informações valiosas sobre as condições ótimas de reação e a cinética dos processos. Este estudo não só amplia o conhecimento sobre a degradação de IFAs como também oferece uma abordagem inovadora para a síntese e análise de moléculas deuteradas, prometendo avanços significativos na área farmacêutica. A combinação de técnicas de RMN com outras metodologias analíticas pode abrir novos caminhos para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e seguros.

Palavras chave: Insumo farmacêutico ativo; degradação; análise de misturas; deuteração; líquido iônico.

ABSTRACT

This doctoral thesis explores two critical areas in pharmaceutical science using advanced Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques. The first chapter investigates the degradation of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) Sofosbuvir and Tenofovir disoproxil fumarate under various conditions, such as acidic and basic environments. The degradation of APIs is a significant issue in the pharmaceutical industry as it can affect the efficacy and safety of medications. Our results demonstrated that NMR, particularly with the ^{31}P nucleus, is a powerful tool for monitoring degradation reactions without the need for prior separation of components. The technique allowed for the identification and quantification of several degradation products, providing a detailed analysis of complex mixtures. We observed the formation of several degradation products, and the NMR technique allowed detailed analysis of complex mixtures, providing information on the number of components and their molecular natures. Additionally, the developed methodology can be applied to other APIs, offering a universal approach for studying drug degradation. The second chapter focuses on monitoring H/D isotopic exchange reactions in pharmaceuticals using NMR. The replacement of hydrogen with deuterium in organic compounds is a key strategy in modifying drugs to improve their stability and pharmacokinetic profile. Our studies showed that NMR is a sensitive and precise technique for tracking these reactions, facilitating the development of new deuterated drugs. The technique allowed real-time monitoring of isotopic exchange reactions, providing valuable information on optimal reaction conditions and reaction kinetics. This study not only expands the knowledge of API degradation but also offers an innovative approach to the synthesis and analysis of deuterated molecules, promising significant advancements in the pharmaceutical field. The combination of NMR techniques with other analytical methodologies can pave the way for the development of more effective and safer medications.

Keywords: Active pharmaceutical ingredient; degradation; mixture analysis; deuteration; ionic liquid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química dos IFAs deuterados. **a)** Deutetrabenzina e **b)** Deucravacitiniba. 23
- Figura 2.** Digrama a) da energia potencial para ligações C-H e C-D e b) da energia potencial para clivagem da ligação C-H e C-D. 23
- Figura 3. a)** Estrutura molecular do sofosbuvir (SFBV), fórmula molecular $C_{22}H_{29}FN_3O_9P$ e massa molar $529,5 \text{ g.mol}^{-1}$ e em **b)** Estrutura molécula do tenofovir disoproxil fumarato (TNFV), fórmula molecular $C_{23}H_{34}N_5O_{14}P$ e massa molar $635,5 \text{ g.mol}^{-1}$ 27
- Figura 4.** Causas de desbalanço de massas. As categorias principais são indicadas nas cinco caixas. 30
- Figura 5.** Representação esquemática da sequência de pulsos mais empregada para determinação dos tempos de relaxação longitudinal. 32
- Figura 6.** Espectros de RMN de ^{31}P (400 MHz, 25 °C, DMSO), a sequência de pulso usada para medir o T_1 foi a de inversão e recuperação t1rpg (nomenclatura Bruker) para a amostra de sofosbuvir degradada em meio ácido. A sigla PDP significa produto de degradação contendo fósforo. 33
- Figura 7.** Espectro de DOSY de 1H da amostra azitromicina (verde) contaminada com cetaconazol (vermelho), em DMSO- d_6 adquirido em equipamento de 600 MHz para 1H 34
- Figura 8. a)** Representação da sequência de pulsos eco de spin. **b)** Diagramas vetoriais do experimento de eco de spin (regra da mão esquerda, por isso o vetor está no eixo y), mostrando o efeito dos pulsos na magnetização com o campo não homogêneo.⁹⁴ 35
- Figura 9.** Representação da sequência de eco de spin com gradiente. Sendo Δ é o atraso da difusão, δ é a duração e gradiente (G) é a intensidade incrementada do pulso de gradiente retangular. 36
- Figura 10.** Perfil de decaimento dos sinais da mistura contendo azitromicina e cetaconazol. Foram adquiridos 16 espectros e as intensidades de gradiente foram incrementadas de 2,5 para 49,1 G/cm. 37
- Figura 11.** Gráfico da Intensidade do Sinal (I) pela Força do Gradiente de Campo ($T^2.m^{-2}$), no qual pode ser observado um perfil de decaimento exponencial. 37
- Figura 12.** Esquema da sequência de pulso ledbpgp2s. 39
- Figura 13.** Perfis de decaimento da intensidade dos sinais calculados para diferentes núcleos. Figura adaptada.⁹⁵ 40
- Figura 14.** Mapa de difusão por RMN DOSY 1H da amostra de SFBV parcialmente degradada em condição ácida. A análise foi realizada após 128 horas do início da reação. A concentração

usada foi de 1,5 mol.L ⁻¹ de DCl. O DOSY de ¹ H foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 2,0 ms (δ) e um tempo de difusão de 70 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm.	46
Figura 15. Mapa de difusão por RMN DOSY ³¹ P do SFBV parcialmente degradada em condição ácida. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de 1,5 mol.L ⁻¹ de DCl. O experimento de DOSY ³¹ P foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 3,8 ms (δ) e um tempo de difusão de 120 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm. A sigla PDP significa produto de degradação contendo fósforo.	47
Figura 16. Mapa de contorno do espectro de 2D- ¹ H- ³¹ P-HMBC da degradação ácida do SFBV em DMSO.	47
Figura 17. RMN de ¹ H (400 MHz, 25 °C, DMSO). Acompanhamento da reação por 24 horas da degradação ácida do Sofosbuvir na concentração de 1,5 mol.L ⁻¹ de DCl, as regiões expandidas destacam-se pela formação dos produtos de degradação com o tempo.	48
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição dos produtos de degradação da molécula sofosbuvir na degradação ácida, adquirido depois de 24 horas. Os sinais destacados com um asterisco são sinais em que a sobreposição dos sinais dos produtos de degradação com a molécula de partida.	49
Figura 19. Mapa de contorno ¹ H- ¹⁵ N HMBC (600 MHz, 25 °C, DMSO) da reação de degradação ácida do sofosbuvir.	50
Figura 20. Espectro de RMN de ³¹ P (400 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição dos produtos de degradação da molécula sofosbuvir na degradação ácida, fixamos a concentração de SFBV em 0,056 mol.L ⁻¹ a) Concentração de 0,5 mol.L ⁻¹ de DCl b) 1,0 mol.L ⁻¹ de DCl c) 1,5 mol.L ⁻¹ mol de DCl.	52
Figura 21. Perfil de formação dos produtos de degradação. a) O gráfico representa a formação do PDP1 no espectro de ³¹ P em função do tempo. b) O gráfico representa a formação do PDP2 no espectro de ³¹ P em função do tempo. c) O gráfico representa a formação do PDP3 no espectro de ³¹ P em função do tempo.	53
Figura 22. Gráfico da variação da concentração de [DCl] <i>versus</i> os valores de <i>k</i> _{obs} para uma reação de degradação de ordem zero.	54
Figura 23. Mapa de difusão por RMN DOSY ¹ H da amostra de TNFV parcialmente degradada em condição ácida. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de 1,0 mol.L ⁻¹ DCl. O DOSY ¹ H foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 1,8 ms (δ) e um tempo de difusão de 100 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm.	54

- Figura 24.** Mapa de difusão por RMN DOSY ^{31}P da amostra de TNFV parcialmente degradada em condição ácida. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ DCl. O DOSY ^{31}P foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 3.6 ms (δ) e um tempo de difusão de 100 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm. A sigla PDP significa produto de degradação contendo fósforo..... 55
- Figura 25.** Mapa de contorno do espectro de 2D- ^1H - ^{31}P -HMBC da degradação ácida do TNFV em DMSO. 55
- Figura 26.** Espectro de RMN de ^{31}P (400 MHz, 25 °C, DMSO) da molécula Tenofovir parcialmente degradada em meio ácido ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl).com expansão do sinal da molécula de referência ácido fosfórico em 0,0 ppm. 56
- Figura 27.** Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição dos produtos de degradação da molécula tenofovir na degradação ácida. Os sinais destacados com um asterisco são sinais em que a sobreposição dos sinais dos produtos de degradação com a molécula de partida. 58
- Figura 28.**Espectro de RMN de ^{31}P (400 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição dos produtos de degradação da molécula sofosbuvir na degradação ácida, fixamos a concentração de TNFV em $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ a) Concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl b) $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl c) $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl..... 59
- Figura 29.** Perfil de formação dos produtos de degradação. O gráfico representa a formação do PDP1 no espectro de ^{31}P em função do tempo..... 59
- Figura 30.** Gráfico da variação da concentração de [DCl] *versus* os valores de k_{obs} para uma reação de degradação de ordem zero..... 60
- Figura 31.** Degradação ácida ($1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl) do SFBV monitorada por RMN ^{31}P . São apresentados quatro espectros dos tempos zero, 12 horas, 24 horas e 48 horas. 60
- Figura 32.** a) Mapa de difusão por RMN DOSY ^1H da amostra de SFBV parcialmente degradada em condição alcalina. b) Expansão do mapa de difusão RMN DOSY ^1H . A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ NaOD. O DOSY ^1H foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 1,8 ms (δ) e um tempo de difusão de 70 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm..... 62
- Figura 33.** Mapa de difusão por RMN DOSY ^{31}P adquirido após 128 horas de degradação básica do sofosbuvir a concentração usada de NaOD foi de $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$, adquirida com um pulso de gradiente de codificação de duração de 3,5 ms (δ) e um tempo de difusão de 80 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm..... 62
- Figura 34.** Os espectros de ^{31}P obtidos durante 48 horas de teste de estresse alcalino mostram, na ampliação, os sinais referentes ao deslocamento químico do sofosbuvir a 3,79 ppm e do

intermediário a 3,73 ppm, formado logo após a adição da base ao meio. Os espectros representados nesta figura foram adquiridos a cada 52 minutos; na figura, são apresentados apenas metade do total de 52 espectros obtidos em 48 horas, para melhor visualização. a) 0,05 mol.L ⁻¹ de NaOD; b) 0,1 mol.L ⁻¹ de NaOD; e c) 0,2 mol.L ⁻¹ de NaOD.	63
Figura 35. Perfil de consumo dos sinais 3.79 ppm (SFBV) e 3,73 ppm (Intermediário). O gráfico representa o decaimento da intensidade absoluta dos sinais no espectro de ³¹ P em função do tempo. Nas concentrações de NaOD, 0,05 mol.L ⁻¹ , 0,1 mol.L ⁻¹ e 0,2. mol.L ⁻¹	64
Figura 36. Perfil de consumo e formação. a. O gráfico representa o decaimento da intensidade absoluta do intermediário em 3,73 ppm no espectro de ³¹ P em função do tempo, para este gráfico a intensidade absoluta foi dividida por dez. b. Intensidade absoluta do sinal do fenolato no espectro de ¹ H, especificamente do sinal em 6,73 ppm. Para esse experimento a condição de degradação foi de 0,2 mol.L ⁻¹ de NaOD.	65
Figura 37. Espectros de absorbância da degradação alcalina do SFBV.	66
Figura 38. Espectros de absorbância da degradação alcalina do SFBV com a variação do pH.	66
Figura 39. Gráfico da constante de velocidade observada em função do pH. A linha em preto corresponde ao meio com água e a solução padronizada de NaOH e a linha em azul o meio com água deuterada e NaOD.....	67
Figura 40. Gráfico de Arrhenius: Constantes de velocidade observada em função da temperatura para a degradação do SFBV em pH=12.....	68
Figura 41. Gráfico de Eyring: Constantes de velocidade observada em função da temperatura para a degradação do SFBV em pH=12.	68
Figura 42. Mapa de difusão por RMN DOSY ¹ H da amostra de TNFV parcialmente degradada em condição básica. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de 0,2 mol.L ⁻¹ NaOD. O DOSY ¹ H foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 1,6 ms (δ) e um tempo de difusão de 80 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm.	69
Figura 43. Mapa de difusão por RMN DOSY ³¹ P da amostra de TNFV parcialmente degradada em condição básica. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de 0,2 mol.L ⁻¹ NaOD. O DOSY ³¹ P foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 3.6 ms (δ) e um tempo de difusão de 100 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm. A sigla PDP significa produto de degradação contendo fósforo.....	70
Figura 44. Mapa de contorno do espectro de 2D- ¹ H- ³¹ P-HMBC da degradação básica do TNFV em DMSO-d ₆	71

Figura 45. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição dos	71
Figura 46. Espectro de RMN de ^{31}P (400 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição do produto de degradação da molécula tenofovir na degradação básica, fixamos a concentração de TNFV em 0,02 mol.L ⁻¹ a) Concentração de 0,04 mol.L ⁻¹ de NaOD b) 0,1 mol.L ⁻¹ de NaOD c) 0,2 mol.L ⁻¹ mol de NaOD.	72
Figura 47. Um resumo das etapas e condições da reação de troca H/D usando os catalisadores BMMI.Pro e BMMI.Im, envolvendo os substratos alquil e benzil que foram deuterado por Dos Santos et.al. (2017), incluindo as porcentagens correspondentes de deuteração obtidas com os catalisadores BMMI.Pro e BMMI.Im. Os sítios de deuteração são destacados nas moléculas. ¹³⁸	77
Figura 48. Estruturas moleculares dos IFAs deste estudo para a reação de troca H/D, o flunitrazepam (1), dipropionato de betametasona (2), e oxcarbazepina (3).	78
Figura 49. Troca H/D catalisada pelos metais platina e paládio em diferentes substratos.a) Ibuprofeno b) Derivado da adenina. Os números em azul corresponde as porcentagens de troca.	80
Figura 50. Troca H/D catalisada por ácido em D ₂ O do polifenol enterolactona. ¹⁵³	81
Figura 51. Troca H/D catalisada por base em D ₂ O da androstenediona.	81
Figura 52. Síntese de sais de imidazólio parcialmente deuterados. Os números em azul indicam a porcentagem de deuteração alcançada.	82
Figura 53. Ilustração do mapeamento dos grupos do epítipo (<i>Group Epitope Mapping</i> - GEM) para dada interação proteína-ligante em uma troca rápida entre ligante livre e complexado. Os grupos representados por um átomo de hidrogênio grande (H) estão em contato mais próximo com a proteína, enquanto os hidrogênios de tamanho mediano simbolizam grupos com menor interação. Os H menores representam um grupo com quase nenhum contato com a proteína, recebendo saturação mínima (Figura adaptada). ¹⁷⁹	87
Figura 54. Estruturas moleculares dos IFAs deste estudo para a reação de troca H/D, incluem o flunitrazepam (1), dipropionato de betametasona (2), e oxcarbazepina (3).	91
Figura 55. Espectro RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, CDCl ₃) de (1) deuterado com BMMI.Pro: (a) estado inicial, (b) 2 h após início da reação, e (c) 24 h após início da reação (consultar a Tabela 1, entrada 4).	93
Figura 56. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, CDCl ₃) de (2) deuterado com BMMI.Pro. (a) Início da reação. (b) Após 2 horas (Tabela 1, entrada 2). (c) Após 24 horas. (d) Após 48 horas (Tabela 1, Entrada 5).	94

Figura 57. Diferença entre a porcentagem de deuteração de átomos de hidrogênio (H4' e H4'') ao longo do tempo no composto (2). Condições de reação: temperatura de 25 °C, 20 mol% BMMI.Pro, sem agitação, na concentração de 0,1 mol L ⁻¹ de dipropionato debetametasona.	94
Figura 58. Espectro NOESY de ¹ D (600 MHz, CDCl ₃) exibindo correlação NOE entre os hidrogênios H4', H4'', e H9 de (2): a) irradiação de sinal de H4'; b) irradiação de sinal de H4''; c) irradiação de sinal de H9 do anel de cinco membros.....	95
Figura 59. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, 25 °C, CDCl ₃) de (3) deuterado com BMMI.Pro. (a) Início da reação. (b) Após 2 horas. (c) Após 24 horas (Tabela 1, Entrada 6).	96
Figura 60. Ambos os gráficos ilustram o consumo de substrato (1) pelo tempo para monitoramento da reação de deuteração de (1). a) A concentração de (1) foi estabelecida como 0,2 mol.L ⁻¹ e concentrações do catalisador BMMI.Pro foram variadas: 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 mol.L ⁻¹ . (b) A concentração de BMMI.Pro (0,06 mol.L ⁻¹) foi mantida constante, ao passo que a concentração de (1) foi variada sistematicamente para 0,25, 0,3 e 0,35 mol.L ⁻¹ ..	98
Figura 61. Gráfico mostrando a variação da concentração de [LI] com os valores de k' ₂	100
Figura 62. Consumo de substrato ([1] vs t) durante reação de deuteração de (1) (0,25 mol.L ⁻¹) a temperaturas variadas em CDCl ₃	101
Figura 63. Parâmetros de reação e condições para a troca isotópica H/D do composto (1) e isolamento do (1) após deuteração em CDCl ₃ (0,25 mL, (1) = 0,2 mol.L ⁻¹ , [BMMI.Pro] = 0,04 mol L ⁻¹).....	102
Figura 64. Espectro de RMN de ² H (61,4 MHz, 25 °C) a) (1) deuterado com BMMI.Pro; b) somente (1) deuterado.	102
Figura 65. Espectro RMN de ¹ H (600 MHz, 298 K, CDCl ₃) de (1) deuterado a) após 12 horas de síntese, e seguida por purificação, resultando na deuteração de 70%. b) Após 24 horas de síntese e seguida por purificação, a deuteração atingiu 94%.	103
Figura 66. Espectro de RMN de ¹³ C { ¹ H} (125MHz, 25 °C, CDCl ₃) de (1) deuterado e purificado.	104
Figura 67. a) Espectros de ¹ H e STD-RMN na presença da proteína HSA. Os espectros foram adquiridos na temperatura de 25 °C, com 1,0 s de tempo de saturação, na proporção molar de 1:20 proteína/fármaco. Os sinais dos deslocamentos químicos encontram-se atribuídos no espectro de (I), a porcentagem de saturação de cada hidrogênio é identificada por uma escala de cores. a) STD do composto (1) deuterado b) STD do composto (1) não deuterado.	105
Figura 68. Gráfico "fator STD" (A _{STD}) versus o tempo de saturação de 0,1 à 10 s, comumente chamado de mapa de epítipo.	105
Figura 69. Curva obtida a partir de A _{STD} em função da concentração do ligante. O k _D foi calculado a partir do ajuste da curva por um método não linear com uma função do tipo	

Michaelis-Menten. **a)** e **b)** composto **(1)** não deuterado, sendo **a)** o deslocamento químico do H1 e **b)** o deslocamento químico dos H7, 14. **c)** e **d)** Semelhante a (a e b), mas para o composto **(1)** deuterado. 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites de impurezas permitidos nos IFAs com base na administração total diária.	28
Tabela 2. Condições de degradação utilizadas e os respectivos tempos de relaxação aplicados nos experimentos de RMN.	43
Tabela 3. Balanço de massa das moléculas parcialmente degradadas em condição ácida, ao final de 48 horas de degradação.	61
Tabela 4. Balanço de massa das moléculas parcialmente degradadas em condição básica, ao final de 48 horas de degradação.	73
Tabela 5. Deuteração do flunitrazepam (1), dipropionato de betametasona (2) e oxcarbazepina (3) usando 20 mol% de BMMI.Im e BMMI.Pro catalisador em CDCl_3 . ^a	92
Tabela 6. Equação derivada para o ajuste cinético e constantes de velocidade direta e inversa em função da concentração de LI e (1).	99
Tabela 7. Parâmetros cinéticos para a deuteração de (1) como função da temperatura ($[\mathbf{1}] = 0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ e $[\text{BMMI.Pro}] = 0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ em 0,5 mL de CDCl_3).	100

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BMMI.Im	1- ⁿ Butil-2,3-dimetilimidazólio imidazolato
BMMI.Pro	1- ⁿ Butil-2,3-dimetilimidazólio prolinato
BPPSTE	Bipolar Pulse Pair STimulated Echo
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
COSY	COrrrelation SpectroscopY
DOSY	Diffusion Ordered SpectroscopY ou espectroscopia ordenada por difusão
EM	Espectrometria de Massas
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatografia Gasosa
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICH	Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar spin-spin
LC-MS	Espectrometria de Massas e Cromatografia Líquida
LIs	Líquidos Iônicos
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (Espectroscopia do Efeito Nuclear Overhauser)
PFG	Pulse Field Gradients
PFGSE	Pulsed Field Gradient Spin-Echo
PFGSTE	Pulsed Field Gradient STimulated Echo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMI	Ressonância Magnética de Imagem
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TOCSY	TOtal Correlation SpectroscopY ou espectroscopia de correlação total
UV	Ultravioleta Visível
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	21
CAPÍTULO 1: Estudo de degradação dos Insumo Farmacêuticos Ativos (IFAs)	
Sofosbuvir e Tenofovir disoproxil fumarato	25
1.1 <i>Introdução</i>	26
1.2 <i>Revisão Bibliográfica</i>	28
1.2.1 Estudos de degradação de fármacos	28
1.2.2 Espectroscopia ordenada por difusão (DOSY)	33
1.2.2.1 Medidas de difusão por RMN.....	35
1.3 <i>Objetivo Geral</i>	41
1.4 <i>Objetivos Específico</i>	41
1.5 <i>Metodologia Experimental</i>	41
1.6 <i>Resultados e Discussão</i>	44
1.6.1 Degradação em meio ácido	45
1.6.2 Degradação em meio básico.....	61
1.7 <i>Conclusões</i>	73
CAPÍTULO 2: Monitoramento de reações de troca isotópica H/D por RMN	75
2.1 <i>Introdução</i>	76
2.2 <i>Revisão Bibliográfica</i>	78
2.2.1 Compostos deuterados.....	78
2.2.2 Cinética de reações	83
2.2.3 RMN em análises de interações proteínas-fármaco	86
2.3 <i>Metodologia experimental</i>	89
2.3.1 Preparo do líquido iônico	89
2.3.2 Síntese dos IFAs deuterados.....	89
2.3.3 Materiais e equipamentos	89
2.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN): STD-RMN.....	90
2.4 <i>Resultados e discussão</i>	91
2.5 <i>Conclusões</i>	107
3 REFERÊNCIAS	108
ANEXOS	118

INTRODUÇÃO GERAL

Esta tese objetiva descrever e utilizar métodos e experimentos por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) como principal ferramenta para interpretação e monitoramento de reações em Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs).

Desde as primeiras observações do fenômeno da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em fase condensada por Bloch¹ e Purcell² em 1946, e a descoberta do deslocamento químico em 1949,³ segundo o qual núcleos com diferentes ambientes químicos têm diferentes frequências de ressonância, a RMN se tornou um método analítico amplamente utilizado. Os desenvolvimentos e avanços contínuos feitos na área tornaram a RMN a principal técnica para a determinação de estruturas químicas até mesmo de moléculas complexas,^{4,5} como proteínas e outras macromoléculas,^{5,6} para a análise de cinética química,^{7,8,9} para o estudo de processos dinâmicos e diferentes matrizes biológicas.¹⁰⁻¹³ Suas características únicas como uma técnica rápida, não destrutiva e de alta resolução, combinadas com seu caráter quantitativo (já que a integral relativa de qualquer sinal de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos responsáveis por aquele sinal) fazem da RMN particularmente adequada para análise de um amplo espectro de aplicações. Em contraste com outros métodos analíticos, tais como a Cromatografia Líquida (CL) combinada com a Espectrometria de Massas (EM),¹⁴ a RMN pode ser utilizada para o estudo de misturas intactas, sem o requisito de separação física dos analitos.

O hidrogênio (¹H) é o núcleo mais amplamente utilizado em análises de RMN. Está presente na maioria dos sistemas químicos e é altamente sensível devido à sua elevada razão magnetogírica e à sua abundância natural de 99,99%. No entanto, em virtude do seu estreito intervalo de deslocamento químico (δ) e do desdobramento de sinais causado pelos acoplamentos escalares (J), podem surgir espectros com diversas sobreposições, o que torna a análise mais difícil. Outros núcleos frequentemente detectados incluem o carbono-13 (¹³C), o flúor-19 (¹⁹F), o nitrogênio-15 (¹⁵N) e o fósforo-31 (³¹P). Dentre eles, o ³¹P, que possui uma abundância natural semelhante à do ¹H, é um dos fatores que influenciam a sensibilidade em experimentos de RMN. Além disso, devido ao seu amplo intervalo de deslocamento químico, o ³¹P pode facilitar significativamente a análise de misturas complexas, ao reduzir a chance de sobreposição entre diferentes sinais de ressonância. Naturalmente, assim como ¹⁵N e ¹⁹F, seu uso é restrito a misturas que contêm moléculas com a presença desses núcleos específicos. Por outro lado, ¹³C é quase tão ubíquo quanto ¹H e oferece espectros simples e geralmente bem resolvidos, mas a sua abundância natural de 1,1%, portanto baixa sensibilidade. Além de alterar o núcleo de detecção, uma variedade de

experimentos homonucleares, tais como COSY,¹⁵ TOCSY,¹⁶ DOSY,¹⁷ NOESY,^{18,19} nesse último caso para o estudo conformacional e experimentos heteronucleares como HSQC,²⁰ HMBC,²¹ HSQC-TOCSY²² e novos como DREAMTIME,²³ fornecem informações ricas e poderosas para a identificação e atribuição de componentes de uma mistura complexa. O primeiro capítulo desta tese é focado em experimentos que usam detecção de ¹H e de ³¹P.

A análise de misturas apresenta, na maioria dos casos, um elevado grau de complexidade. Um dos cenários mais desafiadores envolve misturas que contêm analitos com uma ampla faixa de concentrações. A identificação e quantificação dos componentes de uma mistura é um processo trabalhoso que normalmente exige experimentos sofisticados e analistas experientes. Esse tipo de mistura é comumente encontrado no campo da caracterização de metabólitos, na indústria alimentícia e na farmacêutica. Neste último caso, a recomendação nacional, descrita no guia da Resolução da Diretoria Colegiada RDC 53/15²⁴ da Anvisa e no guia internacional do Conselho internacional para harmonização de requisitos técnicos para medicamentos de uso humano (ICH) Q3A,²⁵ exige que todas as impurezas acima de 0,1% de um Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) sejam identificadas e quantificadas. De acordo com tais recomendações, uma impureza é qualquer componente desconhecido ou indesejado gerado a partir de formulação imperfeita, reação entre o IFA e excipientes, ou degradação. Devido a estas regulamentações rigorosas, a caracterização de impurezas constitui um dos maiores desafios enfrentados pelas empresas farmacêuticas.

A análise por RMN de ¹H de misturas com um intervalo altamente dinâmico de concentração pode ser limitada pela presença de sinais que possuem deslocamentos químicos similares aos sinais de interesse. A sobreposição das impurezas com tais sinais pode complicar a análise, mascarando ou suprimindo completamente os sinais das impurezas investigadas. Portanto, explorar outros núcleos permite simplificar os espectros, removendo os sinais interferentes e, assim, minimizando a sobreposição.

Outro assunto relacionado a fármacos que tem ganhado bastante destaque é o uso de IFAs marcados com o núcleo deutério (D). Em 2017 a agência de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (FDA) aprovou o fármaco deutetrabenzina^{26,27} (Figura 1a) e em 2022 a deucravacitiniba^{28,29} (Figura 1b). A incorporação de deutério na estrutura do princípio ativo pode prolongar sua duração no organismo, reduzindo, assim, os efeitos colaterais, o que é uma consideração crucial para tratamentos de longo prazo.³⁰⁻³⁴

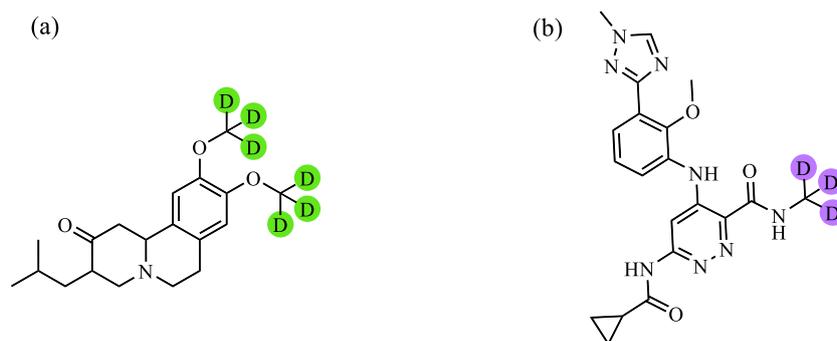


Figura 1. Estrutura química dos IFAs deuterados. **a)** Deutetrabenzina e **b)** Deucravacitiniba.

A troca de C-H por C-D altera as propriedades físico química, devido ao fenômeno conhecido como efeito isotópico cinético (KIE). Essa diferença nas propriedades decorre, principalmente, da maior massa reduzida (μ) do sistema vibracional C-D em comparação com o C-H. Como resultado, a energia de ponto zero (E_0) é menor na ligação C-D. Essas características podem ser matematicamente descritas pelas seguintes equações 1 e 2:^{35,36}

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad \text{Equação 1}$$

$$E_0 = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad \text{Equação 2}$$

Em que, m_1 e m_2 correspondem à massa dos átomos que compõem a ligação, K a constante de força da ligação e h a constante de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34}$ J·s).

A energia de ponto zero (E_0) representa a menor energia que um sistema vibracional pode ter em seu estado fundamental. Em um diagrama de energia potencial que mostra a ligação em função da distância interatômica, percebe-se que a ligação C-D está situada em um nível de energia mais baixo do que a ligação C-H, devido à sua menor energia de ponto zero (Figura 2a). Isso significa que é necessário fornecer mais energia para romper a ligação C-D em comparação com a C-H (Figura 2b).

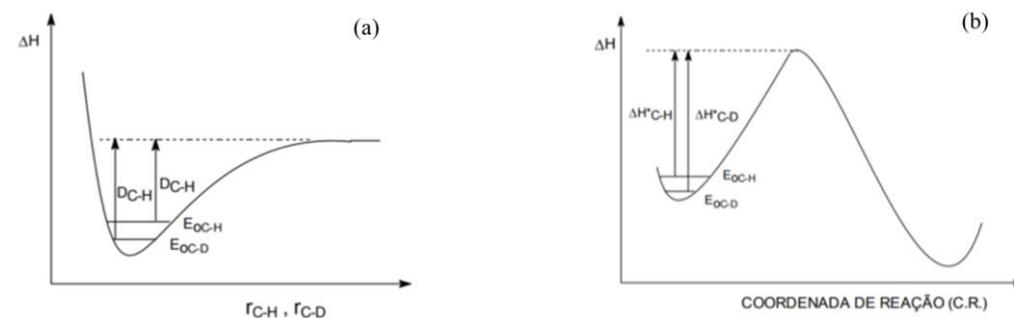
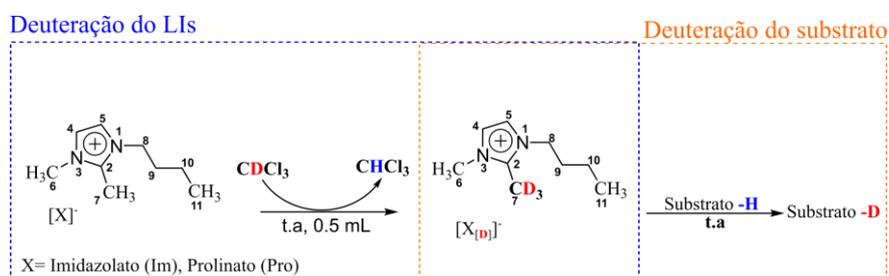


Figura 2. Digrama a) da energia potencial para ligações C-H e C-D e b) da energia potencial para clivagem da ligação C-H e C-D.

Portanto, devido ao efeito cinético isotópico, os medicamentos deuterados tendem a prolongar sua duração no organismo. Como resultado, diversas pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de métodos de síntese seletivos para a realização da troca isotópica $^1\text{H}/\text{D}$ em centros de carbono e na obtenção de moléculas deuteradas. Os principais métodos descritos na literatura envolvem o uso de catalisadores metálicos e múltiplas etapas, o que aumenta o custo da síntese. Conseqüentemente, o uso de métodos menos onerosos, como aqueles que utilizam líquidos iônicos (LIs), torna-se uma alternativa atraente.³⁷

Os líquidos iônicos (LIs) são sais orgânicos líquidos compostos por um cátion orgânico e um ânion, que pode ser orgânico ou inorgânico. A variação desses íons permite ajustar as propriedades físico-químicas conforme a aplicação desejada. Na literatura, é amplamente reconhecido que o cátion imidazólio é facilmente desprotonado na posição C2 devido ao seu elevado pKa (~24). O nosso grupo de pesquisa relatou a troca H/D preferencialmente no grupo C2-CH₃ de sais de 1-*n*-butil-2,3-dimetilimidazólio (BMMI) associados a diferentes ânions, sendo que até então havia poucos relatos da troca no grupo C2-CH₃. Após comprovado a troca investigou o uso de LIs puros como catalisadores em reações de deuteração de diferentes substratos contendo hidrogênios ácido, como alcinos e cetonas (Esquema 1). Para o esquema 1, é mencionado apenas os dois ânions utilizados nesse trabalho.



Esquema 1. Esquema geral das reações de deuteração.

Devido aos excelentes resultados obtidos com os substratos, propomos, neste trabalho, avaliar a capacidade dos líquidos iônicos BMMI.Im e BMMI.Pro como catalisadores para a troca H/D nos fármacos flunitrazepam, dipropionato de betametasona e oxcarbazepina. Como essas reações envolvem a troca isotópica $^1\text{H}/\text{D}$, a técnica de RMN é excelente para monitorar essa troca, devido à sua sensibilidade em acompanhar o processo por meio de três metodologias: experimentos convencionais de hidrogênio, experimentos de deutério e, por fim, no ^{13}C , onde é observado o surgimento de multipletos devido ao acoplamento $^1J_{\text{CD}}$.^{38, 39}

Para uma melhor organização, a tese foi dividida em dois capítulos: o primeiro aborda a análise de misturas e o segundo discute o monitoramento das reações de troca isotópica H/D de fármacos.

**CAPÍTULO 1: Estudo de degradação dos Insumo Farmacêuticos Ativos
(IFAs) Sofosbuvir e Tenofovir disoproxil fumarato**

1.1 Introdução

Para avaliar a estabilidade de IFAs e excipientes em diferentes meios, é necessário entender as vias de degradação, sendo importante a identificação dos produtos da reação. Os produtos de degradação resultam de reações químicas com a molécula original durante suas etapas de fabricação e/ou armazenamento.⁴⁰ Essas reações podem ser classificadas como degradação fotoquímica, térmica e oxidações, hidrólise ácida e alcalina, ou reações colaterais com um excipiente.^{24,25} A degradação do fármaco em condições extremas leva a uma mistura de produtos, cujos componentes podem ser separados e analisados individualmente. As técnicas de LC-(UV)-MS⁴¹ e GC-MS^{42,43} são métodos clássicos para esses tipos de análises, mas demandam tempo para desenvolver os protocolos de separação.⁴⁴ Além disso, o uso de um grande volume de solventes deve ser uma preocupação. Outro problema frequente é a determinação do balanço de massa, pois os protocolos de separação podem levar à perda de material e comprometer informações quantitativas. Portanto, o desenvolvimento de métodos espectroscópicos alternativos, que sejam os mais rápidos e reprodutíveis possíveis, é mais vantajoso.

A Espectroscopia de RMN tem algumas vantagens sobre outras técnicas, como a elucidação estrutural inequívoca, a análise quantitativa e não destrutiva. Além disso, a abordagem de reação dentro do tubo requer uma quantidade muito pequena de solvente. Em relação à análise de misturas, a Espectroscopia de Difusão Ordenada (DOSY) por RMN é amplamente empregada, pois promove, em um único experimento, a separação dos componentes com base em seu comportamento de autodifusão.⁴⁰ Diferenças modestas nos coeficientes de difusão são suficientes para permitir que o espectro de uma mistura intacta seja decomposto em subespectros dos componentes individuais.

O ^1H é o núcleo mais observado em experimentos de DOSY. No entanto, a estreita janela espectral de ^1H , bem como a divisão do sinal devido ao acoplamento escalar, estão associadas a uma sobreposição severa de sinais. Portanto, extrair os coeficientes de difusão dos componentes individuais pode ser desafiador. Nesse contexto, o uso dos núcleos ^{19}F e ^{31}P pode ser interessante devido à sua alta sensibilidade e abundância natural, ampla janela espectral e possibilidade de obtenção de sinais desacoplados. O DOSY de ^{19}F já foi descrito como um método alternativo,⁴⁵ mas o de ^{31}P ainda não. Portanto, nosso objetivo é utilizar métodos baseados em RMN de ^{31}P , como DOSY e ^1H - ^{31}P -HMBC, como uma alternativa para estudar a degradação forçada ácido/base de dois pró-fármacos antivirais, empregando uma abordagem de análise de misturas por RMN, sem separar os componentes da mistura final. A motivação, conforme mencionado, é que o ^{31}P é altamente sensível e fornece espectros de RMN

qualitativos e quantitativos desacoplados. Entre os muitos fármacos que contêm ^{31}P em suas estruturas, uma classe importante são os pró-fármacos antivirais baseados em análogos de nucleotídeos.^{46, 47, 48}

O sofosbuvir possui o nome IUPAC de Isopropil (2S)- 2- [[[2R, 3R, 4R, 5R)- 5- (2, 4-dioxopirimidin- 1- il)- 4- fluoro- 3- hidroxi- 4- metiltetrahidrofuran-2 il] metoxi- fenoxi- fosforil] amino] propanoato cuja a estrutura molecular está apresentada na Figura 3a , é usado no tratamento da hepatite C e é uma molécula fosforamidato.⁴⁹ O tenofovir de nome IUPAC fumarato de 9- [(R)- 2- [[bis (isopropoxicarbonil) oxi] metoxi] fosfonil] metoxi] propil adenina cuja estrutura é apresentada na Figura 3b na forma de sal é usado no tratamento de infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que possui um centro assimétrico e, assim dois enantiômeros podem ser formados e ambas as espécies apresentam atividade antirretroviral semelhantes.^{50,51}

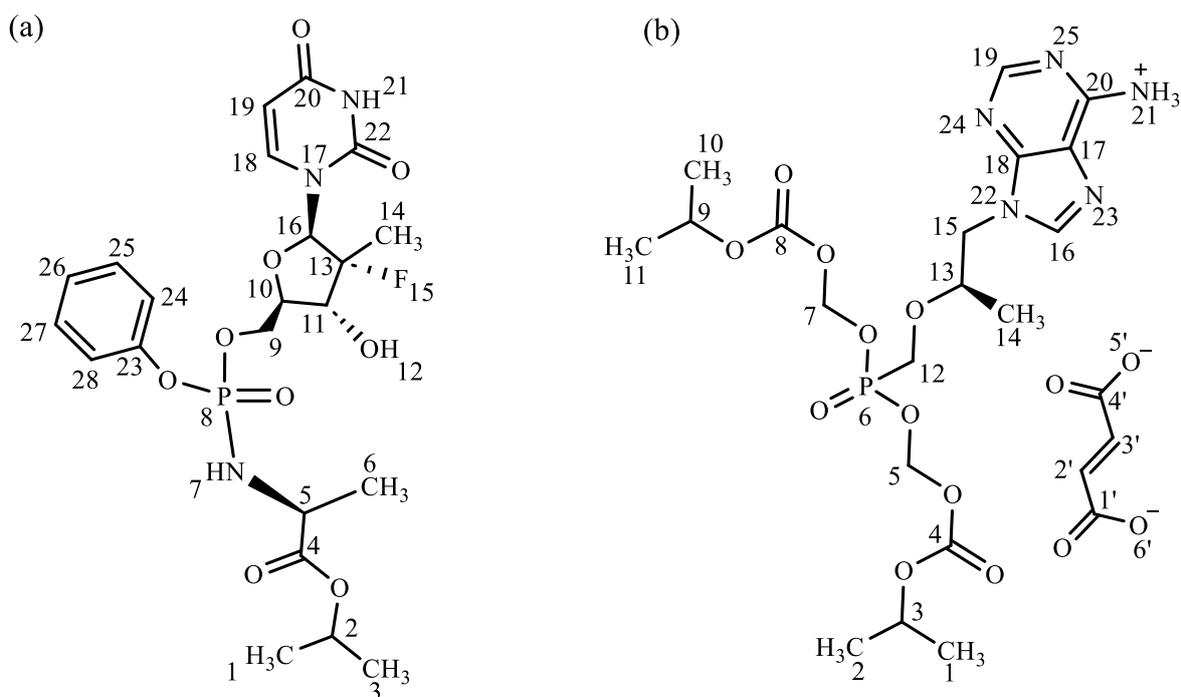


Figura 3. a) Estrutura molecular do sofosbuvir (SFBV), fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{FN}_3\text{O}_9\text{P}$ e massa molar $529,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e em **b)** Estrutura molécula do tenofovir disoproxil fumarato (TNFV), fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{P}$ e massa molar $635,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 Estudos de degradação de fármacos

A garantia e o controle de qualidade de IFAs e excipientes são questões cruciais na análise farmacêutica, visando prevenir danos aos pacientes. No Brasil, as metodologias de qualidade são reguladas pela farmacopeia e por documentos constantemente revisados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estão alinhados aos padrões regulatórios internacionais, como os emitidos pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH) e a Agência Americana de Medicamentos e Alimentos (FDA)

Impurezas farmacêuticas referem-se a quaisquer moléculas químicas que não sejam o princípio ativo e/ou excipientes presentes no medicamento.^{52,53} Sua presença, mesmo em pequenas quantidades, pode afetar a eficácia e a segurança dos fármacos, associando-se diretamente à qualidade do medicamento. O avanço do conhecimento químico e a implementação de software como Zeneth® (Lhasa Limited® - Leeds, Reino Unido),^{54,55} que realiza a predição *in silico* dos produtos de degradação do IFA sob diferentes condições de estresse e prevê a compatibilidade entre ativo e excipiente, têm contribuído significativamente.

Além disso, o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis e seletivos tem melhorado continuamente a determinação de impurezas em produtos naturais e sintéticos. Essas tecnologias estão em conformidade com as políticas e orientações dos guias regulatórios, os quais sempre exigiram que o IFA seja o mais puro possível.

Os principais guias que tratam de impurezas são o ICH Q3A(R2),⁵⁶ Q3B(R2),⁵⁷ além do guia nacional (RDC) 53/15²⁴. O Q3A(R2)⁵⁶ classifica as impurezas em orgânicas, inorgânicas e voláteis orgânicos. As impurezas orgânicas podem surgir durante o processo de fabricação e/ou durante o armazenamento. Na obtenção do IFA, as impurezas podem derivar da matéria prima e de intermediários sintéticos não isolados. O guia também aborda os limites para notificação, identificação e qualificação das impurezas no IFA, descrito na Tabela 1.^{24,58,57,59}

Tabela 1. Limites de impurezas permitidos nos IFAs com base na administração total diária.

Dose Diária Máxima ^a	Limite de Notificação ^{b,c}	Limite de identificação ^c	Limite de qualificação
≤ 2 g/dia	0,05%	0,10% ou 1mg ingerido por dia.	0,15% ou 1mg ingerido por dia.
>2g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

Guia Q3A(R2)ICH- Impurities in new drug substances.⁶⁰ ^aQuantidade de fármaco ingerido por dia; ^bLimites de notificação maiores devem ser cientificamente justificados; ^cLimites menores podem ser assumidos se a impureza for extremamente tóxica.

Se a porcentagem da impureza encontrada está dentro dos limites de notificação, esta deve ser reportada ao órgão regulatório. No entanto, se a impureza presente apresentar concentração superior, mas dentro do limite de identificação, ela deve ser caracterizada, ou seja, sua estrutura molecular e demais informações exigidas pelos órgãos regulatórios devem ser reportadas. Caso a impureza atinja o limite de qualificação, estudos toxicológicos deverão ser realizados.^{57, 58, 56}

O guia Q3B(R2)⁶¹ aborda impurezas em novos medicamentos, que podem ocorrer devido à formação de produtos da reação do IFA com um excipiente A (RDC) 53/15²⁴ discute as impurezas que podem ser formadas durante o ciclo de vida do medicamento ou do IFA, apresentar devido a interações químicas que podem modificar a estrutura química do IFA, resultando em impurezas relacionadas a produtos de degradação. Portanto, o estudo de degradação forçada descrito na RDC 53/15²⁴ visa prever as possíveis impurezas que possam surgir durante o processo de fabricação do medicamento ou no estudo de estabilidade.

O estudo de degradação forçada visa obter produtos de degradação através da exposição do IFA ou medicamento a condições como hidrólise (ácido-base), fotoestabilidade, oxidação por peróxido e temperatura.^{24,53} Portanto, é necessário ter um método analítico capaz de detectar a perda do fármaco e identificar os produtos de degradação, processo conhecido também como balanço de massas. O objetivo principal é assegurar que a quantidade total do IFA e dos produtos de degradação permanece constante, confirmando que não há perda de massa não explicada no sistema. Ou seja, o processo consiste em somar o teor do IFA degradado aos níveis de produtos de degradação encontrados, e essa soma deve se aproximar de 100% do valor inicial.^{62,63,64}

Este conceito, baseado na lei da conservação da massa, é um guia útil para avaliação dos dados, mas nem sempre pode ser atingido. Sua aplicação prática exige uma consideração cuidadosa do que está sendo medido. Assim, o foco da análise não deve ser direcionado exclusivamente para a obtenção de resultados próximos de 100%, mas sim para a confirmação da seletividade do método, investigação completa das vias de degradação do IFA e, se necessário, a identificação de produtos de degradação que possam ser indicadores da extensão da degradação por meio de uma via específica.^{65,66,64}

O cálculo do balanço de massas pode ser expresso de diferentes maneiras. O foco da tese foi o cálculo de balanço de massas absoluto (BMA) conforme a Equação 3.

$$BMA = \frac{(T_D + PD_D)}{(T_i + PD_i)} \quad \text{Equação 3}$$

Onde T_D é o teor do IFA na amostra após a degradação; PD_D é o somatório de produtos de degradação na amostra após a degradação; T_i é o teor do IFA na amostra não degradada, seria o teor obtido na primeira análise e por fim PD_i o somatório de produtos de degradação na amostra não degradada.⁶⁵

O balanço de massas também pode ser expresso pela Deficiência Absoluta de Balanço de Massas (DABM), calculada pela diferença entre o balanço de massas absoluto e os 100%, Equação 4. O DABM permite uma avaliação mais precisa da discrepância entre os resultados práticos e o valor teórico esperado de balanço de massas (100%).^{65,67}

$$DABM = 100 - \frac{(T_D + PD_D)}{(T_i + PD_i)} \quad \text{Equação 4}$$

O resultado do DABM pode ser tanto positivo quanto negativo: é positivo quando o aumento medido nos produtos de degradação é menor que a perda do IFA, e negativo quando o aumento nos produtos de degradação excede a perda do IFA, e é zero quando o balanço de massas é perfeito.⁶⁵

Quando um desvio no balanço de massas, menor ou maior do que o esperado teoricamente, é observado e esse resultado excede a variação do método (ou o erro analítico), uma justificativa técnica para o desvio deve ser apresentada. Essa justificativa é construída com base nos cinco tópicos mencionados na Figura 4.^{68,69}



Figura 4. Causas de desbalanço de massas. As categorias principais são indicadas nas cinco caixas.

A cromatografia líquida com detecção por absorvância UV é o método principal para separação de analitos e monitoramento da formação de impurezas em ensaios de degradação forçada, conseqüentemente realizando o balanço de massas. No entanto, apesar de ser amplamente utilizada, apresenta alguns inconvenientes que impactam nos resultados obtidos no balanço de massas. Um fator crucial que pode afetar esses resultados é o fator resposta: nem todos os produtos são detectados com a mesma sensibilidade, especialmente aqueles que não são cromóforo e pode haver co-eluição entre o IFA e o produto de degradação.⁷⁰

Portanto, o desenvolvimento de métodos espectroscópicos alternativos, rápidos e reprodutíveis é altamente vantajoso. A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) apresenta diversas vantagens sobre outras técnicas espectroscópicas.⁷¹ Destaca-se a capacidade de determinação de estruturas a nível molecular (análise qualitativa simultânea à quantitativa), a realização de medidas em tempo relativamente curtos (para núcleos como o ^1H , por exemplo e outros isótopos como ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , que podem ser explorados), e a possibilidade de análise simultânea de outros compostos de interesse, como excipientes, outros ativos, impurezas e produtos de degradação, desde que haja seletividade.^{71,72,73}

Além disso, de forma padrão a RMN opera em tubos de 5 mm, exigindo uma quantidade muito pequena de solvente.

É importante mencionar que a condição de ressonância é satisfeita com a aplicação de um pulso de curta duração e alta potência na região da frequência de precessão (ω) dos núcleos a serem analisados. Decorrido o pulso, os spins excitados passam a relaxar por dois mecanismos distintos e simultâneos: a relaxação longitudinal (T_1) e a relaxação transversal (T_2).⁷⁴ É durante esse tempo que se observa o sinal induzido pela magnetização dos spins, o FID (Free Induction Decay) que contém todas as frequências espectrais sobrepostas e é gerado um sinal no domínio do tempo para que seja convertido em domínio de frequência para obter um espectro que contém informações como o deslocamento químico e multiplicidades é necessário aplicar uma operação matemática denominada transformada de Fourier.⁷⁵

Apesar do emprego qualitativo das análises espectroscópicas por RMN seja o mais difundido, seu uso quantitativo, apesar da grande potencialidade, ainda é pouco explorado. A relação fundamental mais importante nas medidas quantitativas de RMN de alta resolução (RMNq) é que a área do sinal (A_x) em um espectro é diretamente proporcional ao número de núcleos que absorvem energia na radiofrequência correspondente a essa linha de ressonância (N_x). Equação 5.⁷⁶

$$A_X = K_S N_X$$

Equação 5

Onde, K_S é uma constante do espectrômetro.⁷⁴

Dessa forma, a RMN quantitativa pode ser utilizada como método absoluto, dispensando o uso de padrões. Portanto, a RMNq é particularmente útil na avaliação da pureza e na quantificação de impurezas em misturas complexas, sem a necessidade de separação prévia e sem exigir o uso de um padrão de referência idêntico ao analito.^{77,76,78}

Para uma medida quantitativa alguns parâmetros de aquisição dos experimentos devem ser cumpridos, além dos ajustes básico de sintonia fina da frequência (matching e tuning) e homogeneidade do campo magnético (shimming), o intervalo de tempo entre os pulsos, ou seja, o tempo de aquisição (aq/at) somado ao tempo de espera (d1), deve ser no mínimo igual a $5T_1$ (T_1 relaxação longitudinal), considerando um pulso de 90° . Isso é necessário para que ao menos 99% dos spins retornem em equilíbrio antes do próximo pulso mantendo, assim, informações quantitativa do espectro.^{71,79}

Para obter o valor de T_1 é utilizado uma sequência de inversão recuperação (Figura 5), primeiro é aplicado um pulso de 180° que está convencionalmente em fase negativa, para inverter a magnetização, e, após um tempo τ , é dado um pulso de 90° que retorna à magnetização e ocorre detecção. Este ciclo é realizado inúmeras vezes variando-se o valor de τ . No início quando τ é muito pequeno, o sinal terá máxima intensidade negativa. No decorrer da medida, esta intensidade vai diminuindo, passa pelo zero (valor de τ usado nas estimavas de T_1) e, então, se inicia o sinal com intensidade positiva, a qual aumentará até atingir um máximo e permanecer constante. Nesta condição τ é aproximadamente igual a $5T_1$.^{80,81,82,83}

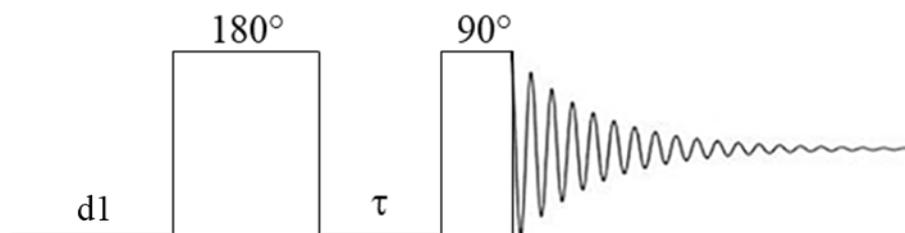


Figura 5. Representação esquemática da sequência de pulsos mais empregada para determinação dos tempos de relaxação longitudinal.

Na Figura 6, são mostrados 16 espectros de ^{31}P adquiridos variando o valor de τ . A amostra é uma mistura de quatro moléculas, e é possível observar pelos perfis dos espectros que cada molécula apresenta um valor de t_1 . Por exemplo, a molécula sofosbuvir possui o menor valor, aproximadamente 0,7 s, enquanto o produto de degradação 1 apresenta t_1 de

aproximadamente 5,5 s. Portanto, ao lidar com uma mistura de várias moléculas, é necessário utilizar o maior valor de t_1 obtido para assegurar que 99,99% da população de spins retorne ao estado de equilíbrio.

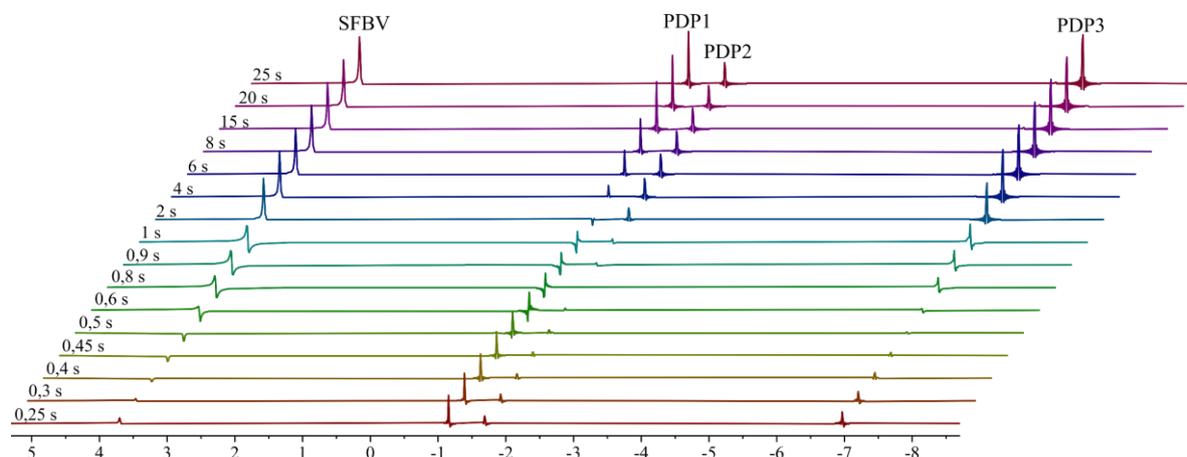


Figura 6. Espectros de RMN de ^{31}P (400 MHz, 25 °C, DMSO), a sequência de pulso usada para medir o T_1 foi a de inversão e recuperação $t_1\text{rpg}$ (nomenclatura Bruker) para a amostra de sofosbuvir degradada em meio ácido. A sigla PDP significa produto de degradação contendo fósforo.

Neste contexto, a medição quantitativa absoluta por RMN de alta resolução é uma técnica importante que, além de identificar qualitativamente os produtos de degradação formados, é útil para a realização do balanço de massas desses produtos.

1.2.2 Espectroscopia ordenada por difusão (DOSY)

A Espectroscopia Ordenada por Difusão (DOSY) é uma técnica importante de RMN para análise de misturas. Através dos experimentos de DOSY é possível obter os coeficientes de difusão para cada sinal individual de um espectro, permitindo distinguir sinais de compostos diferentes com base em seus comportamentos de difusão. Comparada a outras técnicas, como HPLC, a grande vantagem dos experimentos de DOSY é que não requer a separação física das substâncias, permitindo a análise de misturas intactas. Embora duas moléculas possam estar sobrepostas no cromatograma, elas podem ser distinguidas no DOSY devido aos diferentes coeficientes de difusão. No entanto, essa afirmação é válida apenas para moléculas cujos sinais não estão sobrepostos no espectro.

O resultado desse experimento é apresentado como um espectro bidimensional (2D), onde os sinais são dispersos horizontalmente de acordo com seu deslocamento químico e acoplamento escalar, e verticalmente de acordo com seus coeficientes de difusão. A Figura 7

ilustra um exemplo de espectro de DOSY 2D, onde os sinais de RMN são agrupados em dois conjuntos distintos com base em seus coeficientes de difusão, cada conjunto indicando a presença de um componente diferente na mistura.

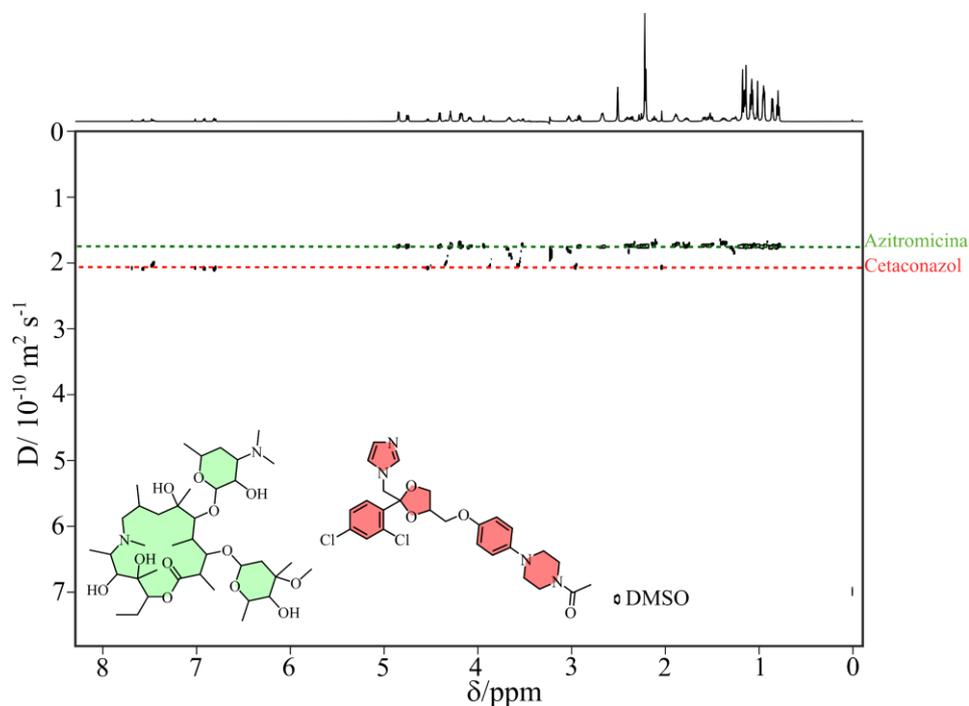


Figura 7. Espectro de DOSY de ^1H da amostra azitromicina (verde) contaminada com cetaconazol (vermelho), em DMSO-d_6 adquirido em equipamento de 600 MHz para ^1H .

O coeficiente de difusão D , utilizado pelo DOSY para separar os componentes de uma mistura, é uma medida quantitativa de difusão. Em um sistema sem ordem posicional e orientação de longo alcance, a difusão refere-se ao movimento aleatório das moléculas, influenciado pela energia térmica do sistema, pelo tamanho e forma da molécula, e pela viscosidade da amostra. Para uma partícula esférica em um fluido contínuo, o coeficiente de difusão D é definido pela equação de Stokes-Einstein (Equação 6).^{17,74,75}

$$D = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta r_s} \quad \text{Equação 6}$$

onde κ_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura do sistema, η é a viscosidade da solução e r_s é o raio de uma esfera com propriedades hidrodinâmicas equivalentes às das espécies em difusão. Portanto, a magnitude do coeficiente de difusão depende da temperatura e do tamanho da molécula. Observando a equação, é possível estabelecer uma relação entre o coeficiente de difusão e o tamanho da molécula. Assim, em experimentos realizados sob as mesmas condições de temperatura e viscosidade do solvente, pequenos valores de coeficientes de difusão correspondem a moléculas grandes e vice-versa.

Obter ou calcular um coeficiente de difusão para cada sinal individual do espectro nem sempre é fácil. O DOSY é muito sensível à sobreposição espectral, e várias soluções foram desenvolvidas para evitar ou minimizar esse problema. Essas soluções incluem a combinação de DOSY com outras técnicas de RMN,⁸⁴ a detecção de heteronúcleos,^{85,86} e a expansão para mais dimensões, como os experimentos de DOSY 3D.^{87,88,89,90} Os experimentos de difusão descritos nesta tese são bidimensionais e buscaram minimizar a sobreposição dos sinais dos espectros de ^1H explorando outros núcleos presentes na mistura analisada, como o ^{31}P .

1.2.2.1 Medidas de difusão por RMN

Na literatura, estão descritas várias sequências de pulso utilizadas para medir a difusão de moléculas. Independentemente da sequência de pulso utilizada, o princípio de medição é o mesmo, baseado em gradientes de campo pulsado (PFG, do inglês **P**ulsed **F**ield **G**radient).⁹¹

A medida de difusão por RMN pode ser inicialmente discutida com base nos "ecos de spin", uma sequência desenvolvida por Erwin Hahn em 1950.⁹² A sequência de pulso é bastante simples e é apresentada na Figura 8a, servindo como base para uma série de experimentos mais complexos na RMN e na Ressonância Magnética de Imagem (RMI).⁹³ O comportamento do vetor magnetização resultante, M , é mostrado na Figura 8b e ilustra o que acontece em cada etapa durante o desenvolvimento da sequência de pulso Spin-eco.

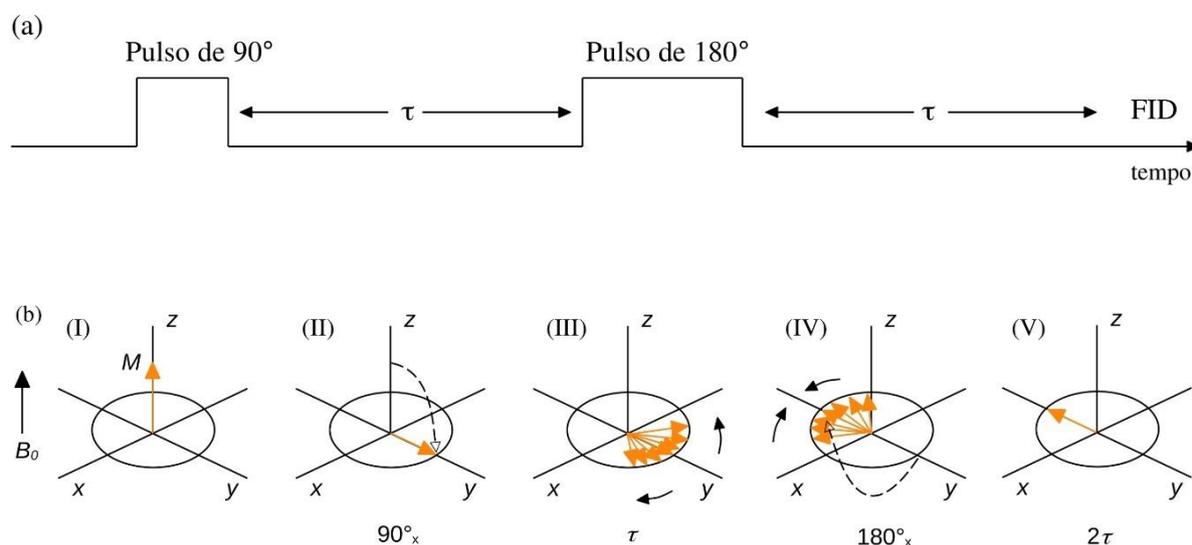


Figura 8. a) Representação da sequência de pulsos eco de spin. b) Diagramas vetoriais do experimento de eco de spin (regra da mão esquerda, por isso o vetor está no eixo y), mostrando o efeito dos pulsos na magnetização com o campo não homogêneo.⁹⁴

Na Figura 8b-I, observamos o vetor de magnetização M ao longo do eixo z , paralelo ao campo magnético B_0 . Em seguida um pulso de 90° é aplicado ao longo do eixo x ,

deslocando/rotacionando a magnetização para o plano eixo xy Figura 8b-II. No momento imediato do pulso de 90° em x , o sinal detectado é máximo, uma vez que a magnetização ainda não sofreu os efeitos de decaimento de T_1 (relaxação longitudinal) e/ou T_2 (relaxação transversal). Com o tempo, devido à não homogeneidade do campo magnético B_0 , os spins nucleares individuais começam a perder coerência e a magnitude da magnetização transversal diminui (Figura 8b-III). Após um certo tempo τ , um pulso de 180° é aplicado ao longo do eixo x , refocando os vetores de magnetização na direção negativa do eixo y (Figura 8b-IV e V). Entretanto, devido à não homogeneidade do campo magnético, a magnetização não é completamente refocada, resultando em um sinal com intensidade $I < I_0$.^{94,95,96}

O experimento de eco de spin com pulso de gradiente de campo "Pulsed Field Gradient Spin-Echo" ou PFGSE), desenvolvido por Stejskal e Tanner em 1965⁹⁷ (Figura 9) também é derivada do conceito de "eco de spin" de Hahn. No entanto neste caso, o campo magnético B_0 é homogêneo, e um outro campo magnético que varia linearmente (um gradiente de campo) é aplicado para criar a não homogeneidade do campo local. Esta sequência utiliza dois pulsos iguais de gradiente de duração δ (comumente chamado de delta pequeno) são inseridos em ambos os períodos τ de uma sequência eco de spin.

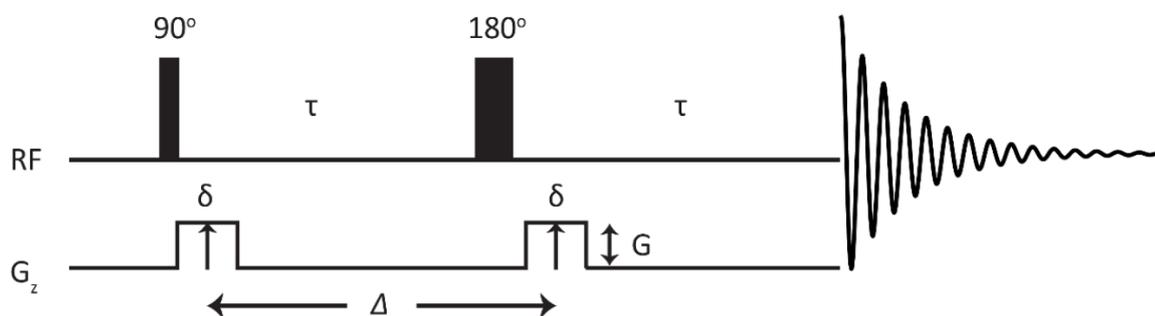


Figura 9. Representação da sequência de eco de spin com gradiente. Sendo Δ é o atraso da difusão, δ é a duração e gradiente (G) é a intensidade incrementada do pulso de gradiente retangular.

Desta forma, o pulso inicial de radiofrequência (RF) de 90° cria a magnetização transversal. Após excitação, é aplicado um gradiente de pulso que codifica difusão. Este gradiente perturba a homogeneidade do campo magnético estático e dá a cada spin uma fase dependente da posição, que pode ser refocada por um segundo pulso de gradiente de igual duração e magnitude.

A refocalização completa é possível somente quando o campo magnético a que os spins estão submetidos é o mesmo antes e depois do pulso RF de refocagem. Contudo, o movimento translacional aleatório dos spins não pode ser controlado. Os spins se movem livremente em

direções aleatórias. Spins que se difundem não experimentam exatamente o mesmo campo magnético durante o segundo pulso de gradiente, resultando em refocalização parcial e perda de sinal. A quantidade de perda de sinal depende da extensão da difusão durante o período de difusão, Δ (delta grande) da sequência de pulso.

A cada aumento na intensidade do pulso de gradiente de campo, haverá uma refocalização menos efetiva da magnetização, em consequência da maior difusão da espécie, acarretando um sinal mais atenuado. Em DOSY, uma série de experimentos é obtido, onde a intensidade do gradiente de campo pulsado é incrementada. Como mostrado na Figura 10, os espectros resultantes contêm sinais cuja a intensidade são atenuadas devido ao fato de que pulsos de gradiente mais fortes levam a atenuações mais severas e perda mais acentuada de sinal. Portanto, um gráfico do sinal pela força do gradiente de campo resulta em um perfil de decaimento exponencial do sinal (Figura 11)^{74,75,98,99}.

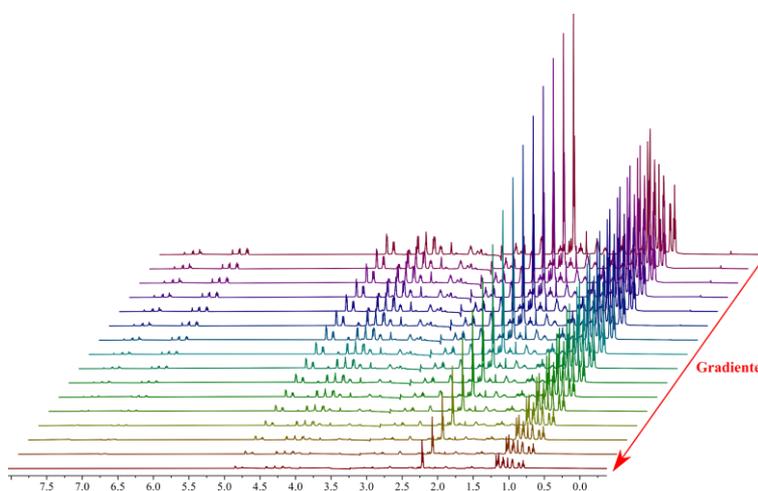


Figura 10. Perfil de decaimento dos sinais da mistura contendo azitromicina e cetoconazol. Foram adquiridos 16 espectros e as intensidades de gradiente foram incrementadas de 2,5 para 49,1 G/cm.

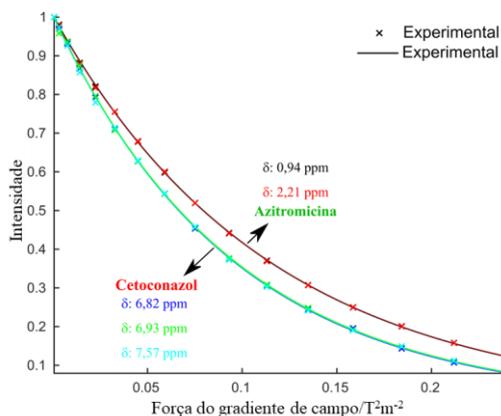


Figura 11. Gráfico da Intensidade do Sinal (I) pela Força do Gradiente de Campo ($T^2 \cdot m^{-2}$), no qual pode ser observado um perfil de decaimento exponencial.

Logo, a intensidade do sinal de RMN é atenuada em função do tempo de difusão (Δ) e da força do gradiente, que varia de forma quadrática ou linear ao longo dos incrementos. A obtenção do coeficiente de difusão é feita aplicando a equação de Stejskal-Tanner (Equação 7) sobre os dados obtidos:^{97,100}

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 \delta^2 g^2 \Delta'} \quad \text{Equação 7}$$

$$D = \frac{\ln \frac{I}{I_0}}{\gamma^2 \delta^2 g^2 \Delta'}$$

onde I representa a amplitude do sinal do eco de spin, I_0 é a intensidade de sinal na ausência de difusão, γ é a razão magnetogírica do núcleo em análise, g é a amplitude de gradiente e Δ' é o tempo de difusão corrigido pelos efeitos da duração do pulso de gradiente δ . Vale mencionar que γ é individual de cada núcleo estudado.

Medidas de difusão por RMN em amostras em solução estão sob risco quando o movimento dos spins das amostras é ditado não apenas pelo movimento Browniano aleatório, mas também pelo movimento coerente causado pela presença de gradientes de temperatura através da amostra. Esse movimento coerente é conhecido como convecção e geralmente conduz a distorções de fase e/ou perda de sinal, além de distorções na linha de base. Essas distorções na linha de base e/ou alargamento do sinal podem surgir devido à presença de corrente residual (Eddy current), que gera gradiente residual.

A taxa de convecção depende de vários parâmetros experimentais, tais como o tamanho e formato da amostra, as propriedades do líquido na amostra, características da sonda e controle de temperatura na sonda. A convecção pode ser minimizada alterando-se a própria amostra (por exemplo, solvente, altura da amostra, material do tubo de RMN) ou utilizando sequências de pulso projetadas apropriadamente. Uma fonte típica de convecção é o aquecimento causado pela aplicação dos pulsos de RF. Por exemplo, o acoplamento de um núcleo requer a aplicação contínua de um campo forte de RF durante a aquisição do núcleo detectado. Esse campo forte de RF dissipa potência na amostra, levando ao seu aquecimento e à formação de gradientes de temperatura ao longo do tubo.

Para minimizar tais efeitos, diversas sequências foram desenvolvidas: Pulsed Field Gradient STimulated Echo (PFGSTE),^{101,102} Bipolar Pulse Pair STimulated Echo (BPPSTE),¹⁰³ Convection Compensated Double Stimulated Echo, Oneshot,¹⁰⁴ dentre outras. Para esse trabalho utilizamos a sequência de pulso ledbpgp2s¹⁰⁵ (nomenclatura Bruker) (Figura 12), que utiliza pulsos de gradientes consecutivos em fase oposta, que atua reduzindo os erros de *Eddy current* e refocalizando o sinal do deutério, minimizando as perturbações no sinal do *lock*.

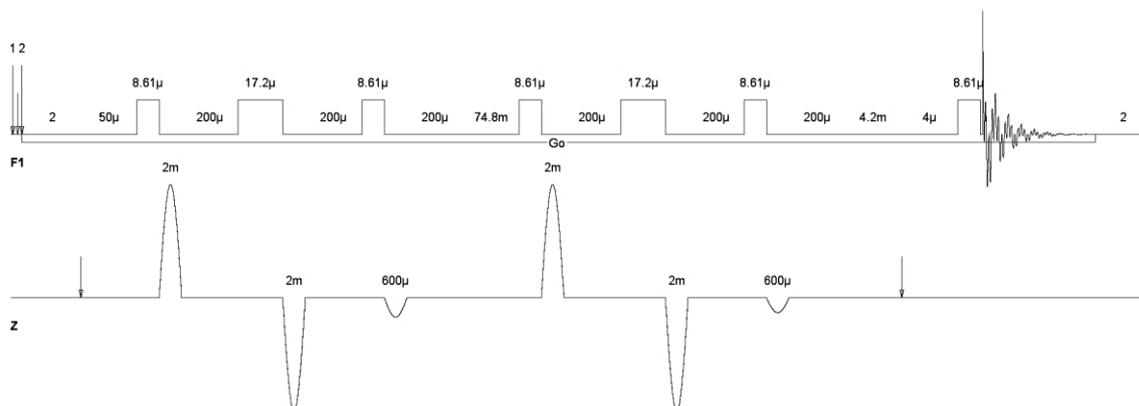


Figura 12. Esquema da sequência de pulso ledbpgp2s.

Há inúmeras aplicações para os experimentos de difusão por RMN, e para este trabalho destacam-se aquelas utilizadas para monitorar os produtos formados da interação dos IFAs com os excipientes de formulações farmacêuticas. No presente estudo, foi demonstrado que, através do experimento de DOSY, foi possível rastrear as misturas no medicamento.¹⁰⁶ Com base nos diferentes coeficientes de difusão das moléculas, o mesmo experimento foi aplicado para identificar falsificações em fármacos Trefi et al. (2009) conseguiram distinguir falsificações e imitações das formulações corretas de Viagra (Sildenafil).¹⁰⁷ O trabalho de Barbosa et al. (2017) realizou o monitoramento dos produtos de degradação do fármaco voriconazol em condições de estresse ácido, alcalino e de temperatura, sem a prévia separação, utilizando o DOSY de ^1H e ^{19}F com principal técnica para identificação dos produtos de degradação formados.⁴⁵

O trabalho publicado por Kapur, Cabrita e Berger (2000) utilizou DOSY ^{31}P e ^1H para obter informações sobre interações e afinidades de diferentes moléculas (trimetilfosfato, dibutilfosfite, óxido de trifetilfosfina e óxido de trietilfosfina) na ausência e na presença de trietanolamina. Observou-se uma redução no coeficiente de difusão do óxido de trifetilfosfina na presença de trietanolamina, indicando uma forte interação entre essas moléculas. Portanto, o DOSY ^{31}P mostrou-se sensível para detectar interações ocorridas no meio..¹⁰⁸

Apesar dos inúmeros trabalhos publicados utilizando a técnica de DOSY, não há trabalhos que utilizam DOSY ^{31}P para o monitoramento de produtos de degradação. O ^{31}P é altamente sensível e possui uma ampla janela espectral que minimiza problemas de sobreposição de sinais. No entanto, deve-se considerar que os parâmetros obtidos no ^1H DOSY podem não ser adequados para núcleos como o ^{31}P , que possui uma menor razão magnetográfica (γ). A γ do ^1H é igual a $26,7522128 \times 10^7 \text{ rad}/(sT)$ e do ^{31}P é $10,8394 \times 10^7 \text{ rad}/(sT)$. Isso ocorre porque as forças de gradiente efetivas totais empregados também dependem de γ . Conforme observado na equação de Stejskal-Tanner (Equação 7), o grau de atenuação da intensidade de

ressonância será reduzido à medida que γ diminui. Esse fato pode ser observado na Figura 13, onde são demonstrados os perfis de decaimento dos núcleos ^1H , ^{19}F , ^{31}P e ^{13}C . Uma menor atenuação significa que serão necessários tempos de difusão maiores e/ou durações de pulso de gradiente mais longas..⁷⁴

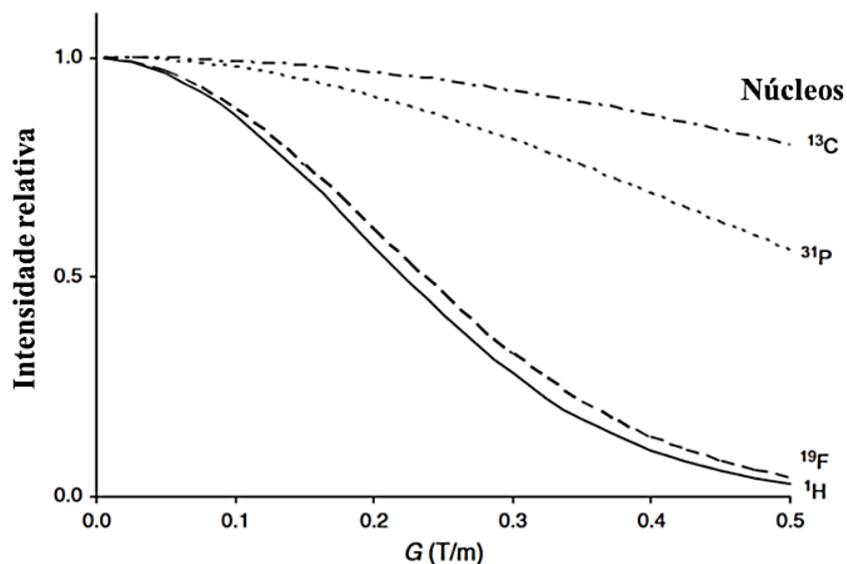


Figura 13. Perfis de decaimento da intensidade dos sinais calculados para diferentes núcleos. Figura adaptada.⁹⁵

Diante da perspectiva de aplicação da técnica de DOSY para o monitoramento dos produtos de degradação, o objetivo deste capítulo foi avaliar o ^1H DOSY e, principalmente, o ^{31}P DOSY como técnicas principais para a análise da mistura obtida na degradação ácida e básica.

1.3 Objetivo Geral

Utilizar métodos baseados em RMN de ^{31}P , como DOSY e ^1H - ^{31}P HMBC, como uma alternativa para estudar a degradação forçada em condições ácida e básica dos IFAs **Sofosbuvir** e **Tenofovir Disoproxil Fumarato**, no contexto de análise de misturas, considerando que, para essas análises, não será realizada a separação física dos IFAs e dos produtos de degradação.

1.4 Objetivos Específico

- Separar os produtos de degradação com os experimentos de difusão DOSY de ^1H e DOSY de ^{31}P ;
- Monitorar os produtos de degradação com experimentos quantitativos de ^{31}P ;
- Elucidar as estruturas dos analitos com experimento bidimensional ^1H - ^{31}P HMBC e propor mecanismo de degradação dos fármacos;
- Realizar o balanço de massas dos produtos de degradação.

1.5 Metodologia Experimental

Estudo de degradação dos fármacos Sofosbuvir e Tenofovir disoproxil fumarato

Foram realizadas as atribuições espectrais completas dos espectros de ^1H , ^{13}C e ^{31}P do sofosbuvir e do tenofovir disoproxil fumarato (Figura 3a e 3b) utilizando experimentos de RMN 1D e 2D, antes dos testes de degradação (Anexos 1-13). As atribuições dos sinais de ^1H e ^{13}C estão de acordo com os dados reportados na literatura.^{109,110} Também é reportado o assinalamento das constantes de acoplamento (J) dos hidrogênios H-6 e H-14 das metilas (ver Anexo 2), determinados com a aplicação das funções de transformação de Lorentz-Gauss (Anexo 2), não relatadas em artigos anteriores.

Assinalamento dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da molécula Sofosbuvir (Figura 3a)

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 11,51 (1H, s, NH21); 7,58 (1H, d, $^3J_{\text{H18H19}}= 7,94$ Hz, H18); 7,38 (2H, m, H24 e H28); 7,22 (2H, m, H25 e H27); 7,18 (1H,td, H26) 5,55 (1H, d, $^3J_{\text{H18H19}}= 8,1$ Hz, H19); 6,07 (1H, d, $^3J_{\text{H16F15}}= 23,00$ Hz, H16); 6,03 (1H,d, $^3J_{\text{H7H5}}= 2,71$ Hz NH7); 5,86 (1H, d, $^3J_{\text{H12H11}}= 6,71$ Hz; OH12); 5,55 (1H, d, $^3J_{\text{H19H18}}= 8,10$ Hz, H19); 4,86 (1H, sept, $^3J_{\text{H2H3}}= 6,26$ Hz, H2); 4,39 (2H, m, H9); 4,03 (1H, m, H10); 3,81 (1H, qd, $^3J_{\text{H5H6}}= 7,07$ Hz, $^3J_{\text{H5H7}}= 2,94$ Hz, H5); 3,90 (1H, qd, $^3J_{\text{H11H12}}= 6,79$ Hz); 1,28 (6H, d, $^3J_{\text{H14F15}}= 22,60$ Hz, H14); 1,24 (3H,dd, $^4J_{\text{H6H7}}= 0,98$ Hz, $^3J_{\text{H6H5}}= 7,12$ Hz, H6); 1,15 (6H, d, $^3J_{\text{H1H2,3}}= 6,26$ Hz Hz, H1 e H3), RMN de ^{13}C (^1H) (100,62 MHz): δ (ppm) 173,0 (1C, s, C4); 163,2 (1C,s, C20); 151,1 (1C, d, $^2J_{\text{C23P8}}= 4,2$ Hz, C23); 150,9 (1C,s,C22); 139,8 (1C, s, C18); 130,1 (2C, s, C24 e C28);

125 (1H, s, C26); 120,05 (2C, s, C25 e C27); 102,7 (1C,s, C19); 101,6 (1C, d, $^1J_{C13F15}= 180,9$ Hz, C13); 89,1 (1C, s, C16); 79,9 (1C, s, C10); 72 (1C, d, $^2J_{C11F15} =15,0$ Hz, C11); 68,4 (1C, s, C2); 65,1 (1C, s, C9); 50,2 (1C, s, C5); 21,8 (2C, s, C1 e C3); 20,2 (1C, d, $^3J_{C6P8}= 6,3$ Hz, C6); 17,1 (1C, d, $^2J_{C14F15} =25,26$ Hz, C14) RMN e de 2D $^1H\{^{31}P\}$ -HMBC (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 3,71 (8P, s) .

Assinalamento dos sinais dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C da molécula Tenofovir disoproxil fumarato (Figura 3b)

RMN de 1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 8,14 (1H, s, H19); 8,03 (1H, s, H16);7,21 (2H, s, NH21); 6,63 (2H, s, H2' e H3'); 5,54 (4H, m, H5 e H7); 4,82 (2H, sept, $^3J_{H3,9H1,2,10,11}= 6,34$ Hz, H3 e H9); 4,21 (2H, dd, , $^2J_{H15,H15} = 4,09$ $^3J_{H15,H13}= 14,41$, H15); 3,97 (3H, sobreposição, H12,H13); 1,24 (12H, d, $^3J_{H1,2,10,11H3,9}= 6,25$ Hz, 1,07 (3H, d, $^3J_{H14H13}= 6,24$ Hz, H14), RMN de $^{13}C\{^1H\}$ (100,62 MHz): δ (ppm) 165,9 (2C, s, C1' e C4'); 155,8 (1C, s, C17); 152,5 (2C, s, C19); 152,3 (1C, s, C4 e C8); 149,7 (1C, s, C18); 141,2 (1C, s, C16); 133,9 (2C, s, C2' e C3'); 118,3 (1C, s, C20); 84,2 (2C, d, $^3J_{C5,7P6}= 5,98$ Hz, C5 e C7); 75,9 (1C, d, $^4J_{C13P6}=12,21$ Hz, C13); 72,8 (2C, s, C3 e C9); 62,8 (1C, d, $^1J_{C12P6} = 164,6$ Hz, C12); 46,5 (1C, s, C15); 21,2 (4C,s, C1,C2,C10 e C11); 16,6 (1C,s, C14) e de 2D $^1H\{^{31}P\}$ -HMBC (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 21,56 (6P, s).

Condições de degradação dos IFAs

Os padrões de sofosbuvir (SFBV) e tenofovir disoproxil fumarate (TNFV) foram cedidos pela indústria farmacêutica para os testes de degradação. Ambos os testes de estresse ácido e alcalino foram realizados em DMSO. Para a degradação ácida foi usado o ácido clorídrico deuterado (DCl) e para a degradação básica, hidróxido de sódio deuterado (NaOD), ambos obtidos comercialmente.

Foram preparadas duas soluções estoque em um balão volumétrico de 0,005 L, para o SFBV foi usada a concentração de 56 mmol. L⁻¹ e para o TNFV a concentração foi de 20 mmol.L⁻¹. Na literatura, não há consenso em relação a concentração de ácido e base a ser utilizada nos estudos de degradação.¹¹¹ De acordo com o guia RDC 53/15, é exigido que ocorra a degradação de ao menos 0,1% do fármaco e que o método seja seletivo na identificação dos produtos formados. Nesse trabalho as proporções de SFBV e DCl foi de 1:10 (0,056 mol.L⁻¹: 0,5 mol.L⁻¹), 1:20 (0,056 mol.L⁻¹: 1,0 mol.L⁻¹) e 1:30 (0,056 mol.L⁻¹: 1,5 mol.L⁻¹) e para o TNFV 1:10 (0,02 mol.L⁻¹: 0,2 mol.L⁻¹) , 1:25 (0,02 mol.L⁻¹: 0,5 mol.L⁻¹) e 1:50 (0,02 mol.L⁻¹: 1,0 mol.L⁻¹). Já para o estresse básico foram usadas as proporções 1:1 (0,056 mol.L⁻¹: 0,05 mol.L⁻¹) ,1:2 (0,056 mol.L⁻¹: 0,1 mol.L⁻¹) e 1:4 (0,056 mol.L⁻¹: 0,2 mol.L⁻¹) para o SFBV e para

o TNFV 1:2 (0,02 mol.L⁻¹: 0,04 mol.L⁻¹), 1:5 (0,02 mol.L⁻¹: 0,1 mol.L⁻¹) e 1:10 (0,02 mol.L⁻¹: 0,2 mol.L⁻¹). O volume utilizado foi de 0,5 mL da solução, e as reações foram realizadas diretamente no tubo de RMN de 5 mm.

Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker AVANCE III de 9,4 T (400 MHz para ¹H) e equipado com uma sonda BBFO de 10 mm. Para obter espectros quantitativos de ³¹P, foram realizados experimentos usando a sequência de pulso de inversão e recuperação t1irpg (nomenclatura adaptada da Bruker). Nesta sequência, uma série de ³¹P foi adquirido variando os valores de t1. Ao final, foi gerado um gráfico que relaciona a intensidade ou área de cada espectro com variação de t1, determinando-se assim o tempo de relaxação longitudinal (T1) de cada sinal individual. Para cada condição ácida e básica, os valores de T1 foram determinados, sendo que para cada condição de degradação foi utilizado um tempo de relaxação (d1) resumido na Tabela 2, representando cinco vezes o tempo de relaxação longitudinal (T1) mais longo medido para a amostra de interesse.

Tabela 2. Condições de degradação utilizadas e os respectivos tempos de relaxação aplicados nos experimentos de RMN.

IFAs	Condições de degradação	d1 (Tempo de relaxação) (s)
SFBV	DCI	12
TNFV	DCI	12
SFBV	NaOD	5
TNFV	NaOD	7

Para as análises de DOSY de ¹H e ³¹P, os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker AVANCE III de 9,4 T (400 MHz para ¹H) equipado com uma sonda BBI de 5 mm. Todos os experimentos foram adquiridos à temperatura de 25 °C.

Condições de aquisição dos experimentos de difusão de ¹H e ³¹P

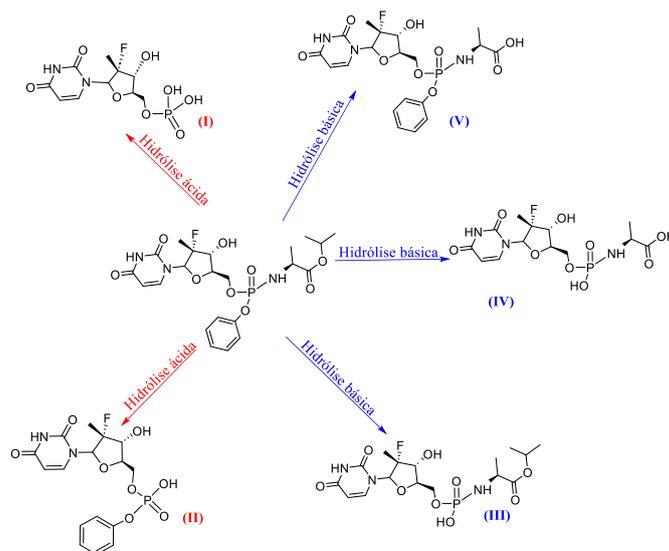
Os dados de difusão de ¹H foram adquiridos utilizando a sequência de pulsos ledbpgppr2s (nomenclatura adaptada da Bruker), com supressão do sinal da água nos ensaios de estresse, bem como um filtro temporal de correntes anelares longitudinais (led, longitudinal eddy current) de 5 ms, para minimizar/eliminar distorções do espectro causadas pela aplicação de gradientes de campo intensos. Os experimentos de difusão foram realizados utilizando um tubo de RMN padrão de 5 mm. Para cada estudo de estresse foram determinados os melhores parâmetros de aquisição, para minimizar efeitos de convecção e observar a separação dos produtos de degradação formados. Nos experimentos variou-se a duração do pulso de gradiente (δ) 1,6 ms, tempo de difusão (Δ) 100 ms e 16 amplitudes de gradientes, que variaram quadraticamente de 1,8 a 35,7 G cm⁻¹. Experimentos de DOSY de ³¹P foram adquiridos usando

a sequência ledbpgp2s_³¹P (nomenclatura adaptada da Bruker), utilizando os mesmos parâmetros do espectro de DOSY de ¹H precisamente descritos, exceto na duração do pulso de gradiente (δ) de 2,5 ms, tempo de difusão (Δ) 150 ms. Os experimentos foram realizados à temperatura de 25 °C. O processamento dos espectros de difusão de ¹H e ³¹P foram realizados usando o programa DOSY Toolbox.^{112, 99}

1.6 Resultados e Discussão

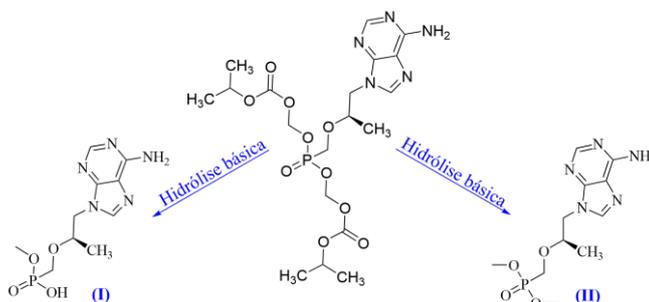
Antes da realização dos estudos experimentais de degradação nas condições ácida e básica dos fármacos SFBV e TFNV, foi realizado um estudo teórico para identificar os grupos funcionais mais suscetíveis à degradação nas condições analisadas. Esse estudo teórico foi conduzido com base em conhecimentos de química orgânica sintética, compreensão de rotas de degradação e uma extensa revisão bibliográfica relacionada a estudos de degradação previamente realizados dos IFAs estudados.

No trabalho publicado por Swain et al (2016)⁴⁴ foram identificados cinco produtos de degradação ácida e básica do SBFV por LC-ESI-MS/MS. Os produtos caracterizados estão descritos no Esquema 2. Os produtos I e II são formados durante a degradação ácida; o produto I é gerado pela perda dos grupos aminopropanoato e do anel aromático, enquanto o produto II resulta apenas da perda do grupo aminopropanoato. Na degradação básica, os produtos III e IV são formados pela perda do anel aromático, sendo que no produto IV ocorre a hidrólise do éster e a liberação do isopropanol. Por fim, o produto de degradação V é formado exclusivamente pela liberação do isopropanol.^{41,113}



Esquema 2. Produtos de degradação ácida e básica da molécula Sofosbuvir. As condições de degradação foram 0,1 mol.L⁻¹ de HCl e 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH ambos os estudos foram realizados na temperatura de 60 °C

Para a molécula TNFV Anandgaonkar et al (2015)¹¹⁴ realizaram um estudo por LC-MS/MS e experimentos bidimensionais de RMN em condição básica, identificando dois produtos de degradação, detalhados no Esquema 3. Na literatura não há relatos da degradação ácida da molécula TFNV.¹¹⁴



Esquema 3. Produto de degradação básica da molécula TFNV. Para o estudo utilizou 0,1 M de NaOH.

Em ambos os estudos de degradação do SFBV e TNFV relatados, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. No caso do TNFV, foram necessários experimentos bidimensionais de RMN para a identificação dos produtos de degradação. Assim, em ambos os casos, foi imprescindível realizar a separação física dos produtos de degradação para posterior identificação, o que exigiu do analista experiência no desenvolvimento de métodos cromatográficos e compreensão para a interpretação dos resultados obtidos por espectrometria de massas. Portanto, é relevante explorar a técnica de RMN, que permite identificar e elucidar os produtos de degradação sem a necessidade de separação física. Vale mencionar que as condições de degradação empregadas nesses estudos diferem das condições utilizadas nesta tese; no entanto, os produtos de degradação descritos na literatura foram utilizados como referência para os produtos encontrados neste trabalho.

1.6.1 Degradação em meio ácido

As degradações em meio ácido dos IFAs foram realizadas em DMSO-d₆. Foram adquiridos experimentos de DOSY ¹H das amostras parcialmente degradada com o objetivo de obter informações sobre os produtos de degradação formados. Experimentos de difusão são uma ferramenta útil que pode facilitar a análise de componentes minoritários em misturas com uma ampla gama de concentrações. No entanto, no espectro de DOSY ¹H (Figura 14) obtido na degradação ácida do SFBV, é possível notar uma sobreposição significativa de sinais na área do espectro entre e 0,9-1,4 ppm e 3,4-4,3 ppm (regiões destacadas em cinza na Figura 14). O único produto de degradação claramente observável é o sinal em 6,5 ppm e 7,2 ppm, que apresenta um coeficiente de difusão de aproximadamente 3,8 x 10⁻¹⁰ m²s⁻¹. Esse valor tão alto de

coeficiente de difusão indica uma molécula com raio hidrodinâmico pequeno. Observando a estrutura da molécula inicial e o deslocamento químico do produto de degradação, concluímos que se trata do fenol.

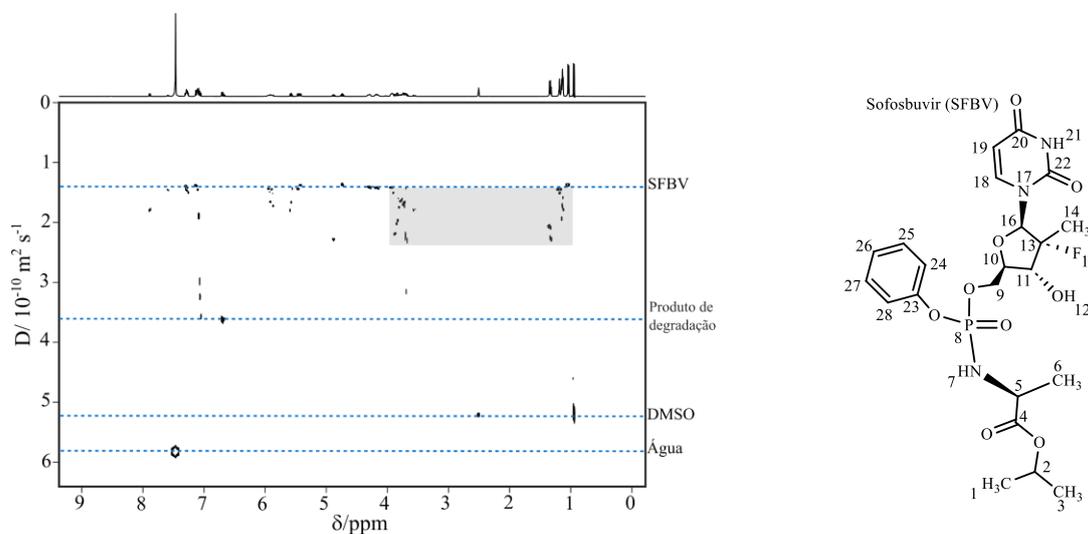


Figura 14. Mapa de difusão por RMN DOSY ^1H da amostra de SFBV parcialmente degradada em condição ácida. A análise foi realizada após 128 horas do início da reação. A concentração usada foi de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl. O DOSY de ^1H foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 2,0 ms (δ) e um tempo de difusão de 70 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm.

A sobreposição dos sinais resulta em coeficientes de difusão intermediários, ajustados entre os coeficientes de difusão das moléculas responsáveis pelos sinais sobrepostos. No DOSY de ^1H , essas sobreposições ocorrem devido à estreita janela espectral do ^1H e ao desdobramento dos sinais devido aos acoplamentos escalares.

Para minimizar esse efeito, exploramos experimentos de difusão com o núcleo ^{31}P , que possui uma ampla janela espectral, alta sensibilidade, alta abundância natural e a possibilidade de obtenção de sinais desacoplados, especialmente na degradação ácida do sofosbuvir. Experimentos de DOSY de ^{31}P para o estudo de degradação de fármacos são inéditos, embora já tenham sido realizados em estudos envolvendo complexos inorgânicos e copolímeros.

115,116,117,118

Os experimentos de DOSY ^{31}P foram adquiridos após 128 horas de degradação para a molécula do SFBV. Na Figura 15, é possível observar três coeficientes de difusão além da molécula de partida. Dois produtos de degradação apresentam coeficientes de difusão muito próximos aos da molécula de partida, levando-nos à conclusão de que possuem o raio hidrodinâmico muito semelhante ao do SFBV, indicando uma estrutura similar.

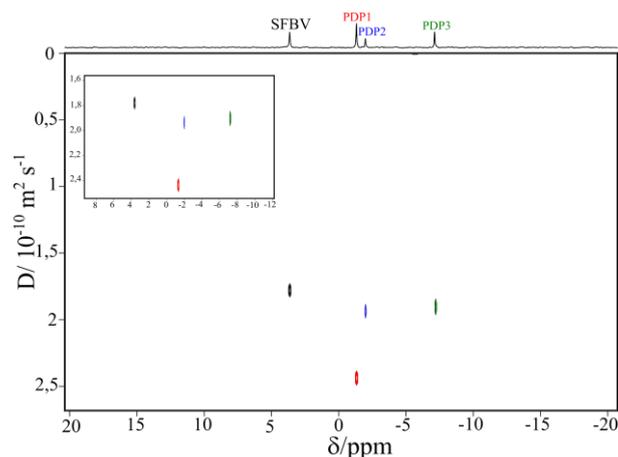


Figura 15. Mapa de difusão por RMN DOSY ^{31}P do SFBV parcialmente degradada em condição ácida. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl. O experimento de DOSY ^{31}P foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 3,8 ms (δ) e um tempo de difusão de 120 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm. A sigla PDP significa produto de degradação contendo fósforo.

Visando identificar o sítio reacional envolvido na degradação, realizamos experimentos de ^1H - ^{31}P -HMBC, na sequência dos experimentos de DOSY ^{31}P . Na Figura 16, é possível verificar que o produto de degradação com deslocamento químico -1,13 ppm (vermelho) correlaciona-se apenas com o H-5'. Já o sinal em -1,99 ppm (azul) correlaciona-se com os H-9' e H-10' ligado ao éter cíclico, indicando a saída do grupo fenol e do aminopropanoato. O produto em -7,20 ppm (verde) correlaciona-se com o hidrogênio aromático e com os H-9' e H-10' do éter cíclico. A esquerda, são apresentadas as estruturas dos produtos de degradação.

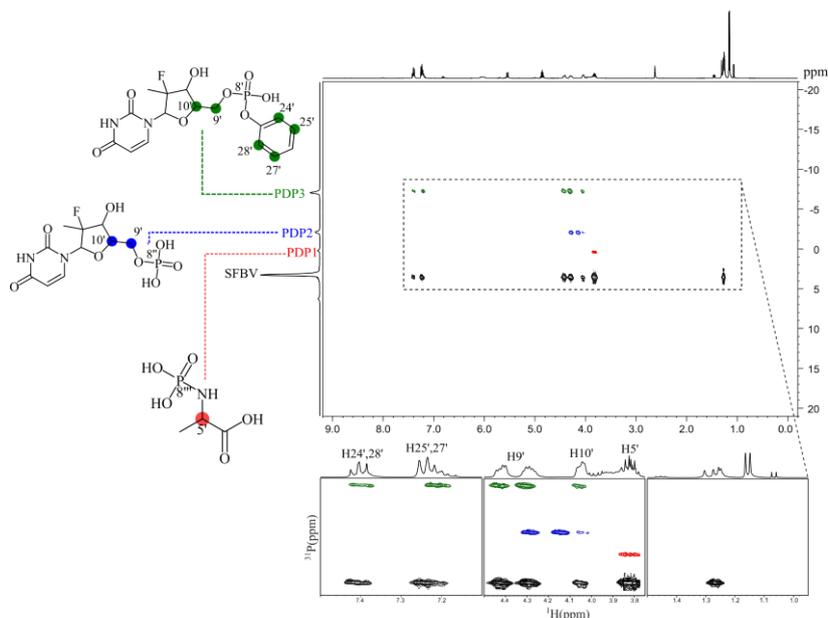


Figura 16. Mapa de contorno do espectro de $2\text{D-}^1\text{H-}^{31}\text{P}$ -HMBC da degradação ácida do SFBV em DMSO.

Com base nos produtos de degradação formados, foi possível propor o mecanismo de degradação ácida apresentado no Esquema 4. Ressalta-se que os grupos de saída responsáveis pela formação dos produtos de degradação observados no experimento DOSY de ^{31}P foram identificados por meio de experimentos convencionais de RMN de ^1H e experimentos bidimensionais. Na Figura 17, observa-se o conjunto de espectros de RMN de ^1H , onde é possível acompanhar a formação dos principais produtos de degradação ao longo do tempo

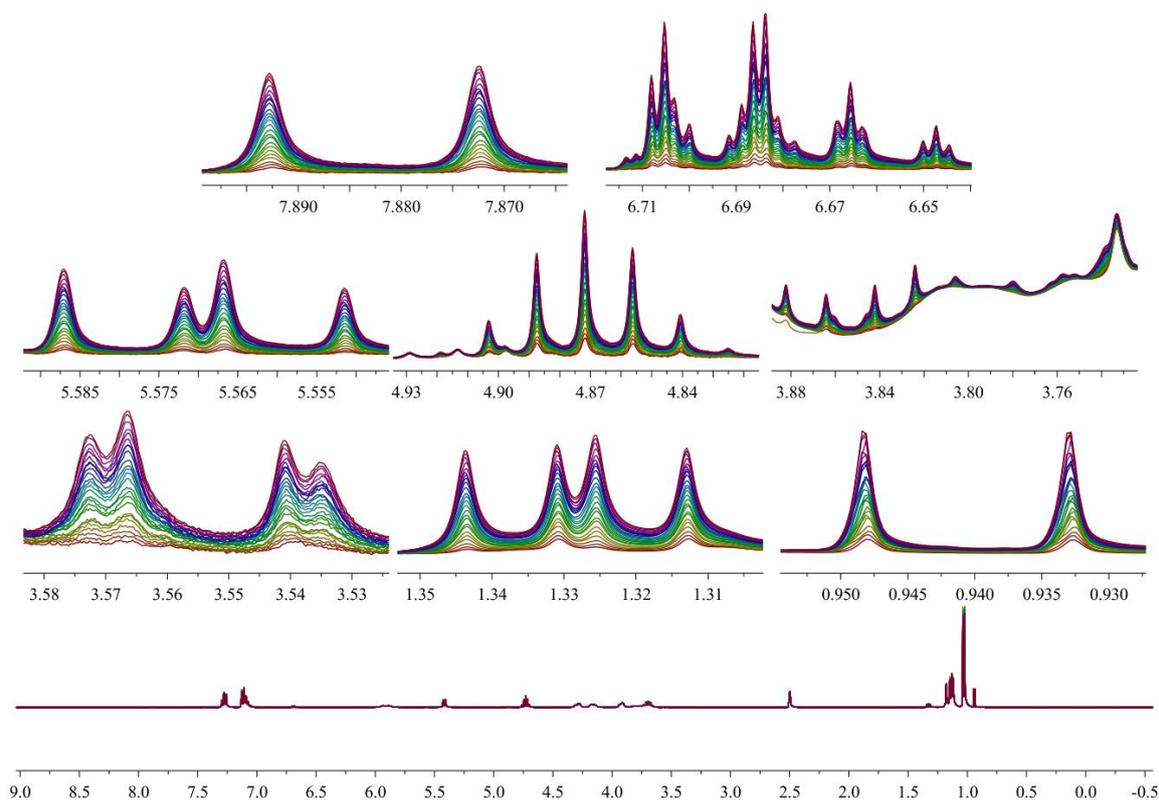


Figura 17. RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, DMSO). Acompanhamento da reação por 24 horas da degradação ácida do Sofosbuvir na concentração de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl, as regiões expandidas destacam-se pela formação dos produtos de degradação com o tempo.

Para melhor visualização, a Figura 18 apresenta a expansão, bem como os assinalamentos e as moléculas majoritárias formadas na degradação ácida. As moléculas identificadas podem ser correlacionadas diretamente com os produtos de degradação PD1, PD2 e PD3 descritos na Figura 16, uma vez que as moléculas observadas no espectro de ^1H correspondem aos grupos de saída envolvidos na formação das respectivas moléculas contendo fósforo. Para a atribuição inequívoca das moléculas (IV) e (V) (Figura 18), foi realizado o experimento ^1H - ^{15}N HMBC. Na Figura 19, observa-se que os dois dupletos em 1,44 ppm, atribuídos aos H-6' e H-6'', correlacionam-se com os N-7' e N-7'', respectivamente.

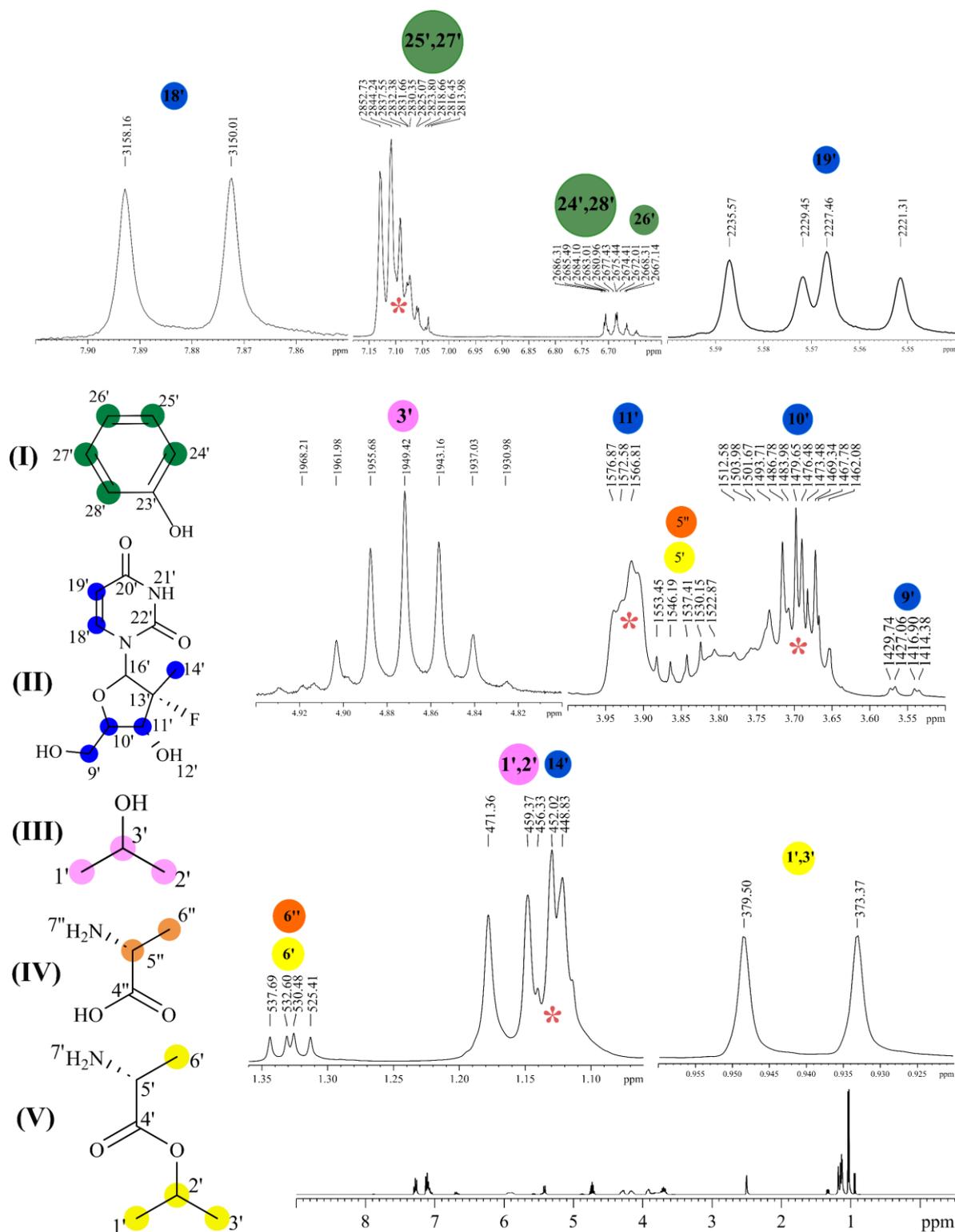


Figura 18. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição dos produtos de degradação da molécula sofosbuvir na degradação ácida, adquirido depois de 24 horas. Os sinais destacados com um asterisco são sinais em que a sobreposição dos sinais dos produtos de degradação com a molécula de partida.

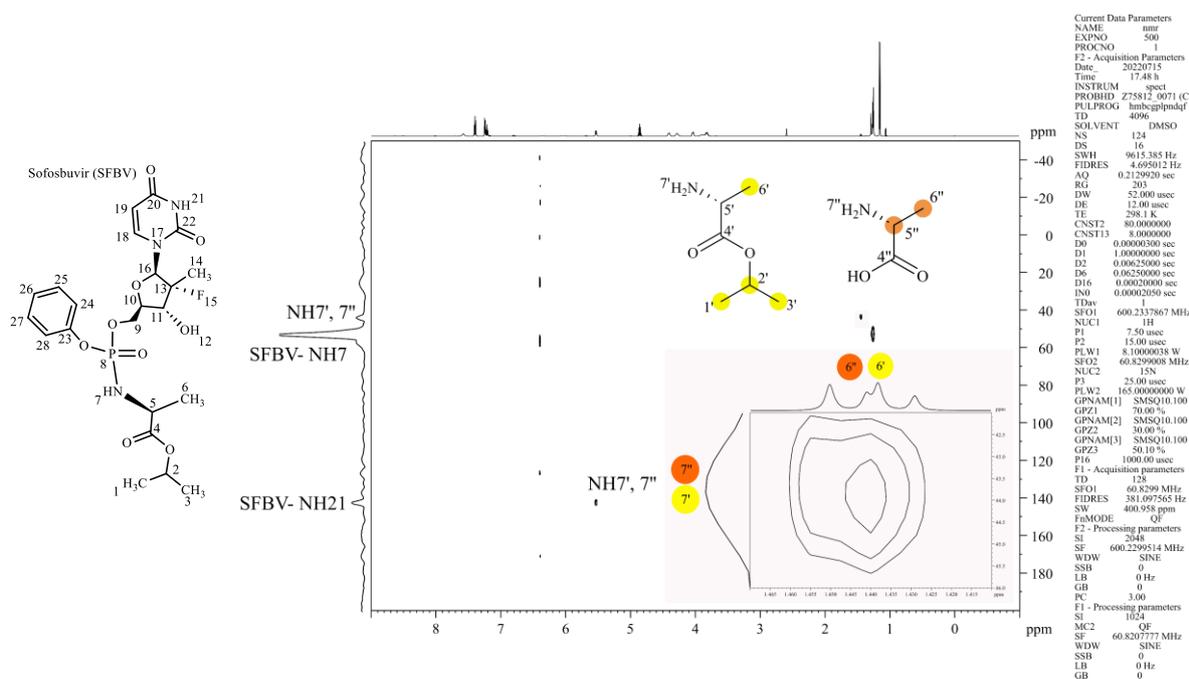
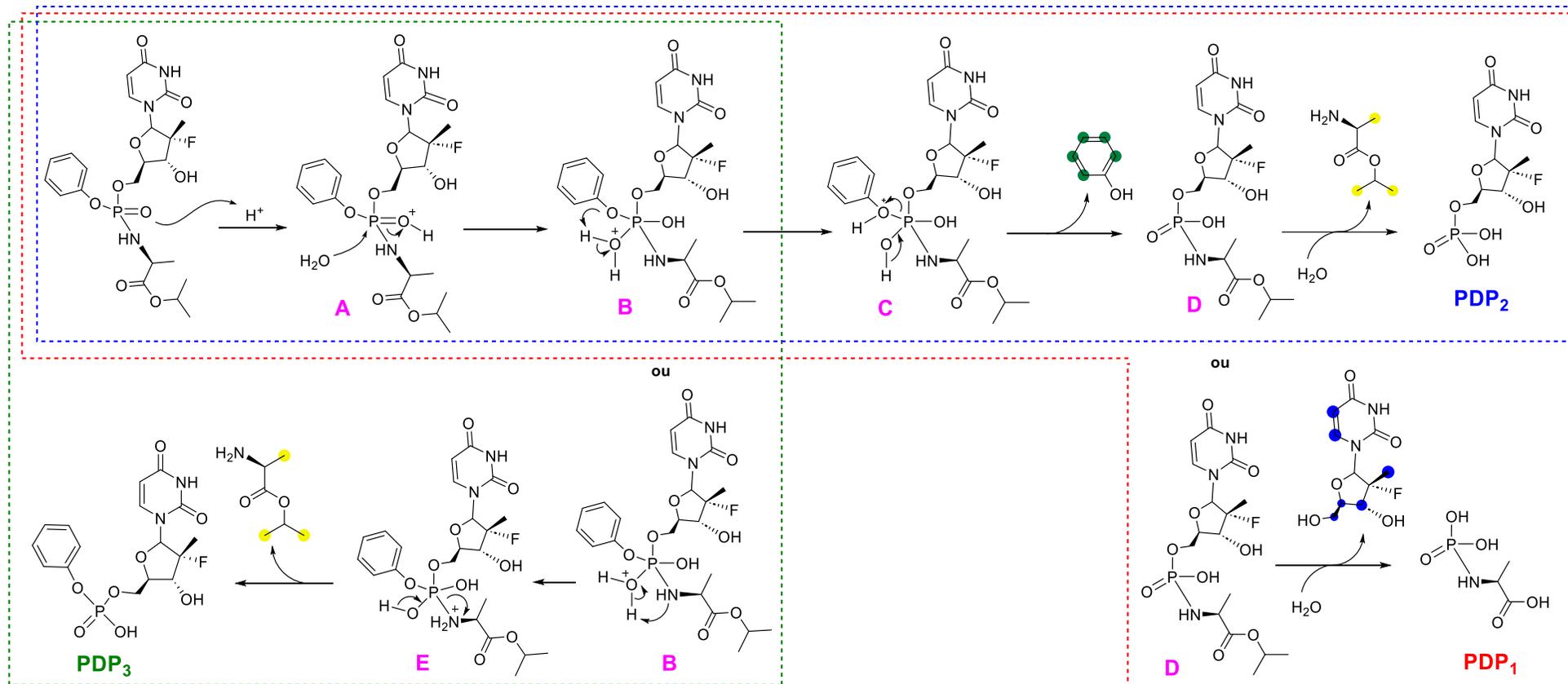


Figura 19. Mapa de contorno ^1H - ^{15}N HMBC (600 MHz, 25 °C, DMSO) da reação de degradação ácida do sofosbuvir.

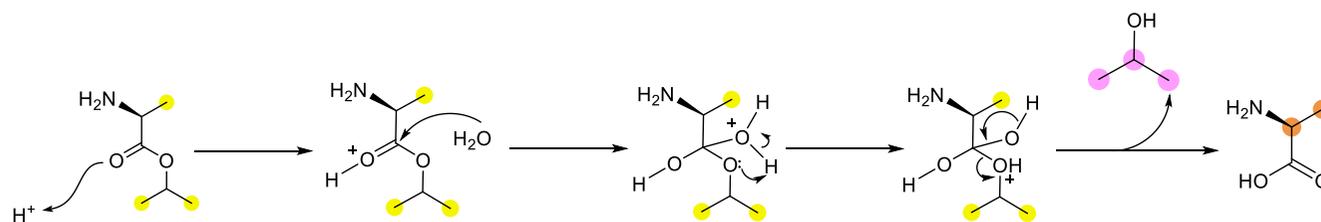
No mecanismo de degradação ácida do sofosbuvir (Esquema 4), ocorre a protonação do oxigênio do grupo fosforila (P=O), o que diminui sua densidade eletrônica e torna o átomo de fósforo mais eletrofílico, aumentando sua suscetibilidade ao ataque nucleofílico da água por meio de substituição nucleofílica bimolecular (SN2). A entrada da água gera um intermediário pentacovalente, no qual o fósforo se liga temporariamente a cinco átomos (três oxigênios, um nitrogênio e a molécula de água incorporada), resultando na formação do intermediário B (Esquema 4). Este intermediário é instável e, nesta etapa, ocorre uma reação intramolecular em que o oxigênio do grupo fenol retira um próton da molécula de água protonada, levando à clivagem e à saída do fenol.

A reação pode então prosseguir com o mesmo mecanismo, resultando na clivagem do grupo aminopropanoato e na formação do produto de degradação PD2. Alternativamente, o intermediário B pode seguir apenas com a clivagem do grupo aminopropanoato, por meio da captura intramolecular do hidrogênio da água protonada pelo nitrogênio, gerando o produto de degradação PD3. Para a formação do produto de degradação PD1, os processos podem ser repetidos; no entanto, no intermediário D, além da clivagem do fenol, pode ocorrer a clivagem do anel de cinco membros (ribose) e a saída do isopropanol proveniente do grupo éster do aminopropanoato.

No Esquema 5, é apresentado um mecanismo alternativo de clivagem dos grupos isopropanol e L-alanina a partir do aminopropanoato livre.



Esquema 4. Mecanismo de formação dos produtos de degradação ácida da molécula SFBV.



Esquema 5. Mecanismo de formação do isopropanol, produto de degradação III e L-Alanina, produto de degradação IV a partir do aminopropanoato.

Com o objetivo de obter informações experimentais que comprovem o mecanismo proposto no Esquema 4, realizamos um estudo cinético. Para os experimentos, utilizamos três concentrações de DCI ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$). O progresso da reação foi monitorado utilizando a RMN de ^{31}P . Optamos por usar a sequência zfg1 e estimar o tempo de relaxação utilizando a sequência t1prg. Na Figura 20, é possível observar a formação dos sinais referentes aos produtos de degradação ao longo do tempo, bem como notar variações no deslocamento químico em diferentes concentrações de DCI.

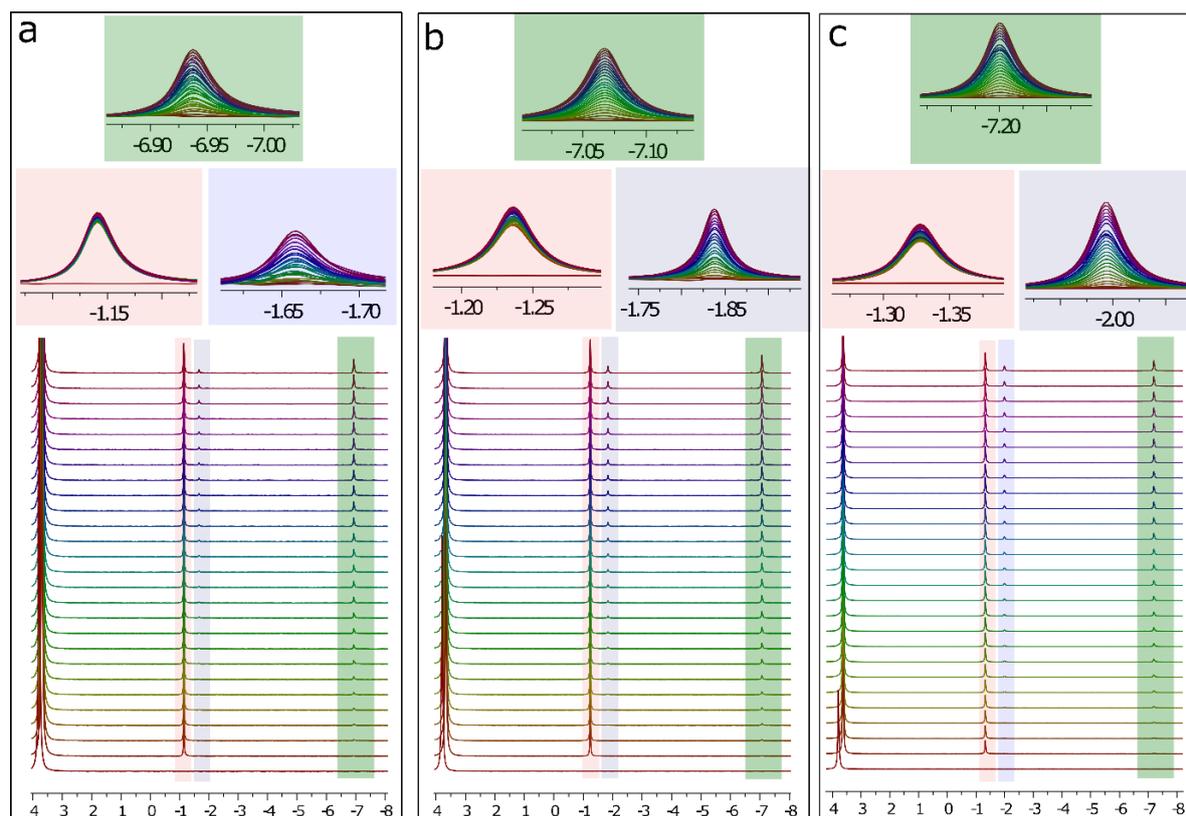


Figura 20. Espectro de RMN de ^{31}P (400 MHz, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, DMSO) com expansão e atribuição dos produtos de degradação da molécula sofosbuvir na degradação ácida, fixamos a concentração de SFBV em $0,056 \text{ mol.L}^{-1}$ a) Concentração de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCI b) $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCI c) $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ mol de DCI.

A partir da intensidade absoluta, foi possível determinar a massa formada de cada produto de degradação ao longo do tempo. Surgiram duas questões ao propor o mecanismo de degradação: se as reações de formação dos produtos de degradação ocorriam de forma paralela ou subsequente. Por exemplo, a partir do PDP1 poderiam ser formados os produtos de degradação PDP2 e PDP3. Foram gerados os gráficos (Figura 21a-21c) é apresentado a variação da concentração dos produtos de degradação em função do tempo.

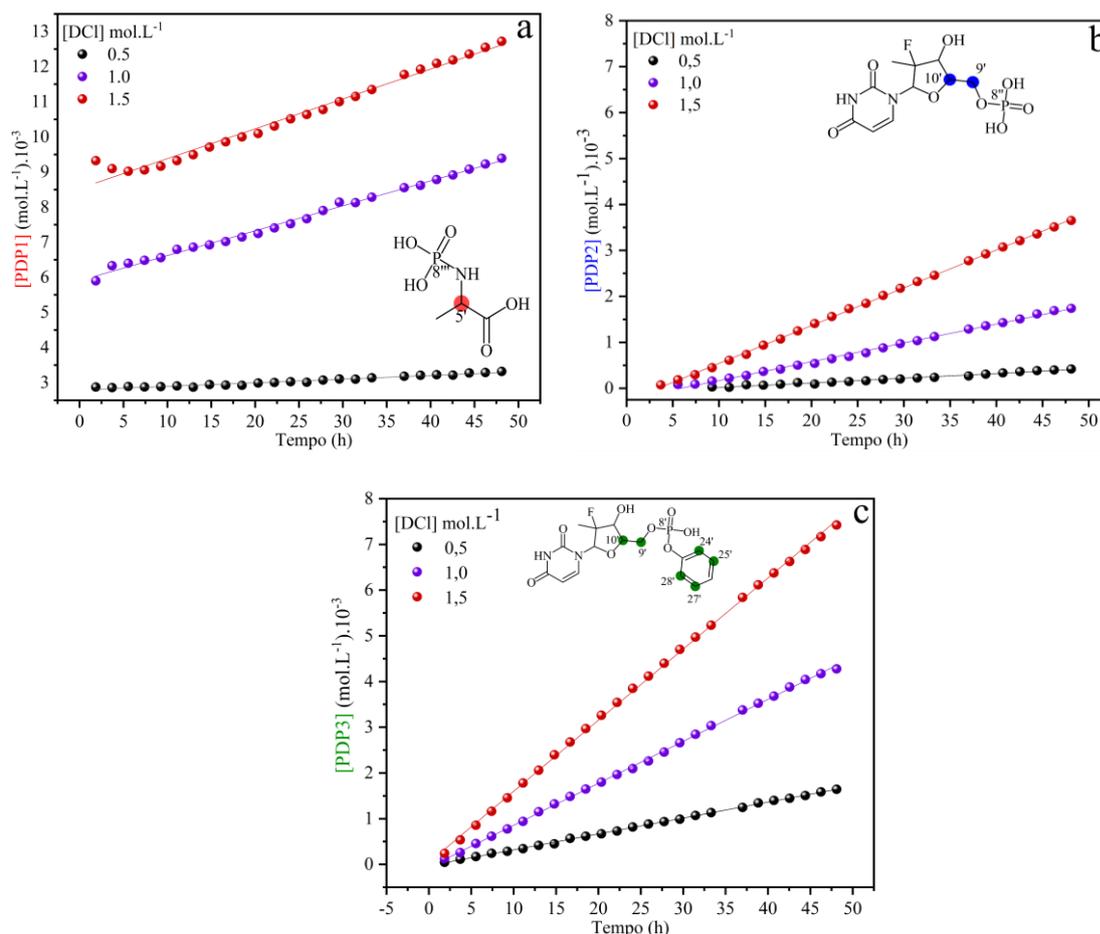


Figura 21. Perfil de formação dos produtos de degradação. **a)** O gráfico representa a formação do PDP1 no espectro de ³¹P em função do tempo. **b)** O gráfico representa a formação do PDP2 no espectro de ³¹P em função do tempo. **c)** O gráfico representa a formação do PDP3 no espectro de ³¹P em função do tempo.

Na Figura 21a, é possível notar a variação na formação do PDP1 ao longo do tempo. Apesar da taxa de variação ser pequena em comparação com PDP2 e PDP3, a concentração de PDP1 é quase o dobro da de PDP2 e um terço da de PDP3. No gráfico das Figuras 21b e c, observa-se um aumento na intensidade de ambos os sinais ao longo do tempo. Portanto, foi possível demonstrar que a reação de formação dos produtos de degradação PDP2 e PDP3 ocorre de forma paralela e não subsequente, como apresentado na literatura.⁴⁴ Vale ressaltar que, para obter as constantes, os gráficos foram ajustados conforme uma reação de ordem zero.

Na Figura 22, é possível observar um aumento na taxa de variação da concentração de DCI, o que é esperado ao aumentar a concentração de ácido no meio. Também é possível verificar que a taxa de formação do PDP3 é maior, o que também é esperado, já que para a formação do PDP3 ocorre a saída de apenas um grupo da molécula inicial.

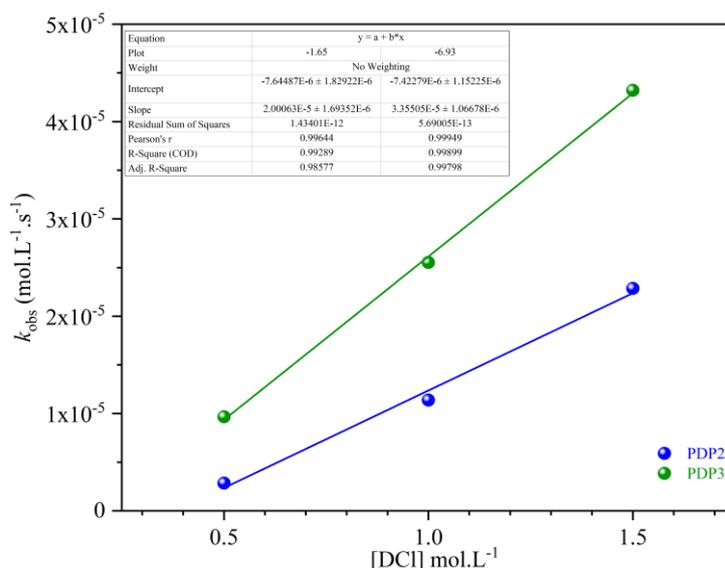


Figura 22. Gráfico da variação da concentração de [DCI] *versus* os valores de k_{obs} para uma reação de degradação de ordem zero.

Os mesmos experimentos de difusão foram realizados para a degradação ácida do TNFV. Na Figura 23, é possível observar o coeficiente de difusão do fumarato pertencente à molécula de partida, além de dois produtos de degradação. Um desses produtos apresenta um coeficiente de difusão muito próximo ao da molécula de partida, enquanto o outro possui um coeficiente de difusão aproximadamente duas vezes maior, em torno de $3,3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

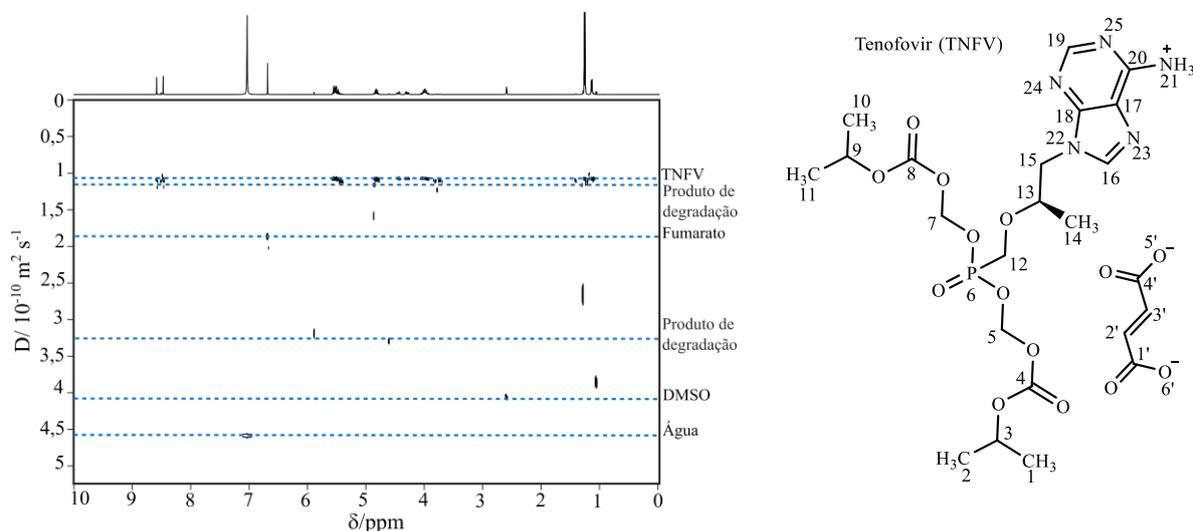


Figura 23. Mapa de difusão por RMN DOSY ^1H da amostra de TNFV parcialmente degradada em condição ácida. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ DCI. O DOSY ^1H foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de $1,8 \text{ ms}$ (δ) e um tempo de difusão de 100 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm .

Para esclarecer os resultados obtidos no DOSY ^1H e observar a molécula com coeficiente de difusão próximo ao da molécula de partida, realizamos também o DOSY ^{31}P . Na Figura 24, é possível observar dois coeficientes de difusão além da molécula de partida.

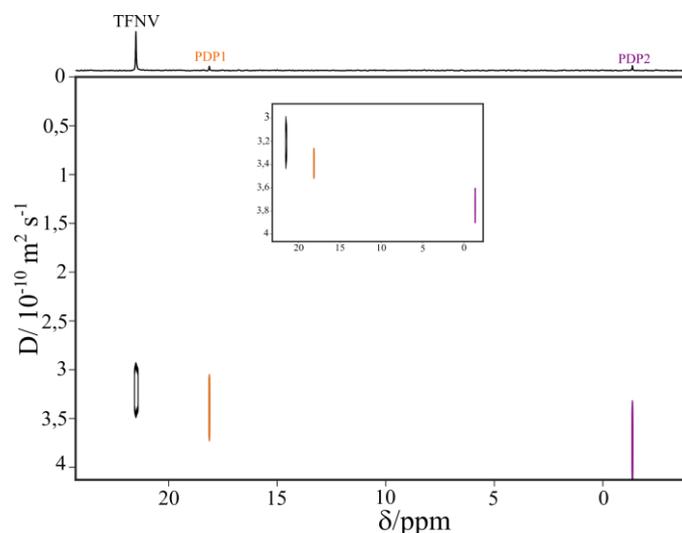


Figura 24. Mapa de difusão por RMN DOSY ^{31}P da amostra de TNFV parcialmente degradada em condição ácida. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ DCl. O DOSY ^{31}P foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 3.6 ms (δ) e um tempo de difusão de 100 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm. A sigla PDP significa produto de degradação contendo fósforo.

Na Figura 25, o mapa de contorno (2D- ^1H - ^{31}P -HMBC) da degradação ácida do tenofovir revela que o sinal em 18,43 ppm se correlaciona com dois sinais em 5,53 e 3,68 ppm. Estes sinais correspondem aos H-5', H-7' e H-12' adjacentes ao fósforo na estrutura do tenofovir.

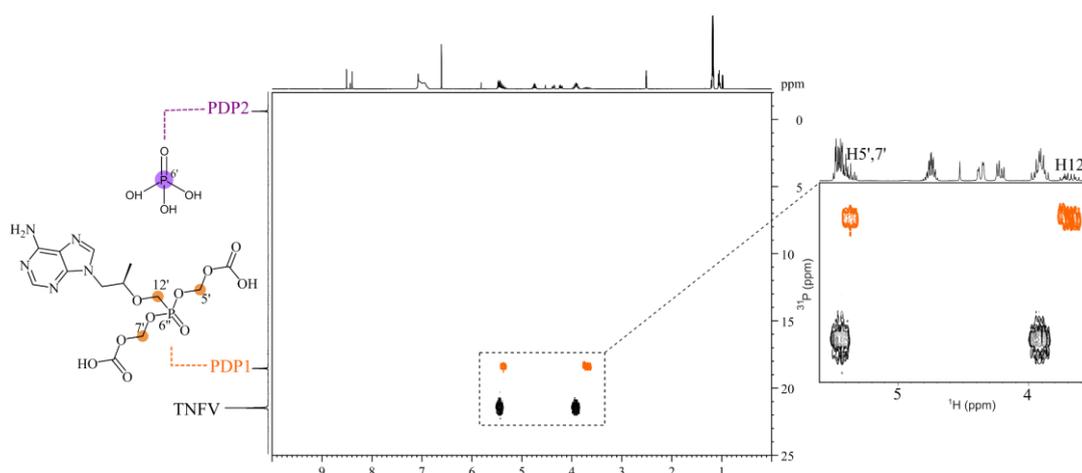


Figura 25. Mapa de contorno do espectro de 2D- ^1H - ^{31}P -HMBC da degradação ácida do TNFV em DMSO.

Observando os coeficientes de difusão da molécula de partida e do PDP1 no DOSY ^{31}P , percebemos que são muito próximos, assim como também observado no DOSY ^1H . Diante

dessas evidências, concluímos que o PDP1 é formado como consequência da hidrólise do isopropanol da molécula TNFV.

O deslocamento químico em -1,15 ppm não se correlaciona com nenhum hidrogênio. Esse fato nos levou a suspeitar que poderia ser o ácido fosfórico. Para confirmar essa hipótese, realizamos um experimento de ^{31}P com a adição de um capilar contendo ácido fosfórico como referência no tubo de RMN com o conteúdo reacional (Figura 26). Observamos que o sinal do produto formado em -1,15 ppm sobrepôs-se ao sinal de referência. Portanto, confirmamos que o ácido fosfórico é o PDP2.

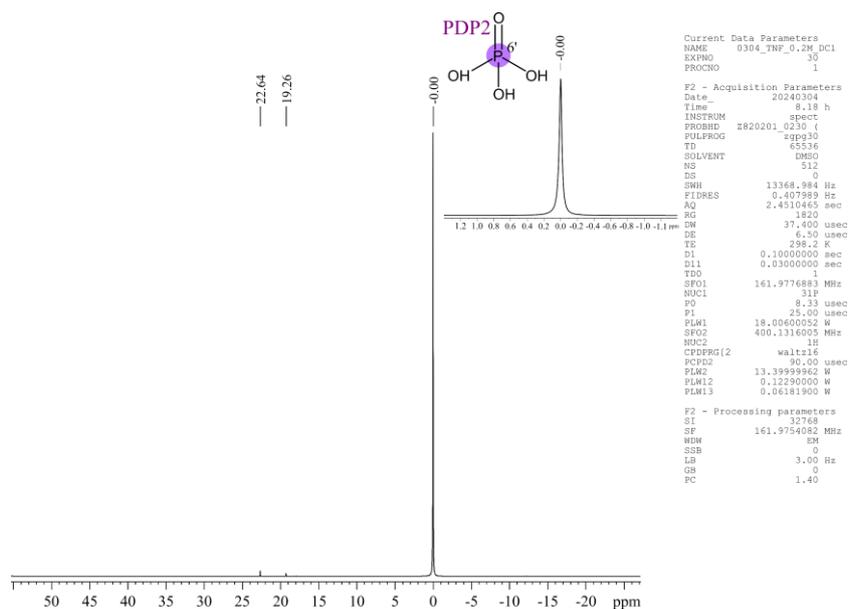
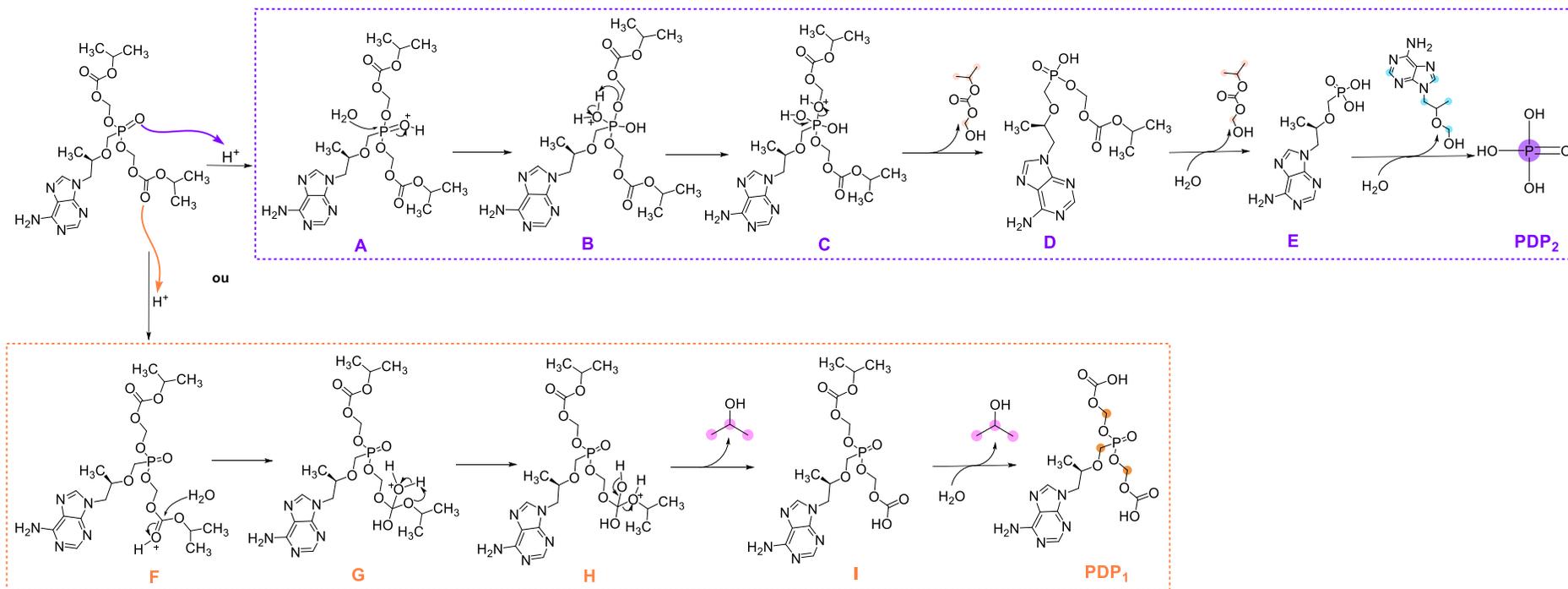


Figura 26. Espectro de RMN de ^{31}P (400 MHz, 25 °C, DMSO) da molécula Tenofovir parcialmente degradada em meio ácido (0,2 mol.L⁻¹ de DCl).com expansão do sinal da molécula de referência ácido fosfórico em 0,0 ppm.

Com base nas evidências experimentais dos produtos formados, o Esquema 6 apresenta o mecanismo reacional proposto. Inicialmente, ocorre a protonação do oxigênio da ligação fosforila (P=O), seguida pelo ataque nucleofílico da molécula de água ao átomo de fósforo, resultando na formação de um intermediário pentacovalente. Em seguida, ocorre uma reação intramolecular, na qual o grupo alcoxi desprotona a água protonada (Estrutura B), levando à clivagem da ligação e à saída do grupo alcoxi (Estrutura C). Esse processo se repete para a saída do outro grupo idêntico. Na última etapa, para a formação do PDP2, ocorre a clivagem e a saída do grupo que contém os átomos de nitrogênio (Estrutura E).

Para a formação do PDP1, ocorre a protonação da carbonila do grupo carbonato e, em seguida, o ataque nucleofílico da água (Estrutura F), seguido por uma reação intramolecular (Estrutura G) que resulta na clivagem e na saída do isopropanol.



Esquema 6. Mecanismo de formação dos produtos de degradação ácida da molécula TNFV.

A Figura 27 confirma as estruturas observadas no mecanismo proposto no Esquema 2. No Anexo 14 apresenta o aumento na intensidade dos sinais referentes aos produtos de degradação com o tempo.

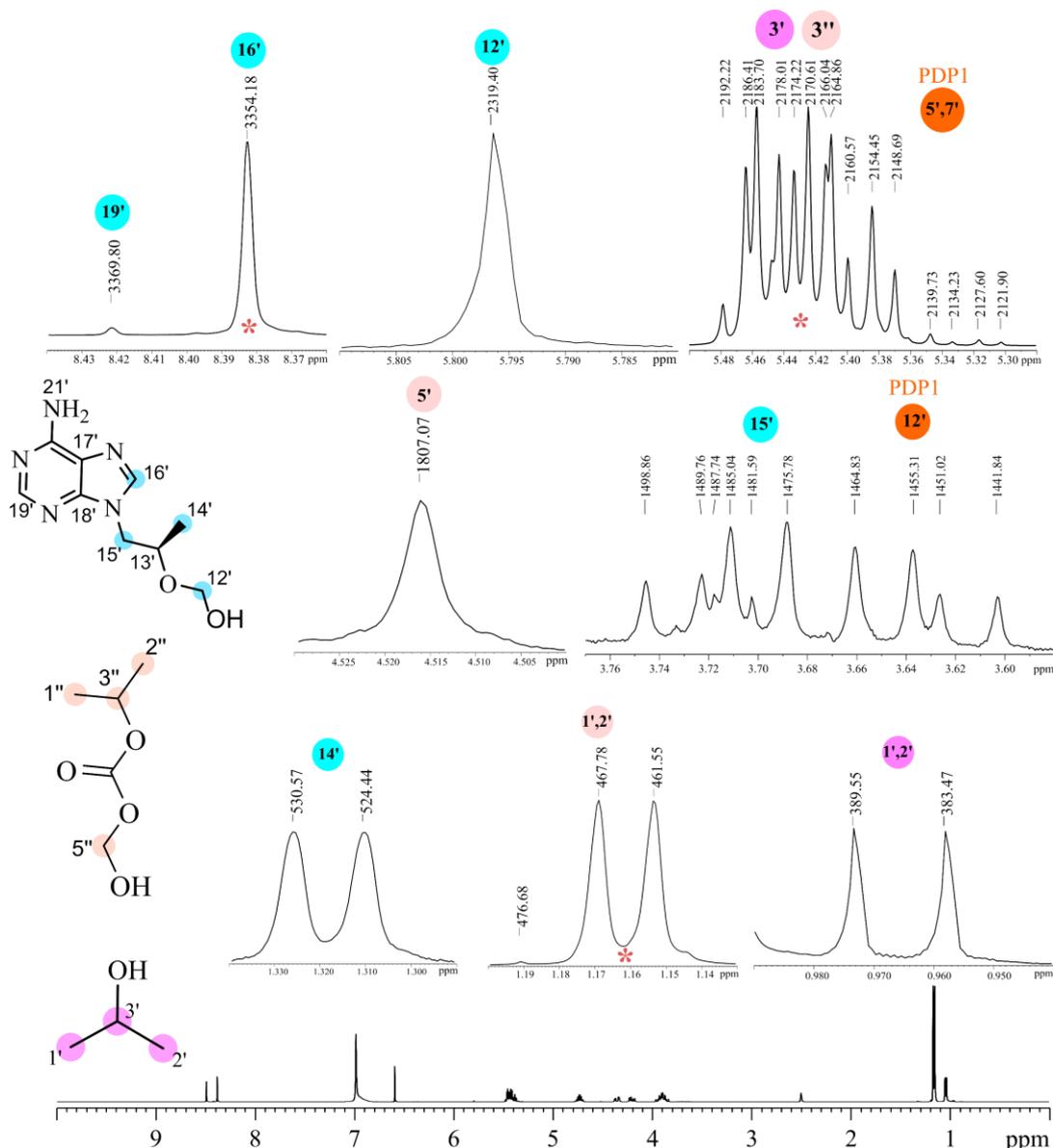


Figura 27. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição dos produtos de degradação da molécula tenofovir na degradação ácida. Os sinais destacados com um asterisco são sinais em que a sobreposição dos sinais dos produtos de degradação com a molécula de partida.

É interessante notar, na Figura 28, que o PDP2 é formado imediatamente após a adição do DCl ao conteúdo reacional, sem que se observe uma evolução na formação deste ao longo do tempo. No entanto, ao analisar o sinal do PDP2 na concentração de 0,2 mol.L⁻¹ de DCl, nota-se uma variação no formato e no deslocamento químico. Possivelmente, com a alta concentração do ácido, outras espécies de fosfatos podem estar sendo formadas.

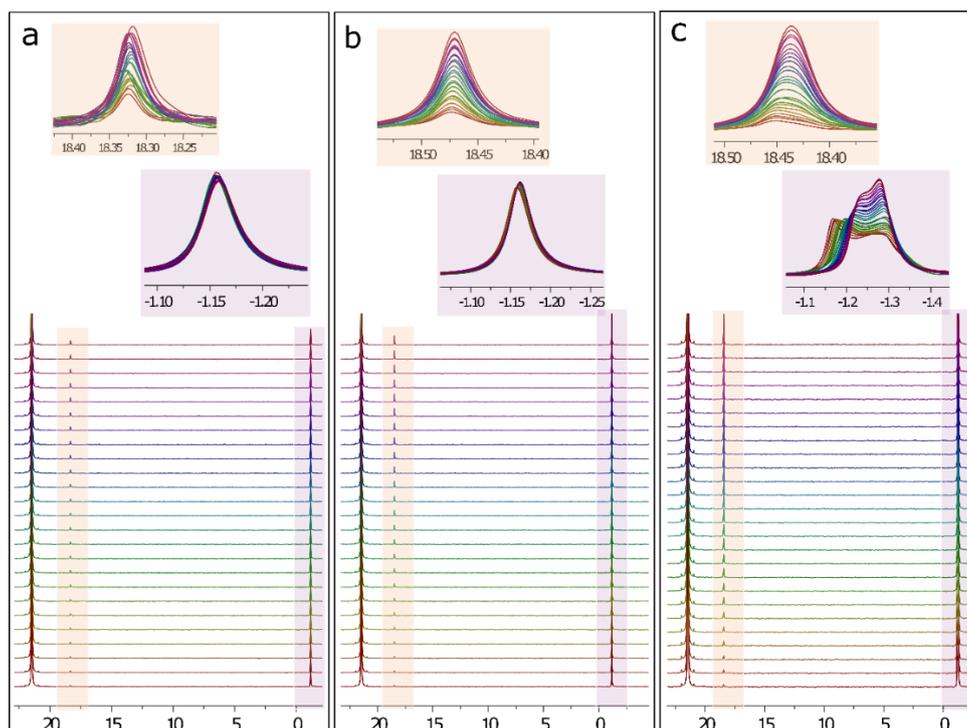


Figura 28.Espectro de RMN de ^{31}P (400 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição dos produtos de degradação da molécula sofosbuvir na degradação ácida, fixamos a concentração de TNFV em $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ a) Concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl b) $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl c) $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCl.

Na Figura 29, observa-se uma evolução na formação do PDP1 ao longo do tempo, bem como um aumento na concentração de PDP1 com o incremento da concentração de DCl. O gráfico confirma o mecanismo proposto no Esquema 2, demonstrando a formação em paralelo dos dois produtos de degradação, sem a geração de produtos secundários

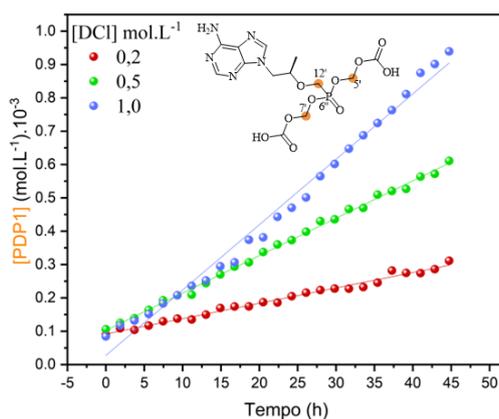


Figura 29. Perfil de formação dos produtos de degradação. O gráfico representa a formação do PDP1 no espectro de ^{31}P em função do tempo.

Na Figura 30, é possível notar um aumento na taxa de variação na concentração de DCl, o que é esperado, uma vez que aumentamos a concentração de ácido no meio.

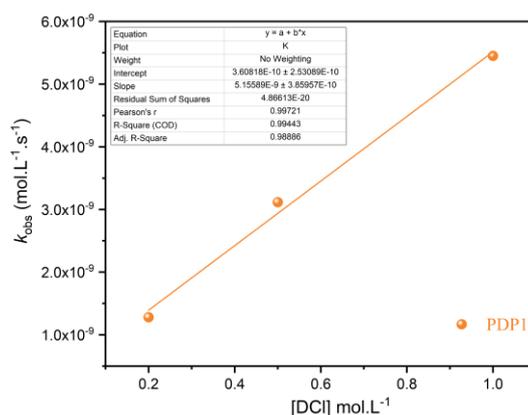


Figura 30. Gráfico da variação da concentração de [DCI] versus os valores de k_{obs} para uma reação de degradação de ordem zero.

É interessante notar que o coeficiente de difusão no DOSY ^1H do TNFV e do PDP1 é a metade do observado no DOSY ^{31}P . No entanto, seria esperado que o experimento com o núcleo de fósforo apresentasse um coeficiente de difusão menor, dado que o fósforo possui o maior raio hidrodinâmico e, portanto, deveria difundir mais lentamente.

Para ambas as moléculas, pode-se concluir que não ocorreram reações secundárias e que os produtos de degradação observados no espectro de ^1H resultam da hidrólise dos grupos funcionais das moléculas de partida. Dessa forma, é possível estabelecer que a porcentagem de consumo da molécula de partida no espectro de ^{31}P corresponde à soma das porcentagens dos produtos de degradação, devendo o somatório ser igual ou próximo a 100%. Para o cálculo, as áreas absolutas de cada sinal do espectro de ^{31}P são convertidas em massa, utilizando-se o espectro de referência do Sofosbuvir (sinal em 3,65 ppm), uma vez que essa área relativa corresponde a 15 mg em massa de SFBV, obtida sem adição de ácido ou base. A Figura 31 apresenta quatro espectros da degradação ácida do SFBV, com ampliação dos sinais correspondentes à molécula de partida e aos produtos de degradação.

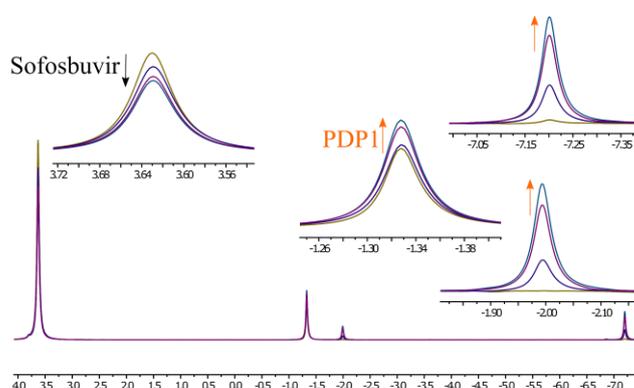


Figura 31. Degradação ácida ($1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCI) do SFBV monitorada por RMN ^{31}P . São apresentados quatro espectros dos tempos zero, 12 horas, 24 horas e 48 horas.

Para determinar a porcentagem da molécula, utilizamos a área absoluta do espectro da molécula controle (SFBV puro ou TNFV puro) como referência, estabelecendo-a como 100%. Em seguida, a partir da área absoluta do primeiro espectro após a adição do ácido, determinamos o teor do fármaco na amostra não degradada (T_i). Subtraindo esse valor de 100%, obtivemos a porcentagem do produto de degradação presente na amostra não degradada (PD_i). A diferença entre a porcentagem do primeiro espectro e o último nos forneceu o teor de IFA remanescente na amostra após 48 horas de degradação (T_D). Por fim, somando as áreas dos produtos de degradação, determinamos o teor dos produtos de degradação (PD_D). Os resultados estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Balanço de massa das moléculas parcialmente degradadas em condição ácida, ao final de 48 horas de degradação.

Concentração de degradação (mol.L ⁻¹)	T_i %	PD_i %	T_D % ^a	PD_D % ^b	BMA % ^c	DABM % ^d
0,5 SFBV	99,66	0,34	95,52	4,13	100	0,34
1,0 SFBV	99,66	0,34	85,01	15,43	100	-0,44
1,5 SFBV	99,66	0,34	72,38	25,08	97,73	2,54
0,2 TNFV	100 ^e	3,3	98,26	1,73	100	0
0,5 TNFV	100 ^e	3,3	84,909	14,07	98,98	1,01
1,0 TNFV ^f	100 ^e	3,3	---	---	---	---

^aCorresponde o quanto do IFA degradou após 48 horas. ^bO somatório dos produtos de degradação formados após 48 horas. ^cO balanço de massas absoluto calculado segundo a equação $BMA = (T_D + PD_D) / (T_i + PD_i)$. ^dA deficiência absoluta de balanço de massa calculado subtraindo o valor de BMA por 100. ^eConsideramos a área absoluta da molécula pura. ^fPara essa concentração não foi possível estimar o balanço de massas.

Observando a Tabela 3, podemos concluir que a espectroscopia de RMN é uma técnica analítica que possibilita monitorar com precisão os produtos de degradação e realizar balanços de massa.

1.6.2 Degradação em meio básico

O teste de estresse básico do sofosbuvir também foi realizado em DMSO. No mapa de contorno de DOSY ¹H (Figura 32a), é claramente visível a formação de um produto de degradação identificado como fenolato. Observando sua estrutura, é plausível que ocorra a hidrólise do grupo fenol, o que é corroborado pelo deslocamento químico e pelo valor do coeficiente de difusão, aproximadamente em $3,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Na ampliação (Figura 32b), outros

produtos com coeficiente de difusão semelhante ao da molécula de partida também são observados.

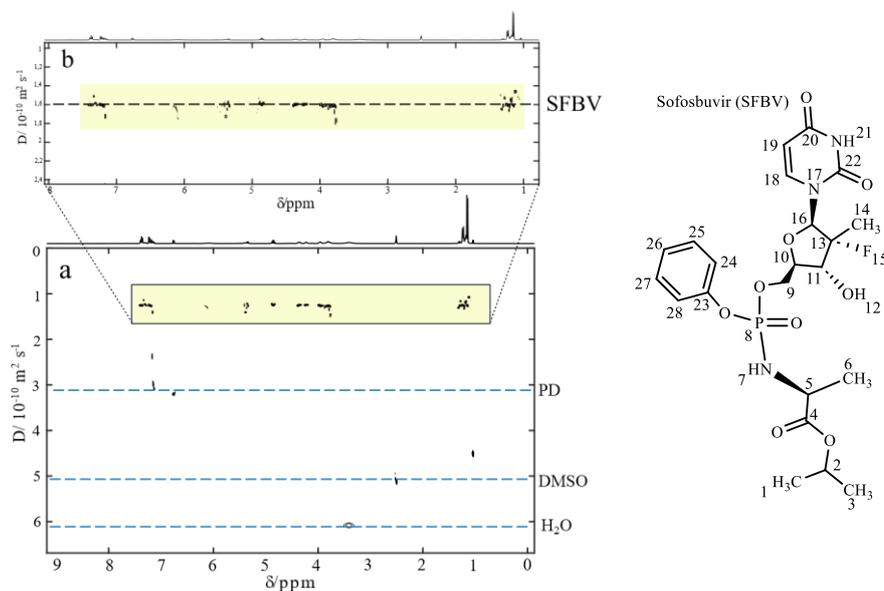


Figura 32. a) Mapa de difusão por RMN DOSY ^1H da amostra de SFBV parcialmente degradada em condição alcalina. b) Expansão do mapa de difusão RMN DOSY ^1H . A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOD. O DOSY ^1H foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 1,8 ms (δ) e um tempo de difusão de 70 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm.

Para uma melhor compreensão, também foi realizado o experimento de DOSY ^{31}P da molécula parcialmente degradada. Na Figura 33, é possível notar a formação de vários produtos de degradação com coeficientes de difusão muito próximos.

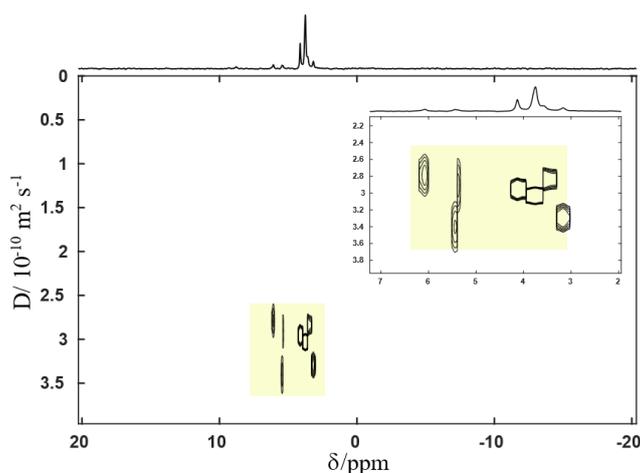


Figura 33. Mapa de difusão por RMN DOSY ^{31}P adquirido após 128 horas de degradação básica do sofosbuvir a concentração usada de NaOD foi de $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, adquirida com um pulso de gradiente de codificação de duração de 3,5 ms (δ) e um tempo de difusão de 80 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm.

Com o objetivo de identificar os produtos de degradação, realizamos experimentos de ^1H - ^{31}P HMBC. No entanto, não foi possível obter um mapa de correlação claro para a identificação dos produtos de degradação. Dessa forma, conduzimos diversos experimentos sequenciais de ^1H e ^{31}P para entender como a reação de degradação básica progride ao longo do tempo. Para este estudo, variamos a concentração de NaOD no meio reacional nas faixas de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, mantendo a concentração de SFBV fixa em $0,056 \text{ mol.L}^{-1}$. A Figura 34 apresenta o espectro de ^{31}P , mostrando a evolução dos produtos de degradação ao longo do tempo e a ampliação da região entre 3,85 ppm e 3,65 ppm.

Logo após a adição de NaOD ao meio reacional, o primeiro fato observado (Figura 34) foi a formação de uma molécula com deslocamento químico muito próximo ao do SFBV. Na menor concentração (Figura 34a), nota-se uma proporção quase igual entre os sinais da molécula de partida e do que suspeitamos ser um intermediário. No entanto, nas Figuras 34b e 34c, essa proporção se inverte. É interessante observar que, assim como o SFBV, a intensidade do sinal do intermediário diminui ao longo do progresso reacional, conforme evidenciado nos gráficos das Figuras 35a-c, indicando também o seu consumo.

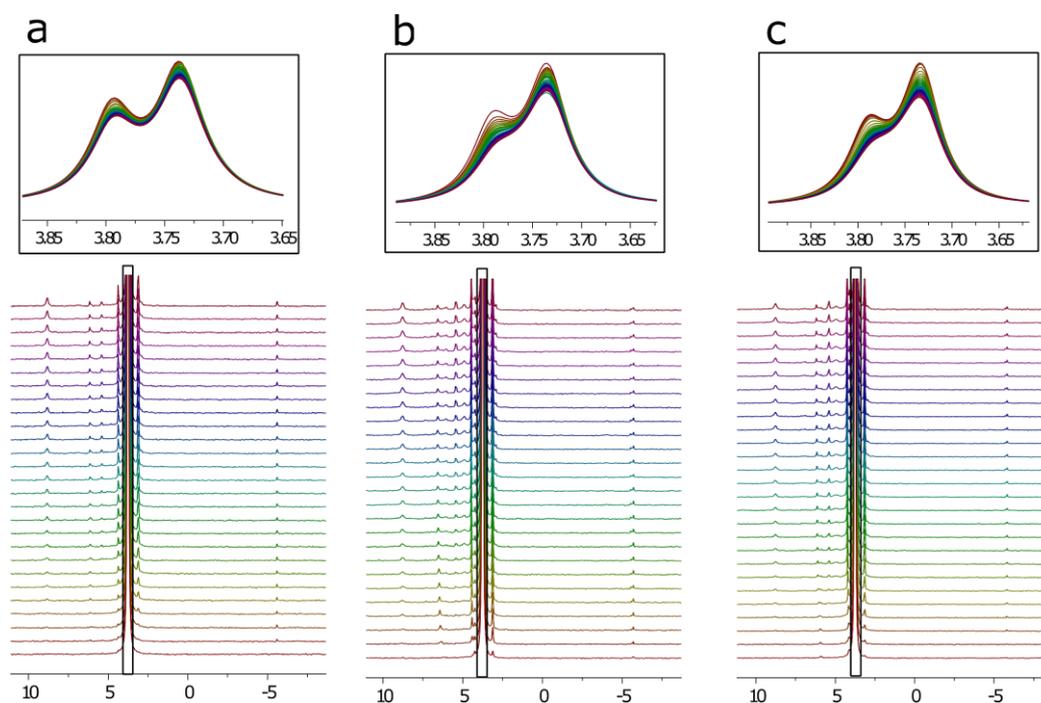


Figura 34. Os espectros de ^{31}P obtidos durante 48 horas de teste de estresse alcalino mostram, na ampliação, os sinais referentes ao deslocamento químico do sofosbuvir a 3,79 ppm e do intermediário a 3,73 ppm, formado logo após a adição da base ao meio. Os espectros representados nesta figura foram adquiridos a cada 52 minutos; na figura, são apresentados apenas metade do total de 52 espectros obtidos em 48 horas, para melhor visualização. a) $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOD; b) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOD; e c) $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOD.

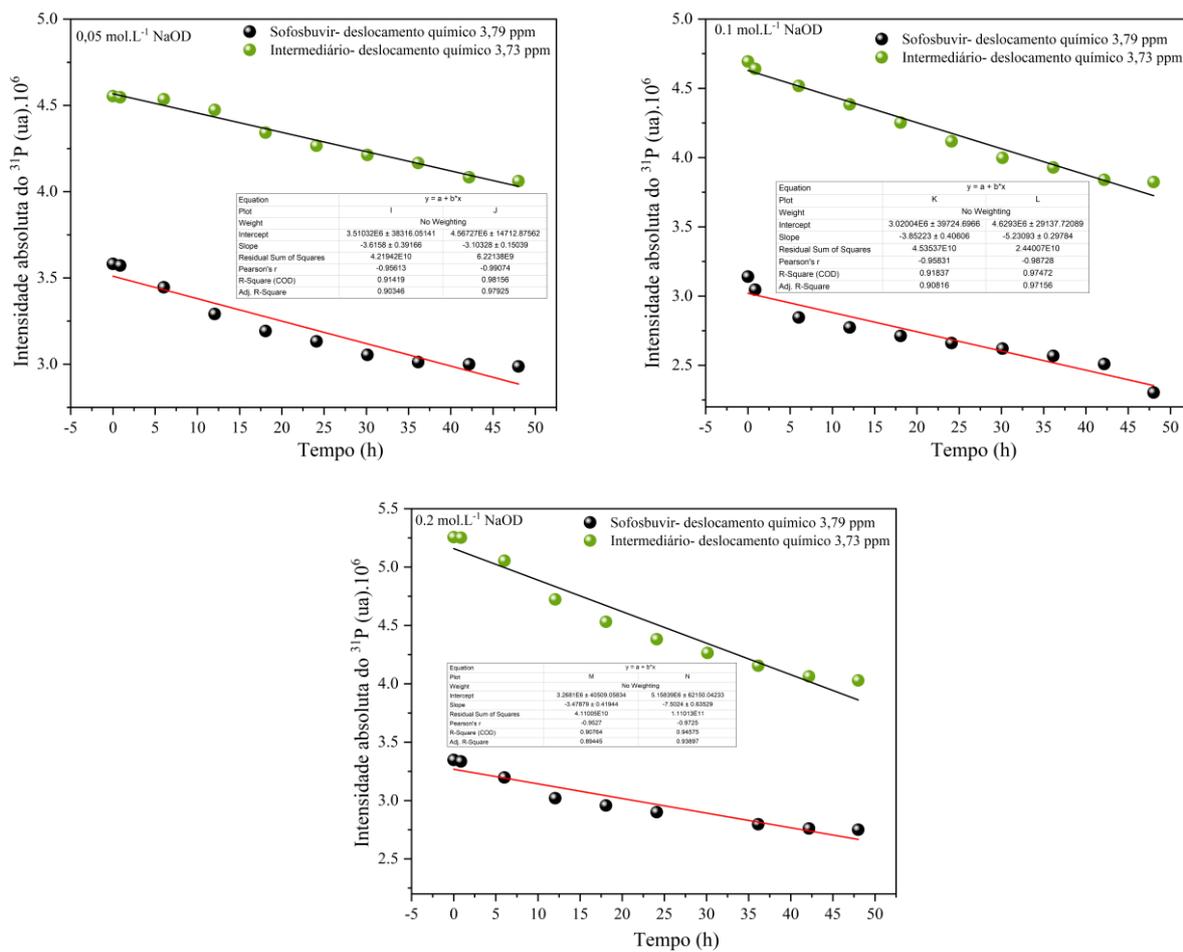


Figura 35. Perfil de consumo dos sinais 3.79 ppm (SFBV) e 3,73 ppm (Intermediário). O gráfico representa o decaimento da intensidade absoluta dos sinais no espectro de ³¹P em função do tempo. Nas concentrações de NaOD, 0,05 mol.L⁻¹, 0,1 mol.L⁻¹ e 0,2. mol.L⁻¹.

Nos Anexos 15-17, que apresentam os espectros de ³¹P com as expansões, observamos que alguns sinais formados, como os deslocamentos em aproximadamente 6,7 ppm e -5,45 ppm, variam não apenas no formato do sinal, mas também no deslocamento químico. Ao analisar os espectros de ¹H (Anexo 18), notamos pouca variação no espectro da molécula de partida, exceto pela formação dos sinais correspondentes ao fenolato e ao isopropanol. Essas evidências nos levam a concluir que a degradação alcalina do SFBV resulta na formação de intermediários contendo fósforo, suficientemente estáveis para serem detectados nos espectros de ³¹P.

Na busca por evidências da formação do que acreditamos ser um intermediário, correlacionamos a taxa de consumo do sinal em 3,73 ppm no espectro de ³¹P com a formação do fenolato no espectro de ¹H. Nas Figuras 36a e 36b, foi possível associar o consumo desse intermediário com a formação de um produto de degradação sem a presença do fenolato. Com base nessas observações, propomos o mecanismo descrito no Esquema 7, que envolve o ataque nucleofílico da hidroxila ao átomo de fósforo, resultando na clivagem da ligação e na

consequente saída do fenolato. No entanto, é importante destacar que o mecanismo proposto é simplificado, baseado apenas nas observações do espectro de ^{31}P , e que a elucidação completa do mecanismo poderia ser obtida através de cálculos teóricos.

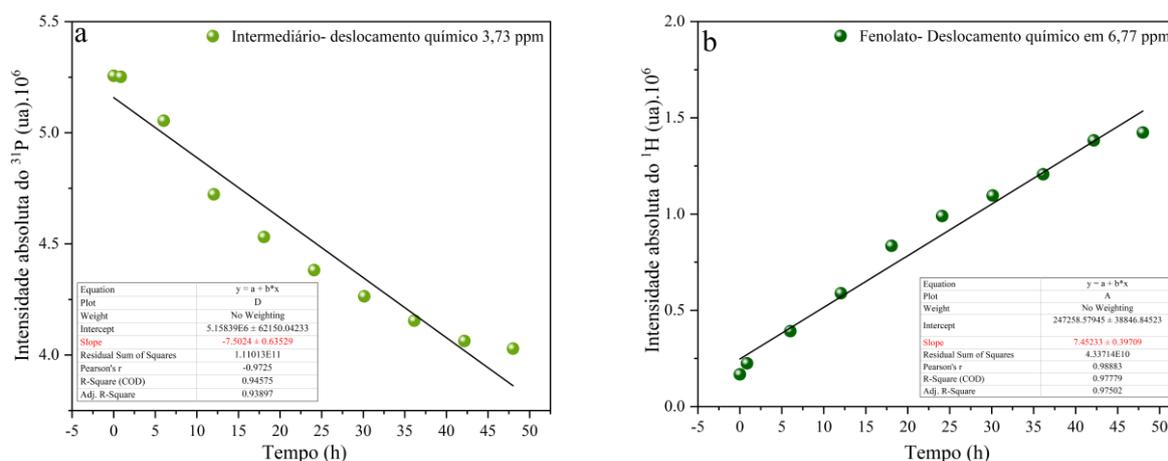
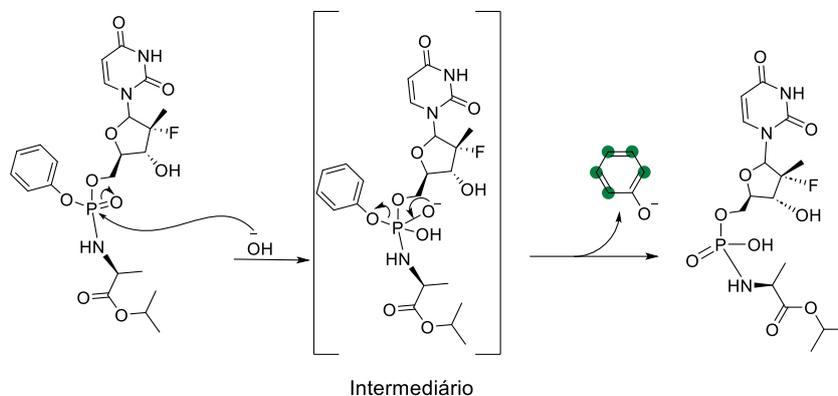


Figura 36. Perfil de consumo e formação. **a.** O gráfico representa o decaimento da intensidade absoluta do intermediário em 3,73 ppm no espectro de ^{31}P em função do tempo, para este gráfico a intensidade absoluta foi dividida por dez. **b.** Intensidade absoluta do sinal do fenolato no espectro de ^1H , especificamente do sinal em 6,73 ppm. Para esse experimento a condição de degradação foi de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOD.



Esquema 7. Mecanismo proposto de formação dos produtos de degradação básica da molécula sofosbuvir.

Para complementar os resultados obtidos por RMN, utilizamos a técnica de espectroscopia na região UV para realizar o estudo cinético de degradação do IFA. É importante destacar que os experimentos foram conduzidos em meio aquoso. Sabemos que o primeiro grupo de saída em meio básico é o fenolato, que possui um alto coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon > 4000 \text{ u.a.}$) e apresenta duas bandas distintas de absorção ($\lambda_1 = 234 \text{ nm}$ e $\lambda_2 = 270 \text{ nm}$). Esta técnica é adequada para análise de espécies em baixas concentrações e permite uma ampla variação de parâmetros, incluindo faixas amplas de variação de pH e temperatura.

Inicialmente, realizamos um experimento cinético na região UV utilizando um meio básico em pH 11 (meio tamponado em $[\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}] = 0,01 \text{ M}$), no qual submetemos o IFA a uma concentração de $6,67 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Na Figura 37, é possível observar o aumento da banda em 234 nm devido à formação de fenolato no meio reacional. A reação atinge uma saturação na concentração de fenolato formado em aproximadamente 12 h após o início.

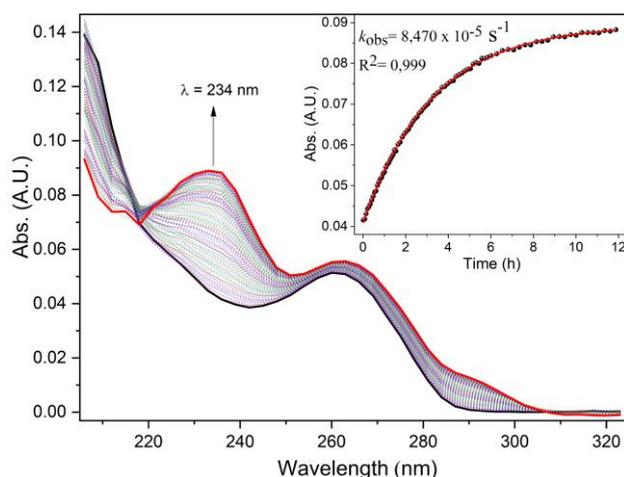


Figura 37. Espectros de absorvância da degradação alcalina do SFBV.

Em seguida, a partir de uma solução padronizada de NaOH (0,1 M), foi preparada uma solução de NaOH com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 11), à qual o fármaco foi submetido utilizando-se a mesma concentração empregada na cinética anterior. Sucessivas alíquotas de uma solução de fenolato foram então adicionadas ao sistema, demonstrando uma variação semelhante à observada na Figura 37. Esse resultado confirma que o aumento das bandas em $\lambda_1 = 234 \text{ nm}$ e $\lambda_2 = 270 \text{ nm}$ corresponde à presença do fenolato. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 38.

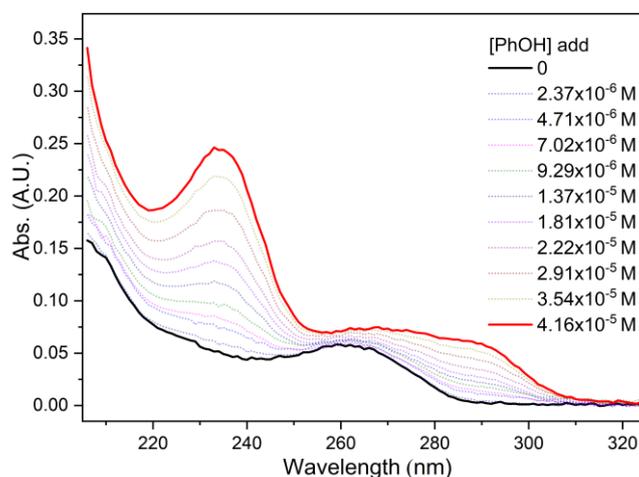


Figura 38. Espectros de absorvância da degradação alcalina do SFBV com a variação do pH.

A partir da solução padronizada de NaOH, foram realizadas cinéticas com variação de pH na faixa de 11 a 13, conforme mostrado na Figura 39. Em pH 11, os valores da constante observada (k_{obs}) foram semelhantes aos obtidos em meio tamponado, como era esperado. Com o aumento do pH, observou-se um aumento na velocidade de degradação em meio básico, indicando que meios com maior concentração de íons OH^- são mais nucleofílicos. Outra informação relevante está relacionada ao efeito isotópico observado: a reação realizada em NaOD com D_2O foi ligeiramente mais rápida em pH/pD próximo de 11, mas em valores mais elevados (pH/pD 13), a velocidade foi praticamente a mesma, com meia-vida ($t_{1/2}$) de aproximadamente 3,3 minutos.

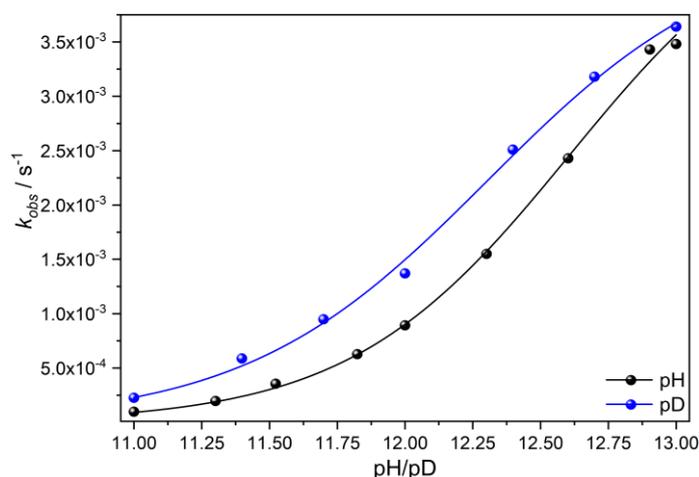


Figura 39. Gráfico da constante de velocidade observada em função do pH. A linha em preto corresponde ao meio com água e a solução padronizada de NaOH e a linha em azul o meio com água deuterada e NaOD.

Como complemento ao estudo, obtivemos os parâmetros de ativação. Fixamos a concentração do IFA em $6,67 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $\text{pH}=12$, variando a temperatura entre 25°C , 30°C , 35°C , 40°C , 45°C , 50°C e 55°C . Utilizando a equação de Arrhenius (Equação 8-9), calculamos os parâmetros associados à barreira energética da reação. Aplicando o logaritmo em ambos os lados da equação de Arrhenius, obtivemos uma equação linear para gerar um gráfico (Equação 9). Ao plotar $\ln(k')$ vs $1/T$ (Figura 40), obtemos uma linha com uma inclinação de $-E_a/R$ e uma interseção com o eixo y de $\ln(A)$. Assim, obtivemos os valores da $E_a= 12,64 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e o fator pré-exponencial $\log(A)= 14,27$.

$$k = Ae^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad \text{Equação 8}$$

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad \text{Equação 9}$$

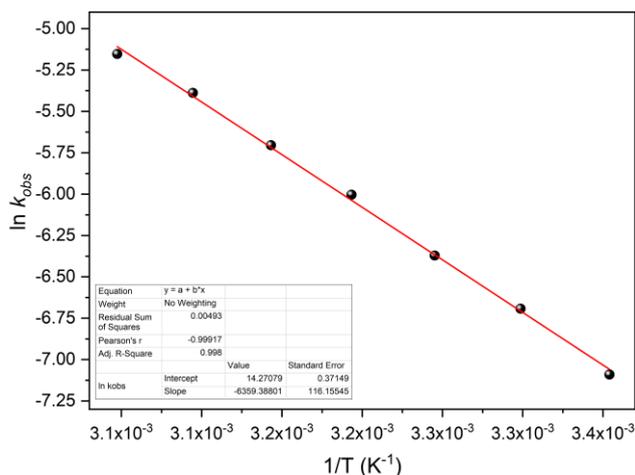


Figura 40. Gráfico de Arrhenius: Constantes de velocidade observada em função da temperatura para a degradação do SFBV em pH=12.

Para determinar o valor de ΔG^\ddagger , utilizamos a equação de Eyring (Equação 10), empregando o valor de k'_2 de 4.09×10^{-6} a uma temperatura de 30°C . Rearranjando a equação de Eyring, obtemos a Equação 11, que pode ser representada graficamente como uma linha reta. Ao plotar $\ln(k'_2)/T$ vs $1/T$ (Figura 41), a inclinação corresponde a $-\Delta H^\ddagger/R$.

$$k = \kappa \left(\frac{k_B}{h} \right) e^{\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT} \right)} \quad \text{Equação 10}$$

$$\ln \frac{k}{T} = \frac{-\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} + \ln \kappa \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad \text{Equação 11}$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad \text{Equação 12}$$

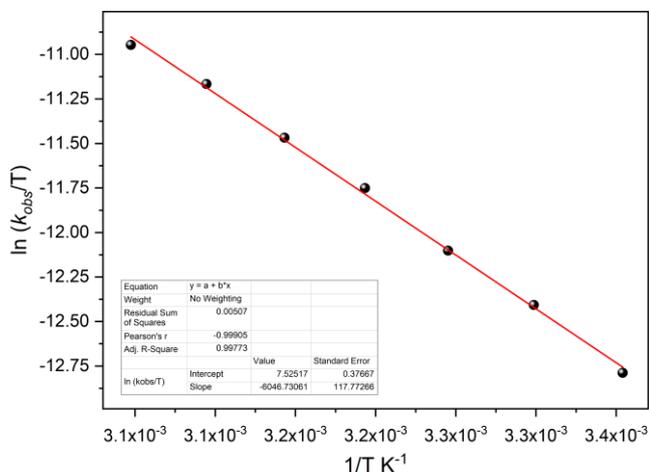


Figura 41. Gráfico de Eyring: Constantes de velocidade observada em função da temperatura para a degradação do SFBV em pH=12.

Aplicando a equação de Eyring, determinamos o valor de $\Delta G^\ddagger = 23,34 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ($303,15 \text{ K}$) (Equação 10). Utilizando a equação de Eyring linearizada (Equação 11). e observando a Figura 41, obtivemos $\Delta H^\ddagger = 12,02 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Finalmente, determinamos $\Delta S^\ddagger = -37,33 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ através da equação fundamental (Equação 10).

Para o IFA Tenofovir também realizamos os experimentos de DOSY ^1H (Figura 42), onde observamos a formação de um produto de degradação com coeficiente de difusão muito próximo ao observado na molécula de partida.

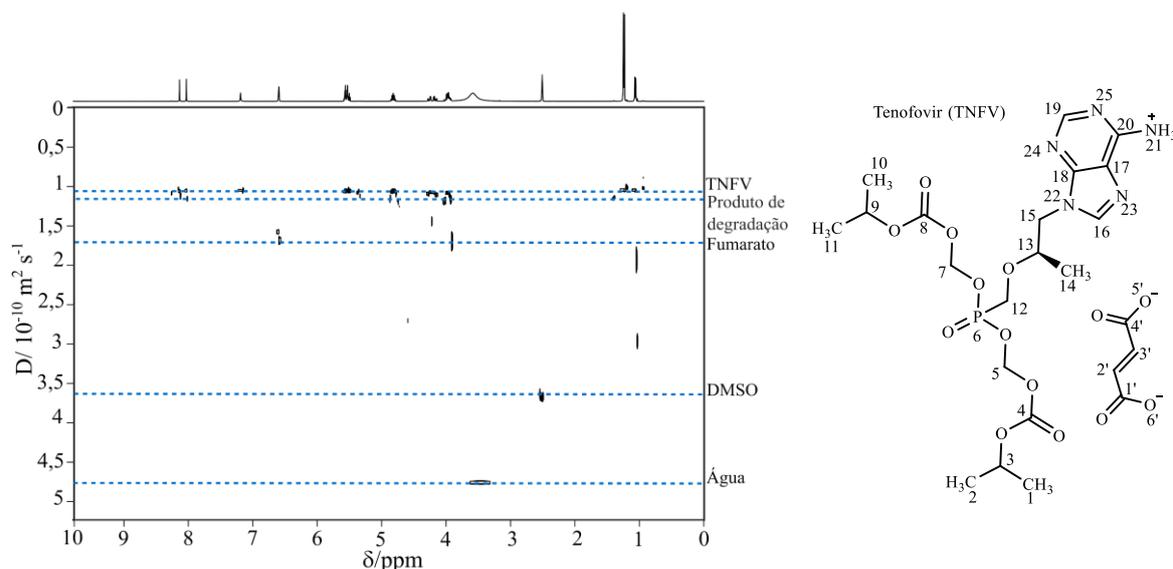


Figura 42. Mapa de difusão por RMN DOSY ^1H da amostra de TNFV parcialmente degradada em condição básica. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ NaOD. O DOSY ^1H foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de $1,6 \text{ ms}$ (δ) e um tempo de difusão de 80 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm .

Para esclarecer os resultados obtidos no DOSY ^1H e observar a molécula com coeficiente de difusão próximo ao da molécula de partida, realizamos também o DOSY ^{31}P . Na Figura 43, é possível observar um coeficiente de difusão além da molécula de partida.

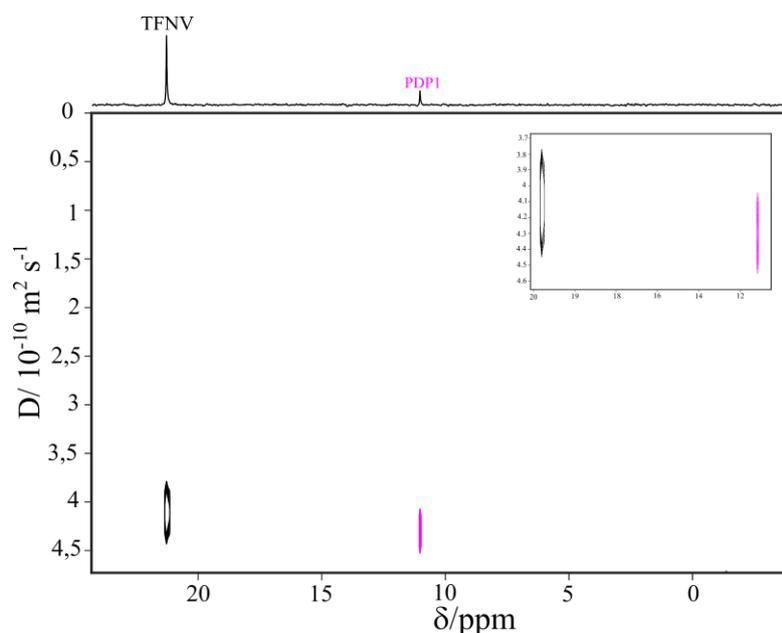


Figura 43. Mapa de difusão por RMN DOSY ^{31}P da amostra de TNFV parcialmente degradada em condição básica. A análise foi realizada após 128 horas de início da reação. A concentração usada foi de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ NaOD. O DOSY ^{31}P foi adquirido com um pulso de gradiente de codificação de duração de 3.6 ms (δ) e um tempo de difusão de 100 ms (Δ), em um tubo de RMN de 5 mm. A sigla PDP significa produto de degradação contendo fósforo.

Na Figura 44, é apresentado o mapa de contorno (2D- ^1H - ^{31}P -HMBC) referente à degradação básica do tenofovir. No espectro, observam-se correlações do PDP1 com dois sinais em 3,4 ppm e 5,4 ppm, correspondentes aos prótons H-5' e H-12', localizados próximos ao átomo de fósforo. Dessa forma, conclui-se que o PDP1 formado possui dois grupos ligados ao fósforo: o metil isopropil carbonato e o grupo cíclico. Não foi considerada a hidrólise do carbonato com liberação de isopropanol, uma vez que este não foi detectado no espectro de ^1H . Contudo, foi identificado um deslocamento químico que indica a presença do grupo carbonato contendo uma hidroxila (Figura 45). Com base nessas evidências, propomos o mecanismo ilustrado no Esquema 8, em que, devido ao forte caráter nucleofílico da hidroxila ($-\text{OH}$), o ataque ocorre preferencialmente no átomo de fósforo, resultando na saída subsequente do grupo carbonato.

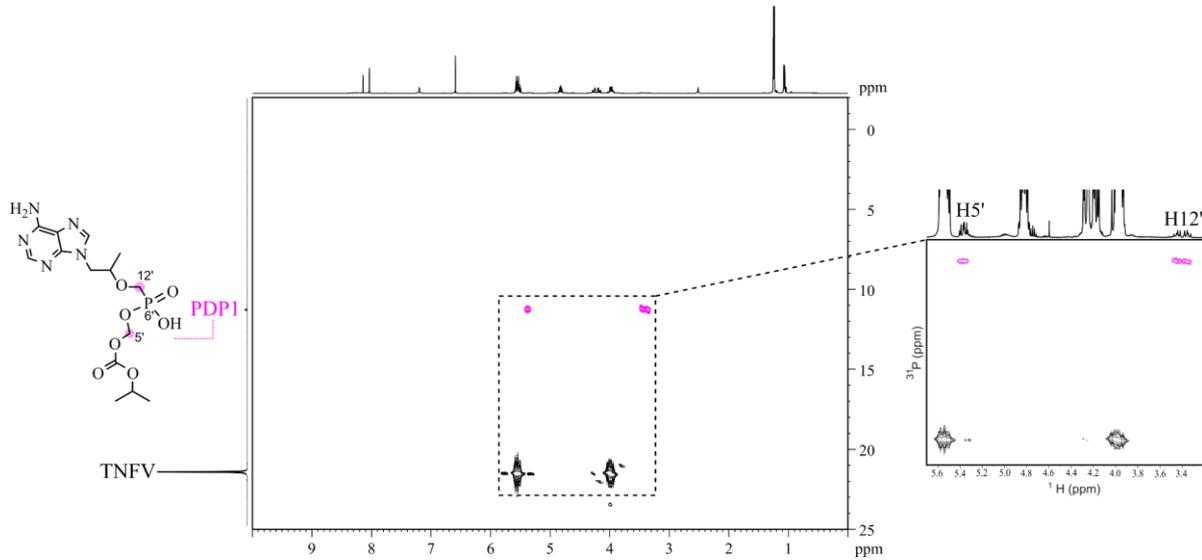


Figura 44. Mapa de contorno do espectro de 2D- ^1H - ^{31}P -HMBC da degradação básica do TNFV em DMSO- d_6 .

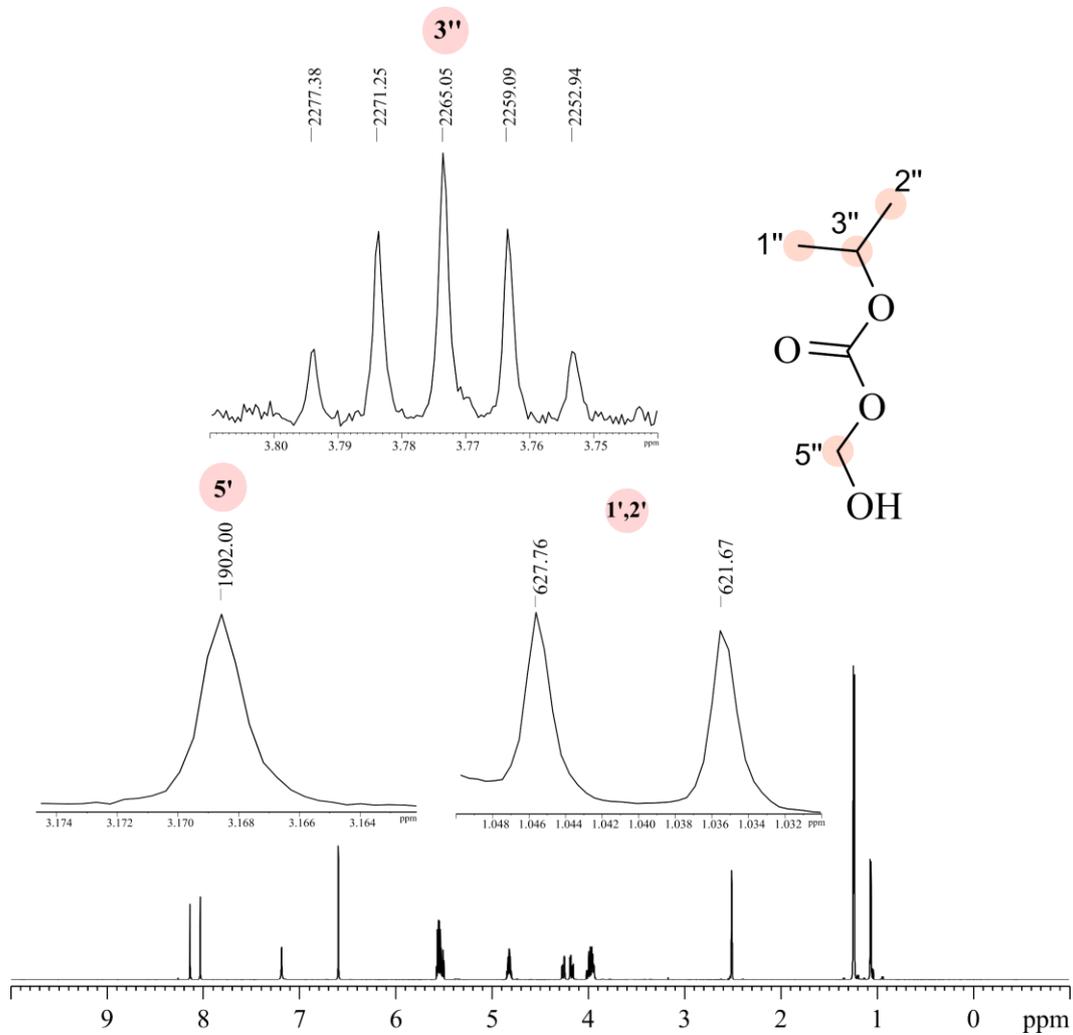
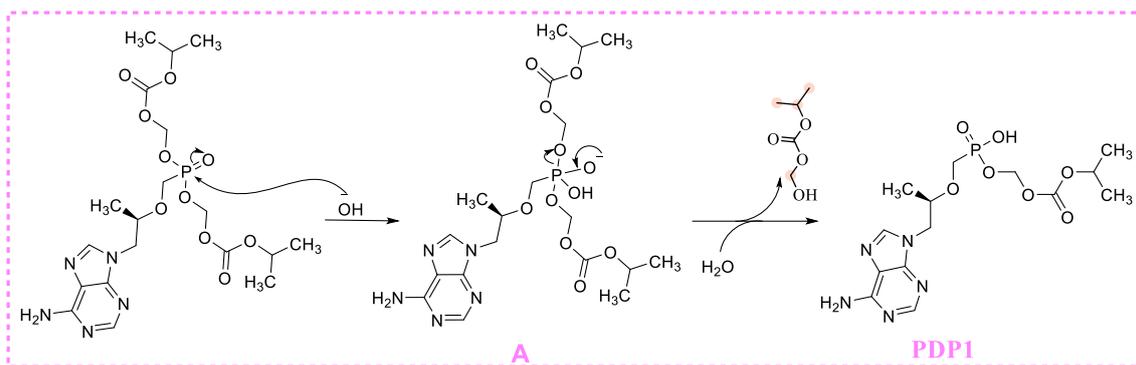


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição dos produtos de degradação da molécula tenofovir na degradação básica.



Esquema 8. Mecanismo proposto de formação dos produtos de degradação básica da molécula tenofovir.

Assim como observamos na degradação ácida do TNFV, o produto de degradação PDP2 é formado no início da reação. Em meio básico, observamos a mesma tendência: a hidrólise para a formação do PDP1 ocorre no momento da adição da base e não evolui para a formação de outros produtos de degradação ou o aumento da concentração de PDP1, resultado observado em todas as concentrações do estudo (0,04, 0,1 e 0,2 mol.L⁻¹ de NaOD), Figura 46.

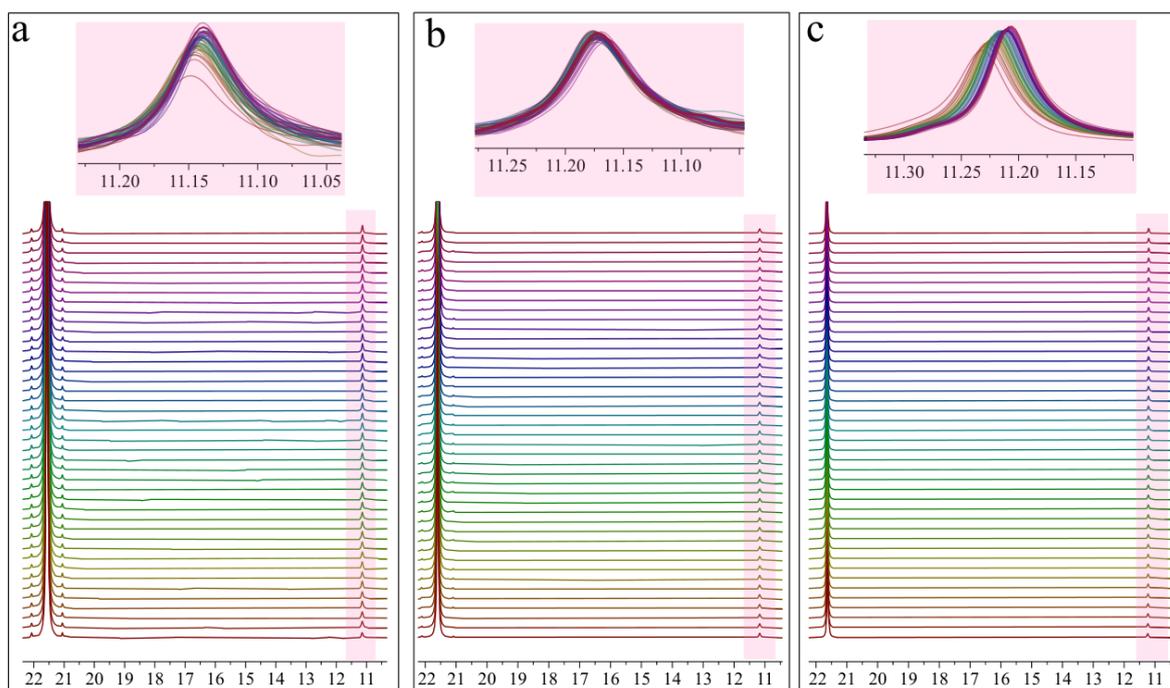


Figura 46. Espectro de RMN de ³¹P (400 MHz, 25 °C, DMSO) com expansão e atribuição do produto de degradação da molécula tenofovir na degradação básica, fixamos a concentração de TNFV em 0,02 mol.L⁻¹ a) Concentração de 0,04 mol.L⁻¹ de NaOD b) 0,1 mol.L⁻¹ de NaOD c) 0,2 mol.L⁻¹ mol de NaOD.

Para a degradação básica, também realizamos os cálculos de balanço de massas, cujos resultados estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Balanço de massa das moléculas parcialmente degradadas em condição básica, ao final de 48 horas de degradação.

Concentração de degradação (mol.L ⁻¹)	T _i %	PD _i %	T _D % ^a	PD _D % ^b	BMA % ^c	DABM % ^d
0,04 TNFV	100	3,3	99,06	0,92	100	0
0,1 TNFV	100	3,3	99,72	1,29	99,72	0,27
0,2 TNFV	100	3,3	99,80	1,35	97,92	2,08

^aCorresponde o quanto do IFA degradou após 48 horas. ^bO somatório dos produtos de degradação formados após 48 horas. ^cO balanço de massas absoluto calculado segundo a equação $BMA = (T_D + PD_D) / (T_i + PD_i)$. ^dA deficiência absoluta de balanço de massa calculado subtraindo o valor de BMA por 100.

Não foi possível realizar o balanço de massas para a degradação básica do sofosbuvir, uma vez que, como discutido anteriormente, diversos produtos de degradação foram formados, o que resultou em sobreposição de sinais e variação significativa nos deslocamentos químicos ao longo da reação. Esses fatores inviabilizaram a obtenção precisa das áreas correspondentes aos produtos de degradação. No entanto, assim como observado na degradação ácida dos fármacos, obtivemos resultados satisfatórios, com um déficit no balanço de massas inferior a 3%. Dessa forma, a RMN de ³¹P demonstrou ser uma técnica eficaz para a realização de ensaios de balanço de massas.

1.7 Conclusões

O estudo evidenciou a eficácia da técnica de RMN no monitoramento de reações de degradação de fármacos sob condições de estresse, eliminando a necessidade de separação prévia dos componentes presentes na mistura. As vantagens da espectroscopia de RMN se tornam particularmente claras ao se utilizar o núcleo de ³¹P para detecção, uma vez que sua ampla janela espectral reduz a probabilidade de sobreposições de sinais, facilitando a análise de misturas complexas. A combinação dos espectros de difusão de ¹H e ³¹P fornece informações valiosas tanto sobre o número de componentes presentes quanto sobre a natureza das moléculas em relação a seus tamanhos relativos, para ambas as moléculas propostas no estudo.

Além disso, os experimentos de DOSY de ^{31}P e 2D- ^1H - ^{31}P -HMBC permitiram a identificação de moléculas que não seriam detectáveis por métodos convencionais, como ^1H - ^{13}C -RMN, COSY e ^1H - ^{13}C -HMBC. Essa abordagem inovadora demonstrou a capacidade da RMN de revelar detalhes importantes sobre os produtos de degradação.

O monitoramento das reações de degradação ácida do sofosbuvir, assim como das degradações ácida e básica do tenofovir, por meio de espectros unidimensionais de ^{31}P , possibilitou a determinação precisa da taxa de consumo de ambas as moléculas ao longo do processo de degradação. Essa análise permitiu a realização do balanço de massas na mistura das duas substâncias, apresentando um déficit inferior a 3%. Além disso, os resultados obtidos com os experimentos de ^{31}P permitiram o acompanhamento detalhado dos produtos de degradação, fornecendo informações quantitativas sobre os compostos formados durante o percurso reacional. Esses dados possibilitaram a proposta de um mecanismo de degradação, refutando alguns dos mecanismos anteriormente sugeridos na literatura.

No entanto, para a degradação básica do sofosbuvir, não foi possível realizar o balanço de massas e identificar todos os produtos de degradação formados, devido à geração de múltiplos produtos que resultaram em sobreposição de sinais e grandes variações nos deslocamentos químicos ao longo do processo reacional. Apesar disso, os resultados obtidos evidenciaram a sensibilidade do sofosbuvir em meio básico e permitiram a identificação de um intermediário que está diretamente relacionado à saída do fenolato. Para corroborar os resultados obtidos por RMN em relação à saída do fenolato, os experimentos de UV-Vis mostraram-se fundamentais, pois contribuíram para o estudo cinético e termodinâmico da degradação. Além disso, esses experimentos forneceram informações valiosas sobre o efeito isotópico na degradação básica.

Esses resultados não apenas ressaltam a versatilidade da RMN na análise de fármacos e no estudo de estabilidade, mas também abrem novas perspectivas para a investigação da degradação em misturas, eliminando a necessidade de separação prévia dos produtos de degradação.

**CAPÍTULO 2: Monitoramento de reações de troca isotópica H/D
por RMN**

2.1 Introdução

A substituição de um átomo de hidrogênio pelo seu isótopo deutério em compostos orgânicos tem uma ampla gama de aplicações. Este método é empregado na química analítica como padrão interno para cromatografia gasosa (CG), análises por espectrometria de massas e cromatografia líquida (LC-MS), na investigação de vias metabólicas em pesquisas biomédicas, e no contexto farmacêutico para o desenvolvimento de uma nova geração de fármacos deuterados.^{30,119,120} A incorporação de deutério na estrutura de um fármaco pode prolongar sua duração no corpo e, conseqüentemente, reduzir efeitos colaterais, o que é crucial para tratamentos de longo prazo.^{34,121} Além disso, a deuteração seletiva de centros de carbono quirais pode minimizar a epimerização.¹²² Destaca-se a aprovação pelo FDA do primeiro fármaco deuterado, a deutetrabenazina, em 2017.^{27,123,124} Mais recentemente, em 2022, o deucravacitinibe também recebeu aprovação.^{28,29}

A aplicação ampla de IFAs deuteradas estimulou interesse no desenvolvimento de metodologias eficientes e seletivas para o enriquecimento isotópico de moléculas orgânicas, particularmente no setor farmacêutico.

Duas abordagens primárias têm sido exploradas para a marcação por deutério em fármacos. A primeira envolve síntese convencional através de uma rota de múltiplos passos usando um marcador isotópico como precursor.^{30,32} Embora este método possa ser dificultado pelo custo elevado do reagente rotulado e por numerosos passos com baixo rendimento, a seletividade da região química é garantida.^{26,125,126}

A segunda abordagem envolve a substituição de isótopo, onde o deutério pode ser adicionado no intermediário ou na molécula final. Inúmeros métodos para troca H/D descritos na literatura, baseada em catálise homogênea ou heterogênea, bem como processos fotocatalíticos.^{119,127–129} Complexos metálicos comumente empregados como catalisadores incluem metais como Ir,^{130,131} Pd,¹³² Pt¹³³ e Rh¹³⁴ todos com e sem carbono, abrangendo variantes oxidadas como Pt₂O¹³⁵ e formas elementares relacionadas a Pd¹³⁶ Pt^{132,136} e Ni.¹³⁷ Métodos de deuteração usando esses catalisadores têm sido aplicados em compostos aromáticos nas posições *orto* e *meta*, bem como em compostos alifáticos, vinílicos e heteroaromáticos.¹¹⁹

Métodos alternativos, como troca H/D dependente de pH baseada na enolização de grupos específicos no substrato, requerem uma fonte de deutério e podem ser catalisados por ácidos ou por bases.^{30,119–121} Algumas destas metodologias envolvem o uso de ácidos ou bases fortes ou de metais pesados. No contexto de deuteração de compostos, tais condições severas

podem ser preocupantes em termos de reatividade e da formação de subprodutos indesejáveis, especialmente quando a troca é realizada na etapa final da rota sintética.

O estudo realizado por Dos Santos et.al. (2017) demonstrou a aplicação bem-sucedida de Líquidos Iônicos (LIs) como catalisadores para a deuteração de substratos contendo hidrogênios ácidos, como cetonas e alcinos, em solvente não polar apróticos CDCl_3 sob condições brandas.³⁷ A Figura 47 resume o estudo mecanístico, onde o LI é ativado pelo solvente no primeiro passo, seguido pela deuteração do substrato no segundo passo. Os LIs mais eficazes identificados foram 1-ⁿButil-2,3-dimetilimidazólio prolinato (BMMI.Pro) e 1-ⁿButil-2,3-dimetilimidazólio imidazolato (BMMI.Im). Na Figura 47, os substratos e os sítios deuterados são destacados, fornecendo uma visão clara das transformações ocorridas durante o processo de deuteração.

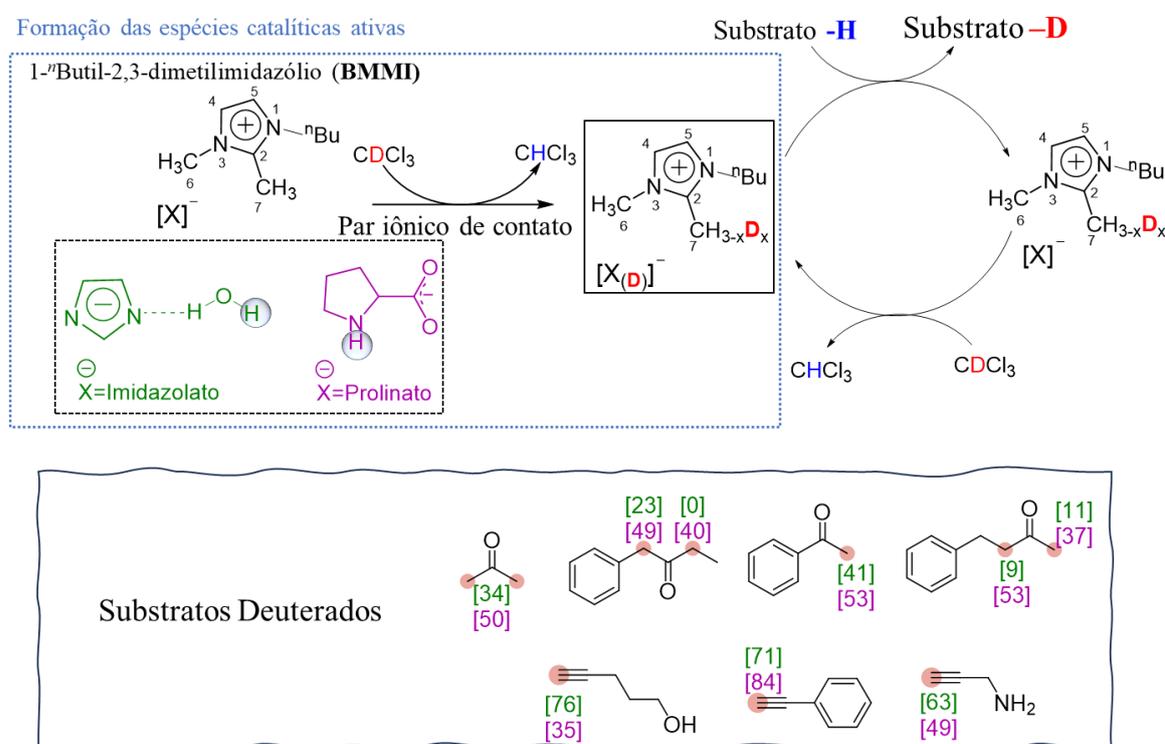


Figura 47. Um resumo das etapas e condições da reação de troca H/D usando os catalisadores BMMI.Pro e BMMI.Im, envolvendo os substratos. Os substratos alquil e benzil que foram deuterado por Dos Santos et.al. (2017), incluindo as porcentagens correspondentes de deuteração obtidas com os catalisadores BMMI.Pro e BMMI.Im. Os sítios de deuteração são destacados nas moléculas.¹³⁸

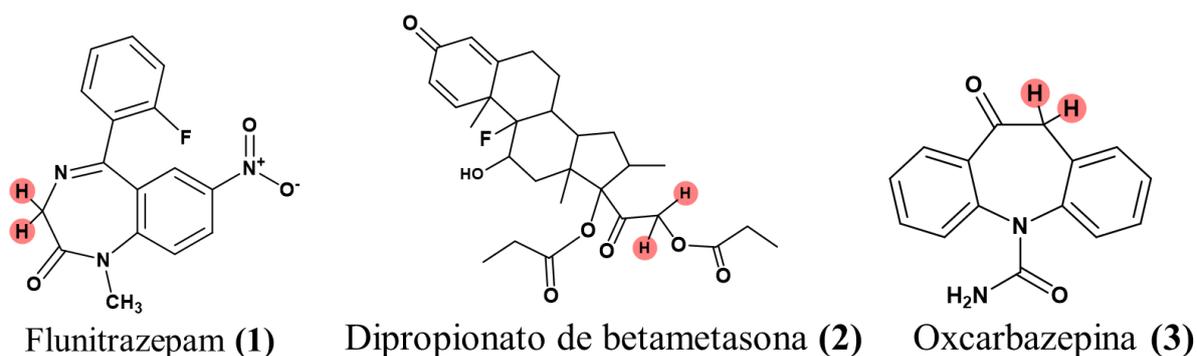


Figura 48. Estruturas moleculares dos IFAs deste estudo para a reação de troca H/D, o flunitrazepam (1), dipropionato de betametasona (2), e oxcarbazepina (3)

A utilização dos LIs BMMI.Pro e BMMI.Im em reações de troca isotópica H/D com os IFAs flunitrazepam (1), dipropionato de betametasona (2), e oxcarbazepina (3) foi proposta, conforme ilustrado na Figura 48. Essas reações foram monitoradas utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), aproveitando os benefícios da técnica para elucidar a eficácia e seletividade da deuteração dos substratos propostos. Essa abordagem oferece a vantagem de ocorrer em um único passo, sem a necessidade de isolar intermediários, e sob condições suaves de pH, o que pode ter implicações significativas no desenvolvimento de novas estratégias de rotulagem isotópica de fármacos.

2.2 Revisão Bibliográfica

2.2.1 Compostos deuterados

Os compostos deuterados são moléculas em que um ou mais átomos de hidrogênio foram substituídos por deutério, um isótopo estável do hidrogênio. O deutério possui um próton e um nêutron em seu núcleo, ao contrário do hidrogênio, que possui apenas um próton. As ligações C–D são mais curtas que as ligações C–H por cerca de 0,005 Å.¹²¹ A principal diferença está na massa, sendo o deutério (D) duas vezes mais pesado que o hidrogênio (H). Como resultado, a ligação C–D apresenta uma frequência de estiramento vibracional reduzida em comparação com a ligação C–H, uma energia de estado fundamental mais baixa e, conseqüentemente, uma maior energia de ativação para a clivagem. Isso implica que a ligação C–D é mais estável que a ligação C–H, com uma diferença de 1,2–1,5 kcal mol⁻¹, e sua clivagem ocorre mais lentamente. Esse efeito é chamado de efeito cinético isotópico primário (KIE).³³ Em geral, a substituição de hidrogênio por deutério altera as propriedades físico-químicas de moléculas orgânicas. Por exemplo, foi relatada uma redução na lipofilicidade e na acidez de

ácidos carboxílicos e fenóis em espécies deuteradas, em comparação com suas equivalentes não deuteradas, além de um aumento na basicidade de aminas.^{139–142}

As propriedades distintas do deutério, em comparação com o hidrogênio, geram uma grande demanda em diversas áreas. Na bioquímica, a troca por deutério permite investigar a conformação de proteínas, pois, na presença de D₂O, os hidrogênios de uma ligação amida passam por troca H/D. Dependendo da conformação da proteína e do envolvimento desse hidrogênio lábil em ligações de hidrogênio, essa troca ocorrerá em diferentes velocidades. Experimentos de marcação, seguidos por análises de espectrometria de massa, permitem a investigação dessas interações não covalentes e fornecem informações sobre estruturas tridimensionais.^{119,121}

Além disso, compostos precisamente marcados têm amplas aplicações em espectrometria de massa quantitativa, bem como padrões internos. A quantidade de aplicações de moléculas marcadas com deutério na ciência dos materiais está crescendo. Por exemplo, aproveitando os efeitos cinéticos isotópicos, as propriedades de materiais orgânicos para diodos emissores de luz (OLEDs) e fluoróforos poderiam ser aprimoradas.¹²¹

Outra aplicação que tem ganhado bastante destaque, e que é o foco deste trabalho, é a utilização de deutério na modificação de fármacos, representando uma fronteira promissora na ciência medicinal. Através da melhoria das propriedades farmacocinéticas, como maior estabilidade metabólica e meia-vida prolongada, os compostos deuterados oferecem novas oportunidades para o tratamento de diversas doenças, especialmente aquelas que exigem terapias de longo prazo e com efeitos colaterais mínimos.^{27–29,32–34,119} Com o contínuo avanço tecnológico e científico, a deuturação de fármacos promete revolucionar a indústria farmacêutica, trazendo medicamentos mais seguros e eficazes para o mercado.

Portanto, devido a todas essas aplicações, é de suma importância o desenvolvimento de metodologias para a síntese de compostos deuterados. A síntese de compostos orgânicos deuterados pode ser realizada mediante a preparação a partir de precursores marcados isotopicamente ou por meio de reações de troca isotópica.^{126,143} A segunda opção é considerada mais conveniente e importante, visto que o deutério pode ser introduzido após a síntese da molécula. Dentro dessa abordagem, há duas categorias de reações: (I) catalisadas por metal ou complexos metálico (catálise homogênea ou heterogênea)^{26,131,134,136,144} e (II) dependentes do pH.^{120,145–147}

Os principais catalisadores descritos na literatura responsáveis pela troca H/D são metálicos ou complexos metálicos. Nos trabalhos publicados por Capponi et al. (1969)¹⁴⁸ e Sajiki et al. (2010),¹⁴⁹ demonstra-se a utilização de catalisadores de Pt e Pd, tanto individualmente quanto em conjunto, para a troca H/D do fármaco ibuprofeno e de ácidos nucleicos. As condições experimentais, moléculas e porcentagens de troca podem ser observadas na Figura 49.

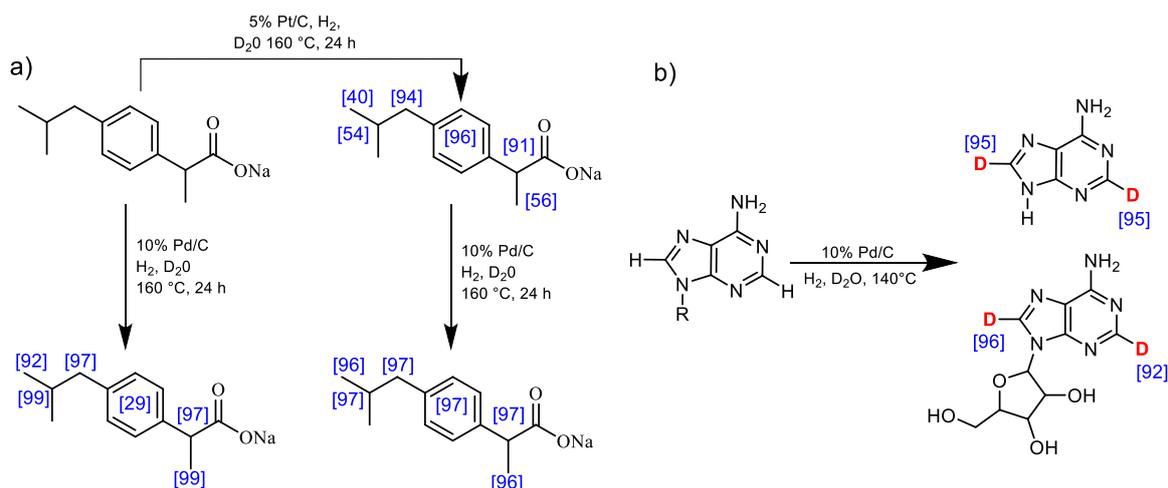


Figura 49. Troca H/D catalisada pelos metais platina e paládio em diferentes substratos. **a)** Ibuprofeno **b)** Derivado da adenina. Os números em azul corresponde as porcentagens de troca.

Apesar do bom rendimento e seletividade observados na utilização de catalisadores metálicos para a troca H/D, esses catalisadores são caros e, além disso, são necessárias condições agressivas de temperatura e pressão que muitas vezes não são compatíveis com os grupos funcionais sensíveis presentes nas moléculas.

As reações de troca H/D influenciadas pelo pH representam métodos clássicos nesta área. Do ponto de vista mecanicista, a enolização, catalisada por ácido ou base, constitui a base dessas reações. Por isso, a troca H/D em posições ativadas pode ser alcançada usando ácidos ou bases de Brønsted deuterados. A reação inversa da troca de deutério por hidrogênio é favorecida, mas etapas químicas adicionais podem ser necessárias para alcançar a desativação completa.^{120,143}

As reações de troca H/D pode ocorrer sem a adição de ácido ou base nos hidrogênios mais ácidos da molécula, apenas com o uso de D₂O e aquecimento. Em moléculas derivadas de piridinas, obtiveram-se resultados superiores a 95% de deuteração nas posições *orto* e *para* do anel; no entanto, essas reações exigiram condições drásticas, como temperatura, em torno de 250 °C.^{150,151}

Ácidos de Brønsted deuterados fortes ou, alternativamente, ácidos de Lewis, por exemplo D_3PO_4 , DCl , BF_3 , $AlCl_3$ e $MoCl_2$, em combinação com uma fonte de deutério, são usados para a incorporação de deutério em compostos aromáticos.^{120,152} Posições menos acessíveis à substituição aromática eletrofílica apresentam menor tendência à troca nessas condições. No caso da enterolactona (Figura 50),¹⁵³ observa-se a troca completa de todos os hidrogênios no anel aromático com bons rendimentos, mesmo à temperatura ambiente, incluindo as posições *meta* não ativadas. Em contraste, os átomos de hidrogênio dos resíduos alifáticos não foram trocados nessas condições.¹⁵⁴

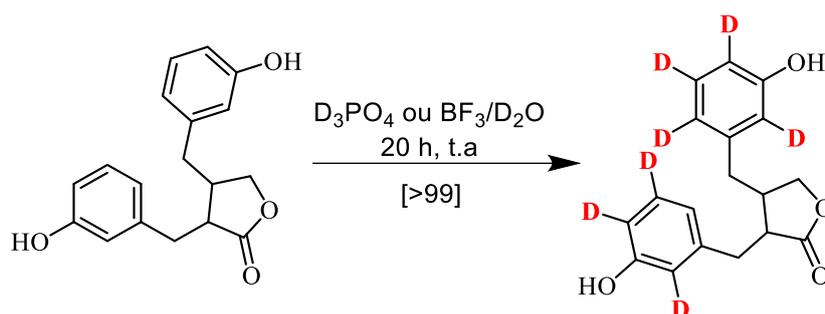


Figura 50. Troca H/D catalisada por ácido em D_2O do polifenol enterolactona.¹⁵³

Por fim, ainda na categoria dependente do pH, há a catálise básica. A troca ocorre através dos átomos de hidrogênios ácidos por deutério por meio de equilíbrio cetoenol, especialmente em compostos carbonílicos como cetonas, ácidos carboxílicos, aldeídos, ésteres e outros substratos com hidrogênios ácidos, como aminas e alcinos. Geralmente, usam-se bases fortes, como KOD , $NaOD$ em D_2O ou CD_3OD como solvente.¹⁵⁴ Os átomos de hidrogênio γ em cetonas α,β -insaturadas também são acessíveis para troca isotópica por meio de conjugação, como foi demonstrado na estrutura esteróide da androstenediona (Figura 51), estrutura semelhante ao fármaco betametasona deuterado nesta tese.^{119,120,120,121}

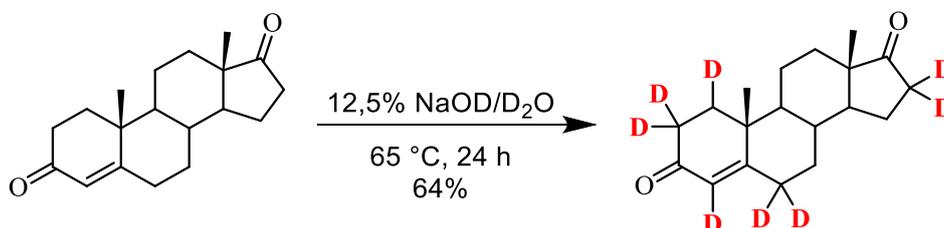


Figura 51. Troca H/D catalisada por base em D_2O da androstenediona.

A incorporação de deutério é mais desafiadora em solventes apróticos, como $CDCl_3$, em comparação com solventes polares próticos, principalmente devido à baixa basicidade nesse tipo de solvente. O $CDCl_3$ é reconhecido como um solvente que não facilita trocas isotópicas.

Entretanto, seu uso como fonte de deutério seria vantajoso para a deuteração de substratos sensíveis e/ou menos solúveis em D₂O.¹⁵⁵

Neste contexto, este estudo propõe realizar a deuteração de fármacos em CDCl₃ sob condições suaves, levando em conta a sensibilidade desses compostos à temperatura e utilizando líquidos iônicos como catalisadores da reação.

Líquidos iônicos são constituídos exclusivamente por íons, incluindo um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico. Destacam-se por sua estrutura iônica, que proporciona baixa pressão de vapor, ampla estabilidade eletroquímica, alta condutividade elétrica e boa estabilidade térmica e química. Essas características tornam os líquidos iônicos materiais versáteis e ajustáveis sinteticamente para diversas aplicações industriais e tecnológicas, como síntese catalítica, armazenamento de energia em baterias, processos de separação e utilização como solventes verdes em práticas químicas sustentáveis.^{145,156–159}

Na literatura, tem sido amplamente discutido que os prótons do anel imidazólio são propensos à troca H/D em vários solventes próticos e em uma variedade de líquidos iônicos, na presença de bases, ácidos de Lewis ou metais. No estudo de Giernoth e Bankmann (2008),¹⁶⁰ foi avaliada a troca H/D em diferentes condições reacionais, conforme observado na Figura 52. A posição C2 do anel imidazólio é facilmente desprotonada, e a troca H/D ocorre sem a necessidade de utilizar base; entretanto, para a deuteração nas posições C4 e C5, a adição de uma base é essencial.^{160,161}

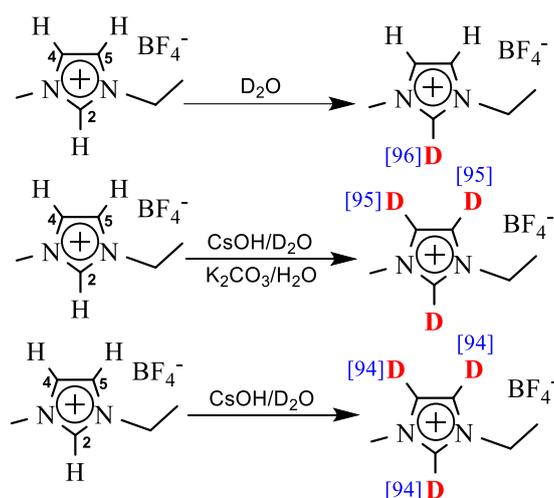


Figura 52. Síntese de sais de imidazólio parcialmente deutерados. Os números em azul indicam a porcentagem de deuteração alcançada.

Diante dessa perspectiva, nosso grupo de pesquisa realizou um extenso trabalho com uma ampla variedade de líquidos iônicos (LI), alguns inéditos, para não apenas avaliar a suscetibilidade de troca H/D, mas também compreender o mecanismo dessa troca, utilizando diferentes fontes de deutério, como DMSO, D₂O, CDCl₃, CD₃OD e na ausência de base. Além da extensa variedade de líquidos iônicos, outro diferencial foi a análise da troca na posição C2 do imidazólio substituído por um grupo metila. A partir de experimentos de NOESY, HOESY e cálculos teóricos, foi possível elucidar o mecanismo de troca H/D nos líquidos iônicos suscetíveis a essa substituição. Portanto, observando o mecanismo reacional, acreditou-se que o LI poderia atuar como catalisador para a deuteração de outros substratos contendo hidrogênios ácidos. Os substratos escolhidos foram alcinos e cetonas. Diante dos bons resultados obtidos na deuteração desses substratos partimos para a aplicação dos LIs na deuteração de fármacos.^{37,37}

2.2.2 Cinética de reações

Os métodos cinéticos são fundamentais para investigar mecanismos de reações, estabelecendo uma expressão matemática para a taxa da reação que pode descrever o sistema em qualquer momento. A descrição das leis de velocidade das reações é alcançada pela solução de equações diferenciais, as quais indicam a concentração de qualquer espécie presente no sistema reacional em qualquer momento após o início da reação. Além disso, as leis de velocidade proporcionam compreensão sobre as etapas elementares da reação e seu mecanismo. Em alguns casos, a lei de velocidade pode ser determinada empiricamente por meio da correlação de dados experimentais.¹⁶²

Podemos estabelecer genericamente que a velocidade instantânea de uma reação química é determinada pela taxa de variação (derivada) da concentração do reagente (R) ou da formação do produto (P) em função do tempo, de acordo com a Equação 13:¹⁶²⁻¹⁶⁵

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} \quad \text{Equação 13}$$

Para uma reação $aA + bB \rightarrow cC$, a velocidade da reação (Equação 14) é proporcional ao produto das concentrações dos reagentes elevadas aos seus respectivos coeficientes estequiométricos a e b multiplicados pela constante de velocidade (k), que depende da temperatura do sistema. A lei da velocidade pode ser expressa como:

$$v = k [A]^m [B]^n \quad \text{Equação 14}$$

A lei de velocidade de uma reação é determinada experimentalmente e geralmente não pode ser deduzida diretamente da equação química da reação (Equação 12). A aplicação prática

da lei de velocidade reside no fato de que a previsão da taxa de progresso da reação depende do conhecimento da composição da mistura reacional. Isso permite calcular a taxa em qualquer momento e serve como guia para a investigação do mecanismo da reação, pois ambos devem ser consistentes entre si. Portanto, considerando cada reagente separadamente, podemos estabelecer uma relação entre a velocidade de consumo do reagente A e a sua concentração, conforme indicado pela Equação 15, onde a velocidade de consumo é proporcional a uma potência da concentração de A, multiplicada por uma constante k .¹⁶³

$$-\frac{d[R]}{dt} = k [A]^a \quad \text{Equação 15}$$

O método das velocidades iniciais é um dos três métodos utilizados para determinar a ordem de uma reação química. Ele consiste na aplicação do logaritmo natural de ambos os lados da Equação 15 da lei de velocidade, o que gera um gráfico linear. Neste gráfico, o coeficiente angular da reta obtida representa a ordem da reação. Esse método é vantajoso porque permite determinar ordens de reações fracionárias de reação, além de ser relativamente simples de aplicar.

O método de isolamento é outro método útil para determinar a ordem de reação. Ele simplifica a lei da velocidade ao considerar que a concentração de todos os reagentes, exceto um, está em excesso. Assim, varia-se apenas a concentração desse reagente isolado (denominado reagente A). Supondo que o reagente B esteja em excesso e sua concentração permaneça constante ao longo da reação, a equação da lei de velocidade pode ser simplificada para (Equação 16):¹⁶³

$$v = k'[A] \quad k' = k [B]_0 \quad \text{Equação 16}$$

Se considerarmos o método de isolamento assume-se, nesse caso, que a lei de velocidade é de pseudoprimeira ordem.¹⁶³

O último método é o método da integral, neste caso a Equação 15 é integrada, conforme a dependência com as concentrações dos reagentes. Para obter a confirmação da ordem da reação é necessário plotar um gráfico da integral das equações e o gráfico dos dados experimentais.

Os métodos discutidos anteriormente não levam em consideração a possibilidade de reações inversa ou em pré equilíbrio. Para investigar essas reações, algumas observações

precisam ser consideradas. Seja uma reação $A \xrightleftharpoons[k']{k} B$, a velocidade de cada reação é dada

por (Equação 17). Para facilitar as deduções consideramos que a reação prossegue via cinética de primeira ordem em ambas as direções.^{163,166,167}

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = k[A] - k'[B] \quad \text{Equação 17}$$

Se a concentração inicial de A for $[A]_0$ e a de B for nula, assume-se que $[A] + [B] = [A]_0$ em qualquer instante da reação. Deste modo, a Equação 18 se torna:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A] - k'[B] = k[A] - k'([A]_0 - [A]) = (k - k')[A] - k'[A]_0 \quad \text{Equação 18}$$

Rearranjando e integrando a equação, chega-se à Equação 19:

$$-\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{(k + k')[A] - k'[A]_0} = \int_0^t dt \quad \text{Equação 19}$$

$$[A] = \frac{[A]_0(k' + ke^{-(k+k')t})}{(k + k')}$$

Se k , k' e $[A]_0$ forem conhecidos, então $[A]$ pode ser calculado para qualquer instante após o início da reação. Em equilíbrio (ou seja, quando $t \rightarrow \infty$) então, podem ser representadas pelas Equações 20.

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]_{eq} - k'[B]_{eq} \rightarrow 0 \quad \text{Equação 20}$$

$$k[A]_{eq} = k'[B]_{eq}$$

Se $t = \infty$

$$k[A]_{eq} = k'[A]_0 - k'[A]_{eq}$$

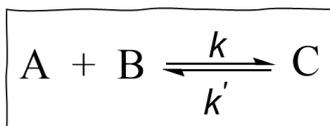
$$\frac{k'}{k + k'}[A]_0 = [A]_{eq}$$

$$\frac{k}{k + k'}[A]_0 = [B]_{eq} = [A]_0 - [A]_{eq}$$

Portanto se admitirmos que no equilíbrio $K=1$ temos a constante de equilíbrio da reação que pode ser expressa por Equação 21.

$$K = \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = \frac{k}{k'} \quad \text{Equação 21}$$

Para reações em equilíbrio em que a reação direta é de segunda ordem e a inversa é de primeira ordem podemos estabelecer que (Equação 22):



$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][B] - k'[C] \quad \text{Equação 22}$$

Reações reversíveis de segunda ordem são mais complexas de resolver, por isso, essas reações são frequentemente conduzidas sob condições aproximadas de primeira ordem, nas quais, por exemplo, a concentração de B é fixada e considerada $[B] = \text{constante}$.¹⁶³

2.2.3 RMN em análises de interações proteínas-fármaco

Existem vários métodos para o estudo de interação de proteínas com ligantes, como a difração de raios X¹⁶⁸ e/ou cálculos matemáticos.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ No entanto, ambas as opções são onerosas e, no caso da difração de raios X, a obtenção de cristais pode ser inviável após a interação de alguns fármacos com a proteína.

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica poderosa que vai além da elucidação estrutural de moléculas orgânicas. Dentro do escopo da RMN, há uma variedade de experimentos que podem ser realizados. Entre eles, destacam-se os experimentos de DOSY, discutidos no primeiro capítulo desta tese. Além disso, existem experimentos que permitem obter informações conformacionais das moléculas, como os experimentos de NOE (Efeito *Overhauser* Nuclear) e o experimento denominado STD (*Saturation Transfer Difference*), que fornecem resultados sobre as interações de um ligante com uma proteína. O STD é amplamente utilizado no estudo da interação de candidatos a fármacos, pois permite obter informações sobre os sítios de interação da molécula com a macromolécula.¹⁷²⁻¹⁷⁶

Para os estudos de interação, a proteína HSA (Albumina Sérica Humana) é a mais empregada. Ela consiste em uma única cadeia polipeptídica de 585 resíduos de aminoácidos (massa molecular aproximada de 66,5 kDa). É a proteína mais abundante no plasma sanguíneo e desempenha inúmeras funções fisiológicas, como o controle da pressão osmótica, o pH do sangue e o transporte de substâncias endógenas ou exógenas..^{177,178} Nosso interesse é utilizar a técnica de RMN denominada STD para avaliar a interação do fármaco deuterado e não deuterado com a proteína HSA, uma vez que esta proteína desempenha um papel fundamental no transporte e na farmacocinética de medicamentos.

Os experimentos de STD foi inicialmente desenvolvida para investigar a interação de pequenos fármacos com macromoléculas biológicas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos. Uma de suas principais vantagens é a capacidade de detectar interações fracas com alta sensibilidade.¹⁷⁹

Como o próprio nome sugere, a técnica consiste na diferença entre dois experimentos. No primeiro experimento ("*on-resonance*"), satura-se a proteína (o receptor) via um trem de pulsos seletivos de rádio frequência (RF). Esses pulsos são aplicados na frequência do receptor e não do ligante, geralmente as proteínas são irradiadas em torno de -1,00 ppm, pois normalmente os ligantes não possuem sinais nessa frequência, mas as proteínas sim. A saturação se propaga através dos hidrogênios da proteína por meio de uma rede de interações dipolares intramoleculares (difusão de spin). A saturação é então transferida às moléculas ligadas via relaxação cruzada intermolecular para a interface proteína-ligante. As pequenas moléculas se dissociam do receptor, mas permanecem em um estado "saturado" devido aos seus longos tempos de relaxação T1 quando livres (Figura 53).

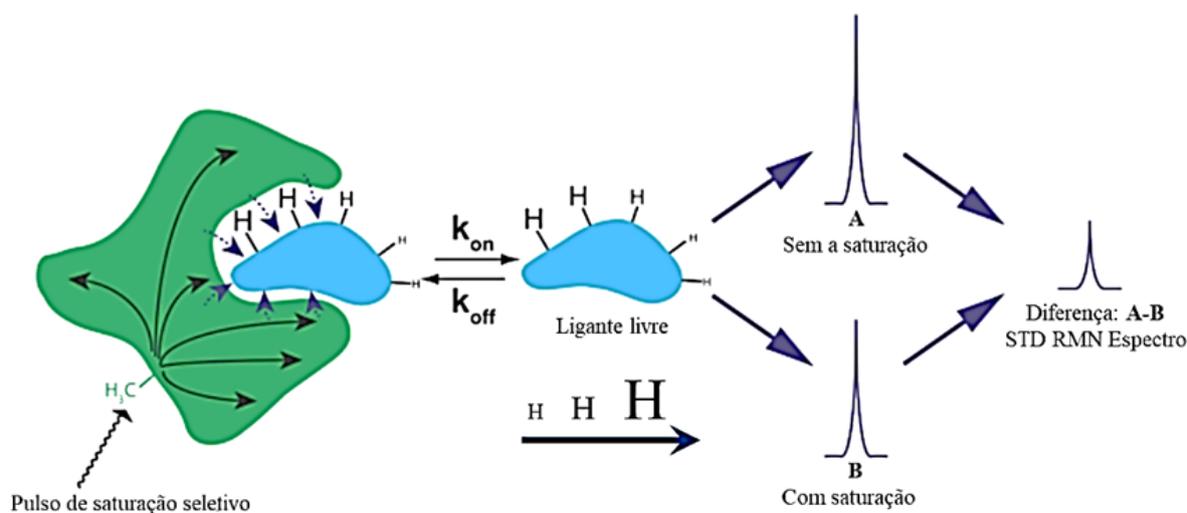


Figura 53. Ilustração do mapeamento dos grupos do epítipo (*Group Epitope Mapping - GEM*) para dada interação proteína-ligante em uma troca rápida entre ligante livre e complexado. Os grupos representados por um átomo de hidrogênio grande (H) estão em contato mais próximo com a proteína, enquanto os hidrogênios de tamanho mediano simbolizam grupos com menor interação. Os H menores representam um grupo com quase nenhum contato com a proteína, recebendo saturação mínima (Figura adaptada).¹⁷⁹

No segundo experimento ("*off-resonance*"), um trem de pulso de RF idêntico ao primeiro é aplicado fora da faixa de ressonância dos núcleos dos ligantes e da proteína. A subtração desses dois experimentos resulta em um espectro com sinais do ligante.¹⁸⁰⁻¹⁸³

Além disso, o grau de saturação dos hidrogênios das moléculas de ligantes menores reflete a proximidade destes com a superfície da proteína. Quanto maior a saturação observada em um determinado hidrogênio do ligante, mais próximo este hidrogênio está da superfície da proteína. Informações detalhadas sobre a interação podem ser obtidas rápida e facilmente com esta técnica, que requer apenas uma pequena quantidade de proteína não marcada isotopicamente. A técnica de STD-NMR é, portanto, extremamente útil para estudos de interação proteína-ligante, especialmente em contextos de descoberta de fármacos, onde a determinação rápida e precisa dos sítios de ligação e da afinidade dos ligantes é crucial para o desenvolvimento de novos medicamentos.¹⁸⁴⁻¹⁸⁸

2.3 Metodologia experimental

2.3.1 Preparo do líquido iônico

O processo de síntese dos LIs BMMI.Im e BMMI.Pro teve início com a preparação do sal de cloreto 1-ⁿbutil 2,3-dimetilimidazólio (BMMI.Cl). Inicialmente, 80 mL de tolueno foi adicionado em um frasco, juntamente com alquillimidazol (1,2-dimetilimidazol) e cloreto de *n*-butila em uma proporção de 1:1,2. A mistura de reação foi então aquecida em refluxo e agitada por 24 horas sob atmosfera inerte. Após isso, o tolueno foi removido por rotaevaporação, e o produto foi purificado e recristalizado usando acetonitrila. Em seguida, a troca iônica foi realizada com resina de troca de ânion (forma de hidróxido de Ambersep 900). Soluções aquosas de BMMI.Cl (0,1 mol.L⁻¹) foram preparadas e passadas através da coluna contendo a resina, facilitando a troca do halogênio por hidróxido. As soluções resultantes foram combinadas com prolinato e ácidos imidazólio em proporções equimolares. As misturas foram então agitadas e concentradas usando um evaporador rotativo. Por fim, os produtos obtidos foram caracterizados utilizando espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C. (Anexos 19-22).

2.3.2 Síntese dos IFAs deuterados

A síntese dos compostos deuterados envolveu apenas uma etapa, inicialmente, foi adicionado 0,5 mL de CDCl₃, e posteriormente, simultaneamente, os catalisadores BMMI.Pro ou BMMI.Im na concentração de 20% mol.L⁻¹ em relação à concentração dos IFAs. As concentrações dos IFAs foram variadas em 0,2 mol, 0,1 mol e 0,05 mol. A solução foi transferida para um tubo de RMN mantido à temperatura ambiente (25 °C). As análises de RMN de ¹H foram realizadas imediatamente e monitoradas por 24 horas. Para os experimentos que variavam a temperatura, foram utilizados 0,25 mol.L⁻¹ do composto flunitrazepam e 0,06 mol.L⁻¹ de BMMI.Pro. A temperatura do experimento foi variada entre 20 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C. Para cada temperatura, a reações foi acompanhada por 24 horas.

2.3.3 Materiais e equipamentos

Os Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram conduzidos em dois espectrômetros Bruker AVANCE III. Um deles operando em 9,4 Tesla (400 MHz para núcleo ¹H e 100 MHz para núcleo de ¹³C, respectivamente), equipado com uma sonda BBI (Broadband Inverse Detection), enquanto o segundo opera a 14,1 Tesla (600 MHz para núcleo ¹H e 150 MHz para o núcleo de ¹³C, respectivamente), com um crioprobe TCI (Triple Channel Inverse). Os espectros foram adquiridos a temperatura de 25 °C, utilizando a sequência de pulso zg2d (nomenclatura da Bruker) para os experimentos de estudos cinéticos, com o número de

acumulações definidas para 16, d1 (tempo de reciclagem da sequência de pulso) a 1s, e ganho do receptor definido para 64. Os deslocamentos químicos foram relatados em partes por milhão (ppm, δ) e referenciados a picos de solvente: CDCl_3 (7,23 em ^1H e 77,0 em ^{13}C). O CDCl_3 comercial foi utilizado.

2.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN): STD-RMN

Para os experimentos de STD-RMN, a solução de HSA (albumina sérica humana) liofilizada obtida comercialmente da Sigma Aldrich foi preparada a partir de uma solução estoque do tampão fosfato à $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em água deuterada (D_2O), contendo o ácido trimetilsilil-2,2,3,3- d_4 -propionato de sódio ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$). A solução estoque do tampão fosfato foi preparada pela mistura de volumes iguais das soluções aquosa de K_2HPO_4 a ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e KH_2PO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) em D_2O . O pH da solução estoque foi ajustado a 7,4 utilizando uma solução de ácido clorídrico e solução básica de hidróxido de sódio. A massa de 0,0215g do padrão interno, o ácido trimetilsilil-2,2,3,3- d_4 -propionato de sódio, foi pesada e diluída na solução estoque do tampão fosfato. Nos experimentos de STD, as amostras foram preparadas na razão molar proteína/ligante correspondente de 1:20, em $500 \mu\text{L}$ de D_2O . Os experimentos de STD-RMN foram realizados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em um espectrômetro Bruker Avance III 600 MHz para núcleos de hidrogênio, usando uma relação molar de 1:20 de HSA versus molécula de FLU e FLU-D. A irradiação seletiva (saturação) da HSA foi obtida utilizando uma frequência de -332 Hz (-0,5 ppm) (em ressonância). Por outro lado, o experimento fora de ressonância foi realizado escolhendo uma frequência de 30,000 Hz (50 ppm). A curva STD de saturação foi adquirida variando o tempo de saturação entre 0,1, 0,25, 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0 e 10 segundos, obtendo um total de 18 experimentos. Para determinar a constante de dissociação aparente (K_d) realizamos 10 experimentos variando a concentração do ligante em $0,4 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $0,6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $0,8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e o tempo de saturação de 1,0 segundos.

2.4 Resultados e discussão

Primeiramente, obtivemos os espectros de RMN na ausência de LIs para os compostos flunitrazepam (**1**), dipropionato de betametasona (**2**), e oxcarbazepina (**3**), (Anexos 23-30). Em seguida, avaliamos a capacidade dos LIs BMMI.Pro e BMMI.Im em fornecer deutério para esses compostos. As concentrações de catalisadores e compostos foram fixadas, conforme detalhado na Tabela 5, utilizando a condição previamente otimizada de 20 mol% do catalisador em relação ao substrato, à temperatura ambiente (25 °C). No entanto, a solubilidade em CDCl_3 foi um fator limitante para a concentração do composto (**3**).

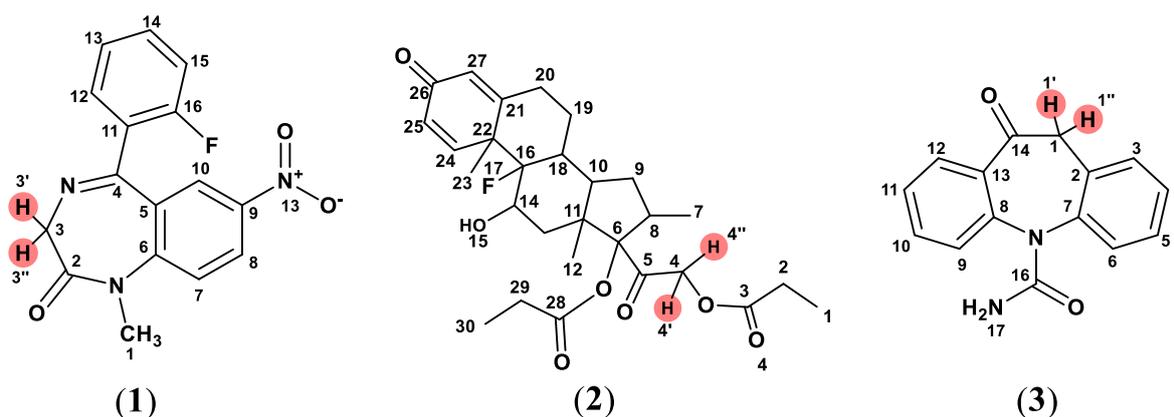


Figura 54. Estruturas moleculares dos IFAs deste estudo para a reação de troca H/D, incluem o flunitrazepam (**1**), dipropionato de betametasona (**2**), e oxcarbazepina (**3**)

Para a deuteração do composto (**1**) com BMMI.Im (entrada 1), alcançamos uma deuteração de 99% da molécula nas primeiras 2 h; no entanto, observamos a formação de produtos secundários (Anexo 31). No caso do composto (**2**) (entrada 2), além da ausência de troca, também observamos a formação de produtos secundários (Anexo 32). Por fim, para o composto (**3**) (entrada 3), notamos uma mudança instantânea na cor, indicando a formação de produtos de degradação. Os resultados desfavoráveis para o BMMI.Im nos levaram a investigar a capacidade do BMMI.Pro em catalisar reações de deuteração nos compostos (**1**), (**2**) e (**3**).

Com o BMMI.Pro como catalisador, todos os compostos foram eficientemente deutерados (entradas 4-6), sem a formação de produtos secundários, eliminando assim a necessidade de purificação. Em particular, para o composto (**1**), observamos um rendimento de 94% de rendimento após 24 h.

Tabela 5. Deuteração do flunitrazepam (**1**), dipropionato de betametasona (**2**) e oxcarbazepina (**3**) usando 20 mol% de BMMI.Im e BMMI.Pro catalisador em CDCl_3 .^a

Entrada	BMMI.x	[IFA] (mol.L ⁻¹)	%D ^b (2h) H _x ^{'c}	%D ^b (24h) H _x ^{'c}	% D ^b (2h) H _y ^{''c}	% D ^b (24h) H _y ^{''c}
1	Im	0,2 (1)	>99 ^d	-	>99 ^d	-
2	Im	0,1 (2)	0	-	0	-
3	Im	0,05 (3)	0	-	0	-
4	Pro	0,2 (1)	56	94	58	95
5	Pro	0,1 (2)	6	43	3	19
6	Pro	0,05 (3)	7	26	7	28

^aCondições de reação: temperatura ambiente (25 °C), 20 mol% de BMMI·X, sem agitação, na concentração de 20 mol% de substrato - (0,5 mL de solvente). ^b Determinado por espectroscopia de RMN de ¹H (Figuras 23 e A40–A43).^cGrau de deuteração em posições específicas para (**1**) H3' e H3'';(**2**) H4' e H4'';(**3**) H1'e H1 ". ^dNota: Degradação parcial observada.

A troca de H/D foi avaliada por meio de espectroscopia de RMN ^1H , conforme mostrado na Figura 55. Inicialmente, observamos a troca isotópica da LI com CDCl_3 , evidenciada pela atenuação do sinal do H-7 da metila, originalmente um simpleto em 2,70 ppm, e pelo aparecimento de um tripleto correspondente à forma deuterada CH_2D . Após 2 h (Figura 55b) observa-se apenas um quinteto correspondente às formas deuterada CH_2D e CHD_2 .

O acompanhamento da deuteração de (1) foi realizado observando a diminuição da intensidade dos sinais dos átomos de hidrogênio não equivalente $\text{C}_\alpha\text{H}_2$, anteriormente um duplo duplo em 4,96 ppm e 3,81 ppm. Além disso, a atenuação dos sinais do catalisador e do substrato é acompanhada pelo aumento na intensidade do simpleto em 7,23 ppm, referente à espécie CHCl_3 , fornecendo evidências adicionais da reação.

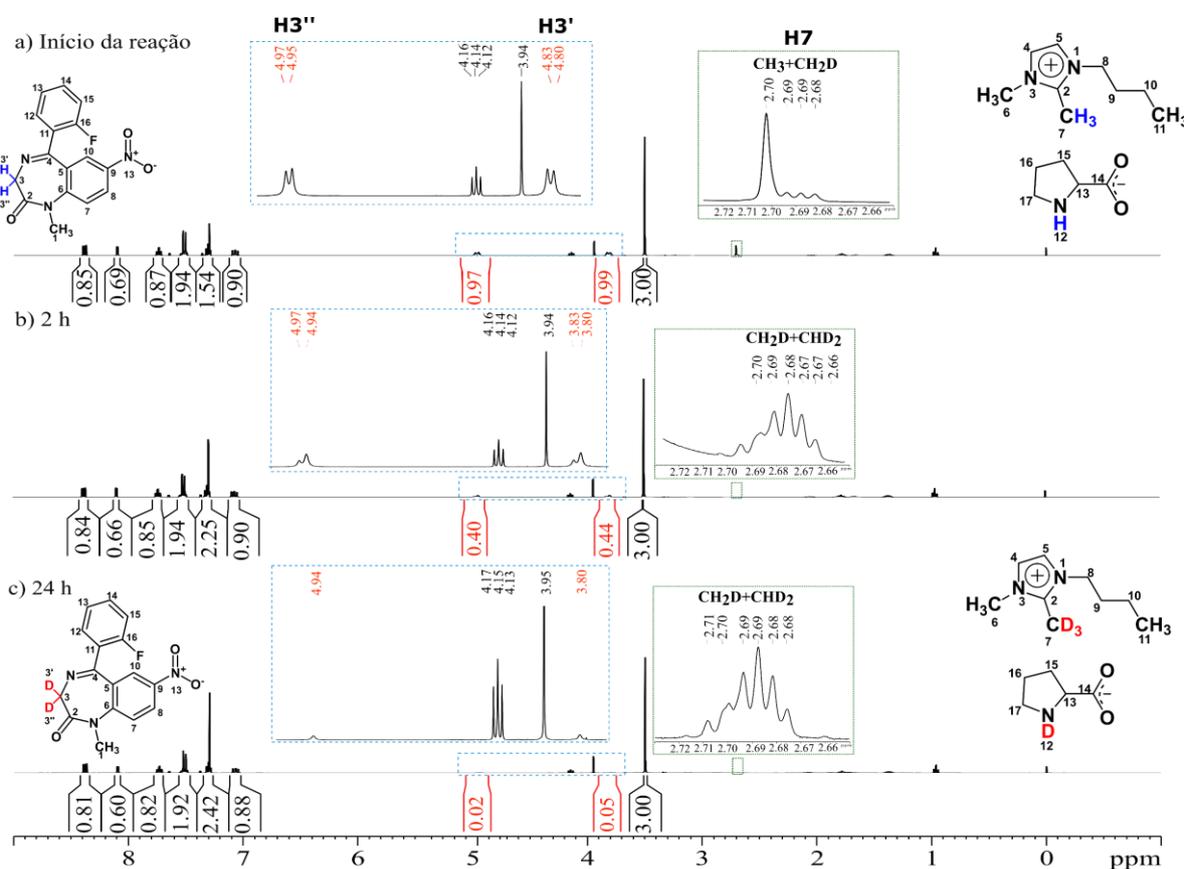


Figura 55. Espectro RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, CDCl_3) de (1) deuterado com BMMI.Pro: (a) estado inicial, (b) 2 h após início da reação, e (c) 24 h após início da reação (consultar a Tabela 1, entrada 4).

Apesar de o composto (2) possuir três hidrogênios alfa carbonílicos, a deuteração ocorreu exclusivamente nos dois hidrogênios mais ácidos da molécula, localizados entre o grupo carbonílico e o éster. Notavelmente, a deuteração desses dois hidrogênios não ocorreu simetricamente, como mostrado na Figura 56.

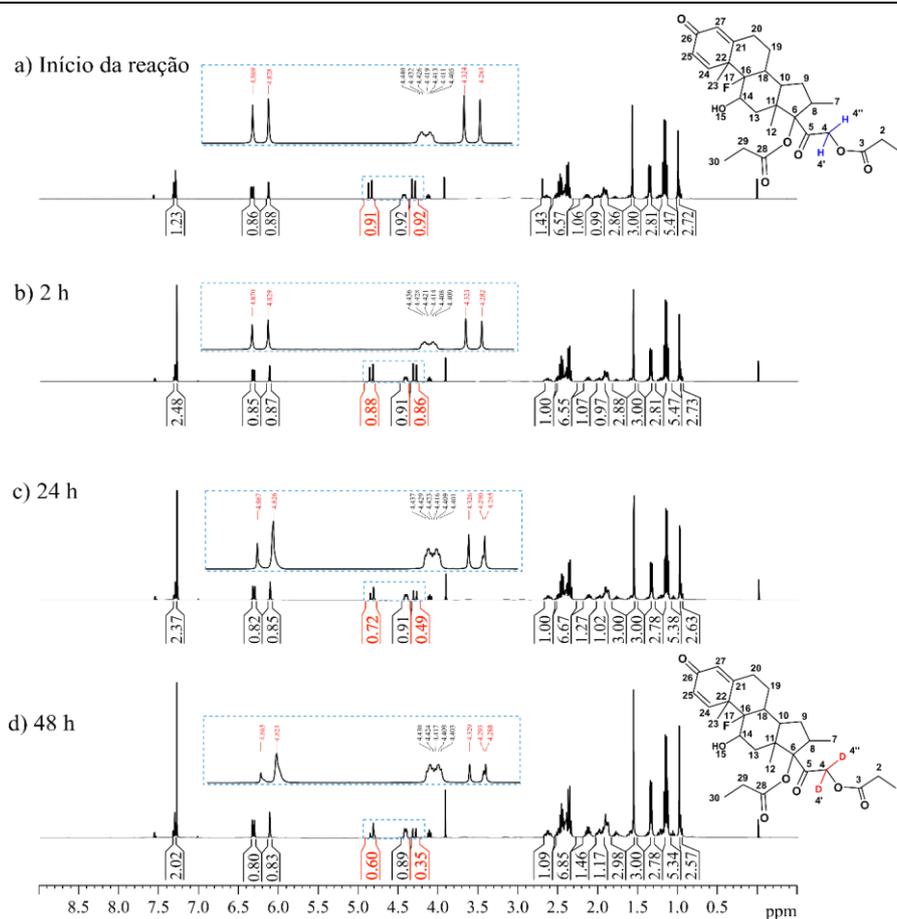


Figura 56. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, CDCl_3) de (2) deuterado com BMMI-Pro. (a) Início da reação. (b) Após 2 horas (Tabela 1, entrada 2). (c) Após 24 horas. (d) Após 48 horas (Tabela 1, Entrada 5).

Como evidenciado na Figura 57, essa assimetria na troca foi observada nos estágios iniciais da reação. Esse fato justificou a extensão e o monitoramento da reação por 48 h, em vez de apenas em 24 h, como realizado para o composto (1).

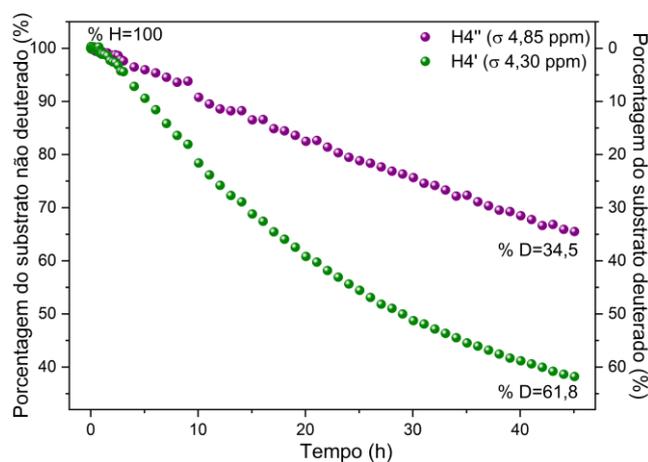


Figura 57. Diferença entre a porcentagem de deuteração de átomos de hidrogênio (H4' e H4'') ao longo do tempo no composto (2). Condições de reação: temperatura de 25 °C, 20 mol% BMMI.Pro, sem agitação, na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de dipropionato debetametasona.

Diante dessa observação, realizamos experimentos unidimensionais de NOE (Efeito nuclear Overhauser)⁷⁴ (Figura 58) para compreender a conformação da molécula. Inicialmente, irradiamos seletivamente os hidrogênios alfa-carbonílicos H4' e H4'', que são os hidrogênios trocáveis. O espectro NOESY 1D mostrado na Figura 58a revela que o H4' está menos impedido, pois não é possível observar nenhuma interação de NOE com hidrogênios vizinhos. Já no caso do H4'' (Figura 58b), observamos interação de NOE com os sinais de H9, H18 e H19, indicando a possibilidade de um impedimento estérico que dificulta a troca isotópica. Para confirmar o impedimento estérico, irradiamos o sinal H9 (Figura 58c) e verificamos a interação com o hidrogênio em 4,85 ppm (H4''). Assim, os resultados do NOE explicam a discrepância observada na troca isotópica entre os dois átomos de hidrogênio. Isso indica a necessidade do emparelhamento do LI com os átomos de hidrogênio trocáveis do substrato, conforme descrito em trabalhos anteriores.^{37,145,189}

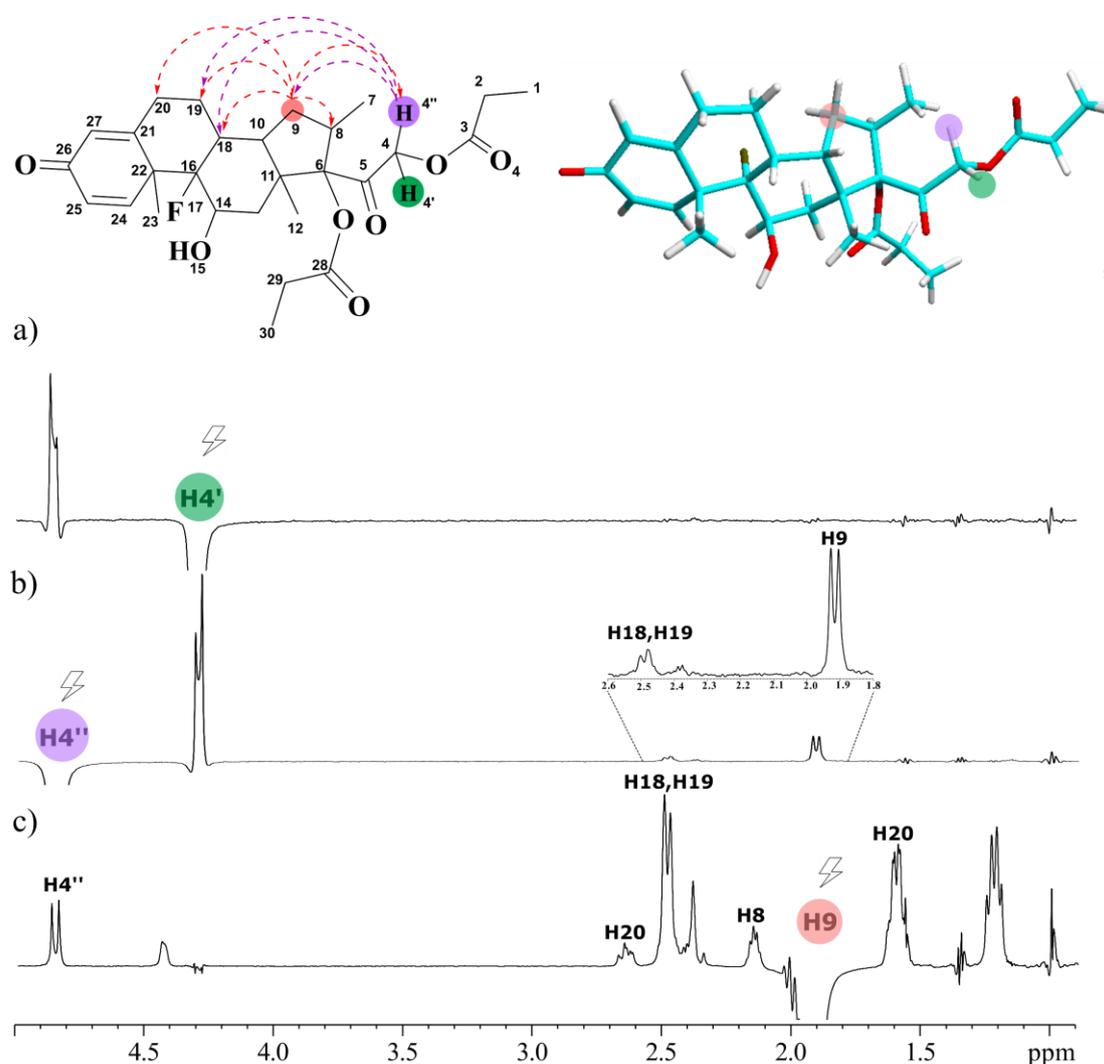


Figura 58. Espectro NOESY de ^1D (600 MHz, CDCl_3) exibindo correlação NOE entre os hidrogênios H4', H4'', e H9 de (2): a) irradiação de sinal de H4'; b) irradiação de sinal de H4''; c) irradiação de sinal de H9 do anel de cinco membros.

Para o composto (**3**), observamos a deuteração exclusivamente nos hidrogênios C α H₂ em 4,45 e 3,84 ppm (Figura 59). No entanto, o rendimento foi inferior (entrada 6) ao obtido para os outros compostos. O fator determinante para o rendimento baixo foi a baixa solubilidade em CDCl₃. Outros solventes polares foram testados, como DMSO e MEOD, mas nenhuma troca H/D foi observada.

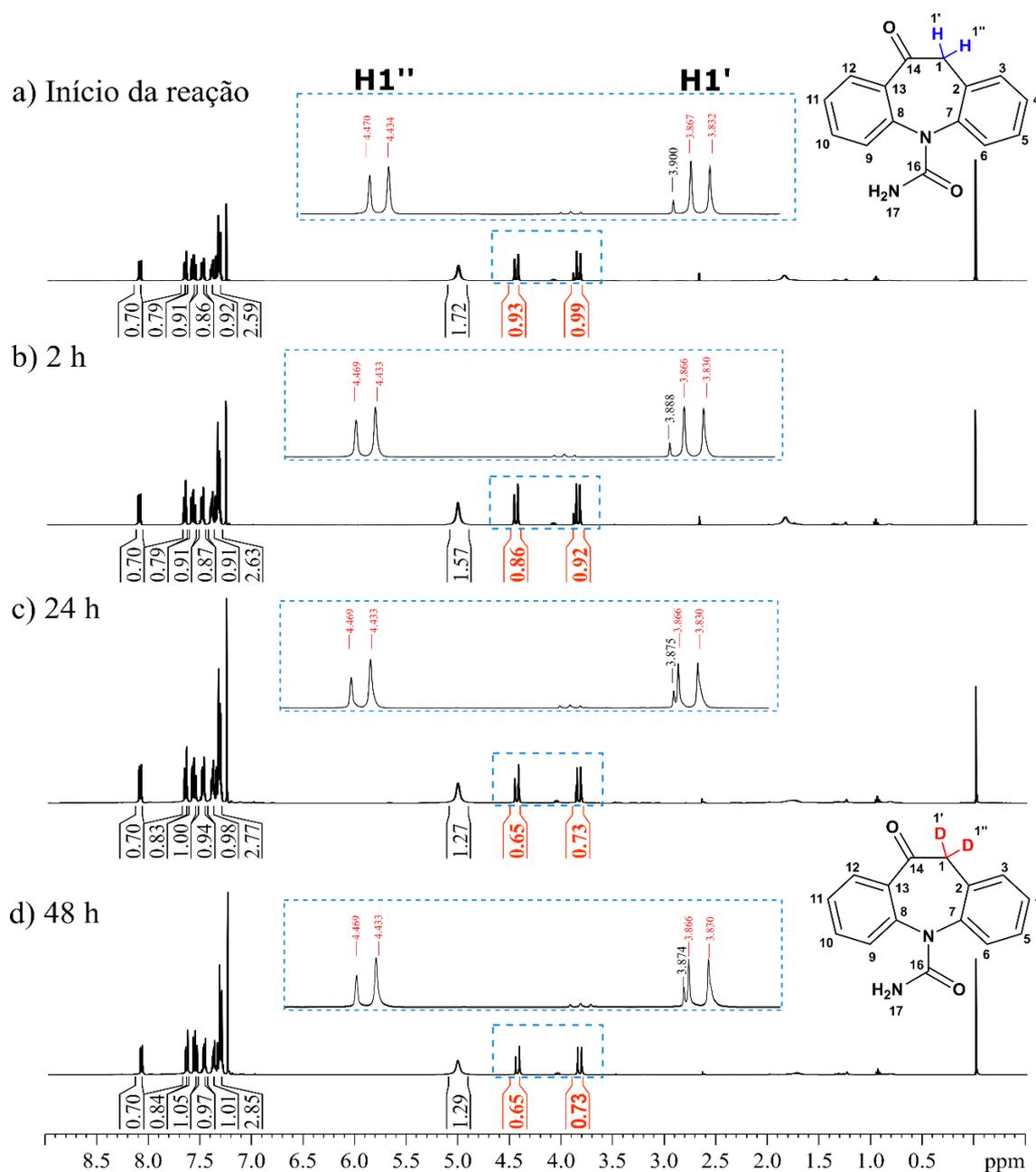
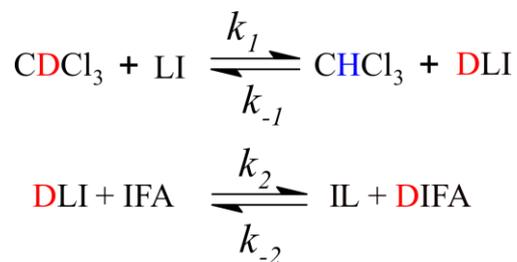


Figura 59. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, 25 °C, CDCl₃) de (**3**) deuturado com BMMI-Pro. (a) Início da reação. (b) Após 2 horas. (c) Após 24 horas (Tabela 1, Entrada 6).

Diante dos resultados promissores para a deuteração de (**1**), realizamos um estudo cinético, essencial para controlar e avaliar as etapas da reação. O progresso da reação foi monitorado utilizando espectroscopia de RMN de ¹H. Com base nos resultados obtidos na fase

inicial deste estudo, observamos resultados semelhantes aos reportados nos trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, o que nos levou a levantar a hipótese de que as etapas de deuteração seguem as etapas resumidas no Esquema 9.³⁷



Esquema 9. Passos da reação de deuteração: Passo 1: geração de Líquido Iônico Deuterado (DLI) (Intermediário); Passo 2: produção de Ingrediente Farmacêutico Ativo Deuterado (DIFA).

No primeiro passo, a espécie cataliticamente ativa do LI é formada. O LI captura deutério do solvente e produz uma forma deuterada do catalisador. Essa reação é rápida e reversível, estabelecendo um equilíbrio entre as constantes de taxa direta (k_1) e inversa (k_{-1}). No segundo passo, o substrato interage com o catalisador ativado para formar um composto deuterado. Esse passo estabelece um equilíbrio entre as constantes de taxa direta (k_2) e inversa (k_{-2}) (Anexo 33),

Para os estudos cinéticos, foram realizados dois conjuntos de experimentos. Inicialmente, a concentração de LI foi variada enquanto a concentração de **(1)** permaneceu constante. Posteriormente, foi realizada a inversão do teste, na qual a concentração de **(1)** foi variada e a concentração LI permaneceu constante. Finalmente, para estudar os parâmetros termodinâmicos de ativação, variamos a temperatura, mantendo constantes as concentrações de LI e do composto **(1)**. Os dados foram coletados continuamente durante a primeira hora, posteriormente, foram coletados dados em intervalos mais longos, estendendo-se até 24 horas de reação e, quando necessário, até 48 horas (Anexo 34).

É importante ressaltar que, para o composto **(2)**, tentamos conduzir um estudo cinético, No entanto, observamos que proporções superiores a 25 mol% do catalisador em relação ao composto levaram à formação de produtos secundários. Além disso, uma redução significativa na proporção do catalisador é impraticável para medições de RMN e pesagem de LI.

Foram gerados gráficos representando a concentração do substrato ao longo do tempo (Figura 60a e 60b). A Figura 60a mostra a dependência da concentração do catalisador na deuteração do composto. Para a menor concentração de catalisador $[\text{LI}] = 0,01 \text{ mol,L}^{-1}$, aproximadamente 48 horas de reação foram necessárias para atingir a conversão máxima do

composto deuterado ($k'_2 \sim 2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Curvas de saturação cinética para ambas as condições ilustram que a reação atinge o equilíbrio, alcançando a conversão máxima em aproximadamente 5 horas ($k'_2 \sim 1,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

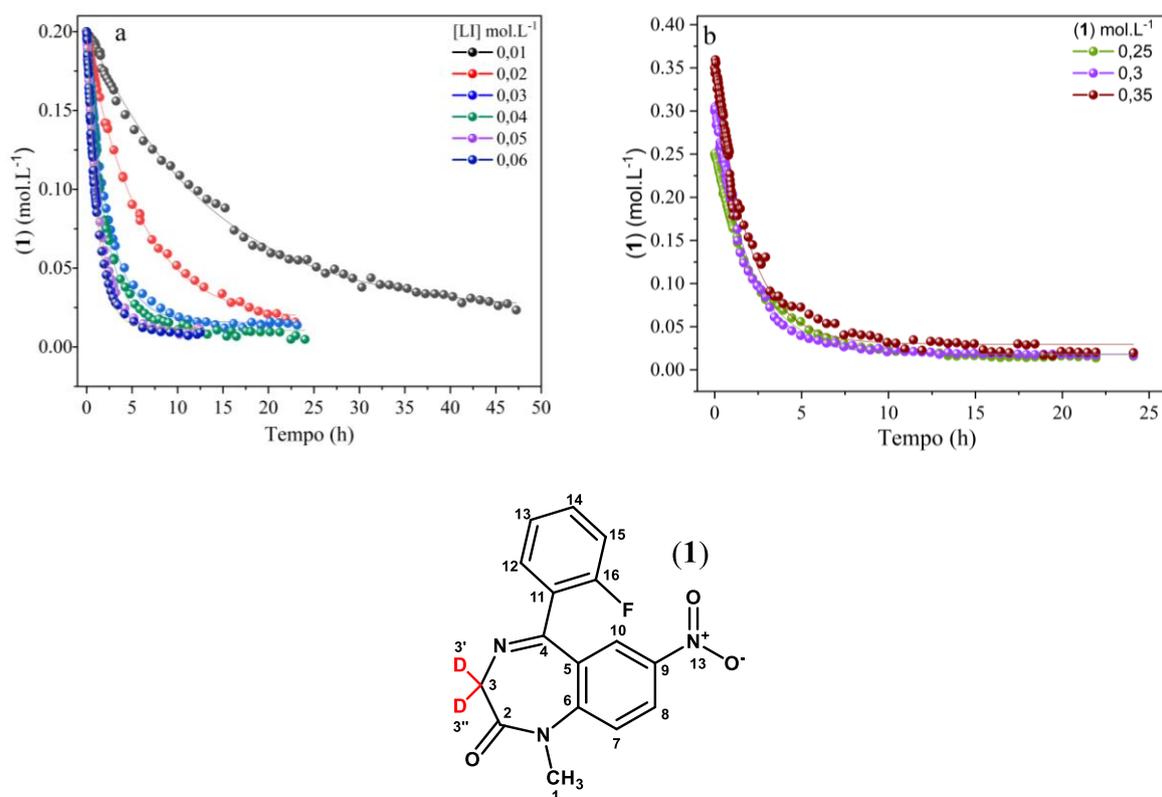


Figura 60. Ambos os gráficos ilustram o consumo de substrato **(1)** pelo tempo para monitoramento da reação de deuteração de **(1)**. **a)** A concentração de **(1)** foi estabelecida como $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e concentrações do catalisador BMMI.Pro foram variadas: 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 mol.L^{-1} . **b)** A concentração de BMMI.Pro ($0,06 \text{ mol.L}^{-1}$) foi mantida constante, ao passo que a concentração de **(1)** foi variada sistematicamente para 0,25, 0,3 e $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$.

Para obter as constantes das reações direta e inversa, os gráficos obtidos foram ajustados usando a equação definida por dos Santos et al.³⁷ A Tabela 6 exibe a equação e os valores das constantes adquiridos para cada concentração de LI. Os valores das constantes aumentaram com a maior concentração de LI. No Anexo 35, são apresentados os valores das constantes em diferentes concentrações de **(1)**, em diferentes concentrações de **(1)**, não foi observada variação significativa nos valores das constantes, com k'_2 permanecendo consistentemente com o valor de $k'_2 = 2,469 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. As constantes de taxa da velocidade da reação (k'_2 e k'_{-2}) foram determinadas usando a condição de pseudo-primeira ordem, dado que há um excesso de substrato em comparação com o LI, $[S] \gg [LI]$, e as concentrações de LI são constantes ($[LI] \approx [DLI]$) desde que a formação de DLI seja observada no início da reação (tempo < 3 minutos).

Tabela 6. Equação derivada para o ajuste cinético e constantes de velocidade direta e inversa em função da concentração de LI e (1).

$$[IFA] = [IFA]_{eq} + \left(\frac{k'_2}{k'_2 + k'_{-2}} \right) IFA_0 e^{-(k'_2 + k'_{-2})t}$$

[LI] (mol.L ⁻¹)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	Variáveis
IFA₀ (mol.L ⁻¹)	0,2325±0,0052x10 ⁻⁴	0,5336±0,0079x10 ⁻⁴	1,305±0,018x10 ⁻⁴	1,476±0,015x10 ⁻⁴	2,092±0,018x10 ⁻⁴	2,469±0,038x10 ⁻⁴	k'₂ (s ⁻¹)
	0,0270±0,0019x10 ⁻⁴	0,0588±0,0029x10 ⁻⁴	0,136±0,0072x10 ⁻⁴	0,1089±0,0010x10 ⁻⁴	0,1538±0,0078x10 ⁻⁴	0,1256±0,016x10 ⁻⁴	k'₋₂ (s ⁻¹)
0,20	0,022 (89%) ^a	0,016 (92%) ^a	0,015 (92,5%) ^a	0,011 (94,5%) ^a	0,012 (94%) ^a	0,012 (94%) ^a	[IFA]_{eq} (mol.L⁻¹)
	8,595	9,074	9,581	13,553	13,602	19,657	K'₂

^aPorcentagem da conversão de deuteração.

Os valores das constantes k'_2 e k'_{-2} podem ser diretamente correlacionados com a concentração de LI. Plotamos as constantes (k'_2 e k'_{-2}) obtidas em diferentes concentrações de LI. A Figura 61 mostra que a cinética da reação de deuteração exibe um comportamento de crescimento linear. A equação cinética (Tabela 6) indica que $k'_2 = k_2[\text{DLI}]$ e $k'_{-2} = k_{-2}[\text{LI}]$. Considerando $[\text{LI}] \approx [\text{DLI}] = [\text{LI}]_0$, a inclinação da linha definida por $k'_2 \times [\text{LI}]_0$ corresponde ao valor da constante de taxa de segunda ordem k_2 ($4,36 \pm 0,25 \times 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). A magnitude de k_2 indica que o LI atuou como um catalisador.

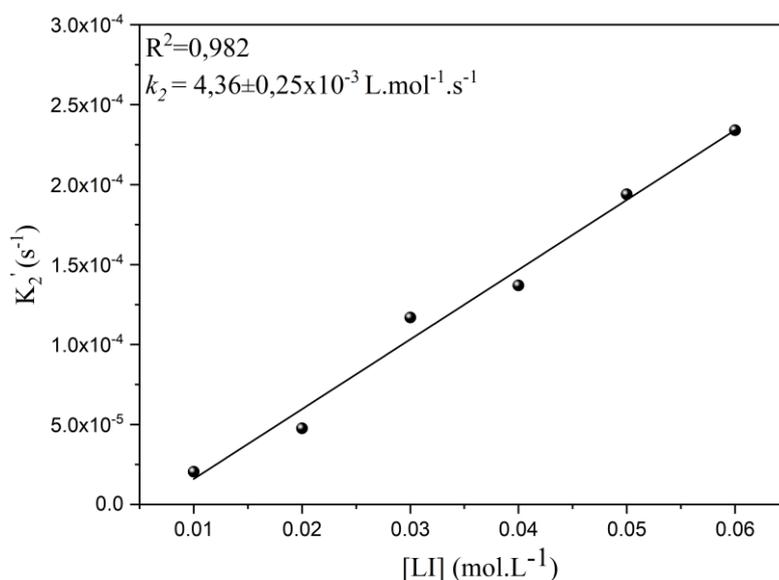


Figura 61. Gráfico mostrando a variação da concentração de [LI] com os valores de k'_2 .

Para obter os parâmetros de ativação, mantivemos as concentrações de LI e (1) constantes e variamos a temperatura. A correlação entre o aumento da temperatura e o aumento em k'_2 é evidente, mostrando que, conforme a temperatura aumenta, a taxa de reação também aumenta (Tabela 7 e Figura 62)

Tabela 7. Parâmetros cinéticos para a deuteração de (1) como função da temperatura ($[\mathbf{1}] = 0,25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $[\text{BMMI.Pro}] = 0,06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em 0,5 mL de CDCl_3).

Temperatura (°C)	k'_2 (s ⁻¹)	k'_{-2} (s ⁻¹)	$[\text{IFA}]_{\text{eq}}$	K'_2
20	$0,2759 \pm 0,0015 \times 10^{-4}$	$0,0368 \pm 0,0098 \times 10^{-4}$	0,026	7,497
30	$0,9670 \pm 0,0242 \times 10^{-4}$	$0,09342 \pm 0,0062 \times 10^{-4}$	0,029	10,351
35	$1,855 \pm 0,050 \times 10^{-4}$	$0,08405 \pm 0,015 \times 10^{-4}$	0,024	22,010
40	$2,524 \pm 0,048 \times 10^{-4}$	$0,0969 \pm 0,016 \times 10^{-4}$	0,013	26,006

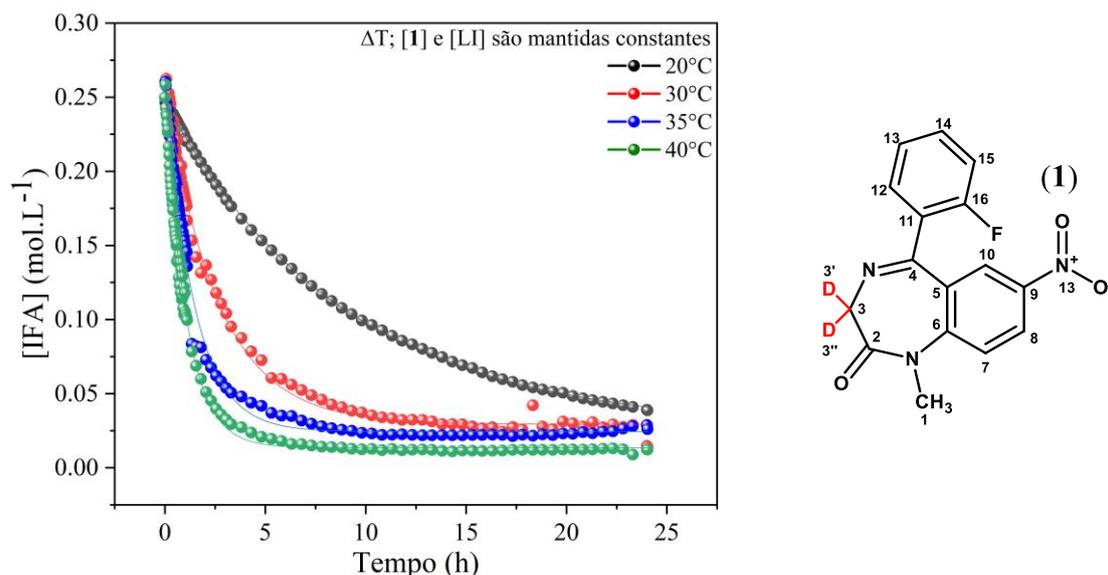


Figura 62. Consumo de substrato (**[1]** vs t) durante reação de deuteração de (**1**) ($0,25 \text{ mol.L}^{-1}$) a temperaturas variadas em CDCl_3 .

Utilizando a equação de Arrhenius (Equação A10 e A11), derivamos parâmetros associados à barreira energética da reação, resultando em $E_a = 20,78 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e o fator pré-exponencial $\log(A) = 10,94$ (Anexo 36).

Aplicando a equação de Eyring, determinamos o valor de $\Delta G^\ddagger = 23,35 \text{ kcal/mol}$ para a temperatura de $303,15 \text{ K}$ (Equação A12). Utilizando a equação de Eyring linearizada (Equação A13) e (Anexo 37), obtivemos $\Delta H^\ddagger = 20,18 \text{ kcal/mol}$, e finalmente, determinamos $\Delta S^\ddagger = -10,43 \text{ cal/mol.K}$ através da equação fundamental (Equação A14).

Estabelecendo a relação entre as equações de Eyring e de Arrhenius (Equação 23 e Equação 24), obtivemos os valores de $\Delta H^\ddagger = 20,18 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta S^\ddagger = -10,48 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$. Esses valores mostraram-se muito próximos aos obtidos na equação de Eyring, sustentando a hipótese de que a troca isotópica H/D evolui em uma etapa determinante de velocidade.³⁶

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad \text{Equação 23}$$

$$\Delta S^\ddagger = 4.576 (\log A - 10.753 - \log T) \quad \text{Equação 24}$$

Tendo estabelecido a cinética da reação de troca isotópica, determinamos as condições ideais para a concentração do catalisador e o tempo de reação com a máxima conversão. Procedemos com uma ampliação em escala de cinco vezes da reação, mantendo a proporção de 20 mol% de BMMI.Pro para (**1**). Nosso objetivo foi o de separar o composto deuturado do LI e avaliar a estabilidade e o rendimento da reação de deuteração. Os passos da síntese são mostrados na Figura 63.

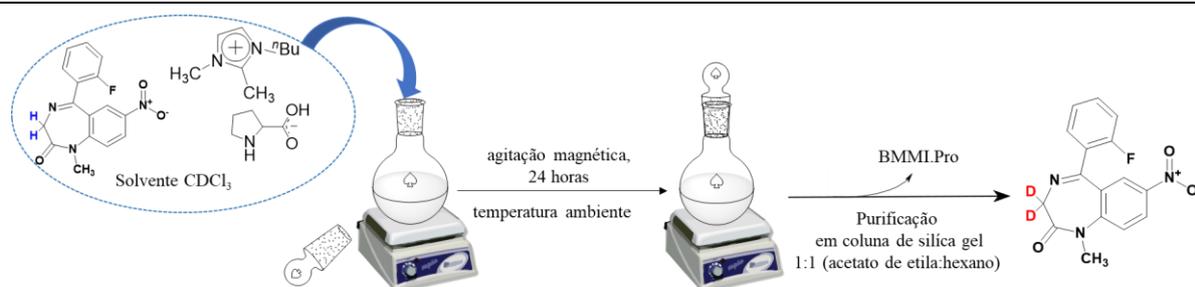


Figura 63. Parâmetros de reação e condições para a troca isotópica H/D do composto **(1)** e isolamento do **(1)** após deuteração em CDCl_3 (0,25 mL, **(1)** = $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $[\text{BMMI.Pro}] = 0,04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Para a síntese preliminar, realizamos a reação por 12 horas, seguida de purificação. Uma alíquota do conteúdo da reação foi retirada, e um espectro de deutério (^2H) foi adquirido antes e depois da purificação (Figura 64). O espectro mostrou que o método de purificação foi eficaz, pois conseguimos remover o catalisador do conteúdo da reação. Sinais de RMN relacionados aos deutérios do composto **(1)** foram observados, confirmando sua estabilidade após a purificação. Notavelmente, por meio da purificação com cromatografia em coluna de gel de sílica, as proporções de solventes foram otimizadas usando cromatografia em camada delgada. A proporção mais eficaz para separar o composto de BMMI,Pro foi encontrada como 1:1 (hexano:acetato de etila).

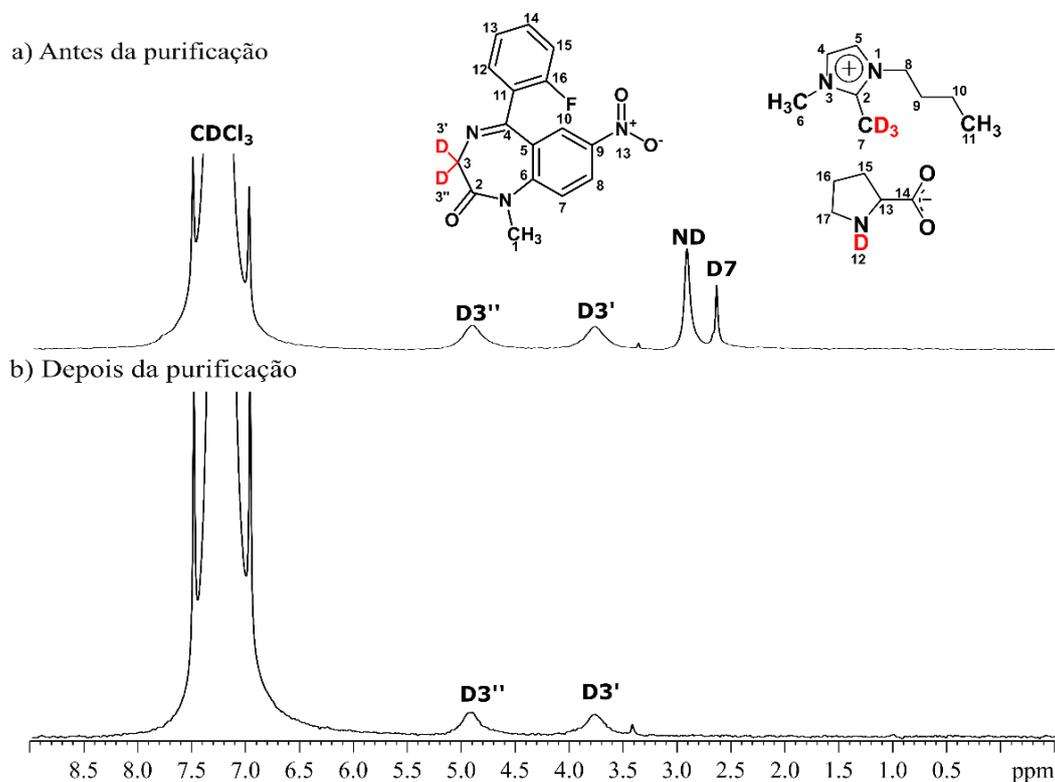


Figura 64. Espectro de RMN de ^2H (61,4 MHz, 25°C) a) **(1)** deuturado com BMMI.Pro; b) somente **(1)** deuturado.

No entanto, após uma reação de 12 horas, a conversão máxima na deuteração do composto não foi alcançada. Portanto, ao prolongar a reação, o tempo de equilíbrio da reação foi afetado. Para alcançar a conversão uma maior conversão do composto para a sua forma deuturada, conduzimos outra reação na qual o tempo de reação foi dobrado. A Figura 65 mostra os espectros de RMN de ^1H de ambas as reações após o processo de purificação. Para a conversão total, foi necessário um tempo de reação de 24 horas.

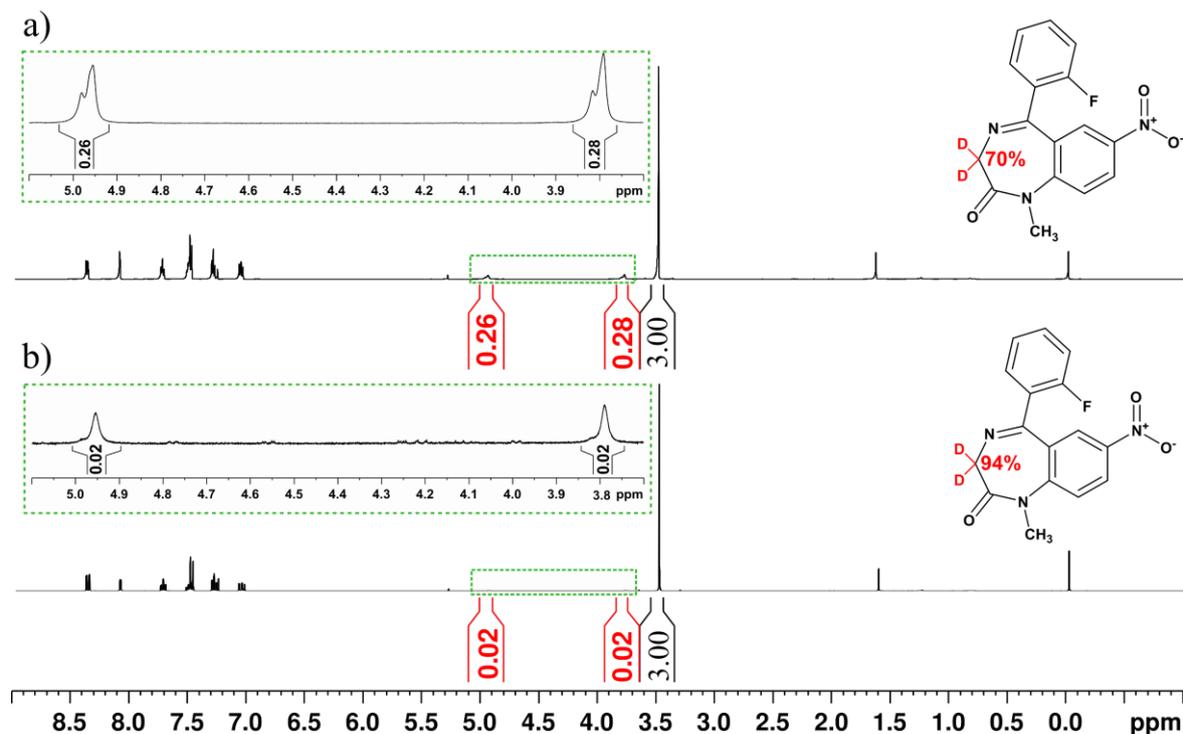


Figura 65. Espectro RMN de ^1H (600 MHz, 298 K, CDCl_3) de (1) deuturado **a)** após 12 horas de síntese, e seguida por purificação, resultando na deuteração de 70%. **b)** Após 24 horas de síntese e seguida por purificação, a deuteração atingiu 94%.

Utilizando o produto isolado, obtivemos espectros de RMN de ^1H , ^2H e ^{13}C e o espectro bidimensional COSY em um instrumento de 600 MHz com sonda criogênica, com o intuito de avaliar a estabilidade, integridade e rendimento da reação (Anexos 38 e 39). O espectro de deutério revelou os sinais de deutério da molécula, enquanto no espectro de ^{13}C (Figura 66) observou-se multiplicidade no sinal do carbono deuturado, devido ao acoplamento com deutério. Tanto o COSY quanto os espectros de ^1H forneceram evidências de que a integridade da molécula foi mantida. Portanto, por meio desses experimentos, isolamos com sucesso a molécula deuturada, garantindo sua estabilidade e alcançando um rendimento de 94%.

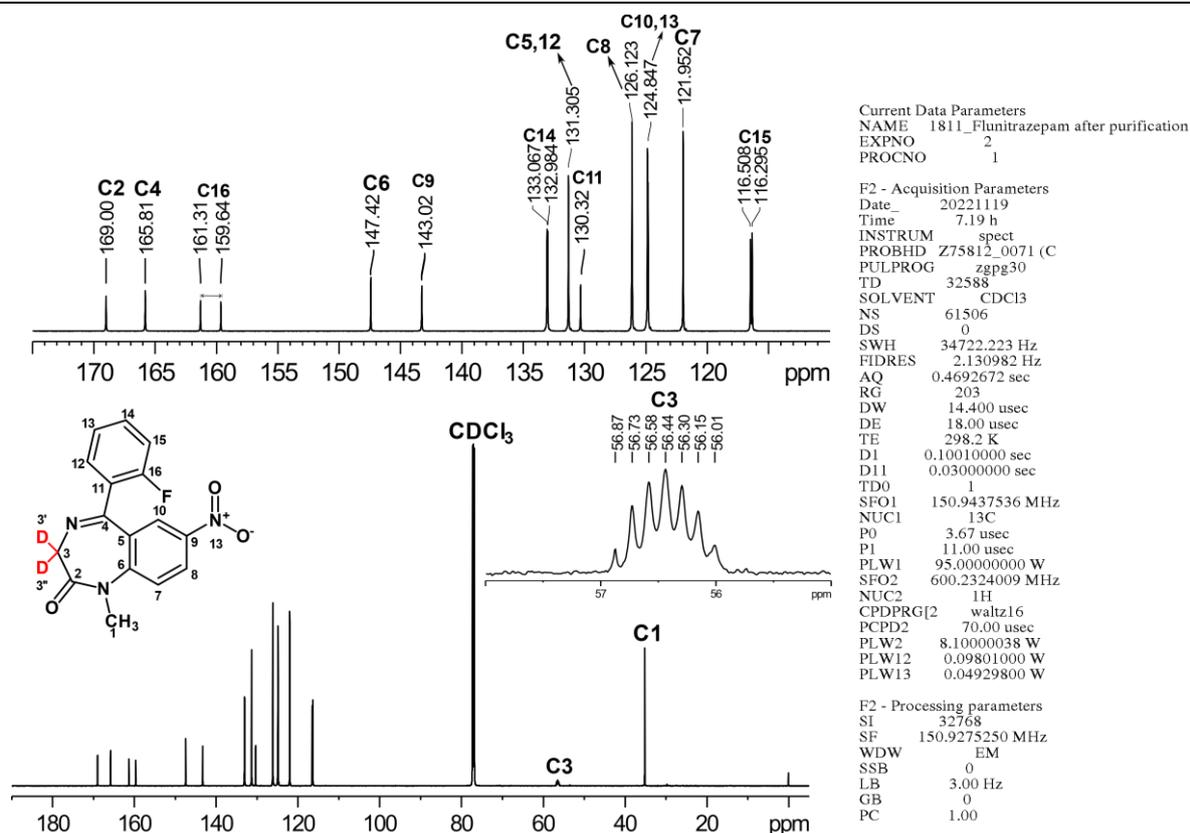


Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (125MHz, 25 °C, CDCl_3) de (1) deuterado e purificado.

Com a molécula deuterada isolada, realizamos um estudo de interação do fármaco flunitrazepam deuterado *versus* não deuterado com a proteína HSA utilizando o método de STD-NMR. Os experimentos de STD foram realizados, variando o tempo de saturação (0,1 a 10,0 s), mantendo constante a concentração do fármaco e da proteína. Em princípio, no experimento de STD, o grau de saturação de um hidrogênio individual de um ligante reflete a proximidade deste à superfície da macromolécula. A partir da área ou intensidade absoluta dos hidrogênios do ligante nos espectros de STD, obtém-se o "*fator STD*" (A_{STD}), Equação 25.

$$A_{STD} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} \quad \text{Equação 25}$$

Na (Figura 67a I) tem-se controle (I_0) e na Figura 67a II o espectro saturado (I_{STD}). Portanto obtemos o "*fator STD*" (A_{STD}) para cada hidrogênios da molécula em cada tempo de saturação, conhecido como mapa de epítipo (Figura 68).

Na Figura 67, também é possível observar as duas moléculas e as porcentagens de interação de cada hidrogênio, obtidas a partir do mapa de epítipo. As diferentes cores indicadas nos hidrogênios da molécula representam diferentes interações, descritas no canto direito da figura. É possível notar que, para ambas as moléculas, a maior interação ocorre entre os

hidrogênios aromáticos e os sítios da macromolécula. A maior diferença de interação entre as moléculas encontra-se nos hidrogênios da metila.

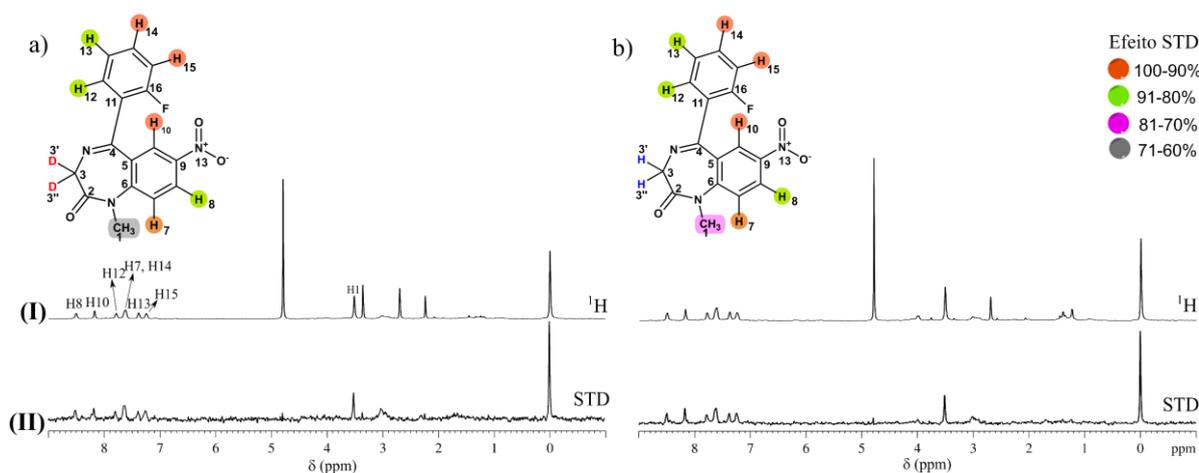


Figura 67. a) Espectros de ^1H e STD-RMN na presença da proteína HSA. Os espectros foram adquiridos na temperatura de 25 °C, com 1,0 s de tempo de saturação, na proporção molar de 1:20 proteína/fármaco. Os sinais dos deslocamentos químicos encontram-se atribuídos no espectro de (I), a porcentagem de saturação de cada hidrogênio é identificada por uma escala de cores. a) STD do composto (1) deuterado b) STD do composto (1) não deuterado.

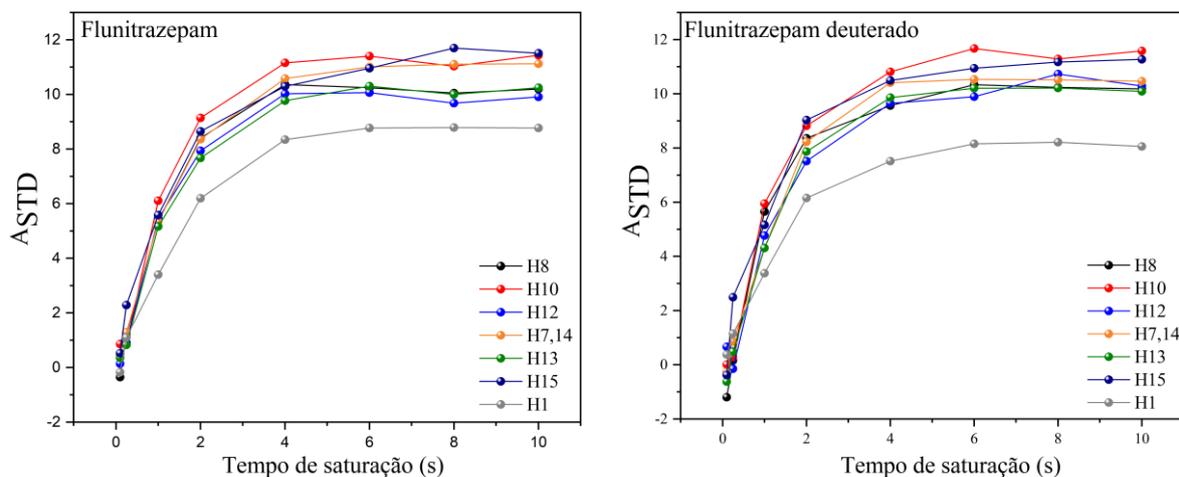


Figura 68. Gráfico "fator STD" (A_{STD}) versus o tempo de saturação de 0,1 à 10 s, comumente chamado de mapa de epítipo.

No mapa de epítipo (Figura 68), foi avaliado que a saturação máxima foi atingida em 1,0 segundo. Portanto, foram realizados experimentos para estimar a constante de dissociação proteína-fármaco (k_D), variando a concentração do ligante enquanto se mantinha constante a concentração da proteína e o tempo de saturação. Em seguida, obteve-se uma curva de ASTD em função da concentração dos fármacos (Figura 69a-d). O valor de k_d foi calculado por meio

do ajuste da curva utilizando um método não linear com uma função do tipo Michaelis-Menten.^{190,191}

Nas Figuras 69a e 69c, são apresentados os valores de k_d para o hidrogênio H1, e nas Figuras 69b e 69d, para os hidrogênios H7 e H14. Observa-se que não houve variação significativa entre as constantes de dissociação das moléculas. Para ambas as moléculas, os valores obtidos estão na ordem de $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, indicando que a interação com a proteína é fraca.

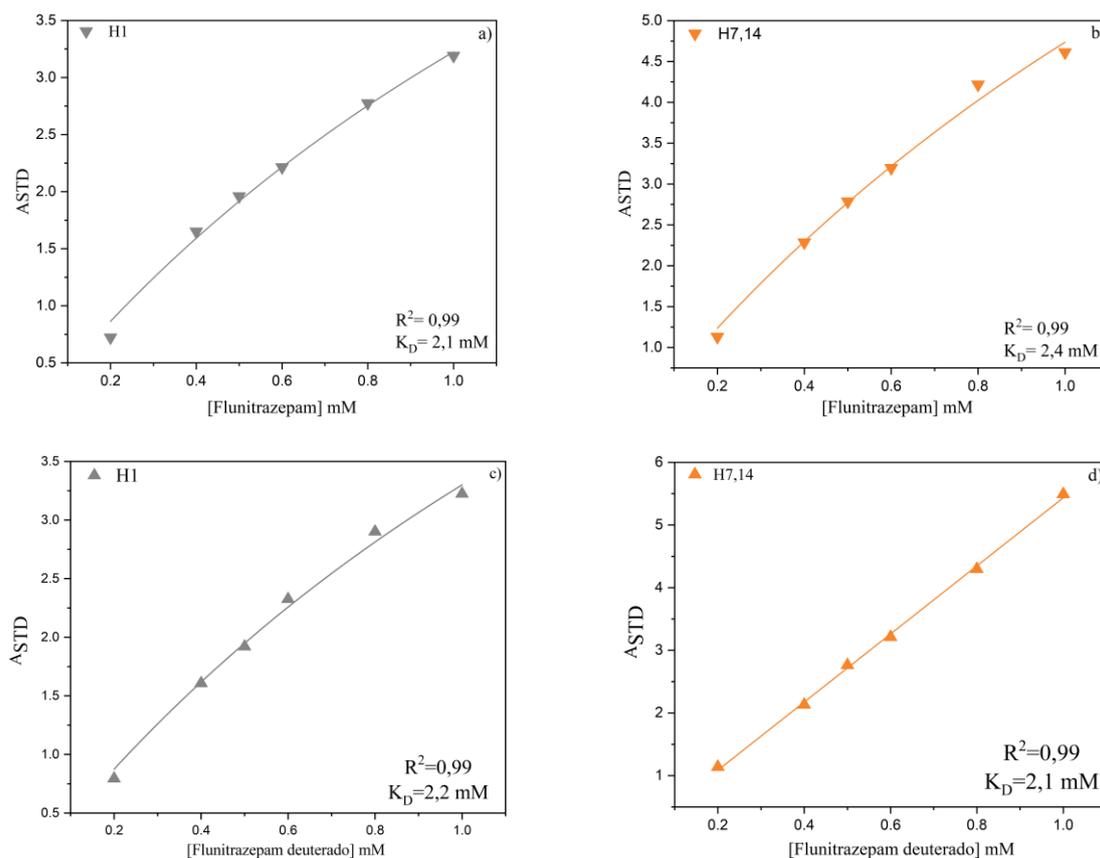


Figura 69. Curva obtida a partir de $ASTD$ em função da concentração do ligante. O k_D foi calculado a partir do ajuste da curva por um método não linear com uma função do tipo Michaelis-Menten. **a)** e **b)** composto (1) não deuterado, sendo **a)** o deslocamento químico do H1 e **b)** o deslocamento químico dos H7, 14. **c)** e **d)** Semelhante a (a e b), mas para o composto (1) deuterado.

2.5 Conclusões

O LI BMMI,Pro demonstrou eficácia como catalisador para a troca isotópica em CDCl_3 à temperatura ambiente nos compostos (1), (2) e (3). A deuteração dos compostos ocorreu principalmente nos átomos de hidrogênio mais ácidos das moléculas. Empiricamente, demonstramos que a reação de troca H/D entre o LI e o composto (1) segue uma cinética de pseudo-primeira ordem. Experimentos de variação de temperatura produziram parâmetros de ativação consistentes com a barreira energética típica para reações de troca isotópica H/D. Ao correlacionar as equações de Eyring e de Arrhenius, observamos que os valores de ΔS^\ddagger e ΔH^\ddagger foram idênticos aos obtidos a partir da equação de Eyring linearizada. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) desempenhou um papel crucial na interpretação e confirmação dos resultados, proporcionando entendimento abrangente através de experimentos de ^1H , ^2H e ^{13}C . A purificação com gel de sílica de (1) demonstrou ser eficaz, resultando em um rendimento final da reação de 94%. Em resumo, os resultados apresentados indicam que a deuteração de compostos usando o LI BMMI,Pro é altamente promissora, abrindo caminho para estudos adicionais que explorem uma gama mais ampla de compostos farmacêuticos.

Com base nos resultados de STD-NMR obtidos para o composto (1), algumas conclusões podem ser inferidas: não observamos uma diferença significativa na interação entre os dois fármacos, deuteração e não deuteração, com a proteína HSA. Para ambos os medicamentos, a interação com a proteína ocorre principalmente nos hidrogênios aromáticos.

REFERÊNCIAS

1. F. Bloch. Nuclear Induction. *Phys. Rev.* **1946**, 70 (7–8), 460–474.
2. E.M. Purcell, H.C. Torrey, R.V. Pound. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review* **1946**, 69 (1–2), 37–38.
3. H. Taub, P. Kusch. The Magnetic Moment of the Proton. *Physical Review* **1949**, 75 (10), 1481–1492.
4. W.F. Reynolds. Natural Product Structure Elucidation by NMR Spectroscopy. In *Pharmacognosy*; Elsevier, **2017**; pp 567–596.
5. B. Japelj, G. Ilc, J. Marušič, et al. Biosimilar structural comparability assessment by NMR: from small proteins to monoclonal antibodies. *Sci Rep* **2016**, 6 (1), 32201.
6. D.J. Hodgson, H. Ghasriani, Y. Aubin. Assessment of the higher order structure of Humira®, Remicade®, Avastin®, Rituxan®, Herceptin®, and Enbrel® by 2D-NMR fingerprinting. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2019**, 163, 144–152.
7. F.F.J. de Kleijne, H. Elferink, S.J. Moons, P.B. White, T.J. Boltje. Characterization of Mannosyl Dioxanium Ions in Solution Using Chemical Exchange Saturation Transfer NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, 61 (6), e202109874.
8. V.I. Bakhmutov, D.W. Elliott, H.-C. Zhou. Kinetics of $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ NMR cross-polarization and dynamics in a layered crystalline $\alpha\text{-Sn(IV)}$ phosphate. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **2023**, 127, 101898.
9. W. Escobedo-Hinojosa, J.L. Wissner, B. Hauer. A real-time ^{31}P -NMR-based approach for the assessment of glycerol kinase catalyzed monophosphorylations. *MethodsX* **2021**, 8, 101285.
10. B. Plainchont, P. Berruyer, J.-N. Dumez, S. Jannin, P. Giraudeau. Dynamic Nuclear Polarization Opens New Perspectives for NMR Spectroscopy in Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* **2018**, 90 (6), 3639–3650.
11. H.K. Kim, Y.H. Choi, R. Verpoorte. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat Protoc* **2010**, 5 (3), 536–549.
12. O. Beckonert, H.C. Keun, T.M.D. Ebbels, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* **2007**, 2 (11), 2692–2703.
13. J.-L. Wolfender, J.-M. Nuzillard, J.J.J. van der Hoof, J.-H. Renault, S. Bertrand. Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography–High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. *Anal. Chem.* **2019**, 91 (1), 704–742.
14. C. Foti, K. Alsante, G. Cheng, T. Zelesky, M. Zell. Tools and workflow for structure elucidation of drug degradation products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, 49, 89–99.
15. A. Bax, R. Freeman. Investigation of complex networks of spin-spin coupling by two-dimensional NMR. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1981**, 44 (3), 542–561.
16. L. Braunschweiler, R.R. Ernst. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1983**, 53 (3), 521–528.
17. G.A. Morris. Diffusion-Ordered Spectroscopy. In *Encyclopedia of Magnetic Resonance*; Harris, R. K., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2009**; p emrstm0119.pub2.
18. U. Schwerk, D. Michel. H NOESY NMR on Adsorbed Molecules. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100 (1), 352–356.
19. J.A. Aguilar, A.A. Colbourne, J. Cassani, M. Nilsson, G.A. Morris. Decoupling Two-Dimensional NMR Spectroscopy in Both Dimensions: Pure Shift NOESY and COSY*. *Angew. Chem.* **2012**.

20. L. Zhang, G. Gellerstedt. Quantitative 2D HSQC NMR determination of polymer structures by selecting suitable internal standard references. *Magnetic Reson in Chemistry* **2007**, 45 (1), 37–45.
21. J. Furrer. Recent Developments in HMBC Studies. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Elsevier, **2011**; Vol. 74, pp 293–354.
22. K. Bingol, L. Bruschweiler-Li, D.-W. Li, R. Brüschweiler. Customized Metabolomics Database for the Analysis of NMR 1H–1H TOCSY and 13C–1H HSQC-TOCSY Spectra of Complex Mixtures. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (11), 5494–5501.
23. A. Jenne, W. Bermel, C.A. Michal, et al. DREAMTIME NMR Spectroscopy: Targeted Multi-Compound Selection with Improved Detection Limits. *Angew Chem Int Ed* **2022**, 61 (19), e202110044.
24. Ministério da Saúde - MS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 53, DE 4 DE DEZEMBRO DE 2015(*); **2015**.
25. J. Abraham. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*; Tietje, C., Brouder, A., Eds.; Brill | Nijhoff, **2010**; pp 1041–1053.
26. D. Bouzouita, J.M. Asensio, V. Pfeifer, et al. Chemoselective H/D exchange catalyzed by nickel nanoparticles stabilized by N-heterocyclic carbene ligands. *Nanoscale* **2020**, 12 (29), 15736–15742.
27. M. Dean, V. Sung. Review of deutetrabenazine: a novel treatment for chorea associated with Huntington’s disease. *DDDT* **2018**, Volume 12, 313–319.
28. S.M. Hoy. Deucravacitinib: First Approval. *Drugs* **2022**, 82 (17), 1671–1679.
29. R. Roskoski. Deucravacitinib is an allosteric TYK2 protein kinase inhibitor FDA-approved for the treatment of psoriasis. *Pharmacological Research* **2023**, 189, 106642.
30. T. Pirali, M. Serafini, S. Cargnin, A.A. Genazzani. Applications of Deuterium in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2019**, 62 (11), 5276–5297.
31. R.M.C. Di Martino, B.D. Maxwell, T. Pirali. Deuterium in drug discovery: progress, opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **2023**, 22 (7), 562–584.
32. S.L.H. Roger D. Tung. Deuterium Medicinal Chemistry: A New Approach to Drug Discovery and Development. May 2, 2014.
33. T.M. Belete. Recent Updates on the Development of Deuterium-Containing Drugs for the Treatment of Cancer. *DDDT* **2022**, Volume 16, 3465–3472.
34. Shao, L., Hewitt, M.C. The kinetic isotope effect in the search for deuterated drugs. *Drug News & Perspectives* **2010**, 23 (6), 398.
35. P.H.V. Vontobel. SÍNTESE DE COMPOSTOS BORILADOS ANÁLOGOS À BEDEROCINA (REP8839) E AO RESVERATROL.
36. E. V. Anslyn, D. A. Dougherty. *Modern Physical Organic Chemistry*; University Science Books.
37. M. Zanatta, F.P. Dos Santos, C. Biehl, et al. Organocatalytic Imidazolium Ionic Liquids H/D Exchange Catalysts. *J. Org. Chem.* **2017**, 82 (5), 2622–2629.
38. G. Khirich, M.J. Holliday, J.C. Lin, A. Nandy. Measurement and Characterization of Hydrogen–Deuterium Exchange Chemistry Using Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2018**, 122 (8), 2368–2378.
39. A.A. Shahkhatuni, A.G. Shahkhatuni, V.P. Ananikov, A.S. Harutyunyan. NMR-monitoring of H/D exchange reaction of ketones in solutions of imidazolium ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, 362, 119746.
40. C. Foti, K. Alsante, G. Cheng, T. Zelesky, M. Zell. Tools and workflow for structure elucidation of drug degradation products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, 49, 89–99.
41. M. Nebsen, E.S. Elzanfaly. Stability-Indicating Method and LC–MS-MS Characterization of Forced Degradation Products of Sofosbuvir. *J Chromatogr Sci* **2016**, 54 (9), 1631–1640.

42. M.E. Sherman, R.D. Smith, F.M. Gardner, D.R. Goodlett, R.K. Ernst. A Sensitive GC-MS Method for Quantitation of Lipid A Backbone Components and Terminal Phosphate Modifications. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2022**, 33 (12), 2301–2309.
43. G. Caviglioli, P. Valeria, P. Brunella, et al. Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, 30 (3), 499–509.
44. D. Swain, G. Samanthula, S. Bhagat, et al. Characterization of forced degradation products and in silico toxicity prediction of Sofosbuvir: A novel HCV NS5B polymerase inhibitor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, 120, 352–363.
45. T.M. Barbosa, G.A. Morris, M. Nilsson, R. Rittner, C.F. Tormena. ¹H and ¹⁹F NMR in drug stress testing: the case of voriconazole. *RSC Adv.* **2017**, 7 (54), 34000–34004.
46. Wong et al. - 2024 - Shaping the future of antiviral Treatment Spotlig.pdf.
47. B. Wang, B. Cao, Z.-C. Bei, et al. Disulfide-incorporated lipid prodrugs of cidofovir: Synthesis, antiviral activity, and release mechanism. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2023**, 258, 115601.
48. Y. Liu, S. Sun, J. Li, W. Wang, H.-J. Zhu. Cell-Dependent Activation of ProTide Prodrugs and Its Implications in Antiviral Studies. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2023**, 6 (10), 1340–1346.
49. S. Zeuzem, G.M. Dusheiko, R. Salupere, et al. Sofosbuvir and Ribavirin in HCV Genotypes 2 and 3. *New England Journal of Medicine.* May 22, 2014, pp 1993–2001.
50. C. Wassner, N. Bradley, Y. Lee. A Review and Clinical Understanding of Tenofovir: Tenofovir Disoproxil Fumarate versus Tenofovir Alafenamide. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC).* January 1, 2020, p 232595822091923.
51. E. De Clercq. Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF). *Biochemical Pharmacology* **2016**, 119, 1–7.
52. A. Caroline, M.C. Ricci. ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA.
53. R.M. Maggio, N.L. Calvo, S.E. Vignaduzzo, T.S. Kaufman. Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, 101, 102–122.
54. Lhasa-Limited-and-IPEC-Europe-collaborative-meeting-report-21.5.pdf.
55. R. Hemingway, S.W. Baertschi, D. Benstead, et al. *In Silico* Prediction of Pharmaceutical Degradation Pathways: A Benchmarking Study Using the Software Program Zeneth. *Org. Process Res. Dev.* **2024**, 28 (3), 674–692.
56. J. Abraham. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*; Tietje, C., Brouder, A., Eds.; Brill | Nijhoff, **2010**; pp 1041–1053.
57. J. Abraham. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*; Tietje, C., Brouder, A., Eds.; Brill | Nijhoff, **2010**; pp 1041–1053.
58. J. Abraham. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*; Tietje, C., Brouder, A., Eds.; Brill | Nijhoff, **2010**; pp 1041–1053.
59. J.C. Berridge. Impurities in drug substances and drug products: new approaches to quantification and qualification. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1995**, 14 (1–2), 7–12.
60. Abraham - 2010 - International Conference On Harmonisation Of Techn.pdf.
61. Abraham - 2010 - International Conference On Harmonisation Of Techn.pdf.
62. J.M. Rodrigues, E.C.P. Rego, E.F. Guimarães, et al. Determination of Aldrin Purity Using a Combination of the Mass Balance Approach and Quantitative NMR. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2015**.

63. H. Hu, K.K. Katyayan, B.A. Czeskis, E.J. Perkins, P. Kulanthaivel. Comparison between Radioanalysis and ^{19}F Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in the Determination of Mass Balance, Metabolism, and Distribution of Pefloxacin. *Drug Metab Dispos* **2017**, 45 (4), 399–408.
64. R.A. Reed, K.M. Alsante, S.W. Baertschi. Pharmaceutical Stress Testing.
65. S.W. Baertschi, B.W. Pack, C.S. Hoaglund Hyzer, M.A. Nussbaum. Assessing mass balance in pharmaceutical drug products: New insights into an old topic. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, 49, 126–136.
66. Pharmaceutical Stress Testing. *DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES*.
67. R.A. Reed, K.M. Alsante, S.W. Baertschi. Pharmaceutical Stress Testing.
68. X. Li, W. Zhang, X. Li, et al. Purity Assessment of Dinotefuran Using Mass Balance and Quantitative Nuclear Magnetic Resonance. *Molecules* **2023**, 28 (9), 3884.
69. B.S. Scott, K. Zhang, P.M. Yehl, S.H. Yang. A strategic approach towards mass balance investigations in pharmaceutical drug substance release testing: A peculiar out of specification case study encountered during API manufacture. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2024**, 238, 115773.
70. M. Narayanam, A. Sahu, S. Singh. Use of LC–MS/TOF, LC–MSn, NMR and LC–NMR in characterization of stress degradation products: Application to cilazapril. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, 111, 190–203.
71. U. Holzgrabe. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2010**, 57 (2), 229–240.
72. F. Malz, H. Jancke. Validation of quantitative NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, 38 (5), 813–823.
73. M.D.S. Santos, L.A. Colnago. Validação de método quantitativo por RMN de ^1H para análises de formulações farmacêuticas. *Quím. Nova* **2013**, 36 (2), 324–330.
74. T.D.W. Claridge. High-resolution NMR techniques in organic chemistry, 2nd ed.; Tetrahedron organic chemistry series; Elsevier, Amsterdam ; Boston, **2009**.
75. J. Keeler. Understanding NMR Spectroscopy.
76. T. Rundlöf, I. McEwen, M. Johansson, T. Arvidsson. Use and qualification of primary and secondary standards employed in quantitative ^1H NMR spectroscopy of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, 93, 111–117.
77. Malz e Jancke - 2005 - Validation of quantitative NMR.pdf.
78. nmr-spectroscopy-in-drug-development-and-analysis-1999.pdf.
79. B. Diehl, U. Holzgrabe, Y. Monakhova, T. Schönberger. Quo Vadis qNMR? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2020**, 177, 112847.
80. PROCI-cap-livro-Fundamentos-e-aplicacoes-...-.pdf.
81. P.M.D. Santos. Desenvolvimento da técnica de precessão livre no estado estacionário para aumento da razão sinal ruído em espectros de RMN de alta resolução. Mestrado em Química Analítica, Universidade de São Paulo, São Carlos, **2009**.
82. jungnickel1963.pdf.
83. M.D.S. Santos. Desenvolvimento de métodos de RMN para controle de qualidade de produtos farmacêuticos e agrícolas. Doutorado em Química Analítica e Inorgânica, Universidade de São Paulo, São Carlos, **2014**.
84. P. Moutzouri, P. Kiraly, M. Foroozandeh, et al. Suppression of ^{13}C satellites in ^1H DOSY spectra. *Journal of Magnetic Resonance* **2018**, 295, 6–11.
85. G. Dal Poggetto, D.C. Favaro, M. Nilsson, G.A. Morris, C.F. Tormena. ^{19}F DOSY NMR analysis for spin systems with $^n J_{FF}$ couplings. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2014**, 52 (4), 172–177.
86. Y. Qiao, W. Ge, L. Jia, et al. Glycosylation intermediates studied using low temperature ^1H - and ^{19}F -DOSY NMR: new insight into the activation of trichloroacetimidates. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (76), 11418–11421.

87. S. Balayssac, S. Trefi, V. Gilard, et al. 2D and 3D DOSY ¹H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: Application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2009**, 50 (4), 602–612.
88. M. Nilsson, G.A. Morris. Improving pulse sequences for 3D DOSY: Convection compensation. *Journal of Magnetic Resonance* **2005**, 177 (2), 203–211.
89. M. Nilsson, A.M. Gil, I. Delgadillo, G.A. Morris. Improving pulse sequences for 3D DOSY: COSY-IDOSY. *Chem. Commun.* **2005**, No. 13, 1737.
90. S. Trefi, V. Gilard, S. Balayssac, M. Malet-Martino, R. Martino. The usefulness of 2D DOSY and 3D DOSY-COSY ¹H NMR for mixture analysis: application to genuine and fake formulations of sildenafil (Viagra). *Magnetic Reson in Chemistry* **2009**, 47 (S1).
91. FULL_TEXT.PDF.
92. E.L. Hahn. Spin Echoes. *Physics Today* **1950**, 3 (12), 21–21.
93. S. Putz. Circuit Cavity QED with Macroscopic Solid-State Spin Ensembles; Springer Theses; Springer International Publishing, Cham, **2017**.
94. Harald Günther - NMR Spectroscopy_ Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry-Wiley-VCH (2013).pdf.
95. Claridge - 2009 - High-resolution NMR techniques in organic chemistr.pdf.
96. Keeler - Understanding NMR Spectroscopy.pdf.
97. E.O. Stejskal, J.E. Tanner. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *The Journal of Chemical Physics* **1965**, 42 (1), 288–292.
98. Full Text PDF.
99. L. Castañar, G.D. Poggetto, A.A. Colbourne, G.A. Morris, M. Nilsson. The GNAT: A new tool for processing NMR data. *Magnetic Reson in Chemistry* **2018**, 56 (6), 546–558.
100. Nilsson - 2009 - The DOSY Toolbox A new tool for processing PFG NM.pdf.
101. J.S. McKenzie, J.A. Donarski, J.C. Wilson, A.J. Charlton. Analysis of complex mixtures using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2011**, 59 (4), 336–359.
102. M. Zecca, S.J. Vogt, P.R.J. Connolly, E.F. May, M.L. Johns. NMR Measurements of Tortuosity in Partially Saturated Porous Media. *Transp Porous Med* **2018**, 125 (2), 271–288.
103. M.D. Pelta, G.A. Morris, M.J. Stchedroff, S.J. Hammond. A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy. *Magnetic Reson in Chemistry* **2002**, 40 (13).
104. A. Botana, J.A. Aguilar, M. Nilsson, G.A. Morris. J-modulation effects in DOSY experiments and their suppression: The Oneshot45 experiment. *Journal of Magnetic Resonance* **2011**, 208 (2), 270–278.
105. wu1995.pdf.
106. A. Becht, C. Schollmayer, J. Wiest, et al. Diffusion ordered NMR spectroscopy measurements as screening method of potential reactions of API and excipients in drug formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2019**, 162, 41–46.
107. S. Trefi, V. Gilard, S. Balayssac, M. Malet-Martino, R. Martino. The usefulness of 2D DOSY and 3D DOSY-COSY ¹H NMR for mixture analysis: application to genuine and fake formulations of sildenafil (Viagra). *Magnetic Reson in Chemistry* **2009**, 47 (S1).
108. G.S. Kapur, E.J. Cabrita, S. Berger. The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy.
109. N. Uchiyama, K. Kiyota, J. Hosoe, et al. Quantitative ³¹P-NMR for Purity Determination of Sofosbuvir and Method Validation. *Chem. Pharm. Bull.* **2022**, 70 (12), 892–900.
110. V. Pottabathini, V. Gugulothu, M. Kaliyaperumal, S. Battu. Identification, Isolation and Structure Confirmation of Forced Degradation Products of Sofosbuvir. *AJAC* **2016**, 07 (11), 797–815.
111. M. Blessy, R.D. Patel, P.N. Prajapati, Y.K. Agrawal. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2014**, 4 (3), 159–165.

112. M. Nilsson. The DOSY Toolbox: A new tool for processing PFG NMR diffusion data. *Journal of Magnetic Resonance* **2009**, 200 (2), 296–302.
113. V. Pottabathini, V. Gugulothu, M. Kaliyaperumal, S. Battu. Identification, Isolation and Structure Confirmation of Forced Degradation Products of Sofosbuvir. *AJAC* **2016**, 07 (11), 797–815.
114. V. Anandgaonkar, A. Gupta, S. Kona, M.V.N.K. Talluri. Isolation, LC–MS/MS and 2D-NMR characterization of alkaline degradants of tenofovir disoproxil fumarate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, 107, 175–185.
115. W.B. Swanson, D. Tabaczynski, D. Lis, E. Zurek, M. Kozik. Direct experimental ^{31}P 2D DOSY NMR evidence for oligomerization of transition-metal substituted polyoxotungstates in nonpolar solvents. *Polyhedron* **2021**, 204, 115174.
116. P. Shestakova, G. Absillis, F.J. Martin-Martinez, et al. Integrating ^{31}P DOSY NMR Spectroscopy and Molecular Mechanics as a Powerful Tool for Unraveling the Chemical Structures of Polyoxomolybdate-Based Amphiphilic Nanohybrids in Aqueous Solution. *Chemistry A European J* **2014**, 20 (18), 5258–5270.
117. G. Kagan, W. Li, R. Hopson, P.G. Williard. Internally Referenced Diffusion Coefficient–Formula Weight (D-FW) Analysis of ^{31}P Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY). *Org. Lett.* **2009**, 11 (21), 4818–4821.
118. T.K.N. Luong, P. Shestakova, G. Absillis, T.N. Parac-Vogt. Detailed Mechanism of Phosphoanhydride Bond Hydrolysis Promoted by a Binuclear Zr^{IV} -Substituted Keggin Polyoxometalate Elucidated by a Combination of ^{31}P , ^{31}P DOSY, and ^{31}P EXSY NMR Spectroscopy. *Inorg. Chem.* **2016**, 55 (10), 4864–4873.
119. S. Kopf, F. Bourriquen, W. Li, et al. Recent Developments for the Deuterium and Tritium Labeling of Organic Molecules. *Chem. Rev.* **2022**, 122 (6), 6634–6718.
120. J. Atzrodt, V. Derdau, T. Fey, J. Zimmermann. The Renaissance of H/D Exchange. *Angew Chem Int Ed* **2007**, 46 (41), 7744–7765.
121. R.M.C. Di Martino, B.D. Maxwell, T. Pirali. Deuterium in drug discovery: progress, opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **2023**, 22 (7), 562–584.
122. T. Yamamoto, E. Tokunaga, S. Nakamura, N. Shibata, T. Toru. Synthesis and Configurational Stability of (S)- and (R)-Deuteriothalidomides. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, 58 (1), 110–112.
123. H.H. Fernandez, D. Stamler, M.D. Davis, et al. Long-term safety and efficacy of deutetrabenazine for the treatment of tardive dyskinesia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **2019**, 90, 1317–1323.
124. C. Schmidt. First deuterated drug approved. *Nat Biotechnol* **2017**, 35 (6), 493–494.
125. M. Lepron, M. Daniel-Bertrand, G. Mencia, et al. Nanocatalyzed Hydrogen Isotope Exchange. *Acc. Chem. Res.* **2021**, 54 (6), 1465–1480.
126. A. Palazzolo, T. Naret, M. Daniel-Bertrand, et al. Tuning the Reactivity of a Heterogeneous Catalyst using N-Heterocyclic Carbene Ligands for C–H Activation Reactions. *Angew Chem Int Ed* **2020**, 59 (47), 20879–20884.
127. R. Zhou, L. Ma, X. Yang, J. Cao. Recent advances in visible-light photocatalytic deuteration reactions. *Org. Chem. Front.* **2021**, 8 (3), 426–444.
128. M.D. Mills, R.E. Sonstrom, Z.P. Vang, et al. Enantioselective Synthesis of Enantioisotopomers with Quantitative Chiral Analysis by Chiral Tag Rotational Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed* **2022**, 61 (33), e202207275.
129. J.R. Clark, K. Feng, A. Sookezian, M.C. White. Manganese-catalysed benzylic C(sp³)-H amination for late-stage functionalization. *Nature Chem* **2018**, 10 (6), 583–591.
130. M. Valero, D. Becker, K. Jess, et al. Directed Iridium-Catalyzed Hydrogen Isotope Exchange Reactions of Phenylacetic Acid Esters and Amides. *Chemistry A European J* **2019**, 25 (26), 6517–6522.

131. M. Valero, A. Burhop, K. Jess, et al. Evaluation of a P,N -ligated iridium(I) catalyst in hydrogen isotope exchange reactions of aryl and heteroaryl compounds. *Labelled Comp Radiopharmac* **2018**, 61 (4), 380–385.
132. J. Atzrodt, V. Derdau. Pd- and Pt-catalyzed H/D exchange methods and their application for internal MS standard preparation from a Sanofi-Aventis perspective. *Labelled Comp Radiopharmac* **2010**, 53 (11–12), 674–685.
133. H. Sajiki, N. Ito, H. Esaki, et al. Aromatic ring favorable and efficient H–D exchange reaction catalyzed by Pt/C. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46 (41), 6995–6998.
134. J.T. Moore, C.C. Lu. Catalytic Hydrogenolysis of Aryl C–F Bonds Using a Bimetallic Rhodium–Indium Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142 (27), 11641–11646.
135. M. Yamamoto, K. Oshima, S. Matsubara. Platinum(IV) Oxide Catalyzed H–D Exchange Reactions in Arylsilanes. *Org. Lett.* **2004**, 6 (26), 5015–5017.
136. H. Esaki, R. Ohtaki, T. Maegawa, Y. Monguchi, H. Sajiki. Novel Pd/C-Catalyzed Redox Reactions between Aliphatic Secondary Alcohols and Ketones under Hydrogenation Conditions: Application to H–D Exchange Reaction and the Mechanistic Study. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (6), 2143–2150.
137. J.R. Heys. Nickel-catalyzed hydrogen isotope exchange. *Labelled Comp Radiopharmac* **2010**, 53 (11–12), 716–721.
138. M. Vilela Salvador, L. Scorsin, R. De Oliveira Gonçalves, T. Venâncio, F.P. Dos Santos. Innovative deuteration strategies: Ionic liquid catalyzed synthesis of deuterated pharmaceuticals. *Journal of Molecular Liquids* **2024**, 401, 124653.
139. A.A. Barboza, A.C. Neto, I.G. Rosset, G.A.M. Jardim, M.A.B. Ferreira. Synthesis of 3-Carbonyl Trisubstituted Furans via Pd-Catalyzed Aerobic Cycloisomerization Reaction: Development and Mechanistic Studies. *J. Org. Chem.* **2021**, 86 (5), 3923–3942.
140. R.P. Bell. Liversidge Lecture. Recent advances in the study of kinetic hydrogen isotope effects. *Chem. Soc. Rev.* **1974**, 3 (4), 513.
141. S. Scheiner, M. Čuma. Relative Stability of Hydrogen and Deuterium Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (6), 1511–1521.
142. K.B. Wiberg. The Deuterium Isotope Effect. *Chem. Rev.* **1955**, 55 (4), 713–743.
143. J. Atzrodt, V. Derdau, W.J. Kerr, M. Reid. C–H Functionalisation for Hydrogen Isotope Exchange. *Angew Chem Int Ed* **2018**, 57 (12), 3022–3047.
144. A. Hogg, M. Wheatley, P. Domingo-Legarda, et al. Ruthenium-Catalyzed Monoselective C–H Methylation and *d*₃ -Methylation of Arenes. *JACS Au* **2022**, 2 (11), 2529–2538.
145. M. Zanatta, A. Girard, N.M. Simon, et al. The Formation of Imidazolium Salt Intimate (Contact) Ion Pairs in Solution. *Angew Chem Int Ed* **2014**, 53 (47), 12817–12821.
146. A. Balk, U. Holzgrabe, L. Meinel. ‘Pro et contra’ ionic liquid drugs – Challenges and opportunities for pharmaceutical translation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, 94, 291–304.
147. S.J. Klippenstein, V.S. Pande, D.G. Truhlar. Chemical Kinetics and Mechanisms of Complex Systems: A Perspective on Recent Theoretical Advances. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (2), 528–546.
148. V.J. Capponi, G.W. Halstead, D.L. Theis. Synthesis of deuterium labelled ibuprofen. *Labelled Comp Radiopharmac* **1986**, 23 (2), 187–196.
149. H. Sajiki, F. Aoki, H. Esaki, T. Maegawa, K. Hirota. Palladium-catalyzed H-D exchange into nucleic acids in deuterium oxide. *Nucleic Acids Symposium Series* **2003**, 3 (1), 55–56.
150. N.H. Werstiuk, C. Ju. Protium–deuterium exchange of substituted pyridines in neutral D₂O at elevated temperatures. *Can. J. Chem.* **1989**, 67 (1), 5–10.
151. T. Junk, W.J. Catallo. Preparative supercritical deuterium exchange in arenes and heteroarenes. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37 (20), 3445–3448.

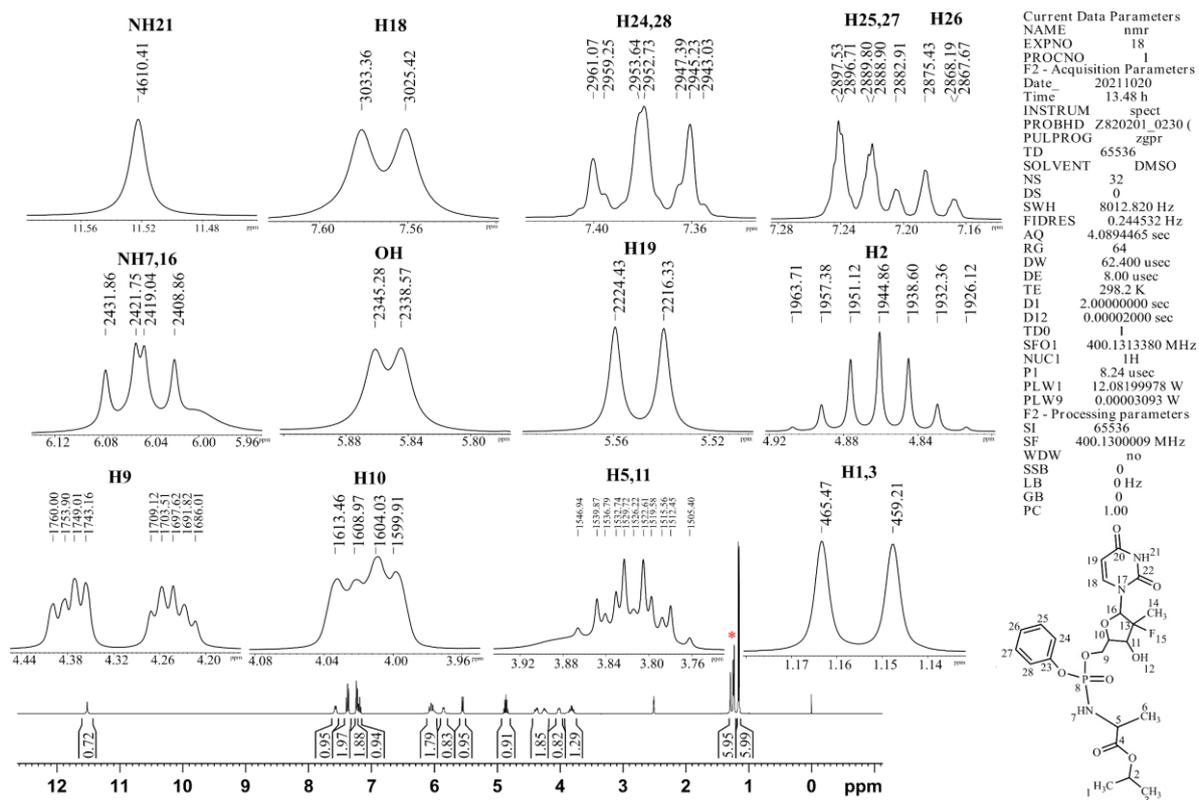
152. P. McGeady, R. Croteau. A Mild and Convenient Method for Tritium Labelling of Activated Aromatic Compounds Using BF₃-Et₂O and Tritiated Water. *J. CHEM. SOC.* **1993**.
153. E. Leppälä, K. Wähälä. Synthesis of [² H ₈]-enterolactone and [² H ₁₀]-enterodiol. *Labelled Comp Radiopharmac* **2004**, 47 (1), 25–30.
154. C. Boix, M. Poliakoff. Efficient H-D Exchange of Aromatic Compounds in Near-Critical D₂O Catalysed by a Polymer-Supported Sulphonic Acid.
155. N.M. Simon, M. Zanatta, F.P. Dos Santos, et al. Carbon Dioxide Capture by Aqueous Ionic Liquid Solutions. *ChemSusChem* **2017**, 10 (24), 4927–4933.
156. J. Dupont. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 15 (3), 341–350.
157. J. Dupont, P.A.Z. Suarez. Physico-chemical processes in imidazolium ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8 (21), 2441.
158. J. Dupont. From Molten Salts to Ionic Liquids: A “Nano” Journey. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44 (11), 1223–1231.
159. J. Dupont, R.F. De Souza, P.A.Z. Suarez. Ionic Liquid (Molten Salt) Phase Organometallic Catalysis. *Chem. Rev.* **2002**, 102 (10), 3667–3692.
160. R. Giernoth, D. Bankmann. Transition-Metal-Free Synthesis of Perdeuterated Imidazolium Ionic Liquids by Alkylation and H/D Exchange. *Eur J Org Chem* **2008**, 2008 (17), 2881–2886.
161. R.C. Remsing, J.L. Wildin, A.L. Rapp, G. Moyna. Hydrogen Bonds in Ionic Liquids Revisited: ^{35/37} Cl NMR Studies of Deuterium Isotope Effects in 1- *n* -Butyl-3-Methylimidazolium Chloride. *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111 (40), 11619–11621.
162. T. D.W. Claridge. High-Resolution NMR techniques in Organic Chemistry, Second Edition.; TETRAHEDRON ORGANIC CHEMISTRY SERIES; Chemistry Research Laboratory, Department of Chemistry, University of Oxford, **2009**; Vol. VOLUME 27.
163. Thorsteinn Loftsson. Drug stability for pharmaceutical scientists; Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Kidlington, Oxford, UK, **2014**.
164. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development; Huynh-Ba, K., Ed.; Springer New York, New York, NY, **2009**.
165. Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals; Bajaj, S., Singh, S., Eds.; Methods in Pharmacology and Toxicology; Springer New York, New York, NY, **2018**.
166. J. García López, P.M. Sansores Peraza, M.J. Iglesias, et al. Spiro[1,2]oxaphosphetanes of Nonstabilized and Semistabilized Phosphorus Ylide Derivatives: Synthesis and Kinetic and Computational Study of Their Thermolysis. *J. Org. Chem.* **2020**, 85 (22), 14570–14591.
167. G.S. Maia, J.R. De Andrade, M.G.C. Da Silva, M.G.A. Vieira. Adsorption of diclofenac sodium onto commercial organoclay: Kinetic, equilibrium and thermodynamic study. *Powder Technology* **2019**, 345, 140–150.
168. N.K. Thakral, R.L. Zanon, R.C. Kelly, S. Thakral. Applications of Powder X-Ray Diffraction in Small Molecule Pharmaceuticals: Achievements and Aspirations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, 107 (12), 2969–2982.
169. D.E. Gordon, G.M. Jang, M. Bouhaddou, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* **2020**, 583 (7816), 459–468.
170. H. Lu, Q. Zhou, J. He, et al. Recent advances in the development of protein–protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Sig Transduct Target Ther* **2020**, 5 (1), 213.
171. M. Maciążek-Jurczyk, B. Morak-Młodawska, M. Jeleń, et al. The Influence of Oxidative Stress on Serum Albumin Structure as a Carrier of Selected Diazaphenothiazine with Potential Anticancer Activity. *Pharmaceuticals* **2021**, 14 (3), 285.

172. J. Angulo, P.M. Enríquez-Navas, P.M. Nieto. Ligand–Receptor Binding Affinities from Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy: The Binding Isotherm of STD Initial Growth Rates. *Chemistry A European J* **2010**, 16 (26), 7803–7812.
173. F.V.C. Kock, A.R. Costa, K.M. De Oliveira, et al. A Supramolecular Interaction of a Ruthenium Complex With Calf-Thymus DNA: A Ligand Binding Approach by NMR Spectroscopy. *Front. Chem.* **2019**, 7, 762.
174. I.M. Figueiredo, A.J. Marsaioli. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de ¹H utilizando detecção do ligante. *Quím. Nova* **2007**, 30 (7).
175. M.P. Almeida, F.V.C. Kock, H.C.R. De Jesus, R.M. Carlos, T. Venâncio. Probing the acetylcholinesterase inhibitory activity of a novel Ru(II) polypyridyl complex and the supramolecular interaction by (STD)-NMR. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2021**, 224, 111560.
176. C.D.F. Milagre, L.F. Cabeça, W.P. Almeida, A.J. Marsaioli. β -lactam antibiotics epitope mapping with STD NMR spectroscopy: a study of drug-human serum albumin interaction. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**.
177. M. Paar, V.H. Fengler, D.J. Rosenberg, et al. Albumin in patients with liver disease shows an altered conformation. *Commun Biol* **2021**, 4 (1), 731.
178. S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Mol Biol* **1998**, 5 (9), 827–835.
179. A. Viegas, J. Manso, F.L. Nobrega, E.J. Cabrita. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.* **2011**, 88 (7), 990–994.
180. B. Meyer, T. Peters. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew Chem Int Ed* **2003**, 42 (8), 864–890.
181. M. Mayer, B. Meyer. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38 (12), 1784–1788.
182. M. Mayer, B. Meyer. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (25), 6108–6117.
183. T. Haselhorst, A.-C. Lamerz, M.V. Itzstein. Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy as a Technique to Investigate Protein-Carbohydrate Interactions in Solution. In *Glycomics*; Packer, N. H., Karlsson, N. G., Eds.; Humana Press, Totowa, NJ, **2009**; pp 375–396.
184. J. Angulo, P.M. Nieto. STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules—a quantitative approach. *Eur Biophys J* **2011**, 40 (12), 1357–1369.
185. Chemistry A European J - 2020 - Monaco - Exploring Multi-Subsite Binding Pockets in Proteins DEEP-STD NMR Fingerprinting.pdf.
186. S. Monaco, J. Angulo, M. Wallace. Imaging Saturation Transfer Difference (STD) NMR: Affinity and Specificity of Protein–Ligand Interactions from a Single NMR Sample. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145 (30), 16391–16397.
187. S. Monaco, J. Ramírez-Cárdenas, A.T. Carmona, I. Robina, J. Angulo. Inter-Ligand STD NMR: An Efficient 1D NMR Approach to Probe Relative Orientation of Ligands in a Multi-Subsite Protein Binding Pocket. *Pharmaceuticals* **2022**, 15 (8), 1030.
188. B.A. Becker. Ligand–Protein Binding and Screening Using NMR spectroscopy.
189. S. Cha, M. Lee, D. Kim. Concentration Dependence of Ion Pairing in Imidazolium-Based Ionic Liquid Solutions. *ChemPhysChem* **2019**, 20 (3), 482–488.
190. P. Guillon, L. Dirr, I.M. El-Deeb, et al. Structure-guided discovery of potent and dual-acting human parainfluenza virus haemagglutinin–neuraminidase inhibitors. *Nat Commun* **2014**, 5 (1), 5268.

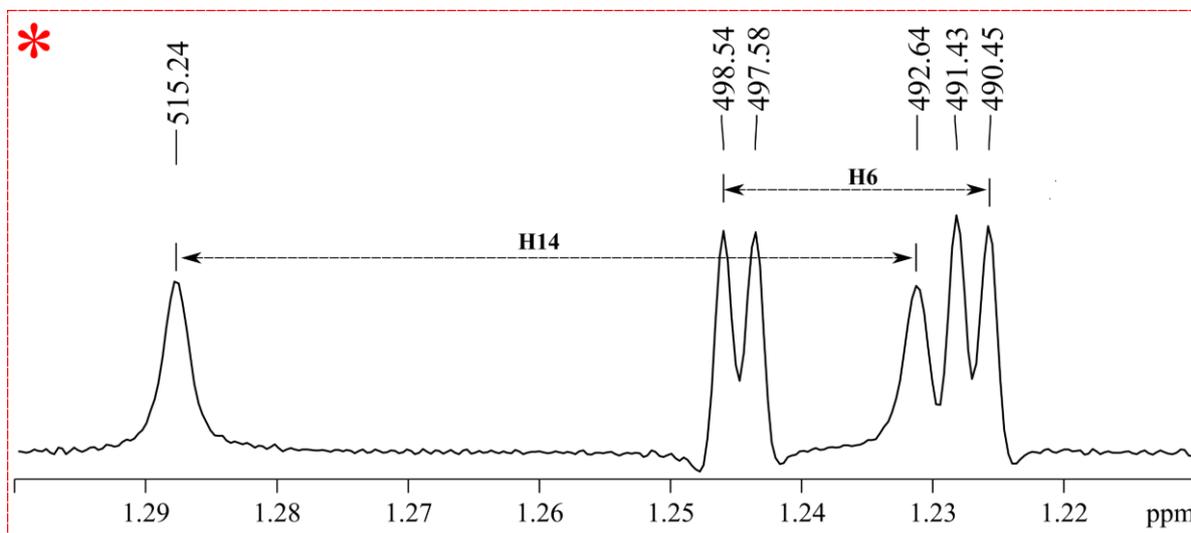
191. A.J. Lamontanara, S. Georgeon, G. Tria, D.I. Svergun, O. Hantschel. The SH2 domain of Abl kinases regulates kinase autophosphorylation by controlling activation loop accessibility. *Nat Commun* **2014**, 5 (1), 5470.

ANEXOS

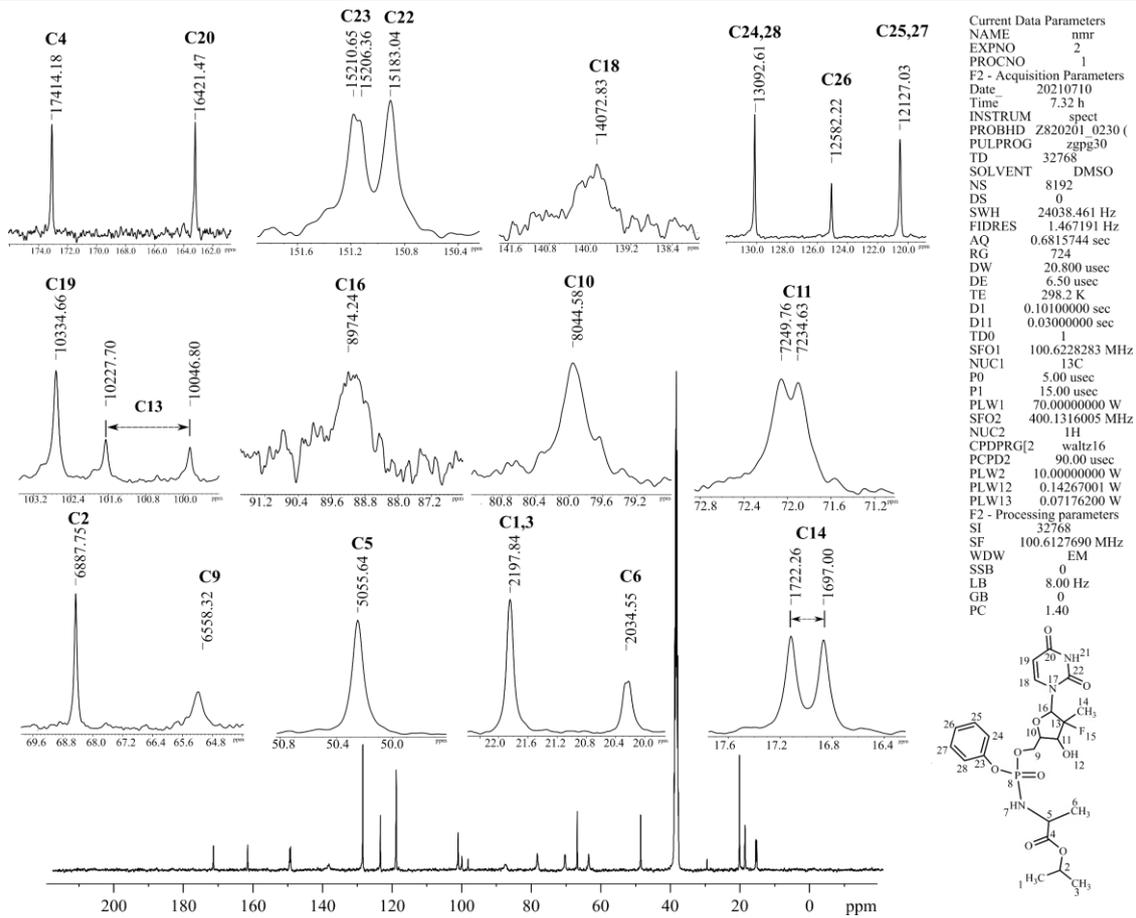
Caracterização do Sofosbuvir



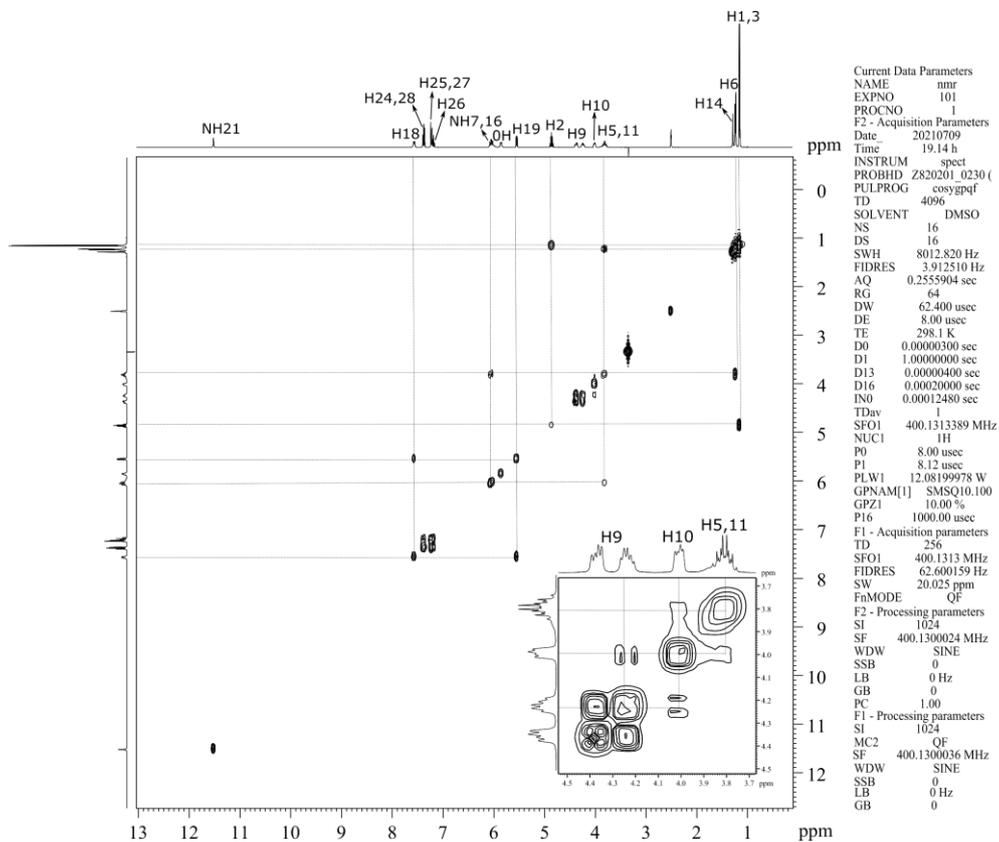
Anexo 1. Espectros de RMN de ^1H com saturação da hidroxila do solvente e com assinalamento dos átomos de hidrogênio do sofosbuvir, em DMSO.



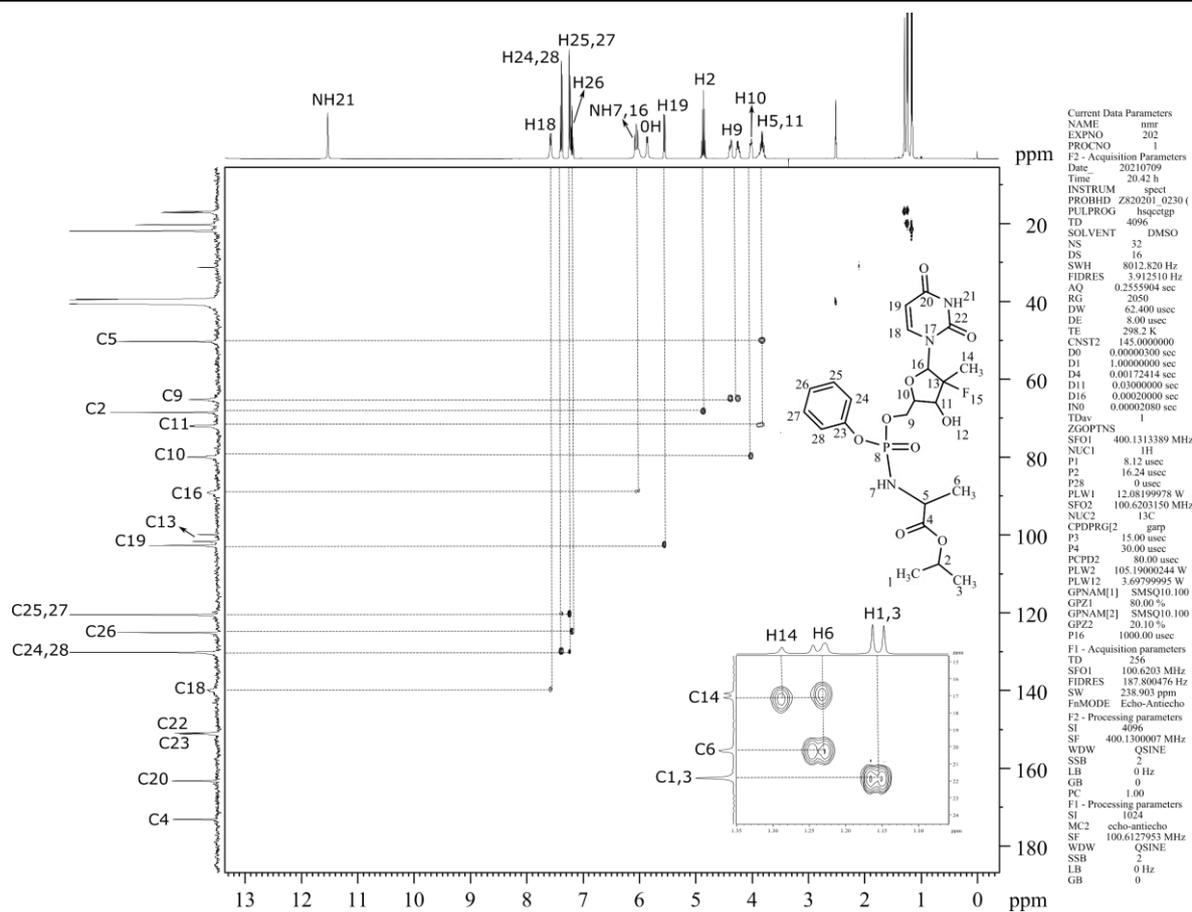
Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H NMR com a expansão dos sinais das metilas foi aplicado lb: -2 e gb: 0.5.



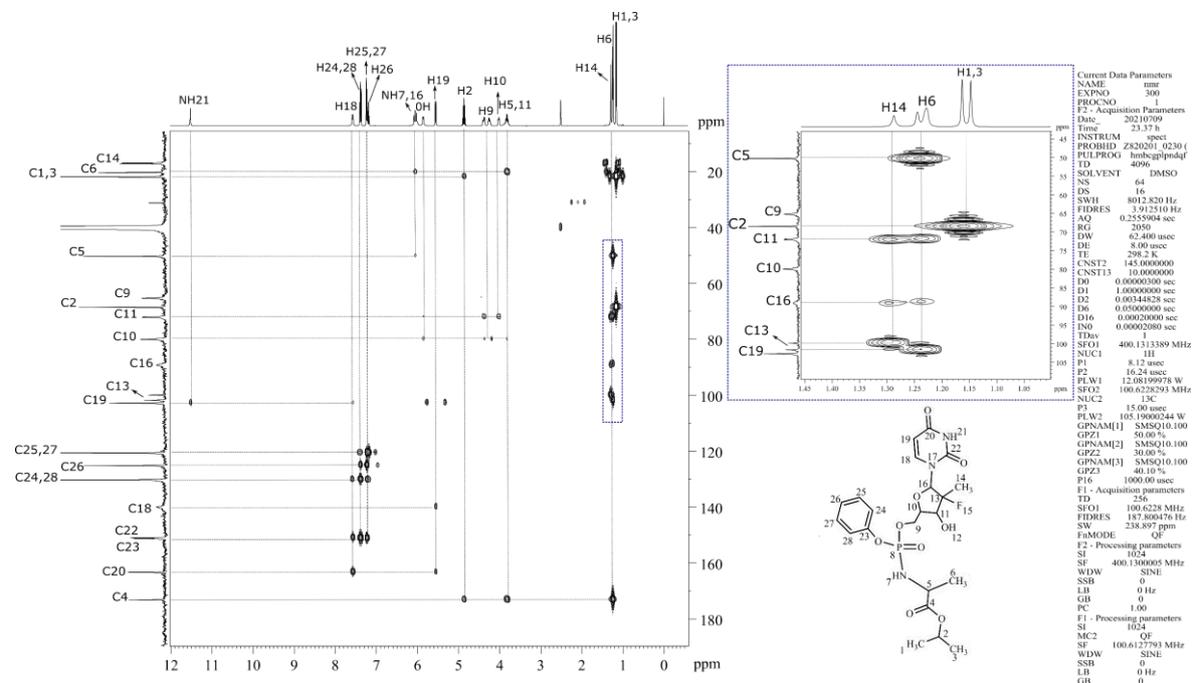
Anexo 3. Expansão do espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do sofosbuvir em DMSO.



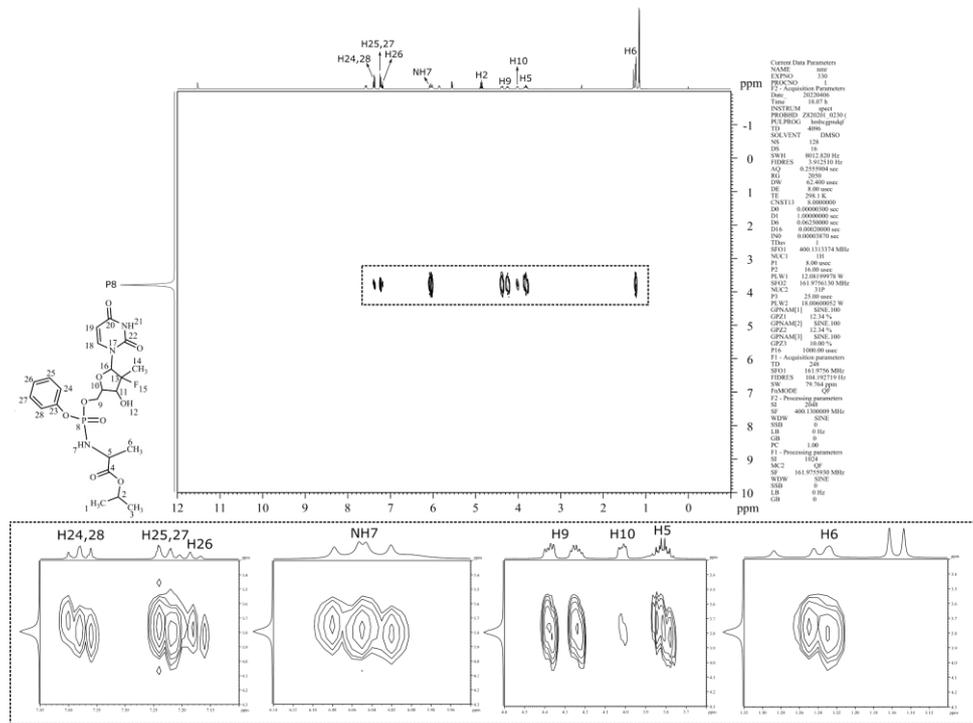
Anexo 4. Mapa de contorno $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY do sofosbuvir em DMSO.



Anexo 5. Mapa de contorno $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\}$ HSQC do sofosbuvir em DMSO.

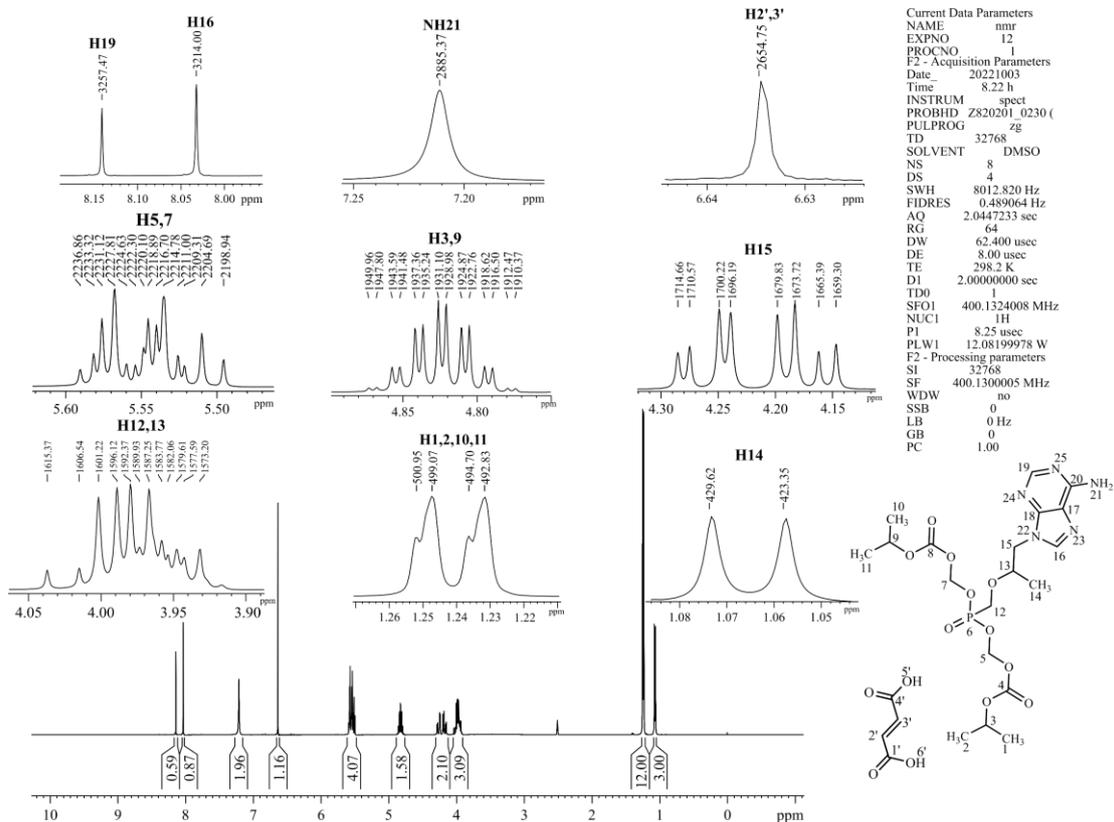


Anexo 6. Mapa de contorno $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\}$ HMBC (400 MHz) do sofosbuvir em DMSO.

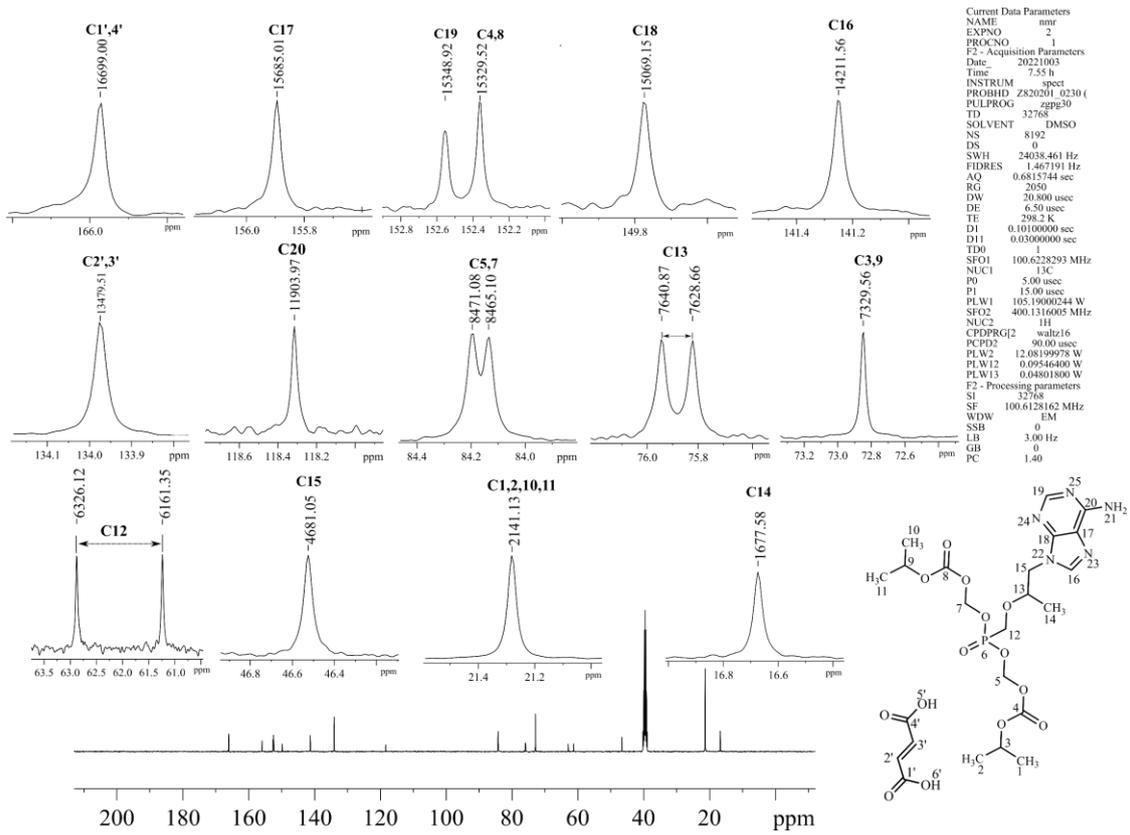


Anexo 7. Mapa de contorno $^1\text{H}\{-^{31}\text{P}\}$ HMBC do sofosbuvir em DMSO.

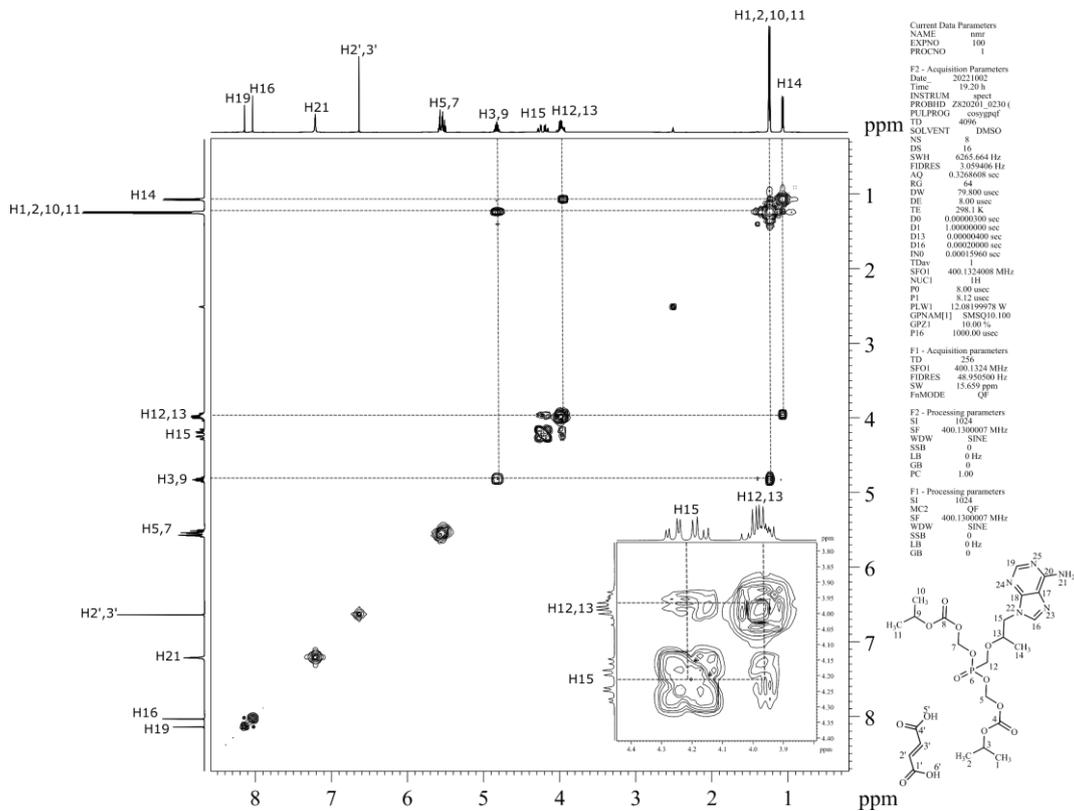
Caracterização do Tenofovir disoproxil fumarato



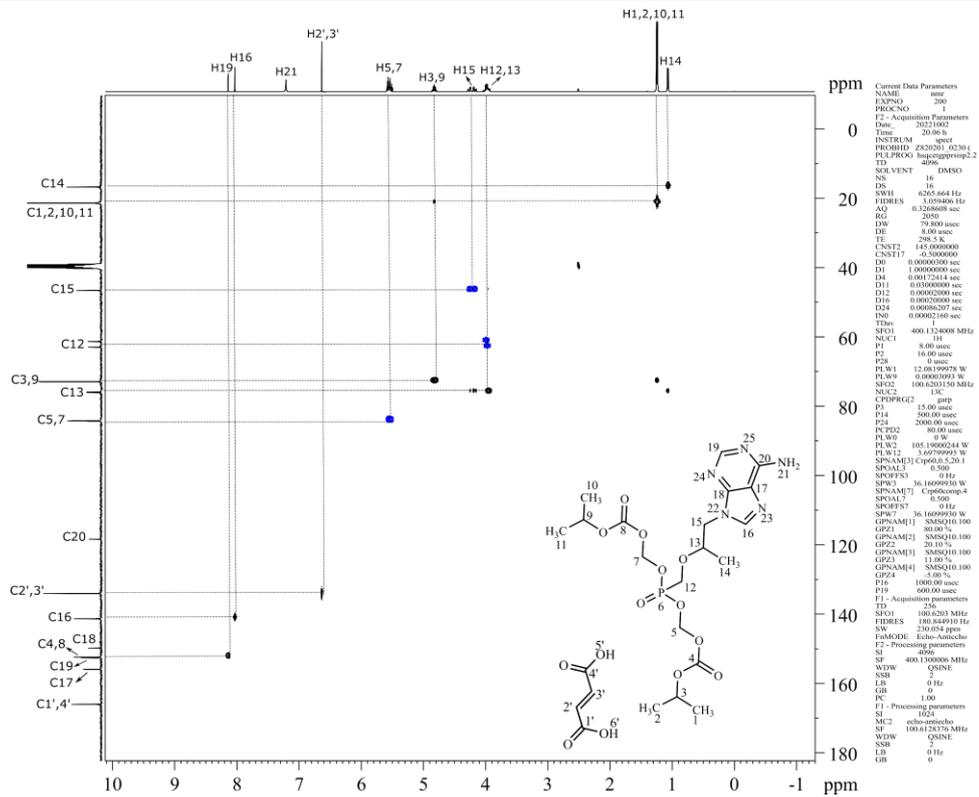
Anexo 8. Espectros de RMN de ^1H com saturação da hidroxila do solvente e com assinalamento dos átomos de hidrogênio do tenofovir disoproxil fumarato, em DMSO.



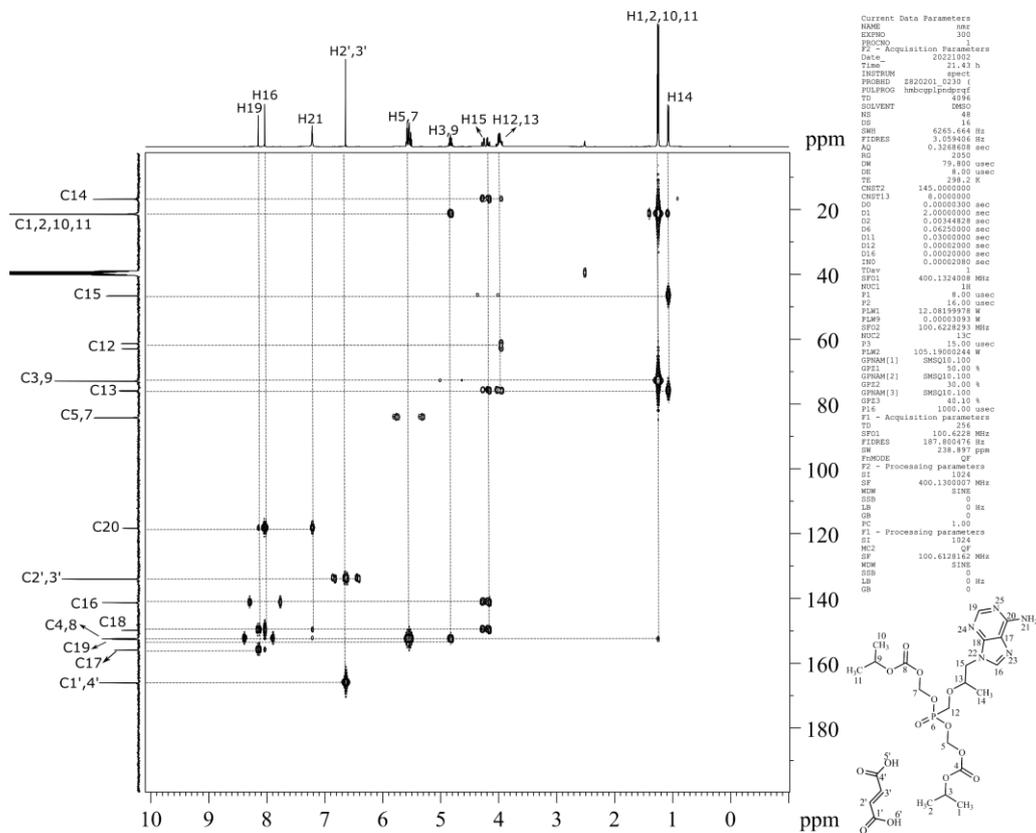
Anexo 9. Expansão do espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do sofosbuvir em DMSO.



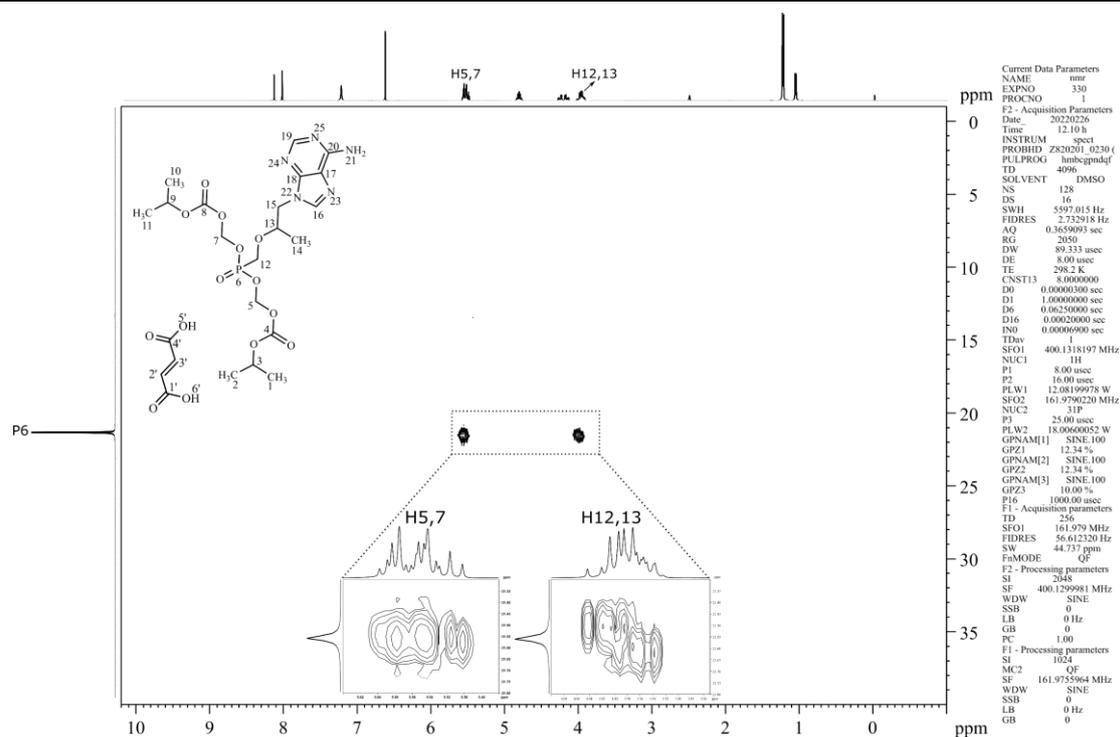
Anexo 10. Mapa de contorno $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY do tenofovir disoproxil fumarato em DMSO.



Anexo 11. Mapa de contorno $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\}$ HSQC editado do tenofovir disoproxil fumarato em DMSO.

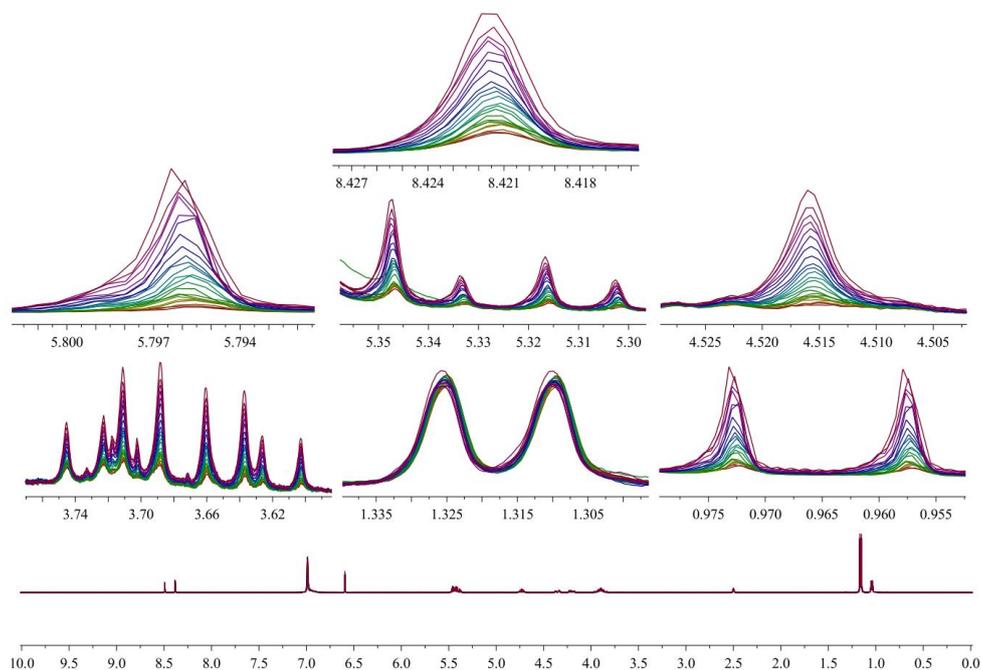


Anexo 12. Mapa de contorno $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\}$ HMBC do tenofovir disoproxil fumarato em DMSO.

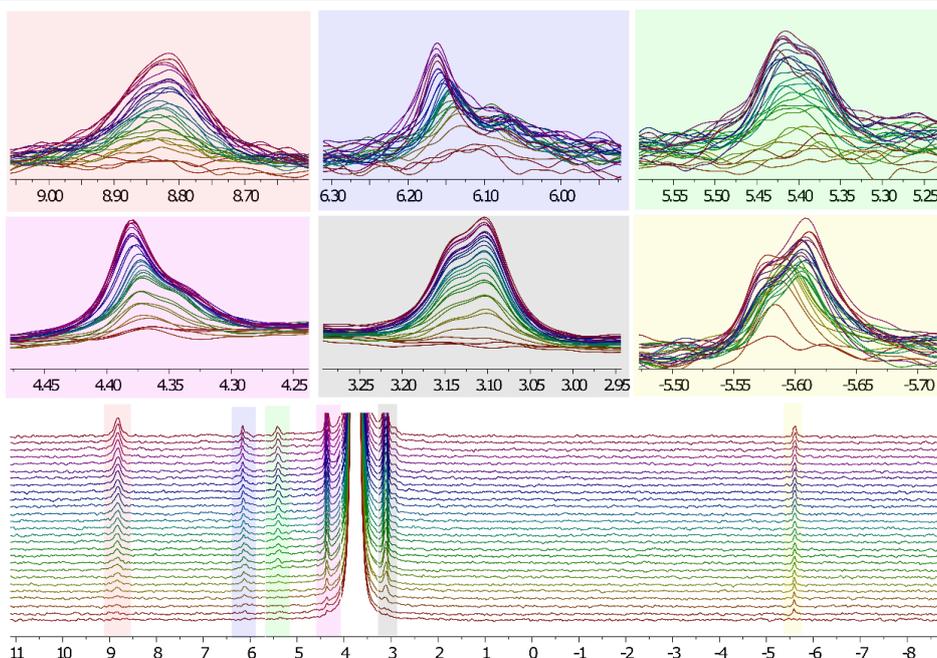


Anexo 13. Mapa de contorno $^1\text{H}\{-^{31}\text{P}\}$ HMBC do tenofovir disoproxil fumarato em DMSO.

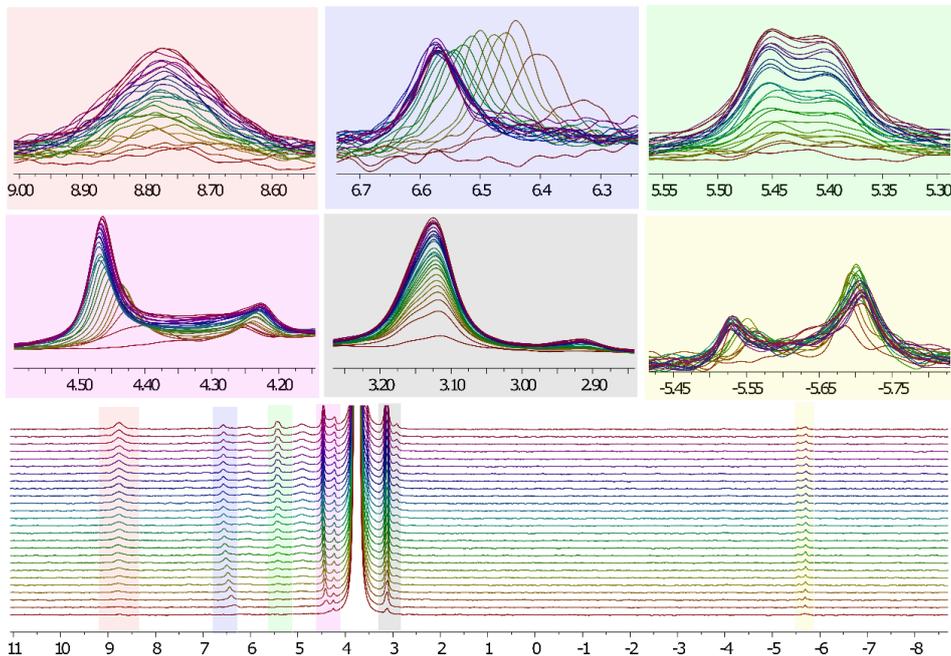
Caracterização das misturas



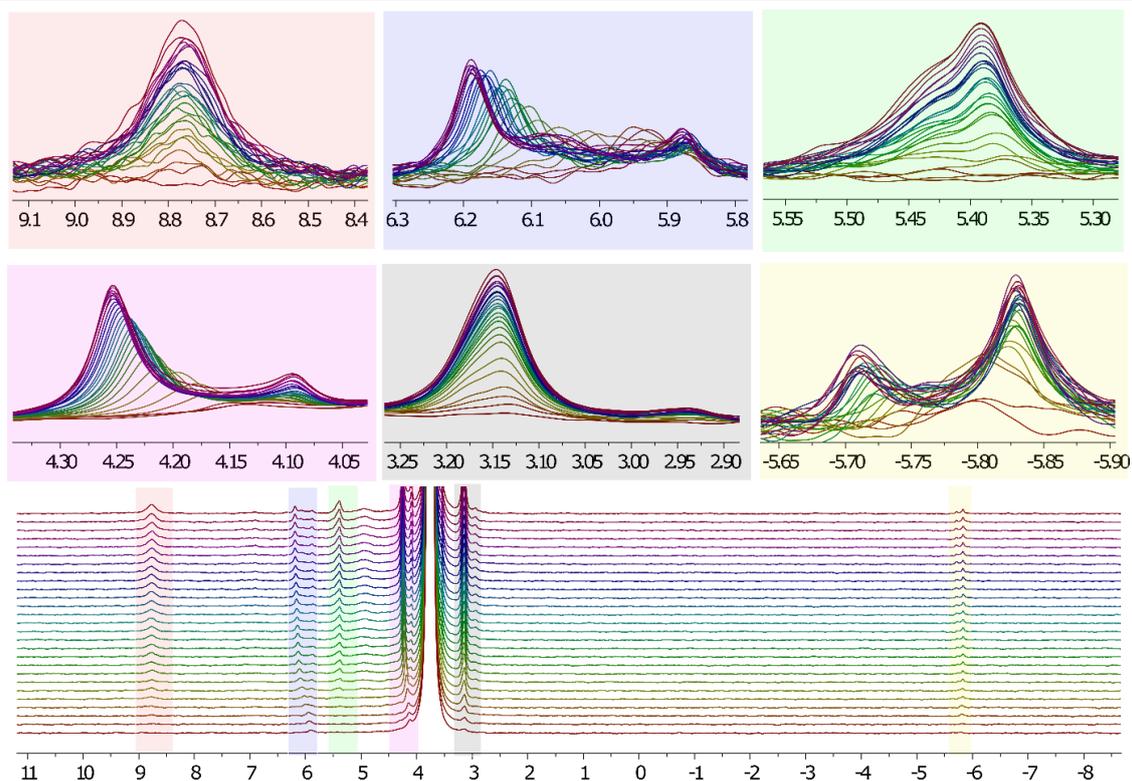
Anexo 14. RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, DMSO). Acompanhamento da reação por 24 horas da degradação ácida do Tenofovir na concentração de $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de DCI, as regiões expandidas destaca a formação dos produtos de degradação com o tempo.



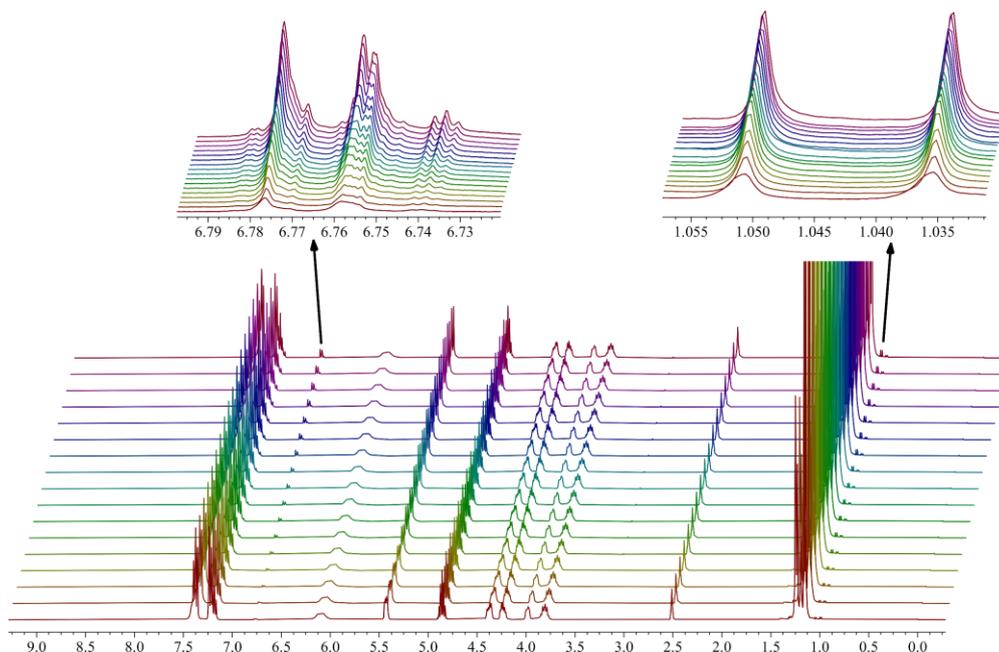
Anexo 15. Espectros de ^{31}P obtidos durante 48 horas de teste de estresse alcalino, na expansão são apresentados os produtos de degradação formados com o tempo. Os espectros representados nesta figura foram adquiridos a cada 52 minutos, na figura são apresentados apenas metade do total de 52 espectros obtidos em 48 horas para melhor visualização. A condição de degradação foi de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOD.



Anexo 16. Espectros de ^{31}P obtidos durante 48 horas de teste de estresse alcalino do sofobuvir, na expansão são apresentados os produtos de degradação formados com o tempo. Os espectros representados nesta figura foram adquiridos a cada 52 minutos, na figura são apresentados apenas metade do total de 52 espectros obtidos em 48 horas para melhor visualização. A condição de degradação foi de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOD.

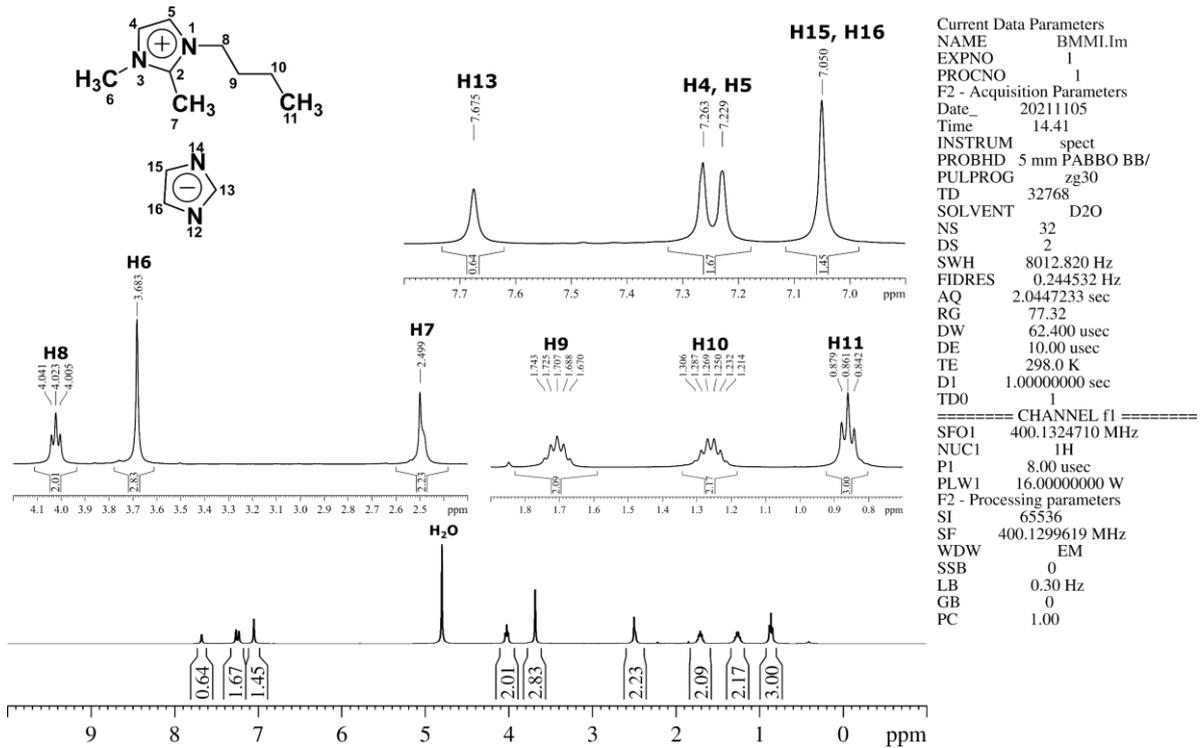


Anexo 17. Espectros de ^{31}P obtidos durante 48 horas de teste de estresse alcalino, na expansão são apresentados os produtos de degradação formados com o tempo. Os espectros representados nesta figura foram adquiridos a cada 52 minutos, na figura são apresentados apenas metade do total de 52 espectros obtidos em 48 horas para melhor visualização. A condição de degradação foi de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOD.

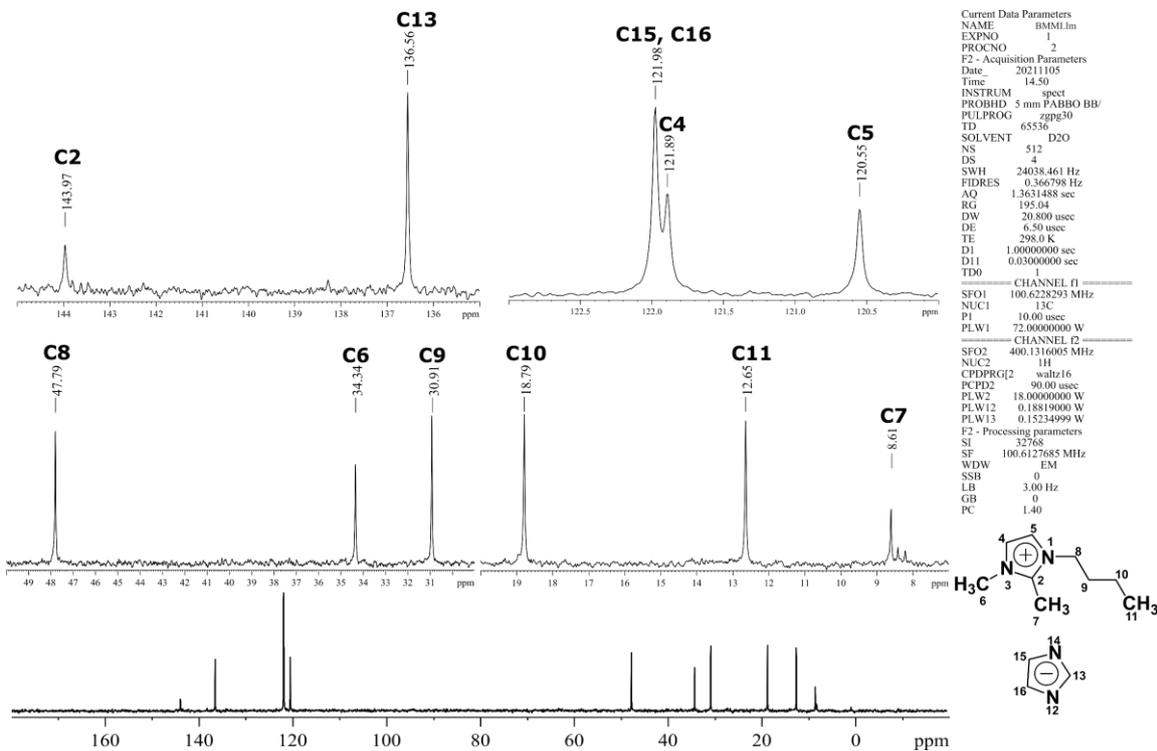


Anexo 18. Espectros de ^1H obtidos durante 24 horas de teste de estresse alcalino do sofosbuvir, na expansão são apresentados os produtos de degradação formados com o tempo. A condição de degradação foi de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOD.

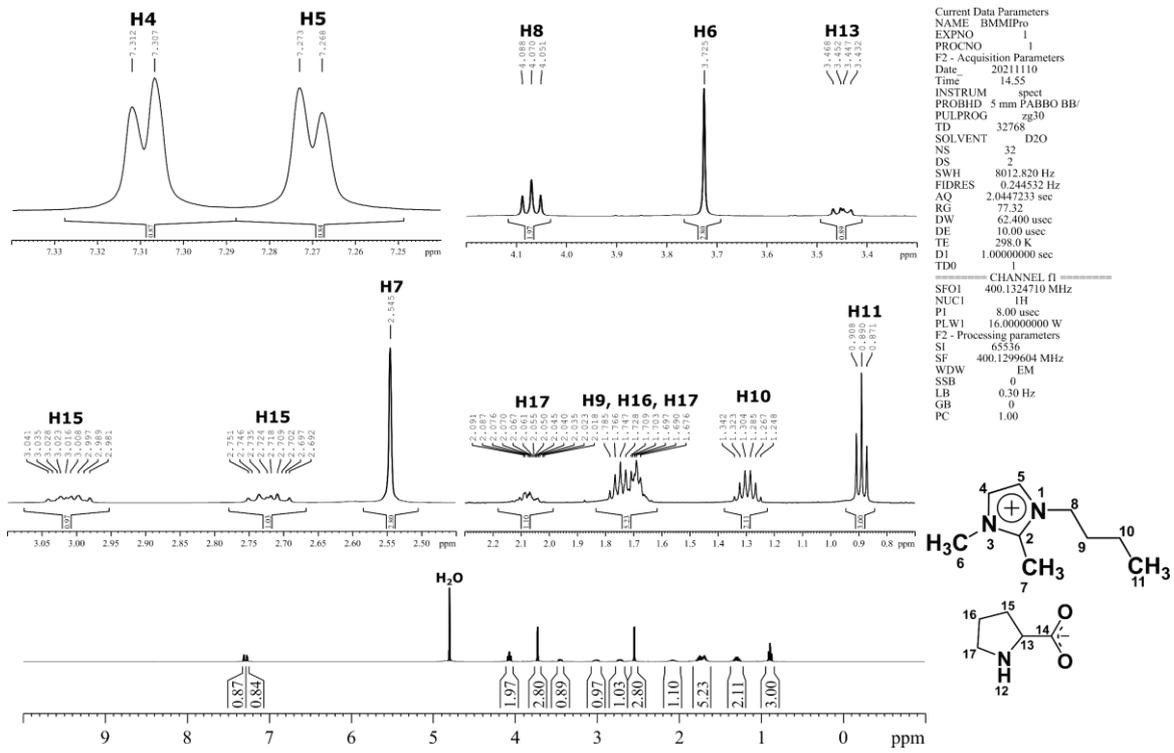
Deuteração de fármacos



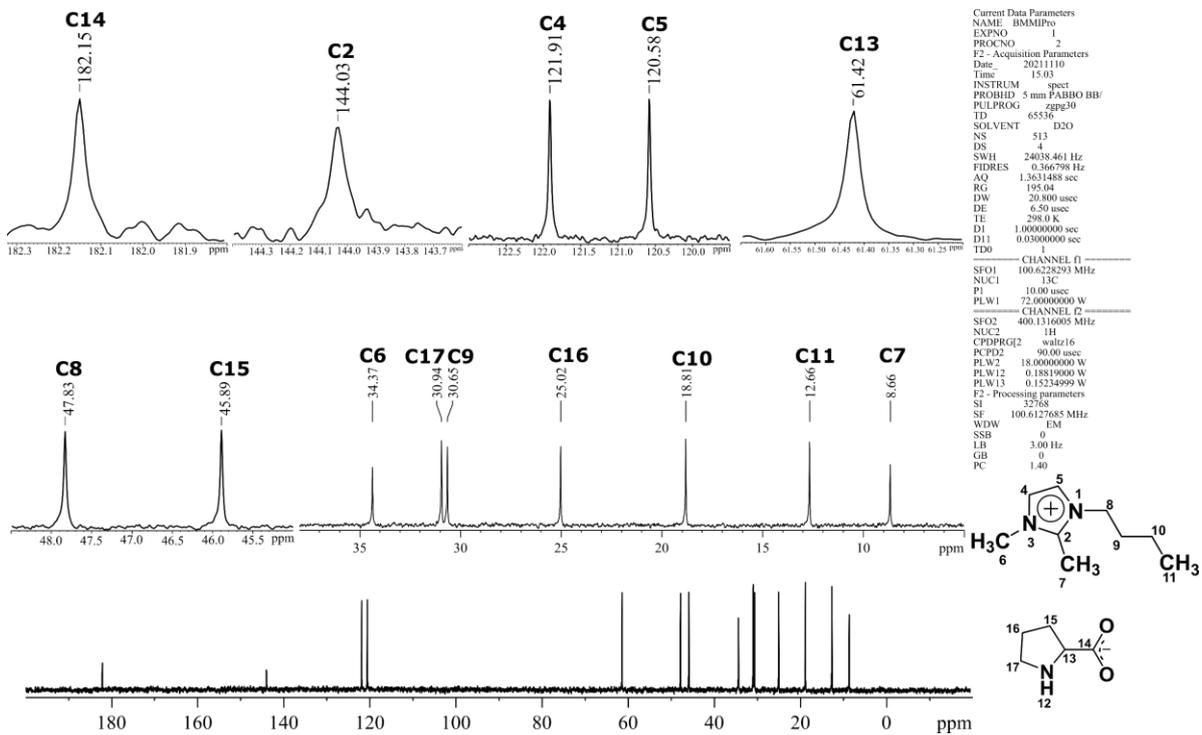
Anexo 19. Espectro de RMN de ¹H e estrutura molecular de BMMI.Im.



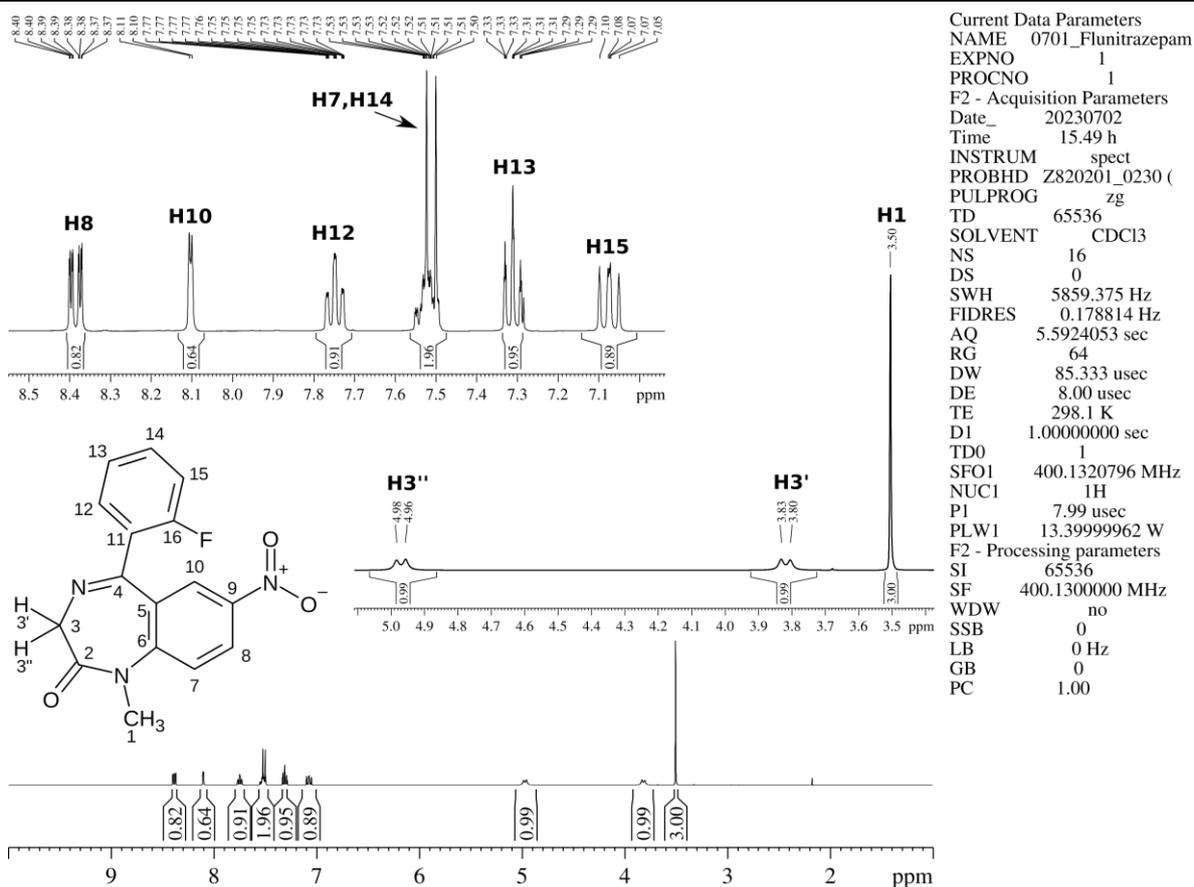
Anexo 20. Espectro de RMN de ¹³C{¹H} e estrutura molecular de BMMI.Im.



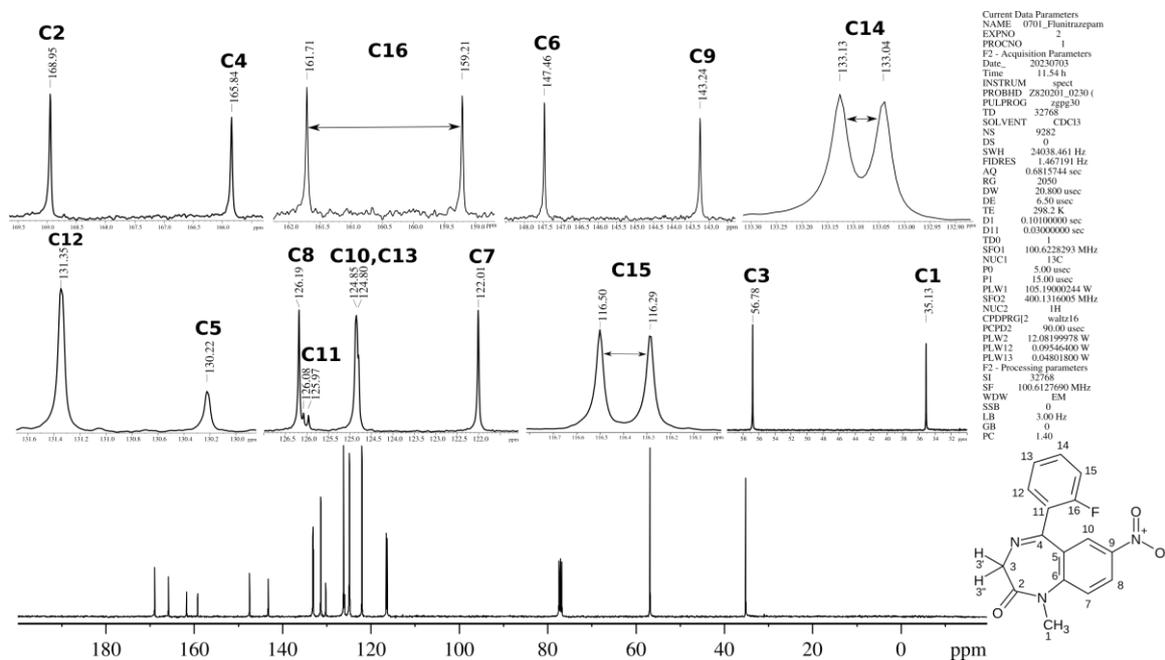
Anexo 21. Espectro de RMN de ¹H e estrutura molecular de BMMI.Pro.



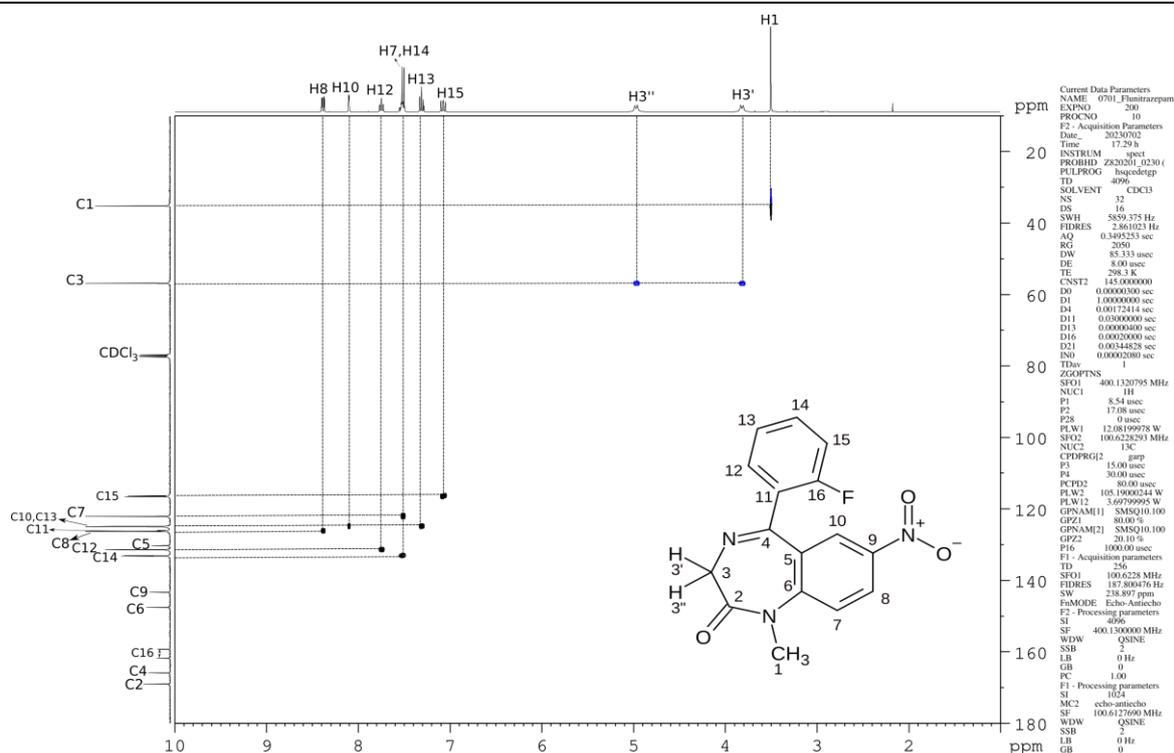
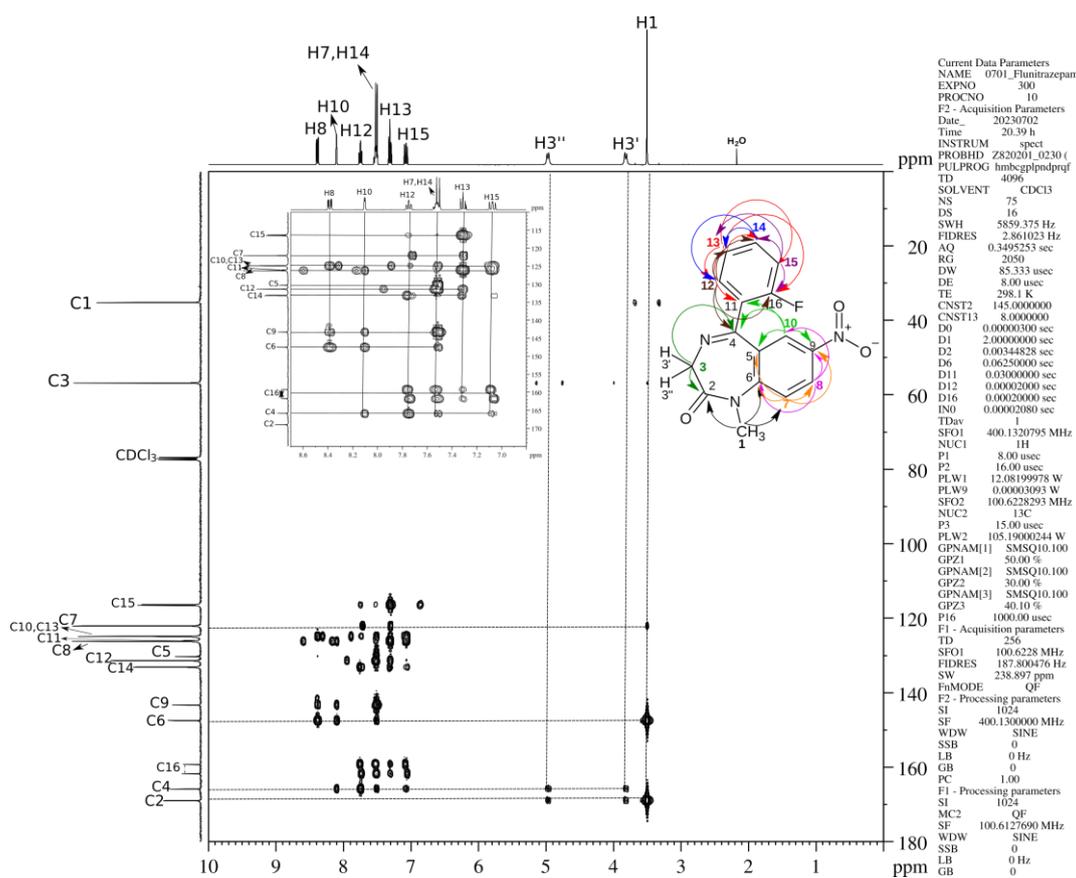
Anexo 22. Espectro de RMN de ¹³C{¹H} e estrutura molecular de BMMI.Pro.

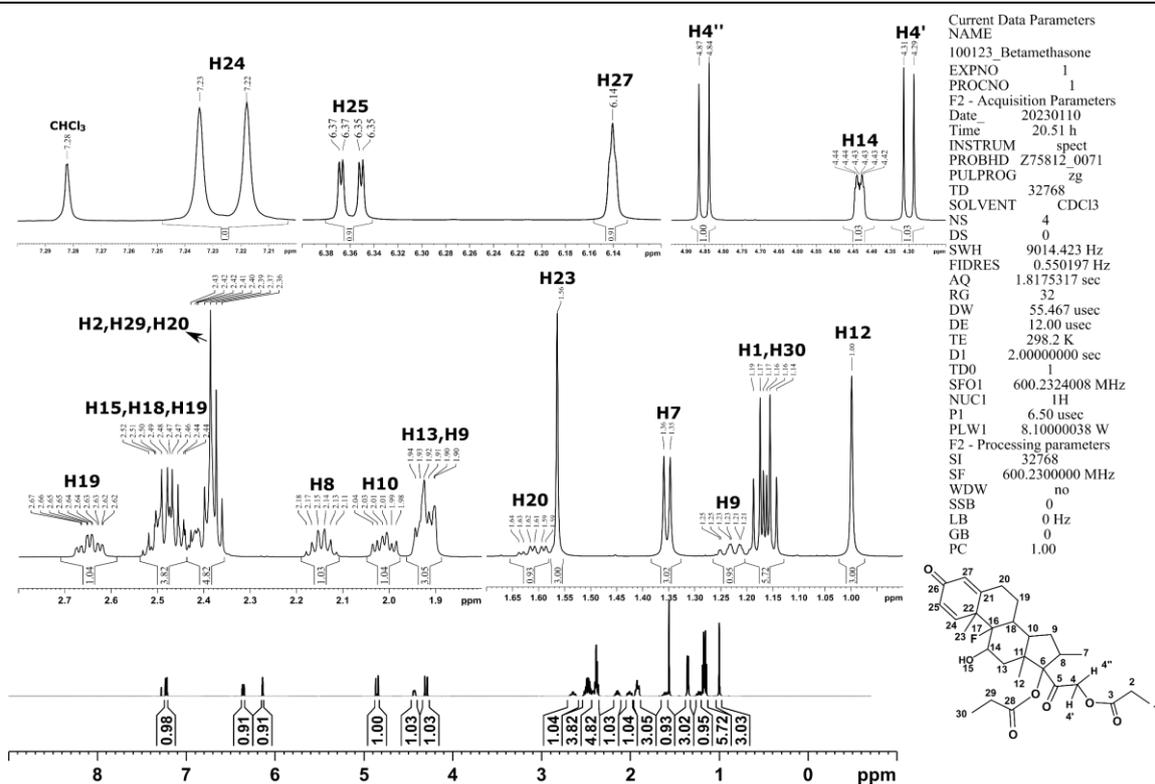


Anexo 23. Espectro de RMN de ¹H e estrutura molecular do composto (1).

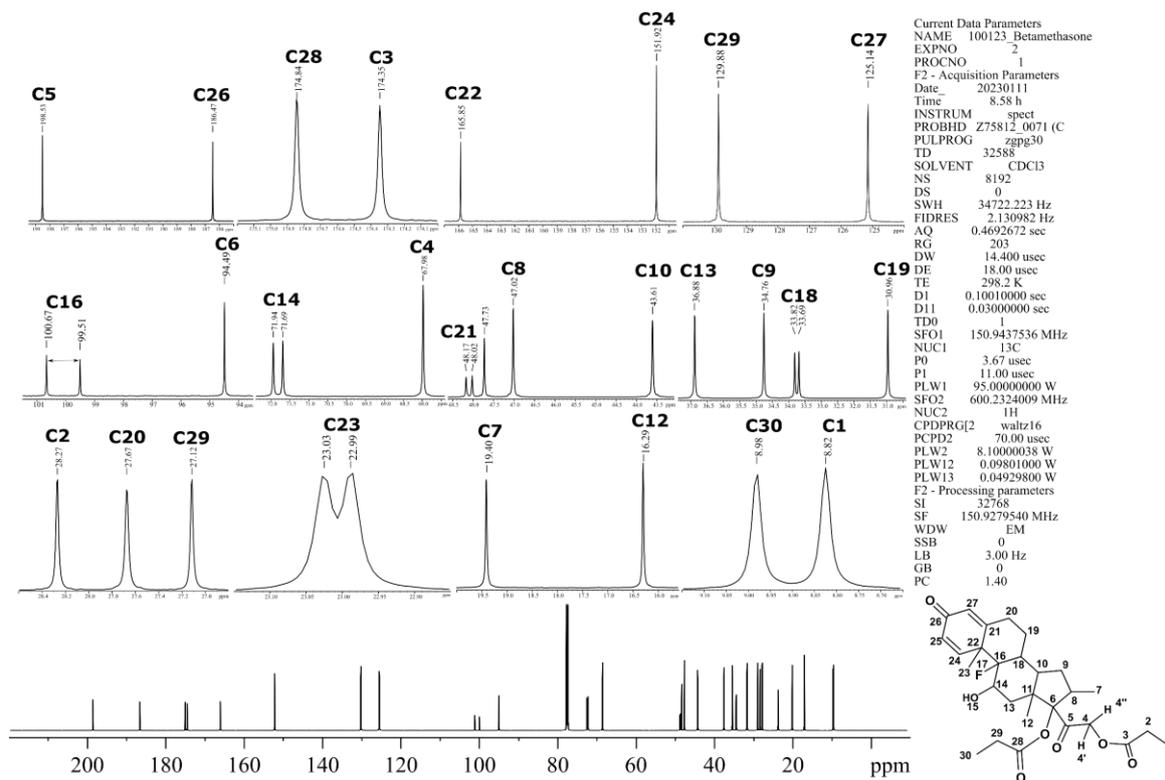


Anexo 24. Espectro de RMN de ¹³C{¹H} e estrutura molecular do composto (1).

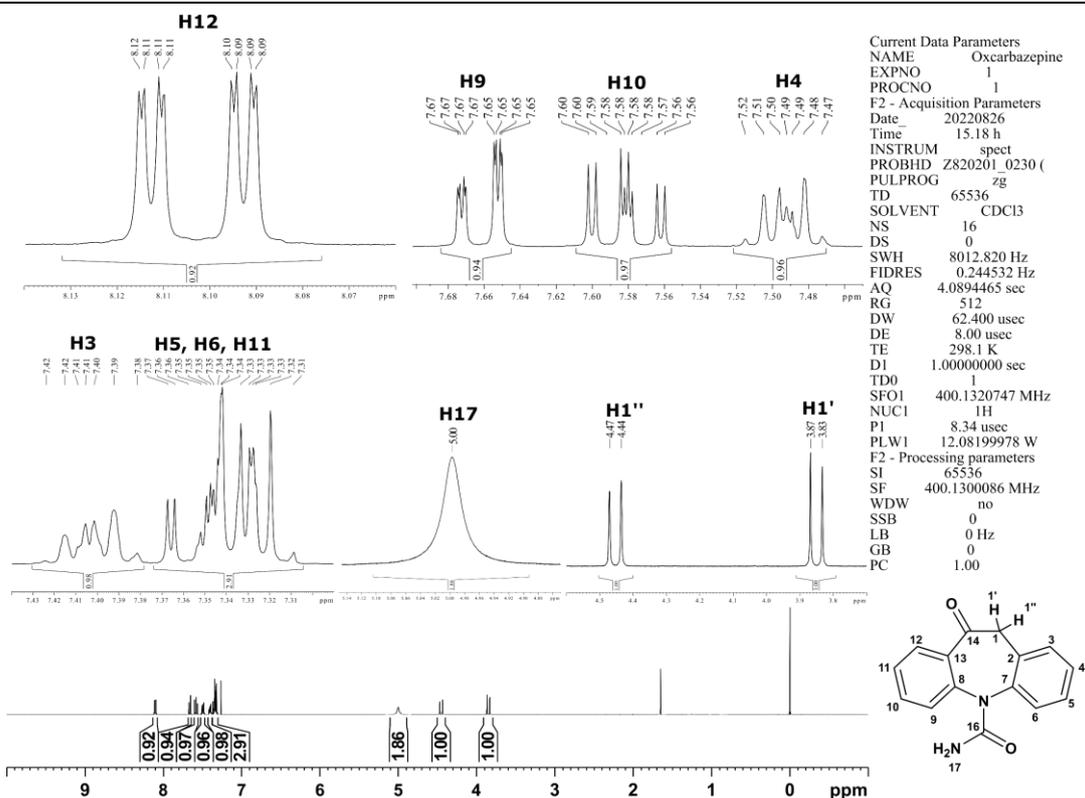
Anexo 25. Mapa de contorno $^1\text{H}-\{^{13}\text{C}\}$ HSQC e estrutura molecular do composto (1).Anexo 26. Mapa de contorno $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - HMBC do e estrutura molecular do composto (1).



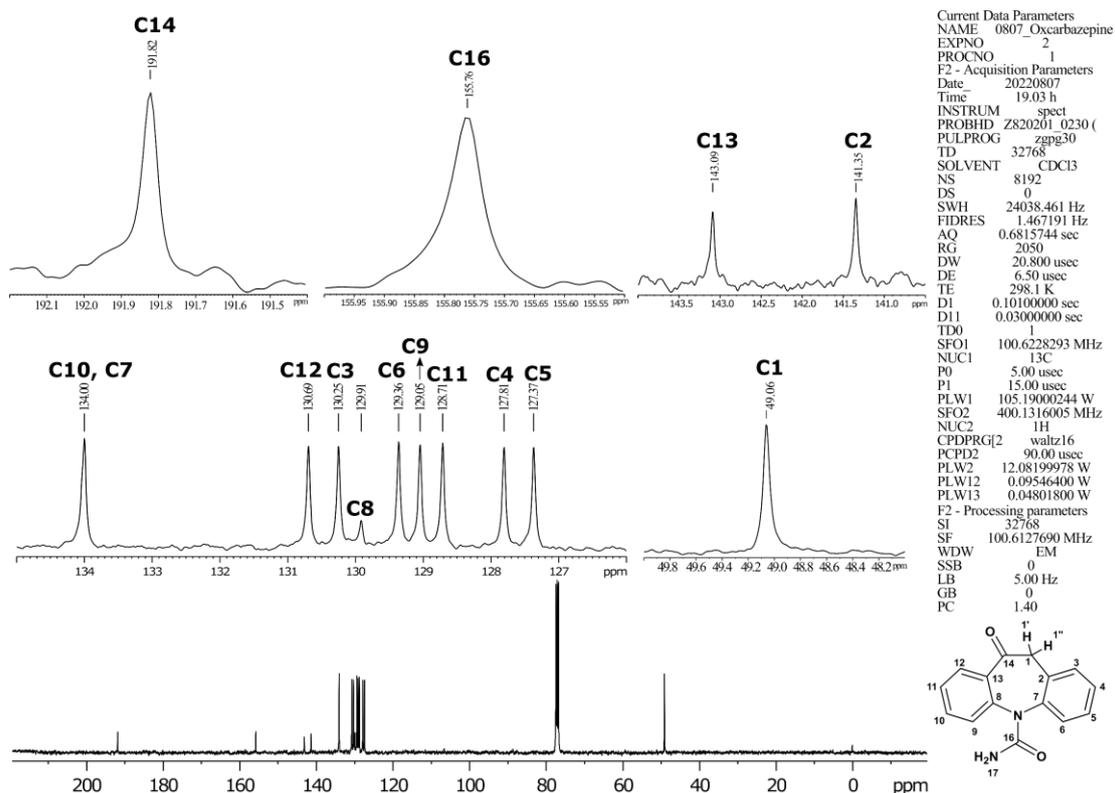
Anexo 27. Espectro de RMN de ^1H e estrutura molecular do composto (2).



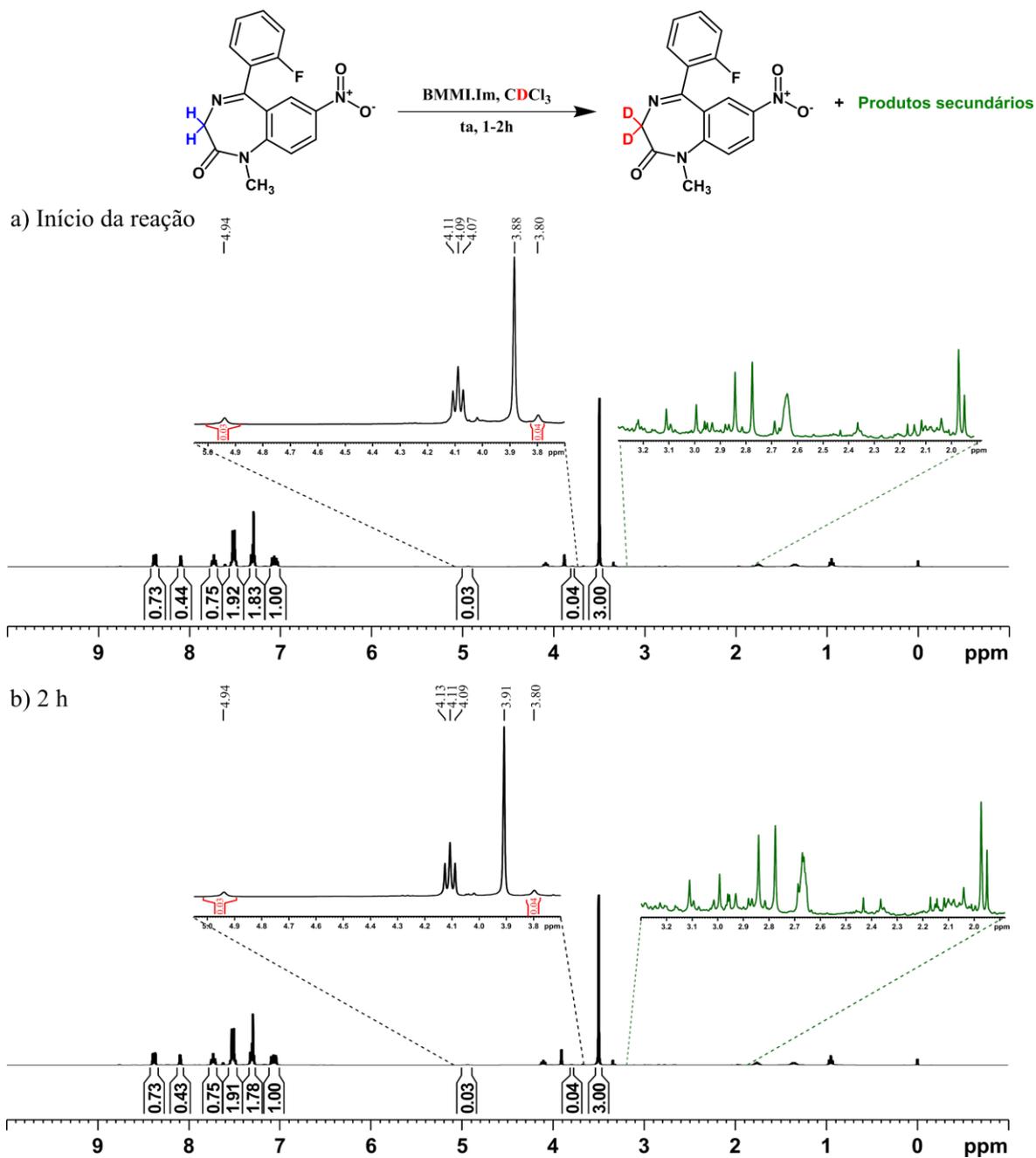
Anexo 28. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e estrutura molecular do composto (2).



Anexo 29. Espectro de RMN de ¹H e estrutura molecular do composto (3).

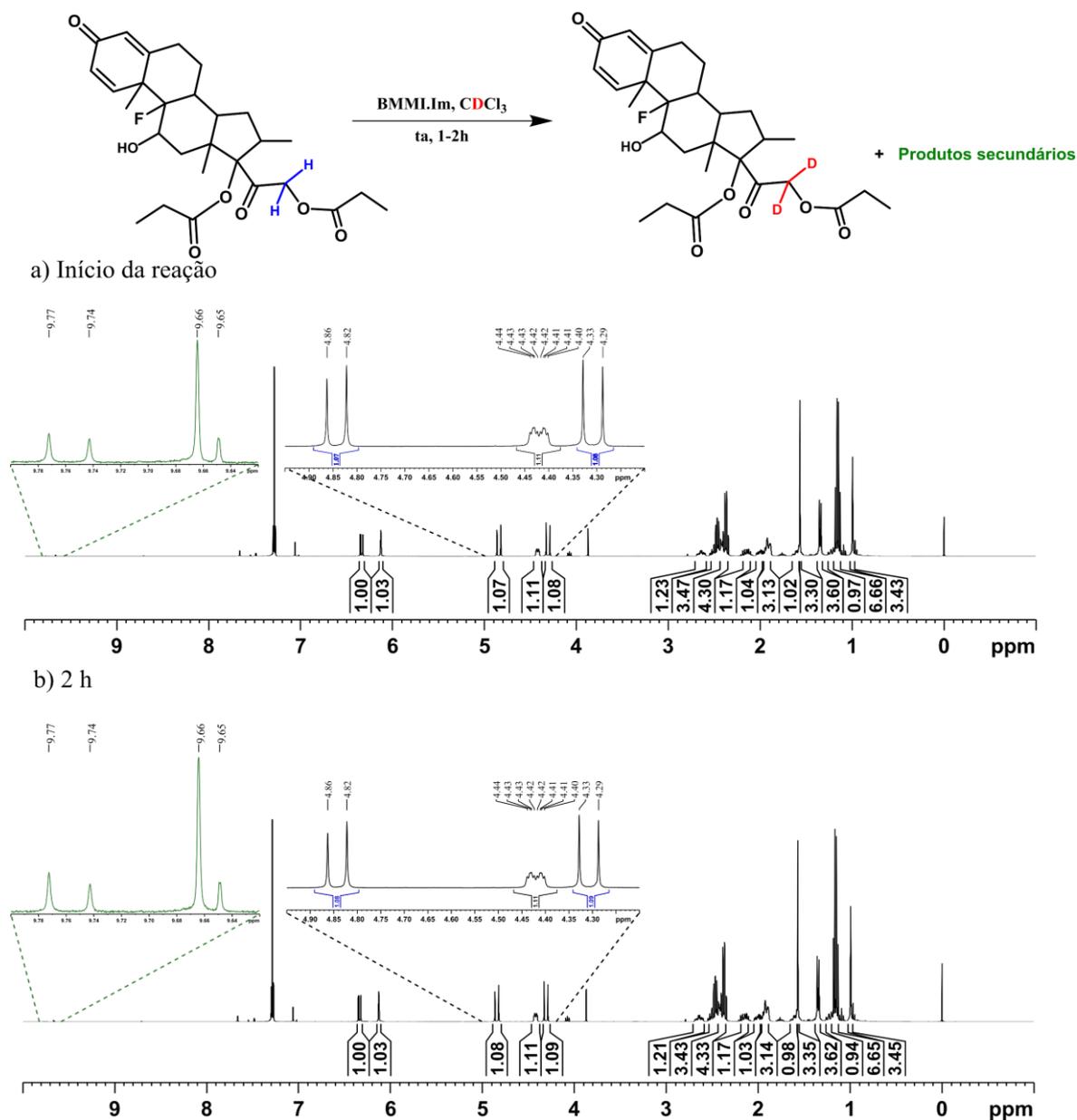


Anexo 30. ¹³C {¹H}-NMR spectrum and molecular structure of compound (3).



Anexo 31. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, CDCl_3) de (1) deuterado com BMMI.Im.

(a) Início da reação. (b) Após 2 horas (Tabela 1, Entrada 1).

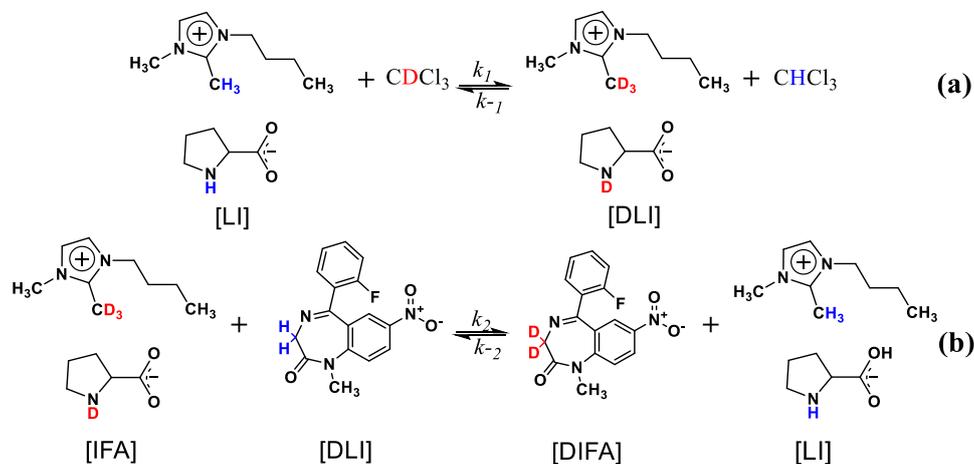


Anexo 32. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, CDCl_3) de (2) deuterado com BMMI-Im.

(a) Início da reação. (b) Após 2 horas (Tabela 1, Entrada 2).

Experimentos cinético

Anexo 33. Etapas da reação de deuteração do fármaco (**1**). Etapa 1: formação do DLI (intermediário); Etapa 2: produção de IFA (**1**) deuturado. Derivação matemática da equação de pseudo primeira ordem reversível moodificada para estudo cinético (Equações A1-A9).



Considerando que as duas reações (a) e (b) estão em equilíbrio, temos a (Equação A1-A2):

$$\frac{d[LI]}{dt} = -k_1[LI][D_{solv}] + k_{-1}[DLI][solv] + k_2[DLI][IFA] - k_{-2}[LI][DIFA] \quad \text{(Equação A1)}$$

$$\frac{d[IFA]}{dt} = -k_2[DLI][IFA] + k_{-2}[LI][DIFA] \quad \text{(Equação A2)}$$

Portanto sabemos que:

$$IFA_0 = [IFA] + [DIFA] \quad \text{e} \quad [DIFA] = IFA_0 - [IFA] \quad \text{(Equação A3)}$$

Assumindo que a primeira etapa é mais rápida que a segunda, pode-se admitir que (Equação A4-A5):

$$[DLI] = constant, \quad k'_2 = k_2[DLI] \quad \text{(Equação A4)}$$

$$[LI] = constant, \quad k'_{-2} = k_{-2}[LI] \quad \text{(Equação A5)}$$

Onde k'_2 e k'_{-2} são constantes de pseudoprimeira ordem. Podemos reescrever a Equação A2:

$$\frac{d[IFA]}{dt} = -k'_2[IFA] + k'_{-2}(IFA_0 - [IFA]) = k'_{-2}IFA_0 - (k'_2 + k'_{-2})[IFA] \quad \text{(Equação A6)}$$

Definindo uma variável auxiliar e rearranjando a equação, temos (Equação A7)

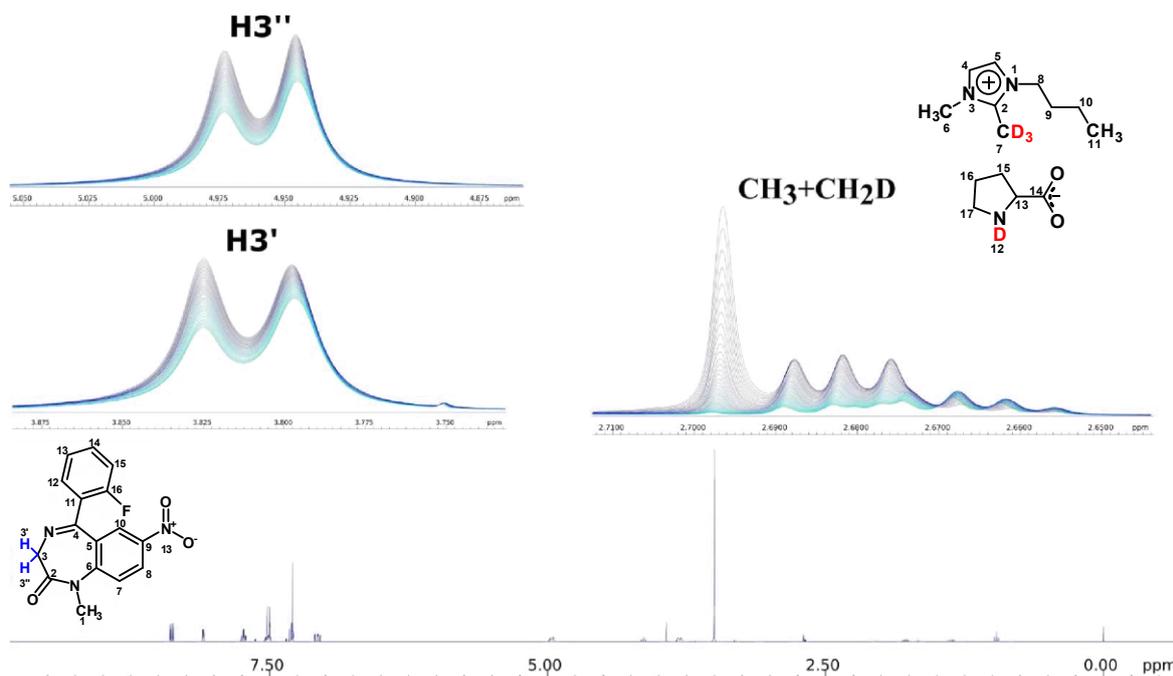
$$[IFA] = \frac{k'_{-2}IFA_0 + k'_2IFA_0 e^{-(k'_2 + k'_{-2})t}}{k'_2 + k'_{-2}} \quad \text{(Equação A7)}$$

Considerando que, quando $t \rightarrow \infty$: $[IFA] \rightarrow [IFA]_{eq}$ (Equação A8-A9):

$$[IFA]_{eq} = \frac{k'_{-2} IFA_0}{k'_2 + k'_{-2}} \quad \text{(Equação A8)}$$

Assim:

$$[IFA] = [IFA]_{eq} + \left(\frac{k'_2}{k'_2 + k'_{-2}} \right) IFA_0 e^{-(k'_2 + k'_{-2})t} \quad \text{(Equação A9)}$$



Anexo 34. Estudo de cinética por RMN de ^1H (400 MHz, 25 °C, CDCl_3) de **(1)** ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) com $0,03 \text{ mol.L}^{-1}$ de BMMI.Pro: primeira hora, 46 espectros e a expansão dos sinais de deuteração.

$[IFA] = [IFA]_{eq} + \left(\frac{k'_2}{k'_2 + k'_{-1}} \right) IFA_0 e^{-(k'_2 + k'_{-2})t}$					
[1]					
[LI]	0,20	0,25	0,30	0,35	Variáveis
	$2,469 \pm 0,038 \times 10^{-4}$	$1,114 \pm 0,016 \times 10^{-4}$	$1,408 \pm 0,030 \times 10^{-4}$	$1,276 \pm 0,052 \times 10^{-4}$	$k'_2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$
0,06	$0,125 \pm 0,016 \times 10^{-4}$	$0,0668 \pm 0,0043 \times 10^{-4}$	$0,0341 \pm 0,0088 \times 10^{-4}$	$0,853 \pm 0,140 \times 10^{-4}$	$k'_{-2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
	0,012	0,017	0,018	0,029	[IFA] _{eq}
	19,657	16,661	41,290	14,957	K'_2

Anexo 35. Equação de ajuste cinético e constantes de taxa direta/reversa como função da concentração de **(1)** (mol.L^{-1}).

Equação de Arrhenius (Equação A10):

$$k = Ae^{(-E_a/RT)} \quad \text{(Equação A10)}$$

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad \text{(Equação A11)}$$

Se tomarmos o logaritmo de ambos os lados da equação de Arrhenius, obtemos a equação para gerar um gráfico linear (Equação A11). O gráfico de $\ln(k'_2)$ vs $1/T$ (Anexo 52) resulta em uma linha com inclinação de $-E_a/R$ e uma interceptação no eixo y de $\ln(A)$.

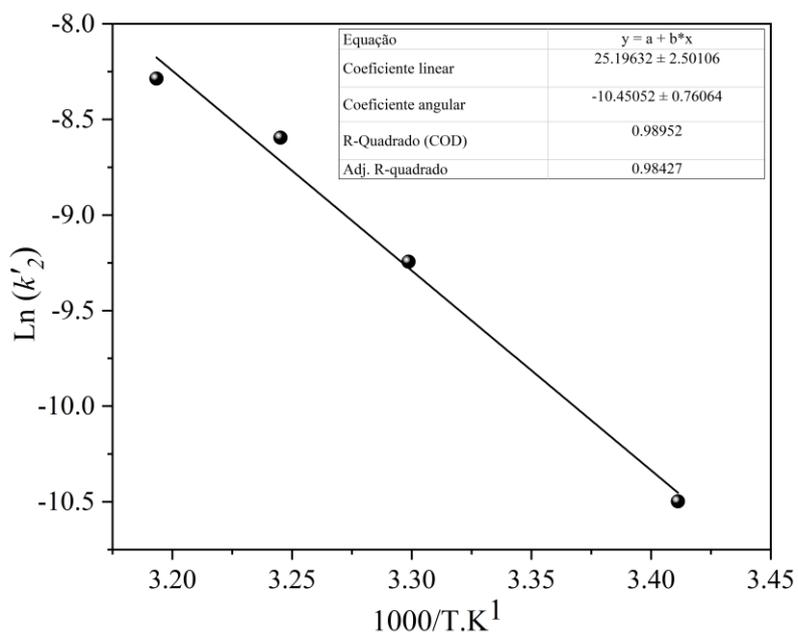
Para determinar o valor de ΔG^\ddagger , a equação de Eyring é empregada (Equação A12), utilizando o valor de k'_2 de $9,67 \times 10^{-5}$ a uma temperatura de 30°C (303 K). Reorganizando a equação de Eyring, obtém-se a equação A13, que pode ser representada graficamente como uma linha reta. O gráfico de $\ln(k'_2)/T$ vs $1/T$ (Anexo 53) apresenta uma inclinação que corresponde a $-\Delta H^\ddagger/R$.

Por fim, para calcular o valor de ΔS^\ddagger , a equação fundamental (Equação A14) é utilizada.

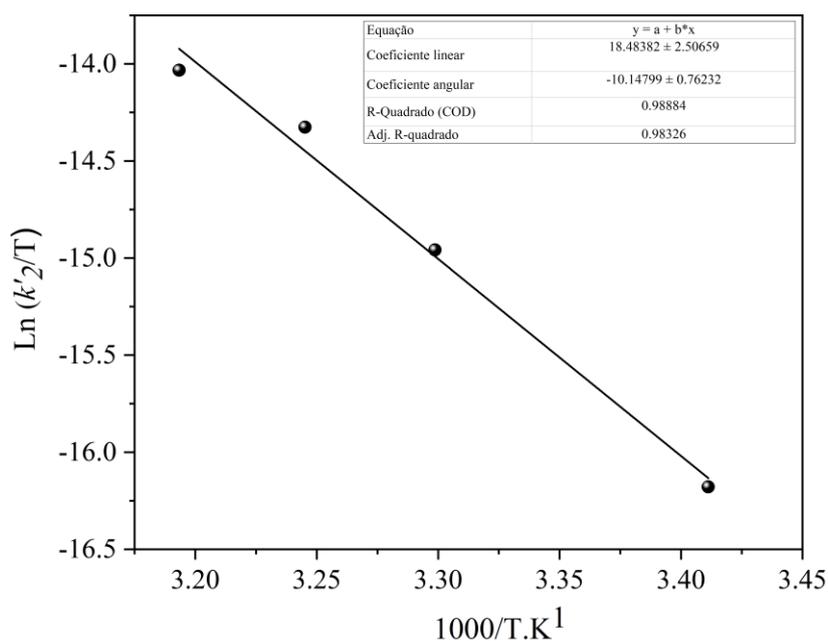
$$k = \kappa \left(\frac{k_B}{h} \right) e^{(-\Delta G^\ddagger/RT)} \quad \text{(Equação A12)}$$

$$\ln \frac{k}{T} = \frac{-\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} + \ln \kappa \frac{k_B}{T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad \text{(Equação A13)}$$

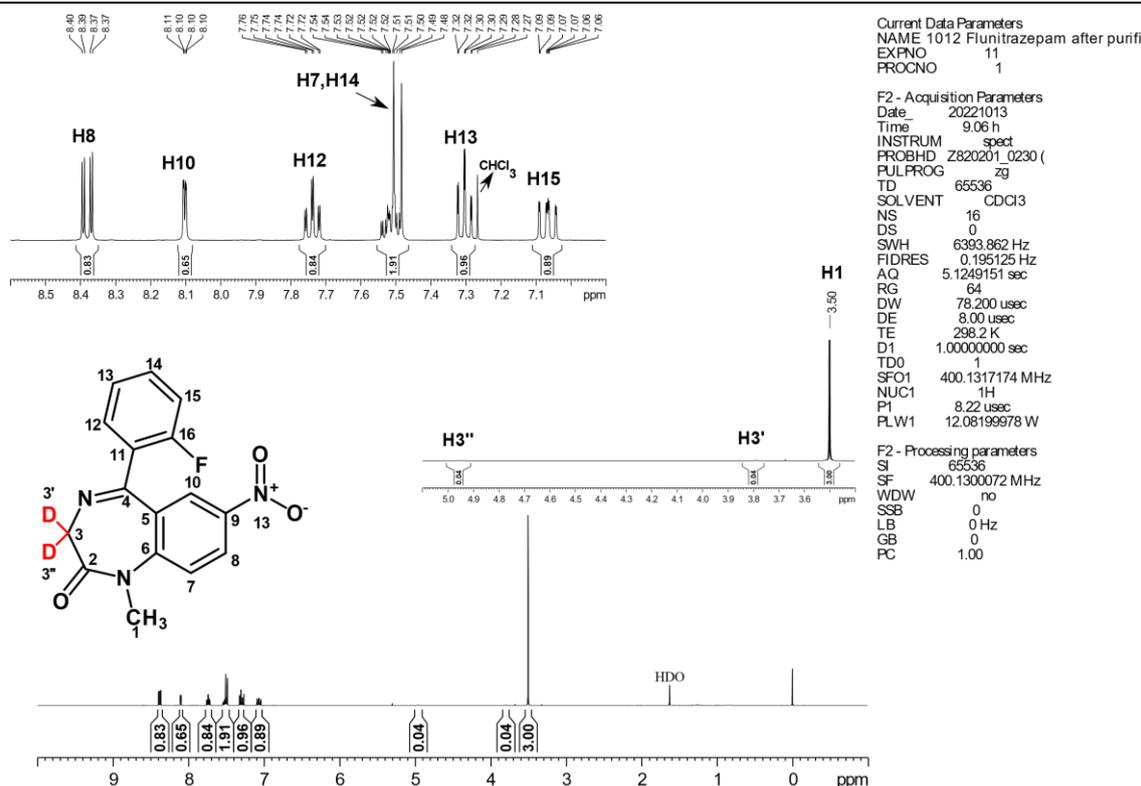
$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad \text{(Equação A14)}$$



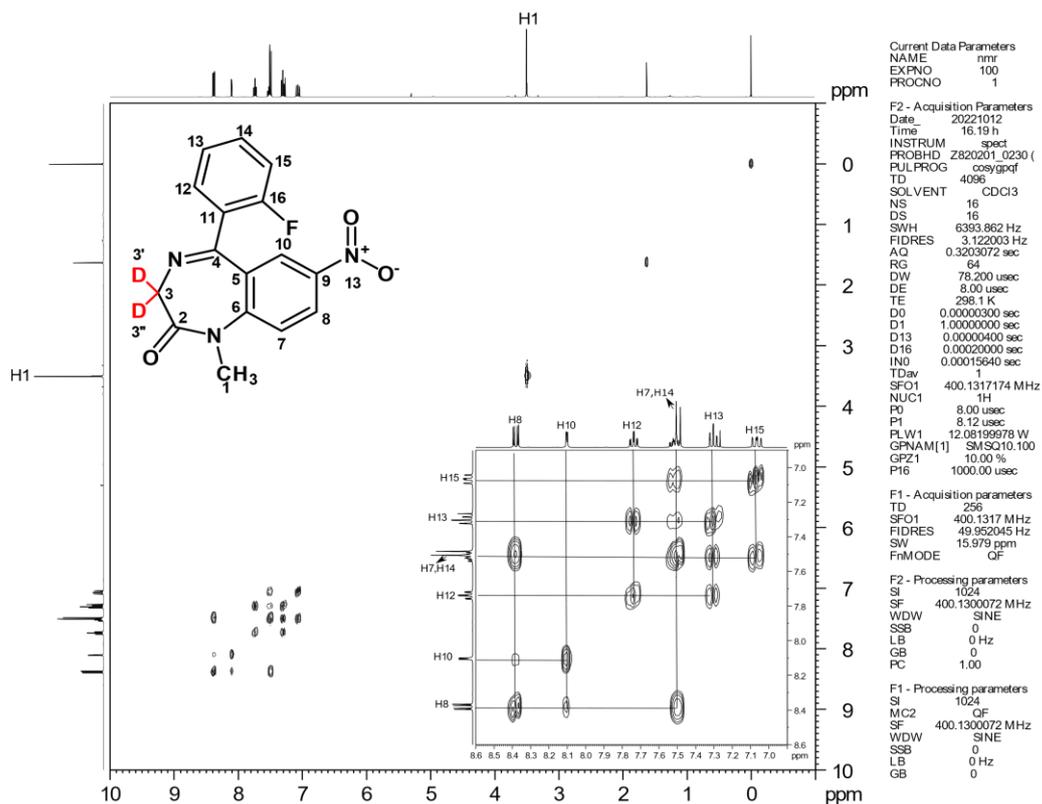
Anexo 36. Gráfico de Arrhenius para a formação de (1) deuterado com valores k'_2 , exibindo ajuste de curva com energia de ativação ($E_a = 20,78 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $\log(A) = 10,94$) da reação de troca H/D isotópica.



Anexo 37. Gráfico de Eyring para a formação de (1) deuterado com valores k_2' , exibindo resultados do ajuste de curva ($\Delta H^\ddagger = 20,18 \text{ kcal.mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = -10,43 \text{ cal.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ e $\Delta G^\ddagger = 23,35 \text{ kcal.mol}^{-1}$).



Anexo 38. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, 25 °C, CDCl_3) de (1) deuterado e purificado.



Anexo 39. Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (600 MHz, 25 °C, CDCl_3) de (1) deuterado e purificado.