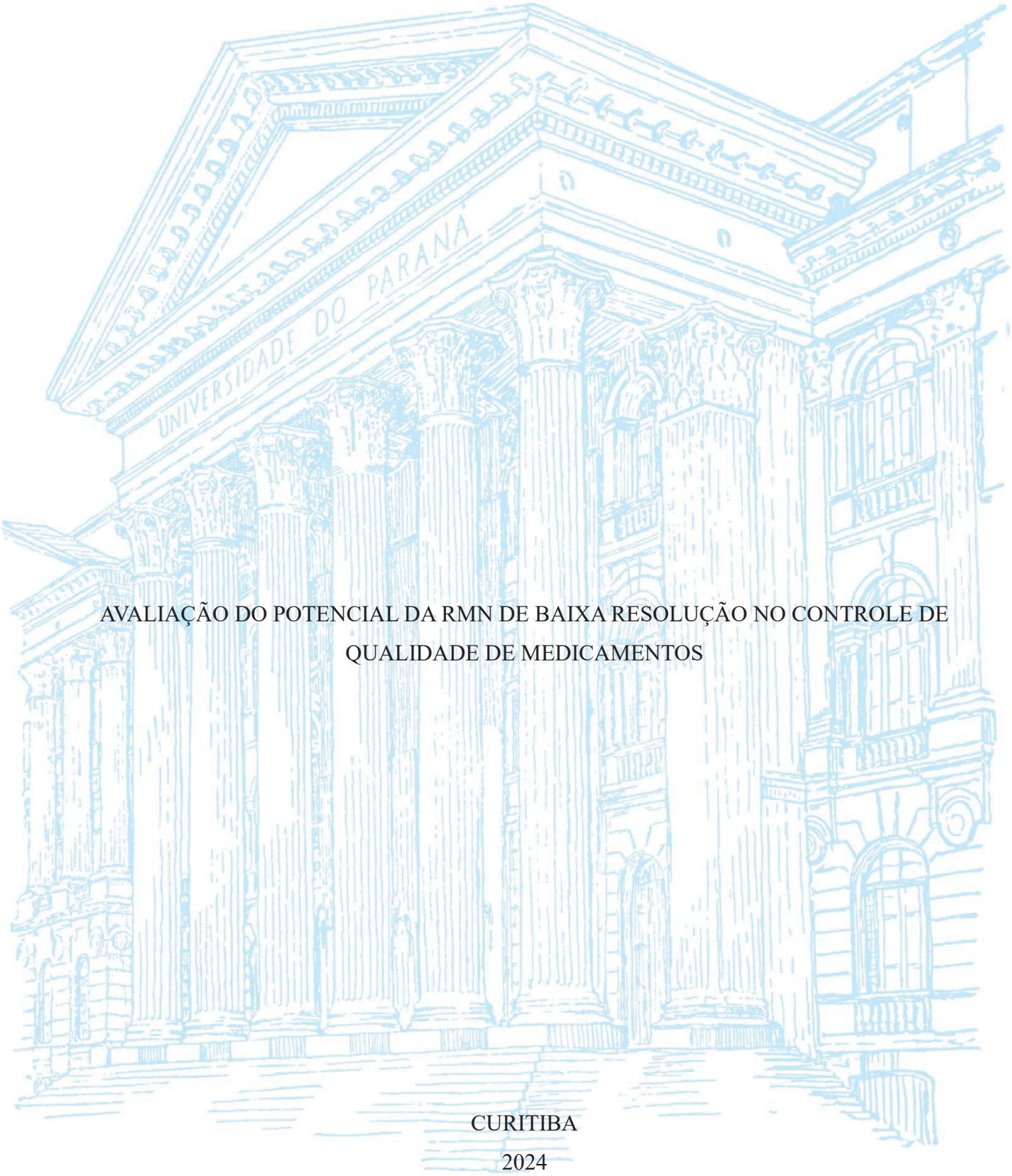
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VINICIUS KEMPER MELARA



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA RMN DE BAIXA RESOLUÇÃO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

CURITIBA

2024

VINICIUS KEMPER MELARA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA RMN DE BAIXA RESOLUÇÃO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Melara, Vinicius Kemper
Avaliação do potencial da RMN de baixa resolução no controle de qualidade de medicamentos / Vinicius Kemper Melara. – Curitiba, 2024.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Andersson Barison

1. Ressonância Magnética Nuclear. 2. Medicamentos – Controle de qualidade. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Barison, Andersson. IV . Título.

Bibliotecário: Leticia Priscila Azevedo de Sousa CRB-9/2029

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **VINÍCIUS KEMPER MELARA** intitulada: **Avaliação do potencial da RMN de baixa resolução no controle de qualidade de medicamentos**, sob orientação do Prof. Dr. ANDERSSON BARISON, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Maio de 2024.

Assinatura Eletrônica
29/05/2024 19:39:38.0
ANDERSSON BARISON
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
19/06/2024 16:37:49.0
KAHLIL SCHWANKA SALOME
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
25/06/2024 12:31:01.0
PAULO ROBERTO DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 369283
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 369283

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Edina Kemper Melara e Rogério Melara, por todo o apoio moral, emocional e financeiro, pelo incentivo inigualável, e pela oportunidade, e também aos meus irmãos, Everton e Lorenzo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Andersson Barison, por todos os ensinamentos durante o período do mestrado, pela confiança depositada em mim, pelo suporte intelectual e pelos incentivos incessantes, que fizeram ser possível a criação desta dissertação.

Agradeço à Dra. Leice Milla Ribeiro de Novais, por todos os ensinamentos passados durante o período de mestrado. Pelo apoio, críticas e debates e, principalmente, pela amizade, companheirismo e presença. Por todo o auxílio sem o qual não teria chegado aqui.

Agradeço ao Prof. Dr. Kahlil Schwanka Salomé pelo aceite em participar como membro das bancas de Qualificação e Defesa, pelas críticas e apontamentos que melhoraram o resultado final deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Roberto de Oliveira pelo aceite em participar da banca de Defesa, e pelo fundamental papel durante o período de graduação, em disciplinas, iniciação científica e trabalho de conclusão de curso, sendo o responsável por meu interesse pela RMN.

Agradeço ao Prof. Dr. Fábio Simonelli, pelos debates e sugestões levantadas durante a banca de qualificação, à Profa. Dra. Caroline Reis e à Profa. Dra. Francinete Ramos Campos pela participação como membro suplente da banca de dissertação.

Agradeço aos demais membros do LabRMN, pelo auxílio, amizade e risadas; em especial a Ma. Ana Caroline Quallio Marques, pelas histórias, apoio e ensinamentos passados.

Agradeço a meus amigos, pelos momentos de distração e apoio fundamentais durante este período.

Agradeço à Farmácia Escola UFPR, à Profa. Dr. Francinente Ramos Campos e ao Me. Eric Luiz Rossa de Moura, pelo apoio durante o mestrado. Agradeço aos servidores técnicos e secretários do Departamento de Química.

Agradeço ao Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento - LACTEC pela flexibilidade e apoio prestado na finalização do mestrado, em especial aos amigos do Laboratório de Emissões Veiculares.

Agradeço aos órgãos de fomento CNPQ, CAPES e FUNPAR, pelo incentivo financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

So it goes.

Kurt Vonnegut Jr.

RESUMO

O controle de qualidade é uma das etapas mais importantes na fabricação de medicamentos, estando relacionado diretamente com riscos à saúde pública. O rápido desenvolvimento científico da área e o constante aumento na demanda ocasionou em buscas por outras metodologias analíticas que permitam obter resultados de maneira rápida e barata. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um dos métodos espectroscópicos mais poderosos da atualidade, sendo capaz de gerar informações que permitem um total entendimento estrutural da amostra através de análises rápidas, não-destrutivas e não-específicas. Apesar disso, a RMN está pouco presente em farmacopeias globais, limitando-se a aplicações nas quais outras ferramentas não são capazes de atuar. Para contornar sua baixa sensibilidade, fator limitante da técnica, os espectrômetros de RMN se tornaram equipamentos custosos de adquirir e manter, fazendo uso de líquidos criogênicos e necessitando de infraestrutura adequada e operadores qualificados, o que tornou a sua aplicação pouco conveniente, os limitando a laboratórios especializados. Nas últimas décadas, foram desenvolvidos e aperfeiçoados os espectrômetros de RMN de baixa resolução (ou de bancada), com o propósito de possibilitar a difusão da RMN para novos ares. Estes são compactos, apresentam baixo custo de aquisição e manutenção, e são de fácil operação, operando em menores campos magnéticos, além de não necessitarem da utilização de solventes deuterados. Apresentam, porém, certas limitações quanto a suas aplicações, principalmente quanto a resolução e sensibilidade. No presente trabalho, buscou-se avaliar a potencialidade de aplicação de um espectrômetro de RMN de baixa resolução no controle de qualidade de medicamentos, mais especificamente na identificação de insumos, em análises quantitativas, e na caracterização de produtos de degradação. Para tal, utilizou-se um espectrômetro Bruker Fourier 80, operando a 1,9 T, e como comparativo foram usados os resultados obtidos em um espectrômetro de alta resolução, modelo Bruker Avance 400, operando a 9,4 T. Foram realizados experimentos de ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$, DEPT135, HSQC e HMBC. As análises quantitativas foram realizadas através do método ERETIC2. Os resultados qualitativos mostraram que, embora as limitações intrínsecas do espectrômetro de RMN de baixa resolução influenciem negativamente nas análises, os resultados obtidos apresentam qualidade suficiente para que seja possível obter informações equivalentes aos adquiridos em espectrômetros de alta resolução. A aplicação do ERETIC2 mostrou alta precisão, acurácia, reprodutibilidade e repetibilidade, sendo possível quantificar amostras de até 2,5 $mmol \cdot L^{-1}$, além de apresentar certa robustez a variações nos parâmetros de aquisições.

Palavras-chave: RMN de baixa resolução; RMN de bancada; controle de qualidade de medicamentos; RMN quantitativa; ERETIC2.

ABSTRACT

Quality control is one of the most important steps in pharmaceutical manufacturing, as it is directly related to public health risks. The fast development in this field and the constant increase in demand have led to the search of other analytical methodologies capable of obtaining results in a quicky and inexpensive manner. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is currently one of the most powerful spectroscopic methods, capable of generating information that enables a complete structural understanding of samples through fast, non-destructive, and non-specific analysis. Despite this, NMR is sparsely present on global pharmacopoeias, limited to applications where other methodologies are not capable. To overcome its low sensibility, a limiting factor in the technique, NMR spectrometers have become costly to purchase and maintain, requiring the use of cryogenic liquids, necessitating appropriate infrastructure and specialized operators, which rendered its application inconvenient, limiting itself to specialized laboratories, primarily focused on research. In recent decades, low-resolution (or benchtop) NMR spectrometers have been developed and perfected with the purpose of expanding the reach into new realms. These are compact, have low acquisition and maintenance costs, and are easy to operate, functioning with lower magnetic fields. Additionally, they do not require the use of deuterated solvents. However, they present certain limitations regarding their applications, primarily in relation with resolution and sensitivity. In this study, it was evaluated how well a low-resolution NMR spectrometer can be applied in the context of pharmaceutical quality control, assessing its capability in ingredient identification, general quantitative analysis and characterization of degradations products. For this purpose, a Bruker Fourier 80 spectrometer operating at 1.9 T was used, and a comparison was made with results obtained from a conventional high-resolution spectrometer, a Bruker Avance I 400, operating at 9.4 T. Experiments of ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$, DEPT135, HSQC and HMBC were conducted. Quantitative analyses were performed using the ERETIC2 method. Qualitative results showed that despite its intrinsic limitations negatively impacting the analyses, the quality of data obtained is sufficient to provide information equivalent to that obtained from high-resolution spectrometers. The application of ERETIC2 demonstrated high precision, accuracy, reproducibility, and repeatability, allowing the quantification of samples with concentrations as low as 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ within minutes, and also showing a certain robustness to variations in acquisition parameters.

Key words: low-resolution NMR; benchtop NMR, pharmaceutical quality control; quantitative NMR, ERETIC2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Estados de *spin* de um núcleo de ^{1}H na ausência e presença de B_0 14
FIGURA 2 - Sinal de decaimento de indução livre (FID) de ^{1}H do etanol (80 MHz) 15
FIGURA 3 - Perda de resolução oriunda da mudança do campo magnético 20
FIGURA 4 - Perda de sensibilidade oriunda da mudança do campo magnético 20
FIGURA 5 - Impacto do tempo de relaxação em um experimento de RMN de ^{1}H 25
FIGURA 6 - Impacto da calibração da sequência de pulsos em um experimneto de RMN de ^{1}H 26
FIGURA 7 - Espectro de RMN de ^{1}H do etanol utilizado como espectro de referência para as análises quantitativas. Em destaque, as regiões integradas (D_2O, 80 MHz) 30
FIGURA 8 - Exemplo de espectro de RMN de ^{1}H da piridoxina utilizado para quantificação. Em destaque, as regiões integradas (D_2O, 80 MHz) 31
FIGURA 9 - Estrutura e espectro de RMN de ^{1}H do BHT (DMSO-d_6/TMS) 34
FIGURA 10 - Estrutura e espectro de RMN de ^{1}H da piridoxina (DMSO-d_6/TMS) 34
FIGURA 11 - Estrutura e espectro de RMN de ^{1}H do propilparabeno($CDCl_3$/TMS) 35
FIGURA 12 - Estrutura e espectro de RMN de ^{1}H da tiamina (D_2O/TMSP) 35
FIGURA 13 - Estrutura e espectro de RMN de ^{1}H do paracetamol (em DMSO e DMSO/DMSO-d_6) 38
FIGURA 14 - Estrutura e espectro de RMN de ^{1}H do polidimetilsiloxano 39
FIGURA 15 - Estrutura e espectro de RMN de ^{1}H da biotina (DMSO-d_6/TMS) 40
FIGURA 16 - Estrutura e espectro de RMN de ^{1}H do colecalciferol (DMSO-d_6/TMS) 40
FIGURA 17 - Estrutura e espectro de RMN de ^{1}H da losartana (D_2O/TMSP) 41
FIGURA 18 - Espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ e DEPT135 da biotina (DMSO-d_6/TMS) 42
FIGURA 19 - Espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ e DEPT135 da piridoxina (DMSO-d_6/TMS) . 43
FIGURA 20 - Espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ e DEPT135 da tiamina (D_2O/TMSP) 44
FIGURA 21 - Espectros de RMN de ^{1}H da amostra A com 2 e 64 transientes 47
FIGURA 22 - Relação entre a razão S/R e a raiz quadrada de *ns* com *plot* linear e logarítmico 49
FIGURA 23 - Espectros de RMN de ^{1}H da amostra F com 2 e 64 transientes 51
FIGURA 24 - Espectros de RMN de ^{1}H da amostra A com valores de RG de 1 e 15 54
FIGURA 25 - Espectro de RMN de ^{1}H da amostra A utilizado para calibração do valor de *p1* 56
FIGURA 26 - Estrutura química da piridoxina e tiamina 59

FIGURA 27 - Espectros de RMN de ^{1}H da piridoxina em (a), e após a exposição a hidrólise básica (b), hidrólise ácida (c), oxidação por peróxido (d) e alta temperatura (e) (80 MHz) 60
FIGURA 28 - Espectros de RMN de ^{1}H da tiamina na presença de H_2O e em D2O (80 MHz) 61
FIGURA 29 - Equilíbrio químico do anel tiazólico da tiamina, com a troca de hidrogênio por deutério 61
FIGURA 30 - Espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$da tiamina em D_2O e na presença de H_2O (100 MHz). 62
FIGURA 31 - Expansão do mapa de contornos HSQC da timaina na presença de H_2O 63
FIGURA 32 - Expensão do mapa de contornos HMBC da tiamina na presença de H_2O 63
FIGURA 33 - Ampliação na região de δ_H 1,00-3,50 dos espectros de RMN de ^{1}H da tiamina em solução tampão (A) e frente a solução 3% de H_2O_2 por 1 hora (B) e 17 horas (C) (80 MHZ) 64
FIGURA 34 - Ampliação na região de δ_H 6,00-9,00 dos espectros de RMN de ^{1}H da tiamina em solução tampão (A) e frente a solução 3% de H_2O_2 por 1 hora (B) e 17 horas (C) (80 MHZ) 65
FIGURA 35 - Esquema da reação de oxidação da tiamina 66
FIGURA 36 - Esquema da reação de hidrólise básica da tiamina 67
FIGURA 37 - Espectro de RMN de ^{1}H da tiamina em solução tampão (A) e frente a hidrólise básica por 1 hora (B) (80 MHZ) 68
FIGURA 38 - Ampliação da região de δ_H 4,00-5,50 dos espectros de ^{1}H da tiamina frente a hidrólise básica por 1 hora em 80 MHz (A) e 400 MHz (B) 69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Dados de deslocamento químico e multiplicidade dos sinais observados nos espectros de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ 36

TABELA 2 - Concentrações calculadas a partir dos dois sinais de ressonância da amostra A, e a média de ambos, em $mmol \cdot L^{-1}$. 45

TABELA 3 - Valores de concentração média, em $mmol \cdot L^{-1}$, e da razão S/R dos espectros de RMN de ^{1}H da amostra A. 47

TABELA 4 - Valores de concentração média, em $mmol \cdot L^{-1}$, e da razão S/R dos espectros de RMN de ^{1}H da amostra B 47

TABELA 5 - Valores de concentração média, em $mmol \cdot L^{-1}$, e da razão S/R dos espectros de RMN de ^{1}H da amostra C 48

TABELA 6 - Valores de concentração média encontrados para as amostras B e C em análises de RMN de ^{1}H realizadas em dias diferentes, em $mmol \cdot L^{-1}$. 50

TABELA 7 – Valores de concentração média, em $mmol \cdot L^{-1}$, e da razão S/R dos espectros de RMN de ^{1}H das amostras D-F 50

TABELA 8 - Valores de concentração, em $mmol \cdot L^{-1}$, e da razão S/R dos espectros de RMN de ^{1}H das amostras A e B com diferentes valores de RG 53

TABELA 9 - Valores de concentração, em $mmol \cdot L^{-1}$, e da razão S/R dos espectros de RMN de ^{1}H das amsotras A e B com diferentes valores de *p1* 54

TABELA 10 - Valores de concentração, em $mmol \cdot L^{-1}$, e da razão S/R dos espectros de RMN de ^{1}H das amostras A e B com diferentes valores de *D1* 57

TABELA 11 - Valores de concentração, em $mmol \cdot L^{-1}$, e da razão S/R dos espectros de RMN de ^{1}H das amostras A e B, com diferentes sequências de pulsos 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR 13
1.2 EVOLUÇÃO DOS ESPECTRÔMETROS DE RMN 15
1.2.1 Terminologia 21
1.3 RMN QUANTITATIVA 22
1.4 CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS 27
2 OBJETIVOS 28
2.1 OBJETIVO GERAL 28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28
3 MATERIAIS E MÉTODOS 29
3.1 ANÁLISES DE RMN 29
3.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS 30
3.3 DEGRADAÇÃO FORÇADA 31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
4.1 IDENTIFICAÇÃO DE INSUMOS 33
4.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS 44
4.3 DEGRADAÇÃO FORÇADA 59
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO 70
REFERÊNCIAS 72

1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade é uma etapa fundamental do processo de produção de medicamentos, sendo cada vez mais um grande desafio para a indústria. O rápido desenvolvimento científico e tecnológico na área, juntamente com a alta procura por medicamentos, causou um significativo aumento na demanda por métodos analíticos capazes de gerar resultados satisfatórios de maneira rápida.[1]

Além da grande escala de produção, outra questão relevante está na descentralização dos processos, envolvendo um maior número de partes distintas, dificultando o acompanhamento e controle como um todo.[1,2] Ainda, por estar diretamente relacionado com riscos à saúde pública, a realização deste processo de maneira adequada é primordial.[3-6]

Embora seja comumente referenciado como um processo único, o controle de qualidade de medicamentos engloba diversas etapas, realizadas em diferentes momentos do processo de produção, com metodologias e objetivos próprios, que se somam e resultam em um conjunto de informações capaz de permitir o completo domínio sobre o todo.[3,4]

Desta maneira, não é possível utilizar apenas uma única técnica analítica no processo como um todo, visto que uma única ferramenta dificilmente seria capaz de obter todos os resultados desejados. Portanto, um misto de metodologias é utilizado neste cenário, englobando desde métodos clássicos, como determinação de ponto de fusão e reações de precipitação, até análises modernas como métodos espectroscópicos.[2,7] Assim, como diferentes métodos analíticos precisam ser utilizados, o processo pode se tornar demorado e apresentar elevado custo, necessitando de uma maior infraestrutura e operadores capacitados frente a diferentes técnicas de análise.[2,3,7]

Métodos cromatográficos como a Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Cromatography, HPLC*) são amplamente difundidos na análise de fármacos, principalmente por poderem ser acopladas a uma grande gama de diferentes detectores, possibilitando que mais informações sejam obtidas.[2-4]

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um dos métodos espectroscópicos mais poderosos da atualidade, apresentando inúmeras vantagens frente a outros métodos analíticos, sendo capaz de fornecer detalhadas informações estruturais de moléculas através da análise inequívoca dos resultados.[4]

As diversas análises aplicáveis no controle de qualidade de medicamentos são fortemente regulamentadas por órgãos nacionais e internacionais, através de protocolos,

metodologias e monografias que estão dispostos em farmacopeias.[8-11] Apesar do poderio da RMN, a ferramenta é pouco utilizada na área, sendo pouco abordada nestes documentos, estando restrita a algumas aplicações nas quais outros métodos analíticos não são capazes de atuar.

Vários fatores podem ser a explicação seu pouco uso, cabendo mencionar o alto custo para adquirir e manter espectrômetros de RMN, a necessidade de infraestrutura adequada e de operadores qualificados, bem como a baixa sensibilidade da RMN quando comparada a outros métodos analíticos. Estes são problemas que distanciam a técnica deste panorama industrial, sendo preterida por outras ferramentas.[4,12,13]

Algumas etapas dentro do controle de qualidade de medicamentos poderiam ser realizadas exclusivamente por RMN, com resultados equivalentes ou até superiores aos encontrados por outras metodologias, mesmo quando estas são aplicadas de forma acoplada. Por exemplo, pode-se citar:

- Identificação de insumos;[2,4,7,12]
- Determinação da composição de formulações multicomponentes;[12]
- Determinação de pureza e detecção de solventes residuais;[2,4]
- Observação de rotas de degradação de insumos, elucidação estrutural e quantificação dos produtos de degradação;[12]
- Determinação de razões molares de ácidos/bases em sais;[12]
- Identificação de produtos falsificados;[2,4]
- Quantificação de teor de princípio ativo em formulações;[4,12]
- Determinação de razões isoméricas em drogas quirais.[4,12]

1.1 A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

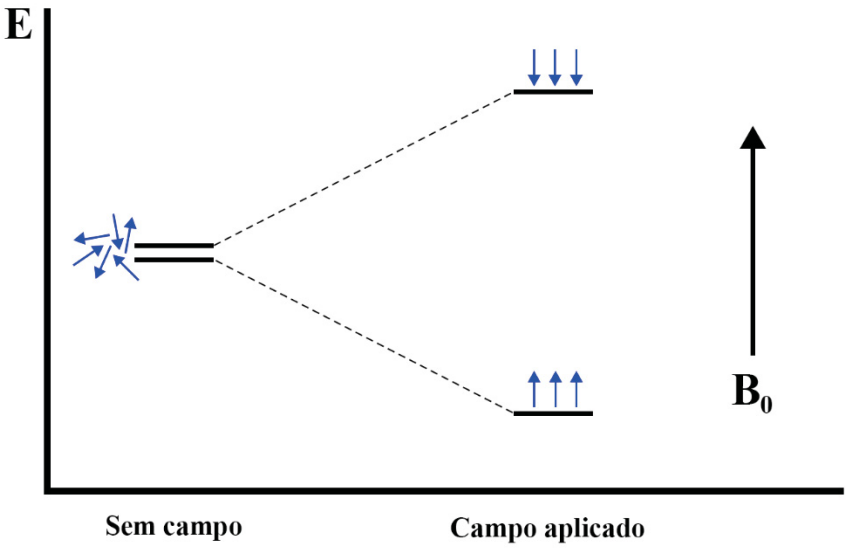
O fenômeno da espectroscopia de RMN está baseado no fato de que certos núcleos atômicos apresentam momento angular de *spin* e, consequentemente, momentos magnéticos de *spin*. Tal fato foi inicialmente proposto em 1924 por Pauli, e comprovado nos anos que se seguiram.[14-17] Contudo, as primeiras demonstrações de sucesso da RMN se deram apenas em 1946, sendo realizadas por dois grupos de pesquisa independentes nas Universidades de Stanford e Harvard, liderados por Bloch e Purcell, respectivamente, o que fez com que ambos fossem agraciados de maneira conjunta com o Prêmio Nobel de Física de 1953.[18,19]

Cada núcleo que apresenta momento magnético de *spin*, chamado simplesmente de *spin*, possui um número quantizado de estados de *spin* permitidos (n_{spin}), determinado pelo número quântico de *spin* nuclear I, conforme a **equação (1)**, e estes apresentam-se com diferenças inteiras sequenciais de $+I$ a $-I$.[20,21]

$$n_{spin} = 2 \cdot I + 1 \qquad \textbf{(1)}$$

Sem interferência externa, todos os estados de *spin* são degenerados e ocupados de maneira quase igualitária. Porém, quando na presença de um campo magnético externo (B_0), os momentos nucleares se alinham no sentido do campo magnético, com direções opostas, e a energia destes se torna desigual. O *spin* alinhado ao campo apresenta menor energia, e o *spin* oposto ao campo apresenta maior energia, conforme mostrado na **FIGURA 1**.[20,21]

FIGURA 1 - ESTADOS DE *SPIN* DE UM NÚCLEO DE ^{1}H NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE B_0.



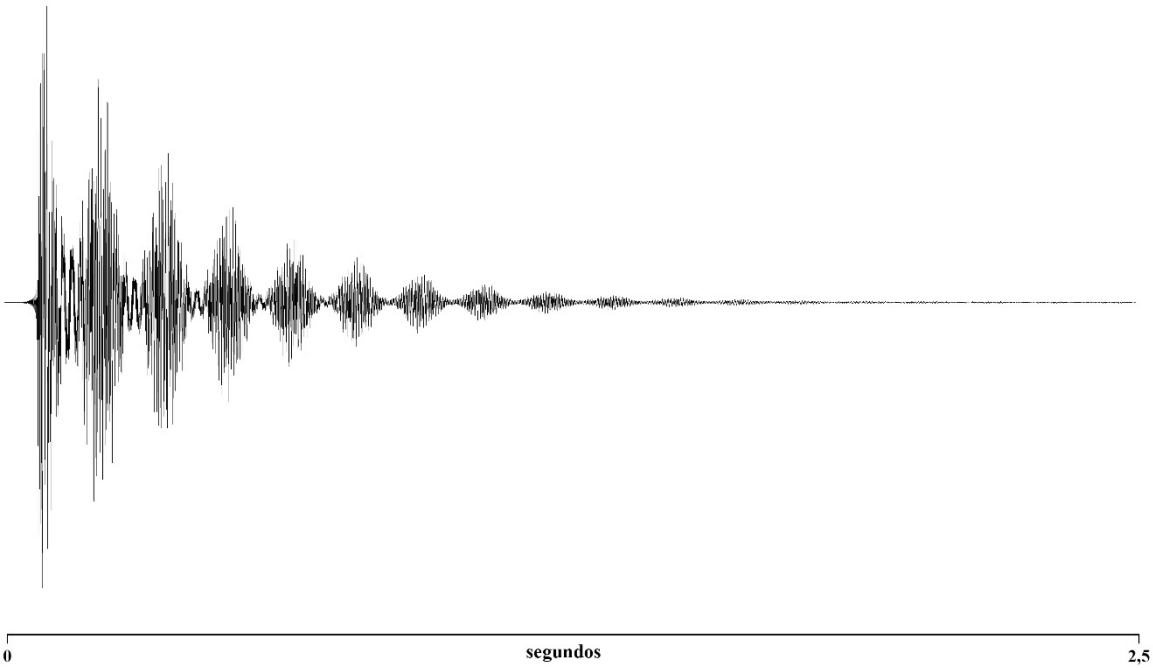
FONTE: O autor (2024).

O fenômeno da RMN ocorre quando estes núcleos são induzidos a absorver energia e mudar a orientação de *spin* em relação a B_0. Essa energia absorvida é quantizada, e é uma função do próprio B_0, o que significa que quanto maior o campo magnético externo aplicado, maior a diferença de energia entre os estados de *spin*.[20,21] A energia é aplicada externamente através de pulsos de excitação de curta duração. Quando o pulso é desligado, os núcleos começam a perder energia e retornar ao seu estado de *spin* original, processo este conhecido como relaxação.[20]

Para que seja possível observar a ressonância, é necessário que exista um excesso populacional de *spins* no estado de menor energia. A diferença energética entre os estados, porém, é muito pequena. Por exemplo, à 25 °C, sob um campo magnético de 60 MHz, o excesso de núcleos de ^{1}H no estado de menor energia é de 9 em 2 milhões de núcleos.[20] É por este motivo que se considera a RMN como uma técnica pouco sensível quando comparada a outras ferramentas analíticas, e maiores campos magnéticos são desejados.[20,21]

Durante a relaxação, cada núcleo emite radiação eletromagnética com diferentes frequências, chamada de sinal de decaimento de indução livre (*Free Induction Decay, FID*), o qual é detectado em função do tempo.[20,21] Um exemplo de FID está exposto na **FIGURA 2**.

FIGURA 2 - SINAL DE DECAIMENTO DE INDUÇÃO LIVRE (FID) DE ^{1}H DO ETANOL (80 MHZ**).**



FONTE: O autor (2024).

O processamento do FID é realizado através da aplicação do método matemático chamado Transformada de Fourier (*Fourier Transform, FT*), que decompõe o FID, convertendo-o para o domínio de frequência, dando origem aos espectros de RMN.[20]

1.2 EVOLUÇÃO DOS ESPECTRÔMETROS DE RMN

A rápida evolução da RMN como ferramenta analítica foi fortemente impulsionada pelo acelerado desenvolvimento e disponibilidade comercial de espectrômetros, juntamente com seus constantes aprimoramentos.[22]

Espectrômetros comerciais começaram a ser desenvolvidos quase imediatamente após as descobertas publicadas por Bloch e Purcell, sendo construídos tanto com magnetos permanentes como eletroímãs. Passados apenas 6 anos da publicação das descobertas, era lançado no mercado o espectrômetro HR-30 da *Varian Associates*, que operava com onda contínua e um eletroímã de 0,7 T, observando o núcleo de ^{1}H a uma frequência de 30 MHz.[22,23] O equipamento pesava aproximadamente 2,5 toneladas, necessitava de resfriamento por água permanente, e apresentava sistema elétrico extremamente complexo, sendo até considerado como um pesadelo de se trabalhar. Contudo, era o "estado da arte" da época.[23]

A baixa sensibilidade deste equipamento, que restringia sua utilização apenas em líquidos puros ou soluções muito concentradas, deu início imediato a busca por equipamentos que operavam com maiores campos magnéticos. Foram lançados nos anos seguintes o HR-40, o HR-60 e o HR-100, com frequências de ressonância de 40 MHz, 60 MHz, e 100 MHz para o núcleo de ^{1}H, respectivamente. Essa procura também fez com que magnetos permanentes fossem pouco utilizados, rapidamente cedendo espaço aos espectrômetros baseados em eletroímãs, que apresentavam a possibilidade de alcançar maiores campos magnéticos.[22,23]

Além do aumento do campo magnético, outros avanços estavam presentes em cada novo lançamento, como a introdução do giro da amostra e a possibilidade de ajustar o *shimming*, que facilitavam a operação do aparelho e melhoravam a homogeneidade do campo magnético, permitindo maior definição do desacoplamento de *spins* e, consequentemente, significativa melhora na qualidade espectral.[22,23]

O primeiro grande salto do desenvolvimento de espectrômetros se deu com o lançamento do *Varian* A-60, em 1961. Este, que observava apenas o núcleo de ^{1}H, a 60 MHz, apresentava alta estabilidade e sensibilidade, além de ter tamanho e formato que permitiam sua instalação em ambientes laboratoriais comuns. Apresentando um sistema de *lock* de campo/frequência e uma interface de fácil utilização, este espectrômetro é considerado como o responsável por difundir a RMN para os laboratórios químicos.[23]

Inúmeros avanços seguiram. Assim, com o aumento da sensibilidade, elevou-se o número de núcleos que podiam ser estudados efetivamente. Com a melhora do sistema computacional e dos *consoles*, surgiu a possibilidade de se adquirir repetidos transientes e somar os espectros obtidos, melhorando o resultado da análise.[23,24]

Dois momentos podem ser considerados como revolucionários para a RMN. Rapidamente se tornou aparente que os espectrômetros baseados puramente em eletroímãs estavam alcançando seu limite operacional. Como a busca por maior sensibilidade requeria que maiores campos magnéticos fossem alcançados, foram desenvolvidos no final da década

de 60 e início da década de 70 os equipamentos baseados em materiais supercondutores, capazes de alcançar campos magnéticos superiores, representando uma nova era para a RMN e que viria a tornar os espectrômetros baseados em eletroímãs não-supercondutores obsoletos, praticamente desaparecendo do mercado nos anos que se seguiram.[25]

A segunda revolução se deu com o início da utilização da Transformada de Fourier (*FT*), substituindo os sistemas que utilizavam onda contínua. Tal alteração permitiu um aumento na sensibilidade, diminuição do tempo de análise, e abriu portas para o surgimento de grande parte dos experimentos conhecidos atualmente. [22,24]

O primeiro estudo sobre a aplicação da *FT* na RMN se deu em 1956.[26] Já em 1969, a *Bruker Instruments* lançou o WH-90, primeiro espectrômetro comercial desenvolvido inteiramente para tal método de análise, baseado em um eletroímã capaz de observar o núcleo de ^{1}H a 90 MHz. No ano seguinte, foi lançado pela mesma empresa o WH-270, o primeiro espectrômetro utilizando um magneto supercondutor e baseado na Transformada de Fourier,[22] sendo esta combinação o que se tem de mais poderoso para a RMN até os dias de hoje.

Atualmente, ainda se procura aumentar a sensibilidade da RMN, o que se traduz diretamente no desenvolvimento de espectrômetros com campos magnéticos cada vez maiores. Campos magnéticos acima de 20 T foram reportados, apresentando frequência de ressonância acima de 1 GHz para o núcleo de ^{1}H.[27]

Porém, este constante avanço tem também suas desvantagens. Cada vez mais, os espectrômetros de RMN voltaram a ser equipamentos volumosos, necessitando de infraestrutura adequada para instalação. Não obstante, devido ao alto nível tecnológico aplicado, são mais custosos para adquirir e manter, necessitando de grande volume de líquidos criogênicos para funcionamento, além de operadores especializados. Deste modo, embora seja inegável o avanço da técnica, seu uso se tornou pouco conveniente, ficando limitado a laboratórios especializados, principalmente voltados a área de pesquisa, e sendo até mesmo preterido por outras técnicas analíticas menos poderosas no cenário industrial.[13,28,29]

Neste sentido, uma nova categoria de espectrômetros foi desenvolvida e rapidamente difundida nos últimos anos. Na segunda metade da década de 2000, começaram a ser produzidos equipamentos que vão em sentido oposto a tendência de busca por maiores campos magnéticos, visando simplificar e baratear os espectrômetros, facilitando a aplicação da técnica e permitindo a difusão da RMN à novos contextos, mas ao custo de certas limitações analíticas, principalmente em relação a sensibilidade e resolução. Estes equipamentos são baseados em magnetos permanentes de campo magnético entre 1,0 T e 3,0 T, aproximadamente, e chegam a custar 20 vezes menos que um espectrômetro de alta

resolução, além de serem compactos, de fácil operação, e requererem mínima manutenção.[13,29-31]

Embora operem em campos magnéticos similares aos primeiros espectrômetros desenvolvidos, realizar tal comparação é equivocada. Além de serem muito menores e mais fáceis de operar, os grandes avanços tecnológicos, principalmente na área eletrônica, fazem com que os equipamentos modernos apresentem maior homogeneidade do campo magnético, garantindo maior sensibilidade e qualidade espectral, sendo estes capazes de observar um número muito maior de núcleos, como ^{1}H, ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{29}Si e ^{31}P, por exemplo, bem como realizar experimentos bidimensionais, de acordo com o modelo do espectrômetro.[13,29-32]

Não obstante, é comum que estes equipamentos apresentem sistema de *lock* externo, não havendo, portanto, a necessidade de utilização de solventes deuterados, e com a possibilidade de ajuste do campo magnético (*shimming*) completamente automática, diminuindo tanto o custo financeiro quanto o operacional da RMN. E, por serem equipamentos modernos, são em sua maioria compatíveis com sistemas de automação, como *autosamplers*.[13,29-32]

Atualmente, diversos modelos destes espectrômetros estão disponíveis comercialmente.

Os modelos *PicoSpin 45* e *PicoSpin 80* da empresa *ThermoScientific*, que operam a 45 MHz e 80 MHz (^{1}H) e pesam 4,8 kg e 19kg respectivamente, são os mais compactos da categoria. Em ambos, que observam apenas o núcleo de ^{1}H, a amostra é injetada diretamente no espectrômetro com o uso de uma seringa, e a análise é feita em fluxo. O *QM-125* da empresa *QMagnetics* é o de maior campo magnético da categoria, operando a 125 MHz para o núcleo de ^{1}H, único núcleo que observa. Este modelo também opera com a injeção da amostra diretamente em seu interior.[33,34]

A empresa *Nanalysis* apresenta diferentes modelos de espectrômetros de RMN de bancada, sendo estes os *60e*, *60PRO*, *100e* e *100PRO*, sendo que os dois primeiros observam o núcleo de ^{1}H a 60 MHz e pesam menos de 25 kg, e os dois últimos observam o núcleo de ^{1}H a 100 MHz e pesam cerca de 110 kg. Os modelos *e* observam apenas os núcleos de ^{1}H e ^{19}F, além de serem capazes de realizar experimentos de relaxação (T_1 e T_2) e de correlação homonuclear ^{1}H-^{1}H (COSY). Os modelos *PRO* podem observar os núcleos de ^{1}H, ^{19}F, ^{13}C, ^{31}P, ^{11}B, entre outros, além de serem capazes de realizar uma grande gama de experimentos bidimensionais homo e heteronucleares.[35,36]

Um modelo mais robusto de espectrômetro é o *SpinSolve*, da *Magritek*, comercializado nos modelos *60*, *80*, e *90*, correspondendo a frequência de Lamor do núcleo

de ^{1}H em cada modelo. Estes variam entre 70 kg e 130 kg, apresentam canais multinucleares com capacidade de observar uma grande gama de núcleos, e podem realizar experimentos bidimensionais. Possuem controle de temperatura, sistema de *lock* externo, e apresentam *software* de processamento próprio e a possibilidade de integração com um sistema *autosampler*.[37-39]

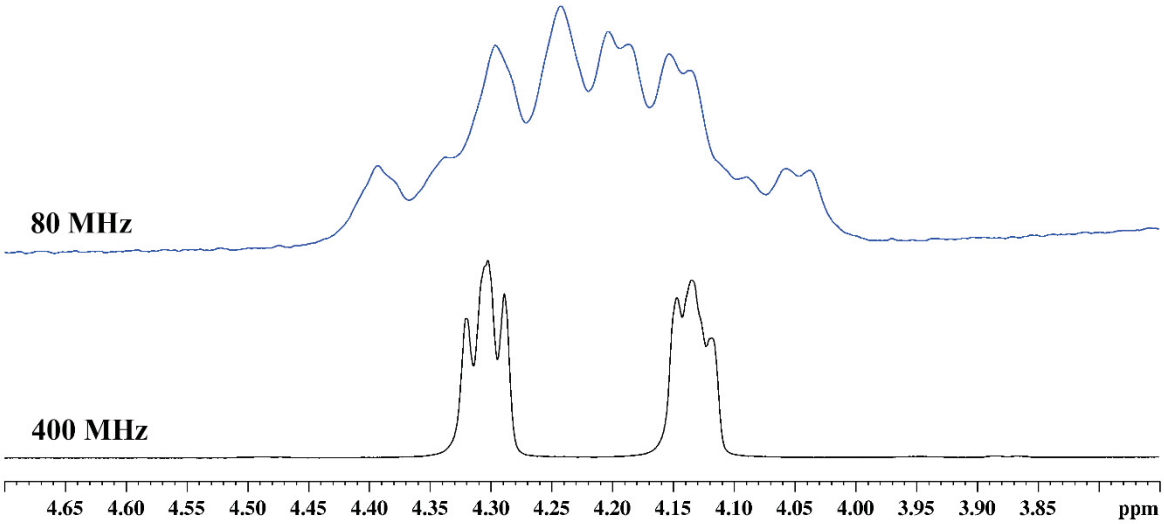
A *Oxford Instruments* possui dois modelos distintos de espectrômetros, o *X-Pulse* e o *Pulsar*, ambos observando o núcleo de ^{1}H a 60 MHz. O primeiro, mais robusto, atinge 150 kg, enquanto o segundo possui menos de 50 kg. Ambos apresentam características semelhantes aos modelos da *Magritek*.[40,41]

A *Bruker* possui um único modelo na categoria, o *Fourier 80*, que observa o núcleo de ^{1}H a 80 MHz. Este apresenta grande número de aplicações, sendo capaz de observar diferentes núcleos, realizar experimentos de correlação, e possui sistema de controle de temperatura, assim como a possibilidade de integração com *autosamplers*. Além disso, conta com todo o robusto sistema de *software* da *Bruker* utilizado em todos os espectrômetros da empresa.[42]

Como é possível notar, apesar das diferenças entre modelos, todos apresentam propósito semelhante na criação de ferramentas de qualidade, mas com menor custo atrelado e de fácil operação, possibilitando a difusão da RMN a cenários industriais, laboratórios não especializados na técnica, laboratórios de ensino, entre outros.

De maneira geral, resultados obtidos nestes espectrômetros são equivalentes aos de espectrômetros de alta resolução. A primeira diferença significativa é a perda de resolução espectral. Os sinais observados são mais alargados, e os picos individuais de um multipleto encontram-se mais separados na escala de ppm, de modo que a sobreposição de sinais é mais evidente. Isto ocorre pois, por exemplo, ao considerar-se um espectro de ^{1}H obtido em 400 MHz, a distância de 1 ppm corresponde a 400 Hz. Já em um espectro obtido em 80 MHz, esta mesma distância corresponde a 80 Hz.[13,20,32] Isto pode ser observado na **FIGURA 3**, na qual o alargamento de dois sinais resulta em sua sobreposição.

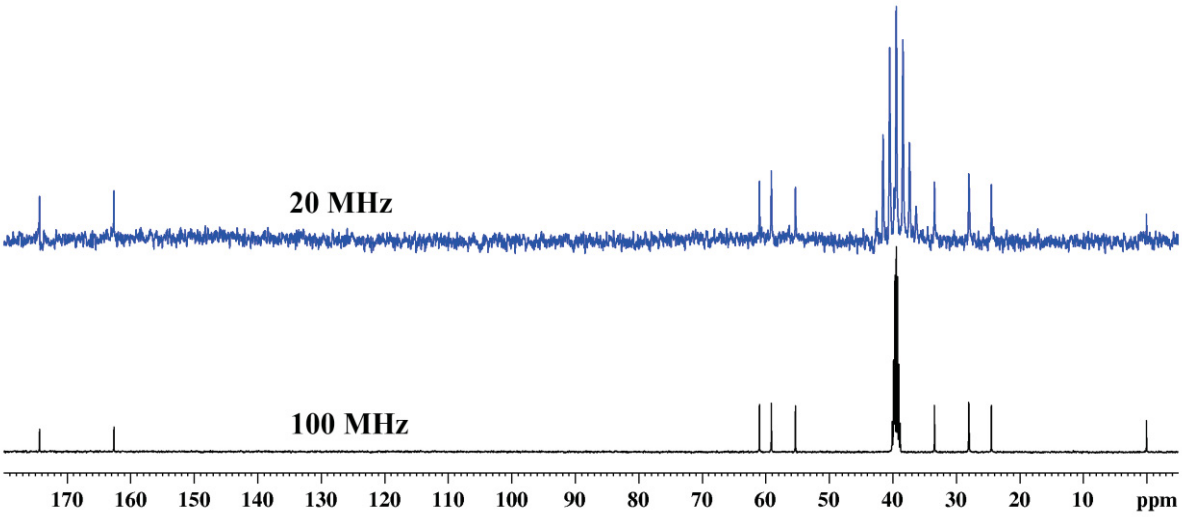
FIGURA 3 - PERDA DE RESOLUÇÃO ORIUNDA DA MUDANÇA DO CAMPO MAGNÉTICO.



FONTE: O autor (2023).

A segunda diferença significativa é a perda de sensibilidade, devido ao menor campo magnético, que faz com que, para alguns experimentos, seja necessário um maior tempo de análise para obter resultados satisfatórios. A **FIGURA 4** exemplifica esta situação na obtenção de espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ da piridoxina. Enquanto uma análise em 100 MHz (^{13}C) necessitou de aproximadamente 40 minutos para se obter um resultado satisfatório, um resultado equivalente à 20 MHz (^{13}C) necessitou mais de 5 horas, ainda o espectro obtido apresentou-se mais ruidoso.

FIGURA 4 - PERDA DE SENSIBILIDADE ORIUNDA DA MUDANÇA DO CAMPO MAGNÉTICO.



FONTE: O autor (2023).

Apesar de suas limitações, as vantagens dos espectrômetros de bancada são tamanhas que sua aplicação tem se difundido cada vez mais, e seu uso vem crescendo significativamente nos últimos anos. Ademais, a combinação destes com outras técnicas espectroscópicas como a no infravermelho (IV) e de massas (EM), aliada a métodos quimiométricos, amplificou seu poderio e diminuiu o impacto de suas limitações.[32]

Linck e colaborados (2013) utilizaram um espectrômetro de RMN operando a 42 MHz para o núcleo de ^{1}H no controle de qualidade de amostras de biodiesel obtidas a partir de diferentes óleos, demonstrando a possibilidade de identificar todos os componentes das reações de transesterificação e de estimar o grau de saturação do produto. As análises, que foram realizadas sem a utilização de qualquer solvente, apresentou resultados equivalentes aos obtidos por RMN de alta resolução, mas com um custo mínimo. De acordo com os autores, o uso de equipamentos de alta resolução dificilmente seria voltado para este fim, devido ao seu alto custo, de modo que outros métodos analíticos mais trabalhosos precisariam ser utilizados.[43]

Percival e colaboradores (2019) demonstraram a aplicação destes equipamentos na análise de biofluídos humanos, utilizando um espectrômetro de 60 MHz para o núcleo de ^{1}H para detectar e quantificar compostos marcadores no controle de diabetes. As análises levaram menos de 15 minutos cada, e poderiam ser realizadas diretamente em laboratórios de hospitais e clínicas médicas, o que seria menos viável de ser feito através de espectrômetros de alta resolução.[31]

1.2.1 Terminologia

Diferentes nomenclaturas têm sido utilizadas para designar esta nova categoria de equipamentos, tais quais “espectrômetros de RMN de bancada” (*benchtop NMR spectrometers*), “espectrômetros de RMN de baixa resolução” (*low-resolution NMR spectrometers*) e “espectrômetros de RMN de baixo campo” (*low-field NMR spectrometers*).

No presente trabalho, optou-se por utilizar os dois primeiros citados: “de bancada”, como uma terminologia geral, oriunda da característica física do equipamento, e “de baixa resolução”, visto a menor resolução obtida nos espectros adquiridos. Considerou-se que o termo “baixo campo” é melhor aplicável a outros modelos de espectrômetros, tais quais os no domínio do tempo (relaxometria), que operam em campos magnéticos menores, de até 0,5 T.

Embora possa ser levantado questionamentos sobre a resolução espectral obtida através destes espectrômetros ser suficiente para não ser classificada como baixa, considerou-

se que, no contexto do trabalho, o termo é utilizado adequadamente, fazendo contraponto aos espectrômetros convencionais de alta resolução.

1.3 RMN QUANTITATIVA

A espectroscopia de RMN apresenta grande importância como ferramenta quantitativa. Apesar de possuir menor sensibilidade frente a outros métodos analíticos, a RMN quantitativa (RMNq) tem inúmeras vantagens, podendo se mencionar a existência de um grande leque de metodologias capazes de se adequar a matrizes distintas, permitindo seu uso nas mais variadas áreas.[12,44-50]

Por se tratar de uma técnica não-específica, através da RMN é possível se obter informações de matrizes complexas sem necessidade de etapas prévias a análise, referentes a preparo amostral e separação de compostos, por exemplo, diminuindo assim o manuseio e exposição de amostras, bem como a variabilidade analítica atrelada, visto que estas etapas representam significativas fontes de erros em análises quantitativas. Além disso, permite que vários analitos sejam quantificados simultaneamente em uma única análise e, como técnica não-destrutiva, permite a recuperação da amostra ao final do experimento.[44-46,48,51,52]

Deste modo, a RMNq é uma ferramenta extremamente atrativa. Resultados precisos podem ser obtidos em curto tempo de análise, de modo reprodutível e com pouco custo no preparo de amostras.[44]

A quantificação pode ser realizada sobre todos os núcleos ativos em RMN, porém diferentes fatores fazem com que apenas alguns sejam utilizados para tal finalidade. A análise de ^{1}H é, sem dúvidas, o método mais difundido, visto que resultados satisfatórios são obtidos de maneira rápida, e trata-se de um núcleo presente em praticamente todas as moléculas orgânicas.[20]

O princípio fundamental da RMNq está baseado no fato de que as áreas dos sinais de ressonância são diretamente proporcionais a concentração das espécies que o geram. Quanto maior a concentração de uma substância, maior o número de núcleos presentes e, consequentemente, maior a área do sinal.[20,53,54] É possível se obter resultados quantitativos relativos, ou seja, a concentração de uma espécie pode ser definida proporcionalmente à concentração de outra, e resultados absolutos, nos quais a quantidade real de uma substância de interesse é descoberta.[12,55]

Duas metodologias se destacam na realização de medidas absolutas. Em ambas, utiliza-se de uma substância de referência padrão, e a área de seus sinais é usada para o

cálculo da concentração dos analitos de interesse. A diferença entre elas se dá na forma que a substância de referência é empregada.[51,55]

No método do padrão interno (MPI), tal substância é adicionada diretamente a amostra. Tal metodologia apresenta sua principal desvantagem no fato de ocorrer uma perturbação da matriz pela adição de um componente estranho. No método do padrão externo (MPE), a substância de referência é adicionada a um tubo coaxial ou capilar, o qual então é adicionado a amostra, de modo que os sistemas são mantidos isolados, e a perturbação da matriz é contornada.[12,51,55]

A escolha adequada da substância de referência é um fator fundamental, principalmente no MPI. É necessário que esta apresente alto grau de pureza, seja solúvel no meio, inerte frente ao solvente e analito, e que seus sinais de ressonância não apresentem sobreposição com os sinais da amostra. Além disso, fatores estruturais também precisam ser levados em consideração. Como são poucas substâncias que se adequam a estes critérios, estas apresentam alto valor comercial, encarecendo significativamente a análise. Por estes motivos, metodologias alternativas foram desenvolvidas.[12,45]

No final dos anos 90, desenvolveu-se o método ERETIC (***E****letronic* ***RE****ference* ***T****o acess* ***I****n vivo* ***C****oncentrations*), o qual não necessita de substâncias de referência no momento da análise. Para a quantificação, realiza-se uma etapa prévia de calibração, onde é obtido o espectro de uma amostra de concentração conhecida. Um sinal deste espectro é então inserido eletronicamente no espectro da amostra a ser quantificada durante o processo de aquisição. Deste modo, o operador tem total controle sobre a amplitude, fase e frequência do sinal, que pode ser adicionado em qualquer região do espectro, evitando assim a sobreposições.[12,45,51,56]

Todavia, este método apresenta significativas limitações, principalmente devido a necessidade de se obter componentes extras de *hardware* e de adequar os espectrômetros para sua aplicação. Ainda, o sinal eletrônico necessita ser estabilizado constantemente.[12,51,53,57]

O método PULCON (***PU****lse* ***L****enght based* ***CON****centration determination*) surgiu como alternativa dentro da RMNq, sendo sua aplicação original voltada para a quantificação de proteínas. Este método baseia-se no princípio da reciprocidade, em que a intensidade de um sinal de RMN é inversamente proporcional a força do pulso de excitação de 90° ou 360° aplicado. Similar ao ERETIC, este necessita de uma etapa de calibração, onde uma amostra de concentração conhecida é analisada, e seus sinais de ressonância servem de referência para a quantificação. A principal diferença é que não há a inserção deste sinal nos espectros, não sendo necessário componentes de *hardware* específicos. A aplicação do método PULCON é

comercializado sob o nome ERETIC2 em espectrômetros *Bruker*, e será assim referenciado no decorrer deste trabalho.[12,51,53]

O cálculo de concentração realizado no ERETIC2 segue a **equação (2)**, na qual S é a área do sinal, C é a concentração, T é a temperatura (em K), θ é a duração do pulso de excitação de 90°, ns é o número de transientes, e k é um fator de correção para possíveis variações nos parâmetros de aquisição entre amostras. A e R indicam se a variável diz respeito ao analito ou a referência, respectivamente. Essa equação é válida desde que as amostras sejam analisadas no mesmo modelo de sonda.[48,51,53] O cálculo pode ser realizado automaticamente em menu próprio no software *TopSpin*.[58]

$$C_A = k \cdot C_R \cdot \frac{S_A \cdot T_A \cdot \theta_A \cdot ns_R}{S_R \cdot T_R \cdot \theta_R \cdot ns_A} \qquad \textbf{(2)}$$

Considera-se o ERETIC2 como uma das metodologias mais otimizadas dentro da RMNq, visto que não existe a necessidade de etapas extras de preparo de amostra nem adaptações nos espectrômetros, e a partir de uma única etapa de calibração pode-se quantificar infinitas amostras. A aplicação deste método já foi analisada em diferentes matrizes, e os resultados obtidos se mostraram equivalente ou até mesmo melhores que os obtidos por outras metodologias da RMNq e outros métodos de quantificação.[46,48,51,52,57]

Para que os resultados de uma análise de RMN sejam efetivamente utilizados para quantificações absolutas, é necessário ter cuidado com alguns parâmetros de aquisição, os quais diferem dos utilizados comumente em análises quantitativas. Ou seja, são necessários parâmetros quantitativos de análise.[59,60]

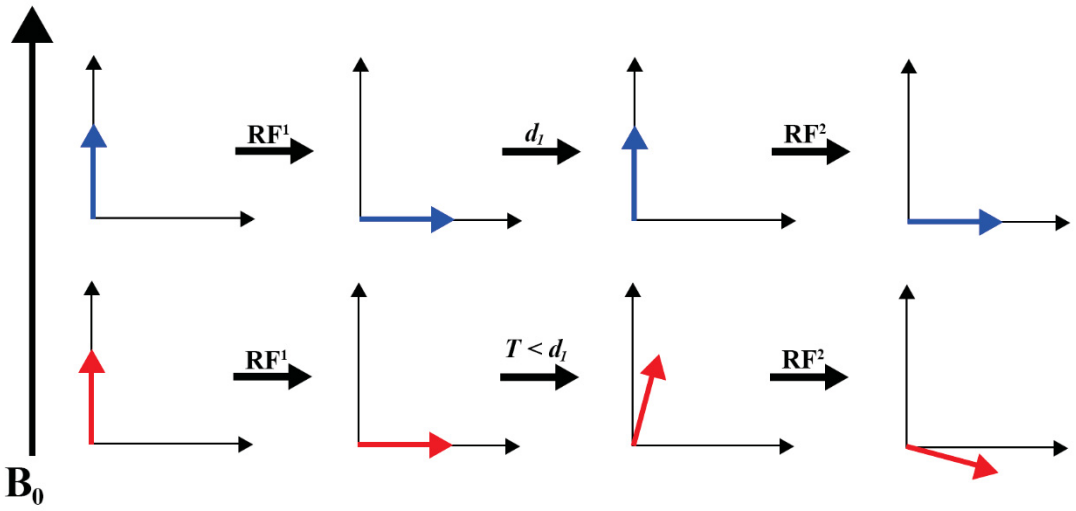
O tempo de relaxação (*D1*) é um dos fatores mais relevantes. Para que um sinal observado no espectro corresponda a sua concentração real, é necessário que o intervalo entre os pulsos de excitação seja suficiente para que ocorra a total relaxação de *spins*, retornando ao seu estado original de alinhamento com o campo magnético.[20,54,59] O tempo de relaxação depende do núcleo analisado, da estrutura molecular, e do ambiente da amostra (temperatura, concentração, entre outros fatores). É possível até mesmo que diferentes átomos de uma mesma molécula apresentem valores de *D1* distintos.[59] Em análises qualitativas, valores pequenos de *D1* são utilizados para que se tenha um reduzido tempo de análise.[20]

O valor de *D1* é calculado a partir do tempo de relaxação longitudinal (T_1), considerando-se de $5 \cdot T_1$ o valor mínimo aceitável, com alguns autores sugerindo o valor de $7 \cdot T_1$.[54] Qualquer valor acima deste não interfere na qualidade do resultado, porém influencia

no tempo de análise. Contudo, o uso de valores menores gera resultados inadequados. Isto pois, ao aplicar um novo pulso de excitação antes da total relaxação de *spin*, o ângulo da excitação não será o esperado, impactando negativamente na análise.[59]

Tal fato está esquematizado na **FIGURA 5**. Em azul, está representado um sistema adequado. O tempo *d1* entre os pulsos de excitação (RF) é suficiente para a completa relaxação do *spin*. Em vermelho, está representada uma situação inadequada. Utilizando um tempo T menor que *d1*, a relaxação não é completa, e o ângulo da excitação oriundo da nova aplicação de um pulso não é adequado.

FIGURA 5 - IMPACTO DO TEMPO DE RELAXAÇÃO EM UM EXPERIMENTO DE RMN DE ^{1}H.



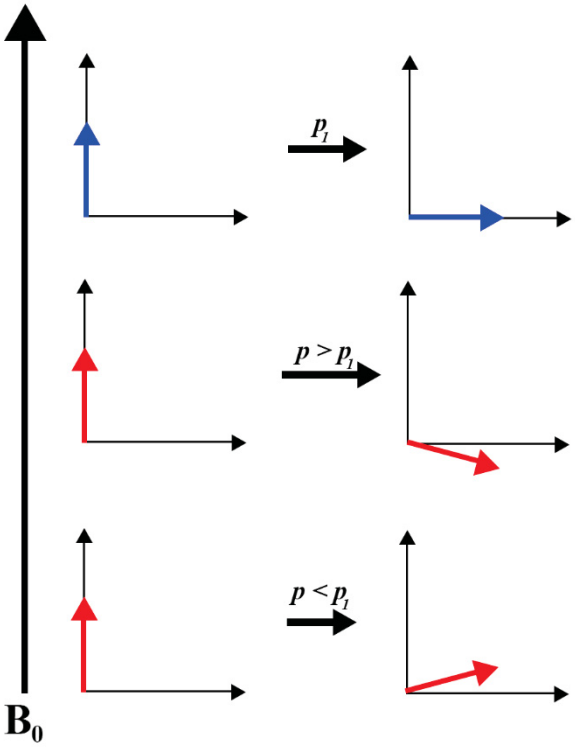
FONTE: O autor (2024).

A calibração do pulso de excitação também é determinante, sendo feita através da otimização de sua duração. Por exemplo, ao se aplicar um pulso de 90°, se deseja que todos os *spins* sejam excitados exatamente nesta angulação. Apenas assim garante-se que houve a completa magnetização da amostra, e a área dos sinais observados no espectro corresponde a concentração dos núcleos que o geram, como mostrado na **FIGURA 6**. Em azul, está representado o cenário ideal, com um valor calibrado de *p1*. Dois possíveis cenários inadequados estão representados em vermelho, correspondendo a valores de duração de pulso maior e menor que o valor de *p1* correto, fazendo com que a excitação do *spin* não possua ângulo adequado, impactando na quantificação.[59,61,62]

Outro fator de suma importância para a correta quantificação está relacionada com a razão Sinal/Ruído (*S/R*) do espectro. Se faz necessário que o sinal a ser integrado esteja suficientemente destacado da linha de base espectral, de modo a evitar erros de integração. A melhora na *S/R* pode ser obtida de diferentes maneiras, sendo mais usual o aumento do

número de transientes (*scans, ns*) adquiridos, ou a otimização do ganho do receptor (*receiver gain, RG*), ambos visando aumentar a intensidade do sinal frente a linha de base. A relação da *S/R* é linear com a raiz quadrada de *ns*, de modo que aumentando o valor de *ns* acarreta no aumento da *S/R*, enquanto que a reação desta com o *RG* não é constante, podendo aumentar ou diminuir de acordo com o valor de *RG*. [59,60] O *shimming* adequado também interfere no valor da *S/R*.

FIGURA 6 - IMPACTO DA CALIBRAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE PULSOS EM UM EXPERIMENTO DE RMN DE ^{1}H.



FONTE: O autor (2024).

De mesmo modo, o tempo de aquisição (*acquisition time, aq*) necessita ser superior ao tempo de relaxação transversal (T_2), para que não ocorra uma "quebra" do FID de aquisição, que pode causar oscilações na linha de base espectral. Ainda, o preparo de amostra deve ser feito com cuidado, com a amostra estando solubilizada e homogeneizada completamente. Até mesmo variações no tubo de RMN utilizado podem influenciar a quantificação.[59,60]

Além da aquisição, o correto processamento espectral é importante. A linha de base e a fase do espectro devem ser corrigidas. A área selecionada para integração deve representar o todo do sinal de ressonância, e não deve ser estendida além deste.[20,59]

1.4 CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

O controle de qualidade de medicamentos é um conjunto de inúmeras etapas isoladas que se somam para que se possa obter o maior número de informações, permitindo se ter controle e segurança sobre o todo do processo.[1]

A primeira etapa dentro deste processo é a identificação dos princípios ativos, que permite ter certeza da identidade do insumo utilizado na fabricação, sendo também fundamental no combate a produtos falsificados.[4,5,7,12] A identificação dos excipientes também é de suma importância. Diversas metodologias são utilizadas para isto, de acordo com características da amostra, desde métodos clássicos como testes colorimétricos e de precipitação, até metodologias modernas como espectroscopia e cromatografia.[2,3,7]

As metodologias mais utilizadas são as espectroscopias de infravermelho (IV) e no ultravioleta (UV). Em ambas, a identificação é realizada pela comparação com padrões de referência. Apesar de prover informações capazes de realizar a identificação não comparativa, a RMN é pouco utilizada para esta finalidade em farmacopeias mundiais.[4,7]

A análise da estabilidade dos insumos isolados e das formulações prontas também é uma etapa primordial, garantindo maior segurança aos consumidores pela possibilidade de se predizer a existência ou não de produtos de degradação, bem como sua identidade, além de possibilitar estudar quais motivos que levaram a degradação, podendo assim otimizar processos de manufatura, armazenamento e transporte.[63]

Os estudos de degradação forçada são aqueles nos quais insumos e formulações são submetidos a situações extremas de estresse, para que se tenha a completa degradação da amostra, e os produtos dessa possam ser identificados. As condições destes estudos são tão extremas que se considera que muitos dos produtos aqui formados jamais seriam observados em condições naturais. Trata-se, portanto, de uma situação limite.[64]

Em diversas etapas dentro do controle de qualidade pode-se ser necessário o uso de ferramentas quantitativas, desde a determinação da pureza de insumos, acompanhamento de processos de produção, até cálculos de teor de formulações prontas. Deste modo, ferramentas capazes de realizar análises qualitativas e quantitativas de maneira rápida e pouco invasiva são essenciais.[12]

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade de espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear de bancada em diferentes etapas do controle de qualidade de insumos utilizados na fabricação de medicamentos visando comprovar a possibilidade de utilização de tais equipamentos em cenários de produção, bem como comparar os resultados obtidos com os adquiridos em espectrômetros de alta resolução.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e adequar parâmetros de experimentos usuais de RMN a um espectrômetro de bancada;
- Identificar insumos (princípios ativos e excipientes) utilizados na fabricação de medicamentos através de espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C;
- Realizar estudos de degradação forçada sobre princípios ativos isolados;
- Identificar e caracterizar os produtos de degradação observados;
- Propor as rotas de que levam a formação de produtos de degradação;
- Avaliar a aplicação da metodologia ERETIC2 em espectrômetros de bancada;
- Analisar a robustez e limites da técnica quantitativa pela variação de parâmetros de aquisição.
- Comparar os resultados obtidos no espectrômetro de bancada com os oriundos de análises realizadas em espectrômetros de RMN de alta resolução;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANÁLISES DE RMN

As análises de RMN foram desenvolvidas empregando um espectrômetro Bruker Fourier 80 (F80) operando a 1,9 T, observando o núcleo de ^{1}H a 80 MHz, em temperatura fixa de 25 °C. Este equipamento apresenta sistema de *lock* externo sobre o núcleo de ^{19}F. O ajuste do campo magnético foi realizado de maneira automática por ao menos 15 minutos até 24 horas antes das análises, utilizando uma solução padrão de 0,5 mL de D_2O:H_2O (95:5) dopada com 0,6 mmol·L^{-1} de $CuSO_4$.

Também se fez uso de um espectrômetro Bruker Avance 400, operando a 9,4 T, com frequência de Lamor de 400 MHz para o núcleo de ^{1}H, utilizando uma sonda de solução multinuclear (X-núcleo e ^{1}H) de observação direta de 5 mm com gradiente de campo no eixo *z*, e de um espectrômetro Bruker DPX 200 com campo magnético de 4,7 T, observando o núcleo de ^{1}H a 200 MHz, utilizando uma sonda QNP multinuclear ($^{1}H/^{19}F/^{13}C/^{31}P$). Ambos apresentam sistema de *lock* em função de núcleo de ^{2}H, o campo magnético foi otimizado manualmente para cada amostra, e as análises foram realizadas a 25 °C.

Os parâmetros de aquisição e processamento das análises variaram de acordo com a aplicação desejada. Quando não especificado o contrário, os experimentos foram realizados conforme citado abaixo.

Os espectros de RMN de ^{1}H foram adquiridos pela aplicação de pulsos de excitação de 90° através da sequência de pulsos Bruker *zg*, com janela espectral de ~ 20,0 ppm. Nesta, foram distribuídos 16k (F80) ou 64k (A400, D200) pontos. A duração dos pulsos de excitação foi de 12,0 µs, e o intervalo entre repetições de 1,0 s. Quando necessário, sinais de solvente foram suprimidos através de irradiação por radiofrequência com potência variada através da sequência de pulso Bruker *zgpr*. Os espectros foram processados pela aplicação de uma multiplicação exponencial Lorentziana por um fator de 0,3 Hz sobre os *FID*s, seguido da aplicação da transformada de Fourier, com preenchimento com zeros por um fator de 2.

Os espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ foram adquiridos pela aplicação de pulsos de excitação de 30° com desacoplamento do núcleo de ^{1}H através da sequência de pulsos Bruker *zgpg30*, utilizando janela espectral de ~254,0 ppm, com 8k (F80) ou 32k pontos distribuídos, com um intervalo entre *scans* de 0,2 s. Os espectros foram processados pela aplicação de uma multiplicação exponencial Lorentziana por um fator de 1,0 Hz sobre os *FID*s, seguido da aplicação da Transformada de Fourier, com preenchimento com zeros para 64k pontos.

Espectros de DEPT135 foram adquiridos através da sequência de pulsos Bruker *deptsp135*, com mesmo processamento que os experimentos de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$.

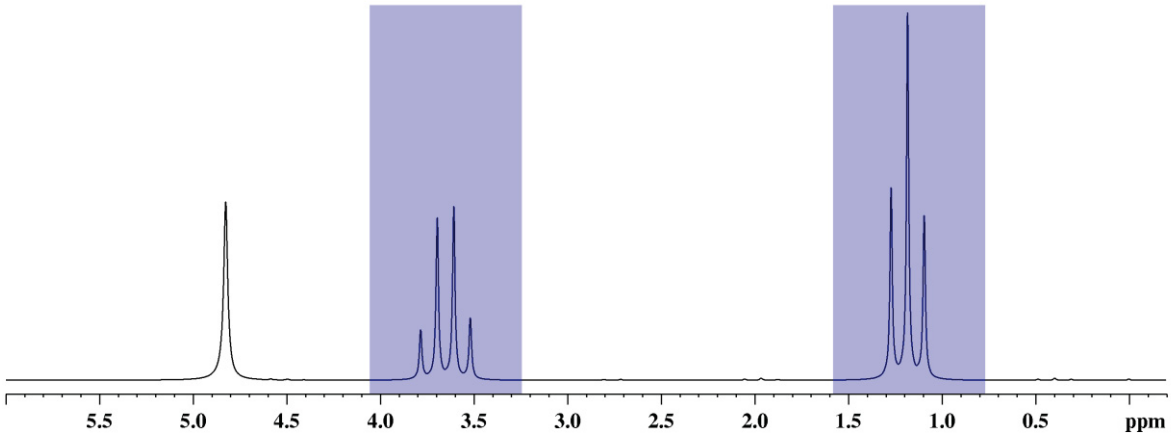
Experimentos de RMN bidimensionais foram realizados no espectrômetro F80. Análises de RMN de HSQC (^{1}H-^{13}C) foram realizadas com a sequência de pulsos hsqctgpsisp2.2, com 32 transientes com tamanhos de FID de 2048/256 pontos em F2 e F1, respectivamente. Análises de RMN de HMBC (^{1}H-^{13}C) foram realizadas com a sequência de pulsos hmbcetglp3nd, com 48 repetições com tamanhos de FID de 2048/256 pontos em F2 e F1, respectivamente.

3.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS

O preparo de amostra foi feito utilizando balança analítica Mettler Toledo modelo XS205DU e micropipetas *Eppendorf Reasearch plus*, em modelos monocanal com ajuste de volume variável entre 10 – 100 µL e 100 – 1000 µL. A quantificação se deu pela aplicação do método ERETIC2 em menu próprio dentro do *software TopSpin 4.1.4*.[58]

Na etapa de calibração, obteve-se um espectro de RMN de ^{1}H de uma amostra de etanol 1,5 mol·L^{-1} em D_2O/TMSP (0,3%), preparada a partir de solução de etanol absoluto 99,9%. Integrou-se como sinais de referência tanto o tripleto em 1,18 ppm quanto o quarteto em 3,65 ppm. A integração se deu em um intervalo de 0,8 ppm centralizada nos respectivos sinais de interesse. Na **FIGURA 7** está exposto o espectro de calibração, destacando-se as áreas dos sinais integrados.

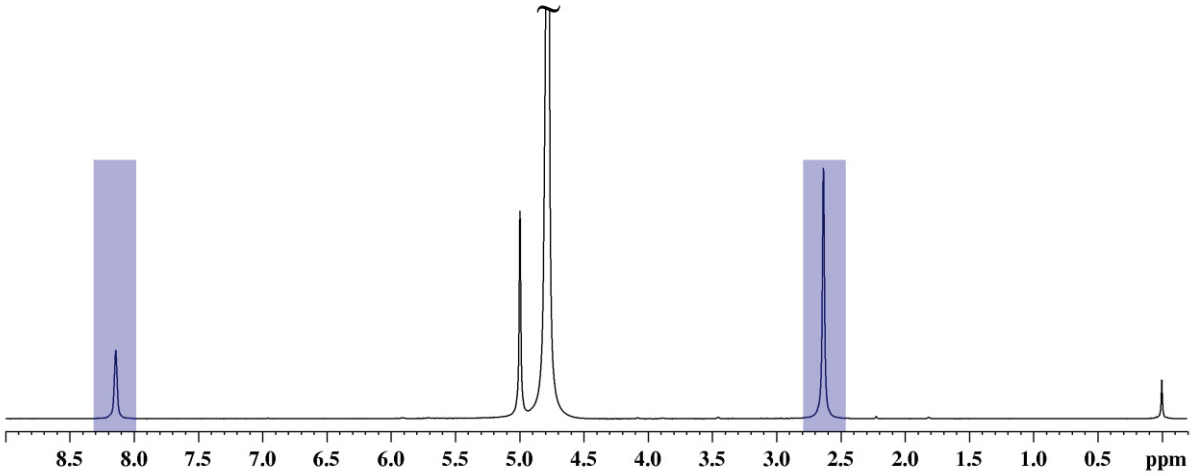
FIGURA 7 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO ETANOL UTILIZADO COMO ESPECTRO DE REFERÊNCIA PARA AS ANÁLISES QUANTITATIVAS. EM DESTAQUE, AS REGIÕES INTEGRADAS (D_2O, 80 MHZ).



FONTE: O autor (2024).

Na etapa de quantificação, espectros de RMN de ^1H foram obtidos para amostras de piridoxina em D_2O/TMSP (0,3%) nas concentrações de 25 mmol·L^{-1} (amostras A, B e C), 5 mmol·L^{-1} (amostras D e E) e 2,5 mmol·L^{-1} (amostra F). Foram integrados e considerados para a quantificação os simpletos em δ_H 2,63 e 8,14. Todas as amostras foram preparadas a partir de uma mesma solução estoque de 100 mmol·L^{-1}. A integração se deu em um intervalo de 0,3 ppm centralizada nos sinais de interesse. Um espectro (amostra A) utilizado para a quantificação está exposto na **Figura 8**.

FIGURA 8 - EXEMPLO DE ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA PIRIDOXINA UTILIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO. EM DESTAQUE, AS REGIÕES INTEGRADAS (D_2O, 80 MHZ).



FONTE: O autor (2024).

A razão Sinal/Ruído foi calculada automaticamente no *software TopSpin*. Para tal, considerou-se como "sinal" a região do sinal de menor intensidade utilizada na integração (quarteto em δ_H 3,65 para o etanol, simpleto em δ_H 8,14 para as amostras A-F), e como "ruído" foi selecionada uma região espectral de 1,0 ppm na qual não era observado sinal de ressonância.

Utilizou-se uma janela espectral de 13,00 ppm. Os parâmetros de aquisição foram variados durante as análises para permitir avaliar a robustez do método e como cada fator pode impactar os resultados da quantificação, estando devidamente explícitos quando apresentados seus resultados.

3.3 DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os estudos de degradação foram realizados em amostras de dois princípios ativos utilizados como insumos na fabricação de cápsulas vitamínicas: a piridoxina (vitamina B_6) e a

tiamina (vitamina B_1), seguindo protocolos da ANVISA pertinentes, mais especificamente a RDC n° 53 de 4 de novembro de 2015, o Guia Associado n° 04/2015, e a RDC n° 318 de 6 de novembro de 2019.[60-62]

Para as hidrólises ácidas, neutras e básicas, aproximadamente 50 mg de amostra foi submetida a situação de estresse frente a 600 µL de soluções de HCl 1,0 $mol \cdot L^{-1}$, tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 1,0 $mol \cdot L^{-1}$ (pH ~7,0), e KOH 1,0 $mol \cdot L^{-1}$, respectivamente. A oxidação foi realizada com solução alcóolica de H_2O_2 3%. Foram transferidos 550 µL de cada solução para tubos de RMN juntamente com 50 µL de D_2O contendo 10 $mg \cdot mL^{-1}$ de TMSP. Foram realizadas análises nos tempos 1, 3, 7 e 17 horas.

A degradação térmica foi realizada mantendo as amostras em estufa a 40 °C por 7 dias, seguido de mais 7 dias a 60 °C. Estas foram analisadas nos tempos 1, 3, 7 e 14 dias, utilizando D_2O contendo 0,3 % TMSP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE INSUMOS

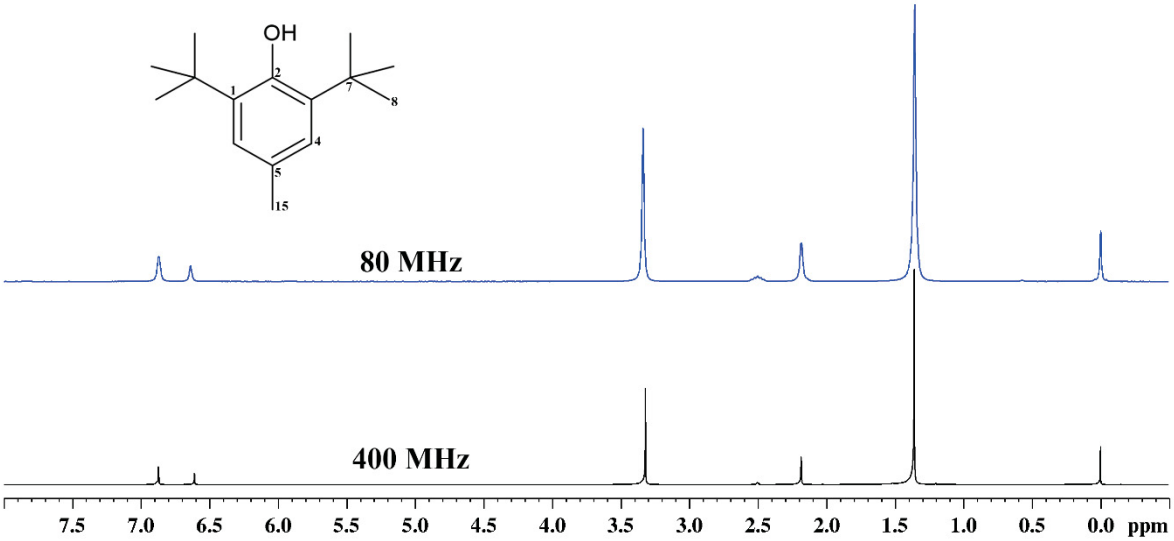
A RMN é uma ferramenta poderosa de identificação estrutural. Espectros de RMN de ^{1}H são obtidos de forma rápida, sendo suficientes para gerar informações necessárias para a elucidação de grande número de moléculas. Ainda, as análises de outros núcleos, como ^{13}C, ^{19}F e ^{31}P podem ser utilizadas caso maiores dados sejam necessários. Contudo, as limitações intrínsecas dos espectrômetros de RMN podem causar perda de informações que impossibilitem a aplicação da técnica na identificação de compostos, principalmente em relação a menor dispersão dos sinais de ressonância (na escala de ppm), resultando em maior sobreposição, e menor sensibilidade, requerendo assim maior tempo de análise.[13,20,30-32]

Para compostos de estruturas simples, espectros de RMN de ^{1}H obtidos em espectrômetros de bancada são capazes de fornecer resultados equivalentes aos de espectrômetros de alta resolução. Isto pode ser visto ao se comparar os espectros de RMN de ^{1}H obtidos em 80 MHz com os obtidos em 400 MHz, conforme exposto para o hidroxitolueno butilado (BHT) (**FIGURA 9**), a piridoxina (**FIGURA 10**), propilparabeno (**FIGURA 11**) e tiamina (**FIGURA 12**).

Observando os espectros (**FIGURAS 9-12**), nota-se que não há diferença nas informações que podem ser obtidas a partir da análise dos espectros de RMN de ^{1}H obtidos em 80 MHz e 400 MHz. Destaca-se o maior alargamento de sinais no espectro obtido em 80 MHz, mas é evidente que a multiplicidade dos sinais pode ser bem observada, quando presente, e não há sobreposição de sinais, de modo que o perfil espectral é o mesmo, independente do campo magnético operante do equipamento.

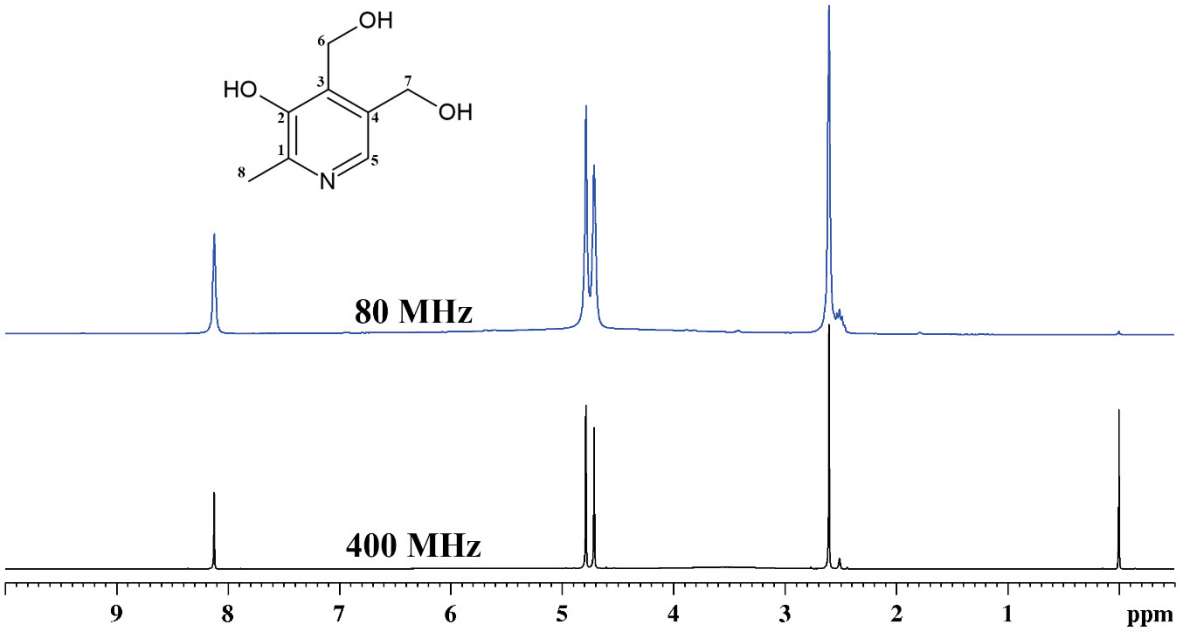
A completa atribuição dos sinais destes espectros, bem como de todos os demais citados no decorrer do trabalho, está descrita na **TABELA 1**.

FIGURA 9 - ESTRUTURA E ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO BHT (DMSO-d_6/TMS).



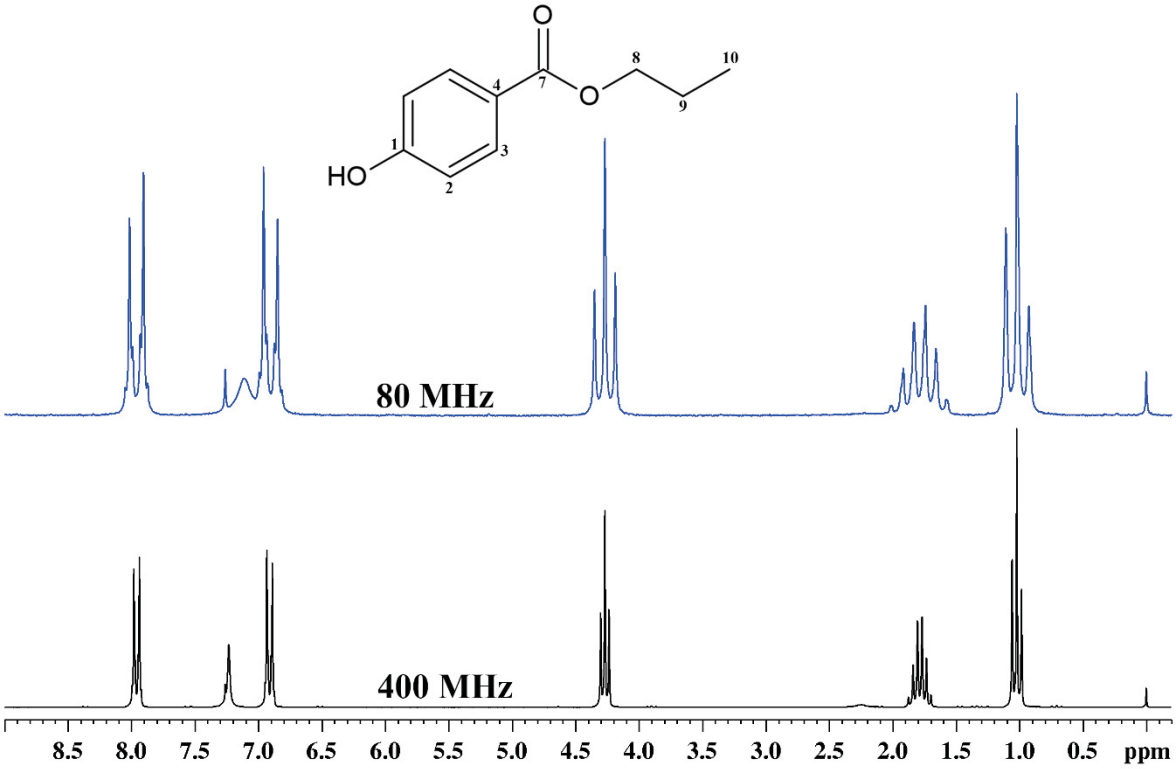
FONTE: O autor (2023).

FIGURA 10 - ESTRUTURA E ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA PIRIDOXINA (DMSO-d_6/TMS).



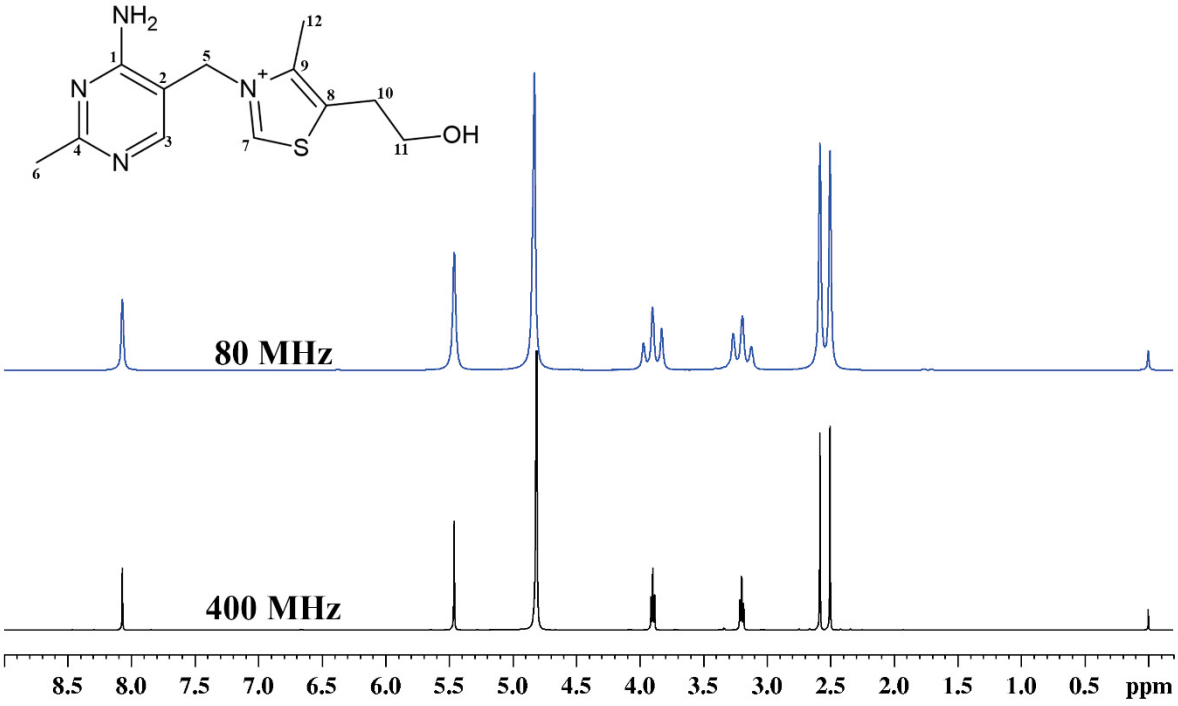
FONTE: O autor (2023).

FIGURA 11 - ESTRUTURA E ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO PROPILPARABENO ($CDCl_3$/TMS).



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 12 - ESTRUTURA E ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA TIAMINA (D_2O/TMSP).



FONTE: O autor (2023).

TABELA 1 - DADOS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO E MULTIPLICIDADE DOS SINAIS OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H E $^{13}C\{^{1}H\}$. (continua)

Composto	δ_H (ppm)	Atribuição	δ_C (ppm)	Atribuição
BHT[67] **(DMSO-d_6/TMS)**	1,36 (*s*)	H_8		
	2,18 (*s*)	H_{15}		
	6,64 (*s*)	OH		
	6,87 (*s*)	H_4		
Piridoxina[68,69] **(D_2O/TMSP)**	2,60 (*s*)	H_8	17,4	C_8
	4,71 (*s*)	H_6	59,9	C_6
	4,79 (*s*)	H_7	61,1	C_7
	8,12 (*s*)	H_5	132,7	C_5
			139,7	C_3
			143,5	C_4
			145,7	C_1
			155,7	C_2
Propilparabeno (CDCl$_3$/TMS)	1,02 (*t*, *J*= 7,2)	H_{10}		
	1,79 (*m*)	H_9		
	4,27 (*t*, *J*= 6,6)	H_8		
	6,90 (*d*, *J*= 8,8)	H_2		
	7,11 (*s*)	OH		
	7,96 (*d*, *J*= 8,8)	H_3		
Tiamina[70] **(DMSO-d_6/TMS)**	2,50 (*s*)	H_{12}	13,9	C_{12}
	2,58 (*s*)	H_6	26,9	C_6
	3,20 (*t*, *J*=5,8)	H_{10}	32,0	C_{10}
	3,90 (*t*, *J*= 5,8)	H_{11}	53,9	C_5
	5,46 (s)	H_5	63,2	C_{11}
	8,07 (s)	H_3	107,3	C_2
			139,0	C_8
			145,7	C_9
			160,0	C_3
			164,7	C_1
			171,9	C_4
Paracetamol[71] **(dmso-d_6/TMS)**	1,95 (*s*)	H_8		
	6,64 (*d*, *J*= 8,9)	H_3		
	7,30 (*d*, *J*= 8,9)	H_2		
	9,18 (*s*)	OH		
	9,64 (*s*)	NH		
Polidimetilsiloxano[72] **(puro)**	0,14 (*s*)	H_1		
Biotina[73] **(D_2O/TMSP)**	1,34 (*m*)	H_7	24,4	C_6
	1,51 (*m*)	H_8, H_6	27,9	C_7
	1,61 (*m*)	$H_{6'}$	28,0	C_8
	2,20 (*t*, *J*= 7,4)	H_9	33,4	C_9
	2,58 (*d*, *J*= 12,4)	H_5	39,8	C_5
	2,82 (*dd*, *J*= 12,4; 5,0)	$H_{5'}$	55,3	C_4
	3,10 (*dt*, *J*= 7,4; 5,6)	H_4	59,1	C_2
	4,13 (*m*)	H_3	61,0	C_3
	4,30 (*m*)	H_2	162,6	C_1
	6,36 (*s*)	NH_B	174,3	C_{10}
	6,43 (*s*)	NH_A		
	12,06 (*s*)	OH		

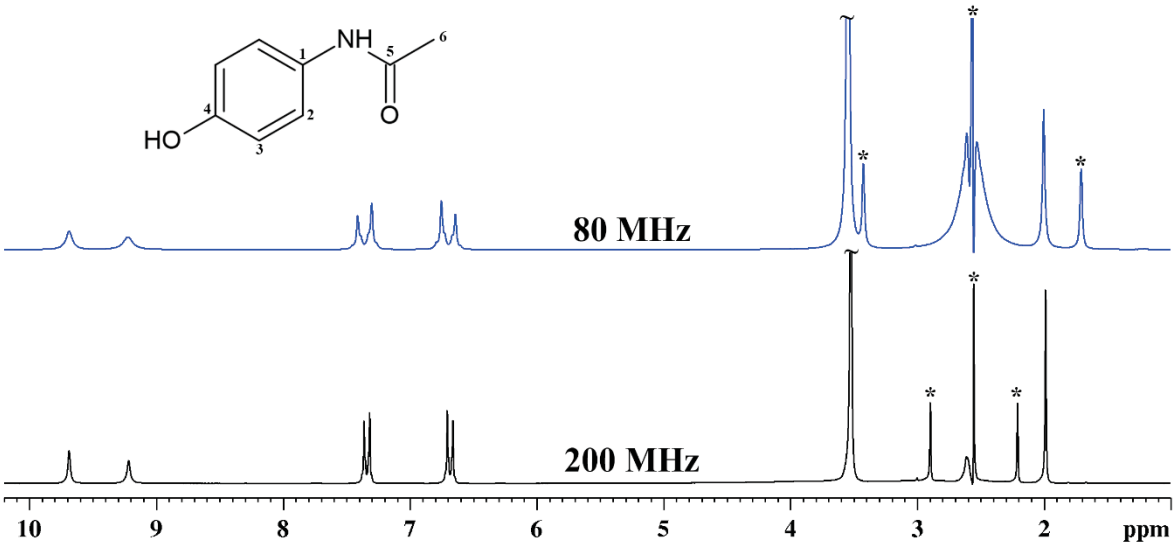
TABELA 1 - DADOS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO E MULTIPLICIDADE DOS SINAIS OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H E $^{13}C\{^{1}H\}$. (conclusão)

Composto	δ (^{1}H)	Atribuição	δ ($^{13}C\{^{1}H\}$)	Atribuição
	0,48 (s)	H_{19}		
	0,83 (d, *J*= 1,9)	H_{25}		
	0,85 (*d*, *J*= 1,9)	H_{26}		
	0,89 (*d*, *J*= 6,2)	H_{27}		
	0,94 – 2,15	*		
	2,32 (*dt*, *J*= 13,7; 4,9)	H_5		
Colecalciferol[69,70]	2,45 (*dd*, *J*= 13,1; 3,3)	H_2		
(DMSO-d$_6$/TMS)	2,80 (*dd*, *J*= 12,3; 3,7)	H_{15}		
	3,64 (*m*, *J*= 4,2)	H_1		
	4,67 (*d*, *J*= 2,2)	H_7		
	4,69 (*d*, *J*= 4,2)	OH		
	5,02 (*s*)	$H_{7'}$		
	5,95 (*d*, *J*= 11,1)	H_9		
	6,17 (*d*, *J*= 11,1)	H_8		
	0,55 (*t*, *J*= 7,4)	H_8		
	0,96 (*sex*, *J*= 7,4)	H_7		
	1,26 (*qui*, *J*= 7,4)	H_6		
	2,27 (*t*, *J*= 7,3)	H_5		
	4,28 (*s*)	H_4		
Losartana[76]	4,97 (*s*)	H_9		
(D$_2$O/TMSP)	6,60 (*d*, *J*= 8,1)	H_{11}		
	6,76 (*d*, *J*= 8,1)	H_{12}		
	6,94 (*d*, *J*= 7,5)	H_{21}		
	7,14 (*t*, *J*= 7,4)	H_{19}		
	7,28 (*t*, *J*= 7,4)	H_{20}		
	7,58 (*d*, *J*= 7,5)	H_{18}		

FONTE: O autor (2024).
* sinais sobrepostos.

A mesma situação de equivalência dos espectros obtidos é observada para o paracetamol (**FIGURA 13**). A estrutura simples deste composto faz com que não exista diferença significante entre os espectros de RMN de ^{1}H. Destaca-se aqui uma das vantagens dos espectrômetros de bancada modernos, ao realizar a análise em 80 MHz (^{1}H), utilizou-se dimetilsulfóxido não deuterado (DMSO) como solvente para o preparo da amostra, devido ao mecanismo de *lock* externo presente no equipamento, e a possibilidade de supressão do sinal de solvente, que faz com que informações não sejam perdidas. Entretanto, ao repetir a análise em 200 MHz (^{1}H), se fez necessária a adição de DMSO-d$_6$ (dimetilsulfóxido deuterado) à solução, visto a necessidade do *lock* no sinal do deutério (^{2}H), o que acarretou no encarecimento significativo da análise.

FIGURA 13 - ESTRUTURA E ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO PARACETAMOL (EM DMSO E DMSO/DMSO-d_6).



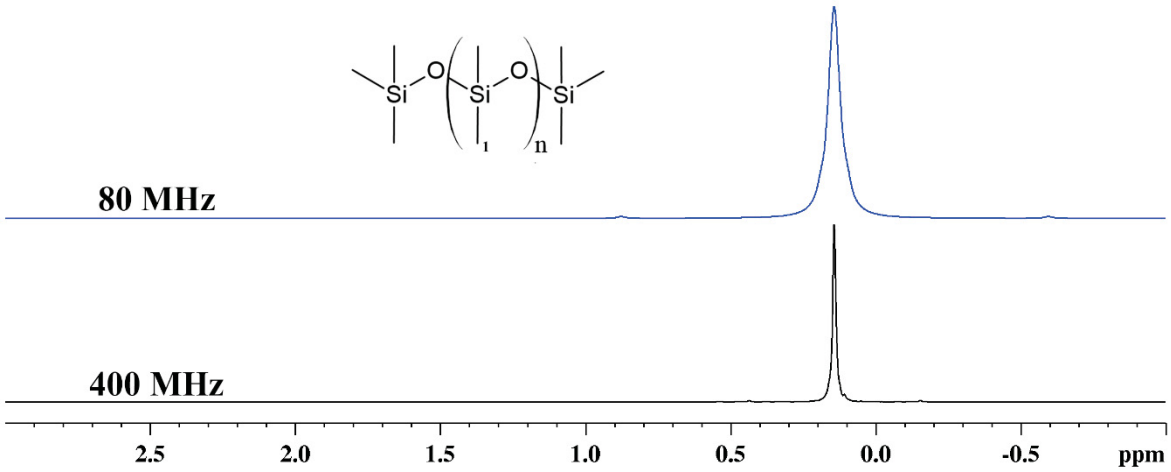
* Sinais do solvente.

FONTE: O autor (2023).

Esse encarecimento pode ser avaliado quantitativamente por uma rápida análise de preços. Em um mesmo fornecedor, encontra-se para venda 1000 mL de DMSO (anidro, 99,9%) por valores próximos à R$ 2.050,00, e 100 g de DMSO-d_6 (99,9% de D) por aproximadamente R$ 2.215,00. Em uma comparação direta, o preço do solvente não deuterado é de R$ 2,05 por mL, enquanto o solvente deuterado tem custo de R$ 26,40 pelo mesmo volume, ou seja, mais de dez vezes maior.

Um caso semelhante e extremo dessa situação é observado para o polidimetilsiloxano (**FIGURA 14**). Por se tratar de um composto líquido a temperatura ambiente, não requer a utilização de nenhum solvente em seu preparo amostral, podendo ser transferido diretamente para um tubo de RMN e analisado no espectrômetro F80. Todavia, para a reprodução da sua análise frente a um espectrômetro de maior campo magnético, é necessário a adição de solvente deuterado, neste caso $CDCl_3$.

FIGURA 14 - ESTRUTURA E ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO POLIDIMETILSILOXANO.

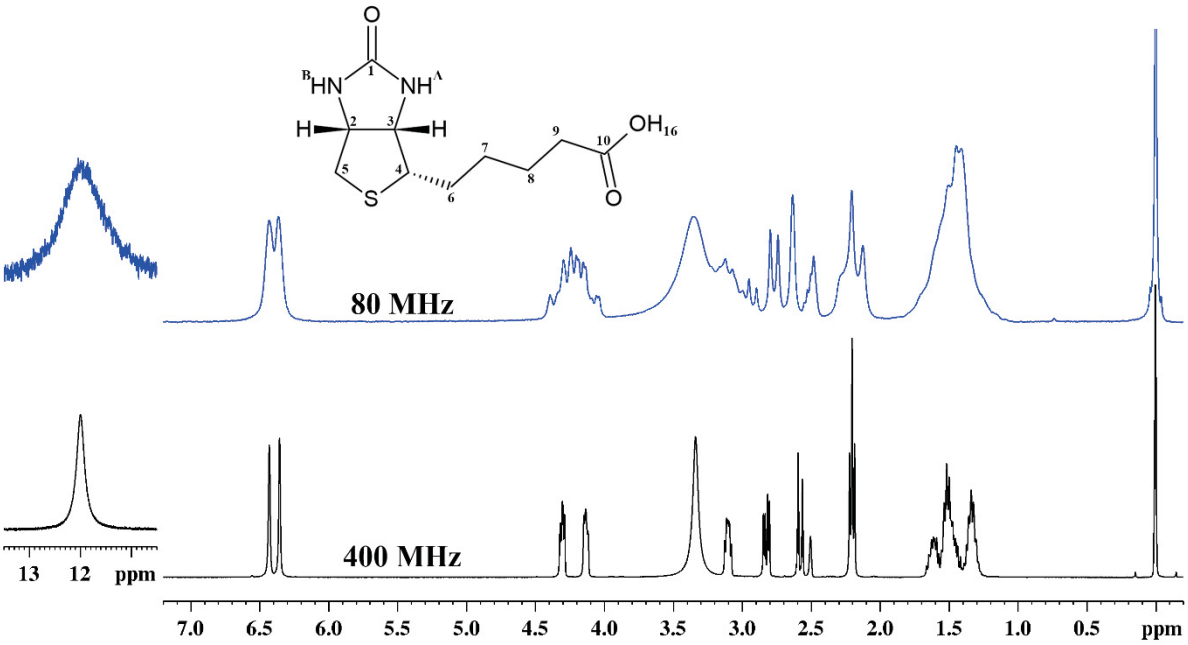


FONTE: O autor (2023).

Ao considerar moléculas com estruturas de maior complexidade, diferenças significativas são observadas ao comparar os espectros de RMN de ^{1}H obtidos em espectrômetros baseados em supercondutores com os de bancada, não podendo estes serem considerados equivalentes. Isto é resultante da maior sobreposição de sinais, que impossibilita principalmente a visualização inequívoca da multiplicidade dos sinais, como pode ser observado para os espectros da biotina (**FIGURA 15**), do colecalciferol (**FIGURA 16**) e da losartana (**FIGURA 17**).

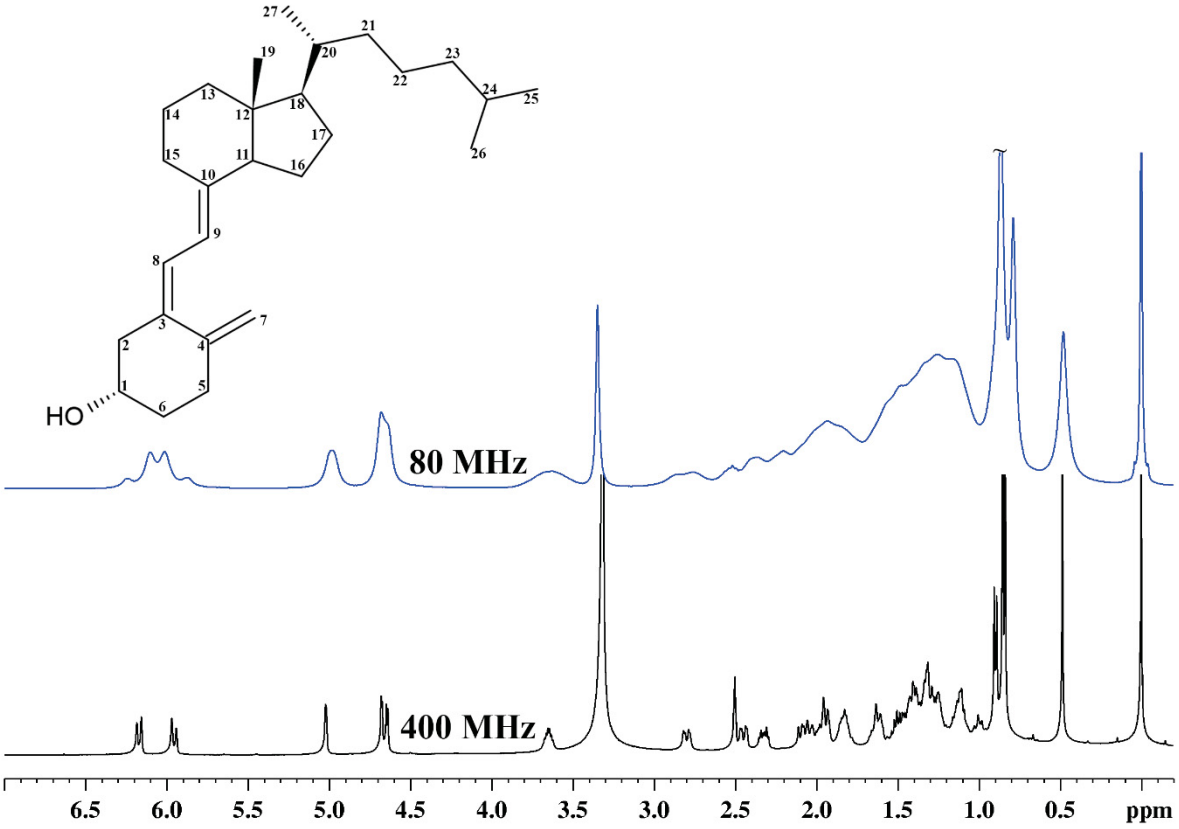
Nos três casos apresentados, fica evidente a perda de informações decorrente da intensa sobreposição de sinais nos espectros obtidos no F80, de modo que a interpretação espectral não pode ser realizada da maneira usual. Entretanto, este fato não significa que os resultados obtidos não são suficientes ou que a ferramenta não é útil para tais cenários. O perfil espectral observado é adequado, nos três casos, para que seja possível identificar a substância de interesse. Além disso, alguns sinais isolados em regiões do espectro podem ser distinguíveis e utilizados como marcadores para a identificação e até mesmo para quantificação destas substâncias. Não obstante, a presença de algum componente estranho ao meio possivelmente seria identificável pela mudança neste perfil. Cabe mencionar a existência da sobreposição de sinais até mesmo nos espectros obtidos em campos magnéticos maiores.

FIGURA 15 - ESTRUTURA E ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA BIOTINA (DMSO-d_6/TMS).



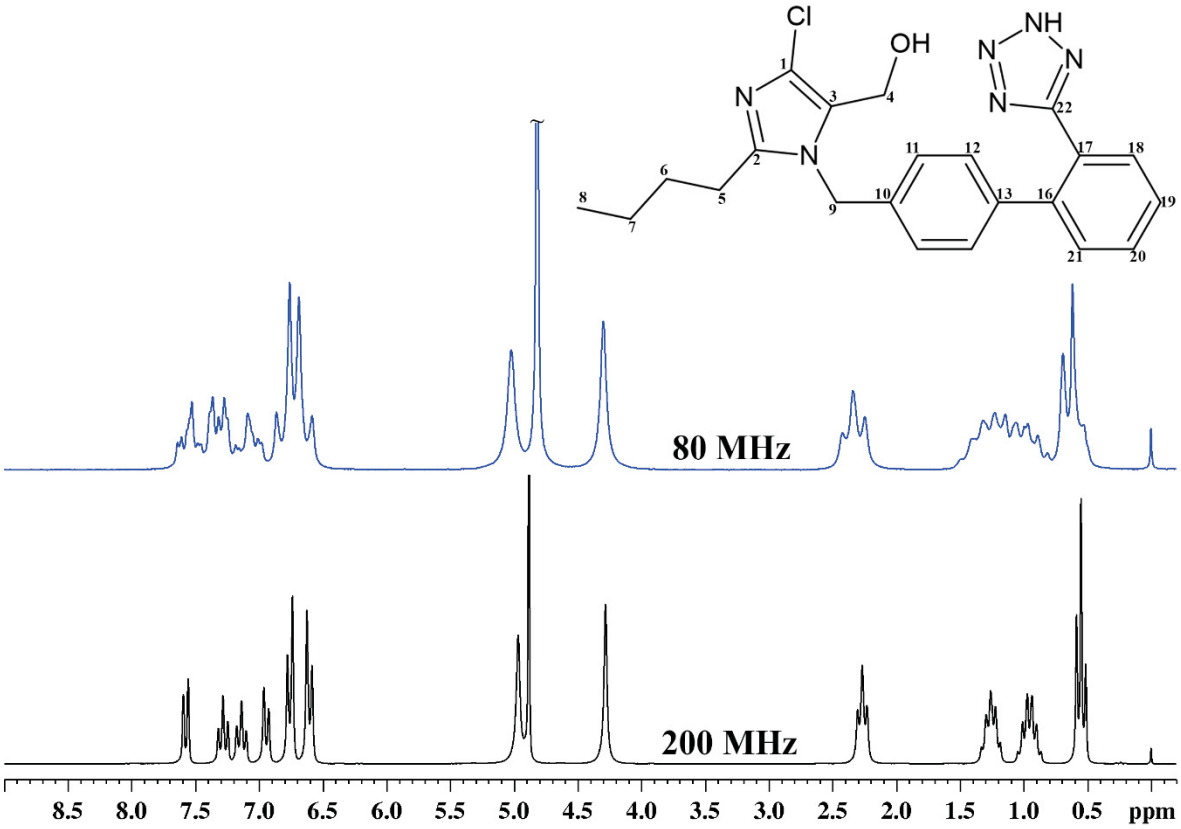
FONTE: O autor (2023).

FIGURA 16 - ESTRUTURA E ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO COLECALCIFEROL (DMSO-d_6/TMS).



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 17 - ESTRUTURA E ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA LOSARTANA (D_2O/TMSP).



FONTE: O autor (2023).

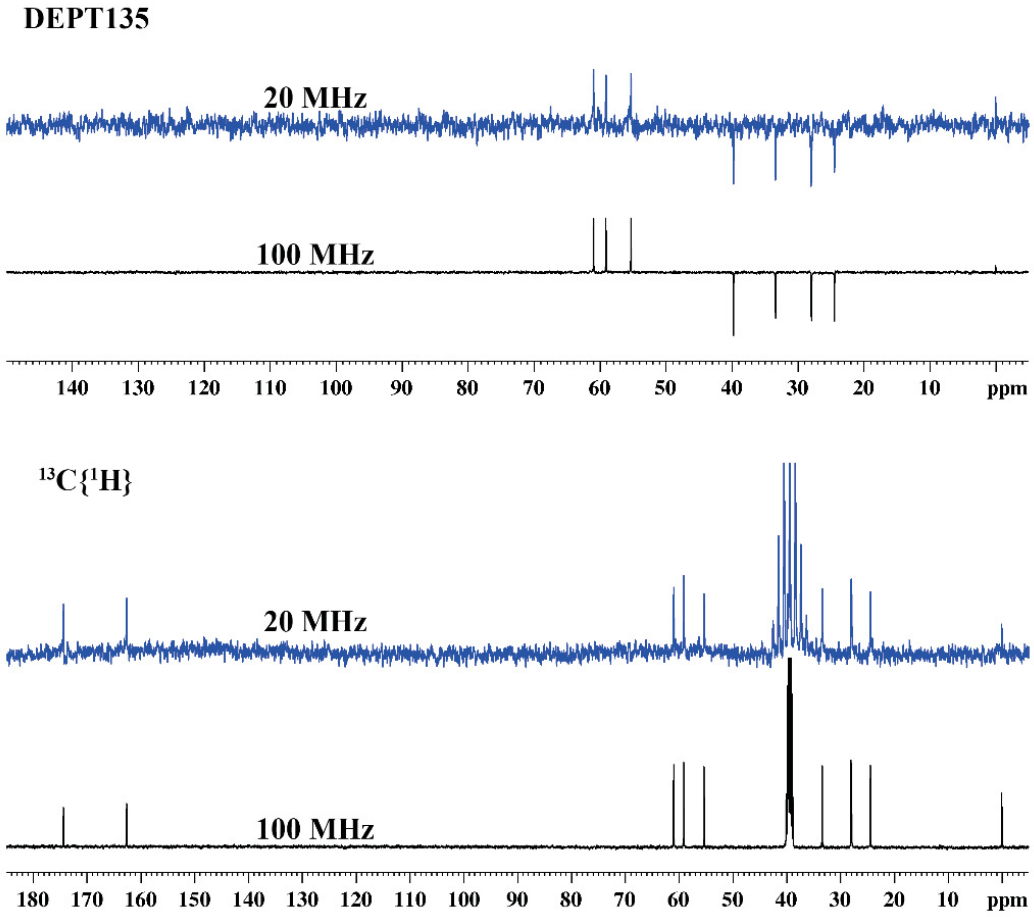
O contexto da análise também não deve ser deixado de lado. Considerando o controle de qualidade em um processo de produção, por exemplo, não é necessário que se tenha a total caracterização da amostra, apenas que seja devidamente identificada.[10] Tais espectros que apresentam limitação nos dados obtidos podem ser utilizados comparativamente com dados da literatura, com espectros com maior resolução obtidos em campos magnéticos mais intensos, e até mesmo para desenvolvimento de bancos de dados próprios, metodologia esta que tem sido introduzida recentemente para as análises de RMN, principalmente devido a maior difusão dos espectrômetros de bancada.[7]

Entretanto, se o resultado não for satisfatório, mais informações podem ser obtidas através de análises de outros núcleos ativos em RMN. Conforme citado anteriormente, embora alguns espectrômetros de bancada mais simples operem apenas para o núcleo de ^{1}H, são diversos os modelos capazes de observar outros núcleos. Espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ são extremamente úteis para identificação e caracterização de moléculas orgânicas. Nestes casos, a sobreposição de sinais deixa de ser um fator relevante pois, mesmo frente a um campo magnético menor, a dispersão dos sinais de ressonância do núcleo de ^{13}C é maior, e é mais raro que se observe a sobreposição de sinais. Porém, dada a baixa população natural

deste isótopo e sua menor constante giromagnética (em comparação com o ^{1}H), o tempo de análise para o ^{13}C é significativamente maior. Reduzindo o campo magnético, o tempo necessário para se obter resultados aceitáveis é ainda mais elevado.[20]

Estão expostos abaixo os espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ e DEPT135 da biotina (**FIGURA 18**), da piridoxina (**FIGURA 19)** e da tiamina (**FIGURA 20**), obtidos a frequências de 20 MHz e 100 MHz. É evidente a pior razão Sinal/Ruído na menor frequência de ressonância, resultante da menor sensibilidade. Todavia, destaca-se a equivalência das informações contidas nos espectros.

FIGURA 18 - ESPECTROS DE RMN DE $^{13}C\{^{1}H\}$ E DEPT135 DA BIOTINA (DMSO-d_6/TMS).

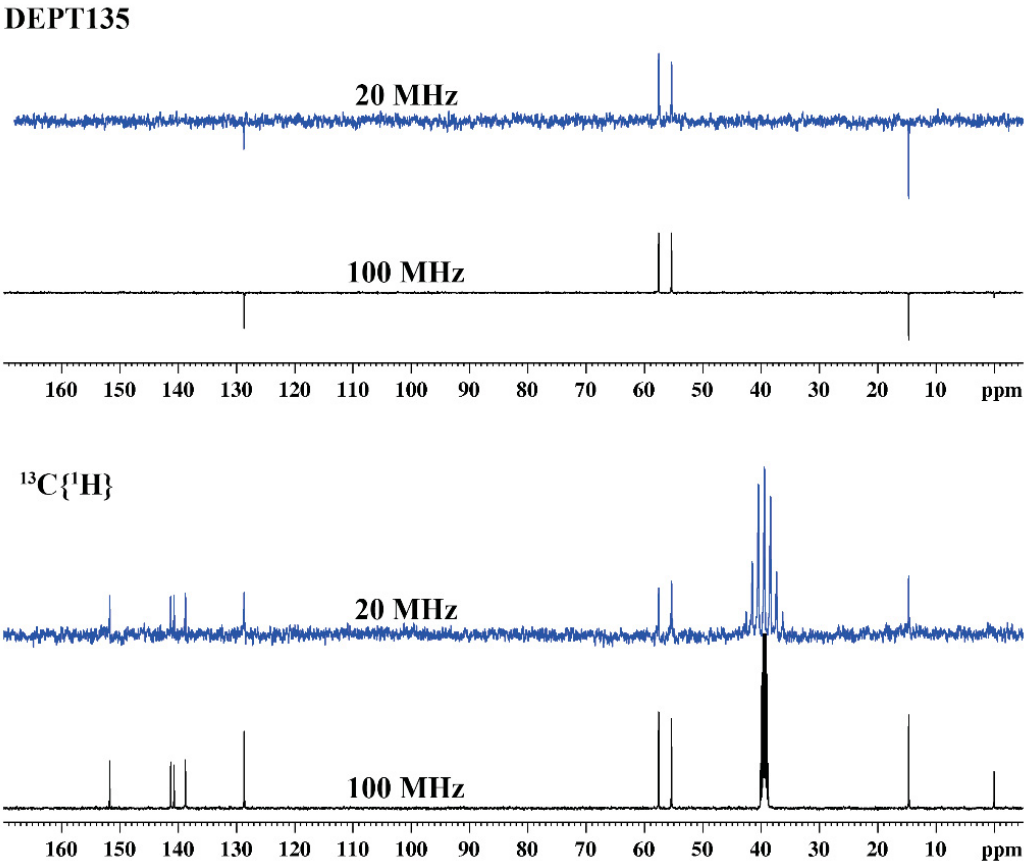


FONTE: O autor (2023).

Os espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ da tiamina e da piridoxina em 100 MHz foram obtidos através de 2k transientes, com tempo de análise de aproximadamente 40 minutos. No espectrômetro de bancada, foram necessários 16k transientes, com tempo de análise superior a 5 horas. Já para a biotina, 32k transientes foram necessários em 20 MHz, resultando em uma análise de mais de 10 horas de duração. Os espectros de DEPT135 foram obtidos com 1k

transientes em 100 MHz (~1 hora), e 8k transientes em 20 MHz (~4 horas). Deste modo, evidencia-se o aumento significativo no tempo de análise quando se compara espectrômetros de bancada e de alta resolução quando se análise o núcleo de ^{13}C.

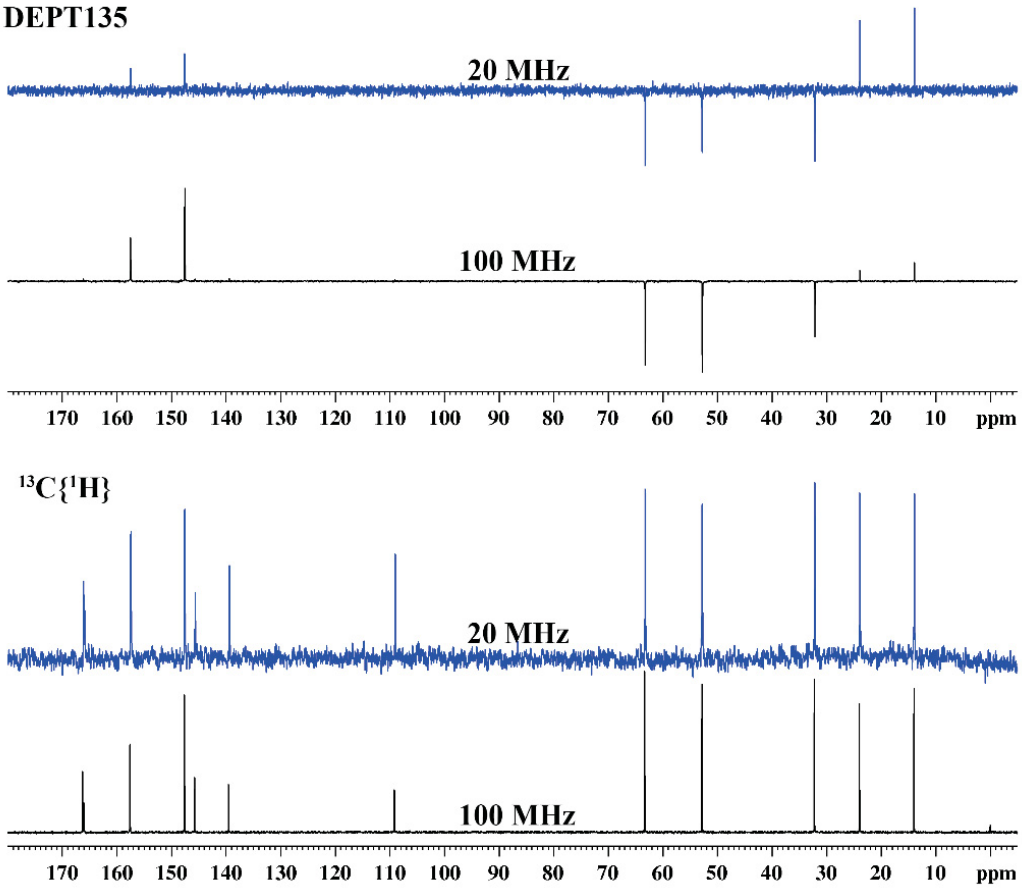
FIGURA 19 - ESPECTROS DE RMN DE $^{13}C\{^{1}H\}$ E DEPT135 DA PIRIDOXINA (DMSO-d_6/TMS).



FONTE: O autor (2023).

Contudo, novamente é importante ressaltar que os espectros de RMN de ^{1}H são suficientes para a grande maioria dos compostos, e neste caso o tempo de análise é equivalente ao se comparar os equipamentos operando em maiores e menores campos magnéticos. O maior tempo de aquisição para o núcleo de ^{13}C faz com que essa não seja aplicável como análise de rotina, mas que pode ser desenvolvido em horários de menor demanda de equipamento, como em períodos noturnos, gerando resultados extremamente satisfatórios.

FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN DE $^{13}C\{^{1}H\}$ E DEPT135 DA TIAMINA (D_2O/TMSP).



FONTE: O autor (2023).

A partir do apresentado, é inegável a possibilidade de aplicação de espectrômetros de RMN de bancada na principal etapa do controle de qualidade da fabricação de medicamentos, na qual através de experimentos unidimensionais dos núcleos de ^{1}H e ^{13}C se obtém resultados satisfatórios e que podem ser considerados equivalentes aos que seriam obtidos em espectrômetros com supercondutores.

4.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS

A análise de RMN quantitativa foi realizada sobre amostras de referência de piridoxina com concentração conhecida utilizando o espectrômetro Bruker F80, operando a 80 MHz para o núcleo de ^{1}H. Ao todo, foram analisadas três amostras com concentração de 25,0 mmol·L^{-1} (A, B e C), duas amostras de concentração 5,0 mmol·L^{-1} (D e E), e uma amostra com concentração de 2,5 mmol·L^{-1} (F), sendo que todas estas foram preparadas a partir da diluição de uma mesma solução estoque. A amostra de calibração utilizada foi uma solução aquosa de etanol à 1,5 mol·L^{-1}. Alguns parâmetros de aquisição, considerados

relevantes, foram variados durante a análise, para averiguar as suas interferências nos resultados quantitativos obtidos.

Os valores baixos de concentração das amostras de piridoxina foram escolhidos para avaliar como os limites de sensibilidade do equipamento podem interferir nos resultados quantitativos. Por exemplo, em 600 μL de uma solução à 2,5 mmol·L^{-1} se tem aproximadamente 0,25 mg de piridoxina.

A quantificação por RMN é usualmente feita pela integração de um único sinal de ressonância da amostra. Neste caso, escolheu-se integrar os dois simpletos em δ_H 2,63 (sinal s1) e 8,14 (sinal s2), em virtude da distinção das áreas e intensidades dos mesmos, o que pode resultar em resultados ligeiramente diferentes. Além disso, os sinais correspondem a hidrogênios que estão em ambientes químicos diferentes na molécula, desta maneira o cálculo da concentração a partir da média dos sinais pode ser considerada melhor representante do todo.

Na **TABELA 2**, estão expostos os resultados das concentrações encontradas para a integração dos sinais s1 e s2 da Amostra A, e a média de ambos ($\bar{C}$), da Amostra A, mantendo-se todos os parâmetros de aquisição iguais, com exceção do número de transientes (*ns*). Foram realizadas três repetições distintas em um mesmo dia.

A concentração média, calculada a partir dos 18 experimentos, gerando 36 resultados de integração, foi de 24,16 mmol·L^{-1}, com desvio padrão (σ) de 0,13 mmol·L^{-1}. Este valor de σ indica uma dispersão mínima dos valores, ou seja, uma alta precisão, a qual também pode ser observada ao se avaliar os valores extremos dentro do intervalo de resultados, tendo um mínimo de 23,91 mmol·L^{-1} e máximo de 24,50 mmol·L^{-1}.

TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES CALCULADAS A PARTIR DOS DOIS SINAIS DE RESSONÂNCIA DA AMOSTRA A, E A MÉDIA DE AMBOS, EM MMOL·L^{-1}.

	Repetição 1			**Repetição 2**			**Repetição 3**		
ns	**C (s1)**	**C (s2)**	**$\bar{C}$**	**C (s1)**	**C (s2)**	**$\bar{C}$**	**C (s1)**	**C (s2)**	**$\bar{C}$**
2	24,04	23,99	**24,02**	24,37	24,14	**24,26**	24,26	24,11	**24,18**
4	23,97	24,12	**24,04**	24,28	24,50	**24,39**	24,09	24,20	**24,15**
8	24,11	23,91	**24,01**	24,21	24,03	**24,12**	24,18	24,16	**24,17**
16	24,06	23,98	**24,02**	24,18	24,00	**24,09**	24,29	24,36	**24,32**
32	24,15	24,11	**24,13**	24,22	24,14	**24,18**	24,22	24,06	**24,14**
64	24,21	24,21	**24,21**	24,25	24,19	**24,22**	24,30	24,30	**24,30**

FONTE: O autor (2024).

Ao se avaliar a diferença no valor de concentração encontrada através da integração dos dois sinais de ressonância, nota-se que não existe uma tendência clara. Em alguns casos, o

sinal s1 resulta em uma maior concentração, enquanto em outros casos uma menor concentração.

A variação *intraday* da aplicação do ERETIC2 foi avaliada, observando-se valores de concentração média para cada repetição de 24,07 mmol·L^{-1}, 24,21 mmol·L^{-1} e 24,21 mmol·L^{-1}, respectivamente, o que resulta em um desvio padrão de 0,08 mmol·L^{-1}. Ou seja, não houve uma variação significativa entre as repetições, indicando a boa repetibilidade da técnica.

Ao todo, foram avaliados 6 valores de *ns*, visando observar quais resultariam em um melhor custo-benefício, considerando a qualidade do resultado obtido e o tempo do experimento. A duração das análises é um fator importante a ser levado em consideração, e neste caso variou de menos de 1 minuto (*ns* = 2) até aproximadamente 30 minutos (*ns* = 64).

Entretanto, notou-se que não houve uma diferença significativa nos resultados obtidos com o aumento de *ns*. Ou seja, para amostras similares a esta, não há a necessidade de realizar experimentos longos, com resultados concretos sendo obtidos com poucos transientes.

Uma análise sobre a razão S/R, calculada automaticamente através do *software TopSpin 4.1.4*, permitiu avaliar esta conclusão. Para isso, selecionou-se como "região de ruído" entre 5,3 e 7,5 ppm, onde não foram observados sinais de ressonância. A escolha por esta região, e não nos extremos do espectro, se deu para melhor avaliar a utilização de um pulso com radiação de radiofrequência utilizado para supressão do sinal de ressonância do solvente em região próxima. A "região de sinal" escolhida foi a mesma utilizada na integração do sinal s2, por apresentar a menor intensidade e estar menos destacado da linha de base dentre os sinais de ressonância, sendo considerado um limite mínimo.

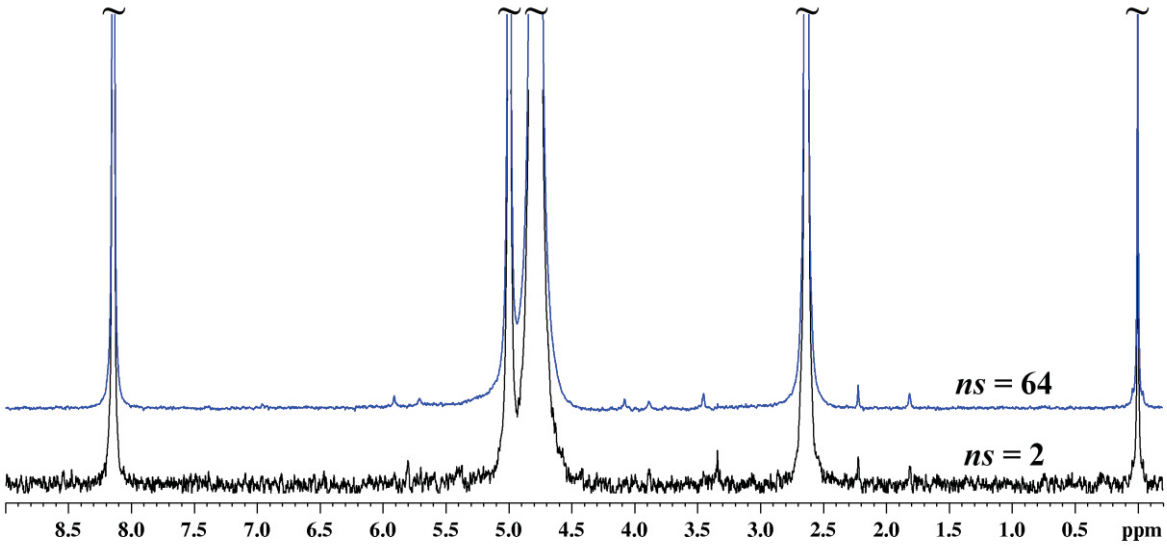
Os valores da razão S/R de cada um dos espectros está exposto na **TABELA 3**. Embora se observe uma relação direta entre o aumento na razão S/R com o aumento do número de transientes, o valor de S/R quando *ns* é igual a 2 já é suficientemente alto para que se tenha condição favorável para quantificação, não sofrendo efeitos negativos de oscilações na linha de base. Na **FIGURA 21**, compara-se os espectros adquiridos com 2 e 64 transientes, os quais foram manipulados para que apresentassem a mesma intensidade de sinais, deixando evidente a melhora da razão S/R.

TABELA 3 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO MÉDIA, EM MMOL·L^{-1}, E DA RAZÃO S/R DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DA AMOSTRA A.

	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3	
ns	**$\bar{C}$**	**S/R**	**$\bar{C}$**	**S/R**	**$\bar{C}$**	**S/R**
2	24,02	70,73	24,26	75,84	24,18	66,53
4	24,04	99,80	24,39	100,48	24,15	114,97
8	24,01	132,38	24,12	134,87	24,17	144,17
16	24,02	174,22	24,09	173,38	24,32	168,11
32	24,13	198,68	24,18	197,99	24,14	210,31
64	24,21	251,92	24,22	232,11	24,30	254,33

Fonte: O autor (2024).

FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DA AMOSTRA A COM 2 E 64 TRANSIENTES.



FONTE: O autor (2024).

Todos estes apontamentos foram realizados para as amostras B e C, também de concentração de 25,0 mmol·L^{-1}. Os resultados para ambas estão expostos nas **TABELAS 4** e **5**, respectivamente, e corroboraram com os resultados obtidos para a Amostra A. Como a integração dos dois sinais de ressonância resultou em resultados equivalentes, apenas a concentração média foi exposta.

TABELA 4 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO MÉDIA, EM MMOL·L^{-1}, E DA RAZÃO S/R DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DA AMOSTRA B.

	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3	
ns	**$\bar{C}$**	**S/R**	**$\bar{C}$**	**S/R**	**$\bar{C}$**	**S/R**
2	24,57	67,17	24,22	62,19	24,13	72,30
4	24,42	103,40	24,34	98,26	24,42	90,33
8	24,51	136,28	24,55	151,34	24,43	133,67
16	24,40	179,07	24,34	167,51	24,41	194,90
32	24,43	239,66	24,49	200,63	24,40	223,52
64	24,45	275,28	24,46	253,43	24,45	246,24

Fonte: O autor (2024).

TABELA 5 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO MÉDIA, EM MMOL·L^{-1}, E DA RAZÃO S/R DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DA AMOSTRA C.

	Repetição 1		**Repetição 2**		**Repetição 3**	
ns	**$\bar{C}$**	**S/R**	**$\bar{C}$**	**S/R**	**$\bar{C}$**	**S/R**
2	25,99	72,86	26,06	87,60	26,04	80,23
4	26,06	102,54	26,29	103,87	25,99	114,05
8	26,11	138,27	26,12	142,40	25,89	145,96
16	26,15	167,92	26,17	206,74	26,14	185,95
32	26,03	225,61	26,07	228,44	26,16	212,14
64	26,05	263,44	26,19	265,80	26,14	264,49

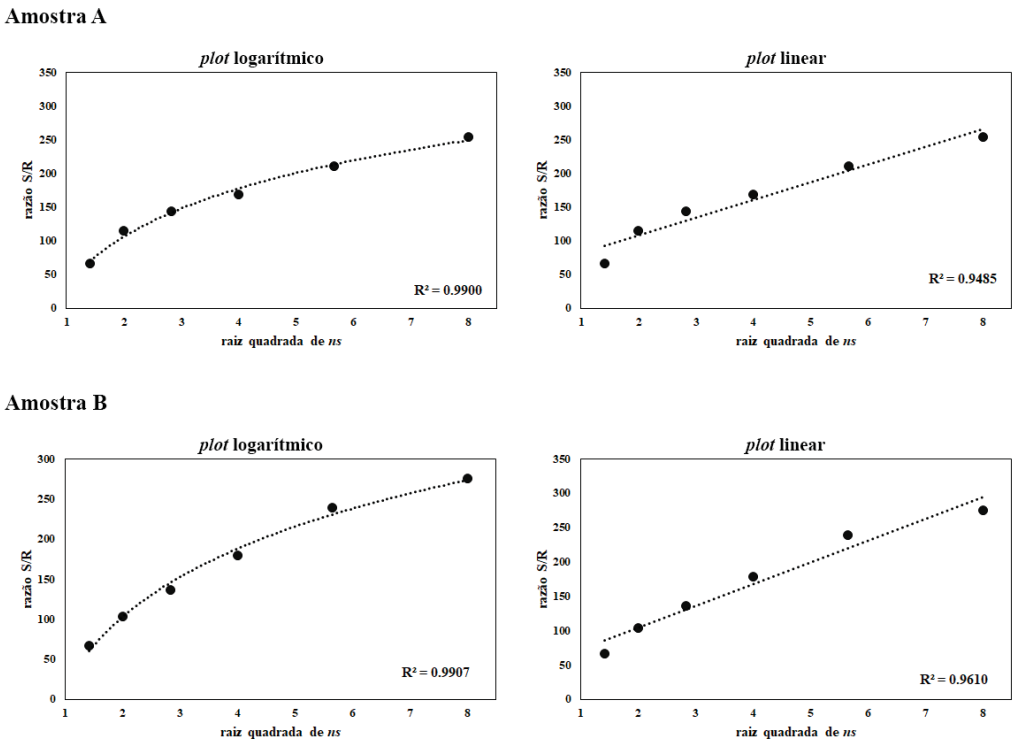
Fonte: O autor (2024).

Dessa forma, baseando-se nas 36 integrações (18 análises), a Amostra B apresentou concentração média de 24,41 mmol·L^{-1} e um σ de 0,13 mmol·L^{-1}, indicando novamente a alta precisão da técnica, e a variação *intraday* foi de apenas 0,05 mmol·L^{-1}, evidenciando sua repetibilidade. Mais uma vez, o aumento de *ns* mostrou-se desnecessário, não havendo impacto nos resultados, dentre os valores estudados. Para a amostra C, a concentração média foi de 26,09 mmol·L^{-1}, com σ de 0,13 mmol·L^{-1} e variação *intraday* de 0,05 mmol·L^{-1}.

As três amostras apresentaram resultados ligeiramente diferentes, comparado a concentração nominal de 25,0 mmol·L^{-1} esperada para as amostras. Como todas foram preparadas a partir de uma mesma solução estoque, esperava-se que apresentassem concentrações iguais, mas uma pequena diferença entre elas foi observada. Ao se considerar as três amostras, obteve-se um valor médio de 24,89 mmol·L^{-1} e um desvio padrão de 1,05 mmol·L^{-1}, sendo este um valor considerado relevante. Porém, não se pode dizer que se trata de falta de acurácia da técnica, visto a fonte de erros oriunda do preparo de amostra. Apesar do cuidado tomado, deve-se considerar questões relativas à instrumentação, que pode não ser ideal, e principalmente ao erro do analista no preparo de amostras, podendo ter ocasionado essa oscilação nos resultados encontrados.

A relação entre a razão S/R é linear com a raiz quadrada de *ns*.[77] Os coeficientes de linearidade (R^2) obtidos, porém, não alcançaram valores acima de 0,97, e chegaram a atingir valores abaixo de 0,90. Embora estes valores sejam suficientes para se afirmar a existência de certa linearidade, eram esperados valores melhores de R^2. Curiosamente, para todas as análises das Amostras A e B, a relação entre a razão S/R e a raiz quadrada de *ns* foi melhor definida através de uma relação logarítmica, conforme exemplificado na **FIGURA 22**.

FIGURA 22 - RELAÇÃO ENTRE A RAZÃO S/R E A RAIZ QUADRADA DE *NS* COM *PLOT* LINEAR E LOGARÍTMICO.



FONTE: O autor (2024).

Isto pode ser explicado pelo desvio do ponto referente ao menor valor de *ns* da tendência linear, apresentando valores de razão S/R inferiores ao previsto, fato este que pode ser visualizado nos gráficos mostrados acima, de modo que a tendência inicia em uma crescente, e atinge a linearidade apenas para valores maiores de *ns*, adequando-se, portanto, a um *plot* logarítmico. O motivo deste desvio da tendência é possivelmente decorrente do fato de que com apenas 2 transientes não se tem informação suficiente para que as interferências destrutivas do ruído se somem de forma significante, resultando em uma menor razão S/R, enquanto para 4 transientes este cancelamento é mais evidente.

Para as amostras B e C avaliou-se também a reprodutibilidade através da análise *interday*, repetindo os experimentos decorrido 5 dias da primeira análise, também em triplicata. Durante este período, as amostras foram condicionadas em refrigerador sem precauções extras. Os resultados da concentração média encontrados estão expostos na **TABELA 6**.

TABELA 6 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO MÉDIA ENCONTRADOS PARA AS AMOSTRAS B E C EM ANÁLISES DE RMN DE ^{1}H REALIZADAS EM DIAS DIFERENTES, EM MMOL·L^{-1}.

	Amostra B		**Amostra C**	
ns	**$\bar{C}$ (Dia 1)**	**$\bar{C}$ (Dia 6)**	**$\bar{C}$ (Dia 1)**	**$\bar{C}$ (Dia 6)**
2	24,31	24,33	26,03	25,82
4	24,39	24,23	26,11	25,73
8	24,50	24,22	26,04	25,76
16	24,38	24,25	26,16	25,76
32	24,44	24,27	26,09	25,79
64	24,45	24,25	26,13	25,80
$\bar{c}$	**24,41**	**24,26**	**26,09**	**25,78**

Fonte: O autor (2024).

Esperava-se observar o mesmo valor de concentração, ou até mesmo um pequeno aumento, decorrente de uma possível vaporização do solvente, mas visualizou-se o oposto, com ambas as amostras apresentando uma ligeira diminuição na concentração. Um possível motivo de tal variação pode ser alterações na qualidade do *shimming*, feito de maneira automática previamente as análises. De todo modo, as variações de concentração foram mínimas, indicando a reprodutibilidade dos resultados.

As mesmas análises feitas para as Amostras A-C foram repetidas para as amostras D e E, de 5,0 mmol·L^{-1}, e para a amostra F de 2,5 mmol·L^{-1}. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados de concentração média e razão S/R estão expostos na **TABELA 7**.

As amostras D e E apresentaram concentrações médias de 5,53 mmol·L^{-1} e 5,76 mmol·L^{-1}, com desvios padrões de 0,08 mmol·L^{-1} e 0,06 mmol·L^{-1}, respectivamente. A variação *intraday* de ambas foi inferior a 0,04 mmol·L^{-1}, e a variação de *ns* não foi significativa para o cálculo da concentração. Atribui-se novamente a diferença entre a concentração obtida e o valor nominal (de 5,0 mmol·L^{-1}) a erros no preparo amostral.

TABELA 7 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO MÉDIA, EM MMOL·L^{-1}, E DA RAZÃO S/R DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DAS AMOSTRAS D-F.

	Amostra D		**Amostra E**		**Amostra F**	
ns	**$\bar{C}$**	**S/R**	**$\bar{C}$**	**S/R**	**$\bar{C}$**	**S/R**
2	5,64	16,12	5,76	16,42	2,23	6,26
4	5,45	23,72	5,76	20,73	2,40	9,44
8	5,49	31,65	5,72	29,15	2,45	11,58
16	5,48	46,94	5,78	40,67	2,46	15,04
32	5,57	61,43	5,76	56,08	2,47	18,16
64	5,54	77,41	5,77	73,22	2,46	23,06

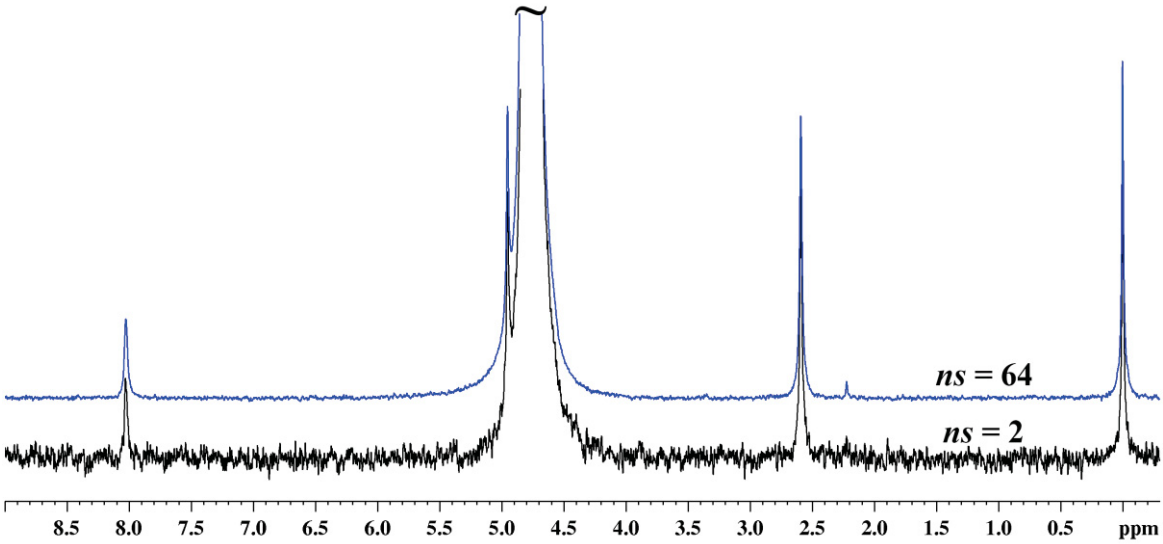
Fonte: O autor (2024).

Para a amostra F, encontrou-se uma concentração média de 2,41 mmol·L^{-1} e desvio padrão de 0,11 mmol·L^{-1}. Neste caso, observou-se uma diferença significante entre o resultado

obtido com *ns* igual a 2 e valores maiores, apresentando em valor médio menor que o das demais medições. Isto significa que para concentrações tão pequenas quanto esta, uma análise com *ns* igual a 2 não é recomendada, o que se deve principalmente ao seu pequeno valor de razão S/R. Ao excluirmos da análise os resultados obtidos com *ns* = 2, o desvio padrão dos resultados cai para 0,07 mmol·L^{-1}, ou seja, a variação é menor.

Na **FIGURA 23**, está exposto um comparativo entre os espectros da amostra F utilizando *ns* igual a 2 e 64, ajustados para apresentarem a mesma intensidade dos sinais, na qual fica evidente a piora na razão S/R, o que resulta na inadequada integração do sinal, com maiores oscilações, resultando em valores menos precisos.

FIGURA 23 - ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DA AMOSTRA F COM 2 E 64 TRANSIENTES.



FONTE: O autor (2024).

O cálculo do limite de quantificação (LOQ), realizado conforme a **equação (3)**, permitiu avaliar a veracidade dos cálculos das concentrações.[78] Para a análise com *ns* igual a 2 encontrou-se um LOQ de aproximadamente 3,6 mmol·L^{-1}, ou seja, realizar a quantificação a partir deste espectro não é adequado. Para a análise com *ns* igual a 4, o LOQ é de aproximadamente 2,5 mmol·L^{-1}, sendo, portanto, o valor mínimo de *ns* que pode ser utilizado para se obter resultados válidos. É importante ressaltar, porém, que este fato não é de maneira alguma um problema impactante em uma análise. Um experimento de RMN de ^{1}H com 4 transientes, considerando todos os parâmetros quantitativos aqui abordados, pode ser realizado em menos de 3 minutos, sendo uma ferramenta muito mais rápida que outras metodologias.

$$\mathrm{LOQ} = \frac{10 \cdot \mathrm{C}}{\mathrm{S/R}} \qquad \textbf{(3)}$$

Os resultados expostos até o momento mostraram a alta repetibilidade e reprodutibilidade da técnica, através da análise das variações *intraday* e *interday* das amostras. Ficou evidente também a alta precisão dos resultados, com desvios padrões mínimos entre as repetições.

O número de transientes utilizado na aquisição dos espectros só foi relevante para a amostra de menor concentração, e apenas para o menor valor de *ns* avaliado, indicando que resultados satisfatórios podem ser obtidos em curtos períodos de análise, mostrando um avanço frente a outras metodologias de análises quantitativas.

Outro fator que apresenta efeito sobre a razão S/R é o valor de RG (*Receiver Gain*). Este é um parâmetro eletrônico utilizado para adequar a amplitude do FID com a faixa dinâmica do digitalizador, ou seja, atua na conversão do sinal de eletrônico para digital.[48,51] Representado como um valor adimensional, este é capaz de maximizar o valor da razão S/R, aumentando a sensibilidade da análise.[59,77,79] Em muitos espectrômetros modernos, o cálculo de RG pode ser feito de maneira automática, otimizando seu valor para cada análise em questão de segundos. Porém, não são todos os espectrômetros de bancada que apresentam esta funcionalidade, e caso se deseje alterar o valor de RG, deve ser feito manualmente. Além disso, os valores de RG são limitados a diferentes intervalos, de acordo com o modelo do espectrômetro utilizado.

O valor de RG ideal varia de acordo com diversos parâmetros, como temperatura e concentração da amostra, o núcleo que está sendo analisado, a sequência de pulsos utilizada na análise, entre outros. Deste modo, um aumento de RG não acarreta diretamente em um aumento da razão S/R. Quando valores muito altos são utilizados, é possível que se cause efeitos negativos ao espectro, oriundos de truncamentos do FID, ocasionando o surgimento de imperfeições e oscilações na linha de base que afetam o formato dos sinais de ressonância e impossibilitam a integração adequada. Portanto, deve-se ter cuidado ao se trabalhar com alterações manuais ao valor de RG.[59,60,79]

No F80, os possíveis valores de RG são limitados entre 1 e 100, sendo 1 seu valor padrão, e não existe a possibilidade de realizar um cálculo automático para definir seu valor ideal.[42] Para as amostras A e B, foram realizadas análises com valores de RG de 1 e 15, mantendo todos os demais parâmetros de aquisição fixos, e os resultados estão expostos na **TABELA 8**.

TABELA 8 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO, EM MMOL·L^{-1}, E DA RAZÃO S/R DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DAS AMOSTRAS A E B COM DIFERENTES VALORES DE RG.

	Amostra A				**Amostra B**			
	RG = 1		**RG = 15**		**RG = 1**		**RG = 15**	
ns	**C**	**S/R**	**C**	**S/R**	**C**	**S/R**	**C**	**S/R**
2	24,17	71,30	24,28	77,57	24,70	76,01	24,46	67,75
4	24,18	95,16	24,49	103,43	24,55	99,38	24,46	108,32
8	24,12	146,10	24,26	145,41	24,45	129,75	24,56	146,83
16	24,18	173,66	24,26	176,55	24,49	160,51	24,59	169,61
32	24,15	220,76	24,34	208,53	24,57	207,71	24,59	214,14
64	24,23	228,37	24,40	210,93	24,62	255,18	24,62	224,82

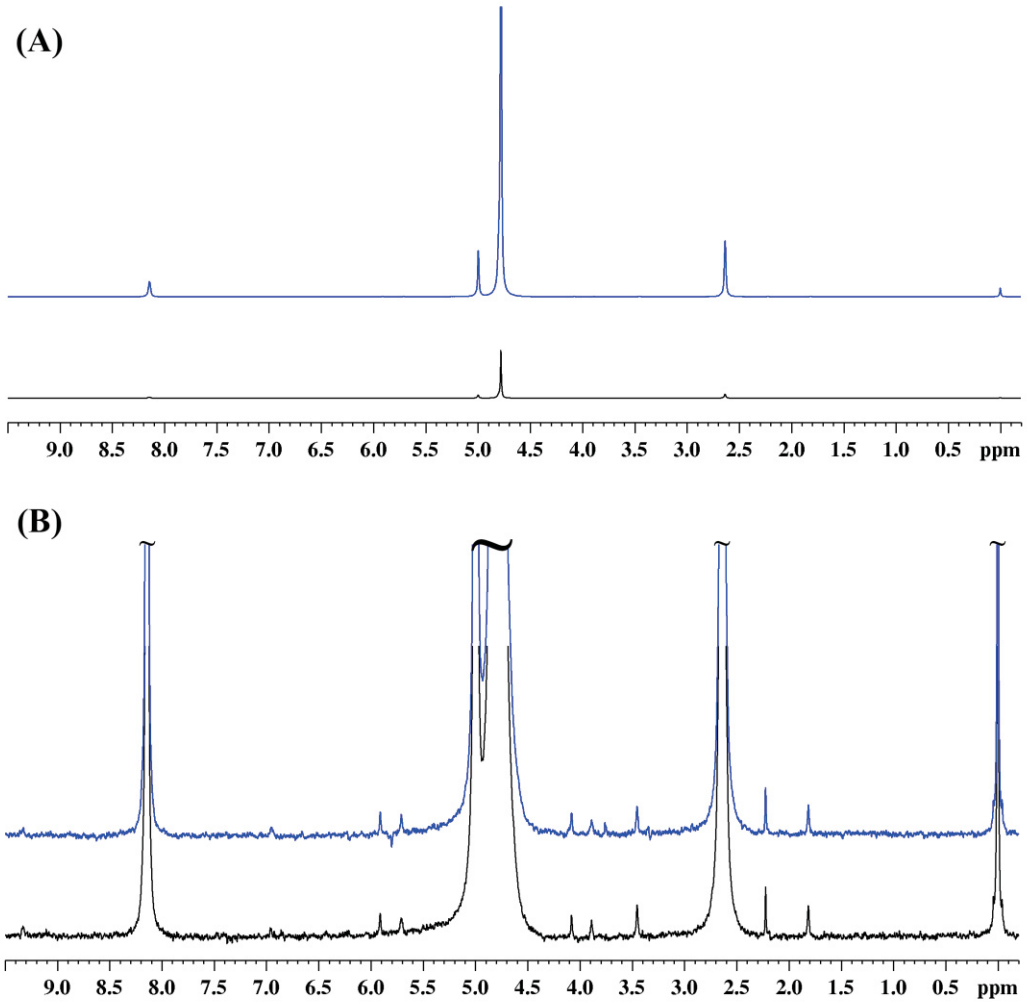
Fonte: O autor (2024).

Como pode se observar, a mudança de RG não causou variações nas concentrações calculadas das amostras, bem como não resultou em alterações significativas nos valores de razão S/R. Ou seja, para as amostras analisadas, não há diferença na variação de RG entre 1 e 15, independentemente do valor de *ns* utilizado. Na **FIGURA 24**, são comparados dois espectros da Amostra A, obtidos com RG igual a 1 e 15. O aumento na intensidade dos sinais é evidente, como mostrado em **(A)**, onde os espectros são apresentados na mesma escala de intensidade. Porém, ao modificar os espectros para que se observe a mesma intensidade de sinais, como mostrado em **(B)**, nota-se que o ruído é equivalente.

Assim, optou-se por não avaliar outros valores de RG. A definição manual do valor a ser utilizado pode levar tempo, precisando ser avaliada individualmente para cada amostra, podendo resultar em efeitos negativos para análise, o que contraria o propósito de se diminuir o tempo e as dificuldades operacionais dos espectrômetros de bancada.

O valor de *p1* é outro parâmetro que deve ser adequado para cada análise quantitativa realizada, de modo que requer um custo de tempo anterior a análise. Avaliou-se aqui o impacto da utilização de um valor de *p1* fixo frente ao valor de *p1* calculado para a amostra. Os resultados das análises variando *p1,* mantendo os demais parâmetros de aquisição fixos, para as Amostras A e B estão dispostos na **TABELA 9**.[59]

FIGURA 24 - ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DA AMOSTRA A COM VALORES DE RG DE 1 E 15.



FONTE: O autor (2024).

TABELA 9 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO, EM MMOL·L^{-1}, E DA RAZÃO S/R DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DAS AMOSTRAS A E B COM DIFERENTES VALORES DE *P1*.

	Amostra A				**Amostra B**			
	***p1* = 11,938**		***p1* = 12,0**		***p1* = 11,938**		***p1* = 12,0**	
ns	**C**	**S/R**	**C**	**S/R**	**C**	**S/R**	**C**	**S/R**
2	24,02	70,73	24,17	71,30	24,57	67,17	24,70	76,01
4	24,04	99,80	24,18	95,16	24,42	103,40	24,55	99,38
8	24,01	132,38	24,12	146,10	24,51	136,28	24,45	129,75
16	24,02	174,22	24,18	173,66	24,40	179,07	24,49	160,51
32	24,13	198,68	24,15	220,76	24,43	239,66	24,57	207,71
64	24,21	251,92	24,23	228,37	24,45	275,28	24,62	255,18

Fonte: O autor (2024).

Nesse contexto, observou-se que houve uma pequena variação nos resultados. Quando utilizado o valor de *p1* considerado ideal, os valores de concentração encontrados foram ligeiramente menores para as três amostras. O valor de *p1* encontrado como ideal foi de 11,938 µs, e o valor fixo utilizado foi de 12,0 µs (valor padrão utilizado para análises

qualitativas com a sequência de pulsos *zg* em espectrômetros Bruker). Assim, conclui-se que a utilização de um *p1* de 12,0 μs não é adequada, e a área dos sinais de ressonância não correspondem à realidade da amostra. Todavia, a diferença na concentração encontrada foi mínima, permitindo inferir que não é estritamente necessária a utilização de um valor exato, pois pequenas variações interferem pouco no método.

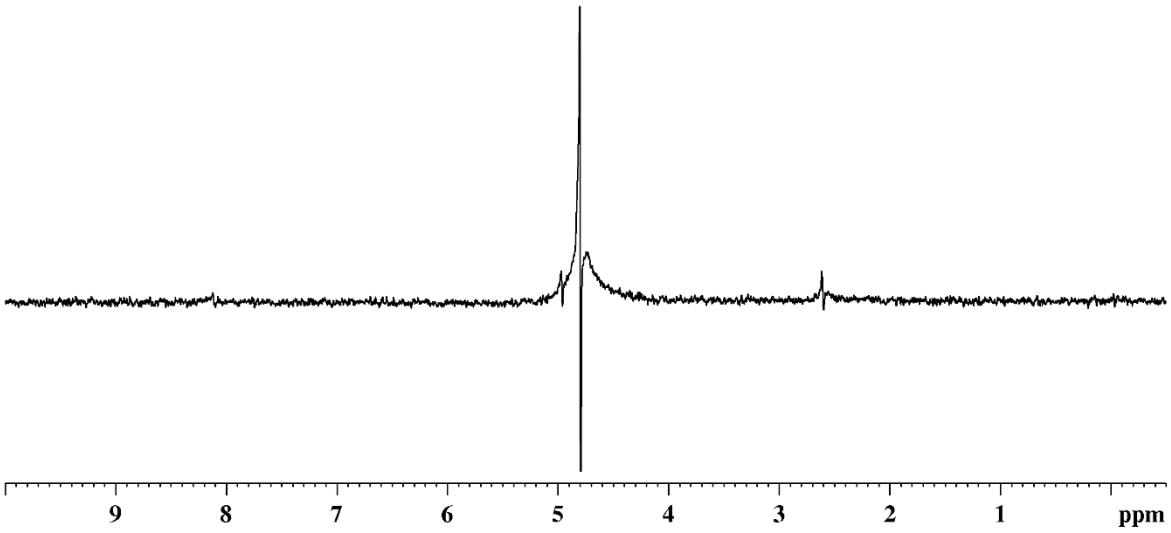
Dessa forma, embora tenham apresentado concentrações ligeiramente diferentes entre si, foi encontrado o mesmo valor de *p1* ideal para as amostras A, B e C, indicando que pequenas variações na concentração não são tão significativas para esta otimização.

Para encontrar o valor de 11,938 μs, foi realizado um método que consiste em estimar o valor ideal através da busca pela duração referente a um pulso de excitação de 360°, e então dividir este valor por 4, processo este que requer tempo. Métodos de cálculo automático do valor ideal de *p1* existem, mas geram resultados imprecisos (comando *pulsecal*) ou também requerem longos tempo para sua determinação (comando *paropt*).[58]

Considera-se a duração do pulso de 360° quando o espectro está nulo, ou seja, não são observados sinais de ressonância. Na realidade, dificilmente se é possível "anular" o espectro, visto que núcleos em diferentes ambientes químicos apresentam diferentes características, e enquanto é possível desaparecer com um sinal do espectro, outros podem não ser corretamente anulados. Para as amostras, a calibração do valor de *p1* foi feita sobre o sinal s1, conforme mostrado na **FIGURA 25**. Entretanto, as concentrações obtidas pela integração de s2 não apresentaram diferenças significativas, indicando que uma alta exatidão pode não ser necessária.

O fator que mais impacta no tempo de análise é sem dúvidas o tempo de relaxação, que corresponde a maior porcentagem do tempo de um experimento em RMN. É fundamental que *D1* tenha um valor suficiente para garantir a total relaxação dos *spins*, o que varia de amostra para amostra, dependendo de concentração, viscosidade, temperatura, solvente, e da estrutura dos compostos, entre outros fatores.[21]

FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA AMOSTRA A UTILIZADO PARA CALIBRAÇÃO DO VALOR DE *P1*.



FONTE: O autor (2024).

Tal como *p1*, a otimização de *D1* pode consumir um grande tempo previamente a análise. O valor de T_1 é utilizado para estimar *D1*, e a determinação de T_1 é comumente realizada através de demorados experimentos de relaxação-recuperação. Uma alternativa é a aquisição de espectros sequenciais com valores de *D1* crescentes, e analisar a partir de qual valor se tem uma estabilização na área e/ou intensidade dos sinais de ressonância, visto que valores de *D1* acima do mínimo não interferem no resultado da análise, o que pode ser feito tanto manualmente quanto automaticamente (comando *paropt*). Contudo, se tem a necessidade de um procedimento laborioso e que pode levar tempo. Uma alternativa, utilizada neste trabalho, é a de utilizar um valor superestimado de *D1*.

Neste trabalho, utilizou-se um valor de *D1* de 20,0 segundos. O valor de *D1* foi estimado uma única vez somente para a Amostra A, sendo este de aproximadamente 12 segundos. Ou seja, nos experimentos realizados, a cada transiente houve uma perda de 8 segundos, o que resultou em um excesso de tempo de até 8,5 minutos (para *ns* igual a 64), sendo este próximo do valor necessário para a determinação do valor de 12 s. Comparou-se o resultado dos experimentos realizados com valores de *D1* de 1 s e 20 s, sendo o primeiro valor usualmente utilizado em análises qualitativas de ^{1}H, e os resultados obtidos estão expostos na **TABELA 10**.

TABELA 10 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO, EM MMOL·L^{-1}, E DA RAZÃO S/R DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DAS AMOSTRAS A E B COM DIFERENTES VALORES DE *D1*.

	Amostra A				**Amostra B**			
	***D1* = 1 s**		***D1* = 20 s**		***D1* = 1 s**		***D1* = 20 s**	
ns	**C**	**S/R**	**C**	**S/R**	**C**	**S/R**	**C**	**S/R**
2	21,32	64,70	24,02	70,73	21,72	61,39	24,57	67,17
4	21,39	86,60	24,04	99,80	21,28	82,06	24,42	103,40
8	20,98	112,73	24,01	132,38	21,60	115,57	24,51	136,28
16	21,11	142,52	24,02	174,22	21,31	128,44	24,40	179,07
32	21,14	166,54	24,13	198,68	21,38	178,85	24,43	239,66
64	21,18	199,94	24,21	251,92	21,54	205,97	24,45	275,28

Fonte: O autor (2024).

Analisando estes dados, fica evidente a importância da calibração do valor de *D1*. Para a Amostra A, por exemplo, enquanto a concentração média obtida foi de 24,16 mmol·L^{-1} com 20 segundos de relaxação, o valor encontrado para um *D1* de 1 segundo foi de 21,19 mmol·L^{-1}. Assim, este curto período de tempo não é suficiente para a relaxação dos *spins*, e a área e/ou intensidade dos sinais de ressonância observados no espectro não correspondem à realidade da amostra.

A necessidade da realização da supressão de sinais de solvente em espectros de RMN de ^{1}H é recorrente. Em espectrômetros de bancada, onde se tem menor resolução, e consequentemente maior sobreposição de sinais, essa necessidade é ainda maior. Além disso, a possibilidade da utilização de solventes não-deuterados faz com que a utilização de sequência de pulsos do gênero seja fundamental. A irradiação de radiofrequência responsável pela supressão do sinal de ressonância, porém, pode interferir em todo o espectro, e não apenas na região desejada. Além disso, oscilações na linha de base podem ser geradas.

Por este motivo, avaliou-se o efeito que a utilização de uma sequência de pulso com supressão de sinais (*Bruker zgpr*), comparando com os resultados obtidos com a aquisição de um pulso sem tal irradiação (*Bruker zg*). A escolha por esta sequência de pulso frente a outras metodologias disponíveis se deu ao fato de ser amplamente utilizada por ser de fácil aplicação. A irradiação foi feita sobre o sinal residual de HOD no solvente, próximo a δ_H 4,80. O sinal s1 possui deslocamento químico a uma distância de 2,20 ppm na região de campo mais alto. O sinal s2 encontra-se descolado aproximadamente 3,30 ppm para a região de menor campo, estando, portanto, mais afastado da irradiação. Os resultados obtidos para as amostras A e B estão expostos na **TABELA 11**.

TABELA 11 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO, EM MMOL L^{-1}, E DA RAZÃO S/R DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H ANALISADOS DAS AMOSTRAS A E B COM DIFERENTES SEQUÊNCIAS DE PULSOS.

	Amostra A				**Amostra B**			
	zg		***zgpr***		***zg***		***zgpr***	
ns	**c**	**S/R**	**c**	**S/R**	**c**	**S/R**	**c**	**S/R**
2	24,02	70,73	26,15	108,55	24,57	67,17	26,59	104,82
4	24,04	99,80	26,54	133,83	24,42	103,40	26,55	143,59
8	24,01	132,38	26,26	195,27	24,51	136,28	26,57	184,54
16	24,02	174,22	26,21	233,64	24,40	179,07	26,25	247,26
32	24,13	198,68	26,15	309,67	24,43	239,66	26,32	295,48
64	24,21	251,92	26,22	333,28	24,45	275,28	26,27	347,02

Fonte: O autor (2024).

O aumento da razão S/R é a primeira consequência da supressão. Dada a baixa concentração das amostras, o sinal residual de impureza do solvente era o de maior intensidade do espectro. Ao "excluir" tal sinal, se tem um ganho na separação dos demais sinais da linha de base.

Nota-se que, mais uma vez, os resultados obtidos da integração dos sinais s1 e s2 diferem significativamente. Enquanto s1 apresentou resultados similares aos esperados, a concentração calculada a partir de s2 superou seu valor real. Este resultado contrariou o esperado. Por estar mais distante da irradiação, esperava-se que este sinal de ressonância sofresse menor interferência, o que não foi o caso.

Conforme exposto por Giraudeau *et* al. (2015), a quantificação em espectros com supressão de sinais é um processo complexo, e que deve ser cuidadosamente analisado para evitar impacto negativo nos resultados. A realização da supressão pela irradiação de pulsos de radiofrequência que anulam a magnetização referente ao sinal desejado (conhecido como *radiation dumping*), que é o caso da sequência de pulsos aqui utilizada, é conhecida por gerar resultados pouco exatos, e outras metodologias são mais bem adequadas para este propósito.[80]

Os resultados obtidos comprovaram a alta acurácia e precisão da RMNq, bem como a reprodutibilidade, repetibilidade e robustez do método ERETIC2. Conforme previsto, *D1* e *p1* são os parâmetros fundamentais para análises quantitativas precisas, e são a maior fonte de erros em caso de aproximações ou padronização. A escolha de uma sequência de pulsos adequada também é fundamental. Os demais parâmetros abordados mostraram pouca influência na qualidade dos resultados, de modo que podem ser otimizados individualmente para cada amostra, ou fixados em valores pré-determinados, sem prejudicar a análise.

A aplicabilidade do ERETIC2 é extremamente promissora ao se considerar cenários de controle de qualidade, principalmente devido a simplicidade em utilizá-lo. Além disso, é um processo rápido e sem necessidade de etapas prévias de preparo de amostra. Seu uso na

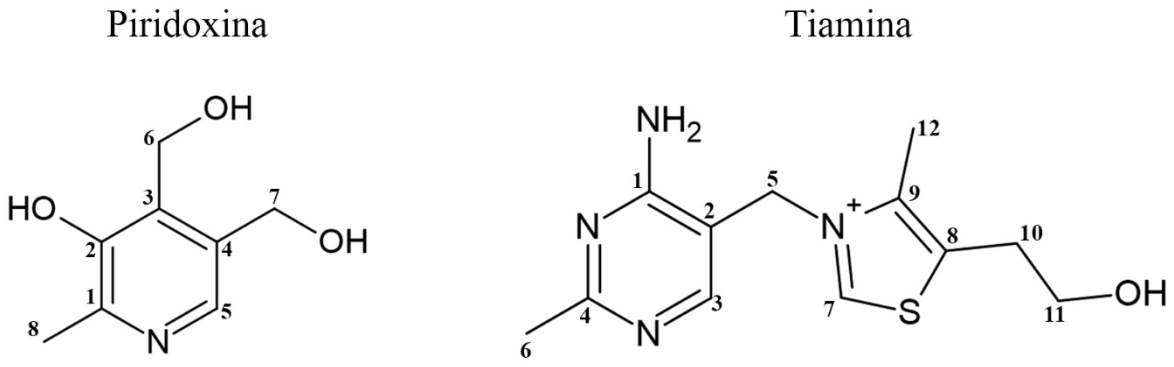
área de medicamentos pode ser proveitoso na determinação da pureza dos insumos utilizados e, principalmente, na análise de formulações prontas para identificar o teor real de princípio ativos e excipientes.

4.3 DEGRADAÇÃO FORÇADA

O interesse em realizar estudos de degradação fundamenta-se na avaliação da capacidade dos espectrômetros de baixa resolução em identificar e possivelmente caracterizar produtos em baixa concentração. Além disso, através de estudos introdutórios, foi possível avaliar a capacidade da ferramenta em análises de acompanhamento de reações químicas.

Os estudos foram realizados com a piridoxina (vitamina B_6) e tiamina (Vitamina B_1). A escolha por vitaminas se deu por serem espécies conhecidas por serem susceptíveis a degradação frente a diversas situações de estresse.[59,77-79] Além disso, as vitaminas do grupo B são hidrossolúveis, facilitando o desenvolvimento dos experimentos. Baseadas em suas estruturas químicas, expostas na **FIGURA 26**, espera-se que a piridoxina apresente alta estabilidade, e maior reatividade seja observada para a tiamina, principalmente pela presença de um anel tiazol.

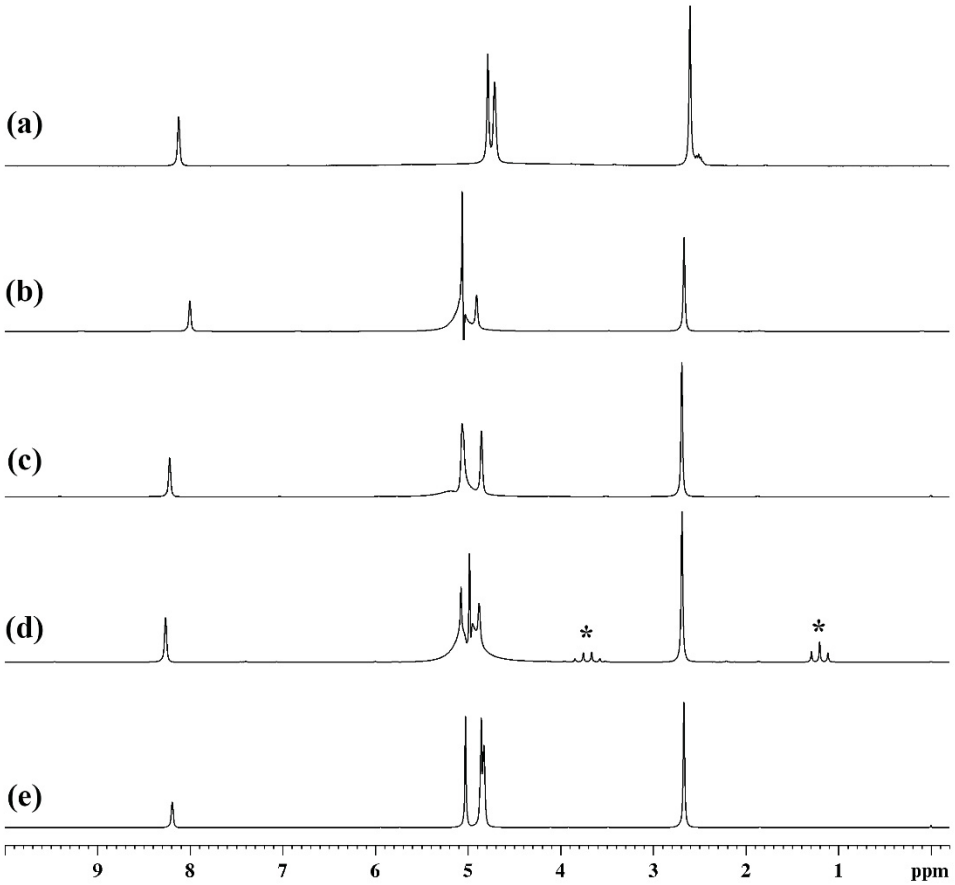
FIGURA 26 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PIRIDOXINA E TIAMINA.



FONTE: O autor (2024).

Assim sendo, a piridoxina apresentou elevada estabilidade frente a todas as situações de estresse as quais foi submetida. Na **FIGURA 27** estão expostos os espectros de RMN de ^1H da mesma, nos quais pode-se observar a similaridade entre os perfis espectrais independente da situação testada.

FIGURA 27 - ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DA PIRIDOXINA EM DMSO-d_6 (a), E APÓS EXPOSIÇÃO A HIDRÓLISE BÁSICA (b), HIDRÓLISE ÁCIDA (c), OXIDAÇÃO POR PERÓXIDO (d) E ALTA TEMPERATURA (e) (80 MHZ). *ETANOL.



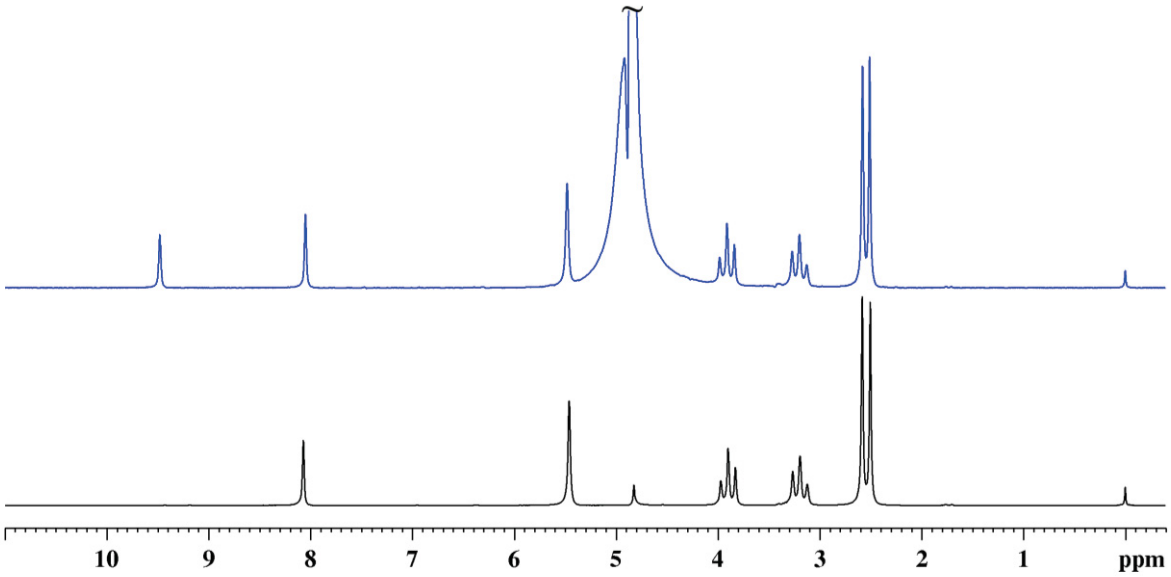
FONTE: O autor (2024).

A presença do intenso sinal de água residual no espectro é extremamente prejudicial para a análise, pois este se encontra na mesma região que os sinais referentes aos hidrogênios H_9 e H_{10} da piridoxina, ocorrendo a sobreposição dos mesmos.

Resultados mais interessantes foram obtidos para a tiamina. A partir do espectro de RMN de ^{1}H em D_2O desta molécula (**FIGURA 12**) averiguou-se a ausência do sinal de ressonância referente ao hidrogênio H_{11}. Entretanto, ao repetir a análise na presença de H_2O, em solução tampão, foi possível observar um simpleto em δ_H 9,71 referente a H_7. Ambos os espectros estão comparados na **FIGURA 28**.

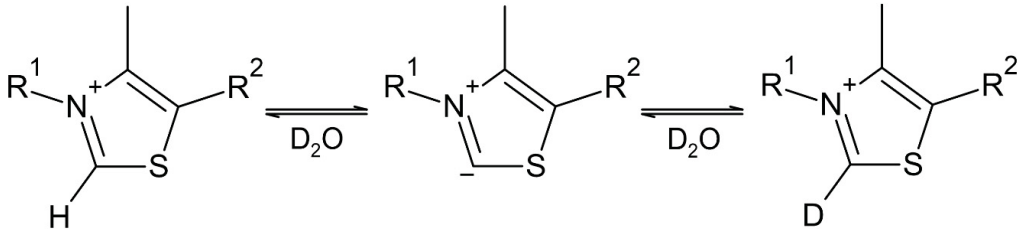
Isto é explicado pela relativa acidez do hidrogênio H_7, em decorrência da estabilidade do carbânion formado no anel tiazólico, devido a estrutura de ileto obtida.[84,85,86] Ao utilizar o solvente deuterado, ocorre a substituição deste hidrogênio por um átomo de deutério, que está em excesso no meio, conforme explícito na **FIGURA 29**. Na presença de maior quantidade de H_2O, o equilíbrio resulta na troca de um átomo de hidrogênio por outro, e não há alteração no espectro.

FIGURA 28 - ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DA TIAMINA NA PRESENÇA DE H_2O E EM D_2O (80 MHZ).



FONTE: O autor (2024).

FIGURA 29 - EQUÍLIBRIO QUÍMICO DO ANEL TIAZÓLICO DA TIAMINA, COM A TROCA DE HIDROGÊNIO POR DEUTÉRIO.

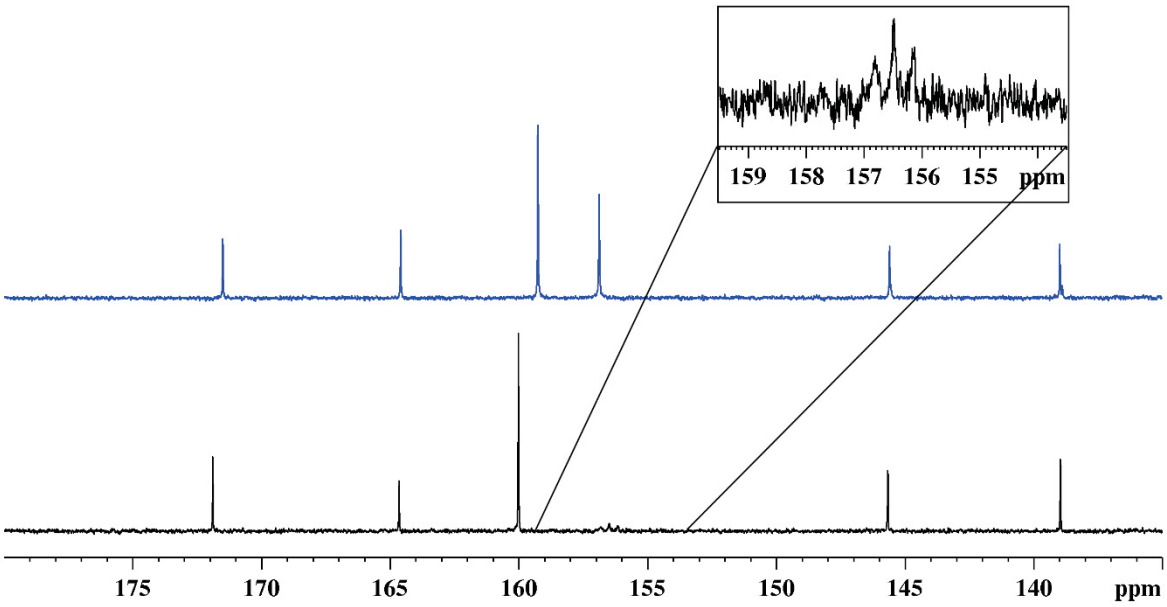


FONTE: O autor (2024).

Nesse sentido, com exceção do "surgimento" do sinal, o espectro se mantém idêntico, indicando que não há qualquer outra alteração na estrutura molecular. Isso também aponta que, embora o intermediário carbânion seja estável suficiente para ser formado, este é rapidamente consumido no equilíbrio, não podendo ser detectado por RMN. Este fenômeno já é conhecido, e foi um dos primeiros usos da RMN no acompanhamento de reações orgânicas, e já foi utilizado na aplicação da RMN para cálculos de constante cinética de desprotonação.[84,85]

Este fato também pode ser observado pela análise dos espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$, expostos na **FIGURA 30**. Na presença de H_2O, observa-se um sinal de ressonância em δ_C 156,9, referente ao carbono C_7. Em D_2O, este sinal existe na forma de um tripleto de intensidade mínima.

FIGURA 30 - ESPECTROS DE RMN DE $^{13}C\{^{1}H\}$ DA TIAMINA EM D_2O E NA PRESENÇA DE H_2O (100 MHZ).



FONTE: O autor (2024).

Em espectros de RMN $^{13}C\{^{1}H\}$, os sinais de ressonância se dão na forma de simpletos devido ao desacoplamento com o núcleo de ^{1}H. Como o núcleo de deutério (^{2}H) apresenta *spin* nuclear diferente, este não é desacoplado durante o experimento, e o sinal se dá na forma de um tripleto. Trata-se de situação semelhante ao visualizado nos espectros para os multipletos referentes a solventes deuterados.[20]

Contudo, a intensidade do sinal foi tão baixa que não pôde ser detectado através de um espectrômetro de bancada. Apenas em alta resolução, e somente com tempo de análise superior a 2 horas (*ns* = 8k), pôde ser notada sua presença no espectro.

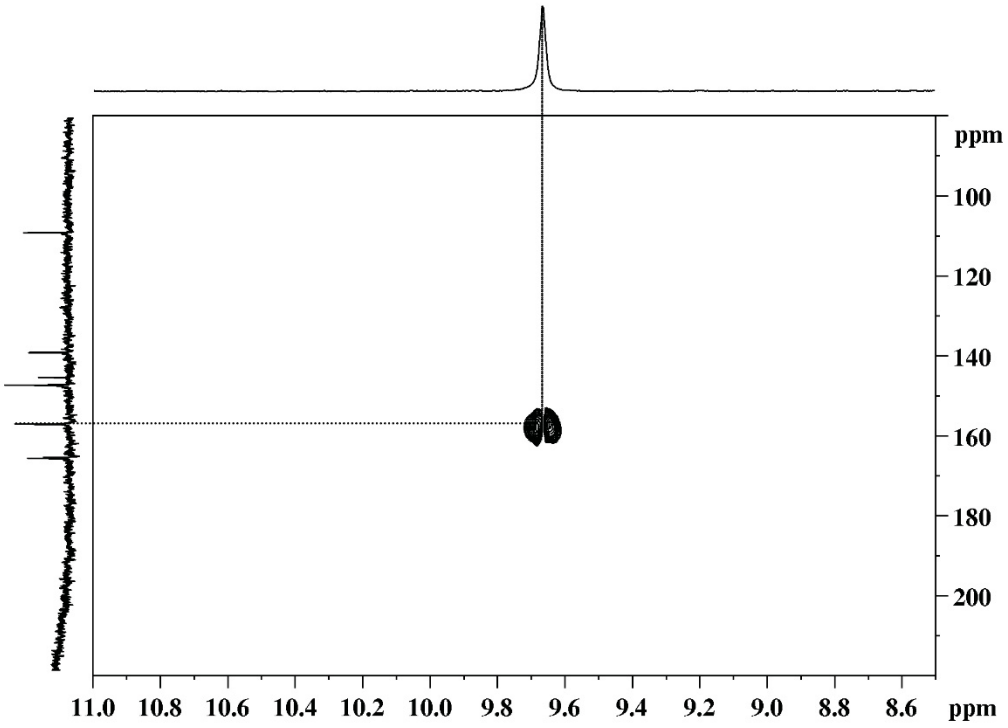
Ao se desacoplar o núcleo de ^{1}H durante o experimento, o sinal de ressonância de um núcleo de ^{13}C é intensificado. Primeiro, pois somam-se as intensidades de cada sinal que seria observado em um multipleto, e pelo aprimoramento causado por NOE (*Nuclear Overhauser Effect*). Com a existência da ligação C–D, nenhum destes aprimoramentos é observado, o que explica o sinal pouco intenso.[20,21]

Tal como na análise de ^{1}H, a única alteração no espectro é em referência a este átomo, não havendo diferenças significativas de deslocamento químico dos demais sinais, o que também indica que o intermediário ileto não pôde ser detectado por RMN, visto que a carga distribuída no anel causaria alterações eletrônicas significativas na molécula.

Uma análise do mapa de contornos HSQC permitiu correlacionar os sinais em questão, confirmando que o hidrogênio com ressonância em δ_H 9,71 está diretamente ligado ao carbono com deslocamento químico de δ_C 156,9, conforme mostrado na **FIGURA 31**.

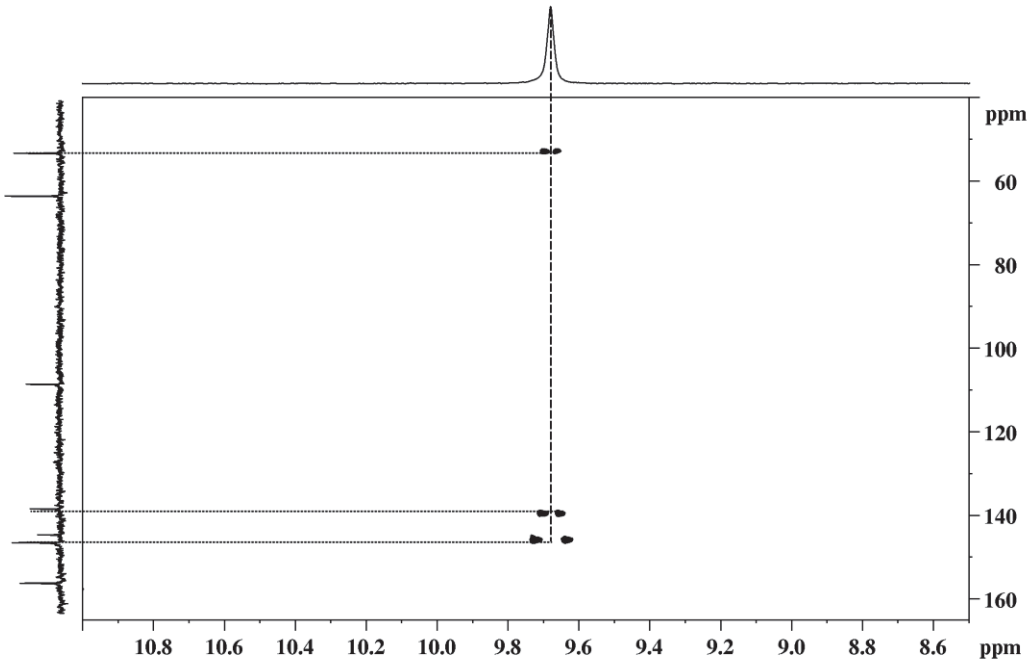
Através de um experimento de HMBC, exposto na **FIGURA 32**, confirmou-se a atribuição correta de H_{11} e C_{11}, visto pela correlação do sinal de ^1H em δ_H 9,71 com os sinais em δ_C 53,0, 139,6 e 145,8, referente aos carbonos C_5, C_8 e C_9, respectivamente (**TABELA 2**).

FIGURA 31 - EXPANSÃO DO MAPA DE CONTORNOS HSQC DA TIAMINA NA PRESENÇA DE H_2O.



FONTE: O autor (2024).

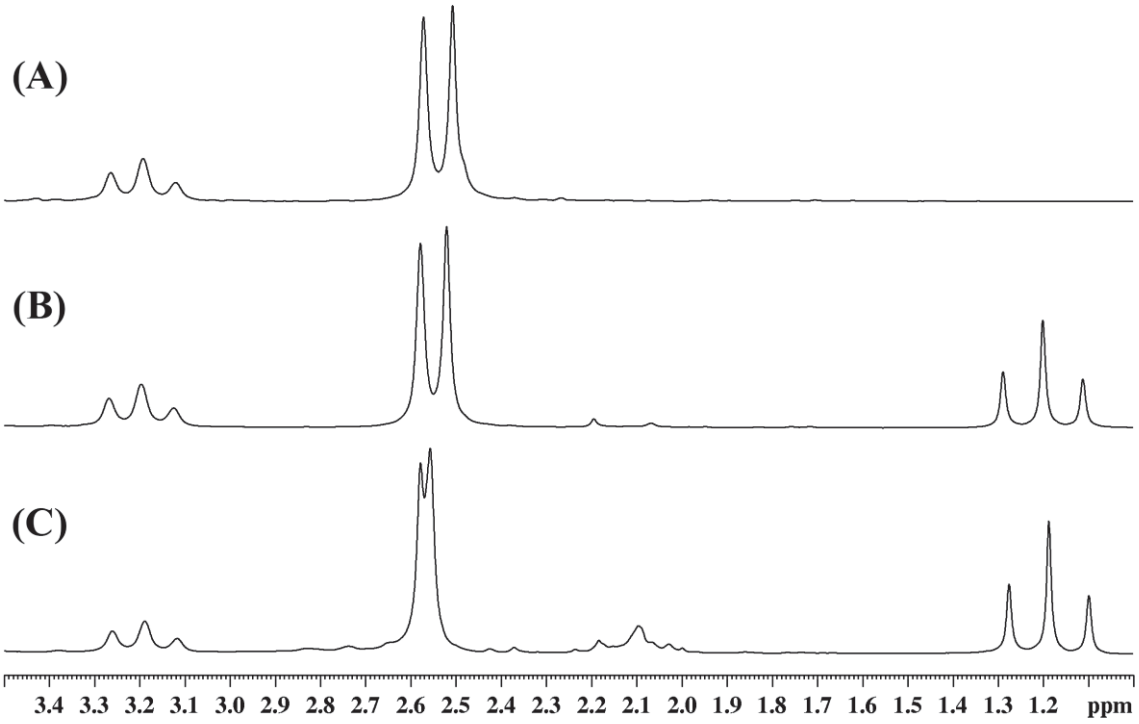
FIGURA 32 - EXPANSÃO DO MAPA DE CONTORNOS HMBC DA TIAMINA NA PRESENÇA DE H_2O.



FONTE: O autor (2024).

A tiamina se mostrou susceptível a oxidação por peróxido (H_2O_2). Através dos espectros de RMN de ^1H, foi possível observar a presença de sinais de produtos de degradação, bem como o aumento da intensidade destes com o decorrer do tempo. Na região de menor deslocamento químico (a direita do espectro), observou-se uma ligeira variação para o sinal referente aos hidrogênios H_{12}, de δ_H 2,51 para δ_H 2,56, no decorrer de 17 horas de oxidação, e o surgimento de sinais na região entre δ_H 1,70-2,40, como mostrado na **FIGURA 33**.

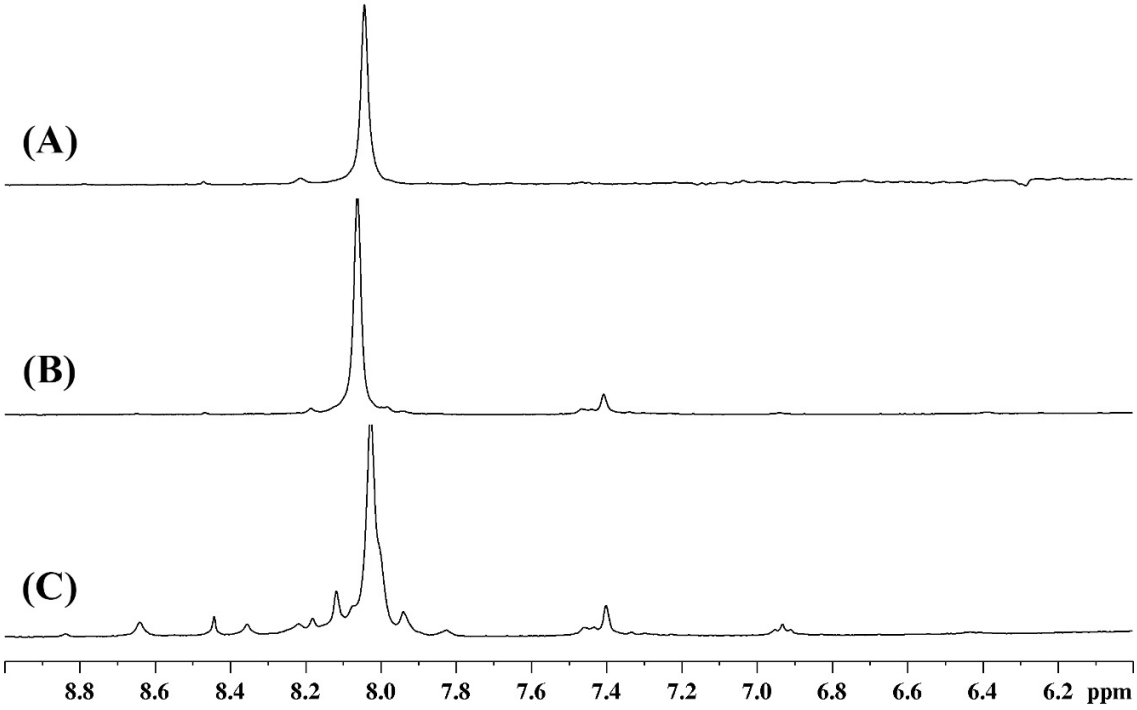
FIGURA 33 - AMPLIAÇÃO NA REGIÃO DE δ_H 1,00-3,50 DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA TIAMINA EM SOLUÇÃO TAMPÃO (A) E FRENTE A SOLUÇÃO 3% DE H_2O_2 POR 1 HORA (B) E 17 HORAS (C) (80 MHZ). *ETANOL



FONTE: O autor (2024).

A **FIGURA 34** mostra a região de campo mais baixo (a esquerda do espectro), na qual é notável o aparecimento de um grande número de sinais de ressonância de baixa intensidade, indicando alterações nos anéis aromáticos da molécula.

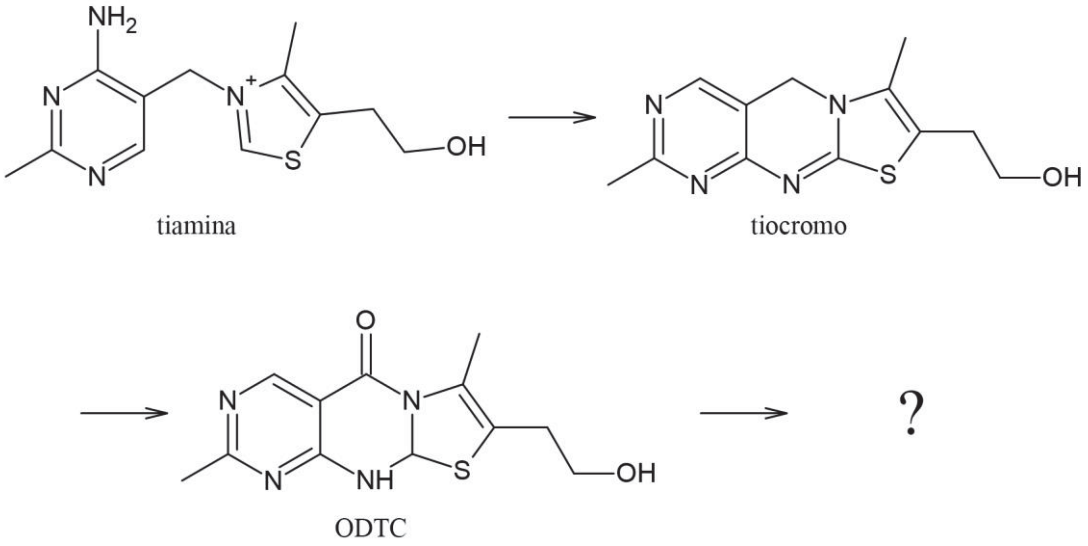
FIGURA 34 - AMPLIAÇÃO NA REGIÃO DE δ_H 6,00-9,00 DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA TIAMINA EM SOLUÇÃO TAMPÃO (A) E FRENTE A SOLUÇÃO 3% DE H_2O_2 POR 1 HORA (B) E 17 HORAS (C) (80 MHZ).



FONTE: O autor (2024).

A tiamina é conhecida pela sua fácil oxidação para tiocromo frente a vários agentes oxidantes. Este processo é, inclusive, utilizado para a quantificação desta por fluorescência.[87,88] O tiocromo, por sua vez, é oxidável para o oxi-dihidro-tiocromo (ODTC), e estudos apontam que este também é oxidável a substâncias de estruturas não desvendadas.[87] Esta sequência de oxidação está exposta no esquema da **FIGURA 35**.

FIGURA 35 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA TIAMINA.



FONTE: O autor (2024).

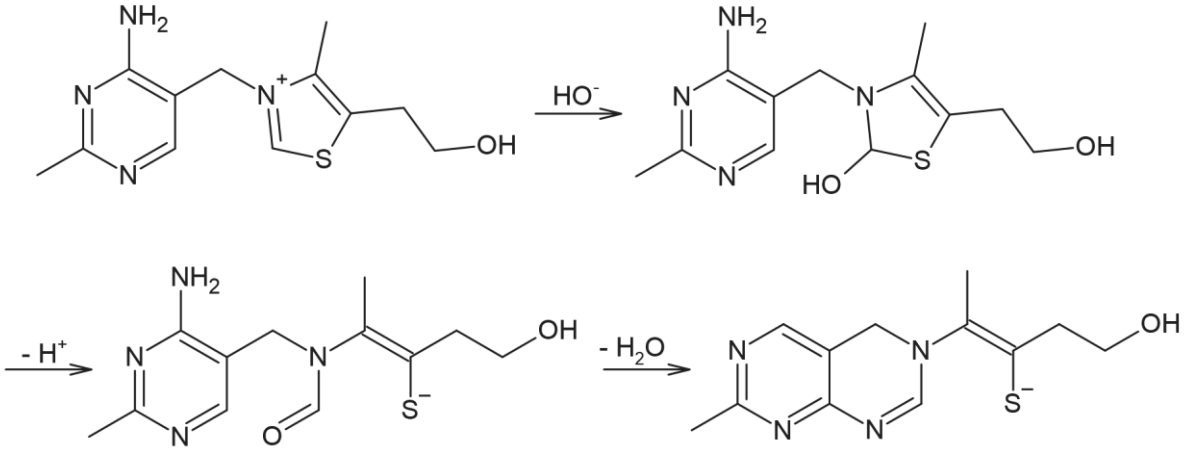
Infelizmente, as análises sobre o núcleo de ^{13}C, assim como os experimentos bidimensionais realizados, não se mostraram aplicáveis para possível caracterização ou identificação dos produtos de degradação, devido a pequena quantidade formada.

Apesar disso, foi possível contestar a rota de oxidação para tiocromo com as informações obtidas no espectro de RMN de ^{1}H. Isto pois, se a degradação segue a rota proposta no esquema da **FIGURA 35**, alterações significativas deveriam ser observadas em relação ao sinal de ressonância do hidrogênio H_5, mas nenhuma mudança foi verificada, seja em relação a deslocamento químico ou a intensidade do sinal. Esse resultado vai de encontro com o fato de o tiocromo apresentar coloração amarela que não foi observada na solução.

Outros estudos apontam que a oxidação da tiamina resulta na clivagem da ligação entre C_8-N_9, separando o sistema tiazólico do anel pirimidínico.[89] Mais uma vez, o fato de não se observar mudança no sinal de ressonância do hidrogênio H_5 indica que não é o que está ocorrendo.

A tiamina também se mostrou sensível a hidrólise em meio alcalino, de acordo com o esquema da **FIGURA 36**.[89]

FIGURA 36 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE BÁSICA DA TIAMINA.



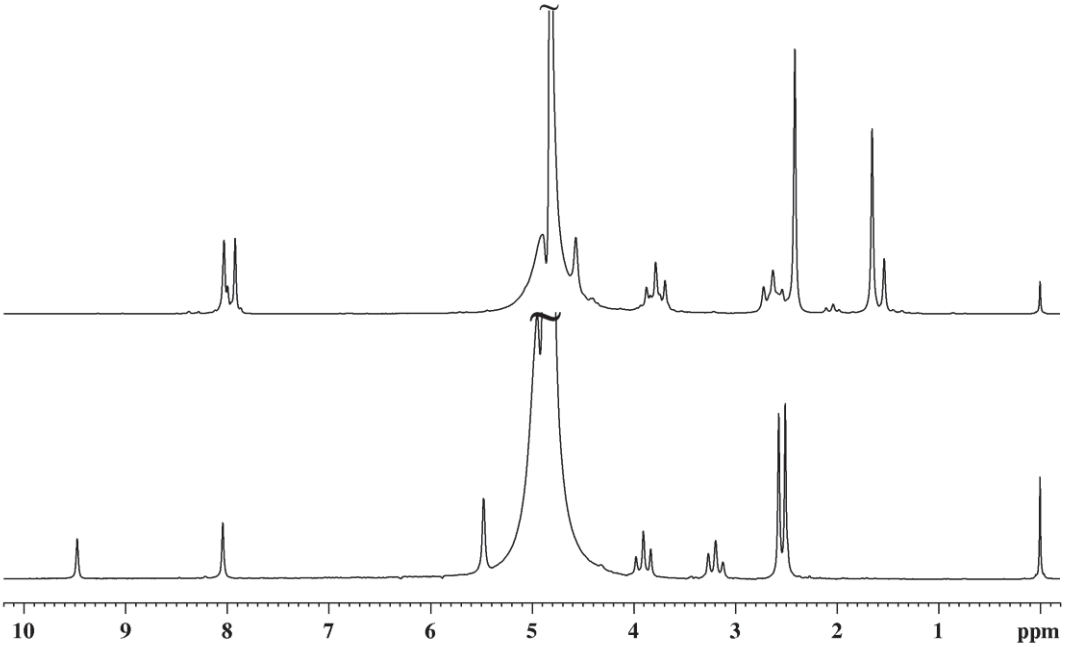
FONTE: O autor (2024).

A degradação foi observada por mudanças no espectro de RMN de ^{1}H. Cabe ressaltar que não houve um aumento gradativo da degradação com o passar do tempo, ou seja, o espectro obtido após 1 hora de degradação foi equivalente ao obtido após 17 horas, indicando que a reação ocorre rapidamente.

De maneira geral, não foi observado o aparecimento de sinais de baixa intensidade, mas sim uma alteração nos de deslocamentos químicos dos sinais, apontando que a degradação segue uma rota fixa, sem subprodutos ou caminhos distintos. O espectro de RMN de ^{1}H da tiamina exposta a degradação básica é mostrado na **FIGURA 37**, juntamente com um espectro sem a reação de degradação.

O sinal referente ao H_{11}, que nestas condições apresentava deslocamento químico de δ_H 9,57, não foi observado no espectro, o que era esperado mesmo sem degradação devido a sua acidez, conforme exposto anteriormente. O surgimento de um sinal de ressonância em δ_H 8,03 corrobora a rota de degradação apresentada no esquema da **FIGURA 36**, indicando o fechamento de um novo ciclo de seis membros nesta posição, acarretando na perda de aromaticidade de H_7.

FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE 1H DA TIAMINA EM SOLUÇÃO TAMPÃO (A) E FRENTE A HIDRÓLISE BÁSICA POR 1 HORA (B) (80 MHZ).



FONTE: O autor (2024).

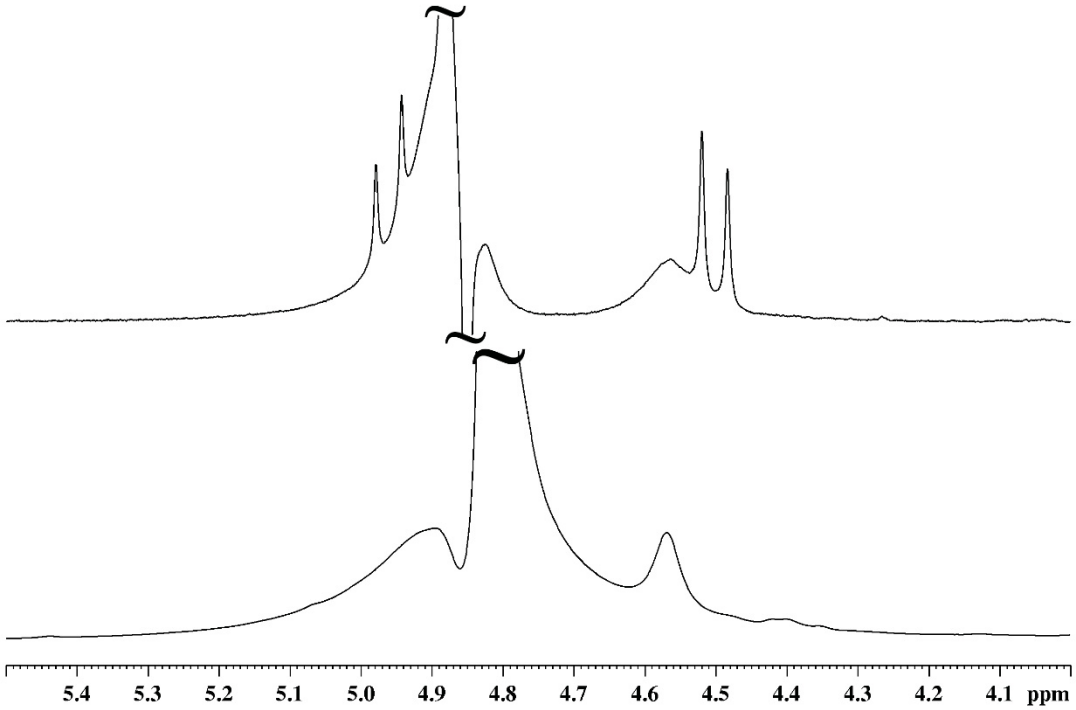
Ambos os tripletos visualizados no espectro, referentes a ressonância dos hidrogênios H_{10} e H_{11}, apresentaram deslocamento para mais baixo campo, resultante da abertura do anel tiazólico, sendo notado com maior intensidade para H_{10}, que está mais próximo da ligação rompida. O mesmo padrão de deslocamento químico foi observado para os hidrogênios H_6 e H_{12}, pertencentes aos grupamentos metila, sendo mais acentuado para o H_{12}, originalmente ligado ao anel tiazólico.

Além destes deslocamentos químicos, observou-se a duplicação de alguns dos sinais de ressonância. Junto ao sinal em δ_H 8,03, se tem um simpleto de menor intensidade em δ_H 8,00, da mesma forma para o simpleto em δ_H 1,65, observou-se outro sinal de menor intensidade em δ_H 1,53. Uma possível explicação para este fato é a existência de duas estruturas de ressonância distintas no meio.

O sinal de ressonância do hidrogênio H_5 é essencial para confirmar a rota de degradação proposta, bem como determinar a estrutura do produto formado. Observou-se o desaparecimento do simpleto em δ_H 5,48, indicando alterações estruturais significantes, porém nenhum sinal de ressonância novo foi observado no espectro. Contudo, ao realizar a análise em alta resolução, foi possível observar os sinais esperados. Os hidrogênios H_5 e $H_{5'}$ não são mais magneticamente equivalentes, acoplando entre si com uma constante de acoplamento (^2J) de 14,4 Hz, característico de hidrogênios geminais.[20] Em baixa resolução, a

sobreposição com o sinal do solvente impediu a visualização destes. Um comparativo entre os espectros obtidos em diferentes campos magnéticos está exposto na **FIGURA 38**.

FIGURA 38 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE δ_H 4,00-5,50 DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DA TIAMINA FRENTE A HIDRÓLISE BÁSICA POR 1 HORA EM 80 MHZ (A) E 400 MHZ (B).



FONTE: O autor (2024).

Deste modo, a RMN de baixa resolução apresentou limitações óbvias, que fizeram com que os resultados não fossem comparáveis aos obtidos através de um espectrômetro de alta resolução. A baixa sensibilidade impossibilitou a realização de experimentos sobre o núcleo de ^{13}C, bem como as análises bidimensionais, e a menor resolução atrapalhou a interpretação de espectros de RMN de ^{1}H. Todavia, este equipamento se mostrou uma ferramenta útil e com várias possibilidades de aplicação, permitindo a identificação de produtos e a proposição de rotas de degradação, por exemplo. Apesar dos entraves, diversos resultados relevantes foram obtidos e, considerando a diferença de custo financeiro e operacional entre as duas categorias de espectrômetros, os espectrômetros de RMN de bancada se mostram como ferramentas de destaque.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

A espectroscopia por RMN já se provou como uma das técnicas analíticas mais poderosas da atualidade, superando outros métodos por diferentes fatores. Esta é capaz de gerar um grande número de informações rápida e não-destrutiva, além de não requerer extensivo preparo amostral.

Entretanto, o alto custo para adquirir e manter um espectrômetro de RMN limita a sua aplicação em diversas áreas, principalmente em cenários industriais, se limitando a laboratórios de pesquisa especializados. Os espectrômetros de RMN de baixa resolução foram desenvolvidos como uma alternativa viável para a difusão da técnica a novos ares, sendo compactos, menos custosos, e de fácil operação. Apresentam, porém, certas limitações intrínsecas que fazem com que sua aplicação precise ser cuidadosamente estudada.

No presente trabalho, foi avaliado a aplicabilidade de espectrômetros de RMN de bancada em diferentes processos que fazem parte do controle de qualidade de medicamentos. Cabe mencionar que as conclusões obtidas nesta pesquisa podem ser extrapoladas para outros âmbitos semelhantes.

Nesse sentido, comprovou-se a aplicabilidade destes equipamentos na identificação de insumos, com resultados similares aos obtidos através da RMN de alta resolução, mas com a vantagem de não ter a necessidade de utilizar solventes deuterados, os quais apresentam alto valor comercial. Ainda, evidenciou-se a potencialidade no desenvolvimento de análises quantitativas de maneira simples e rápida, através da aplicação do método ERETIC2, sem necessitar etapas de preparo de amostra e utilização de substâncias de referência custosas. Foram obtidos resultados extremamente precisos de uma maneira robusta, com alta repetibilidade e reprodutibilidade. Ademais, demonstrou-se a capacidade destes equipamentos de serem utilizados na identificação de produtos de degradação, permitindo a obtenção de informações para se propor ou recusar possíveis rota de degradação, além de demonstrar a possibilidade de sua aplicação na área de síntese orgânica.

Deste modo, mostrou-se que a ferramenta é extremamente promissora na proposta desenvolvida neste estudo, podendo ser utilizada para substituir diferentes metodologias analíticas que são atualmente empregadas de maneira individual ou em conjunto, em função do poderio da RMN e o menor custo e necessidade de infraestrutura dos espectrômetros.

Neste sentido, ficou comprovado, pelas análises desenvolvidas, que as limitações oriundas do menor campo magnético dos espectrômetros de baixa resolução, embora

existentes, não são impactantes no que concerne a proposta desta pesquisa, e que de maneira alguma inutilizam o uso destes equipamentos para as mais variadas aplicações.

REFERÊNCIAS

1. NASR, M. M.; KRUMME, M.; MATSUDA, Y.; TROUT, B. L.; BADMAN, C.; MASCIA, S.; COONEY, C. L.; JENSEN, K. D.; FLORENCE, A.; JOHNSTON, C.; KONSTANTINOV, K.; LEE, S. L. Regulatory Perspectives on Continuous Pharmaceutical Manufacturing: Moving From Theory to Practice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 11, p. 3199–3206, 2017. doi: <10.1016/j.xphs.2017.06.015>

2. KUMAR, M.; BHATIA, R.; RAWAL, R. K. Applications of various analytical techniques in quality control of pharmaceutical excipients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 157, p. 122–136, 2018. doi: <10.1016/j.jpba.2018.05.023>

3. DISPAS, A.; SACRÉ, P. Y.; ZIEMONS, E.; HUBERT, P. Emerging analytical techniques for pharmaceutical quality control: Where are we in 2022? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 221, 2022. doi: <10.1016/j.jpba.2022.115071>

4. ACHANTA, P. S.; JAKI, B. U.; MCALPINE, J. B.; FRIENSEN, J. B.; NIEMITZ, M.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Quantum mechanical NMR full spin analysis in pharmaceutical identity testing and quality control. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 192, 2021. doi: <10.1016/j.jpba.2020.113601>

5. MARINI, R. D.; ROZET, E.; MONTES, M. L. A.; ROHRBASSER, C.; ROHT, S.; RHÈME, D.; BONNABRY, P.; SCHLAPPLER, J.; VEUTHEY, J. L.; HUBERT, P.; RUDAZ, S. Reliable low-cost capillary electrophoresis device for drug quality control and counterfeit medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 5, p. 1278–1287, 2010. doi: <10.1016/j.jpba.2010.07.026>

6. DUAN, J. Z. A Biopharmetrics Approach for Drug Product Quality Control with Clinical Relevance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 1, p. 478–488, 2021. doi: <10.1016/j.xphs.2020.08.005>

7. GÖRÖG, S. Identification in drug quality control and drug research. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 114–122, 2015. doi: <10.1016/j.trac.2014.11.020>

8. **The Japanese Pharmacopeia**. Society of Japanese Pharmacopeia, 1996.

9. **European Pharmacopeia**. Council of Europe, 2007.

10. **Farmacopeia Brasileira**. ANVISA, 2010.

11. **United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36)**. United States Pharmacopeial Convention, 2016.

12. HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 229–240, 2010. doi: <10.1016/j.pnmrs.2010.05.001>

13. SINGH, K.; BLÜMICH, B. NMR spectroscopy with compact instruments. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 83, p. 12–26, 2016. doi: <10.1016/j.trac.2016.02.014>

14. GOUDSMIT, S. A.; Pauli and Nuclear Spin. **Physics Today**, v. 14, n. 6, p. 18–21, 1961. doi: <https://doi.org/10.1063/1.3057597>

15. PAULI, W. Zur Frage der theoretischen Deutung der Satelliten einiger Spektrallienen und ihrer Beeinflussung durch magnetische Felder. **Naturwissenschaften**, v. 12, p. 741–743, 1924. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01504828>

16. SCHULTZ, B. H.; RABI, A. A new method of measuring intensities of magnetization. **Physica**, v. 6, n. 2, p. 137–144, 1939. doi: <10.1016/S0031-8914(39)80004-0>

17. GERLACH, W.; STERN, O. Über die Richtungsquantelung im Magnetfeld. **Annalen der Physik**, v. 4, n. 74, p. 672–699, 1924. doi: < https://doi.org/10.1002/andp.19243791602 >

18. BLOCH, F. Nuclear induction. **Physical Review**, v. 70, n. 7–8, p. 460–474, 1946. doi: <10.1103/PhysRev.70.460>

19. PURCELL, E. M.; TORREY, H. C.; POUND, R. V. Ressonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. **Physical Review**, v. 69, n. 681, p. 681, 1946. doi <https://doi.org/10.1103/PhysRev.69.37>

20. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**, 5 ed., Stanford: Cengage Learning, 2013.

21. CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**, 3 ed., Amsterdam: Elsevier, 2016.

22. RABENSTEIN, D. L. NMR Spectroscopy: Past and Present. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 214A-223A, 2001. doi < https://doi.org/10.1021/ac012435q>

23. SHOOLERY, J. N. NMR spectrometer in the beginning. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 17, p. 731–741, 1993. doi <https://doi.org/10.1021/ac00065a002>

24. ANDREW, E. R. A historical review of NMR and its clinical applications. **British Medical Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 115–119, 1984. doi: <10.1093/oxfordjournals.bmb.a071956>

25. NELSON, F. A.; WEAVER, H. E. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in superconducting magnetic fields. **Science**, v. 146, n. 3641, p. 223–232, 1964. doi: <10.1126/science.146.3641.223>

26. ERNST, R. R.; ANDERSON, W. A. Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. **Review of Scientific Instruments**, v. 37, n. 1, p. 93–102, 1966. doi: <10.1063/1.1719961>

27. MAEDA, H.; YAMAZAKI, T.; NISHIYMA, Y.; HAMADA, M.; HASHI, K.; SHIMIZU, T.; SUEMATSU, H.; YANAGISAWA, Y. Development of super-high-field NMR operated beyond 1 GHz using high-temperature superconducting coils. **eMagRes**, v. 5, n. 2, p. 1109–1120, 2016. doi: <10.1002/9780470034590.emrstm1492>

28. GROOTVELD, M.; PERCIVAL, B.; GIBSON, M.; OSMAN, Y.; EDGAR, M.; MOLINARI, M.; MATHER, M. L.; CASANOVA, F.; WILSON, P. B. Progress in low-field benchtop NMR spectroscopy in chemical and biochemical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 1067, p. 11–30, 2019. doi: <10.1016/j.aca.2019.02.026>

29. BEEK, T. A. V. Low-field benchtop NMR spectroscopy: status and prospects in natural product analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 32, n. 1, p. 24–37, 2021. doi: <10.1002/pca.2921>

30. BLÜMICH, B. Introduction to compact NMR: A review of methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 83, p. 2–11, 2016. doi: <10.1016/j.trac.2015.12.012>

31. PERCIVAL, B. C.; GROOTVELD, M.; GIBSON, M.; OSMAN, Y.; MOLINARI, M.; JAFARI, F.; SAHOTA, T.; MARTIN, M.; CASANOVA, F.; MATHER, M. L.; EDGAR, M.; MASANIA, J.; WILSON, P. B. Low-field, benchtop NMR spectroscopy as a potential tool for point-of-care diagnostics of metabolic conditions: Validation, protocols and computational models. **High-Throughput**, v. 8, n. 1, 2019. doi: <10.3390/ht8010002>

32. BLÜMICH, B.; SINGH, K. Desktop NMR and Its Applications From Materials Science To Organic Chemistry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 57, n. 24, p. 6996–7010, 2018. doi: <10.1002/anie.201707084>

33. **Brochure**: High Performance NMR made acessible. ThermoScientific.

34. **User Guide**: picoSpin. ThermoScientific.

35. **Brochure**: 60 MHz Benchtop NMR. Nanalysis.

36. **Brochure**: 100 MHz Benchtop NMR. Nanalysis.

37. **Brochure**: Spinsolve 80. Unparalleled performance with unique flexibility. Magritek.

38. **Brochure**: Spinsolve 90. The unique performance of a Spinsolve - now at 90 MHz. Magritek.

39. **Brochure**: Spinsolve MultiX. Access mutiple nuclei in one NMR spectrometer in a fully automatic way. Magritek.

40. **Brochure:** Pulsar - delivering NMR to your benchtop. Oxford Instruments.

41. **Brochure:** X-Pulse with X-Auto - automating broadband NMR on your benchtop. Oxford Instruments.

42. **Brochure:** The Fourier 80 benchtop. Bruker.

43. LINCK, Y. G.; KILLNER, M. H. M.; DANIELI, E.; BLÜMICH, B. Mobile Low-Field 1H NMR Spectroscopy Desktop Analysis of Biodiesel Production. **Applied Magnetic Resonance**, v. 44, n. 1–2, p. 41–53, 2013. doi: <10.1007/s00723-012-0405-y>

44. ZIELINSKA, A.; MAZUREK, A.; SIUDEM, P.; KOWALSKA, V.; PARADOWSKA, K. Qualitative and quantitative analysis of energy drinks using H-1 NMR and HPLC methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 213, 2022. doi: <10.1016/j.jpba.2022.114682>

45. PINTO, V. S.; ANJOS, M. M.; PINTO, N. S.; LIÃO, L. M. Analysis of thermal degradation of Brazilian palm oil by quantitative 1H NMR and chemometrics. **Food Control**, v. 130, p. 1–9, 2021. doi: <10.1016/j.foodcont.2021.108406>

46. HOHMANN, M.; FELBINGER, C.; CHRISTOPH, N.; WACHTER, H.; WIEST, J.; HOLZGRABE, U. Quantification of taurine in energy drinks using 1H NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 93, p. 156–160, 2014. doi: <10.1016/j.jpba.2013.08.046>

47. SOUZA, A. C. L.; RAMOS, A. S.; MAR, J. M.; BOEIRA, L. S.; BEZERRA, J. A.; MACHADO, M. B. Alcoholic beverages from araçá-boi fruit: quantification of antioxidant compounds by NMR ERETIC2. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 12, p. 4733–4738, 2020. doi: <10.1007/s13197-020-04721-x>

48. RIBEIRO, M. V. M.; BORALLE, N.; FELIPPE, L. G.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. 1H NMR determination of adulteration of anabolic steroids in seized drugs. **Steroids**, v. 138, n. July, p. 47–56, 2018. doi: <10.1016/j.steroids.2018.07.002>

49. COEN, M.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 9–27, 2008. doi: <10.1021/tx700335d>

50. PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative 1H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 1, p. 133–149, 2005ax. doi: <10.1021/np0497301>

51. MUMCU, A. A different approach to the quantification of human seminal plasma metabolites using high-resolution NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 229, 2023. doi: <10.1016/j.jpba.2023.115356>

52. HSIEH, L. Y.; CHAN, H. H.; KUO, P. C.; HUNG, H. Y.; LI, Y. C.; KUO, C. L.; PENG, Y.; ZHAO, Z. Z.; KUO, D. H.; SUN, I. W.; WU, T. S. A feasible and practical 1H NMR analytical method for the quality control and quantification of bioactive principles in Lycii Fructus. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 1105–1112, 2018. doi: <10.1016/j.jfda.2018.01.001>

53. WIDER, G.; DREIER, L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 8, p. 2571–2576, 2006. doi: <10.1021/ja055336t>

54. MEYER, K.; KERN, S.; ZIENTEK, N.; GUTHAUSEN, G.; MAIWALD, M. Process control with compact NMR. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 83, p. 39–52, 2016. doi: <10.1016/j.trac.2016.03.016>

55. CULLEN, C. H.; RAY, G. J.; SZABO, C. M. A comparison of quantitative nuclear magnetic resonance methods: Internal, external, and electronic referencing. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 705–713, 2013. doi: <10.1002/mrc.4004>

56. AKOKA, S.; BARANTIN, L.; TRIERWEILER, M. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 13, p. 2554–2557, 1999. doi: <10.1021/ac981422i>

57. MONAKHOVA, Y. B.; KOHL-HIMMELSEHER, M. Determination of the purity of pharmaceutical reference materials by 1H NMR using the standardless PULCON methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 381–386, 2014. doi: <10.1016/j.jpba.2014.08.024>

58. BRUKER, **TopSpin 4.1.4**, 2023.

59. BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative 1H NMR spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5–26, 2012. doi: <10.1016/j.trac.2012.02.007>

60. EVILIA, R. F. Quantitative NMR spectroscopy. **Analytical Letters**, v. 34, n. 13, p. 2227–2236, 2001. doi: <10.1081/AL-100107290>

61. WU, P. S. C.; OTTING, G. Rapid pulse length determination in high-resolution NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 176, n. 1, p. 115–119, 2005. doi: <10.1016/j.jmr.2005.05.018>

62. KEIFER, P. A. 90° pulse width calibrations: How to read a pulse width array. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 11, n. 3, p. 165–180, 1999bj. doi: <10.1002/(SICI)1099-0534(1999)11:3<165::AID-CMR4>3.0.CO;2-D>

63. RAKUŠA, Ž. T.; PISLAR, M.; KRISTL, A.; ROSKAR, R. Comprehensive stability study of vitamin d3 in aqueous solutions and liquid commercial products. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, 2021. doi: <10.3390/pharmaceutics13050617>

64. BRASIL, Resolução RDC n° 318, de 6 de novembro de 2019. Estabelece "**os critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências**". Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

65. BRASIL, Resolução RDC n° 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece "**os parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências**". Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2015.

66. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia 04/2015 verão 1**. Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação de medicamentos, 2015.

67. FULMER, G. R.; MILLER, A. J. M.; SHERDEN, N. H.; GOTTLIEB, H. E.; NUDELMAN, A.; STOLZ, B. M.; BERCAW, J. E.; GOLDBERG, K. I. NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. **Organometallics**, v. 29, n. 9, p. 2176–2179, 2010. doi: <10.1021/om100106e>

68. JAWORSKI, R. J.; O'LEARY, M. H. 13C NMR Spectroscopy of the Vitamin B6 Group. **Methods in Enzymology**, v. 62, p. 436–454, 1979. doi: <10.1016/0076-6879(79)62253-X>

69. HILL, R. E.; HIMMELDRIK, K.; KENNEDY, I. A.; PAULOSKI, R. M.; SAYER, B. G.; WOLF, E. The Biogenetic Anatomy of Vitamin B6. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 48, p. 30426–30435, 1996. doi: <10.1074/jbc.271.48.30426>

70. IGOSHI, A.; NODA, K.; MURATA, M. A novel thiamine-derived pigment, pyrizepine, formed by the maillard reaction. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 82, n. 8, p. 1425–1432, 2018. doi: <10.1080/09168451.2018.1466687>

71. SCHRIPSEMA, J.; MERLIM, R. S.; PARVAN, L. G.; RIBEIRO, H. S. S.; SCHRIPSEMA, L. D.; ALEIXO, S.; BECHT, A.; HOLZGRABE, U.; DAGNINO, D. Towards a holistic view of tablet quality, an extensive study on paracetamol tablets with nuclear magnetic resonance using similarity calculations, differential NMR and hierarchical cluster analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 215, 2022. doi: <10.1016/j.jpba.2022.114773>

72. MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA, K.; JAMRÓGIEWICZ, Z.; ŁUKASIAK, J. Determination of polydimethylsiloxanes by 1H-NMR in wine and edible oils. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 5, p. 438–444, 2003. doi: <10.1080/0265203031000136288>

73. BRADBURY, J. H.; JOHNSON, R. N. Assignment of the 13C NMR spectrum of biotin. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 35, n. 2, p. 217–222, 1979. doi: <10.1016/0022-2364(79)90230-0>

74. MOUSAVI, M.; YU, S. S. F.; TZOU, D. L. M. A 13C solid-state NMR analysis of vitamin D compounds. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 36, n. 1, p. 24–31, 2009. doi: <10.1016/j.ssnmr.2009.04.003>

75. **White Paper**: Vitamin D 3 - A Structural Elucidation Example Using the Varian 400-MR. Agilent Technologies, Inc.

76. MAVROMOUSTAKOS, T.; GRDADOLNIK, S. G.; ZERVOU, M.; ZOUMPOULAKIS, P.; POTAMITIS, C.; POLITTI, A.; MANTZOURANI, E.; PLATTS, J. A.; KOUKOULITSA, C.; MINAKAKIS, P.; KOKOTOS, G.; TSELIOS, T.; MATSOUKAS, J.; DURDAGI, S.; PAPADOPOULOS, M.; PAPAHADJIS, D.; SPYRANTI, Z. S.; DALKAS, G. A.; SPYROULIAS, G. Putative bioactive conformers of small molecules: A concerted approach using NMR spectroscopy and computational chemistry. *In*: COLOMBO, G. P.; RICCI, S. **Medicinal Chemistry Research Progress**, p. 175-206, Nova Science Publisher, 2008.

77. WEBB, A. Increasing the sensitivity of magnetic resonance spectroscopy and imaging. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 9–16, 2012. doi: <10.1021/ac201500v>

78. CIAMPA, A.; LAGHI, L.; PICONE, G. Validation of a 1H-NMR Spectroscopy Quantitative Method to Quantify Trimethylamine Content and K-Index Value in Different Species of Fish. **Journal of Food Quality**, 2022. doi: <10.1155/2022/3612095>

79. MO, H.; HARWOOD, J. S.; RAFTERY, D. Receiver gain function: The actual NMR receiver gain. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 235–238, 2010. doi: <10.1002/mrc.2563>

80. GIRAUDEAU, P.; SILVESTRE, V.; AKOKA, S. Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics: a tutorial review. **Metabolomics**, v. 11, n. 5, p. 1041–1055, 2015. doi: <10.1007/s11306-015-0794-7>

81. SHEPHARD, G. S.; LABADARIOS, D. Degradation of vitamin B6 standard solutions. **Clinica Chimica Acta**, v. 160, n. 3, p. 307–311, 1986. doi: <10.1016/0009-8981(86)90198-1>

82. SAIDI, B.; WARTHESEN, J. J. Influence of pH and Light on the Kinetics of Vitamin B6 Degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 876–880, 1983. doi: <10.1021/jf00118a051>

83. EIFF, J.; MONAKHOVA, Y. B.; DIEHL, B. W. K. Multicomponent analysis of fat- and water-soluble vitamins and auxiliary substances in multivitamin preparations by qNMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 12, p. 3135–3143, 2015. doi: <10.1021/acs.jafc.5b00087>

84. BRESLOW, R. On the Mechanism of Thiamine Action. IV. Evidence from Studies on Model Systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 14, p. 3719–3726, 1958. doi: <10.1021/ja01547a064>

85. MURRAY, C. J.; DUFFIN, K. L. Determination of rates of proton exchange of thiamine hydrochloride by1H NMR spectroscopy - A bioorganic experiment for the undergraduate laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 68, n. 8, p. 683–684, 1991. doi: <10.1021/ed068p683>

86. JORDAN, F.; KUDZIN, Z. H.; RIOS, C. B. Generation and physical properties of enamines related to the key intermediate in thiamin diphosphate dependent enzymatic pathways. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, p. 4415–4416, 1987. doi <10.1021/ja00248a059>

87. ANWAR, Z.; SHERAZ, M. A.; AHMED, S.; MUSTAAN, N.; KHURSHID, A.; GUL, W.; KHATTAK, S. U. R.; AHMAD, I. Photolysis of thiochrome in aqueous solution: A kinetic study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, 2020. doi: <10.1016/j.jphotobiol.2019.111766>

88. EDWARDS, K. A.; MAUNG, N. T.; CHENG, K.; WANG, B.; BAUEMNER, A. J.; KRAFT, C. E. Thiamine Assays—Advances, Challenges, and Caveats. **ChemistryOpen**, v. 6, n. 2, p. 178–191, 2017. doi: <10.1002/open.201600160>

89. DWIVEDI, B. K.; ARNOLD, R. G. Chemistry of Thiamine Degradation in Food Products and Model Systems: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 54–60, 1973. doi: <10.1021/jf60185a004>