



Instituto de Química - IQ

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica – PPGTQB

TESE DE DOUTORADO

Desenvolvimento do Processo de Síntese, com Ênfase em Boas Práticas de Fabricação (BPF), Estudos de Degradação e Polimorfismo de uma Cromenona Inibidora de *Quorum Sensing* Microbiano

Robson Alves Fernandes Cavalcante

Orientador: Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado

Brasília, DF

2019



Instituto de Química -IQ

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica – PPGTQB

TESE DE DOUTORADO

Desenvolvimento do Processo de Síntese, com Ênfase em Boas Práticas de Fabricação (BPF), Estudos de Degradação e Polimorfismo de uma Cromenona Inibidora de *Quorum Sensing* Microbiano

Robson Alves Fernandes Cavalcante

Tese apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica, para obtenção do título de doutor em Tecnologias Química e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado.

Brasília, DF

2019

Ficha catalográfica

Cavalcante, Robson Alves Fernandes.

Desenvolvimento do Processo de Síntese, com Ênfase em Boas Práticas de Fabricação (BPF), Estudos de Degradação e Polimorfismo de uma Cromenona Inibidora de *Quorum Sensing* Microbiano / Robson Alves Fernandes Cavalcante. - Brasília: Universidade de Brasília, 2019.

Xx f, 151 p.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado. Instituto de Química.

Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília / Instituto de Química,
Programa de Pós-graduação em Tecnologias Química e Biológica.

1. *quorum sensing*. 2. IFA. 3. Desenvolvimento de processo. I. Machado, Ângelo Henrique de Lira. II. Universidade de Brasília. III. Título.

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **Robson Alves Fernandes Cavalcante**, matrícula nº **15/0102429**, intitulada *“Desenvolvimento do processo de síntese, com ênfase em boas práticas de fabricação (BPF), estudos de degradação e polimorfismo de uma cromenona inibidora de quorum sensing microbiano”*, apresentada no (a) Sede da ANVISA, Sala 07 da Universidade de Brasília (UnB) em 23 de setembro de 2019.

Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Dra. Rosimeire Pereira Alves da Cruz
Membro Titular (ANVISA)

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 23 de setembro de 2019.

Agradecimentos

- Agradeço à Deus e a Nossa Senhora de Fátima que me ajudaram nos momentos de dificuldade.
- A meu pai (*in memoriam*) e minha mãe por terem me ensinado a batalhar sempre.
- À minha família: Daniela, Carlos Augusto e Ana Clara por serem meu porto seguro e sempre me acolherem com compreensão e carinho.
- Aos professores do LITMO: Rafael, Guilherme, Márcia e Lucília pela amizade e compartilhamento de seus conhecimentos.
- Ao professor Angelo, pela orientação, ensinamentos, paciência e amizade durante esses anos de doutorado.
- Aos colegas de laboratório, Terezinha, Diana, Jorge, Charley, Vinícius, José, Fernanda, Éder e Saulo, pelos momentos de descontração, amizade e troca de experiências.
- Aos amigos do LAQMOS pelo compartilhamento de solventes, equipamentos, reagentes e palavras de apoio.
- Aos colegas, Erislene e Robson do LDPQ pela amizade e apoio no desenvolvimento do trabalho.
- Ao professor Fabrício, pelo apoio técnico, pela amizade e confiança de me acolher em seu laboratório.
- Aos funcionários da Central Analítica do IQ, por serem cordiais e prestativos durante as análises. Especialmente o Luiz, pela disponibilidade e apoio nas análises de RMN.
- A professora Sarah e a colega Luana do LIMA, por terem me ajudado no desenvolvimento dos estudos fotolíticos.
- Ao professor Jez e a professora Aline, pela ajuda e orientação na correção do artigo.
- A CAPES e a FAPDF pelo apoio financeiro.
- A Agência Nacional de Vigilância Sanitária -Anvisa, em especial, por ter propiciado uma grande oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

Resumo

Moléculas inibidoras de *quorum sensing* (IQSs) têm se apresentado como alternativas promissoras na limitação da virulência de microrganismos. Nesse trabalho, buscou-se apresentar o desenvolvimento do processo de síntese de uma cromenona, denominada 6-oxo, que tem se mostrado um novo inibidor do *quorum sensing* (QS) microbiano do tipo I.

Após o desenvolvimento inicial, notou-se que a retirada da etapa de destilação reduzida, a redução dos excessos molares dos reagentes e solventes, assim como, a utilização de atmosfera ambiente em vez de atmosfera inerte, proporcionaram um desenho de processo mais racional e econômico. Além disso, o monitoramento da reação *in situ* utilizando uma sonda de IV médio, permitiu a redução dos tempos reacionais e estabelecimento de um importante controle em processo. Foi possível notar que os processos de purificação, utilizando-se carvão ativado e cristalização, demonstraram efetividade na remoção das impurezas. Pois, obteve-se um produto com 99,9% pureza, considerando a metodologia de análise por RMNq. Ademais, a compreensão da rota sintética permitiu: elencar, sintetizar e caracterizar as impurezas de processo. Dentre elas, destaca-se a HCB, por ser último intermediário de síntese.

Os estudos de degradação forçada demonstraram que a 6-oxo possui importantes impurezas oriundas de estresse térmico e oxidativo. Sendo que nesta última, conseguimos isolar uma lactona ainda não relatada na literatura, a 4-metil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[b][1,4]dioxepin-2-ona (MHBD). Tais fatos propiciaram a determinação do perfil de impurezas do processo, assim como, permitiram a avaliação de um método analítico indicativo de estabilidade utilizando-se a CLAE.

Quanto ao polimorfismo, verificou-se a existência de duas formas cristalinas, sendo uma obtida por cristalização em hexano e outra detectada quando uma amostra foi fundida e resfriada rapidamente sob atmosfera inerte.

Palavras-chave: *quorum sensing*, cromenonas, desenvolvimento de processo, IFA, polimorfismo.

Abstract

Quorum sensing inhibitors (QSIs) are molecules that have been presented as promising alternatives for quench the microorganism virulence. In this work, we discuss the process development of a chromenone called 6-oxo. This molecule is a new inhibitor of the type I bacterial quorum sensing (QS).

After the early chemical process development, it could be notice that the removal of the distillation step, the reduction of molar excesses of reagents and solvents, as well as the use of ambient atmosphere at first step reaction, has provided a more rational and economical process design. In addition, the *in situ* monitoring, using an IR probe, allowed the reduction of reaction times. In addition, it was noted that the purification steps using activated charcoal and crystallization has demonstrated effectiveness in the impurities removing. Considering that it was obtained a high purity product (99.9%), which its amount was measured by qNMR. In addition, the study of the synthetic route allowed: to list, synthesize and characterize the process impurities. Among them, the HCB has an important role, for being the last synthesis intermediate.

Forced degradation studies have shown that 6-oxo has important impurities from thermal and oxidative stress. In the latter, we were able to isolate a lactone not yet reported in the literature, 4-methyl-3,4,6,7,8,9-hexahydro-2H-benzo[b][1,4]dioxepin-2-one (MHBD). These facts allowed the determination of the impurities profile of the process, as well the development of a stability indicating analytical method by HPLC.

This work also allowed the identification of two polymorphic presentation for 6-oxo: one obtained from cooling crystallization from hexane and another formed when a molten sample was rapidly cooled under an inert atmosphere.

Keywords: *quorum sensing*, chromenones, process development, API, polymorphism.

Sumário

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	2
3.	Revisão da literatura	3
3.1.	<i>Quorum Sensing</i>	3
3.1.1.	Cromenonas - Potenciais drogas antipatogênicas	5
3.2.	Síntese de insumos farmacêuticos ativos (IFA)	7
3.2.1.	Insumos farmacêuticos ativos (IFA)	7
3.2.2.	Desenvolvimento de processo da síntese de IFA	8
3.2.3.	Rota de síntese	9
3.2.3.1.	Seleção da rota para a síntese da 6-oxo	11
3.2.4.	Perfil de impurezas em IFAs	13
3.2.5.	Classificação das impurezas:	13
3.2.5.1.	Impurezas orgânicas	13
3.2.5.2.	Impurezas inorgânicas	15
3.2.5.3.	Solventes orgânicos residuais	15
4.	Estudos de degradação forçada (EDF)	17
4.1.	Objetivos dos EDF	17
4.2.	A importância regulatória dos EDF	17
4.3.	Condições para o desenvolvimento dos EDF	18
4.4.	Estratégias para seleção das condições dos EDF e análise dos produtos de degradação	19
4.4.1.	Coleta de informações sobre as propriedades químicas e físico-químicas da molécula:	20
4.4.2.	Predição do comportamento degradativo	20
4.4.3.	Separação, identificação e caracterização dos produtos formados	20
4.4.4.	Proposição de uma rota de degradação	23
5.	Polimorfismo	24
5.1.	Tipos de apresentações do estado sólido	24
5.1.1.	Formas cristalinas e formas amorfas	24
5.1.2.	Sólidos formados por multicomponentes	26
5.2.	Fatores que influenciam na preparação de Formas Cristalinas	27
5.3.	Caracterização e Avaliação de Formas Cristalinas	28
6.	Resultados e Discussão	31
6.1.	Síntese dos materiais de partida	31
6.1.1.	1-morfolino-ciclohexeno (MCE)	31
6.1.1.1.1.	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	32
6.1.1.1.2.	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	33
6.1.2.	Ácido Crotônico (ácido (E)-but-2-enoico)	34
6.1.2.1.1.	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	34
6.1.2.1.2.	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	37
6.1.2.1.3.	Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ¹³ C)	38
6.1.3.	Síntese do cloreto de crotonila (CC)	38
6.1.3.1.1.	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	39

6.1.3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ¹³ C)	39
6.2. Conclusões	40
6.3. Desenvolvimento da síntese da 6-oxo	41
6.3.1. Otimização do processo utilizando monitoramento <i>in situ</i> por espectroscopia de infravermelho médio	44
6.3.2. Diagrama de fluxo de processo	47
6.3.3. Caracterização	49
Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	49
6.3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ¹³ C)	50
6.3.3.2. Espectrometria de infravermelho	52
6.3.3.3. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	52
6.3.3.4. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)	54
6.3.3.5. Determinação da pureza por Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq)	55
6.4. Perfil de impurezas de síntese	57
6.4.1. (E)-1-(2-hidroxíciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB)	59
6.4.1.1. Caracterização	60
6.4.1.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	60
6.4.1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono -13 (RMN ¹³ C)	61
6.4.1.1.3. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	61
6.4.2. A (E)-1-morpholinobut-2-en-1-one (MBE)	63
6.4.2.1. Caracterização	64
6.4.2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	64
6.4.2.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono -13 (RMN ¹³ C)	64
6.4.2.1.1. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	65
6.4.3. 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)	67
6.4.3.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H) e COSY	67
6.4.3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ¹³ C)	69
6.4.3.1.3. HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)	70
6.4.3.1.4. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	72
7. Testes de degradação forçada (estudos de estresse)	75
7.1. Ensaios de degradação forçada em condições ácidas	75
7.2. Ensaios de degradação forçada em condições básicas	76
7.3. Ensaios de degradação forçada fotolíticos	80
7.4. Ensaios térmicos de degradação forçada	82
7.4.1. Isolamento e caracterização das impurezas geradas nos testes de estresse térmico	85
7.4.1.1. 2-metilcroman-4-ona (MC)	85
7.4.1.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	85
7.4.1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ¹³ C)	86
7.4.1.1.3. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	87
7.4.1.1.4. Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)	89
7.4.1.1.5. Proposta de mecanismo de formação da impureza MC	90
7.4.1.2. 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (HMC)	90
7.4.1.2.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	90

7.4.1.2.2.	Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ¹³ C)	91
7.4.1.2.3.	HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy)	92
7.4.1.2.4.	Espectrometria de infravermelho	93
7.4.1.2.5.	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	94
7.4.1.2.6.	Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)	95
7.4.1.2.7.	Proposta de mecanismo de formação da impureza 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (HMC)	96
7.4.1.3.	2-metil-2,3,6,7-tetrahidro-4H-cromeno-4,8(5H)-diona (MTCD)	97
7.4.1.3.1.	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	97
7.4.1.3.2.	Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ¹³ C)	97
7.4.1.3.3.	HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy)	99
7.4.1.3.4.	Espectrometria de infravermelho	100
7.4.1.3.5.	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	100
7.4.1.3.6.	Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)	102
7.4.1.3.7.	Proposta de mecanismo de formação da impureza MTCD	103
7.5.	Ensaio de degradação forçada oxidativos	103
7.5.1.1.	4-metil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[b][1,4]dioxepin-2-ona (MHBD)	105
7.5.1.1.1.	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	105
7.5.1.1.2.	Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ¹³ C)	106
7.5.1.1.3.	HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy)	108
7.5.1.1.4.	Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)	109
7.5.1.1.5.	Proposta de mecanismo de formação da impureza MHBD	110
8.	Método indicativo de estabilidade	111
9.	Estudo de polimorfismo da 6-oxo	115
10.	Conclusões	120
11.	Materiais e Métodos	121
12.	Experimentos realizados	123
12.1.	Síntese da enamina	123
12.2.	Síntese do cloreto ácido	123
12.1.	Síntese da 6-oxo	124
12.2.	Síntese da (E)-1-(2-hidroxiciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB)	125
12.3.	Síntese da (E)-1-morfolinobut-2-en-1-ona (MBE)	126
12.4.	4-metilbiciclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)	127
12.5.	Impurezas de degradação	127
13.	Anexos	129
14.	Referências	147

Figuras

Figura 1: Desenho esquemático do sistema de QS na relação simbiótica entre a <i>V. fischeri</i> e a lula havaiana <i>Euprymna scolopes</i> , segundo Mattmann et. al. (2010) - com adaptações. (Box tipo-lux é uma sequência curta e palindrômica de DNA reconhecida pelo complexo [OHHL / LuxR]). ^{3,4}	3
Figura 2: Estruturas moleculares de algumas acil-homoserinas lactonas (AHL's).	4
Figura 3: Estruturas moleculares das cromenonas 5-oxo (5) e 6-oxo (6).	5
Figura 4: Ensaio de correlação entre densidade ótica (DO) e luminescência. Legenda: A. Visão qualitativa da inibição apresentado pela 6-oxo sobre a luminescência da cepa BB886. B. Gráfico com a inibição comparativa de bioluminescência da cepa de <i>V. harveyi</i> BB886 com as lactonas vinílogas 5-oxo e 6-oxo (com adaptações). ⁸	6
Figura 5: Perímetro da otimização de processo, segundo Adler. ²⁶	8
Figura 6: Estrutura molecular da impureza (trímero) segundo Sajan e colaboradores (2015). ³³	14
Figura 7: Estruturas propostas para o EDF por oxidação da fentanila (34) realizado por Garg e colaboradores (2010): <i>cis</i> -n-óxido de fentanila (35) e <i>trans</i> -n-óxido fentanila (36).	19
Figura 8: Estrutura molecular do azilzartan (37). ⁵¹	21
Figura 9: Cromatogramas de CL-UV após o EDF - (A) AZL degradado em HCl 0,1 M e (B) AZL degradado em NaOH 0,1 M, segundo Kaushik e colaboradores 2016, com adaptações. ⁵¹	21
Figura 10: Representação esquemática do retículo cristalino e da cela unitária. ⁵⁷	25
Figura 11: Representação dos sete tipos de sistemas cristalinos (redes bravais).	25
Figura 12: Perfis de concentração plasmática por tempo da droga após a administração oral do itraconazol pó (□) e da emulsão sólida (■) na dose de 10mg/kg de itraconazol em ratos. Cada valor representa a média ± D.P. (n=6), segundo Choi e colaboradores (2012), com adaptações. ⁵⁹	26
Figura 13: Representação esquemática dos vários tipos de formas sólidas. ⁵⁷	26
Figura 14: Micrografias de comprimidos feitos de: a) paracetamol na forma I, b) cocrystal paracetamol + teofilina, c) cocrystal paracetamol + naftaleno e d) cocrystal paracetamol + ácido oxálico. O comprimido (a) apresenta má formação devido a um empacotamento inapropriado das moléculas da rede cristalina do IFA, enquanto que as estruturas nos cocrystal são passíveis de deformação durante a formação dos comprimidos. ^{62,63}	27
Figura 15: Representação gráfica da zona metaestável, segundo Prado e Rocha (2015), com adaptações. ⁵⁷	28
Figura 16: Padrões de PXRD para os diferentes solvatos de sais de malonato do IFA6. De cima para baixo: a- Tetrahydrofurano + acetato de etila, b - tetrahydrofurano, c - acetato de etila, d – acetona, e – propano-2-ol e f – etanol, segundo Karpinski (2006), com adaptações. ⁶⁶	30
Figura 17: Estrutura do polímero sulfonado Nafion®. ⁶⁸	31
Figura 18: Cromatograma por CG-EM: (a) morfolina; (b) ciclohexanona e (c) MCE.	32
Figura 19: Espectro de massa por impacto de elétrons da MCE.	32
Figura 20: Espectro de massa por impacto de elétrons da ciclohexanona.	32
Figura 21: Espectro de massa por impacto de elétrons da morfolina.	33

Figura 22: Espectro (RMN ¹ H, 600 MHz, CDCl ₃) da 1-morfolinociclohexeno (MCE).	33
Figura 23: Estrutura molecular do ácido crotônico.	34
Figura 24: Cromatograma por CG-EM do ácido crotônico (AC).	34
Figura 25: Espectro de massas por impacto de elétrons do ácido crotônico.	34
Figura 26: Estrutura molecular do BSTFA (52).	35
Figura 27: Cromatograma por CG-EM do BSTFA (a- BSTFA e b- componente desconhecido).	35
Figura 28: Espectro de massas por impacto de elétrons: a – BSTFA e b – componente não identificado.	35
Figura 29: Cromatograma por CG-EM: a-ácido crotônico e b- BSTFA.	36
Figura 30: Cromatograma por CG-EM do AC derivatizado com BSTFA: a- BSTFA (4,4 min.), b- componente desconhecido do BSTFA (4,6 min) e c – produto derivatizado (5,7 min.).	36
Figura 31: Espectro de massas por impacto de elétrons do derivado do ácido crotônico (<i>m/z</i> 158).	37
Figura 32: Estrutura molecular da substância trimetilsilil (E)-but-2-enoato.	37
Figura 33: Espectro (RMN ¹ H, 600 MHz, CDCl ₃) do ácido crotônico (AC).	37
Figura 34: Espectro (RMN ¹³ C, 151 MHz, CDCl ₃) do ácido crotônico (AC).	38
Figura 35: Espectro (RMN ¹ H, 600 MHz, CDCl ₃) do cloreto de crotonila (CC).	39
Figura 36: Espectro (RMN ¹³ C, 75 MHz, CDCl ₃) do cloreto de crotonila (CC).	40
Figura 37: óleo marrom (6-oxo bruta).	41
Figura 38: Cromatograma da fase óleo (6-oxo – 99,36 % - 9,85 min. e impurezas: <i>m/z</i> 162 – 0,03 % - 9,5 min., <i>m/z</i> 180 – 0,48 % - 10,9 min. e <i>m/z</i> 235 - 0,13 % em 15,3 min.).	41
Figura 39: Sólido marrom	42
Figura 40: Cromatograma do sólido amarelo (6-oxo e impureza de <i>m/z</i> 180 (a) – 10,9 min).	42
Figura 41: 6-oxo sólido na água-mãe.	43
Figura 46: Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da 6-oxo.	50
Figura 47: Espectro de RMN ¹³ C (151 MHz, CDCl ₃) da 6-oxo.	51
Figura 48: Espectro de RMN ¹³ C (151 MHz, CDCl ₃) da 6-oxo com APT.	51
Figura 49: Espectro de Infravermelho da 6-oxo.	52
Figura 50: Cromatograma por CG-EM da 6-oxo.	52
Figura 51: Espectro de massa por impacto de elétrons da 6-oxo.	53
Figura 52: Espectro UV-vis da 6-oxo.	54
Figura 53: Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do ácido maleico.	56
Figura 54: Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da 6-oxo + ácido maleico	56
Figura 55: Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da HCB.	60
Figura 56: Espectro de RMN ¹³ C (151 MHz, CDCl ₃) da HCB.	61
Figura 57: Cromatograma CG-EM da HCB.	62
Figura 58: Espectro de massa por impacto de elétrons da HCB.	62

Figura 59: Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da MBE.	64
Figura 60: Espectro de RMN ¹³ C (151 MHz, CDCl ₃) da MBE.	65
Figura 61: Cromatograma CG-EM da MBE.	65
Figura 62: Espectro de massa por impacto de elétrons da MBE.	66
Figura 63: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da BCD.	67
Figura 64: Espectro COSY (600 MHz, CDCl ₃) da BCD.	68
Figura 65: Espectro de RMN ¹³ C (151 MHz, CDCl ₃) da BCD.	69
Figura 66: Espectro de RMN ¹³ C com APT (151 MHz, CDCl ₃) da BCD.	70
Figura 67: Espectro de HSQC da BCD.	71
Figura 68: Espectro de HMBC da BCD.	72
Figura 69: Cromatograma CG-EM da BCD.	72
Figura 70: Espectro de massa por impacto de elétrons da BCD.	73
Figura 71: Cromatograma de CG-EM da amostra de 6-oxo após teste de degradação forçada em condições ácidas (HCl 0,1 mol/L, a 40 °C por 7 dias).	75
Figura 72: Espectro de EMAR da 6-oxo após teste de degradação forçada em condições ácidas (HCl 6 mol/L, 75 °C por 6 h).	76
Figura 73: Cromatogramas por CG-EM das amostras de 6-oxo após os testes de degradação forçada em condições básicas (5 mg/mL em NaOH 0,1 mol/L) a 30 °C: a- 12 h e b- 144 h.	77
Figura 74: Espectro de massas por impacto de elétrons da impureza de <i>m/z</i> 192.	77
Figura 75: Porcentagens de degradação das amostras de 6-oxo em condições básicas (5 mg/mL em NaOH 0,1 mol/L) a 30 °C nos tempos: 12, 24, 48, 96 e 144 h	78
Figura 76: Espectro de massas de alta resolução da impureza <i>m/z</i> 192.	78
Figura 77: Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da impureza de <i>m/z</i> 192.	79
Figura 78: Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) da impureza de <i>m/z</i> 192.	80
Figura 79: Câmara utilizada nos testes de degradação forçada com luz	81
Figura 80: Cromatograma de CG-EM da amostra de 6-oxo após teste de degradação fotolítico no tempo máximo (30 dias).	81
Figura 81: Cromatograma de CLAE-UV da amostra de 6-oxo da amostra de 6-oxo após teste de degradação fotolítico no tempo máximo (30 dias).	82
Figura 82: Frasco Schlenk contendo amostra após 14 dias sob estresse térmico em estufa a 70 °C.	82
Figura 83: Cromatogramas por CG-EM das amostras de 6-oxo após os testes de estresse térmico: a- 10 dias – 70 °C e b- 14 dias - 70°C (9,4 min. - <i>m/z</i> 162; 9,7 min. - <i>m/z</i> 166 (6-oxo); 10,6 min. - <i>m/z</i> 178 e 10,8 min. - <i>m/z</i> 180).	83
Figura 84: Espectro de massas por impacto de elétrons das impurezas geradas após os testes de estresse térmico: a - <i>m/z</i> 162 (9,4 min.); b - <i>m/z</i> 178 (10,6 min.) e c - <i>m/z</i> 180 (10,8 min.).	84
Figura 85: Estruturas moleculares das impurezas formadas no estudo de estresse térmico da 6-oxo: 2-metilcroman-4-ona (69); 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (70) e 2-metil-2,3,6,7-tetrahidro-4H-cromeno-4,8(5H)-diona (71).	85

Figura 86: Espectro (RMN ¹ H, 600 MHz, CDCl ₃) da impureza da MC.	86
Figura 87: Espectro (RMN ¹³ C, 75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da impureza da MC	87
Figura 88: Cromatograma por CG-EM da impureza MC	87
Figura 89: Espectro de massas por impacto de elétrons da impureza MC.	88
Figura 90: Espectro de massas de alta resolução da impureza da impureza <i>m/z</i> 162.	89
Figura 91: Espectro (RMN ¹ H, 300 MHz, CDCl ₃) da impureza da HMC.	91
Figura 92: Espectro (RMN ¹³ C, 75 MHz, CDCl ₃) da impureza da HMC.	92
Figura 93: Espectro de HSQC da HMC.	92
Figura 94: Espectro de Infravermelho da HMC.	93
Figura 95: Cromatograma por CG-EM da impureza com <i>m/z</i> 178	94
Figura 96: Espectro de massas por impacto de elétrons da impureza com <i>m/z</i> 178	94
Figura 97: Espectro de massas de alta resolução da impureza <i>m/z</i> 192	95
Figura 98: Espectro (RMN ¹ H, 600 MHz, CDCl ₃) da impureza da MTCD.	97
Figura 99: Espectro (RMN ¹³ C, 75 MHz, CDCl ₃) da impureza da MTCD.	98
Figura 100: Espectro de RMN ¹³ C com APT (75 MHz, CDCl ₃) da MTCD.	98
Figura 101: Espectro de HSQC da MTCD.	99
Figura 102: Espectro de Infravermelho da MTCD.	100
Figura 103: Cromatograma por CG-EM da impureza MTCD.	100
Figura 104: Espectro de massas por impacto de elétrons da impureza MTCD.	101
Figura 105: Espectro de massas de alta resolução da impureza MTCD.	102
Figura 106: Cromatogramas por CG-EM das amostras de 6-oxo após os testes de degradação forçada em condições oxidativas (5 mg/mL em H ₂ O ₂ 10%) a 30 °C, em diferentes tempos de exposição: a- 12 h e b- 48 h	104
Figura 107: Espectro de massas por impacto de elétrons das impurezas oxidativas - a: <i>m/z</i> 182 e b: <i>m/z</i> 180.	104
Figura 108: Cromatograma por CG-EM da impureza com <i>m/z</i> 182	105
Figura 109: Espectro (RMN ¹ H, 600 MHz, CDCl ₃) da impureza de <i>m/z</i> 182 (MHBD).	106
Figura 110: Estrutura molecular da impureza com <i>m/z</i> 182 (MHBD).	106
Figura 111: Espectro (RMN ¹³ C, 75 MHz, CDCl ₃) da impureza de <i>m/z</i> 182 (MHBD).	107
Figura 112: Espectro de RMN ¹³ C com APT (75 MHz, CDCl ₃) da MHBD.	107
Figura 113: Espectro de HSQC da MHBD.	108
Figura 114: Espectro de massas de alta resolução da impureza <i>m/z</i> 182.	109
Figura 115: Espectro MS ² da impureza <i>m/z</i> 182.	110
Figura 116: Relação entre os diferentes perfis de degradação obtidos por: Estudo de estabilidade de longa duração, estudo de estabilidade acelerada e estudo de degradação forçada. ⁸⁵	111

Figura 117: Cromatograma CLAE-DAD da 6-oxo (1) em 67,5 min. e de suas impurezas: m/z 166 - HCB (2) em 63,3 min.; m/z 192 (3) em 61,5 min., m/z 182 (4) em 58,5 min., m/z 162 (5) em 56,2 min., m/z 180 (6) em 22,0 min, m/z 178 (7) em 21,1 min., m/z 166 – BCD em 18 min. e m/z 155 (9) em 14 min. ___	112
Figura 118: Curva analítica por CLAE-DAD da 6-oxo (concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). _____	113
Figura 119: Fórmula do cálculo da % de recuperação. _____	113
Figura 120: Fórmula utilizada no cálculo do limite de detecção – LD (DPAD – desvio padrão e IC – inclinação da curva). _____	113
Figura 121 – Fórmula utilizada no cálculo do limite de quantificação – LQ (DPAD – desvio padrão e IC – inclinação da curva). _____	114
Figura 122: Termograma (TGA) da 6-oxo. _____	115
Figura 123: Curvas de aquecimento e resfriamento na análise da 6-oxo por DSC. _____	116
Figura 124: Difratoograma da 6-oxo (PDRX). _____	117
Figura 125: Difratoograma da 6-oxo recristalizada (PDRX). _____	117
Figura 126: Dados do difratograma da 6-oxo indexados no <i>software</i> Match. _____	118
Figura 127: Dados do difratograma da 6-oxo recristalizada indexados no <i>software</i> Match. _____	118
Figura 128: Espectro de IV da 6-oxo e da 6-oxo recristalizada. _____	119
Figura 129: Comparação de diferentes espectros de RMN de ^{13}C da 6-oxo: 1 – Espectro RMN de ^{13}C da 6-oxo dissolvida em CDCl_3 (amostra líquida), 2 – Espectro de RMN de ^{13}C da 6-oxo no estado sólido antes da recristalização e 2 – Espectro de RMN de ^{13}C da amostra recristalizada de 6-oxo no estado sólido	119

Esquemas

Esquema 1: Rota sintética medicinal da <i>N</i> -diazabicyclo[2,2,2]-octilmetil benzamida, segundo Lienard e colaboradores (2017), com adaptações. ^a	9
Esquema 2: Síntese do epóxido de ftaloimida quirál (8), segundo Lienard e colaboradores (2017), com adaptações. ^a	10
Esquema 3: Rota sintética da 6-oxo, segundo MacDonald e Burnell (2009), com adaptações. ²⁹	11
Esquema 4: Esquema simplificado da síntese de lactonas acetilênicas a partir de oxabicycloalquenonas, com adaptações.	12
Esquema 5: Esquema da síntese da 6-oxo (6), segundo Mahajan e Resck (1997), com adaptações.	12
Esquema 6: Esquema da síntese de um potencial fármaco, segundo Sajan e colaboradores (2015), com adaptações.	14
Esquema 7: Esquema da formação da diimina para detecção de 32, segundo Sajan e colaboradores (2015).	14
Esquema 8: Proposta de mecanismo de fragmentação do AZL (37) inicialmente apresentada para a formação do produto com $m/z = 207,0913$ (41), segundo Kaushik e colaboradores 2016, com adaptações.	22
Esquema 9: Proposta de mecanismo de fragmentação produto de degradação I (ácido 2-etoxibenzimidazol-7-carboxílico) (42), segundo Kaushik e colaboradores 2016, com adaptações.	22
Esquema 10: Rota de degradação da hidrocortisona (45) para a formação dos isômeros Z (47) e E (48).	23
Esquema 11: Esquema de formação dos polimorfos I e II da aspirina (49) a partir de soluções de aspirina em acetona (a 50 °C) e diclorometano (a 5 °C), respectivamente.	28
Esquema 12: Rota de síntese da 1-morfolino-ciclohexeno.	31
Esquema 13: Rota de síntese do cloreto de crotonila (19).	38
Esquema 14: Esquema simplificado das etapas de síntese da 6-oxo (6).	44
Esquema 15: Diagrama de fluxo de processo da 6-oxo.	49
Esquema 16: Propostas de mecanismos de fragmentação da 6-oxo.	54
Esquema 17: Mecanismo de síntese da 6-oxo.	58
Esquema 18: Mecanismo de síntese da BCD.	59
Esquema 19: Propostas de mecanismos de fragmentação da HCB.	63
Esquema 20: Reação de síntese da MBE.	63
Esquema 21: Propostas de mecanismos de fragmentação da MBE.	66
Esquema 22: Proposta de mecanismos de fragmentação da BCD.	74
Esquema 23: Propostas de mecanismos de fragmentação da MC.	89
Esquema 24: Proposta de mecanismo de formação da impureza MC.	90
Esquema 25: Propostas de mecanismos de fragmentação da HMC.	95

Esquema 26: Proposta de mecanismo de formação da impureza HMC. _____	96
Esquema 27: Propostas de mecanismos de fragmentação da MTCD. _____	102
Esquema 28: Proposta de mecanismo de formação da impureza MTCD. _____	103
Esquema 29: Proposta de mecanismo de formação da impureza MHBD. _____	110

Tabelas

Tabela 1: Principais critérios de seleção de rota de síntese e exemplos de questões potenciais, segundo Ager (2011) – com adaptações _____	10
Tabela 2: Solventes da classe 1 para produtos farmacêuticos. _____	15
Tabela 3: Solventes da classe 2 para produtos farmacêuticos. _____	16
Tabela 4: Condições sugeridas pela OMS no protocolo de estudo de estresse para o desenvolvimento de formas farmacêuticas. _____	18
Tabela 5: Combinação dos sistemas cristalinos com as células bravais. ⁵⁸ _____	25
Tabela 6: Principais características de algumas técnicas analíticas utilizadas na caracterização de polimorfos: Difração de raios X de pó, difração de raios X de monocristal, calorimetria diferencial exploratória e termogravimetria. _____	29
Tabela 7: Quantidade de reagentes: síntese original x síntese adaptada. _____	41
Tabela 8: Dados utilizados no cálculo da pureza da 6-oxo pelo método de RMNq. _____	57
Tabela 9: Dados espectroscópicos de RMN ¹³ C (151 MHz, CDCl ₃) da 4-metilbiciclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD) _____	70
Tabela 10: Dados espectroscópicos de HSQC da BCD. _____	71
_____	84
Tabela 11: Dados com as porcentagens de impurezas das amostras submetidas a estresse térmico: 1 - 10 dias – 70 °C e 2 – 14 dias – 70 °C. _____	84
Tabela 12: Dados espectroscópicos de HSQC da HMC. _____	93
Tabela 13: Dados espectroscópicos de HSQC da MTCD. _____	99
Tabela 14: Dados espectroscópicos de HSQC da MBHD. _____	109
Tabela 15: Dados das leituras das amostras nas concentrações de 1, 6 e 10 µg.mL ⁻¹ de 6-oxo em acetonitrila utilizados no cálculo da % de recuperação _____	113

Anexos

Anexo 1: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da 1-morfolinociclohexeno (MCE) _____	129
Anexo 2: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) do cloreto de crotonila (CC) _____	130
Anexo 3: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da 6-oxo _____	131
Anexo 4: Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da 6-oxo _____	132
Anexo 5: Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da 6-oxo com APT _____	133
Anexo 6: Espectro de infravermelho (KBr) da 6-oxo _____	134
Anexo 7: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) do ácido maleico _____	135
Anexo 8: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) da 6-oxo + ácido maleico _____	136
Anexo 9: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da (E)-1-(2-hidroxiciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB) _____	137
Anexo 10: Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da (E)-1-(2-hidroxiciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB) _____	138
Anexo 11: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da (E)-1-morpholinobut-2-en-1-one (MBE) __	139
Anexo 12: Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da (E)-1-morpholinobut-2-en-1-one (MBE) __	140
Anexo 13: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da 4-metilbiciclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD) _ _____	141
Anexo 14: Espectro de COSY da 4-metilbiciclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD) _____	142
Anexo 15: Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da 4-metilbiciclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD) _ _____	143
Anexo 16: Espectro de RMN ^{13}C com APT (151 MHz, CDCl_3) da 4-metilbiciclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD) _____	144
Anexo 17: Espectro de HSQC da BCD _____	145
Anexo 18: Espectro de HMBC da BCD _____	146

Abreviações

AcOH	Ácido acético
AHLs	Acil homoserina lactonas
AI	Auto-indutores
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZL	Azilsartan
BCD	4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona
CG-EM	Cromatografia gasosa com espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida com espectrometria de massas
CL-EM-TOF	Cromatografia líquida com espectrometria de massas por tempo de voo (time-of flight)
CL-RMN	Cromatografia líquida com ressonância magnética nuclear
CL-UV	Cromatografia líquida com espectrometria no ultravioleta
COSY	Correlation spectroscopy
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DO	Densidade ótica
EDF	Estudos de degradação forçada
HCB	(E)-1-(2-hidroxiclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
ICH	International Council for Harmonisation
IFAs	Insumos Farmacêuticos Ativos
IQSs	Inibidoras de quorum sensing
LDA	Diisoprilamideto de lítio
MBE	(E)-1-morpholinobut-2-en-1-one
MCE	1-morfolinociclohexeno
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PI	Padrão interno
PXRD	Padrão de difração de Raios-X
QQs	Quorum quenchers
QS	Quorum sensing
RAPG	Receptor acoplado a proteína G
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMNq	Ressonância Magnética Nuclear quantitativa
THF	Tetrahidrofurano

1. Introdução

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem se apresentado como um dos importantes desafios à saúde pública mundial.^{1,2} Nesse cenário, nota-se que o uso indiscriminado de antibióticos tem contribuído, de forma significativa, para o aumento da resistência microbiana e para o aparecimento de cepas multirresistentes.^{2,3}

Nesse contexto, destaca-se que a descoberta de novas alternativas terapêuticas passam a ter um papel fundamental no controle das infecções microbianas.⁴ Pesquisas recentes sobre *quorum sensing* (QS) tem demonstrado que este sistema de sinalização química apresenta-se como um eficiente mecanismo de controle de alguns fatores associados à expressão da virulência microbiana.^{3,5}

A evolução dos estudos sobre QS e suas moléculas sinalizadoras, denominadas auto-indutores (AIs), levaram ao surgimento de novos modelos relacionados ao controle na patogênese das infecções bacterianas.⁶ Dentre esses paradigmas, observa-se que os AIs do tipo I, pertencentes ao grupo das acil homoserina lactonas (AHLs), constituem um importante de grupo de moléculas participantes do sistema de QS de bactérias Gram-negativas.^{3,7}

Moléculas inibidoras de *quorum sensing* (IQSs), também conhecidas como *quorum quenchers* (QQs), têm se apresentado como alternativas promissoras na limitação da virulência de microrganismos. Normalmente, essas moléculas atuam no sentido de reduzir as exigências impostas ao hospedeiro para debelar infecções.³

Nesse trabalho, abordamos o desenvolvimento do processo de síntese de uma cromenona, denominada 6-oxo, que tem apresentado um potencial de inibição do QS microbiano do tipo I. Esse potencial pôde ser observado em um ensaio de cinética de expressão da bioluminescência em *V. Harvey*, no qual a 6-oxo promoveu a inibição deste evento em até 60%.⁸

Destaca-se ainda que apesar de ser uma substância ainda em fase inicial de avaliação em química medicinal, o fato de não haver literatura relacionada aos aspectos envolvidos no desenvolvimento do processo para ampliação de escala da 6-oxo foi a preponderante para esse estudo.

2. Objetivos

Este trabalho visa apresentar os principais aspectos envolvidos no desenvolvimento do processo inicial de síntese da 6-oxo, considerando as exigências previstas nas Boas Práticas de Fabricação (BPF) para a síntese de Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) no estado sólido. Para o alcance dessa meta, foram traçados os seguintes objetivos:

- Desenhar de um processo de síntese em batelada para a 6-oxo;
- Identificar os parâmetros de processo que interferem na qualidade do material obtido;
- Apresentar uma metodologia analítica que permita avaliar as especificações de pureza exigidas do IFA produzido;
- Identificar e caracterizar impurezas de síntese;
- Realizar estudos de estresse para obtenção e identificação das potenciais impurezas de degradação;
- Realizar varredura de condições experimentais que permitam a formação de diferentes polimorfos da 6-oxo e, caso formados, caracterizá-los físico-quimicamente.

3. Revisão da literatura

3.1. Quorum Sensing

Quorum sensing (QS) pode ser definido como um sistema de comunicação intercelular bacteriano, realizado por meio de sinais químicos, genericamente denominados de auto-indutores (AIs), que são utilizados para modular a alteração coordenada da expressão genética das bactérias em resposta às variações de sua densidade populacional.^{5,7,9,10} De forma geral, após atingirem uma determinada densidade populacional, as bactérias detectam o acúmulo dos AIs em um limiar mínimo e alteram a expressão dos seus genes. Por consequência, atuam modificando seu comportamento de forma sincronizada, funcionando como organismos multicelulares.¹¹

O QS pode mediar diversos processos nas comunidades bacterianas, dentre eles estão a bioluminescência, a formação de biofilme, a expressão de fatores de virulência e o crescimento bacteriano.³

O primeiro sistema de QS foi identificado na bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*, que reside nos órgãos luminosos da lula havaiana *Euprymna scolopes*.^{4,12} Essa bactéria utiliza um sistema de QS composto por três partes: um auto-indutor (uma acil homoserina lactona – AHL), sua sintetase (LuxI) e seu receptor (LuxR). No processo de QS, a LuxI tem a função de produzir o auto-indutor denominado 3-oxo-hexanoil homoserina lactona (OHHL) que, após sintetizada, difunde-se dentro e fora da célula.^{4,11}

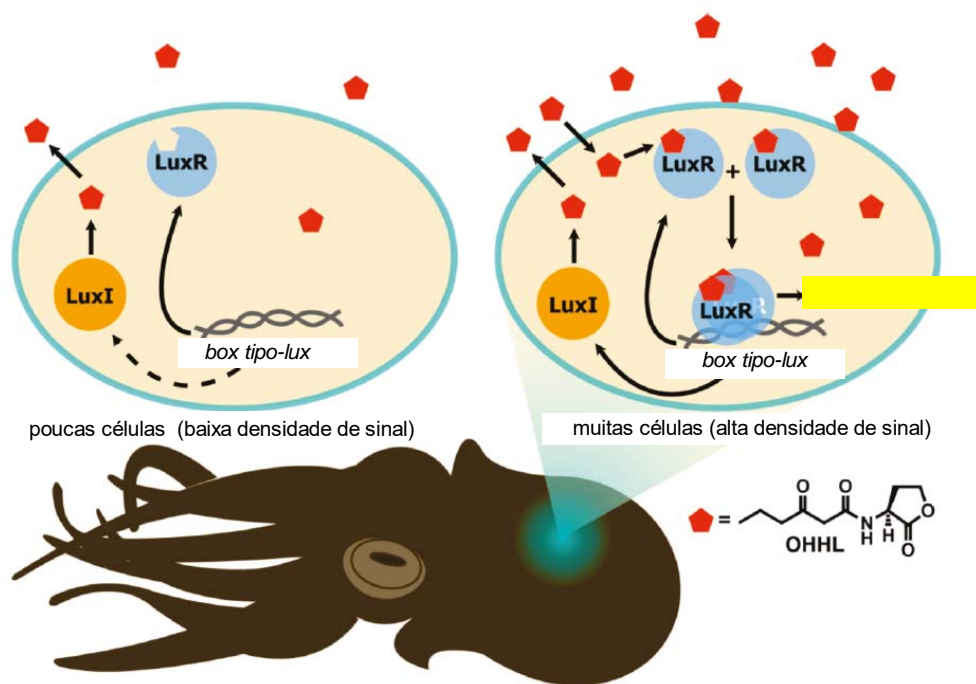


Figura 1: Desenho esquemático do sistema de QS na relação simbiótica entre a *V. fischeri* e a lula havaiana *Euprymna scolopes*, segundo Mattmann et. al. (2010) - com adaptações. (Box tipo-lux é uma sequência curta e palindrômica de DNA reconhecida pelo complexo [OHHL / LuxR]).^{3,4}

Com o aumento da densidade populacional bacteriana, observa-se também um aumento da concentração do sinal do AI e, quando a concentração limiar intracelular de OHHL é atingida, este AI se liga à sua proteína receptora citoplasmática (LuxR). Em seguida, o complexo OHHL/LuxR dimeriza e ativa a transcrição de genes envolvidos na indução da bioluminescência.⁴

O processo de sinalização sensorial de QS que ocorre em algumas bactérias é, em muitos casos, mais complexo do que o descrito na Figura 1. A bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, utiliza, ao menos, três tipos de sistemas de sinalização por QS, sendo dois deles baseados em AHLs.¹³ No entanto, a descrição do modelo simplificado de QS da *V. fischeri* nos permite evidenciar o relevante papel dos auto-indutores do tipo I (AI-1), grupo que compreende as acil-homoserina lactonas (AHL), na mediação dos processos de QS em bactérias Gram-negativas.¹³

Estudos de QS em diferentes espécies de bactérias têm revelado uma grande variedade estrutural de AHL. Pois, apesar destas moléculas compartilharem uma mesma porção homoserina lactona, tem se observado que diferentes isoformas das enzimas receptoras de AHL incorporam cadeias acil de tamanho e estado de saturação específicos. Essas cadeias, em sua maioria, apresentam tamanhos que variam de 4 a 18 carbonos, podendo ser também saturadas ou insaturadas, com ou sem substituintes hidróxi ou oxo no C3.^{13,14}

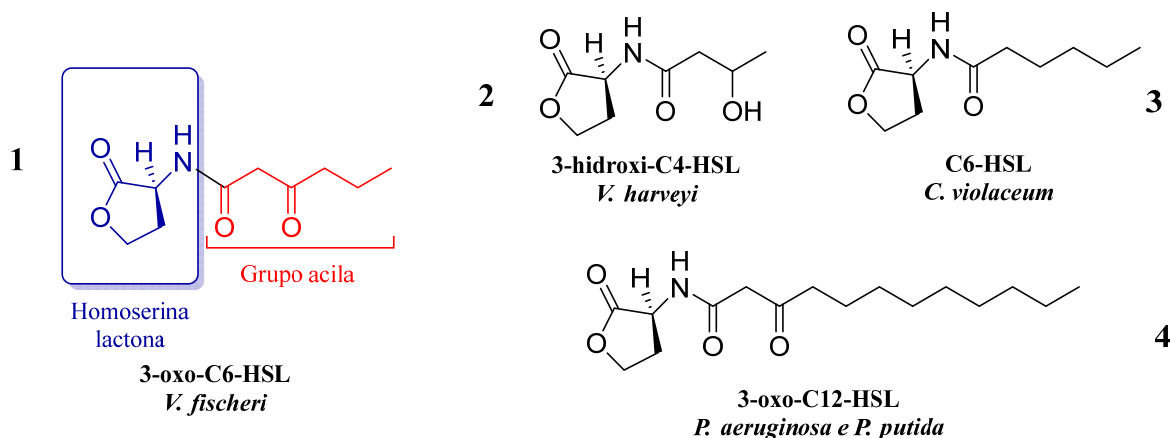


Figura 2: Estruturas moleculares de algumas acil-homoserinas lactonas (AHL's).

Observa-se ainda que as AHL oriundas de pequenos ácidos graxos são moléculas solúveis e livremente difusíveis, possuindo a capacidade de atravessar as membranas celulares para “perceber” a densidade bacteriana. Já as AHL com cadeias laterais longas necessitam de bombas de efluxo para realizar seu transporte para o meio extracelular.³

3.1.1. Cromenonas - Potenciais drogas antipatogênicas

A crescente prevalência de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos disponíveis, bem como o surgimento de cepas multirresistentes, tem pressionado a indústria farmacêutica na busca de novas alternativas terapêuticas aos fármacos convencionais.^{3,6}

Estudos sobre diversas bactérias patogênicas, algumas com relevante importância médica, tem observado que esses microrganismos utilizam um sistema de QS para regular a expressão de seus fatores de virulência. Essa estratégia aumenta as chances de sobrevivência destes microrganismos, uma vez que a expressão da virulência é efetivada somente quando a população bacteriana atinge um elevado contingente, facilitando assim a subjugação do sistema imunológico.^{3,6}

Alguns trabalhos relatam que as substâncias inibidoras de *quorum sensing* (IQSs), também conhecidas como *quorum quenchers* (QQs), têm se apresentado como alternativas promissoras na limitação da virulência de microrganismos.^{1,3} Tais moléculas oferecem a oportunidade de inibir a patogênese bacteriana sem impor imediata pressão seletiva ao patógeno bacteriano. Esse diferente tipo de combate às doenças bacterianas tem sido considerado um novo paradigma na prevenção e tratamento das doenças infecciosas.⁶

Nesse modelo terapêutico, são usadas drogas baseadas em moléculas sinais, conhecidas como drogas antipatogênicas, que tem por objetivo atenuar a patogenicidade, em vez do crescimento bacteriano.¹⁵ Assim, uma variedade de análogos aos autoindutores, sintéticos e naturais, tem sido sondada, levando à descoberta de alguns inibidores de *quorum sensing*.^{4,13,16,17}

Estudos preliminares demonstraram que as cromenonas 2-metil-2,3,4,6,7,8-hexahidro-5H-cromen-5-ona e a 2-metil-2,3,5,6,7,8-hexahidro-4H-cromen-4-ona, as quais denominamos 5-oxo (**5**) e 6-oxo (**6**) (Figura 4), respectivamente, têm apresentado destaque na inibição de QS bacteriano. Como exemplo, podemos citar que ensaios de cinética de expressão da bioluminescência em *V. Harvey* demonstraram que a 6-oxo promoveu a inibição deste evento em até 60%, sem inibir o crescimento populacional desta bactéria (Figura 3).⁸

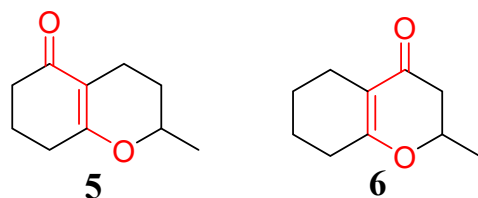


Figura 3: Estruturas moleculares das cromenonas 5-oxo (**5**) e 6-oxo (**6**).

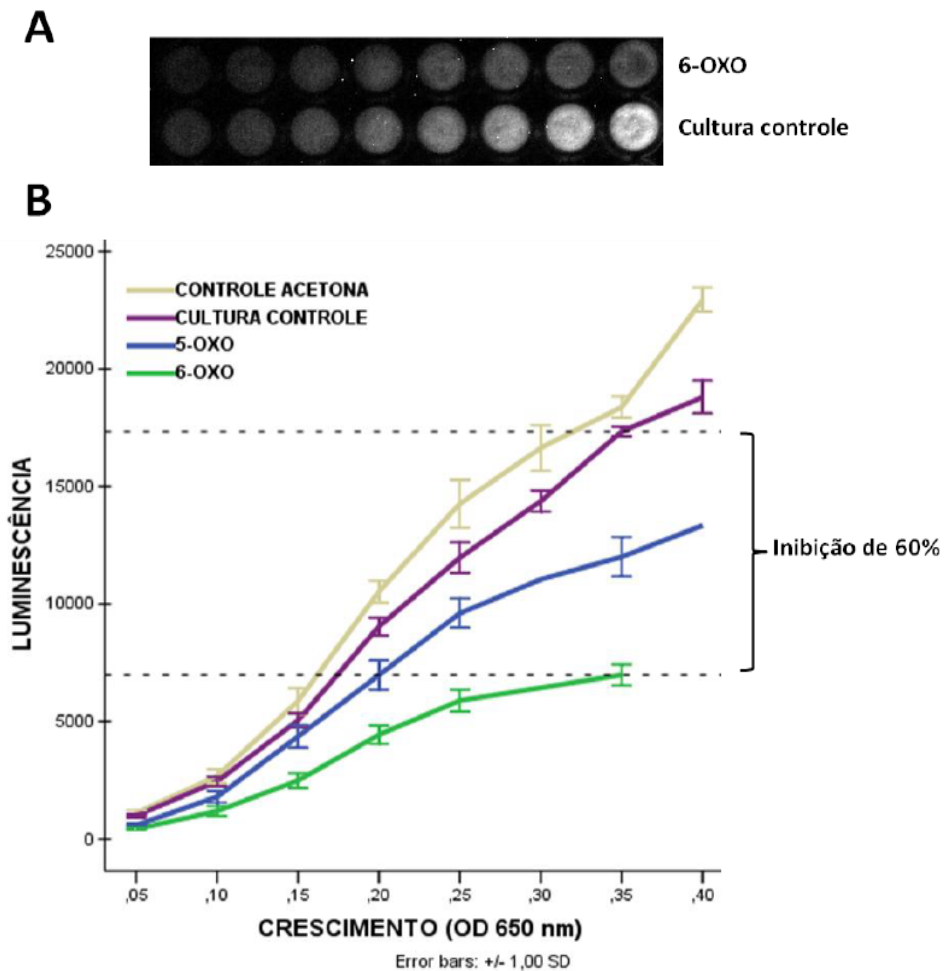


Figura 4: Ensaio de correlação entre densidade ótica (DO) e luminescência. Legenda: A. Visão qualitativa da inibição apresentado pela 6-oxo sobre a luminescência da cepa BB886. B. Gráfico com a inibição comparativa de bioluminescência da cepa de *V. harveyi* BB886 com as lactonas vinílogas 5-oxo e 6-oxo (com adaptações).⁸

A comparação das estruturas químicas das cromenonas 5-oxo e 6-oxo (Figura 4) com a dos autoindutores naturais da *V. fischeri* (3-oxo-C6-HSL) e da *C. violaceum* (C6-HSL) nos permitem identificar similaridades estruturais potencialmente responsáveis pelas respostas observadas nos ensaios realizados.^{13,14} O grupo carbonila dessas cromenonas mimetiza as interações que o éster das homoserinolactonas apresentam com seus receptores. Somado a isso, observa-se que o anel que compreende o oxigênio do enoléter, além de mimetizar a interação do grupo acila das AHL's, garante restrição conformacional a esta parte das moléculas.

3.2. Síntese de insumos farmacêuticos ativos (IFA)

3.2.1. Insumos farmacêuticos ativos (IFA)

Os dados mencionados no capítulo anterior indicam que a 6-oxo pode ser considerada uma potencial droga inibidora de *quorum sensing*. Dessa forma, surge a necessidade de realizar a produção de seus lotes com critérios de qualidade semelhantes aos aplicados na síntese dos insumos farmacêuticos, visando obter um produto com elevado grau de pureza para realização dos novos testes biológicos.¹⁸

No âmbito farmacêutico, as substâncias produzidas com o intuito de exercer a função ativa em um medicamento são denominadas de insumos farmacêuticos ativos (IFA).¹⁹ Esses insumos podem ser definidos como quaisquer substâncias introduzidas na formulação de uma forma farmacêutica que, quando administradas em um paciente, exercem atividade farmacológica ou outro efeito direto no diagnóstico, cura, tratamento ou prevenção de uma doença, podendo ainda afetar a estrutura e o funcionamento do organismo humano.²⁰

A produção dos IFA no Brasil é regulada por diversas normas sanitárias. Dentre elas destacam-se a RDC nº 69/2014, que dispõe sobre as boas práticas de fabricação (BPF) de insumos farmacêuticos ativos, e a RDC nº 57/2009, que dispõe sobre o registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e dá outras providências.^{20,21}

Nessas normas, produzidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), são exigidas a apresentação de diversas informações sobre o insumo e seu processo produtivo, com intuito de garantir um elevado padrão de qualidade do IFA produzido. Na descrição do processo sintético de um insumo, por exemplo, algumas informações técnicas são imprescindíveis e, dentre elas, destacam-se: definição da rota de síntese, descrição das moléculas intermediárias e purificação; catalisadores utilizados, descrição das etapas críticas, definição dos parâmetros de controle da síntese, rendimento da reação e determinação do perfil de impurezas.^{20,21}

Diante do exposto, podemos perceber que os insumos farmacêuticos ativos desempenham uma importante função no desenvolvimento do mercado farmacêutico, pois, além de sua importância econômica, ocupam um papel central na garantia de qualidade, segurança e eficácia do processo de produção de medicamentos.²²

3.2.2. Desenvolvimento de processo da síntese de IFA

A palavra “processo” pode ser relacionada às diversas operações ou procedimentos realizados no âmbito industrial. Na síntese de fármacos, o termo “desenvolvimento de processo” é utilizado para denominar o conjunto de ações utilizadas na etapa de desenvolvimento dos processos de trabalho, visando a síntese de um fármaco com alta qualidade e em larga escala.^{23,24}

Os principais ajustes do processo sintético de um fármaco são feitos durante a fase de pesquisa e desenvolvimento (P&D). Essa fase ajuda a entender todas as etapas do processo e adotar uma abordagem sistemática sobre a síntese, permitindo a aquisição de dados fundamentais para a documentação das informações técnicas exigidas na produção de um IFA.²⁵

O desenvolvimento de processo é uma tarefa muito desafiadora. Haja vista que diferentes objetivos, tais como qualidade, segurança, robustez, custos e tempo, devem ser equilibrados durante as diversas fases de um projeto, para que uma eventual preponderância de um dos fatores não prejudique o processo final.²⁶

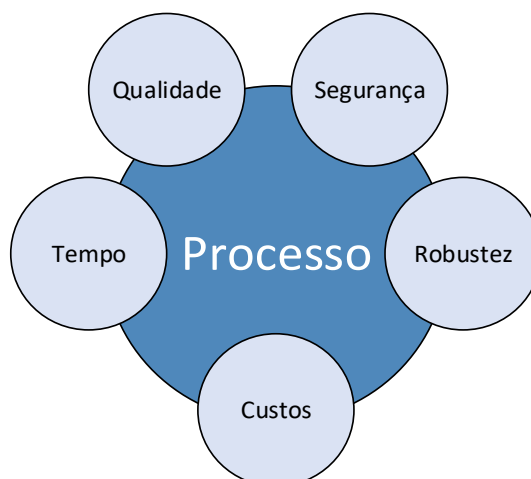
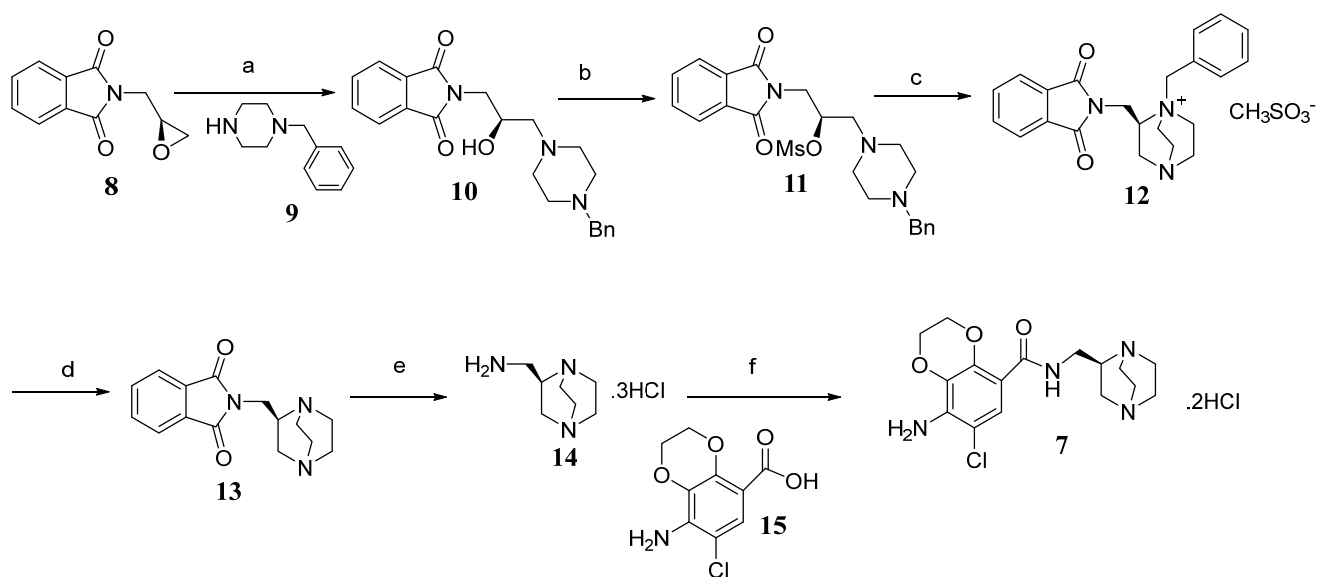


Figura 5: Perímetro da otimização de processo, segundo Adler.²⁶

É preciso destacar que, em determinadas etapas do desenvolvimento de processo a alocação de recursos para modificações no processo pode ser limitada; uma vez que a maioria dos potenciais fármacos nunca serão comercializados, por falharem nos testes clínicos. Mais tarde, no entanto, durante a fase de comercialização, o medicamento deve ter preços competitivos e, com isso, seu processo fabricação deverá ser otimizado visando obter maior produtividade com menor custo de produção.²⁶

3.2.3. Rota de síntese

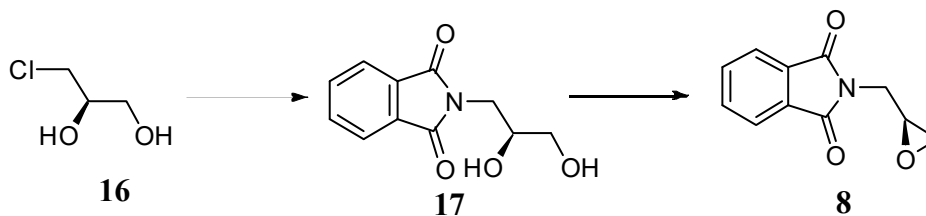
A escolha da rota de síntese é um fator importante no desenvolvimento de processo. Pois, rotas sintéticas que demandam modificações significativas para sua ampliação de escala, podem dificultar, substancialmente, a produção do fármaco nas condições desejadas.²⁷ Como exemplo, podemos observar o estágio inicial do desenvolvimento de processo em escala piloto da SL65.0102-10ⁱ, uma *n*-diazabicyclo[2,2,2]-octilmetil benzamida (7) (Esquema 1). Nesse processo, Lienard e colaboradores (2017) verificaram que rota de síntese da etapa de química medicinal não era adequada para a produção em grandes quantidades. O problema era que um dos materiais de partida, o epóxido de ftaloimida quiral (8), não possuía rota de fabricação segura. Haja vista que os reatores disponíveis à época não estavam equipados para lidar com seu precursor: a epiclorigrina. A síntese do epóxido quiral foi conseguida somente com uma diferente abordagem, na qual se utilizou um novo substrato, o (*R*)-(-)-3-cloro-1,2-propanodiol, em uma reação de dihidroxilação de *Sharpless* (Esquema 2). Essa etapa demandou um grande esforço para seu desenvolvimento, dificultando substancialmente o desenvolvimento do processo desse potencial fármaco.²⁸



^a Reagentes e condições: (a) tolueno, 80 a 120 °C, 95%; (b) CH₃SO₂Cl, trietilamina, diclorometano, sem purificação; (c) Tolueno, refluxo, 87%; (d) H₂/Pd/C, MeOH, 50°C, 68%; (e) NH₂NH₂/EtOH/refluxo, então 4 N HCl, 0°C, 77%; (f) DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), NaOH, pridina/água, TA., purificação em SiO₂/cromatografia então HCl/EtOH, 44%

Esquema 1: Rota sintética medicinal da *N*-diazabicyclo[2,2,2]-octilmetil benzamida, segundo Lienard e colaboradores (2017), com adaptações.^{a 28}

ⁱ A SL65.0102-10 é um agonista parcial seletivo para o receptor do tipo 5-HT₄. O receptor 5-HT₄ é um receptor acoplado a proteína G (RAPG) a qual pertence à família dos receptores de serotonina. O papel do receptor 5-HT₄ na modulação de várias doenças tem sido bem discutido na literatura. Evidências sugerem que a estimulação seletiva de receptores neuronais do subtipos 5-HT₄ pode ser benéfica no tratamento sintomático de distúrbios da memória.²⁸



^a Reagentes e condições: (a) Ftaloimida de potássio, dimetilformamida (DMF), cloreto de benziltriethylamônio (TEBAC), 94,5%; (b) $\text{CH}_3\text{C}(\text{OCH}_3)_3$, tolueno, pirrínio para-tolueno sulfonato (PPTS), 50°C, então clorotrimetilsilano (TMSCl), a T.A., e MeONa, 30°C, 66,5%.

Esquema 2: Síntese do epóxido de ftaloimida quiral (**8**), segundo Lienard e colaboradores (2017), com adaptações.^{a 28}

Vários critérios podem influenciar na escolha inicial de uma rota sintética e, de forma geral, os principais deles envolvem questões de segurança, impacto ambiental, legalidade, economia, controle de processo e aumento de escala.²⁷

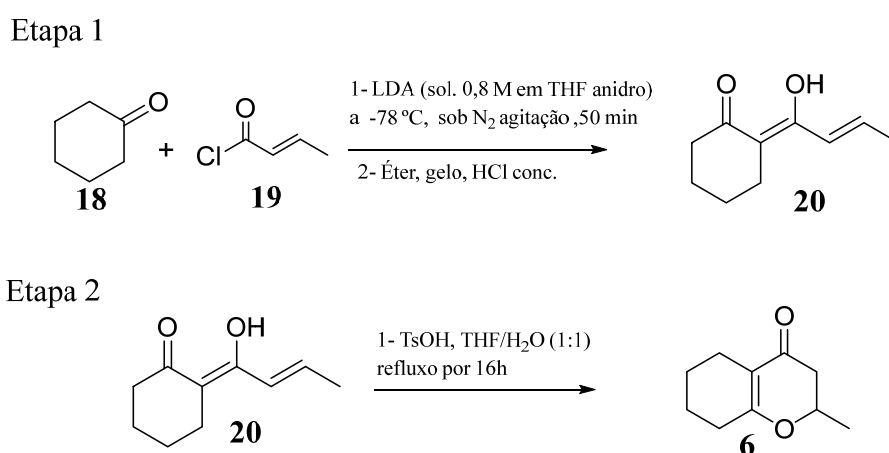
Tabela 1: Principais critérios de seleção de rota de síntese e exemplos de questões potenciais, segundo Ager (2011) – com adaptações²⁷

Critérios	Exemplos de questões potenciais
Segurança	Controle de reações e etapas sintéticas potencialmente perigosas Exposição a substâncias prejudiciais à saúde
Impacto ambiental	Uso de substâncias danosas ao meio ambiente
Legalidade	Observância das regulamentações que controlam o uso de reagentes, solventes e intermediários.
Economia	Cotação dos produtos alvo para o mercado futuro Síntese longa utilizando insumos de alto valor agregado Avaliação dos custos necessários para garantir o desenvolvimento de processo;
Controle de processo	Controle dos parâmetros de qualidade visando atingir as especificações previstas para o IFA
Aumento de escala	Disponibilidade de matérias-primas e outros insumos Planta fabril com equipamentos disponíveis para ampliação de escala

É preciso considerar que, durante a escolha de um processo sintético, podem surgir diferentes conclusões sobre uma determinada rota, uma vez que as forças motrizes subjacentes podem não ser as mesmas. Dessa forma, é salutar que uma avaliação inicial seja realizada por uma equipe multidisciplinar, a fim de que um maior número de pessoas possa fornecer a expertise necessária para a escolha do melhor caminho sintético. Em geral, o resultado final dependerá da complexidade da molécula, do conhecimento do processo, da escala a ser utilizada, dos recursos disponíveis, da filosofia da empresa e da linha de fabricação, pois todos eles têm influências importantes na seleção de rota.²⁷

3.2.3.1. Seleção da rota para a síntese da 6-oxo

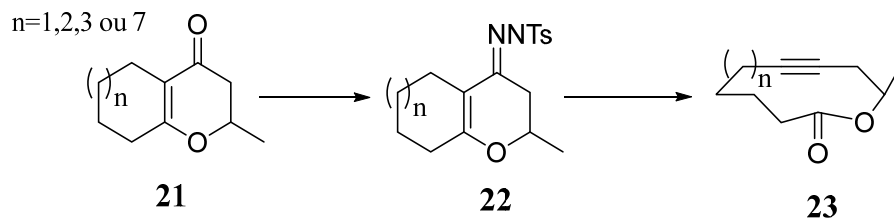
Na escolha de uma rota sintética para a 6-oxo (**6**), foram analisadas duas reações de acilação que apresentaram bons rendimentos. A primeira, publicada em 2009 por MacDonald e Burnell (Esquema 3), apresentou como etapa inicial a acilação da ciclohexanona (**18**) com cloreto de crotonila (**19**) na presença do diisoprilamido de lítio (LDA), gerando como produto intermediário uma 1,3-dicetona- α,β -insaturada (**20**) (isolada na forma enólica), com um rendimento de 68%. Esse produto foi ciclizado com ácido *p*-tolueno sulfônico em THF/H₂O para a formação da 6-oxo (**6**), com o rendimento de 91% (rendimento global: 62 %).²⁹



Esquema 3: Rota sintética da 6-oxo, segundo MacDonald e Burnell (2009), com adaptações.²⁹

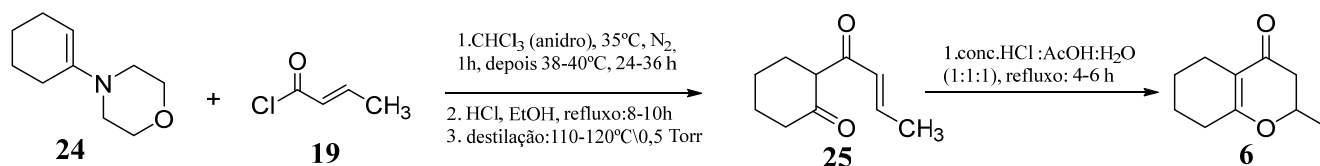
Em uma análise pormenorizada, verificamos que o processo apresenta uma condição experimental de difícil execução em larga escala, pois a reação inicial requer uma temperatura de resfriamento muito baixa (-78°C). Dessa forma, teríamos que dispor de um sistema especial de arrefecimento.^{29,30} Outra alternativa para execução dessa etapa em maior escala seria a troca da base. Contudo, essa hipótese não foi considerada viável, haja vista que os reagentes de bancada mais comuns para essa finalidade, *n*-butil-lítio e hidreto de sódio, raramente são utilizados em larga escala por serem pirofóricos.²⁴

Na busca de uma segunda alternativa, verificamos que Mahajan e Resck (1997) apresentaram uma proposta diferenciada de síntese para a 6-oxo (**6**) durante um trabalho que visava obtenção de lactonas acetilênicas macrocíclicas (**23**) a partir de tosilhidrazonas (**22**) advindas de diferentes oxabicycloalquenonas (**21**) (Esquema 4).³¹



Esquema 4: Esquema simplificado da síntese de lactonas acetilênicas a partir de oxabicycloalquenonas, com adaptações.³¹

Nesse trabalho, eles prepararam a oxabicyclodecenona (6-oxo) pelo procedimento de Gelin e colaboradores³², o qual envolvia a acilação do 1-morfolinociclohexeno (**24**) com cloreto de crotonila (**19**), na presença de trietilamina, seguida por hidrólise ácida, e obtiveram somente 30% do produto desejado. Contudo, promovendo uma etapa adicional de isomerização/ciclização sob condições ácidas (AcOH:H₂O:HCl conc., 1:1:1), eles conseguiram elevar o rendimento para uma faixa de 65-70%.³¹ Em uma análise mais detalhada, verificou-se que o procedimentoⁱⁱ de síntese (Esquema 5) não apresentava etapas complexas para ampliação de escala.³¹ A principal modificação a ser realizada, seria a retirada da etapa de destilação à baixa pressão (0,5 Torr), feita antes da adição da mistura ácida para ciclização/isomerização. Pois sua execução exigiria, entre outros, elevada demanda energética e equipamentos especiais para produção em maiores quantidades.^{24,31}



Esquema 5: Esquema da síntese da 6-oxo (**6**), segundo Mahajan e Resck (1997), com adaptações.³¹

Comparando os processos sintéticos, verificamos que o processo de Mahajan e Resck (1997) apresentava menores entraves para o desenvolvimento de processo. Além disso, seu rendimento global era maior do que o obtido na síntese proposta por MacDonald e Burnell (2009), por isso, ele foi escolhido como base para o desenvolvimento desse trabalho.

ⁱⁱ Esse procedimento será melhor discutido na apresentação do desenvolvimento da síntese.

3.2.4. Perfil de impurezas em IFAs

A identificação e quantificação de impurezas em IFAs é uma atividade importante no âmbito farmacêutico. Haja vista que a segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos podem ser afetadas pela presença de impurezas advindas dos fármacos.³³

A impureza é qualquer componente indesejável presente em um determinado IFA, como por exemplo: solventes, catalisadores, reagentes, entre outros. Diante dessas possibilidades de geração de contaminantes, torna-se fundamental conhecer os diversos aspectos que envolvem a formação e controle das impurezas durante um processo sintético de um IFA.^{33,34}

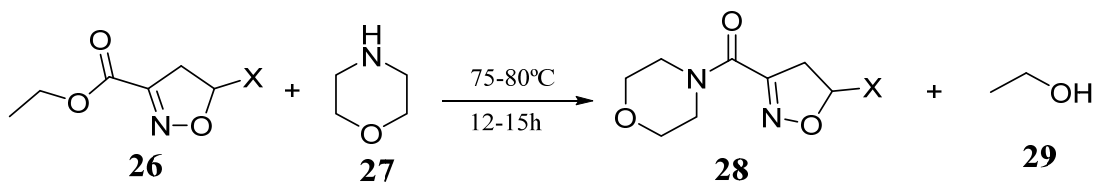
3.2.5. Classificação das impurezas:

Segundo o guia de impurezas em novos fármacos Q3A(R2), da Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para uso Humano (ICH)[‡], as impurezas podem ser classificadas em três categorias: impurezas orgânicas (de processo e produtos relacionados), impurezas inorgânicas e solventes orgânicos residuais.³⁵

3.2.5.1. Impurezas orgânicas

As impurezas orgânicas podem surgir durante o processo de síntese e/ou armazenamento do fármaco em desenvolvimento, podendo ter origem nos materiais de partida, subprodutos, intermediários, produtos de degradação, reagentes, ligantes e catalisadores.³⁵ No trabalho de Sajan e colaboradores, por exemplo, foi detectada a presença de uma impureza orgânica de origem desconhecida durante o desenvolvimento de um potencial fármaco (**28**) (Esquema 6). A grande indagação residia no fato de que a impureza era um trímico (**30**) formado pela união de duas unidades do fármaco com uma unidade de etilendiamina (**32**), sendo que essa diamina não era utilizada na reação. Após análises de amostras de morfolina (**27**) (um dos materiais de partida) por CG-EM, utilizando um método de derivatização com benzaldeído (**31**) para formação de uma diimina (**33**) (Esquema 7) a fim de que pudesse ser quantificada por essa técnica analítica, eles conseguiram comprovar a presença de etilendiamina na morfolina, em quantidade suficiente para formação da impureza no produto final.³³

[‡]O ICH (sigla proveniente do inglês: The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) é uma comissão que reúne as autoridades reguladoras de diversos países e a indústria farmacêutica para discutir aspectos científicos e técnicos do registro de medicamentos. De forma geral, seus guias trazem recomendações que visam alcançar uma maior harmonização na interpretação e aplicação de diretrizes técnicas e requisitos para registro de produtos farmacêuticos.



Esquema 6: Esquema da síntese de um potencial fármaco, segundo Sajan e colaboradores (2015), com adaptações.³³

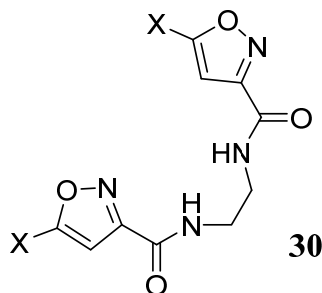
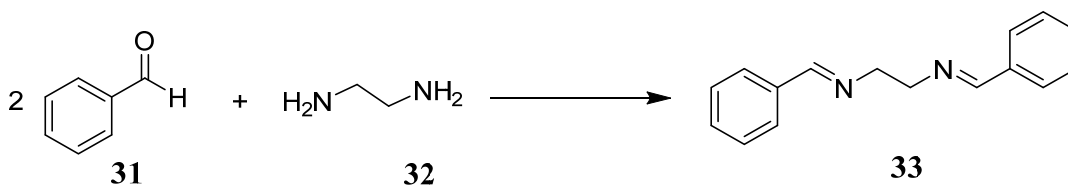


Figura 6: Estrutura molecular da impureza (trímero) segundo Sajan e colaboradores (2015).³³



Esquema 7: Esquema da formação da diimina para detecção de **32**, segundo Sajan e colaboradores (2015).³³

Como observado, é importante a correta descrição do processo de formação de impurezas, para que seja possível identificar sua origem na rota sintética. Nesse sentido, o guia Q3A(R2) do ICH sugere que seja elaborado um relatório descrevendo as impurezas reais e potenciais com maior potencial de serem formadas durante as fases de síntese, purificação e armazenamento de uma nova substância medicamentosa. Este documento deve basear-se em uma avaliação científica sólida das reações químicas envolvidas na síntese e das impurezas associadas a matérias-primas que poderiam contribuir para o perfil de impurezas de uma substância medicamentosa e possíveis produtos de degradação.³⁵

No Brasil, durante o processo de registro de um IFA, é necessário apresentar à Anvisa um fluxograma do processo produtivo com indicação da formação de intermediários e de possíveis impurezas, incluindo a elucidação das respectivas estruturas químicas. Por isso, é fundamental que a empresa possua todos os dados técnicos e científicos envolvidos na formação das impurezas orgânicas durante o desenvolvimento de processo.²¹

3.2.5.2. Impurezas inorgânicas

As impurezas inorgânicas podem ser provenientes das seguintes fontes: reagentes e catalisadores, metais pesados e sais inorgânicos. Em reações catalíticas, por exemplo, a transferência de catalisadores para a nova substância farmacológica deve ser avaliada durante o desenvolvimento, devido à possibilidade de lixiviação do catalisador durante a síntese.³⁵

O guia Q3A(R2) do ICH sugere que a necessidade de inclusão ou exclusão de impurezas inorgânicas na especificação de novos fármacos deve ser discutida.³⁵ No Brasil, as impurezas inorgânicas compõem o rol de substâncias exigidas na descrição do perfil de impurezas de um IFA.²¹

3.2.5.3. Solventes orgânicos residuais

Os solventes residuais são substâncias orgânicas voláteis, utilizadas no processo de síntese de IFA, que não são completamente removidas do produto final durante o processo de fabricação. Essas substâncias não geram benefício terapêutico e, por isso, é importante sua efetiva retirada para que se atenda às especificações de qualidade previstas ao produto.³⁶

A escolha apropriada do solvente para a síntese de um IFA pode aumentar o rendimento ou determinar algumas de suas características, tais como o polimorfismo, a pureza e a solubilidade.³⁶ Contudo, a presença de resíduos de solvente no produto final é indesejada, principalmente por sua toxicidade.³⁷ O guia Q3C(R6) do ICH, denominado: guia para solventes residuais, apresenta uma classificação dos solventes quanto ao risco associado a seu uso, dividindo-os em 3 classes:³⁶

- **Classe 1:** Solventes a serem evitados (conhecidos como carcinogênicos aos humanos, altamente suspeitos de serem carcinogênicos aos humanos e solventes danosos ao meio ambiente);
- **Classe 2:** Solventes de uso limitado (não carcinogênicos a humanos mas possíveis agentes causais de toxicidades irreversíveis tais como neurotoxicidade e teratogenicidade);
- **Classe 3:** Solventes com baixo potencial tóxico (solventes com baixo potencial tóxico a humanos e não necessitam de determinação dos limites de exposição).

O guia apresenta também tabelas contendo os limites de exposição dos solventes para as classes 1 (Tabela 2) e 2 (Tabela 3):³⁶

Tabela 2: Solventes da classe 1 para produtos farmacêuticos.

Solvente	Concentração limite (ppm)	Risco potencial
Benzeno	2	Carcinogênico
Tetracloroeto de carbono	4	Tóxico e nocivo a meio ambiente
1,2-dicloroetano	5	Tóxico
1,1-dicloroetano	8	Tóxico
1,1,1-tricloroetano	1500	Nocivo ao meio ambiente

Tabela 3: Solventes da classe 2 para produtos farmacêuticos.

Solvente	PDE (mg/dia)[§]	Concentração limite (ppm)
Acetonitrila	4,1	410
Clorobenzeno	3,6	360
Clorofórmio	0,6	60
Cumeno	0,7	70
Ciclohexano	38,8	3880
1,2-Dicloroetano	18,7	1870
Diclorometano	6	600
1,2-Dimetoxietano	1	100
N,N-Dimetilacetamida	10,9	1090
N,N-Dimetilformamida	8,8	880
1,4-Dioxano	3,8	380
2-Etoxietanol	1,6	160
Etilenoglicol	6,2	620
Formamida	2,2	220
Hexano	2,9	290
Metanol	30	3000
2-Metoxietanol	0,5	50
Metilbutilcetona	0,5	50
Metilciclohexano	11,8	1180
Metilisobutilcetona	45	4500
N-Metilpirrolidona	5,3	530
Nitrometano	0,5	50
Piridina	2	200
Sulfolano	1,6	160
Tetrahidrofurano	7,2	720
Tetralina	1	100
Tolueno	8,9	890
1,1,2-Tricloroetano	0,8	80
Xileno	21,7	2170

Quanto aos solventes da classe 3^{**}, considera-se que quantidades residuais de 50 mg/dia ou menos (correspondente a 5000 ppm) seria aceitável sem justificativa. Quantidades mais elevadas também podem ser aceitas desde que sejam justificadas realisticamente quanto à capacidade de fabricação e as boas práticas de fabricação (BPF).³⁶

[§] O termo "exposição diária permitida" (PDE), do inglês: "*permitted daily exposure*", é definido pelo guia Q3C(R6) como a ingestão diária aceitável de solventes residuais.³⁶

^{**} Os solventes de classe 3 não apresentam uma tabela especificando a concentração limite. São eles: ácido acético, acetona, anisol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de butila, MTBE, dimetil sulfóxido, etanol, acetato de etila, éter etílico, formiato de etila, ácido fórmico, heptano, acetato de isobutila, acetato de isopropila, acetato de metila, 3-metil-1-butanol, metietilcetona, 2-metil-1-propanol, pentano, 1-pentanol, 2-propanol, acetato de propila e trietilamina.

4. Estudos de degradação forçada (EDF)

Os estudos de degradação forçada (EDF), também conhecidos como testes de estresse, são metodologias de estudo que permitem a geração dos prováveis produtos de degradação de um IFA, por meio da exposição desta substância a agentes de estresse, tais como: luz, temperatura, umidade, substâncias oxidantes, ácidas, básicas entre outros.^{38,39}

Com os dados obtidos nos EDF, é possível desenvolver uma metodologia analítica adequada para avaliação da estabilidade intrínseca do IFA, assim como avaliar suas possíveis rotas de degradação.³⁹

4.1. Objetivos dos EDF

Os EDF são conduzidos visando alcançar os seguintes propósitos:⁴⁰

- Identificar e caracterizar os produtos de degradação formados;
- Estabelecer a diferença entre as impurezas provenientes da degradação do IFA com as impurezas oriundas de outras fontes (p. ex.: impurezas de síntese);
- Estabelecer uma rota de degradação do IFA quando submetido às condições de estresse;
- Auxiliar no estudo de problemas de estabilidade do IFA isolado ou quando estiver em formulação farmacêutica.

4.2. A importância regulatória dos EDF

No âmbito internacional, a necessidade dos EDF tornou-se um requisito regulatório formal no processo de fabricação de IFA no ano de 1993, com a introdução do guia para testes de estabilidade de novos medicamentos e substâncias (Q1A) do ICH.^{41,42}

Apesar deste ser um marco regulatório para os EDF, ele apresentava apenas informações superficiais sobre os principais aspectos a serem abordados durante um estudo de estresse. Um maior detalhamento ocorreu apenas em 2006, com o lançamento do guia do ICH Q3B – Impurezas em medicamentos novos. Esse guia, em sua versão atual, ICH Q3B (R2), aborda vários aspectos importantes para a realização de um EDF, como por exemplo, o racional para elaboração de relatório e controle dos produtos de degradação e a aplicação e validação dos métodos analíticos (melhor detalhado nos guias ICH Q2A e Q2B – guias para validação analítica).⁴³

No Brasil, a necessidade dos EDF para IFA foi regulamentada com a publicação da RDC nº 45, de 9 de agosto de 2012 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esta norma trouxe, em seu artigo 37, a necessidade de testes de degradação forçada incluindo: os efeitos da temperatura, da umidade, da oxidação, da luz e a susceptibilidade à hidrólise em ampla faixa de valores de pH.³⁴

Para os medicamentos, a elaboração do perfil de degradação contendo substâncias ativas sintéticas, deve seguir o disposto na RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015 da ANVISA. De acordo com essa norma é necessário que a amostra seja submetida às seguintes condições: aquecimento; umidade; solução ácida; solução básica; solução oxidante; exposição fotolítica e íons metálicos.³⁹

4.3. Condições para o desenvolvimento dos EDF

Apesar da norma sanitária brasileira apresentar os fatores de estresse a serem aplicados nos EDF, não foram encontradas indicações da quantidade e tempo de exposição para realização destes testes. Isto porque, cada molécula, em função da sua estrutura química, possui um diferente tipo de reatividade frente às condições de estresse. Entretanto, observa-se que em 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu um conjunto de parâmetros mais comuns para estudo de estresse de um IFA, no seu guia para o registro de medicamentos associados de dose fixa. Esses parâmetros, reproduzidos na tabela 4, podem servir como um guia para iniciação dos EDF.⁴⁴

Tabela 4: Condições sugeridas pela OMS no protocolo de estudo de estresse para o desenvolvimento de formas farmacêuticas.⁴⁴

Fator de estresse	Condições	Concentração do IFA ^a	Tempo
Calor	60°C	1:1 com o diluente ^b	1-10 dias
Umidade	75 % UR ou maior	Estado sólido	1-10 dias
Ácido	0,1 M HCl	2:1 em 0,1 M de HCl	1-10 dias
Base	0,1 M NaOH	2:1 em 0,1 M de NaOH	1-10 dias
Oxidação	3% de H ₂ O ₂	1:1 em 3% de H ₂ O ₂	1-3 horas
Fotólise	Lâmpada de haletos metálicos, mercúrio, xenônio ou lâmpada fluorescente UV-B	1:1 com o diluente	1-10 dias
Íons Metálicos (opcional)	0,05 mol/L Fe ²⁺ ou Cu ²⁺	1:1 com a solução de íon metálicos	1-10 dias

^aAo testar a degradabilidade de IFAs combinados, os IFAs devem estar na mesma proporção da forma farmacêutica

^b Em cada caso, o diluente é um excipiente ou todos os excipientes na formulação na mesma proporção como na formulação. Outros índices de diluente também podem ser apropriados, por exemplo, a proporção aproximada em que a droga e os excipientes serão utilizados numa formulação.

É importante destacar que os EDF não devem promover a completa degradação do IFA. O intuito é causar degradação em uma extensão suficiente (normalmente de 10% a 30%) para avaliação dos efeitos do estresse sem descaracterizar a amostra por uma degradação excessiva.^{39††}Essa consideração é importante, pois se a condição de degradação for muito severa, os produtos de degradação podem ser muitos diferentes. Em um estudo de degradação forçada por oxidação, por exemplo, Garg e colaboradores (2010) adicionaram 1 mL de peróxido de hidrogênio (0,3%) a uma solução de fentanila

^{††}Segundo a RDC nº 53/2015, os testes devem promover uma degradação superior a 10% (dez por cento) e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra, comprometendo o teste.

(34) em acetonitrila com concentração de 500 µg/mL. Posteriormente, as amostras foram analisadas por CLAE/EM nos tempos de 0, 2, 4, 6, e 24 h até que cerca de 10% de degradação da amostra fosse alcançada. Os resultados demonstram que houve apenas a formação dos isômeros *cis* (35) e *trans* (36) do n-óxido de fentanila (Figura 7).⁴⁵ Já em um estudo de degradação convencional, Qi et al. (2011), adicionaram 50 mL de uma solução de peróxido de hidrogênio 0,2 mol/L a soluções aquosas de 5 mL de cloridrato de fentanila (10 mg/mL). Em seguida, as amostras foram submetidas a uma agitação na taxa de 1320 rpm por um tempo máximo de 1h, degradando 53% da amostra inicial. Os resultados obtidos pela análise de CG/EM detectaram apenas a presença da *N*-fenilpropanamida.⁴⁶ Mesmo com objetivos e abordagens diferentes, a comparação dos resultados nos permite visualizar a diferença dos produtos gerados na degradação oxidativa de um mesmo substrato pelo mesmo agente oxidante, ratificando a importância da correta definição dos parâmetros dos ensaios de degradação.

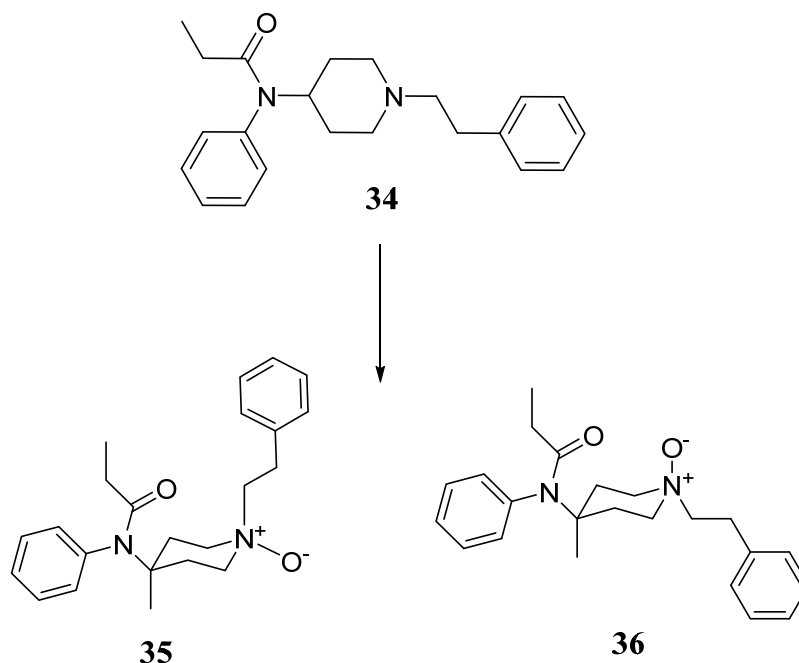


Figura 7: Estruturas propostas para o EDF por oxidação da fentanila (34) realizado por Garg e colaboradores (2010): *cis*-n-óxido de fentanila (35) e *trans*-n-óxido fentanila (36).⁴⁵

4.4. Estratégias para seleção das condições dos EDF e análise dos produtos de degradação

A metodologia de geração e caracterização dos produtos de degradação pode se tornar um exercício árduo, pois a escolha das condições de degradação devem ter a máxima correlação com as condições de estresse encontradas no processo de fabricação, assim como, deve fornecer amostras representativas para o desenvolvimento do estudo de estabilidade do IFA e do produto acabado.^{38,40} Além disso, as técnicas analíticas devem permitir a identificação, quantificação e caracterização de todos

produtos formados. Diante disso, são apresentados alguns passos que podem ser seguidos para obtenção de sucesso na escolha das condições de degradação e análise dos produtos formados:

4.4.1. Coleta de informações sobre as propriedades químicas e físico-químicas da molécula:

Neste primeiro passo devem ser coletadas informações básicas do IFA, tais como, temperatura de fusão e ebulição, pKa e solubilidade em diversos solventes. Essas informações serão muito úteis na definição dos agentes de estresse e na definição das metodologias de análise.^{38,40} A pesquisa em base de dados especializadas, como por exemplo o SciFinder®, pode ser muito útil na definição desse fatores.⁴⁷

4.4.2. Predição do comportamento degradativo

Essa etapa permite identificar os grupos funcionais mais lábeis de um IFA, assim como, as partes menos reativas e os análogos mais estáveis de uma molécula em estudo. Com isso, o analista poderá avaliar um indicador de estabilidade mais eficiente para uma determinada condição de estresse.⁴⁸ Já existem algumas compilações que trazem diversos exemplos de processos degradativos dos IFA, como por exemplo, o livro “Organic Chemistry of Drug Degradation”.⁴⁹ Esses dados podem servir como base para predição do comportamento degradativo por meio de uma avaliação comparativa entre os dados compilados e a estrutura molecular de um IFA.³⁸ Além disso, há o desenvolvimento de ferramentas *in silico*, como por exemplo o Zeneth®, que podem gerar um perfil de degradação de pequenas moléculas antes de uma avaliação experimental. Em um estudo de “Benchmark” dessa ferramenta, Kleimann e colaboradores (2014) avaliaram a formação dos produtos de degradação de 27 pequenas moléculas quando submetidas aos EDF e a estudos de estabilidade. Eles verificaram que, utilizando a base de dados mais atual (2012.2.0) do programa, foi possível identificar 54% (em média) dos produtos de degradação formados, em relação às informações dos EDF fornecidos pelos fabricantes dos IFA.⁴⁸

4.4.3. Separação, identificação e caracterização dos produtos formados

As técnicas cromatográficas são os métodos mais utilizados para separação dos produtos de degradação, dentre elas destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE.^{38,50} Para realizar a identificação e caracterização, utilizam-se técnicas cromatográficas com detectores acoplados (hifenadas), tais como: CG-EM, CL-EM, CL-UV, CL-RMN E CL-EM.⁴⁰ Um exemplo do uso dessas técnicas, pode ser observado no trabalho de Kaushik e colaboradores (2016), no qual foi realizado um EDF do Azilsartan (Figura 8), de acordo com as diretrizes previstas nos guias do ICH, com o objetivo

de identificar e caracterizar os produtos de degradação formados. Por meio da análise de CL-UV, os pesquisadores conseguiram identificar a presença de 4 produtos de degradação formados durante as degradações ácida e básica (Figura 9).⁵¹

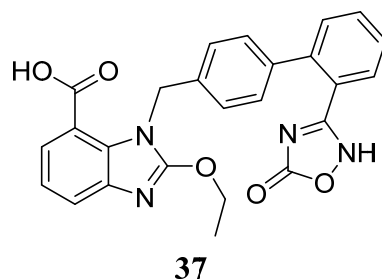


Figura 8: Estrutura molecular do azilzartan (**37**).⁵¹

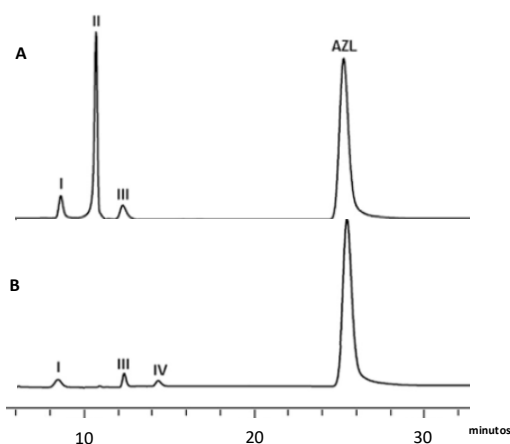
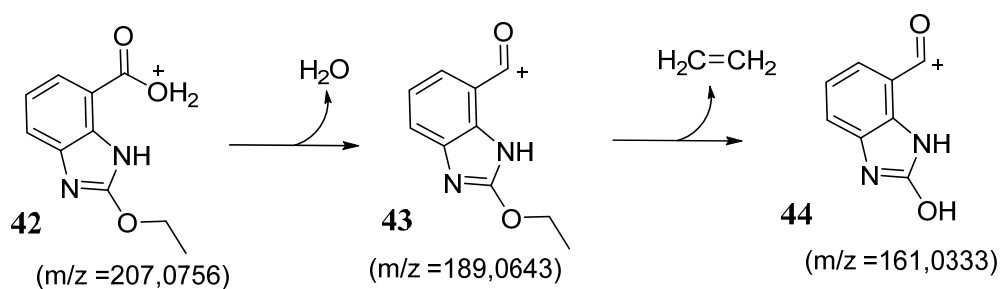
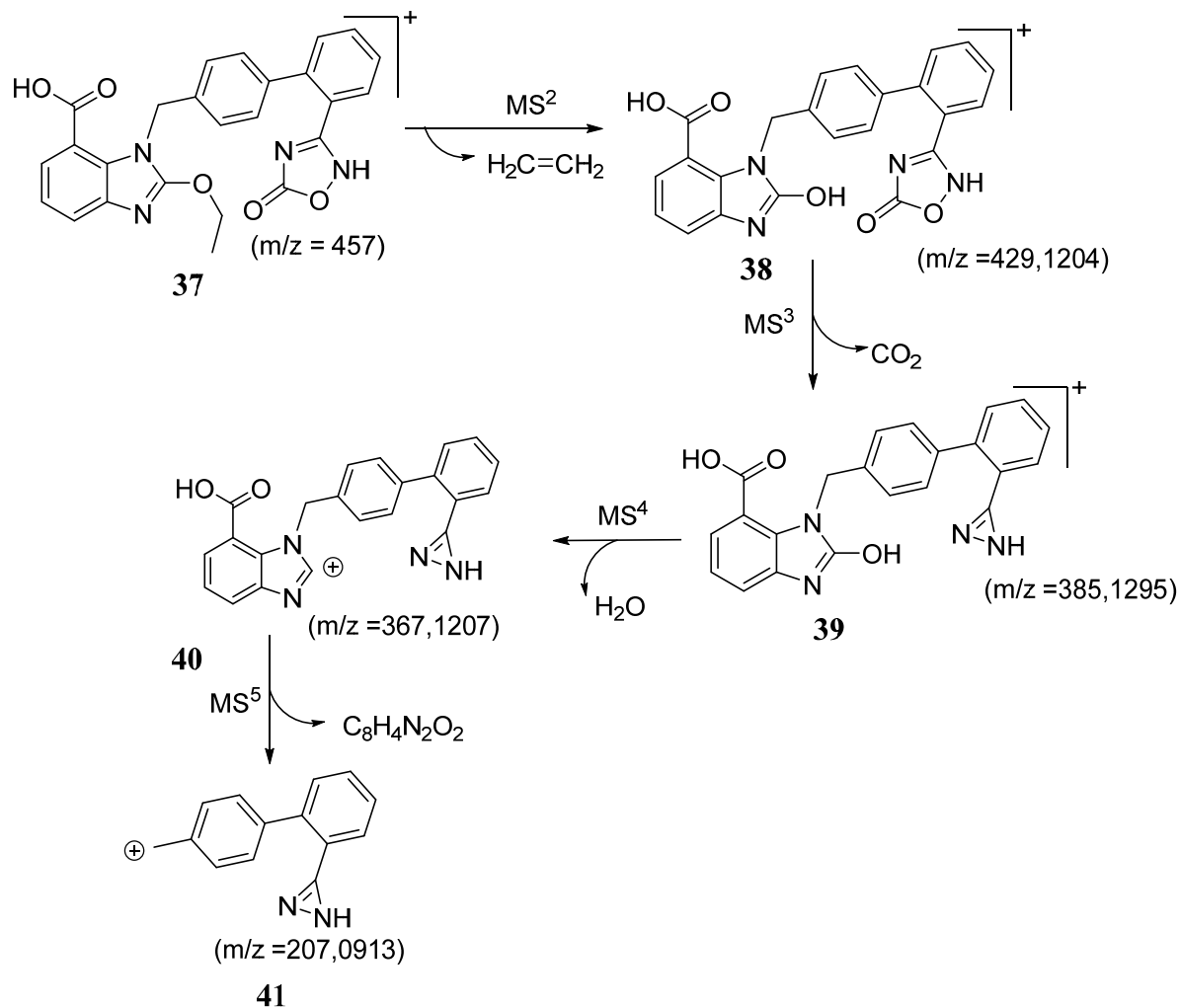


Figura 9: Cromatogramas de CL-UV após o EDF - (A) AZL degradado em HCl 0,1 M e (B) AZL degradado em NaOH 0,1 M, segundo Kaushik e colaboradores 2016, com adaptações.⁵¹

No processo de caracterização, Kaushik e colaboradores utilizaram como técnica analítica a CL-EM-TOF. Os espectros de massa de AZL, de cinco estágios (MS⁵), foram registrados para descrever o padrão de fragmentação da molécula, visando auxiliar a caracterização dos produtos de degradação. Na discussão dos resultados, os autores compararam: o padrão de fragmentação de massas do AZL (**37**) (apresentado parcialmente no esquema 8) e as massas de seus produtos de degradação. Para o produto de degradação I, por exemplo, foi observado seu íon molecular apresentava um sinal m/z 207,0756 (**40**) o que poderia sugerir uma estrutura correlata a um dos produtos de fragmentação do quinto estágio de m/z 207,0913 (**42**). No entanto, por meio da verificação da massa acurada e do padrão de fragmentação do produto de degradação I (esquema 9), os pesquisadores concluíram que se tratava de outra estrutura: o ácido 2-etoxibenzimidazol-7-carboxílico (**41**).⁵¹

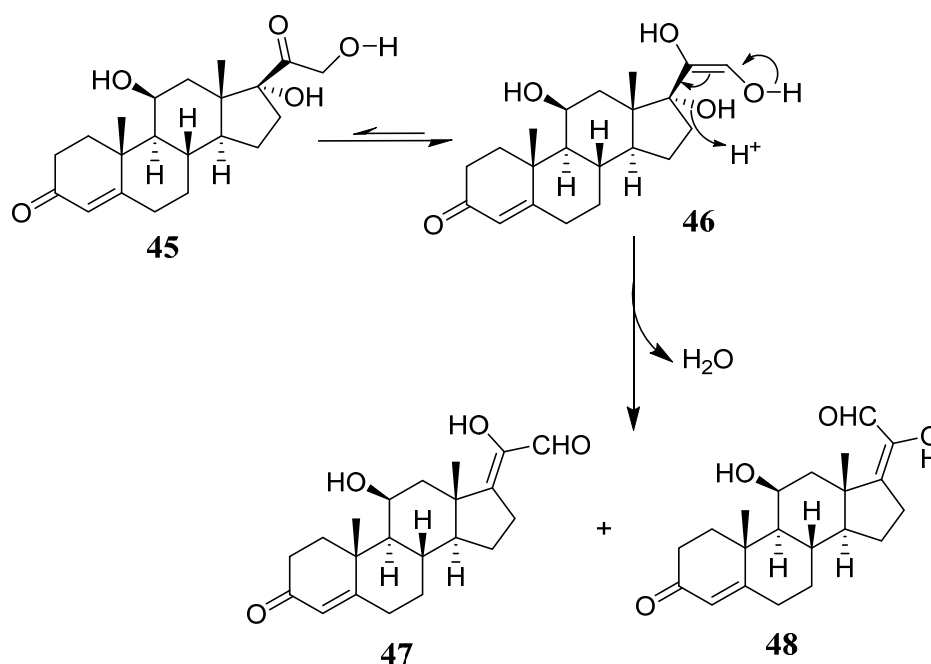
Por último, destaca-se ainda que na elucidação estrutural dos produtos de degradação de um IFA, podem ser utilizadas técnicas adicionais de análise, como por exemplo, a Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ¹H e ¹³C.⁵²



Esquema 9: Proposta de mecanismo de fragmentação produto de degradação I (ácido 2-etoxibenzimidazol-7-carboxílico) (**42**), segundo Kaushik e colaboradores 2016, com adaptações.⁵¹

4.4.4. Proposição de uma rota de degradação

Para um completo entendimento do processo de formação dos produtos de degradação em diversas condições de estresse, é importante a apresentação de uma proposta de rota de degradação que justifique a formação dos produtos. O entendimento dessa rota permite uma completa compreensão dos modelos de degradação a que estão sujeitos a substância em estudo e possivelmente do grupo de substâncias correlatas a ela.^{45,53} Zhang e colaboradores, por exemplo, observaram que 02 produtos de degradação da hidrocortisona (**45**) são isômeros geométricos (**47** e **48**) obtidos por uma rota de degradação idêntica. A rota proposta segue um modelo conhecido como “rearranjo” de corticosteroides com catálise ácida de Mattox (Esquema 10).⁵³



Esquema 10: Rota de degradação da hidrocortisona (**45**) para a formação dos isômeros Z (**47**) e E (**48**).⁵³

5. Polimorfismo

A maioria dos IFA é fornecida aos pacientes na forma sólida em formas farmacêuticas orais, tais como os comprimidos e as cápsulas.^{54,55} Via de regra, essas substâncias são obtidas por processos de cristalização, nos quais as impurezas são rejeitadas na água-mãe e a forma sólida desejada é obtida.⁵⁶ Devido ao polimorfismo, um mesmo fármaco pode cristalizar em formas cristalinas distintas e, com isso, alterar algumas de suas propriedades, tais como: solubilidade, biodisponibilidade, higroscopicidade, compressibilidade, entre outros.⁵⁴ Nesse cenário, observa-se que a compreensão dos fatores que envolvem a formação e caracterização dos polimorfos torna-se importante no processo de desenvolvimento de um IFA, pois a produção de um polimorfo indesejado, pode influenciar na qualidade, segurança e eficácia do produto final.⁵⁵

5.1. Tipos de apresentações do estado sólido

5.1.1. Formas cristalinas e formas amorfas

Os IFA podem se apresentar, quando em estado sólido, nas formas cristalinas ou amorfas. Os sólidos cristalinos possuem um arranjo periódico dos seus átomos, íons ou moléculas, constituído por celas unitárias que se repetem de forma translacional (Figura 10). As células unitárias são caracterizadas por seis parâmetros de rede: três eixos cristalográficos (a , b e c) e três ângulos formados por esses eixos (α , β e γ). A combinação desses parâmetros forma diferentes tamanhos de células unitárias, as quais podem ser agrupadas em setes tipos básicos de arranjos: cúbico, tetragonal, ortorrômbo, hexagonal, monoclinico, triclinico e romboédrico (trigonal) (Figura 11).^{57,58} Além disso, existem quatro tipos celas bravais:

- Primitiva (p) – todos as unidades estruturais estão nos vértices da cela unitária;
- Centrada (I)- as unidades estruturais estão nos vértices e também no centro da cela unitária;
- Base centrada (C) – as unidades estruturais ocupam os vértices e também o centro de uma das faces e;
- Face centrada (F) – Além dos vértices, há unidades estruturais no centro de todas as faces da cela unitária.

A combinação dos sete sistemas cristalinos com os quatro tipos de celas bravais dão origem a somente quatorze tipos de retículos cristalinos, especificados na Tabela 5.⁵⁸

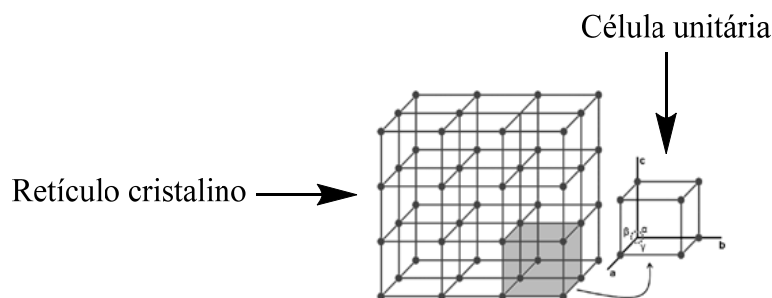


Figura 10: Representação esquemática do retículo cristalino e da célula unitária.⁵⁷

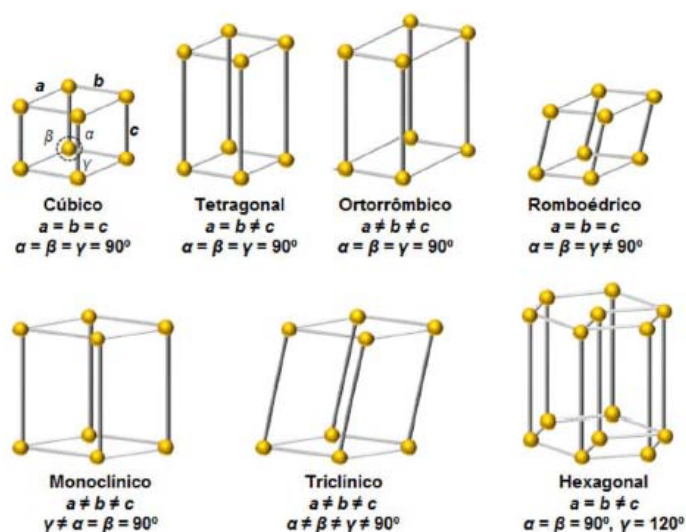


Figura 11: Representação dos sete tipos de sistemas cristalinos (redes bravais).⁵⁷

Tabela 5: Combinação dos sistemas cristalinos com as células bravais.⁵⁸

Sistema Cristalino	Primitiva (P)	Centrada (I)	Base centrada (C)	Face Centrada (F)
Cúbico	X	X		X
Hexagonal	X			
Tetragonal	X	X		
Romboédrico	X			
Ortorrômbico	X	X	X	X
Monoclínico	X		X	
Triclínico	X			

Os sólidos amorfos não apresentam uma ordenação espacial à longa distância. Quando comparados aos sólidos cristalinos, tendem a ser mais energéticos e, por isso, normalmente apresentam maiores solubilidade e taxas de dissolução.⁵⁷ Nessa perspectiva, Choi e colaboradores apresentaram um estudo para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade do itraconazol, um fármaco de baixíssima solubilidade. Na formulação final, eles obtiveram um sólido no estado amorfo que, após testes em ratos,

apresentou uma biodisponibilidade cerca de oito vezes em relação ao maior em relação ao itraconazol cristalino (Figura 12).⁵⁹ Apesar de o exemplo citado ter apresentado um bom resultado quanto à biodisponibilidade, é preciso lembrar que os sólidos amorfos apresentam menor estabilidade química e física, o que leva a uma menor utilização em formulações devido a sua tendência a cristalização e/ou degradação.⁵⁷

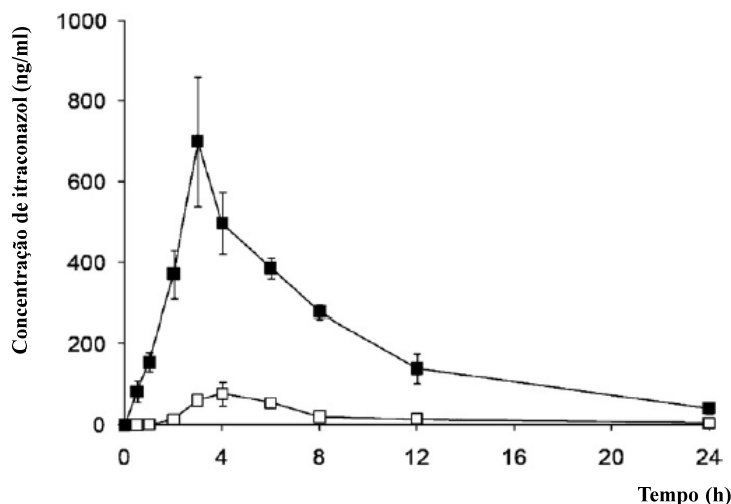


Figura 12: Perfis de concentração plasmática por tempo da droga após a administração oral do itraconazol pó (□) e da emulsão sólida (■) na dose de 10mg/kg de itraconazol em ratos. Cada valor representa a média ± D.P. (n=6), segundo Choi e colaboradores (2012), com adaptações.⁵⁹

5.1.2. Sólidos formados por multicomponentes

Além das formas cristalinas e amórficas, podem se apresentar também nas formas de solvatos, sais e cocrystalis (Figura 13).⁵⁷

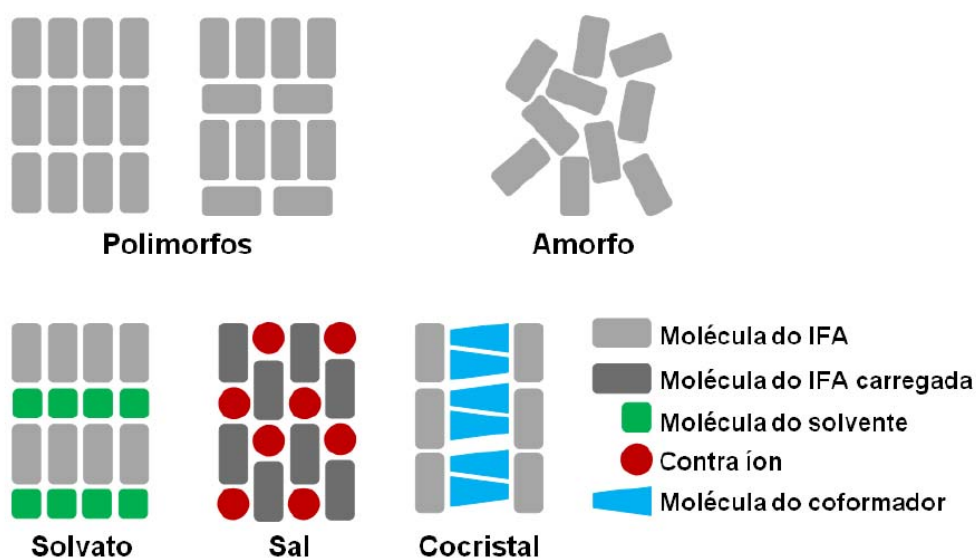


Figura 13: Representação esquemática dos vários tipos de formas sólidas.⁵⁷

Os solvatos são formados por moléculas do solvente agregadas à rede cristalina por meio de interações supramoleculares. Os solventes podem ser aprisionados fisicamente pelo cristal ou absorvidos por regiões desordenadas do cristal. Quando o solvente incorporado à rede cristalina do IFA for a água, o sólido é denominado de hidrato. É importante observar que alguns autores consideram os solvatos e os hidratos como pseudopolimorfos, tendo em vista que muitos deles são formados durante o processo de cristalização.⁶⁰

Os sais são formados por meio de processos de cristalização dos IFAs com ácidos e bases, nos quais ocorre uma transferência de carga (contra íon) dessas substâncias para o produto final.⁶⁰

Os cocristais são materiais sólidos com uma única fase cristalina formados por dois ou mais compostos iônicos e/ou moleculares, geralmente em proporção estequiométrica, os quais não são solvatos ou sais simples.⁶¹

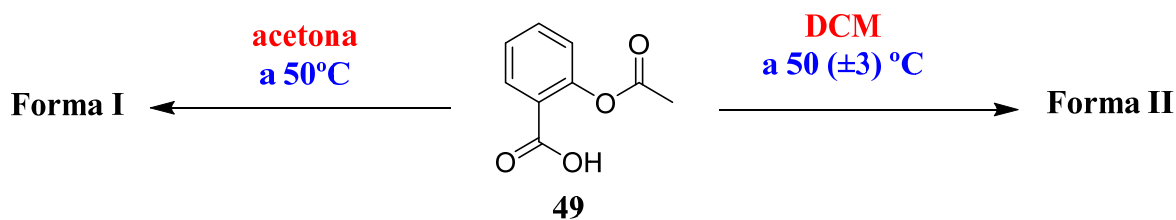
O uso de sistemas multicomponentes em IFA, especialmente os cocristais, tem se apresentado como uma estratégia efetiva para a resolução de problemas durante o processamento do fármaco na fabricação de medicamentos.⁶² Karki e colaboradores (2009), por exemplo, demonstraram uma melhoria na compressibilidade do paracetamol na fase I (polimorfo monoclinico) por meio de formação de cocristais desse IFA com outras substâncias orgânicas (figura 14).^{62,63,64}



Figura 14: Micrografias de comprimidos feitos de: a) paracetamol na forma I, b) cocrystal paracetamol + teofilina, c) cocrystal paracetamol + naftaleno e d) cocrystal paracetamol + ácido oxálico. O comprimido (a) apresenta má formação devido a um empacotamento inapropriado das moléculas da rede cristalina do IFA, enquanto que as estruturas nos cocristais são passíveis de deformação durante a formação dos comprimidos.^{62,63}

5.2. Fatores que influenciam na preparação de Formas Cristalinas

No processo de preparação de sólidos, diversas metodologias podem ser utilizadas para obtenção de diferentes polimorfos de um IFA, tais como: cristalização a partir de um solvente ou misturas de solventes, alteração do pH da solução, secagem, moagem, etc. De forma geral, um grande número de experimentos é realizado, variando-se parâmetros como, solvente, concentração, temperatura, taxa de resfriamento, entre outros.⁵⁷ Bag e colaboradores, por exemplo, relataram em seu trabalho a preparação seletiva das formas I e II do ácido acetil salicílico (49), a partir de uma mesma amostra comercial, ao otimizar condições de solvente e temperatura, usando o método de evaporação rápida, sem a adição ou aumento no níveis do anidrido de aspirina (Esquema 11).⁶⁵



Esquema 11: Esquema de formação dos polimorfos I e II da aspirina (49) a partir de soluções de aspirina em acetona (a 50 °C) e diclorometano (a 5 °C), respectivamente.⁶⁵

A cristalização a partir de soluções é a metodologia mais utilizada na síntese de IFAs. Sua primeira etapa, denominada nucleação, envolve a formação dos primeiros cristais em uma solução supersaturada, dando início à separação de fases. A relação entre a supersaturação e a cristalização leva a uma representação da zona metaestável, representada em um gráfico de solubilidade/supersolubilidade (Figura 15), onde a nucleação espontânea não ocorre, sendo necessário, por exemplo, a adição de sementes (cristal na forma desejada) para que ocorra a cristalização.⁵⁷

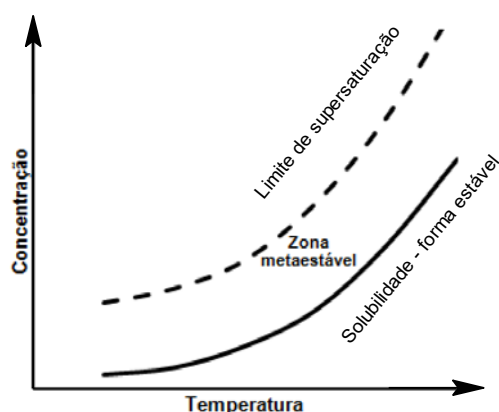


Figura 15: Representação gráfica da zona metaestável, segundo Prado e Rocha (2015), com adaptações.⁵⁷

A segunda etapa envolve o processo de crescimento dos cristais, sendo que sua taxa de crescimento depende das condições experimentais utilizadas, como por exemplo, taxa de resfriamento, taxa de agitação, velocidade de remoção do solvente e pH. Além disso, distintas taxas de crescimento podem gerar cristais morfologicamente diferentes alterando o processo de formação do produto desejado.⁵⁷

5.3. Caracterização e Avaliação de Formas Cristalinas

Diversos métodos podem ser empregados para a identificação e caracterização de polimorfos, tais como os cristalográficos, espectroscópicos, térmicos e microscópicos. As técnicas analíticas

comumente utilizadas para caracterização de polimorfos incluem: Difração de raios X de pó - PXRD, difração de raios X de monocristal, calorimetria diferencial exploratória, termogravimetria, espectrometria no IV próximo, médio, distante (Tera Hertz) e Raman, ressonância magnética no estado sólido, microscopia de luz polarizada, microscopia eletrônica de varredura e termomicroscopia. A tabela 6 apresenta as principais características de algumas dessas técnicas.⁵⁷

Tabela 6: Principais características de algumas técnicas analíticas utilizadas na caracterização de polimorfos: Difração de raios X de pó, difração de raios X de monocristal, calorimetria diferencial exploratória e termogravimetria.⁵⁷

Técnica Analítica	Informações	Vantagens	Desvantagens/Dificuldades
Difração de raios X de (PXRD)	- Informação estrutural - Picos de difração únicos para formas cristalinas - Halo para amorfo	- Não destrutível - Análise quali- e quantitativa	- Orientação preferencial
Difração de raios X monocristal	- Informação estrutural - Resolução de estruturas cristalinas	- Não destrutível	- Requer um monocristal de boa qualidade
Calorimetria exploratória (DSC)	- Temperatura de transição vítrea de cristalização e de fusão, capacidade calorífica, calor cristalização - Interações IFA-IFA IFA-excipiente	- Pequena quantidade de amostra - Análise quali e quantitativa	- Destrutível
Termogravimetria	- Transições envolvendo ganho ou perda de massa	- Pequena quantidade de amostra - Análise quantitativa	- Destrutível

O padrão de difração de Raios X de pó (PXRD) é considerado como *gold standard* para a obtenção de informações sobre a estrutura cristalina (impressão digital cristalina) para pequenas moléculas orgânicas. Porém, em alguns casos, não é possível diferenciar diferentes fases no estado sólido. Um exemplo de limitação da técnica pode ser visto em um trabalho de Karpinski (2006). Nesse trabalho, ele analisa, por PXRD, a estrutura cristalina de diferentes solvatos de sais de malonato de um

determinado IFA. Os resultados obtidos demonstram que os padrões de PXRD são claramente indistinguíveis, impedindo a diferenciação dos diferentes solvatos sintetizados (figura 16).⁶⁶

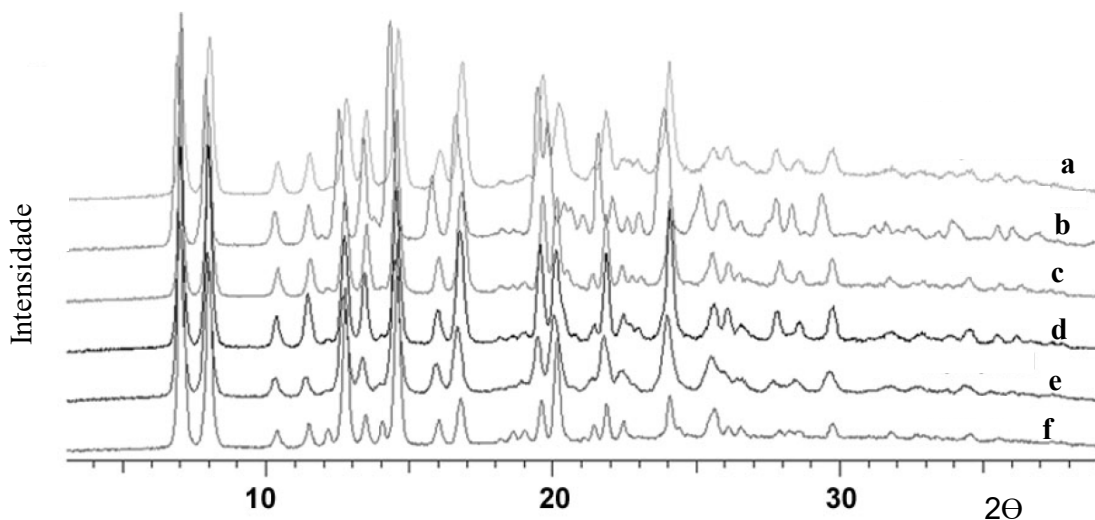


Figura 16: Padrões de PXRD para os diferentes solvatos de sais de malonato do IFA6. De cima para baixo: a- Tetrahydrofurano + acetato de etila, b - tetrahydrofurano, c - acetato de etila, d – acetona, e – propano-2-ol e f – etanol, segundo Karpinski (2006), com adaptações.⁶⁶

A avaliação por cristalografia de raios-X de monocristal fornece um parecer final para identificação das fases cristalinas, pois permitem obter dados sobre o empacotamento, a conformação das moléculas e suas interações. Contudo, a necessidade de obtenção de monocristais com elevada qualidade pode dificultar sua execução.⁵⁷

O uso de outras técnicas vai depender basicamente das características que se quer observar no IFA produzido. Nesse sentido, é importante observar que apesar do grande número de técnicas para identificação e caracterização de polimorfos, geralmente uma ou duas são utilizadas rotineiramente no controle de qualidade de um IFA.⁵⁷

6. Resultados e Discussão

6.1. Síntese dos materiais de partida

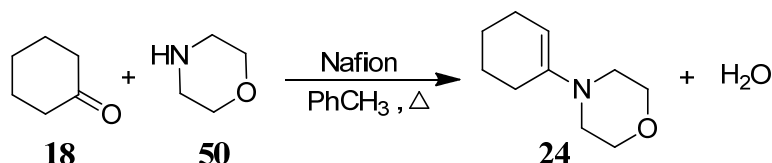
Segundo a RDC nº. 69/2014 da ANVISA, entende-se como material de partida uma substância química utilizada na produção de um insumo farmacêutico ativo, que é normalmente incorporada como importante fragmento estrutural ao IFA. Segundo essa norma, é importante que sua estrutura química, propriedades e características físicas e químicas, assim como o perfil de impurezas estejam bem definidos.²⁰

Considerando a metodologia de síntese (vide item 3.2.3.1), escolhemos como materiais de partida: a enamina (nome químico: 4-(ciclohex-1-en-1-il)morfolina, comumente conhecida como 1-morfolinociclohexeno (**24**), e o ácido crotônico (**51**) (ácido (E)-but-2-noico). Pois ambas as substâncias contribuem estruturalmente na formação do produto final. Além disso, foi realizada a caracterização do cloreto ácido (**19**) (cloreto (E)-but-2-enoila), conhecido comumente como cloreto de crotonila, pois essa substância é um dos reagentes iniciais da síntese da 6-oxo.

Apesar de todas as substâncias serem disponíveis comercialmente, optamos por realizar a síntese da enamina e do cloreto ácido, com o intuito de conhecer os fatores que possam influenciar nas especificações de impurezas destes insumos.

6.1.1. 1-morfolino-ciclohexeno (MCE)

A síntese da 1-morfolino-ciclohexeno (MCE) (**24**) utilizada nesse trabalho foi baseada no processo descrito por Hünig e colaboradores.⁶⁷ Esse procedimento consiste na reação da ciclohexanona (**18**) com a morfolina (**50**), na presença de um catalisador ácido, utilizando tolueno como solvente (Esquema 12). Contudo, em vez de usar o ácido p-tolueno sulfônico como catalisador ácido, foi utilizado um fluoropolímero em estado sólido, contendo grupos ácidos do tipo -SO₃H, denominado Nafion® (figura 17).⁶⁸ Esse catalisador, além possuir boa estabilidade química, é insolúvel em tolueno e em meio aquoso, o que facilita sua remoção durante o processo.⁶⁹



Esquema 12: Rota de síntese da 1-morfolino-ciclohexeno.

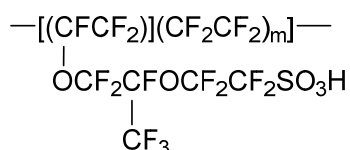


Figura 17: Estrutura do polímero sulfonado Nafion®.⁶⁸

6.1.1.1.1. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Na análise do cromatograma, obtido por CG-EM (Figura 18), nota-se que há um pico em 9,75 minutos (c) correspondente a enamina, e outros dois em 5,05 minutos (b) e 3,60 minutos (a), que foram atribuídos a ciclohexanona e à morfolina, respectivamente. As três substâncias foram identificadas pelos valores dos seus íons moleculares. Além disso, realizou-se a comparação de seus padrões de fragmentação (figuras 19, 20 e 21) com a base de dados do NIST^{††} instalada no *software* do cromatógrafo gasoso (*Lab solution* versão 1.01).

O cálculo da área percentual demonstrou que a MCE apresenta uma pureza aproximada de 95,0 %. Contudo, entendemos que ela pode ser maior, pois parte da MCE pode ter sido hidrolisada durante a análise.

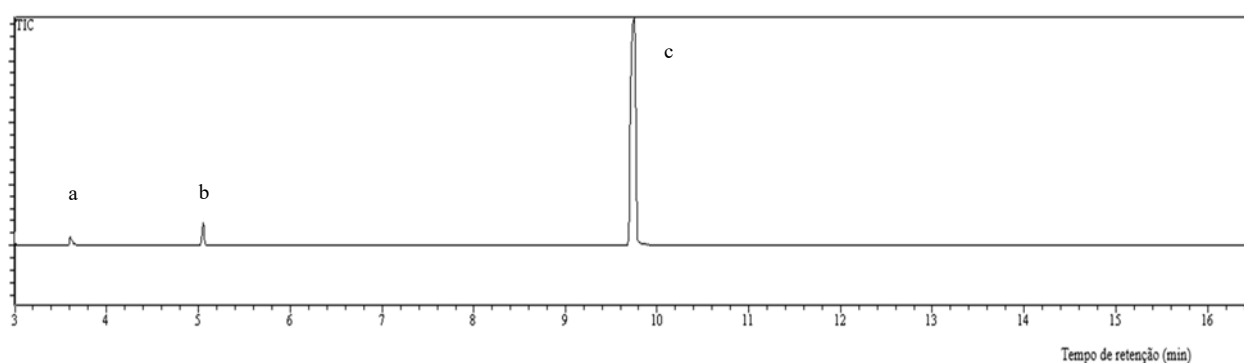


Figura 18: Cromatograma por CG-EM: (a) morfolina; (b) ciclohexanona e (c) MCE.

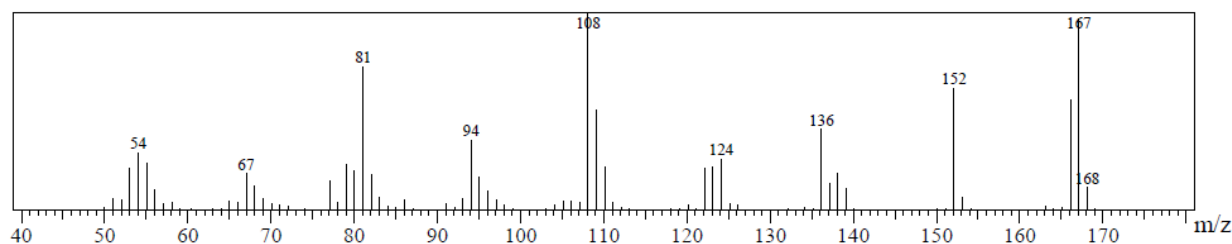


Figura 19: Espectro de massa por impacto de elétrons da MCE.

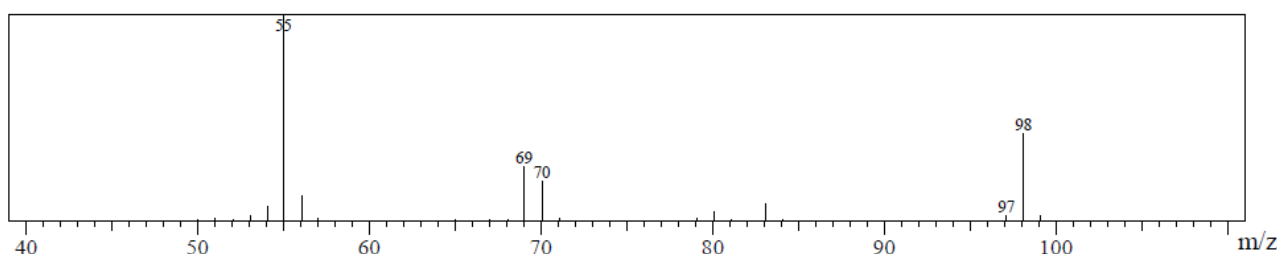


Figura 20: Espectro de massa por impacto de elétrons da ciclohexanona.

^{††} Wiley Registry 9th Edition/NIST (National Institute of Standards and Technology) 2008 Mass Spectral Library

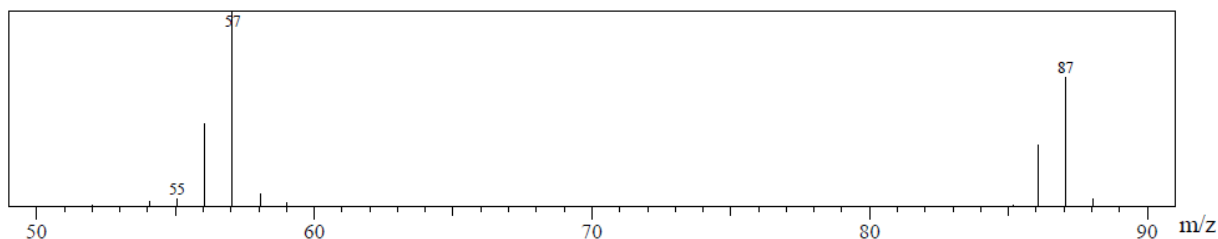


Figura 21: Espectro de massa por impacto de elétrons da morfolina.

6.1.1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Nos dados espectroscópicos de RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 (Figura 22), podemos notar a presença de dois multipletos, nas regiões em 1,53 a 1,58 ppm e 1,65 a 1,71 ppm, ambos integrados para 2 hidrogênios, que foram atribuídos aos grupos metileno mais blindados da molécula (posições 1 e 2). Na região entre 2,02 e 2,10 ppm, observamos a presença de um multipletto, integrado para 4 hidrogênios, atribuído aos metilenos alílicos (posições 3 e 6). O próximo multipletto, na região de 2,72 a 2,81 ppm, integrado para 4 hidrogênios, foi atribuído aos metilenos vicinais ao nitrogênio (posições 8 e 12). Os dois grupos metilenos mais desblindados, vizinhos ao oxigênio, apresentam-se como um multipletto localizado na região de 3,71 a 3,75 ppm. Por último, o multipletto de campo mais baixo (4,66 a 4,69 ppm) foi atribuído ao hidrogênio vinílico na posição 5.

Os outros sinais no espectro foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos metileno da morfolina (entre 2,8 e 3,7 ppm) e da ciclohexanona (entre 1,7 e 2,4 ppm), impurezas presentes na amostra.

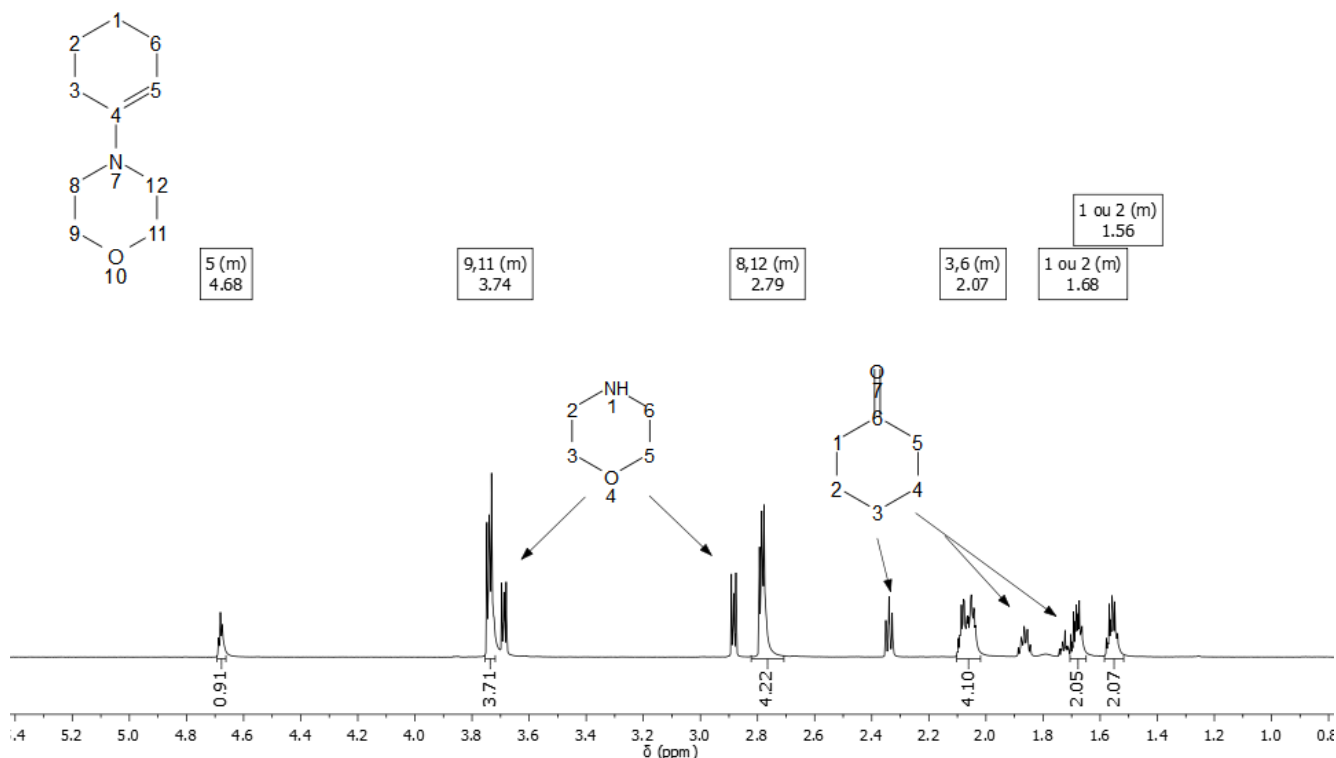


Figura 22: Espectro (RMN ^1H , 600 MHz, CDCl_3) da 1-morfolinociclohexeno (MCE).

6.1.2. Ácido Crotônico (ácido (E)-but-2-enoico)

O ácido crotônico (**51**) foi obtido comercialmente e caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C . Além disso, utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para avaliar a presença de impurezas.

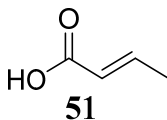


Figura 23: Estrutura molecular do ácido crotônico.

6.1.2.1.1. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Na análise do cromatograma, obtido por CG-EM (Figura 24), nota-se que há apenas um pico em 4,4 minutos, correspondente ao ácido crotônico, segundo o espectro de massas na Figura 25. Contudo, observa-se que a amostra apresentou um pico muito largo, o que foi atribuído a elevada polaridade da molécula. Sendo assim, optou-se por fazer um processo de derivatização, visando melhorar suas propriedades cromatográficas e identificar a presença de impurezas na amostra.⁷⁰

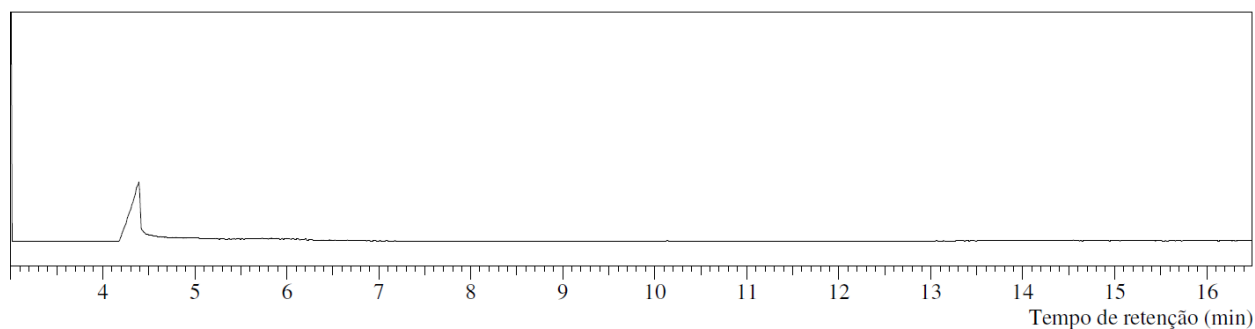


Figura 24: Cromatograma por CG-EM do ácido crotônico (AC).

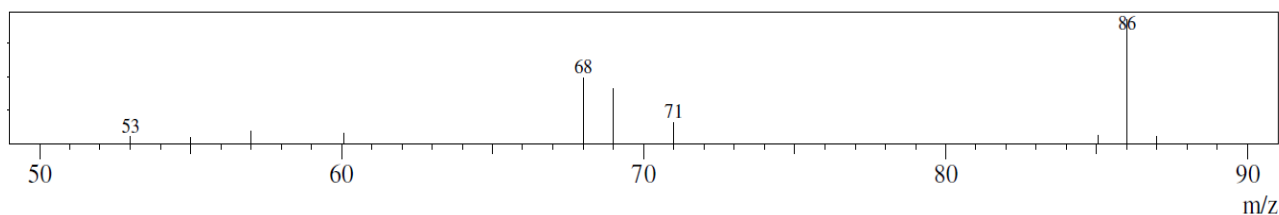


Figura 25: Espectro de massas por impacto de elétrons do ácido crotônico.

De forma geral, a derivatização usualmente é feita por substituições na função polar da molécula, onde as reações mais comuns são a alquilação, acilação e a sililação.⁷⁰ Neste trabalho, utilizou-se um agente de sililação denominado: N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida – BSTFA^{§§} (Figura 26).

^{§§} Reagente para derivatização por CG adquirido na empresa Sigma Aldrich - lote: BCBX5504, pureza: 99,6 %

Contudo, antes dos testes iniciais, realizou-se a análise do BSTFA por CG-EM, utilizando-se acetonitrila como solvente. Os resultados mostraram dois picos (Figura 27): o primeiro em 4,4 min (97,1 %), atribuído ao BSTFA (vide espectro de massas, Figura 28, letra a) e o segundo em 4,6 min (2,9 %), atribuído a um componente não identificado presente no reagente derivatizante (m/z 159, Figura 28, letra b). Apesar disso, o reagente foi utilizado nos testes de derivatização do ácido crotônico.

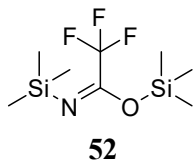


Figura 26: Estrutura molecular do BSTFA (**52**).

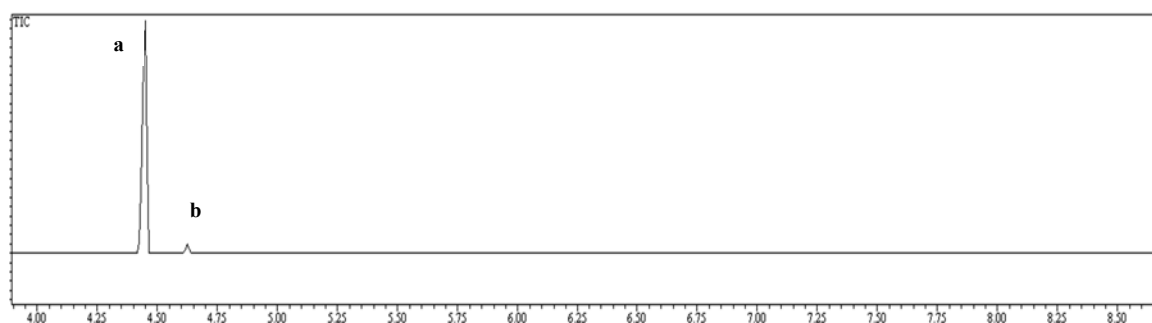


Figura 27: Cromatograma por CG-EM do BSTFA (**a**- BSTFA e **b**- componente desconhecido).

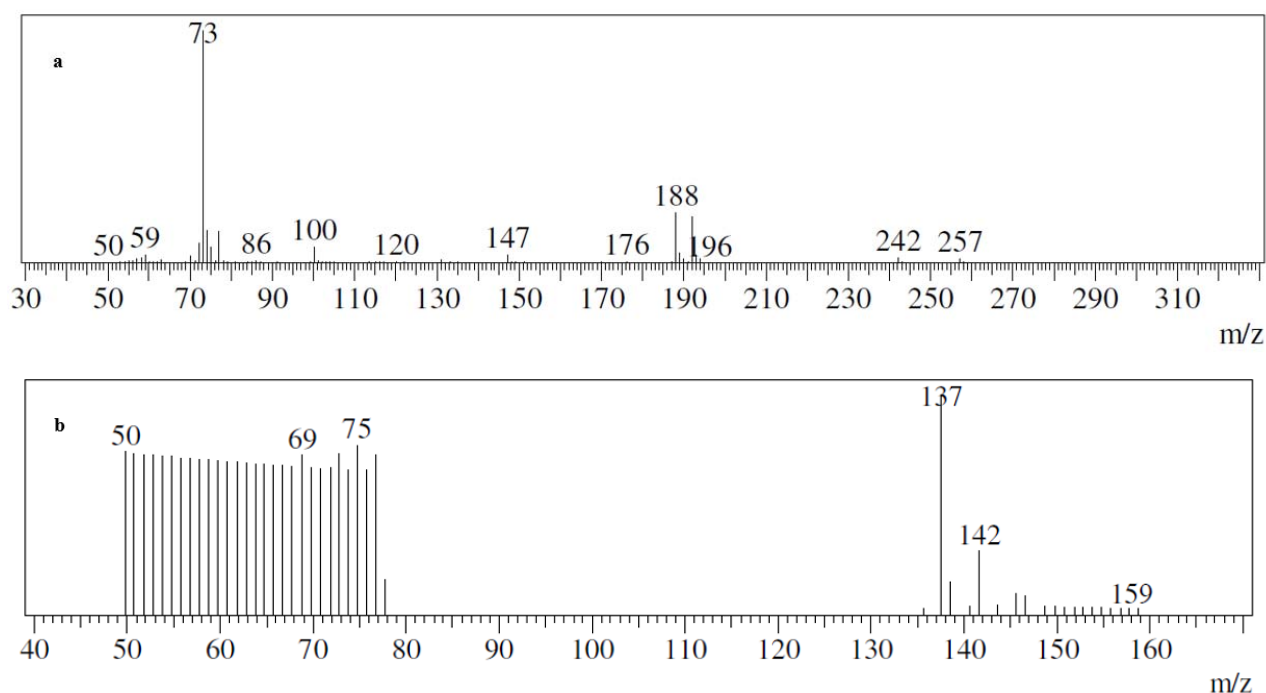


Figura 28: Espectro de massas por impacto de elétrons: **a** – BSTFA e **b** – componente não identificado.

Nos testes iniciais, foram preparadas soluções supersaturadas de ácido crotônico em BSTFA. Tais soluções foram submetidas à centrifugação (1400 rpm) por 10 minutos. Logo após uma alíquota do sobrenadante foi dissolvida em acetonitrila e analisada por CG-EM. Os resultados mostraram apenas os picos dos reagentes iniciais, indicando que não houve reação (figura 29).

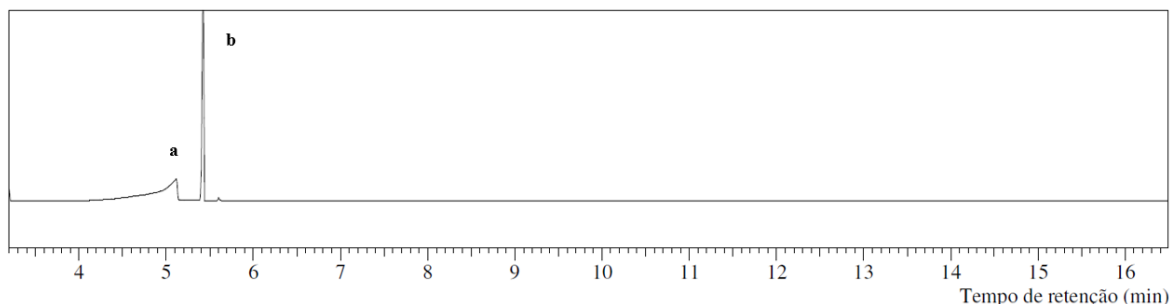


Figura 29: Cromatograma por CG-EM: **a**-ácido crotônico e **b**- BSTFA.

Considerando que o BSTFA pode formar trialquilsilil derivados em condições moderadas de reação⁷¹, dissolveu-se uma pequena quantidade de ácido crotônico (1 mg) em 4 mL de BSTFA, visando derivatizar toda a massa de ácido crotônico. A reação foi mantida a 60 °C, em frasco Schlenk, por 1h. Depois, a solução foi transferida para um frasco Eppendorf e submetida à centrifugação (1400 rpm) por 10 minutos. Observou-se que ao final da centrifugação não havia qualquer sólido decantado na amostra. Para avaliar a efetividade da derivatização, uma alíquota do produto foi diluída em acetonitrila e analisada por CG-EM.

Segundo a literatura consultada, o resultado esperado nas reações de sililação de ácidos carboxílicos é a substituição do hidrogênio lábil pelo grupo trimetilsilil.^{70,71} No cromatograma da amostra derivatizada (Figura 30) observa-se que, além do pico do BSTFA e de seu componente desconhecido, há apenas um pico em 5,7 minutos, com m/z 158 (Figura 31). Esse sinal foi atribuído ao composto trimetilsilil (*E*)-but-2-enoato (Figura 32), demonstrando que a derivatização foi efetiva. Além disso, não foi possível identificar outras impurezas na amostra.

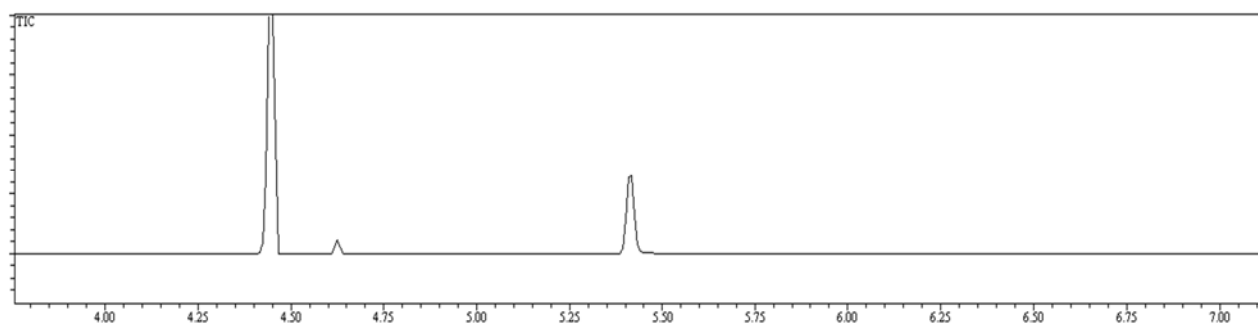


Figura 30: Cromatograma por CG-EM do AC derivatizado com BSTFA: **a**- BSTFA (4,4 min.), **b**- componente desconhecido do BSTFA (4,6 min) e **c** – produto derivatizado (5,7 min.).

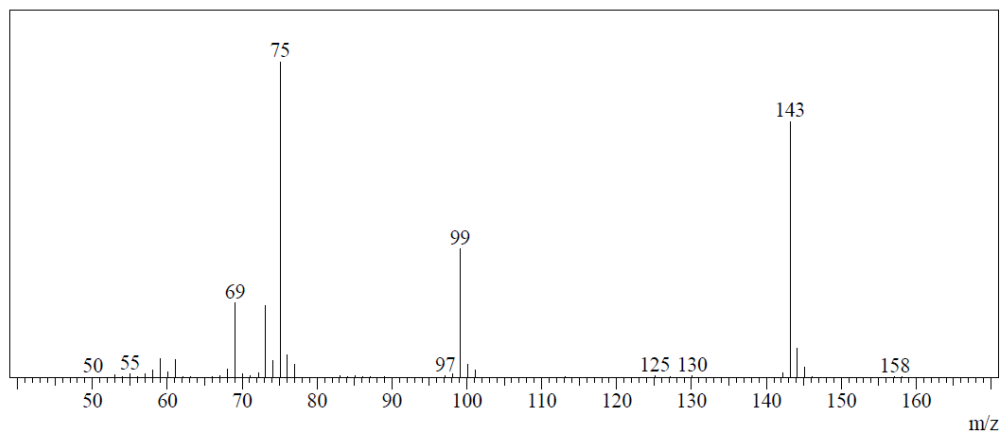


Figura 31: Espectro de massas por impacto de elétrons do derivado do ácido crotonico (m/z 158).

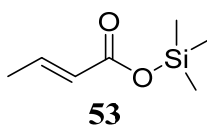


Figura 32: Estrutura molecular da substância trimetilsilil (E)-but-2-enoato.

6.1.2.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Nos dados espectroscópicos de RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 (Figura 33), observa-se em 1,92 ppm a presença de duplo duplete ($J = 6,9$ e $1,8$ Hz), integrado para 3 hidrogênios, referente ao acoplamento do grupo metila com os hidrogênios da dupla ligação. Em 5,86 ppm, observa-se um duplo quarteto (dq, $J = 15,5$ e $1,7$ Hz) referente aos acoplamentos do grupo CH, vicinal à carbonila, com hidrogênio na posição *trans* (3J) e com grupo metila (4J). Por último, nota-se outro duplo quarteto em 7,1 ppm referente aos acoplamentos do grupo CH, na posição 2, com o grupo metila (3J) e com o grupo CH (4J) na posição 3.

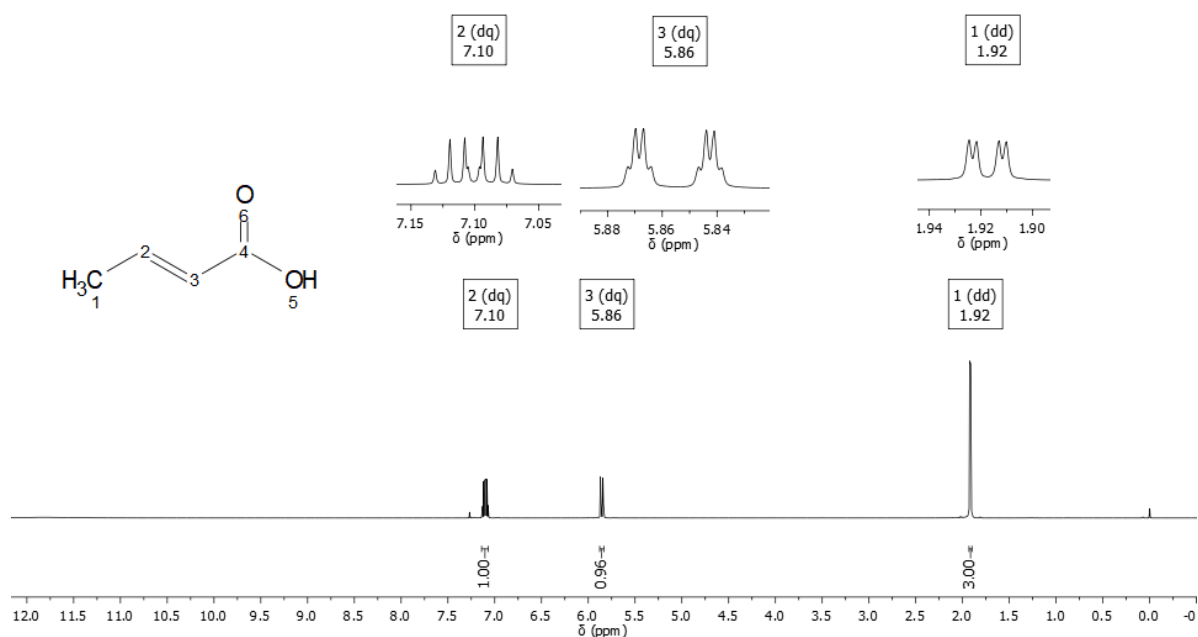


Figura 33: Espectro (RMN ^1H , 600 MHz, CDCl_3) do ácido crotonico (AC).

6.1.2.1.3. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ¹³C)

Nos dados espectroscópicos de RMN ¹³C a 151 MHz em CDCl₃ do ácido crotônico (Figura 34), são observados todos os sinais esperados para a molécula. Em δ=172,4 ppm tem-se um sinal relativo ao carbono da carbonila. Em δ=147,5 e 122,2 ppm foram observados, respectivamente, os sinais dos carbonos vinílicos das posições beta e alfa à carbonila. Por último, em δ=18,1 ppm nota-se o sinal do carbono mais blindado da molécula, o qual foi atribuído à metila na posição 1.

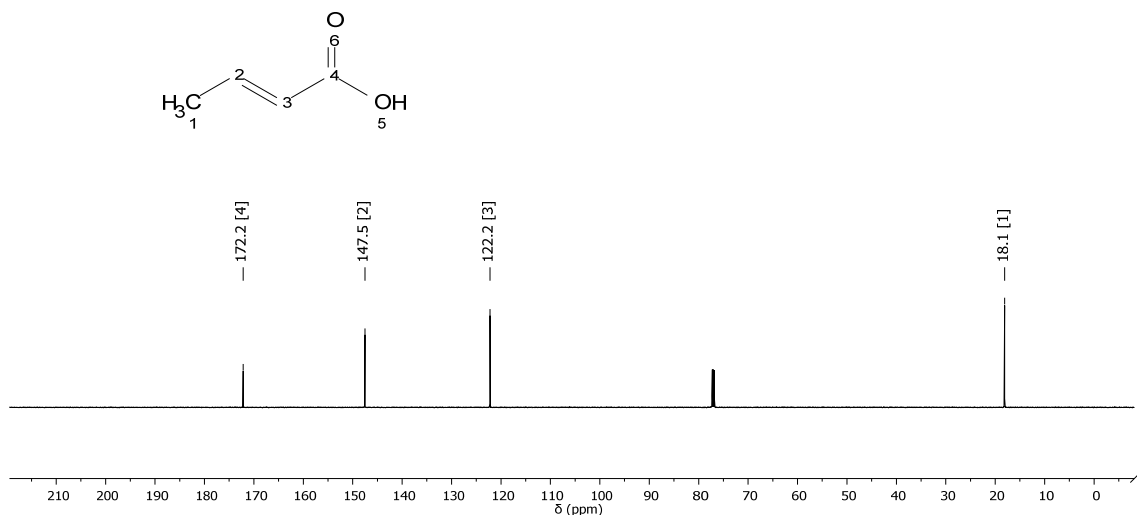
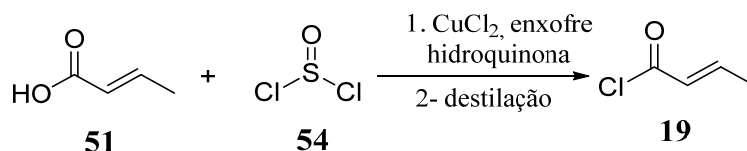


Figura 34: Espectro (RMN ¹³C, 151 MHz, CDCl₃) do ácido crotônico (AC).

6.1.3. Síntese do cloreto de crotonila (CC)

O cloreto de crotonila (**19**) foi preparado conforme método descrito por Mahajan e Resck (1997) (Esquema 13).³¹ Nesse procedimento, foram utilizados os reagentes ácido crotônico (**51**) e cloreto de tionila (**54**), na presença de cloreto de cobre II, enxofre e hidroquinona. Sendo que esses últimos três reagentes têm o objetivo de evitar a polimerização radicalar do cloreto de crotonila formado durante a síntese. Ao final, o produto foi purificado por destilação (115-119 °C).



Esquema 13: Rota de síntese do cloreto de crotonila (**19**).

6.1.3.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Nos dados espectroscópicos de RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 (Figura 35), observamos em 2,00 ppm a presença de duplo duplete ($J = 7,0$ e $1,8$ Hz), integrado para 3 hidrogênios, referente ao acoplamento do grupo metila com os hidrogênios da dupla ligação. Em 6,10 ppm, temos a presença de um duplo quarteto (dq, $J = 15,1$ e $1,7$ Hz) referente aos acoplamentos do grupo CH, vizinho à carbonila, com hidrogênio na posição *trans* (3J) e com grupo metila (4J). Por último, observa-se outro duplo quarteto em 7,25 ppm, referente aos acoplamentos do grupo CH na posição 4, com o grupo metila (3J) e com o grupo CH (4J) na posição 3.

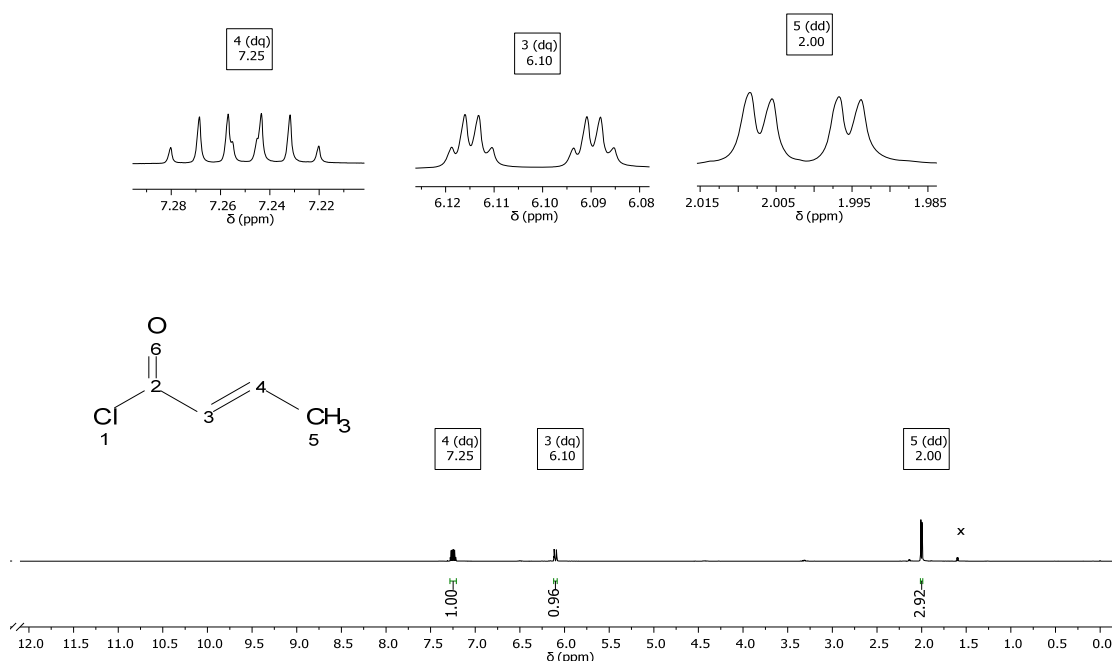


Figura 35: Espectro (RMN ^1H , 600 MHz, CDCl_3) do cloreto de crotonila (CC).

6.1.3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C)

Nos dados espectroscópicos de RMN ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do cloreto de crotonila (Figura 36), observam-se todos os sinais esperados para a molécula. Em $\delta=165,7$ ppm observa-se um sinal relativo a carbonila do cloreto ácido. Em $\delta=152,8$ e $127,8$ ppm podem ser notados, respectivamente, os sinais dos carbonos insaturados das posições beta e alfa à carbonila. Por último, em $\delta=18,4$ ppm tem-se o sinal do carbono mais blindado da molécula, o qual foi atribuído à metila na posição 5.

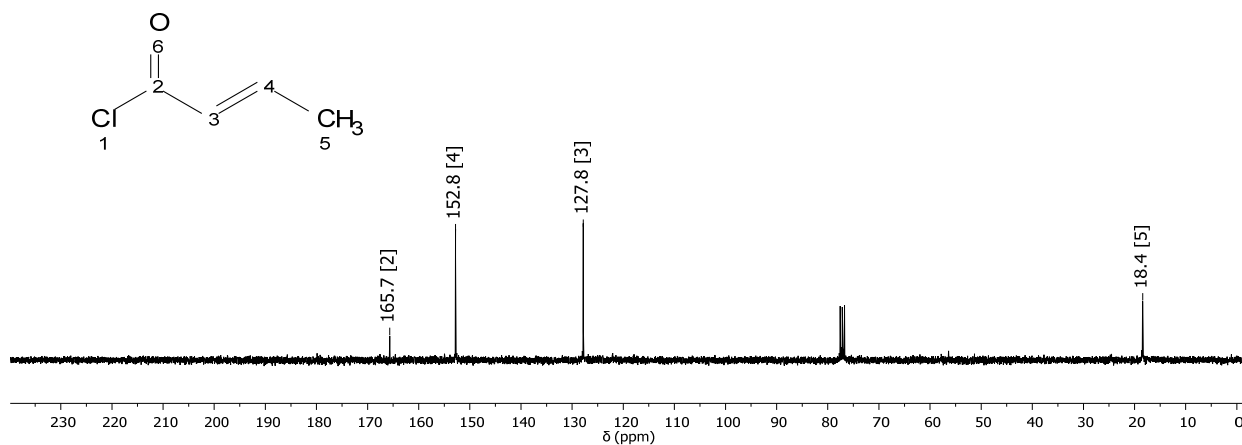


Figura 36: Espectro (RMN ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3) do cloreto de crotonila (CC).

6.2. Conclusões

Os dados de CG-EM e RMN ^1H da MCE indicam a presença de duas impurezas: a morfolina e a ciclohexanona. Essas impurezas não se apresentam como entrave para execução da síntese, pois elas podem ser geradas no próprio meio reacional, devido à elevada susceptibilidade a hidrólise inerente à enamina. Dessa forma, entende-se que a MCE sintetizada possui qualidade satisfatória para utilização na síntese da 6-oxo.

Os dados de CG-EM (por análise direta e derivatizada), RMN ^1H e ^{13}C do ácido crotônico não demonstraram a presença de impurezas que pudessem influenciar na síntese do cloreto de crotonila, o qual foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C .

6.3. Desenvolvimento da síntese da 6-oxo

Conforme descrito no item 3.2.3.1 (seleção da rota para a síntese da 6-oxo), o processo de síntese escolhido para o desenvolvimento apresentava como principal dificuldade a etapa de destilação à pressão reduzida (110-120 °C/0,5 Torr). Diante disso, em um primeiro momento, optou-se por retirar essa operação unitária e seguir a mesma rota sintética somente com uma única etapa de purificação do produto, a cristalização. Além disso, preferiu-se fazer uma redução de escala em 70 %, visando o uso econômico de reagentes durante as etapas iniciais de desenvolvimento (Tabela 7). Outra modificação foi a utilização de diclorometano (DCM) anidro em vez de clorofórmio anidro na primeira etapa, tendo em vista que o DCM possui um limite residual 10 vezes maior do que o clorofórmio (vide tabela 3 do item 3.2.5.3). Nas diversas tentativas de execução dessa metodologia, sempre se obteve um óleo marrom, que não cristalizava sob resfriamento, com alta porcentagem de 6-oxo (Figura 37), segundo os dados da análise por CG-EM (figura 38).

Reagentes	Original			Adaptado		
	mmol	Eq.molar	Volume (mL)	mmol	Eq.molar	Volume (mL)
Trietilamina	75	1,5	10,5	22,5	1,5	3,1
Cloreto de crotonila	65	1,3	6,2	19,5	1,3	1,9
Enamina	50	1	8,0	15	1	2,4

Tabela 7: Quantidade de reagentes: síntese original x síntese adaptada.

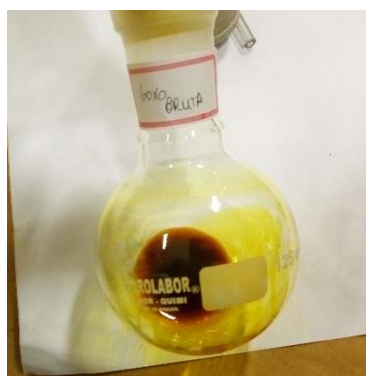


Figura 37: óleo marrom (6-oxo bruta).

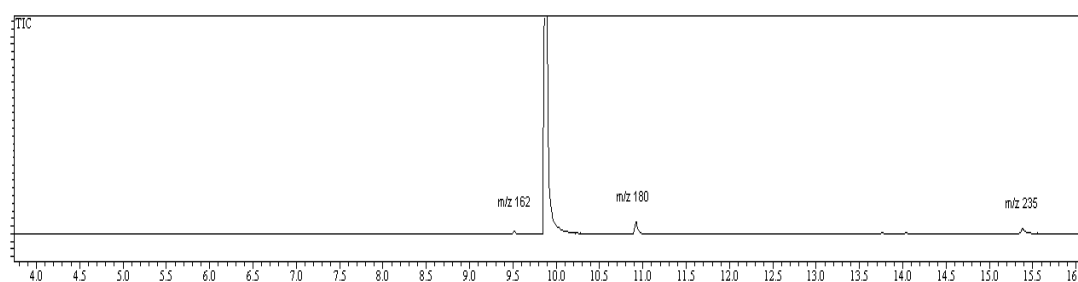


Figura 38: Cromatograma da fase óleo (6-oxo – 99,36 % - 9,85 min. e impurezas: m/z 162 – 0,03 % - 9,5 min., m/z 180 – 0,48 % - 10,9 min. e m/z 235 - 0,13 % em 15,3 min.).

Em uma segunda abordagem, resolveu-se seguir o mesmo processo proposto em uma escala duas vezes maior (30 mmol), visando aumentar a massa de 6-oxo produzida, o que poderia facilitar a cristalização. De fato, obteve-se um óleo marrom que cristalizava sob vácuo formando um sólido também marrom (Figura 39). Contudo, verificou-se que essa amostra, apesar de sólida, ainda apresentava as mesmas impurezas da fase óleo. Na tentativa de realizar uma purificação por recristalização, dissolveu-se o sólido marrom em hexano à quente (25-30 mL), o qual foi deixado esfriar a temperatura ambiente. Ao final, observou-se a presença de um líquido amarelo e resíduo de óleo marrom depositado no fundo. Essa amostra foi filtrada em papel de filtro e não cristalizou a temperatura ambiente. Após o resfriamento em banho de gelo, houve a formação de um sólido amarelo, o qual ainda apresentava a impureza m/z 180^{***} (Figura 40).

Figura 39: Sólido marrom

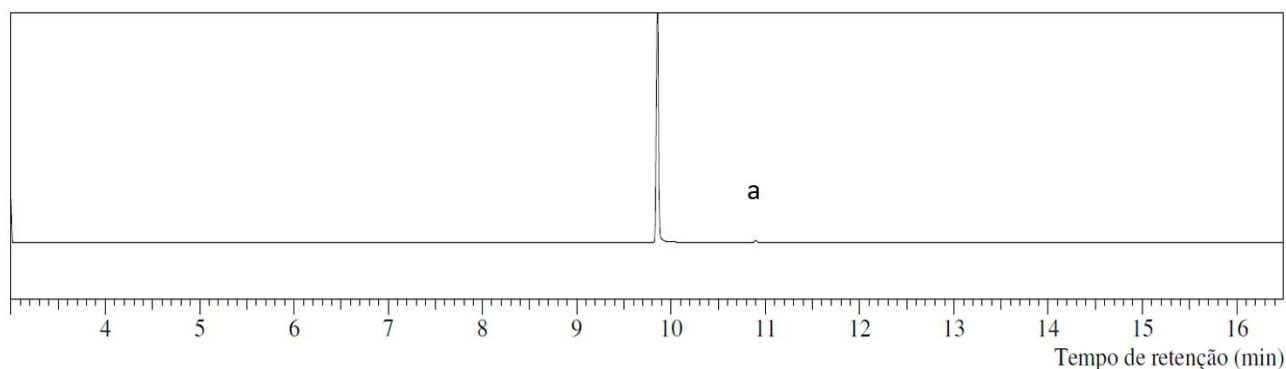


Figura 40: Cromatograma do sólido amarelo (6-oxo e impureza de m/z 180 (a) – 10,9 min).

Diante disso, optou-se por redissolver a amostra em hexano e, posteriormente, colocá-la sob agitação com carvão ativado, a temperatura ambiente, por 6 h horas, visando reduzir a coloração amarela do líquido. Decorrido esse tempo, a solução foi filtrada em celite, obtendo-se um líquido amarelo claro, no qual percebeu-se a cristalização sob resfriamento ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) de um sólido branco (Figura 41), com um rendimento de 55 %.

^{***} A impureza de m/z 180 foi isolada e caracterizada. A discussão sobre ela encontra-se no capítulo de estudos de degradação forçada

Figura 41: 6-oxo sólido na água-mãe.



Apesar de obter um rendimento 10% abaixo da síntese original, considerou-se satisfatório o procedimento de purificação alternativo à etapa de destilação. Além disso, concluiu-se que o DCM poderia ser utilizado em substituição do clorofórmio como solvente na primeira etapa do processo.

Em continuidade ao desenvolvimento do processo, foram propostas as seguintes modificações:

- Uso na atmosfera “ambiente”, em vez de atmosfera inerte, na primeira etapa da reação, uma vez que todos os solventes são secados previamente em hidreto de cálcio;
- Redução dos excessos molares em 20% dos reagentes: cloreto ácido de 30 para 10 mol% e da trietilamina de 50 para 30 mol%, visando economia no uso de reagentes e redução dos quantitativos de impurezas.

Essas modificações foram aplicadas e a reação transcorreu de forma idêntica ao processo já realizado.

Considerando o sucesso da modificação anterior, propôs-se a redução na proporção do solvente da reação de 2 para 1 mL de CH_2Cl_2 anidro por mmol de MCE, reduzindo o uso de solvente pela metade na etapa inicial. Para manter uma cinética lenta da reação, uma vez que os reagentes estariam em maior concentração e o tempo de gotejamento não seria alterado, optou-se por resfriar a reação a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, em vez de aquecê-la a $38 \pm 2^\circ\text{C}$. Ao final do gotejamento, foi verificado que reação apresentava o aspecto visual esperado: amarelo clara (Figura 42).

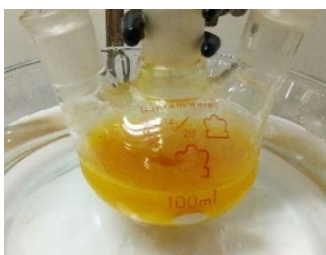


Figura 42: Final do gotejamento na síntese da 6-oxo.

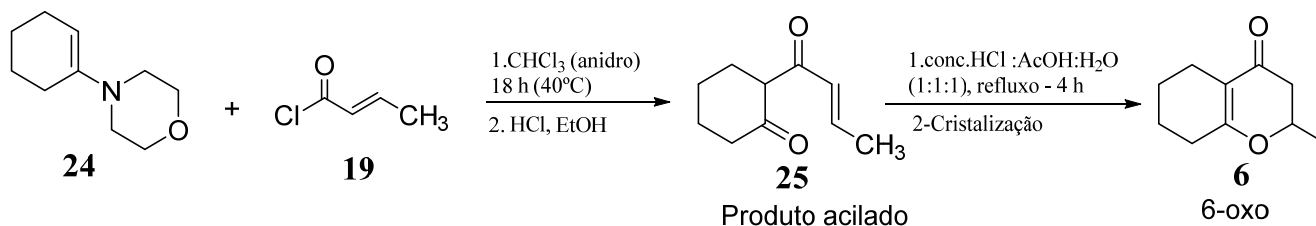
Por último, propôs-se outra modificação visando melhorar o rendimento. O sólido marrom foi dissolvido a quente em uma mistura de hexano/acetato de etila (95:5 v/v, 20 mL, $40 \pm 2^\circ\text{C}$) e mantido em agitação sob carvão ativado por 2 h. Por último, a solução foi filtrada a vácuo através de uma camada de terra diatomácea (celite), e o solvente foi removido por rotoevaporação, para dar um sólido amarelo claro. Este produto foi solubilizado em hexano quente (25 mL) e, depois do resfriamento, a cristalização produziu a 6-oxo pura (agulhas brancas, 3,3 g, 65%) (Figura 43). Essa reação foi ampliada até nas escalas de 120 e 180 mmol, nas quais foram obtidos os mesmos rendimentos.



Figura 43: 6-oxo cristalizada (produto final).

6.3.1. Otimização do processo utilizando monitoramento *in situ* por espectroscopia de infravermelho médio

Na primeira etapa de síntese da 6-oxo (**6**), a acilação do 1-morfolinociclohexeno (**24**) foi feita pela adição lenta de cloreto de crotonila (**19**) na presença trietilamina anidra. Em seguida, essa reação foi aquecida a 40 °C (cerca de 1 h) e mantida nesta temperatura por 18 h. Essa etapa era a mais longa de todo o processo e necessitava de alternativas que pudessem otimizá-la. Contudo, alguns desafios impediam o monitoramento do consumo de reagentes usando métodos analíticos off-line mais comuns, devido às características químicas dos compostos. Para preparação de uma amostra para análise por CLAE, por exemplo, seria necessário realizar uma derivatização ou neutralização do cloreto de crotonila, o que degradaria a enamina (reagente limitante), uma vez que este composto sofre hidrólise facilmente. Diante disso, verificou-se a possibilidade de utilização de sensores de processo (dispositivos analíticos implementados na linha do processo), visando a coleta de dados qualitativos e quantitativos diretamente no meio reacional.



Esquema 14: Esquema simplificado das etapas de síntese da 6-oxo (**6**).

Para monitoramento das reações *in situ* foi utilizado um espectrômetro automatizado de infravermelho com a tecnologia de transformada de Fourier (FTIR), fabricado pela empresa Mettler Toledo: O ReactIR TM 15. As medidas foram realizadas, por meio de uma sonda inserida no meio reacional, à medida que as reações ocorriam ao longo do tempo. A acilação foi monitorada durante 24 horas a partir da adição de solvente (diclorometano). Cada substância foi adicionada separadamente e monitorada por um intervalo de tempo após sua adição.

Com o objetivo de fornecer a melhor visualização de sinais de cada componente durante a dosagem do cloreto ácido, a Figura 44 apresenta um espectro de IV com uma janela de tempo de 8 h, em uma faixa de número de onda de $1750\text{-}1125\text{ cm}^{-1}$. Neste gráfico de superfície 3D pode-se observar que a intensidade do sinal em 1204 cm^{-1} diminuiu enquanto o sinal em 1712 cm^{-1} aumentou durante dosagem do cloreto de crotonila. Esses perfis de absorbância foram utilizados para monitorar o consumo de enamina e a formação de produtos utilizando uma ferramenta de software chamada ConcIRT®, que possui um algoritmo sensível a alterações na mistura de reação e pode fornecer análise de tendências por deconvolução de sinais nos espectros.^{72†††}

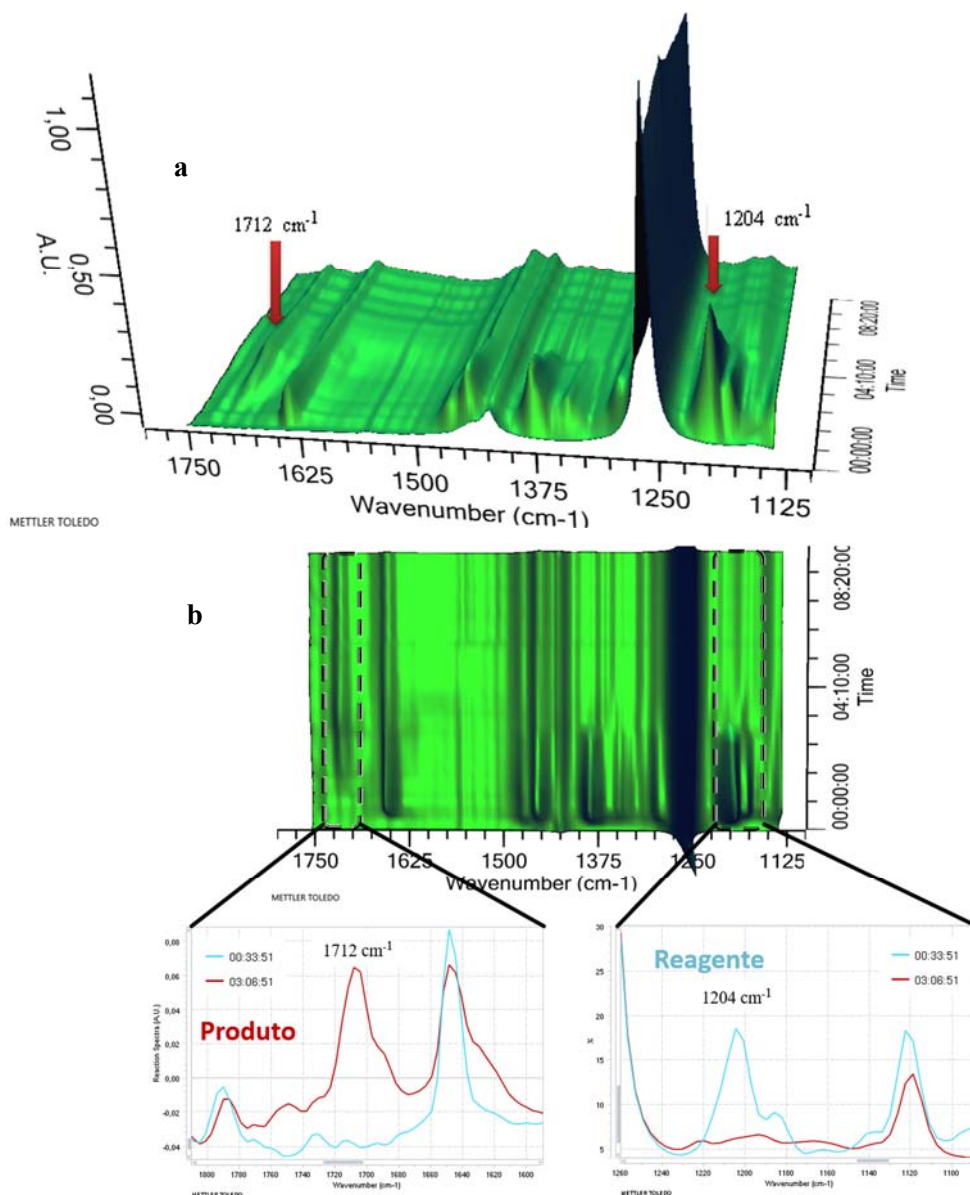


Figura 44: a: Gráfico de superfície 3D da acilação até 8 h de reação (vista frontal) e b: Gráfico de superfície 3D da acilação até 8 h de reação (vista superior) com ampliação das regiões de $1800\text{ a }1600\text{ cm}^{-1}$ e $1260\text{ a }1050\text{ cm}^{-1}$ em 2D.

†††ConcIRT é um tratamento quimiométrico baseado na resolução de curvas que, em alguns casos, fornece um perfil de concentração ("componente") e calcula os espectros ("Perfil do espectro ConcIRT") de espécies transitórias em um meio de reação, observado neste estudo.

De acordo com os dados ConcIRT® (Figura 45), o produto acilado (**25**), (Esquema 14) foi completamente formado após a adição do cloreto de crotonila (cerca de 4 horas de reação). Assim, concluiu-se que o tempo de acilação pode ser reduzido de 18 horas para 2 horas, o que minimiza a probabilidade de formação do processo de impurezas.

Por último, destaca-se que foi avaliada a utilização da sonda para monitorar as demais etapas de reação. Contudo, não se obteve resultados que permitissem a otimização das etapas seguintes do processo.

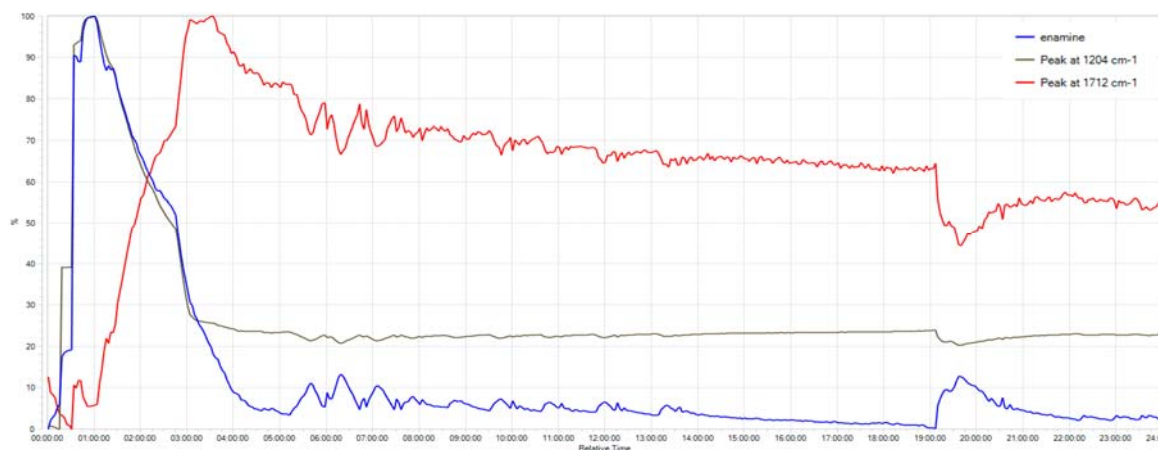
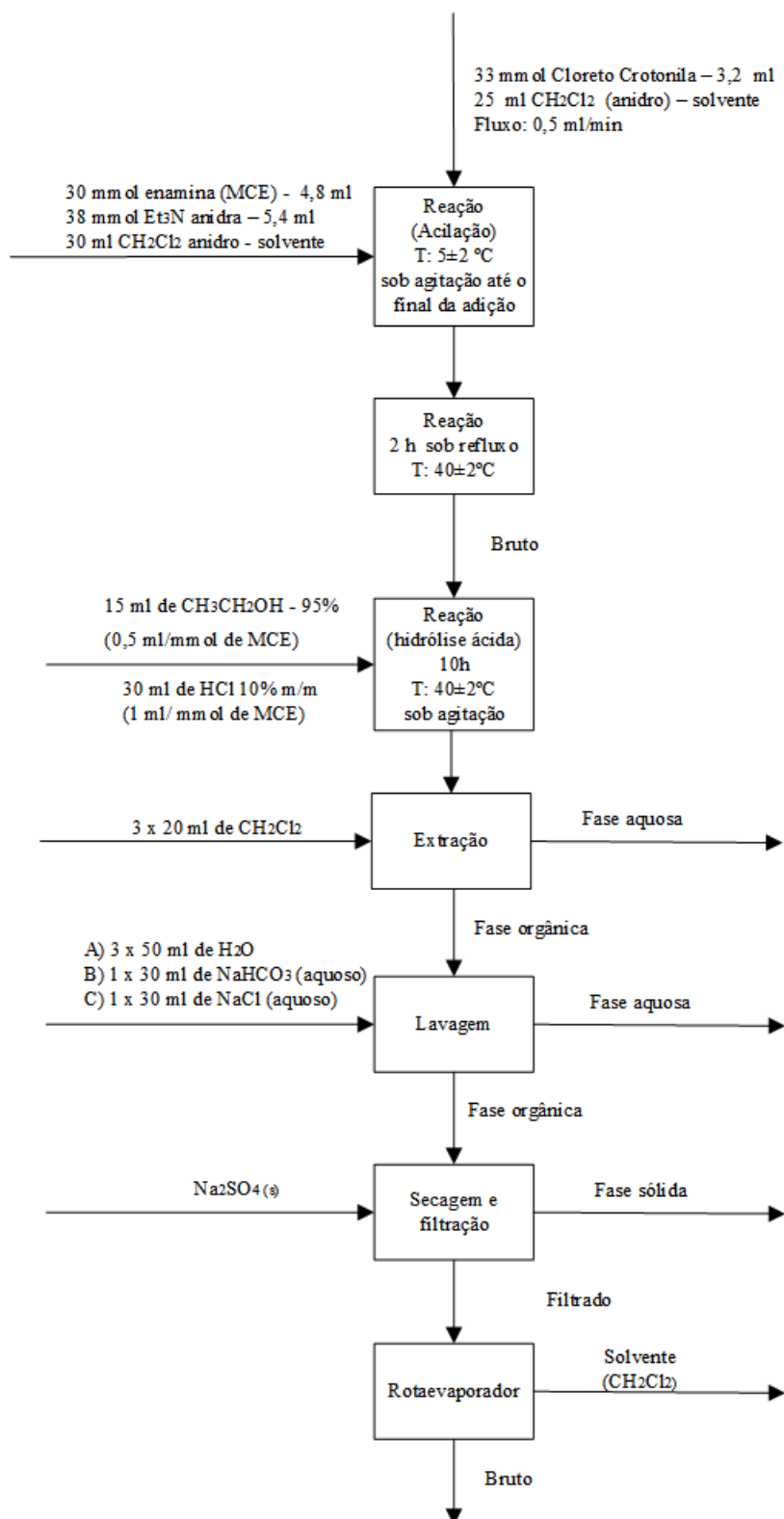
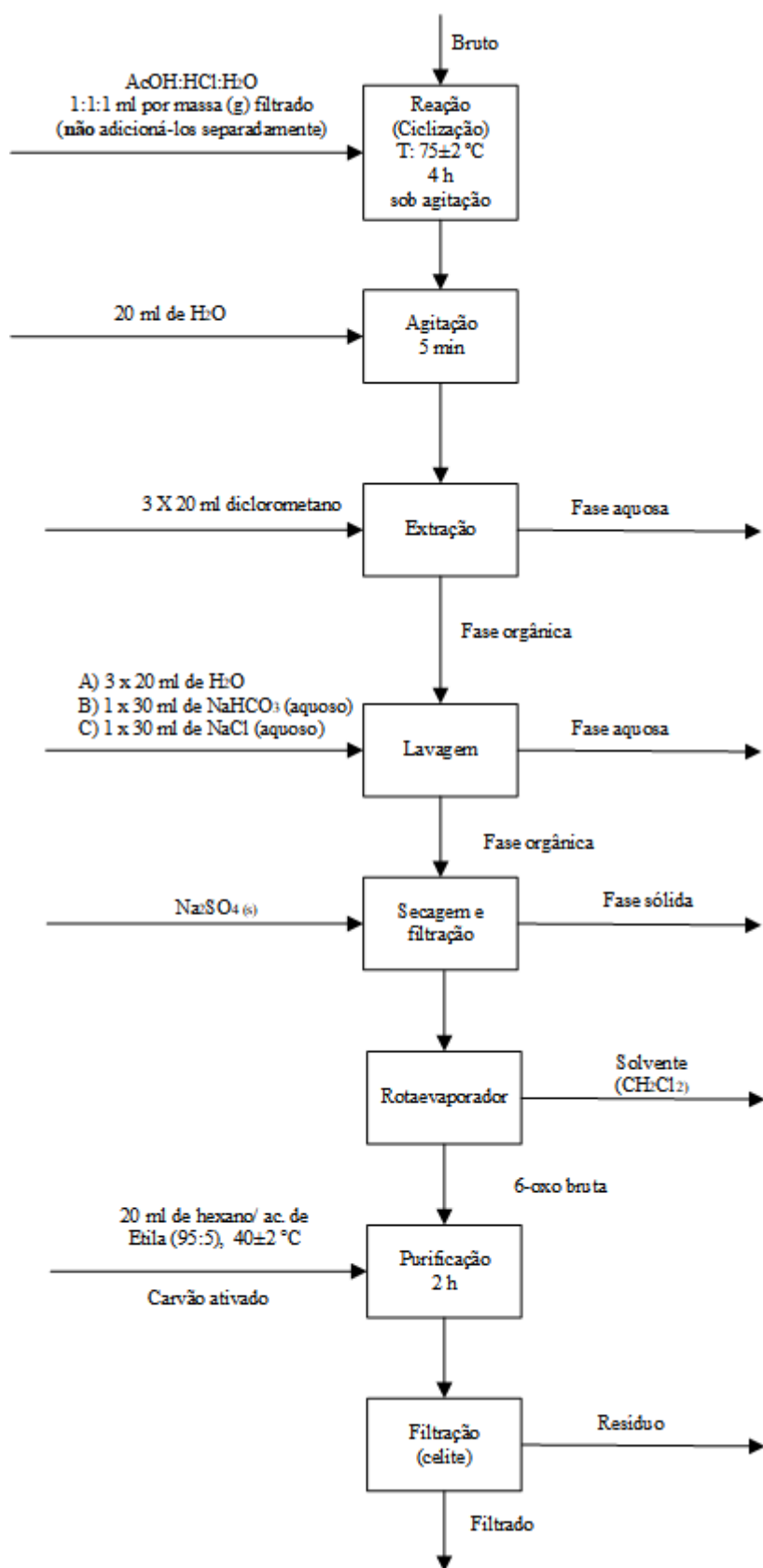


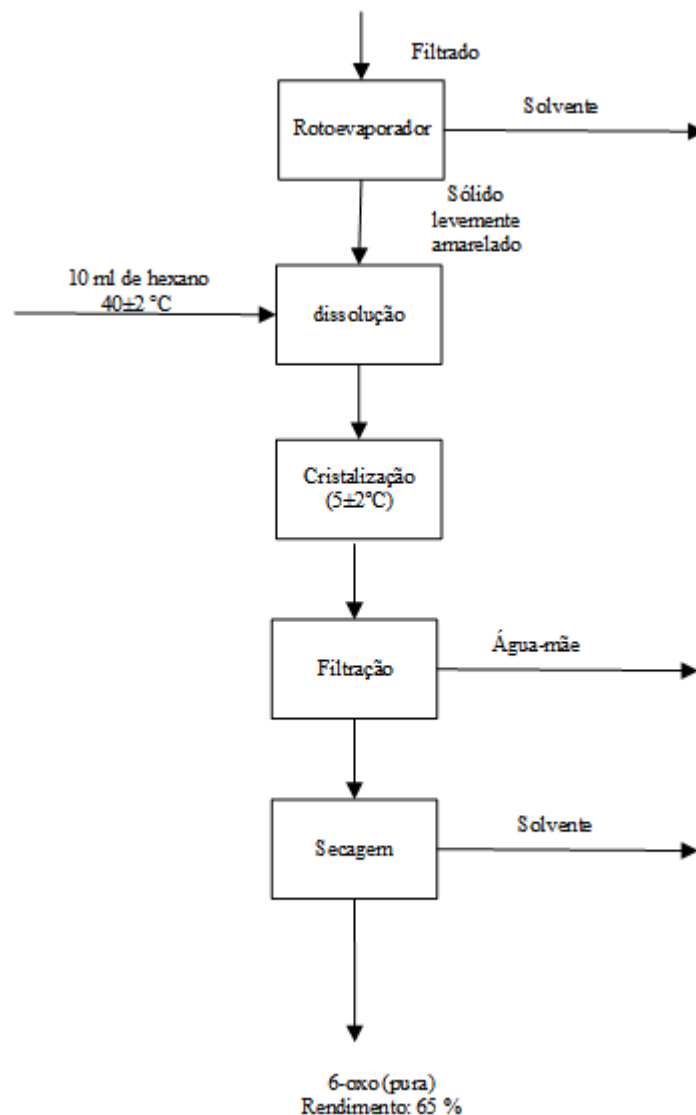
Figura 45: Perfis ConcIRT® da enamina e dos picos em 1204 cm^{-1} e 1712 cm^{-1} .

6.3.2. Diagrama de fluxo de processo

O processo foi representado em um diagrama de fluxo (Esquema 14), o qual apresenta as proporções dos reagentes utilizados, as operações unitárias e os parâmetros do controle durante o processo. Os valores utilizados fazem referência a uma escala de bancada de 30 mmol em relação à enamina (reagente limitante da primeira etapa). Outros detalhes podem ser encontrados na descrição no capítulo da parte experimental.







Esquema 15: Diagrama de fluxo de processo da 6-oxo.

6.3.3. Caracterização

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Nos dados espectroscópicos de RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 (Figura 46), podem ser observados alguns deslocamentos e multiplicidades que permitem evidenciar a estrutura da 6-oxo. Em 4,44 ppm observa-se um duplo quarteto de duplete (dqd) relativo aos três diferentes tipos acoplamentos do H8: o primeiro ocorre com o H13 pseudoaxial ($J = 12,7$ Hz), o segundo com os hidrogênios do CH_3 na posição 12 ($J = 6,3$ Hz) e o terceiro com o H14 pseudoequatorial ($J = 4,0$ Hz). Em 2,46 e 2,40 ppm observam-se dois duplos dupletos relativos aos diferentes acoplamentos dos hidrogênios diastereotópicos (13 e 14) com o hidrogênio na posição 8: o primeiro referente aos acoplamentos H13 – H14 ($J = 16,7$ Hz) e H13-H8 ($J = 3,93$ Hz) e o segundo referente aos acoplamentos H14-H13 ($J = 16,7$ Hz) e H14-H8 ($J = 13,2$ Hz). Na faixa de 2,3 - 2,12 ppm observa-se um multipletto, integrado para 4

hidrogênios, referente aos metilenos nas posições 3 e 6 da molécula. De 1,82 a 1,67 ppm e de 1,65 a 1,44 são observados dois multipletos referentes aos hidrogênios nas posições 1 e 2 da molécula. Contudo, não é possível diferenciá-los. Por último, em 1,42 ppm observa-se um duplete relativo ao grupo metila na posição 12 acoplado com H8 ($J = 6,3$ Hz).

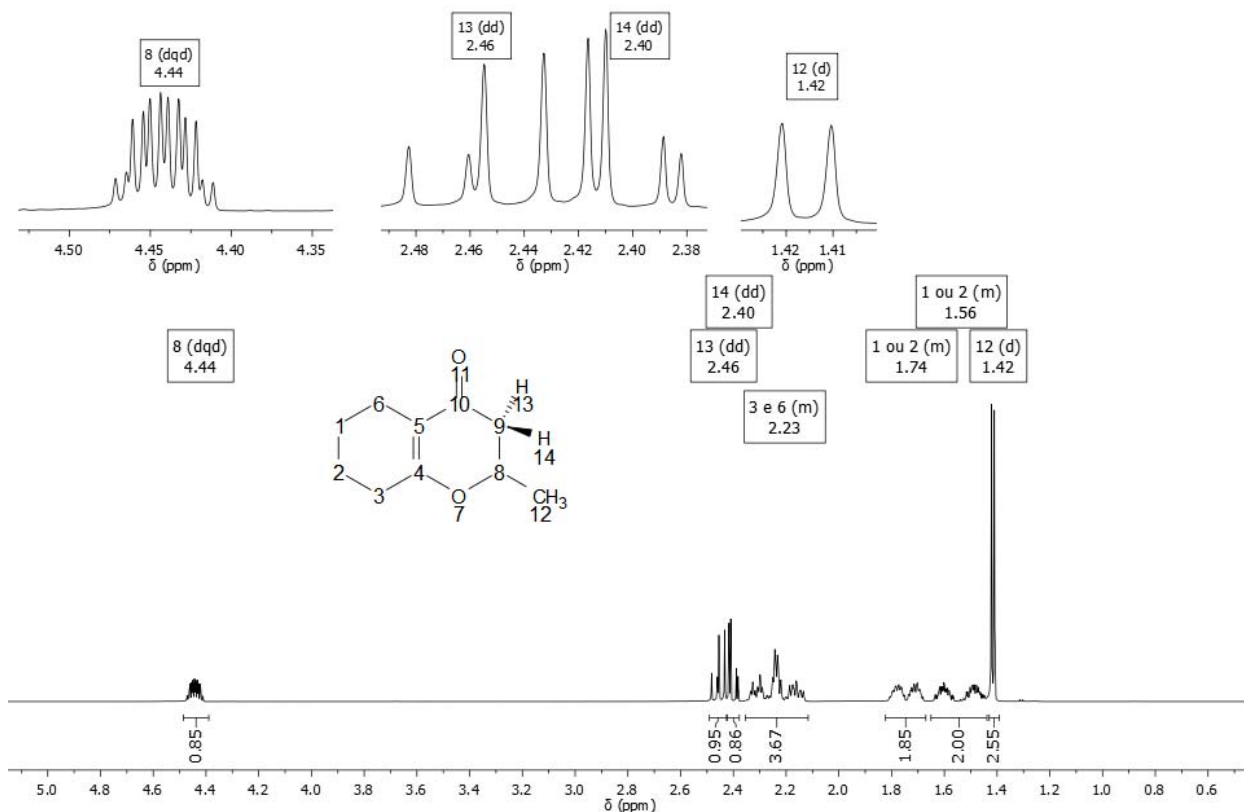


Figura 46: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da 6-oxo.

6.3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C)

Os dados espectroscópicos de RMN ^{13}C a 151 MHz em CDCl_3 (Figura 47), demonstram que todos os carbonos da molécula apresentam sinais no espectro, devido à ausência de simetria na molécula. Observou-se ainda que os sinais de RMN de ^{13}C da molécula estão de acordo com os dados previstos na literatura consultada.⁷³

O carbono observado em campo mais baixo (192,5 ppm) foi o da carbonila do anel dihidropirano, devido ao forte efeito de desblindagem pela anisotropia magnética da ligação $\text{C}=\text{O}$. Em 171,4 ppm, observa-se o sinal do carbono insaturado vicinal ao oxigênio, o qual é duplamente desblindado devido à proximidade com o átomo eletronegativo e ao efeito anisotrópico da dupla ligação. O outro sinal em campo baixo com 112,5 ppm está relacionado ao outro carbono da ligação $\text{C}=\text{C}$. O próximo sinal em 74,6 ppm corresponde ao carbono metino monossustituído vizinho ao oxigênio e, em sequência, observa-se o sinal em 43,3 ppm do carbono saturado na posição α a carbonila.

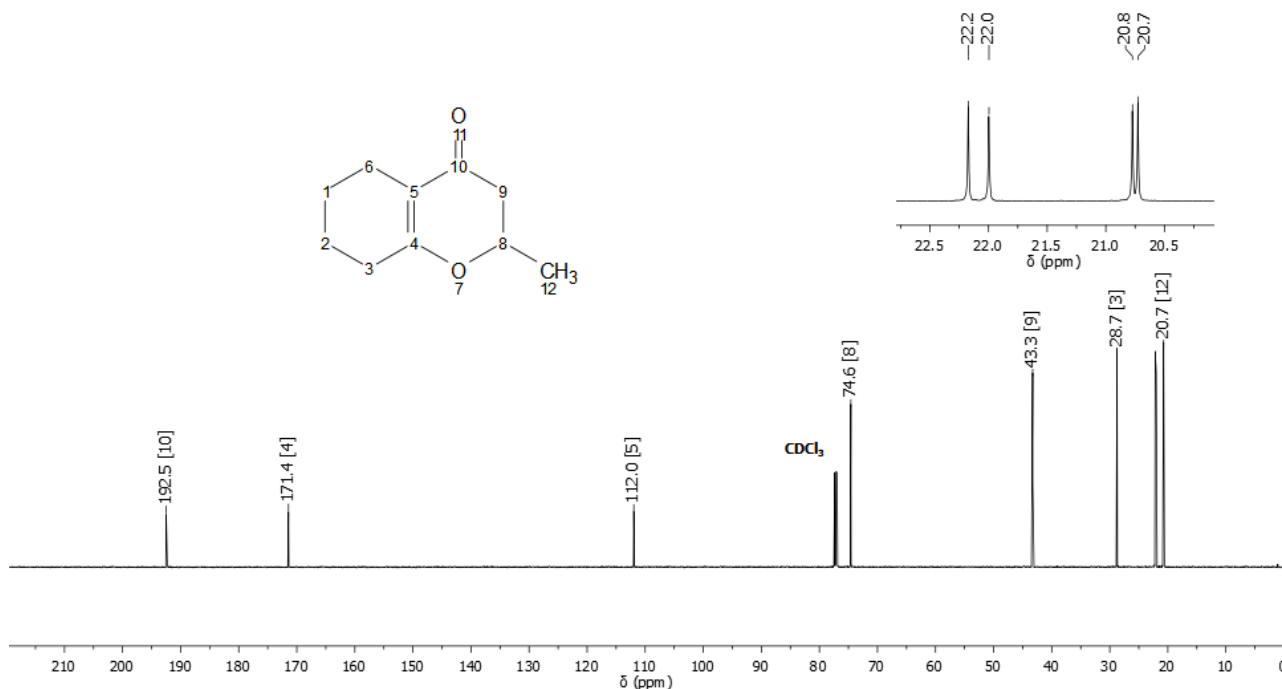


Figura 47: Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da 6-oxo.

Além obtenção do espectro de ^{13}C , foi realizado o experimento de carbono com APT (Figura 48) para identificação dos demais grupos metilenos e metila da molécula. Por meio dos dados obtidos, foi possível identificar o grupo metila em 20,7 ppm e identificar os grupos metilenos em 20,8 ppm, 22,0 ppm, 22,2 ppm e 28,7 ppm. Utilizando-se a estimativa de deslocamento de RMN ^{13}C do *software* ChemDraw Ultra 8.0, atribui-se o sinal em 28,7 ppm ao metileno β ao oxigênio do anel dihidropirano. Ademais, não foi possível atribuir indistintamente os sinais dos demais grupos metilenos, devido à proximidade dos valores de deslocamento.

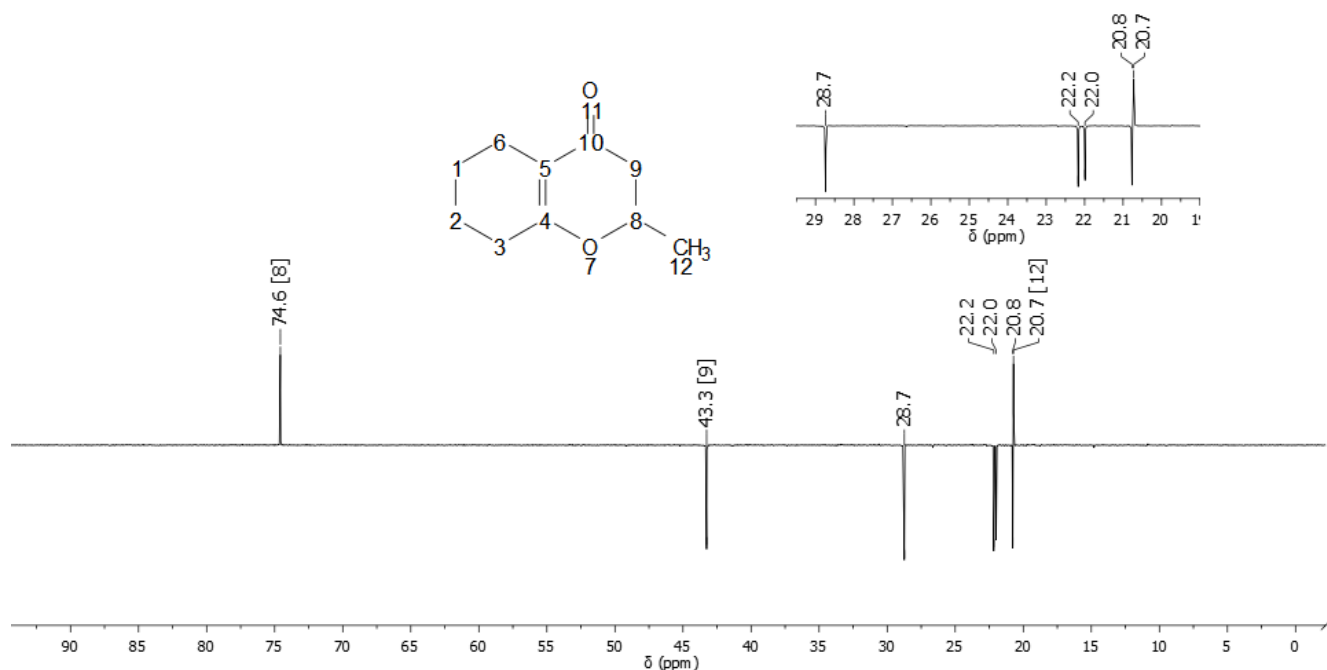


Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da 6-oxo com APT.

6.3.3.2. Espectrometria de infravermelho

O espectro de infravermelho (Figura 49) demonstra absorções características na região de 2973 cm^{-1} a 2865 cm^{-1} relativos aos estiramentos das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{H}$ da metila e dos 4 grupos metileno da molécula. Em 1664 cm^{-1} pode-se observar a absorção relativa ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ conjugada e em 1612 cm^{-1} observa-se a absorção relativa ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$.

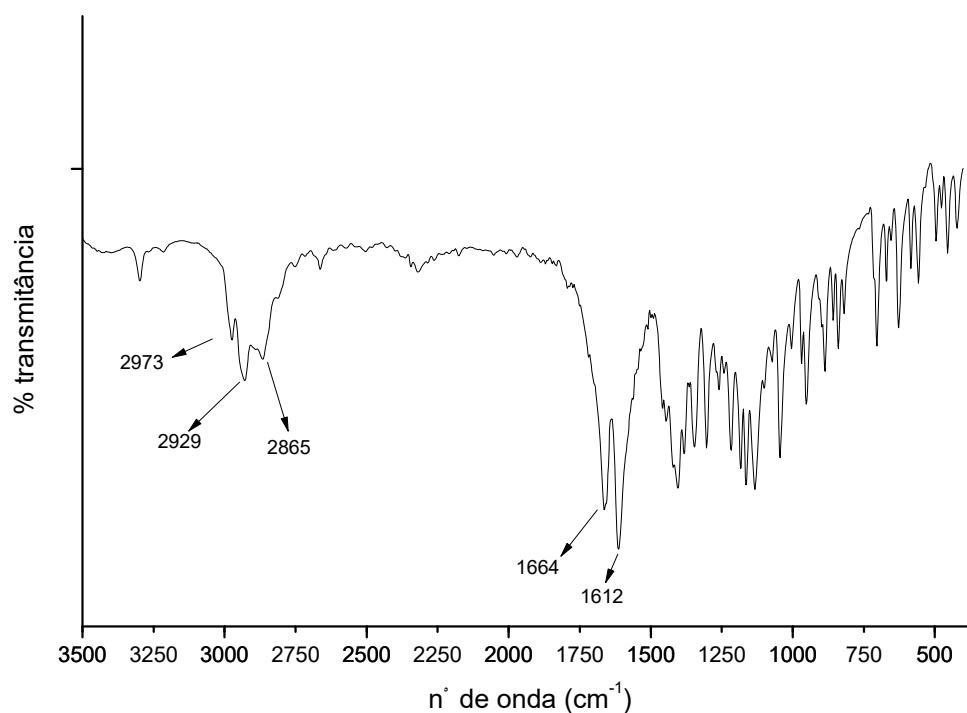


Figura 49: Espectro de Infravermelho da 6-oxo.

6.3.3.3. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Na análise do cromatograma (Figura 50), observa-se que há somente o pico da 6-oxo, com tempo de retenção de 9,8 min, o que indica uma alta pureza do material sintetizado.

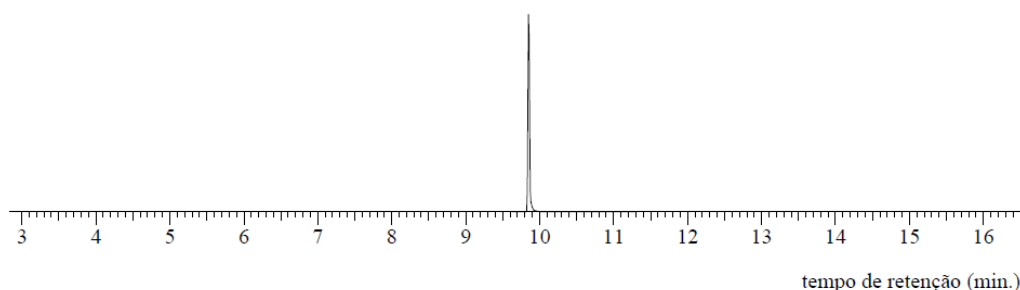


Figura 50: Cromatograma por CG-EM da 6-oxo.

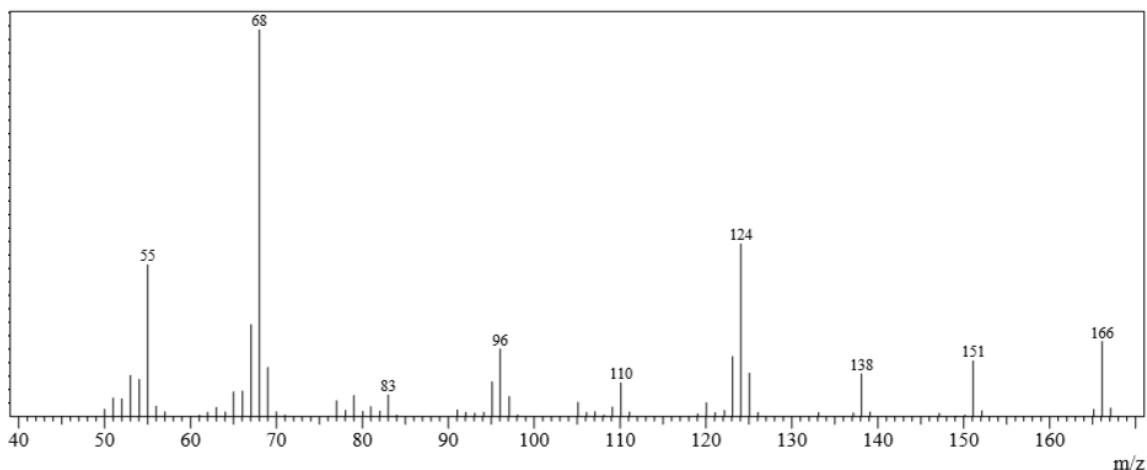
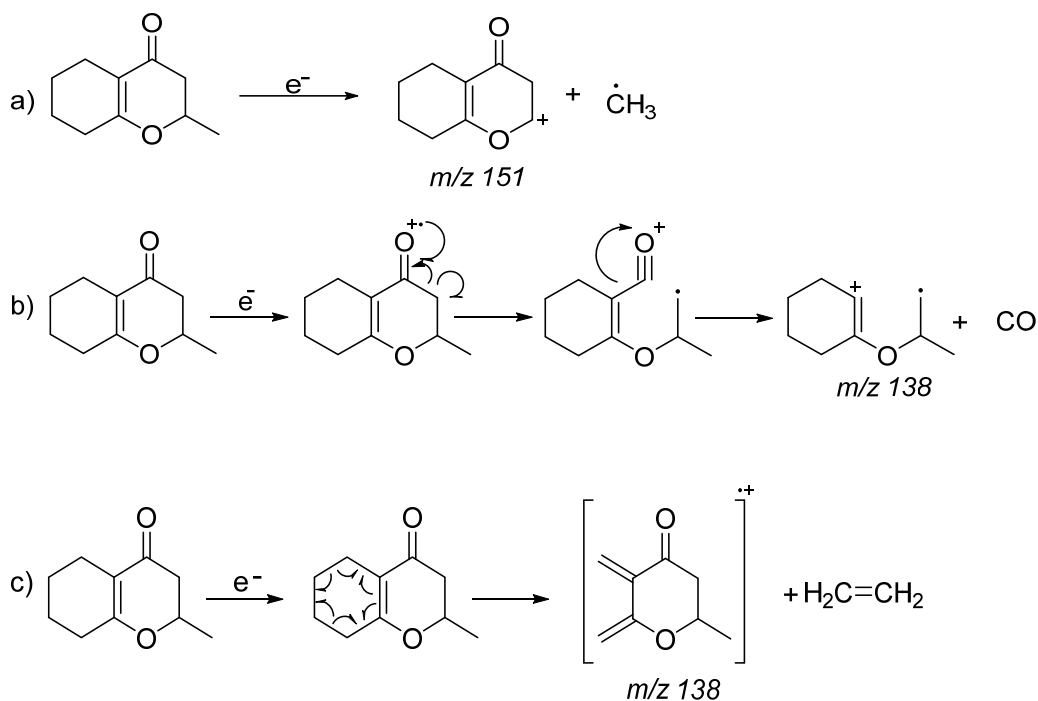
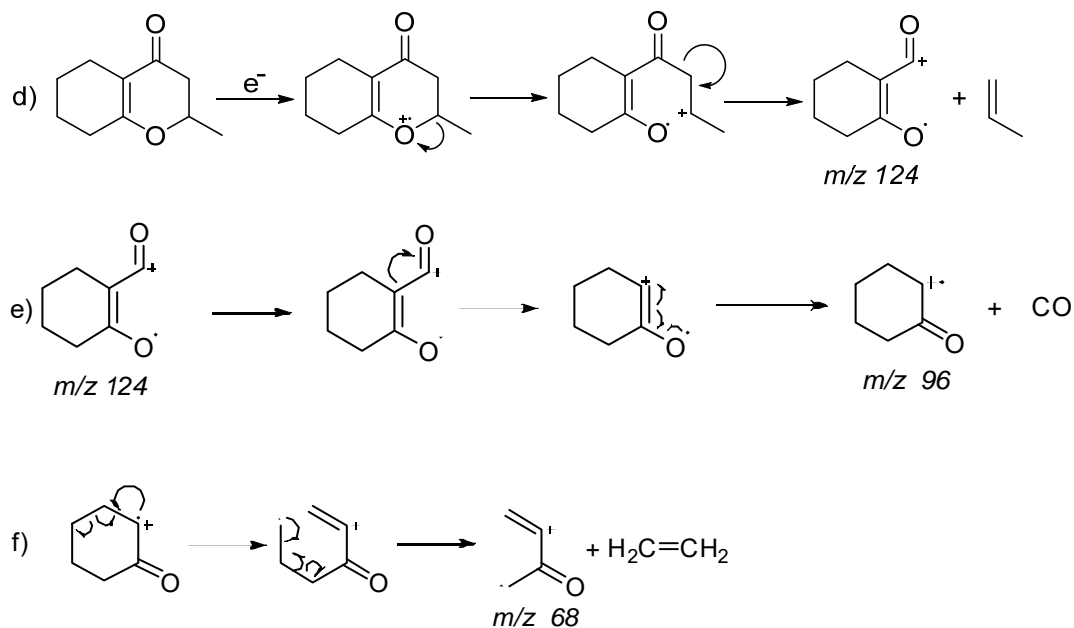


Figura 51: Espectro de massa por impacto de elétrons da 6-oxo.

O espectro de massa da 6-oxo (Figura 51) apresentou, conforme esperado, o pico de íon molecular com m/z 166. A primeira fragmentação ocorre de devido à perda do grupo metila formando o pico m/z 151 (Esquema 15, letra a). O pico M-28 (m/z 138) pode ser atribuído a dois tipos diferentes de fragmentação: um deles relativo a perda de CO (Esquema 15, letra b) e o outro relativo a fragmentação do tipo retro Diels-Alder (Esquema 15, letra c). O pico m/z 124 pode ser atribuído a liberação de um propeno (Esquema 15, letra d). A fragmentação do íon molecular m/z 124, com liberação de CO, dá origem ao pico m/z 96 (Esquema 15, letra e). A fragmentação do íon m/z 96, com liberação de eteno, dá origem ao íon do pico base m/z 68 (Esquema 15, letra f).





Esquema 16: Propostas de mecanismos de fragmentação da 6-oxo.

6.3.3.4. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)

No espectro de UV-vis da 6-oxo em acetonitrila (Figura 52), nota-se apenas o aparecimento de uma banda de absorção com λ_{max} em 270 nm, atribuída ao grupo cromóforo C=C-C=O da molécula.

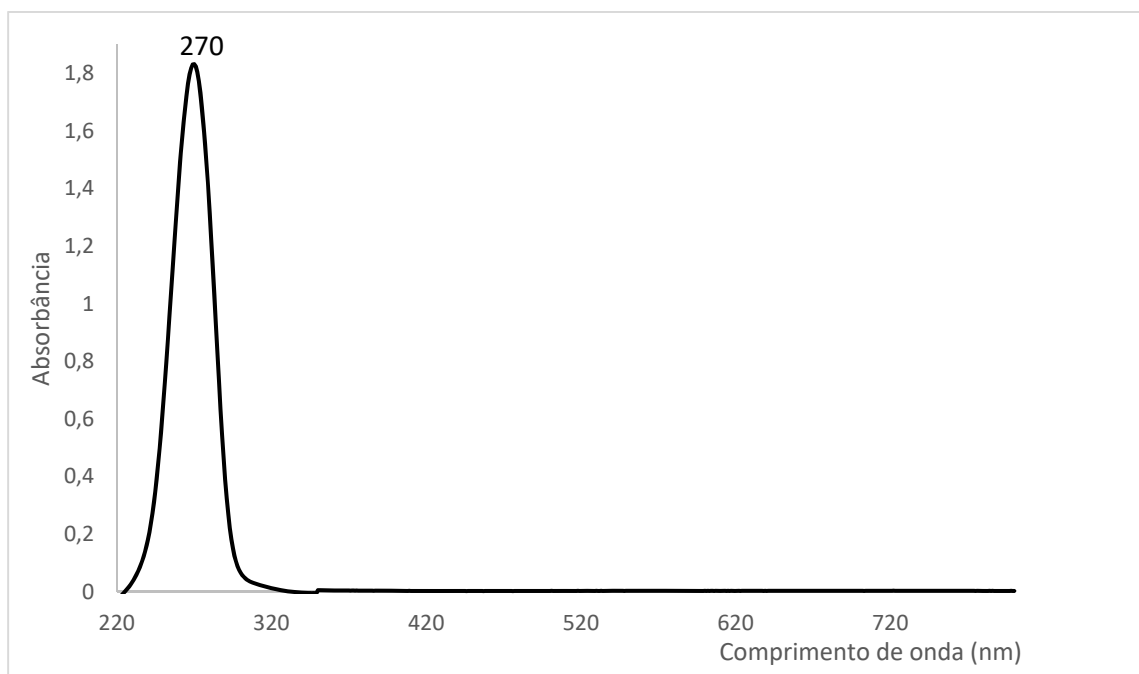


Figura 52: Espectro UV-vis da 6-oxo.

6.3.3.5. Determinação da pureza por Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq)

A técnica de RMN quantitativa (RMNq) consiste em uma metodologia para quantificação de um analito por meio da comparação entre a razão das áreas dos sinais da amostra e de um padrão em um espectro de RMN ^1H .^{74,75} Essa aplicação já tem sido utilizada na análise de fármacos e oficializada por algumas farmacopeias, como por exemplo, nas monografias do citrato de orfenadrina e do nitrato de isoamila.^{74,76,77}

Na maioria das vezes, a utilização do RMNq é feita utilizando-se um padrão interno (PI) de pureza determinada. Para a realização dos cálculos, utiliza-se uma equação na qual temos os seguintes fatores: x = analito; P = pureza; PI = padrão interno; A = área do sinal de ressonância; N = número de núcleos que absorvem na frequência do sinal de ressonância; M = massa molar e m = massa de amostra.^{74,75}

$$P_x = \frac{A_x}{A_{PI}} \frac{N_{PI}}{N_x} \frac{M_x}{M_{PI}} \frac{m_{PI}}{m} P_{PI}$$

Equação 1: Equação para determinação da pureza, por meio de RMNq, utilizando-se padrão interno.

Devido à possibilidade de uma medida direta da razão das áreas dos sinais entre um padrão interno e o analito, a análise de RMNq pode ser considerada como um método de padronização primária, pois entende-se que não há necessidade de construção de uma curva de calibração, assim como a utilização de padrões de referências análogo aos analitos. Outras características positivas dessa técnica incluem: a possibilidade de determinar as estruturas a nível molecular, a ausência de necessidade de calibração para determinação das razões de intensidade (o sinal da área é diretamente proporcional ao número de núcleos ressonantes), os tempos de medidas relativamente rápidos, a não necessidade de destruição da amostra, o fácil manuseio e preparo da amostra (muitas vezes não necessita do isolamento da amostra) e a possibilidade de análise de determinação simultânea de mais de um analito na amostra.^{74,75}

Nesse trabalho, determinou-se a pureza da 6-oxo por RMNq utilizando como padrão interno de referência o ácido maleico. Haja vista que os sinais de seus hidrogênios vinílicos apresentam-se como um simpleto em 6,27 ppm, região onde não há sinais da 6-oxo (Figuras 53 e 54). As amostras foram preparadas, em triplicata, pesando-se de 12 a 14 mg do padrão e analito, ambos dissolvidos em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6). As análises foram realizadas em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance III HD, equipado com sonda do tipo *broadband observe*

(BBFO) 5 mm, operando em campo magnético de 14 T e à frequência de ^1H de 600 MHz. Os espectros adquiridos foram processados utilizando-se o software Topspin 3.2 da Bruker.

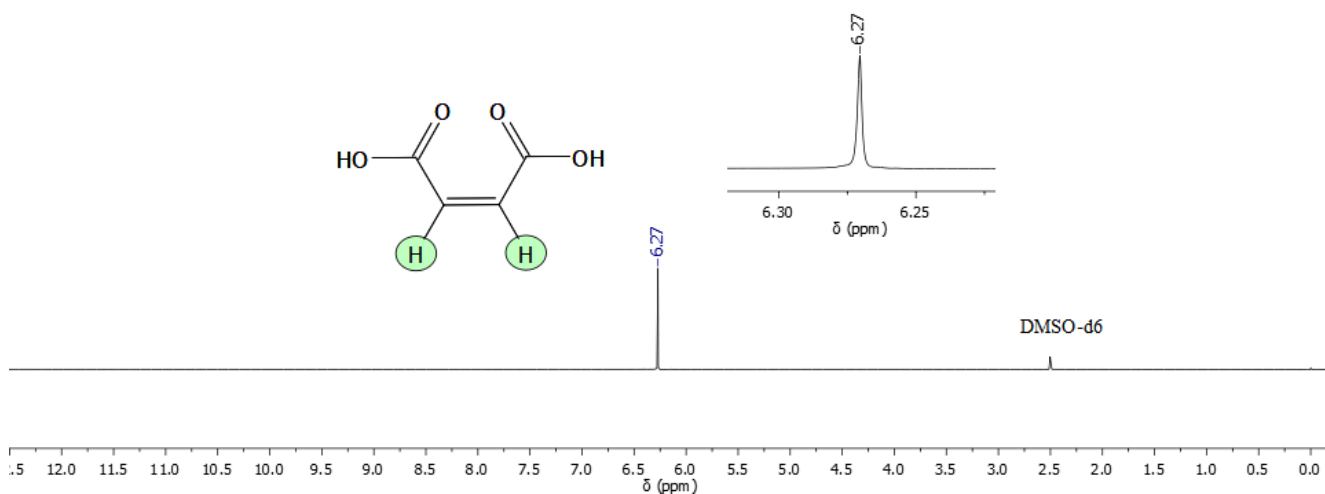


Figura 53: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do ácido maleico.

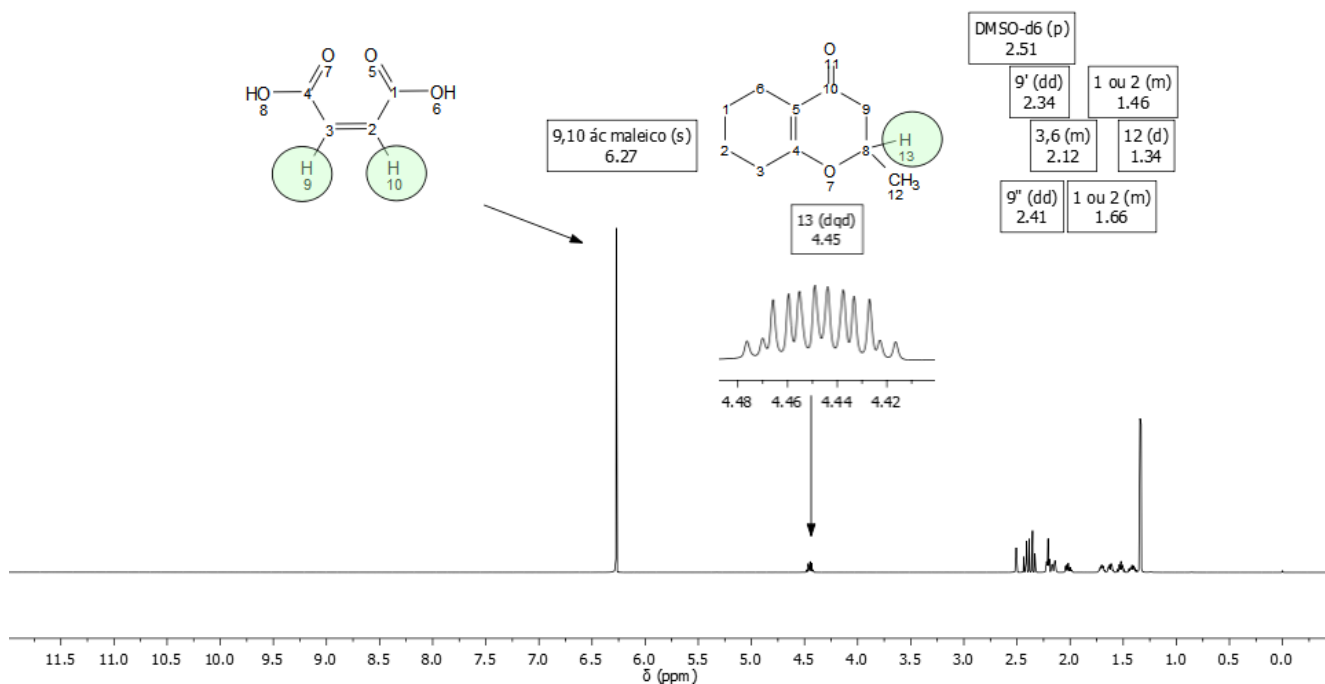


Figura 54: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da 6-oxo + ácido maleico

Os dados obtidos foram tabelados e o cálculo de pureza, para cada amostra, foi realizado utilizando a fórmula abaixo:

$$P_x = \frac{A_x}{A_{PI}} \frac{N_{PI}}{N_x} \frac{M_x}{M_{PI}} \frac{m_{PI}}{m} P_{PI}$$

Amostras	A_x	A_{pi}	N_{pi}	N_x	M_x	M_{pi}	mPI	m	P_{pi}	P_x
1	31,9100	100,0000	2	1	166,22	116,07	14,0	12,8	99,94	99,90
2	38,5497	100,0000	2	1	166,22	116,07	12,4	13,7	99,94	99,87
3	39,8606	100,0000	2	1	166,22	116,07	12,0	13,7	99,94	99,94

Tabela 8: Dados utilizados no cálculo da pureza da 6-oxo pelo método de RMNq.

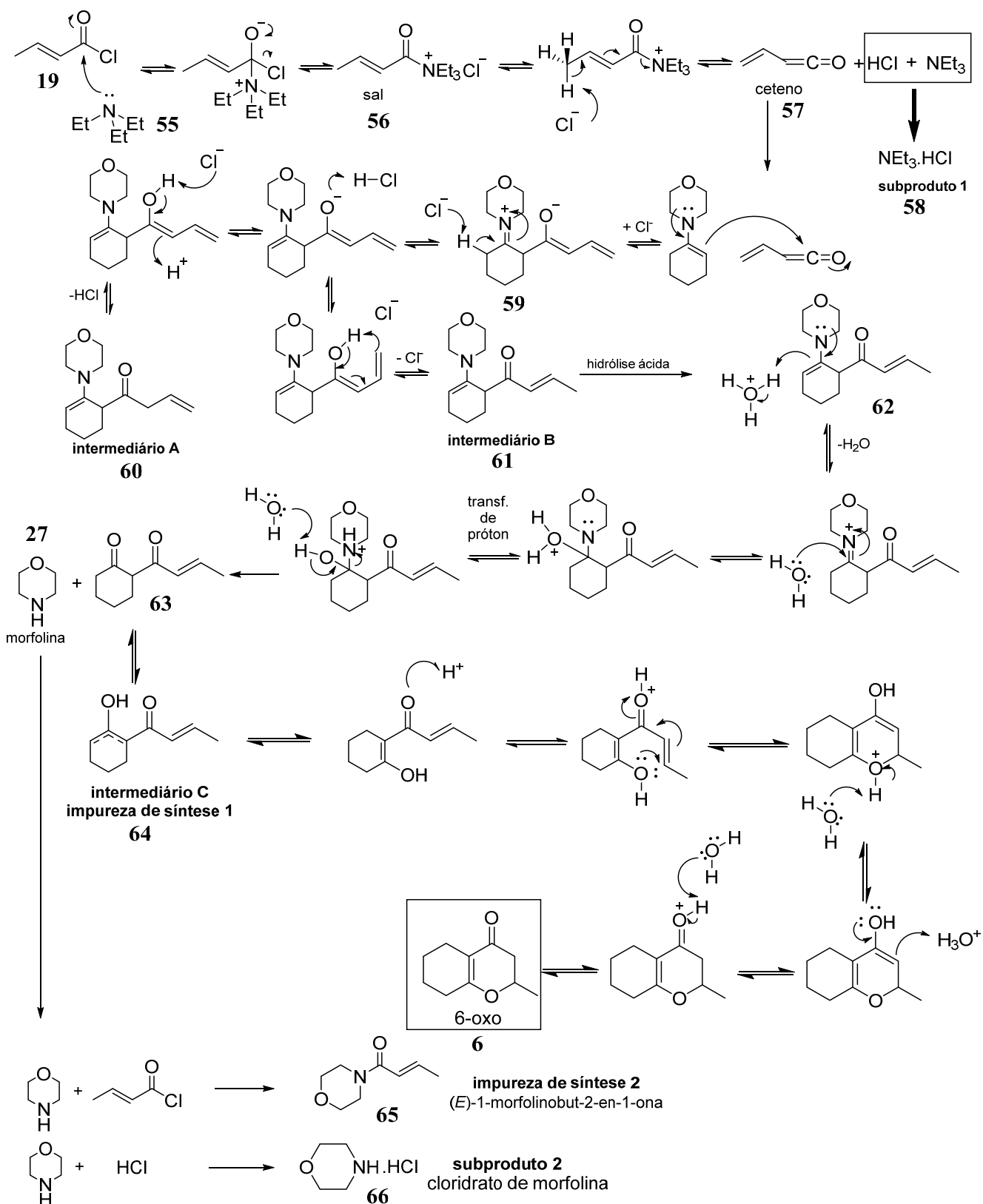
A análise dos dados demonstrou que a 6-oxo apresenta uma pureza média de 99,9 % , com uma incerteza expandida (U) de 0,3%.⁸ Sendo assim, entende-se que o material sintetizado apresenta a pureza adequada para um IFA.

6.4. Perfil de impurezas de síntese

Para o entendimento das possíveis impurezas de síntese avaliou-se a rota sintética da 6-oxo com base no trabalho de Hickmott e colaboradores (1973), o qual promove uma discussão pormenorizada do efeito da trietilamina no curso da reação de cloretos ácidos α,β -insaturados com enaminas.⁷⁸

A proposta de mecanismo para síntese da 6-oxo (Esquema 17) apresenta, como etapa inicial, a reação da trietilamina (**55**) com o cloreto ácido (**19**), formando um sal quaternário de amônio (**56**). Isso impede a acilação da enamina, devido ao grande volume do resíduo de amina terciário incorporado à estrutura do cloreto ácido. Em seguida, temos a retirada do hidrogênio do carbono terminal do sal para formação de um ceteno vinílico (**57**), etapa favorecida pela presença de uma ligação dupla conjugada com a carbonila. Ainda nessa etapa, podemos observar que há também a formação de cloridrato de trietilamina (**58**), um subproduto da reação. Após essa etapa, ocorre a reação de acilação da 1-morfolinociclohexeno pelo ataque nucleofílico da ligação π dessa enamina à carbonila do ceteno, formando um composto zwitteriônico (**59**). Esse composto, em sua forma enólica, pode dar origem a dois intermediários: O intermediário A (**60**) é a forma cetônica do enol. Já o intermediário B (**61**) é formado pelo rearranjo das duplas conjugadas, dando origem a uma enamina acilada α,β -insaturada (**62**). A hidrólise ácida do intermediário B dá origem a uma dicetona (**63**), que na sua forma mais estável, forma o intermediário C (**64**). Apesar de não ser isolado durante o processo, esse composto pode ser considerado o último intermediário da síntese e, por isso, torna-se uma potencial impureza (impureza de síntese 1).

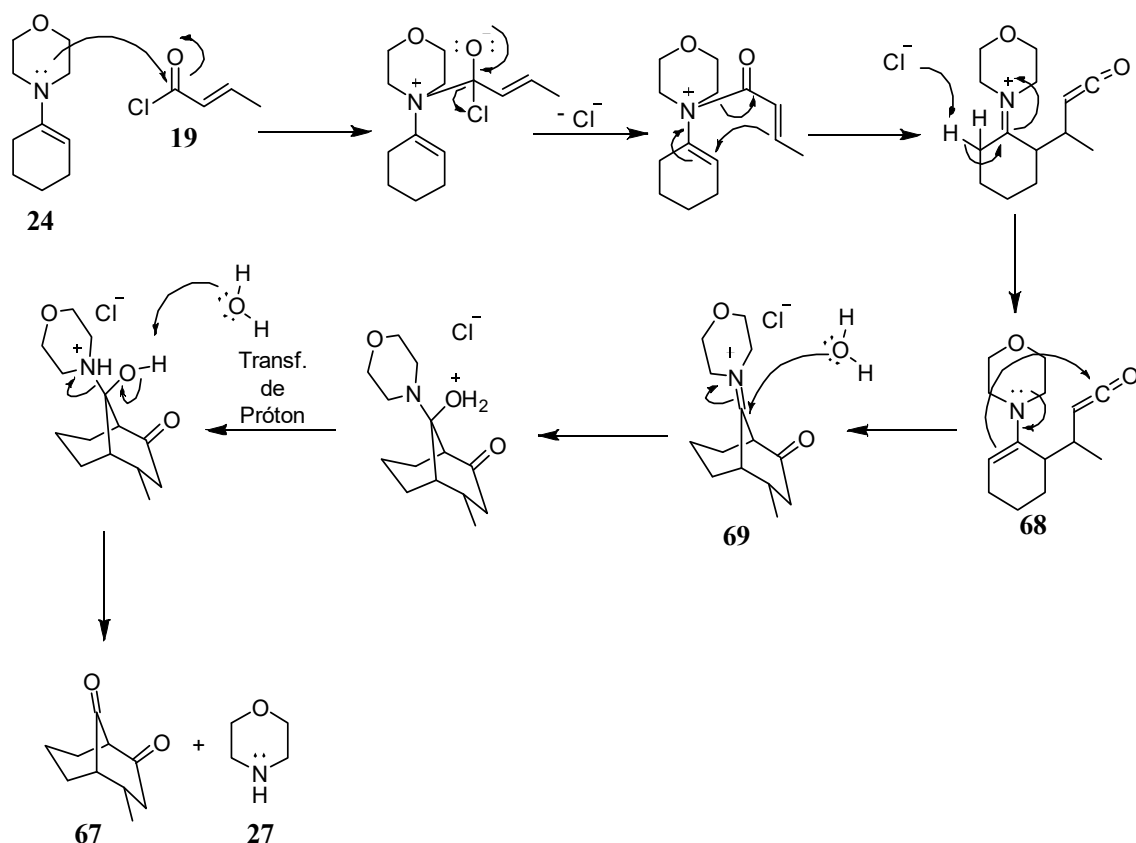
No esquema 17, pode-se notar também que a reação da morfolina (**27**) com o cloreto de crotonila pode dar origem a outra impureza de síntese: (E)-1-morfolinobut-2-en-1-ona (**65**) (impureza de síntese 2).



Esquema 17: Mecanismo de síntese da 6-oxo.

Considerando a possibilidade de uma parcela da enamina (24) reagir com cloreto de crotonila (19) sem a influência da trietilamina, elencou-se outra potencial impureza de síntese: a 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD) (67). Pois, de acordo com Hickmott e colaboradores, esse é

o principal produto da reação 4-(ciclohex-1-en-1-il)morfolina (MCE) com o cloreto de crotonila na ausência da trietilamina.⁷⁸ Segundo o mecanismo proposto por Hickmott (1973) (Esquema 18), a reação é iniciada com a acilação do nitrogênio da MCE, seguida de um rearranjo sigmatrópico [3,3]. Esse processo promove a ciclização do ceteno (**68**) formando um sal de imínio (**69**) que, após a hidrólise, conduz a formação da BCD (**67**).⁷⁸



Esquema 18: Mecanismo de síntese da BCD.⁷⁸

Por último, destaca-se que morfolina também pode ser considerada uma potencial impureza de síntese. Contudo, por ser uma molécula conhecida não será discutida.

6.4.1. (*E*)-1-(2-hidroxiciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB)

Conforme o mecanismo de reação proposto para obtenção da 6-oxo (Esquema 18), é possível observar que a (*E*)-1-(2-hidroxiciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB) (**64**) é o último intermediário de síntese. Dessa forma, a HCB foi considerada uma potencial impureza de processo, devido à possibilidade de contaminação do produto final caso a reação não seja efetiva em sua última etapa. Sua síntese foi baseada no trabalho de Hickmott e colaboradores (1973).⁷⁸ No entanto, foram realizadas

modificações no processo de separação, visando obtenção de uma amostra com o grau de pureza suficiente para sua caracterização.

6.4.1.1. Caracterização

6.4.1.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Por meio da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H da HCB (Figura 55), obtidos a 600 MHz em CDCl_3 , foi possível evidenciar sua estrutura. Em 1,71 ppm foi observado um multipletto (m) relativo aos diversos acoplamentos dos hidrogênios dos grupos metileno 2 e 3. Em 1,94 ppm observou-se a presença de um duplo duplete (dd) relativo ao acoplamento dos hidrogênios do grupo CH_3 com os hidrogênios dos carbonos insaturados 9 ($J= 7,0$ Hz) e 10 ($J= 1,7$ Hz). Em 2,39 e 2,42 ppm foram observados dois tripletos, os quais foram atribuídos, respectivamente, aos acoplamentos dos hidrogênios dos grupos metilenos 3 e 2 com os hidrogênios nas posições 4 e 1. Em 6,34 ppm observou-se um multipletto relativo ao acoplamento do H9 com os H10 e H11. Em 6,97 ppm há a presença de um duplo quarteto (dq) relativo ao acoplamento do H10 com os H9 ($J= 15,0$ Hz) e H11 ($J=7,0$ Hz).

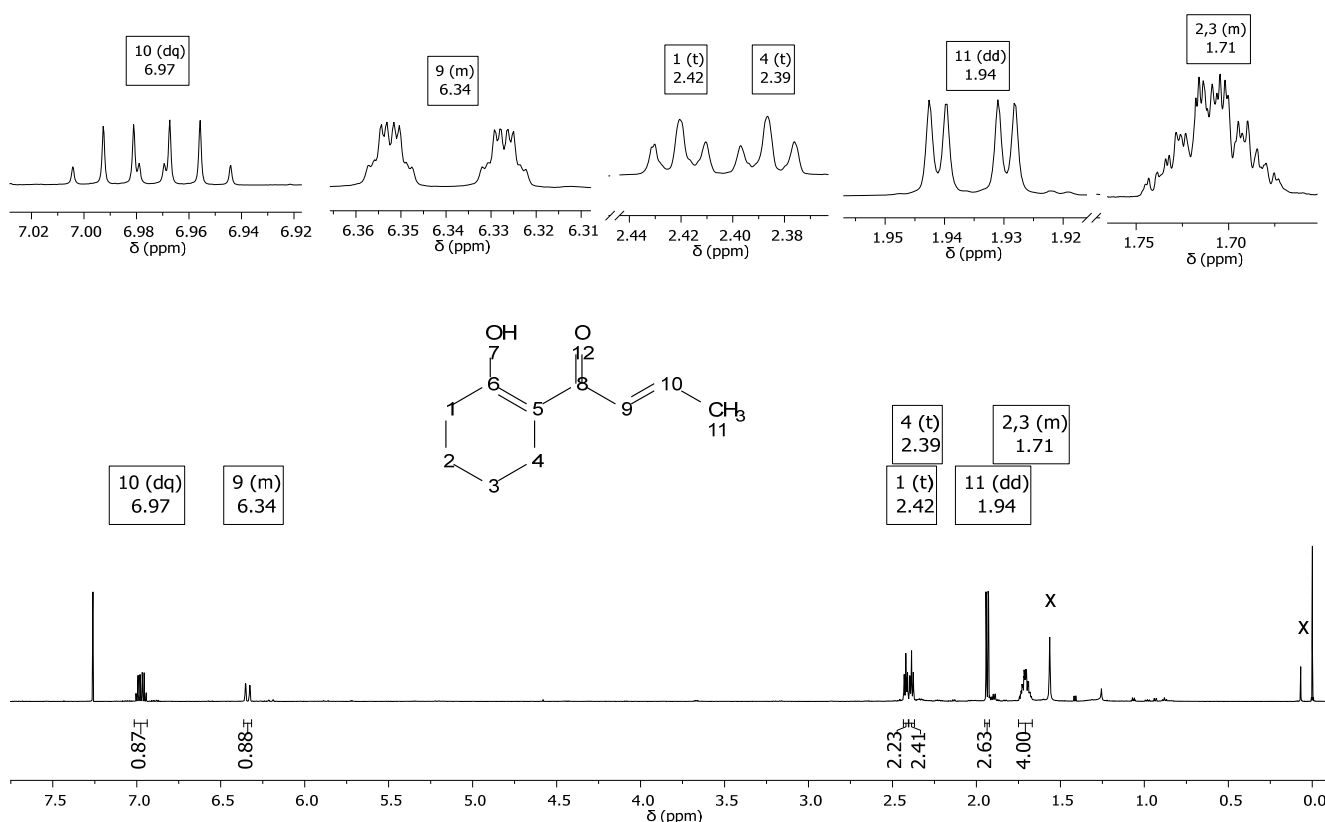


Figura 55: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da HCB.

6.4.1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono -13 (RMN ¹³C)

Os dados espectroscópicos de RMN ¹³C a 151 MHz em CDCl₃ (Figura 56), demonstram que todos os carbonos da molécula apresentam sinais no espectro (figura 39). Em 191,7 ppm observa-se o sinal referente a carbonila da cetona (carbono mais desblindado). O sinal em 182,2 foi atribuído ao carbono do enol na posição 6 da molécula. Em 141,6 ppm e 124,5 ppm, têm-se, respectivamente, os carbonos insaturados 9 e 8 da cadeia lateral. O sinal em 106,1 ppm foi atribuído ao carbono 5 da ligação dupla do enol. Em 33,7 ppm temos o sinal referente ao metileno na posição 1, que está vicinal ao carbono mais desblindado do enol (carbono 6). Os demais sinais dos grupos metilênicos com 23,7, 23,0 e 21,8 ppm, foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos metilênicos nas posições 2, 4 e 3, tendo como base para análise a predição do software MestreReNova® versão 11.0.4-18998. Por último, em 18,7 ppm, observa-se o sinal referente ao grupo metila na posição 10 da molécula.

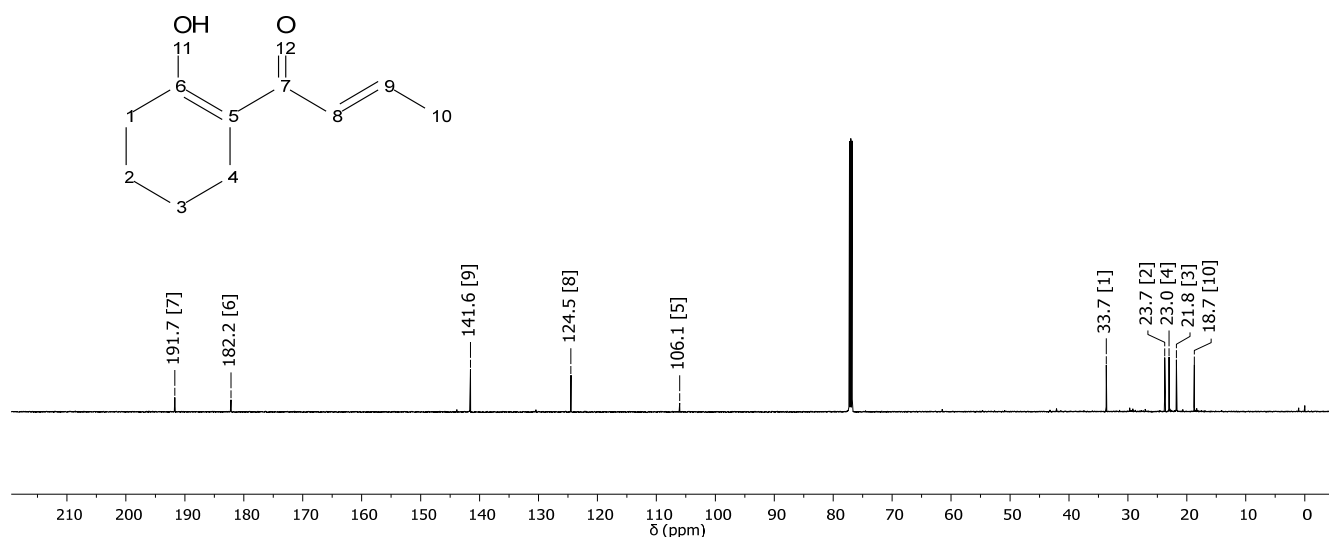


Figura 56: Espectro de RMN ¹³C (151 MHz, CDCl₃) da HCB.

6.4.1.1.3. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Na análise do cromatograma (Figura 57), observou-se que a HCB apresentou um pico com tempo de retenção de 10,27 min. Os cálculos das áreas percentuais demonstraram uma pureza aproximada de 97,0 %.

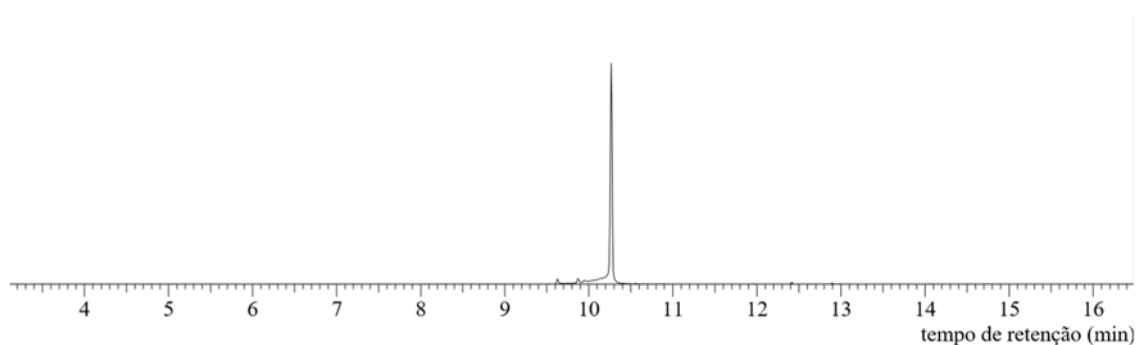


Figura 57: Cromatograma CG-EM da HCB.

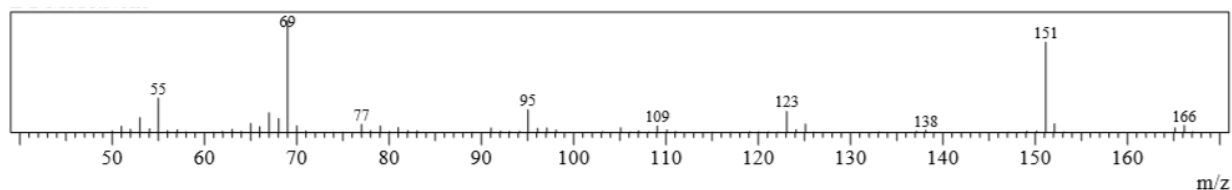
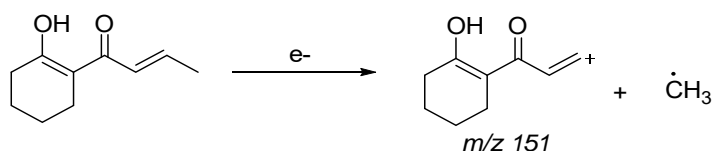


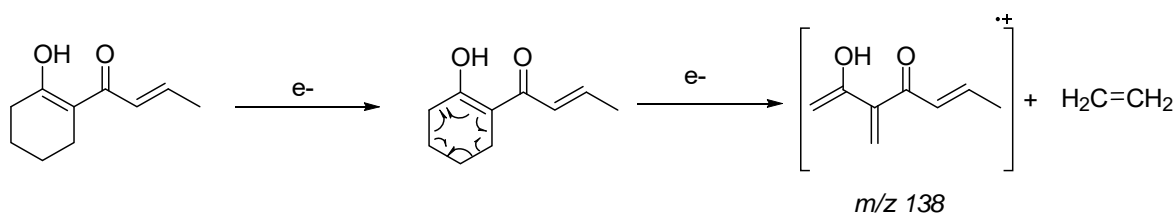
Figura 58: Espectro de massa por impacto de elétrons da HCB.

O espectro de massa da HCB apresentou o pico de íon molecular com m/z 166 e o pico base com m/z 69 (Figura 58). Na primeira fragmentação, o sinal M-15 foi formado pela perda de radical metila da cadeia alifática da molécula (Esquema 19, letra a). A formação do fragmento m/z 138 foi justificada pela liberação de eteno após a ocorrência de uma fragmentação do tipo Retro Diels–Alder (Esquema 19, letra b). A formação do sinal com m/z 123 foi explicada pela fragmentação do cátion m/z 138. Nesse processo, ocorre uma migração de hidrogênio do grupo hidroxila do enol para formação da cetona, conduzindo a formação do cátion acílio para a liberação de um radical metila (Esquema 19, letra c). A presença do cátion m/z 95 foi justificada pela liberação de CO após a migração de um par de elétrons ligação do cátion acílio de m/z 123 (Esquema 19, letra d). A formação do pico base foi atribuída pelo rompimento da ligação alfa carbonila formando o íon acílio com m/z 69.

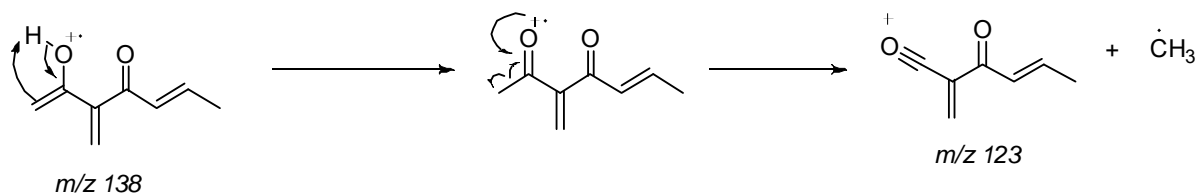
a.



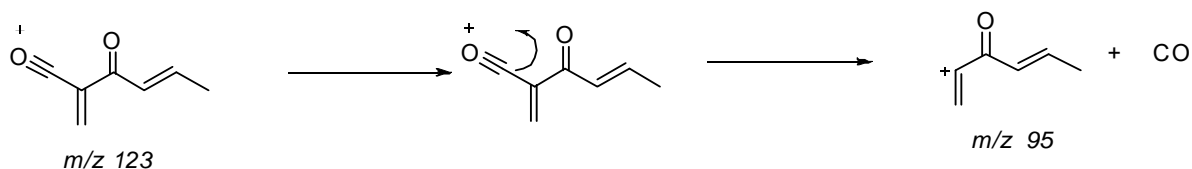
b.



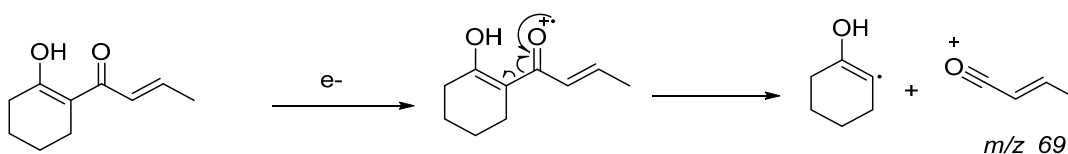
c.



d.



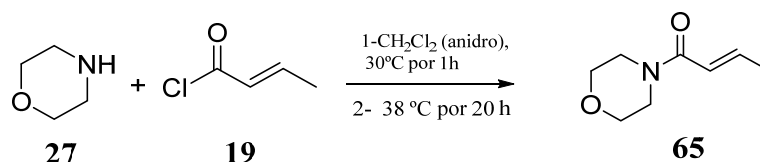
e.



Esquema 19: Propostas de mecanismos de fragmentação da HCB.

6.4.2. A (*E*)-1-morpholinobut-2-en-1-one (MBE)

A (*E*)-1-morfolinobut-2-en-1-ona (MBE) (**65**) foi considerada uma das possíveis impurezas de processo na síntese da 6-oxo, devido a possibilidade de uma reação da morfolina (**27**) (proveniente de uma hidrólise da parcial da enamina ou gerada como um subproduto na reação de acilação da enamina) com o cloreto ácido (**19**). Por esse motivo, a síntese da MBE foi realizada em condições reacionais semelhantes às da síntese da 6-oxo, apesar da literatura apresentar outras alternativas de síntese com bom rendimento (Esquema 20).^{79,80}



Esquema 20: Reação de síntese da MBE.

6.4.2.1. Caracterização

6.4.2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

A análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H da MBE (Figura 59), obtidos a 600 MHz em CDCl_3 , em comparação aos dados reportados na literatura (obtidos a 60 MHz e 100 MHz), é possível notar que os deslocamentos e multiplicidades apresentados nos permitem evidenciar a estrutura da (*E*)-1-morfolinobut-2-en-1-ona.^{79,80} Em 1,10 ppm foi observado um duplo duplete (dd) relativo aos acoplamentos dos hidrogênios do grupo metila (posição 10) com o hidrogênio do grupo CH na posição 9. Na região de 3,48 a 3,75 ppm foi notada a presença de um multipletto, integrado para 8 hidrogênios, referente aos acoplamentos dos grupos metilenos do anel morfolina. Em 6,23 ppm foi observado um duplo quarteto (dq), com constantes de acoplamento de 15,0 e 1,7 Hz, relativas, respectivamente, aos acoplamentos do H8 com os hidrogênios H9 (CH) e H10 (CH_3). Um outro duplo quarteto (dq) foi observado em 6,90 ppm. Esse sinal também apresentou uma constante de acoplamento de 15 Hz, referente ao acoplamento dos hidrogênios olefinicos, e outra de 6,9 Hz, atribuída ao acoplamento a J^3 do H9 com os hidrogênios do grupo CH_3 . Dessa forma, foi possível diferenciar os dois duplos quartetos presentes no espectro de RMN ^1H da molécula.

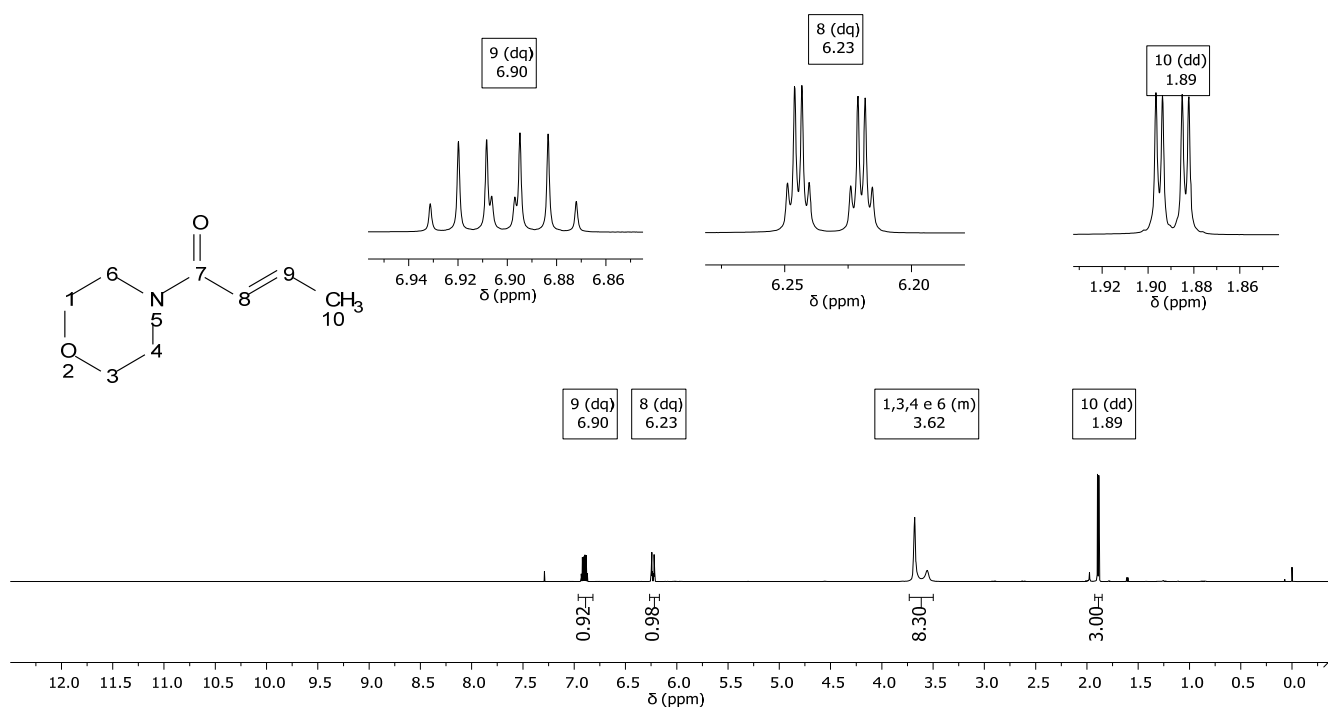


Figura 59: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da MBE.

6.4.2.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono -13 (RMN ^{13}C)

O espectro de RMN ^{13}C a 151 MHz em CDCl_3 (Figura 60) apresentou apenas 7 sinais referentes aos 8 carbonos da molécula. O sinal em 18,3 ppm foi atribuído ao grupo metila, por ser o grupo mais

blindado da molécula. Os sinais em 42,3 e 46,2 ppm foram atribuídos aos grupos metileno vicinais ao nitrogênio (posições 4,6). Pois, apesar da simetria, seus diferentes deslocamentos são justificados pela possibilidade de restrição na livre rotação da ligação nitrogênio-carbonila, durante a aquisição do espectro, por conta do caráter de ligação dupla que a deslocalização do par de elétrons não ligantes no átomo de nitrogênio para o carbono carbonílico apresenta. Os carbonos 1 e 3, que estão ligados ao oxigênio do anel morfolina, apresentaram apenas um sinal em 66,9 ppm, devido a simetria da molécula. Os carbonos olefínicos 8 e 9, foram atribuídos, respectivamente, aos sinais em 121,1 e 142,2 ppm. O sinal em 165,8 ppm foi atribuído a carbonila da amida, por ser o carbono mais desblindado da molécula.

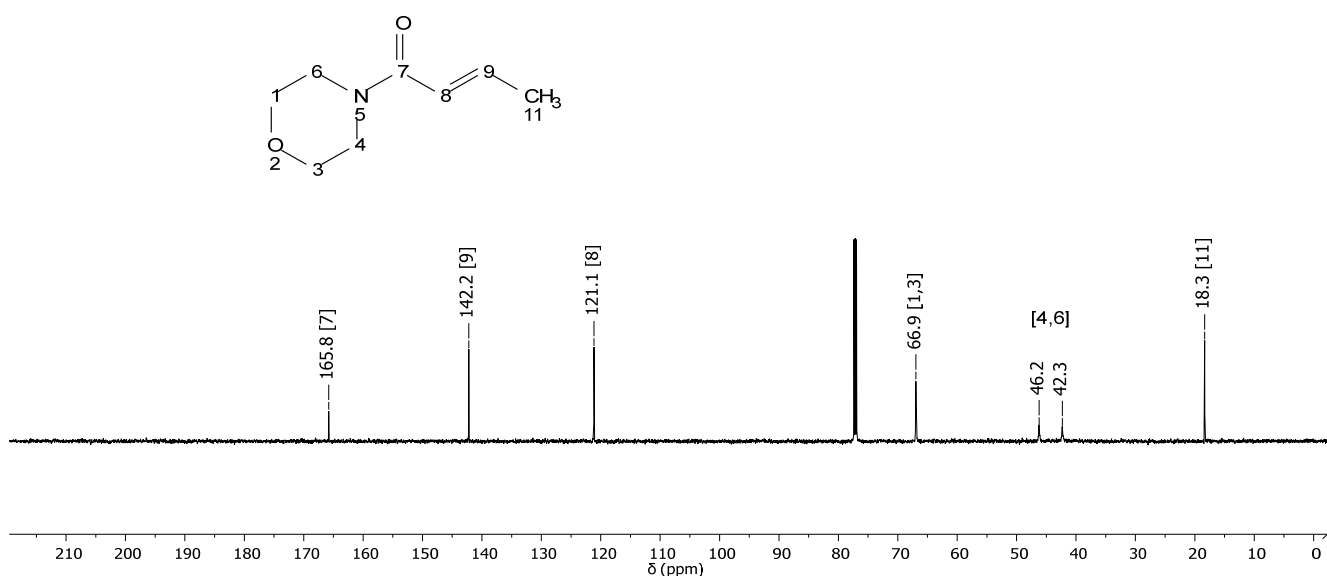


Figura 60: Espectro de RMN ¹³C (151 MHz, CDCl₃) da MBE.

6.4.2.1.1. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Na análise do cromatograma (Figura 61) observou-se que a MBE apresentou um pico com tempo de retenção de 9,7 minutos. Os cálculos das áreas percentuais demonstram uma pureza aproximada de 98,5 %.

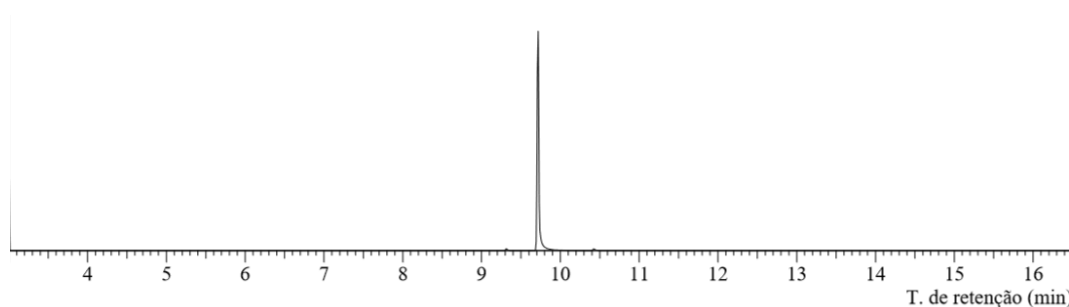


Figura 61: Cromatograma CG-EM da MBE.

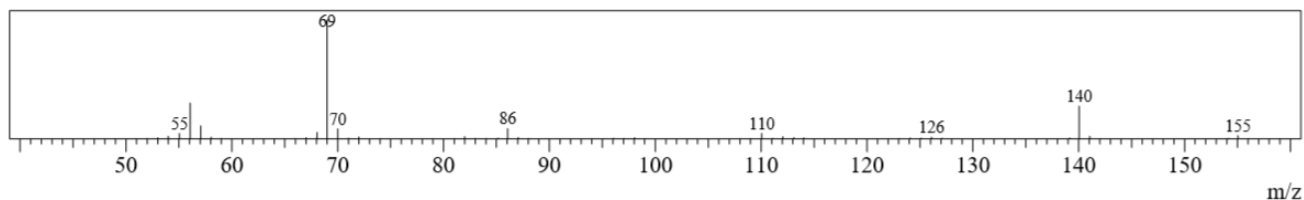
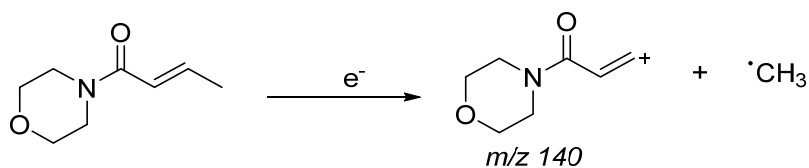


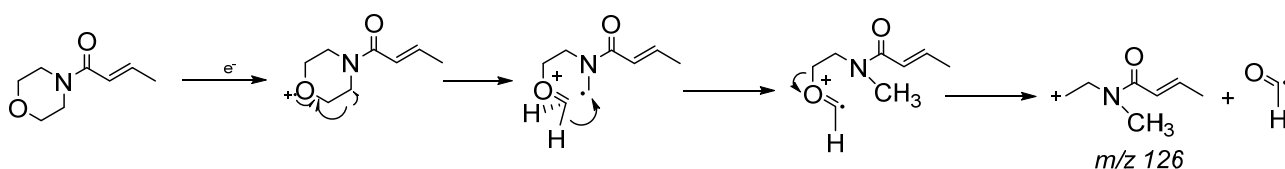
Figura 62: Espectro de massa por impacto de elétrons da MBE.

O espectro de massa da MBE (Figura 62) apresentou o pico de íon molecular com m/z 155 e o pico base com m/z 69. Na primeira fragmentação, o sinal M-15 foi formado pela perda de um radical metila da cadeia alifática da molécula (Esquema 21, letra a). A formação do fragmento m/z 126 foi iniciada com a formação do cátion radicalar no oxigênio da morfolina, seguido dos seguintes eventos: rompimento homolítico da ligação C-C do anel, migração de um átomo de hidrogênio e, por último, rompimento heterolítico da ligação C-O para a liberação do radical formila (Esquema 21, letra b). A formação do fragmento de m/z 86 foi ocorrer devido a geração do cátion morfoliníio, proveniente da cisão homolítica da ligação carbonila – nitrogênio. (Esquema 21, letra c). O pico base com m/z 69 (ion acílio) também é atribuído ao rompimento homolítico da ligação carbonila – nitrogênio. No entanto, o evento de ionização inicial ocorreu nos pares de elétrons não ligantes do oxigênio. (Esquema 21, letra d).

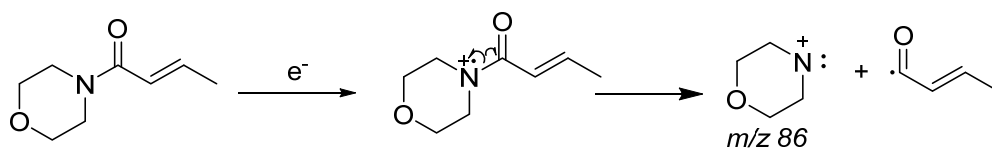
a)



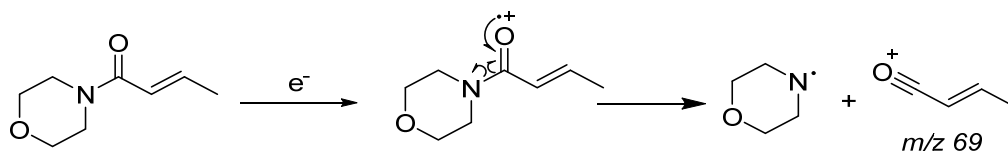
b)



c)



d)



Esquema 21: Propostas de mecanismos de fragmentação da MBE.

6.4.3. 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)

Conforme visto no item 6.4, a possibilidade de uma reação da enamina com o cloreto de crotonila, sem a influência da trietilamina, pode formar a substância: 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD) (67). Diante disso, esse composto foi sintetizado com base no trabalho de Harding e colaboradores.⁸¹

6.4.3.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e COSY

Nos dados espectroscópicos de RMN ¹H a 600 MHz em CDCl₃ (Figura 63), podem ser observados alguns deslocamentos e multiplicidades que permitem evidenciar a estrutura da 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD). Além do espectro de RMN ¹H, foi realizado o experimento COSY (Figura 64), com o objetivo facilitar a atribuição dos sinais da molécula.

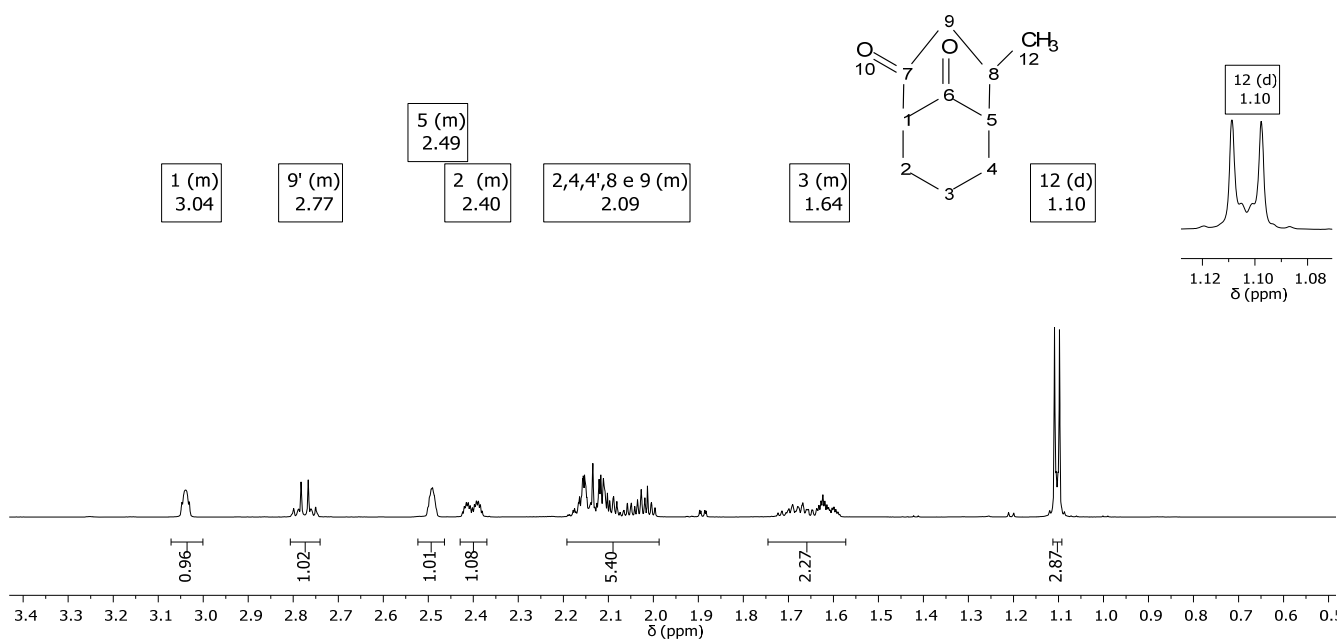


Figura 63: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) da BCD.

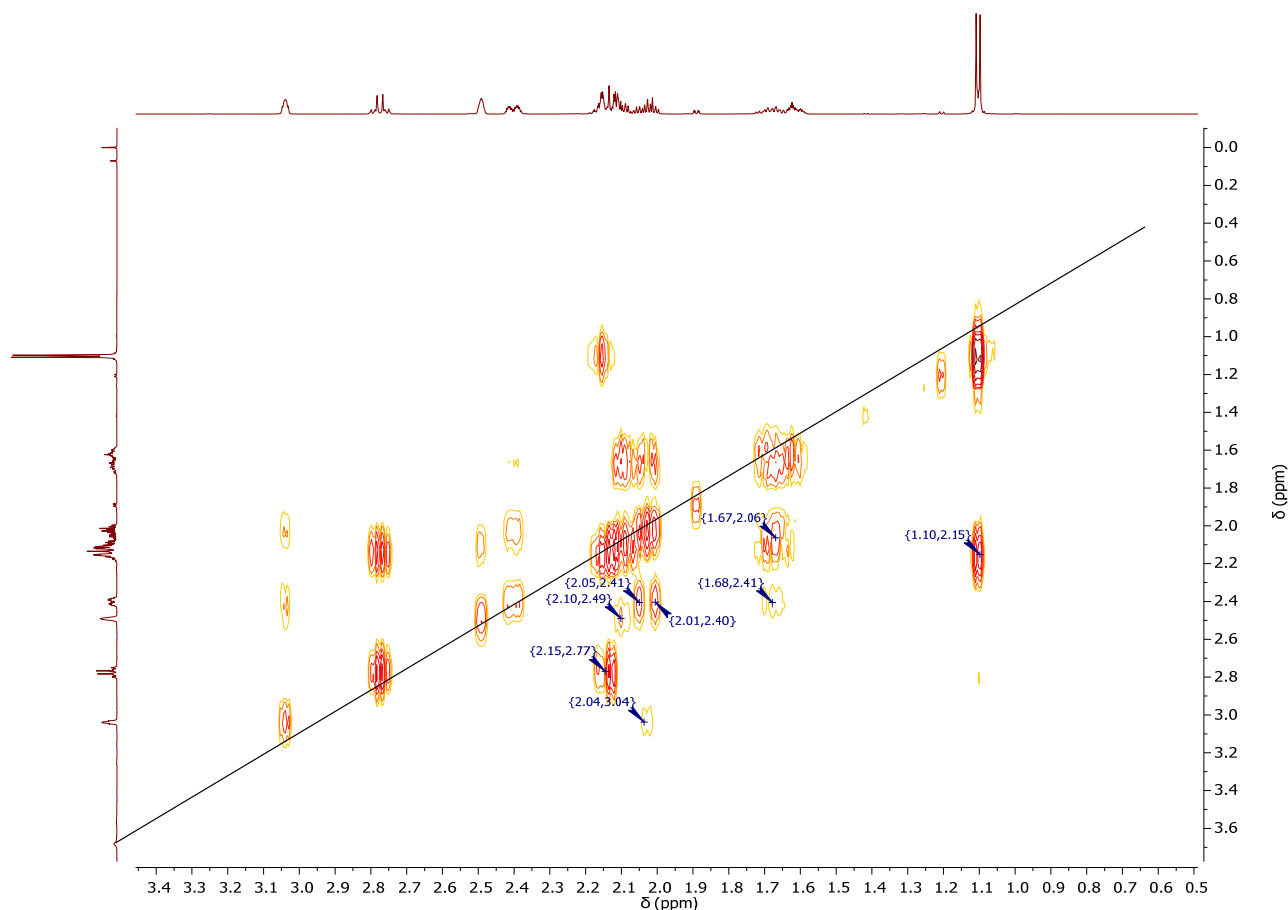


Figura 64: Espectro COSY (600 MHz, CDCl_3) da BCD.

Em 1,10 ppm observa-se um duplete relativo ao acoplamento dos hidrogênios do grupo metila (posição 12) com o hidrogênio do grupo CH na posição 8. Após essa atribuição, pode-se observar que no espectro COSY existe um sinal relativo ao acoplamento dos hidrogênios do grupo CH_3 em 1,10 ppm com um hidrogênio em 2,15 ppm. Considerando a estrutura da molécula, conclui-se que o H8 encontra em dentre os hidrogênios presentes no multiplete com o deslocamento na região de 1,97-2,19 ppm.

Na faixa de 1,57-1,74 ppm observa-se a presença de um multiplete relativo ao grupo metileno na posição 3. A atribuição de seu deslocamento químico foi sugerida em função de sua alta blindagem. A presença de multiplete é justificada pelos acoplamentos dos hidrogênios do metileno na posição 3 com os hidrogênios nas posições 2 e 4, os quais podem ser verificados no espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H (COSY). Haja vista que se observa a presença de um sinal em 1,67 ppm correlacionando-se com um sinal em 2,06 ppm. Outro fato que se pode verificar é a existência de um sinal de correlação dos hidrogênios do grupo metileno na posição 3 com o multiplete em localizado na faixa de 2,36 – 2,43 (sinal em 1,68; 2,41 ppm). Esse sinal foi atribuído ao acoplamento dos hidrogênios do metileno na posição 3 com um dos hidrogênios dos grupos metilênicos na posição 4 ou 2. Dessa forma, verifica-se que os dados do COSY sugerem que dos 5 hidrogênios presentes na região de 1,97-2,19 ppm, temos apenas 3 hidrogênios que pertencentes as posições 2 e 4 da molécula. Haja vista que um dos hidrogênios está localizado no multiplete na região δ 2,36 – 2,43 ppm, pois é possível observar um sinal no COSY

em δ 1,68/2,41 relativo ao acoplamento desse hidrogênio com os hidrogênios do grupo metileno na posição 3.

Os multipletos localizados nas regiões de δ 2,47 - 2,51 e δ 2,65 - 2,86 foram atribuídos aos hidrogênios localizados nas posições 5 e 9 da molécula. Haja vista que ambos possuem maior desblindagem por estarem vizinhos a uma carbonila.

O multipletto de δ 3,02-3,05 foi atribuído ao hidrogênio na posição 1. Pois o H1 está localizado entre as duas carbonilas da BCD.

6.4.3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C)

Os dados espectroscópicos de RMN ^{13}C a 151 MHz, demonstram que todos os carbonos da molécula apresentam sinais no espectro (Figura 65). Além disso, foi realizado o experimento de carbono com APT (Figura 66), com o intuito de identificar os diferentes tipos de carbono na molécula. Por meio dos dados obtidos, observa-se que o sinal do carbono mais blindado com 18,6 ppm pertence ao grupo metileno na posição 3 da molécula. O carbono com 23,27 ppm pertence ao grupo metila na posição 12 da molécula. De acordo com o APT, o sinal em 29,98 ppm indica a presença de um grupo CH, pois temos somente uma metila na molécula. Sabendo-se também que os outros dois grupos CH estão em campo mais baixo, pois são vizinhos a uma carbonila (posições 1 e 5 na molécula), atribuiu-se o 29,28 ppm ao C8 da molécula. Quanto aos outros metilenos identificados no espectro, o que possui maior valor de deslocamento químico é o C9 em 48,44 ppm, pois esse é vicinal a carbonila. Os outros dois sinais foram atribuídos aos metilenos nas posições 2 (δ 35,43) e 4 (δ 35,05) da molécula. De acordo com a estrutura molecular, podemos observar que o C5 é vizinho a uma carbonila enquanto o C1 está localizado entre duas carbonilas e, por isso, o carbono em 53,36 ppm foi atribuído ao C5 e o carbono em 62,57 ppm ao C1. Os valores com 209,67 e 212,20 ppm foram atribuídos as duas carbonilas.

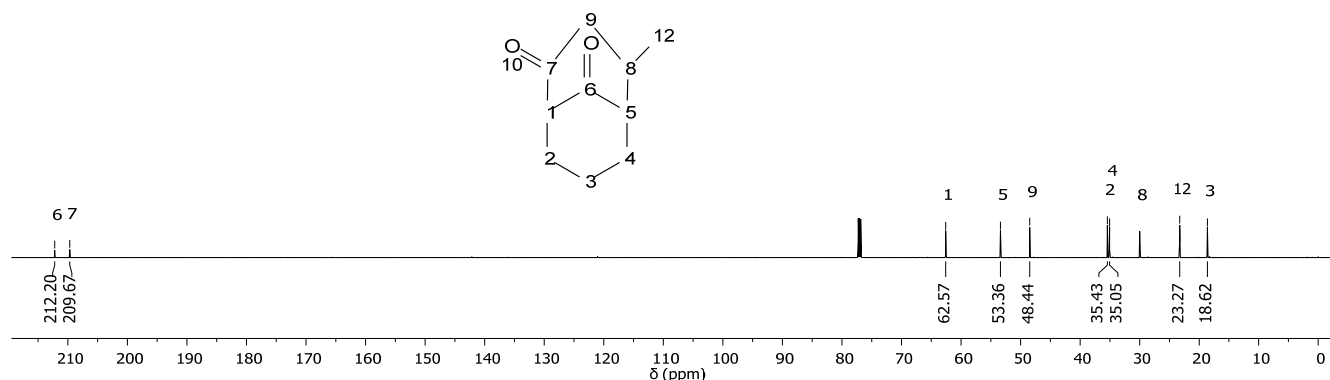


Figura 65: Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da BCD.

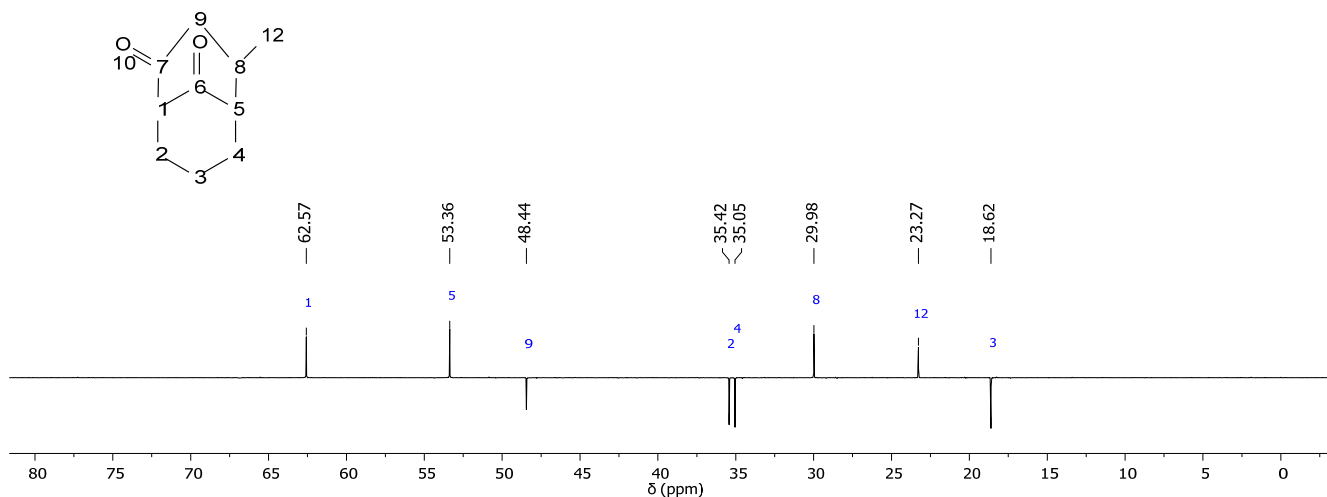


Figura 66: Espectro de RMN ^{13}C com APT (151 MHz, CDCl_3) da BCD.

Tabela 9: Dados espectroscópicos de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)

δ_{C} (ppm)	Número de carbonos	Carbono(s) correspondente(s)
212,2 e 209,6	2	7 e 6
62,5	1	1
53,3	1	5
48,4	1	9
35,4 e 35,0	2	2 e 4
29,9	1	8
23,2	1	12
18,6	1	3

6.4.3.1.3. HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

No espectro de HSQC da BCD (Figura 67) foi possível observar os diversos acoplamentos C-H da molécula. Essas relações foram descritas na Tabela 10. Contudo, esse experimento totalmente conclusivo quanto aos acoplamentos do multipletto na região de 2,36—2,43 ppm, devido à proximidade dos sinais dos carbonos 2 e 4. Essa dúvida foi dirimida com o experimento HMBC (Figura 68), no qual podemos observar o sinal de acoplamento a J^2 do C1 com o H2, demonstrando que o multipletto na região de 2,36—2,43 ppm pertence a um hidrogênio na posição 2.

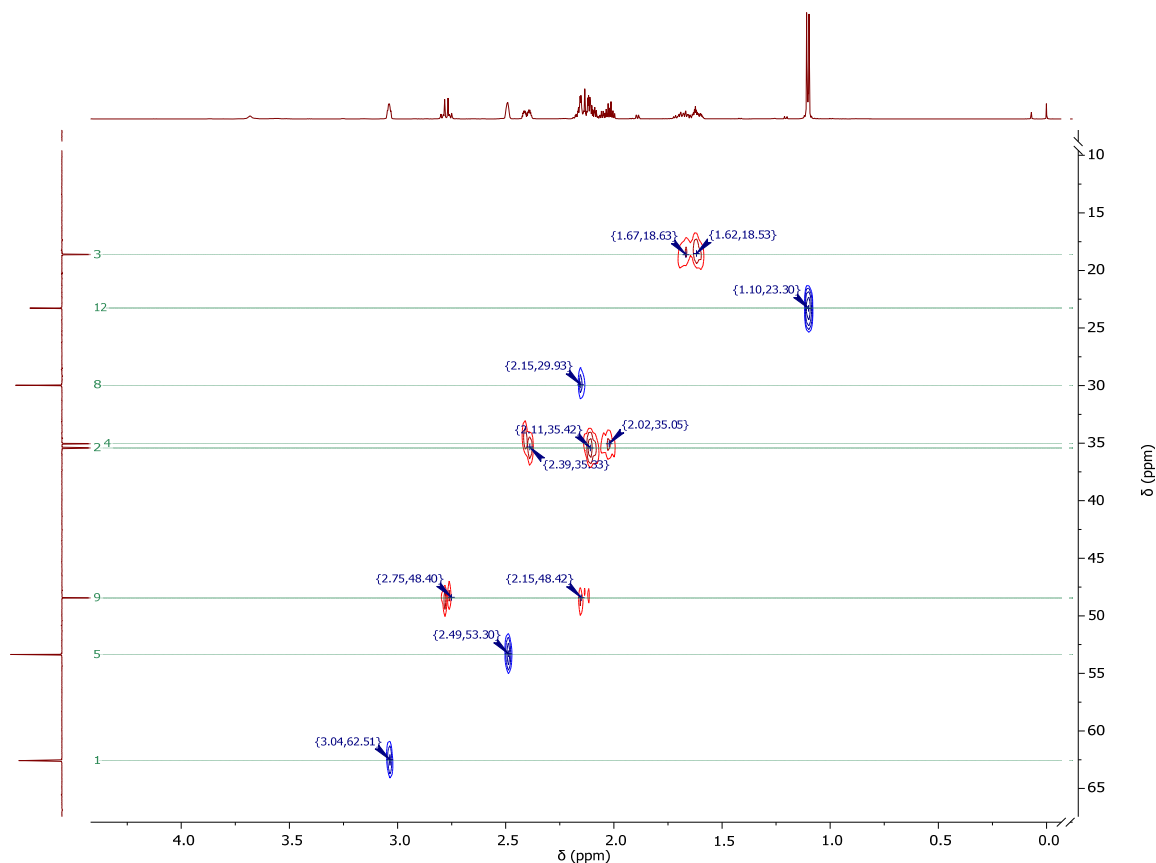


Figura 67:Espectro de HSQC da BCD.

Posição C	δ_C (ppm)	Posição H	δ_H (ppm)	Multiplicidade	Quantidade H
3	18,6	3	1,57-1,54	m	2
12	23,2	12	1,1	d	3
8	29,9	8	1,97-2,19	m	1
4 e 2	35,0 e 35,4	4, 4' e 2	1,97-2,19	m	3
2	35,4	2'	2,36 -2,43	m	1
9	48,4	9	2,86-2,65	m	1
		9'	1,97-2,19	m	1
5	53,3	5	2,51-2,47	m	1
1	62,5	1	3,05-3,02	m	1

Tabela 10: Dados espectroscópicos de HSQC da BCD.

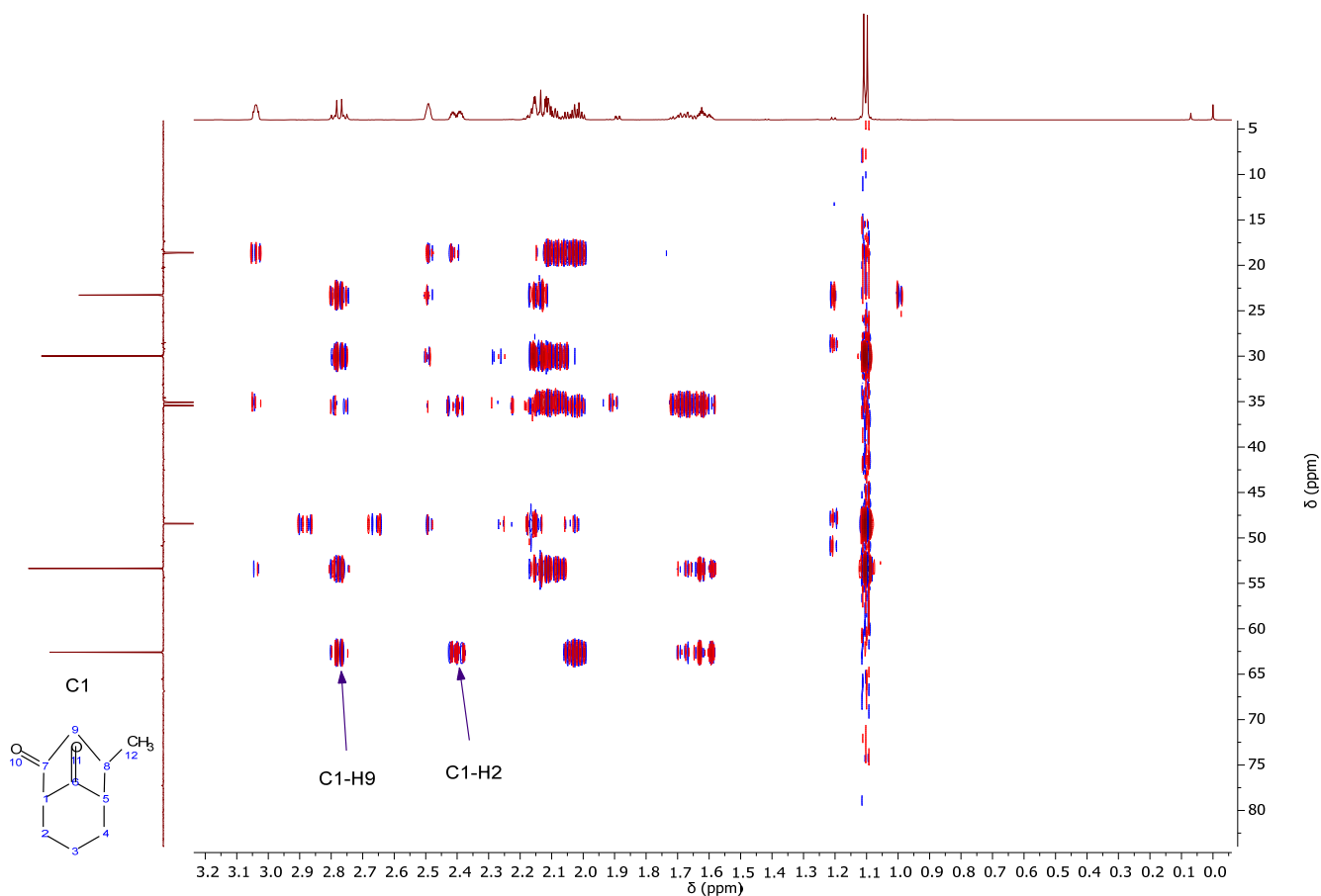


Figura 68: Espectro de HMBC da BCD.

6.4.3.1.4. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Na análise do cromatograma (Figura 69) observou-se que a BCD apresentou um pico com tempo de retenção de 9,68 min. Os cálculos das áreas percentuais foram obtidos eletronicamente no software Lab solution versão 1.01, sem a utilização de um padrão de referência ou fator de correção, e demonstraram uma pureza aproximada de 97,4%. Segundo o cromatograma, a impureza de maior concentração (1,9 %) está em 10,14 min com m/z 166 (Figura 70).

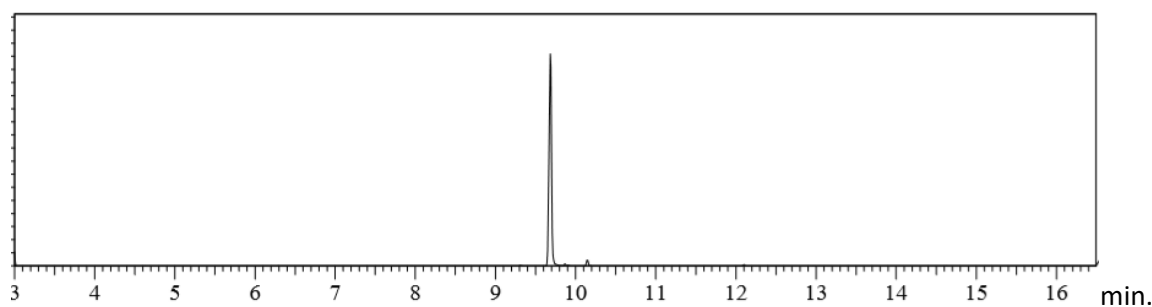


Figura 69: Cromatograma CG-EM da BCD.

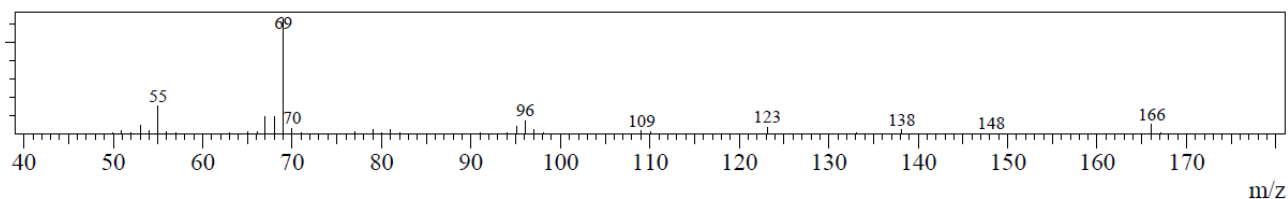
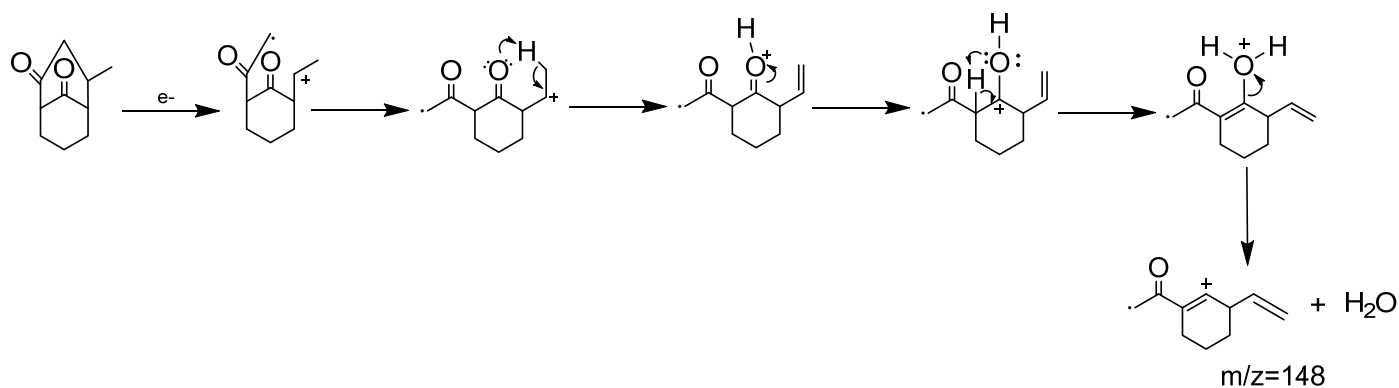


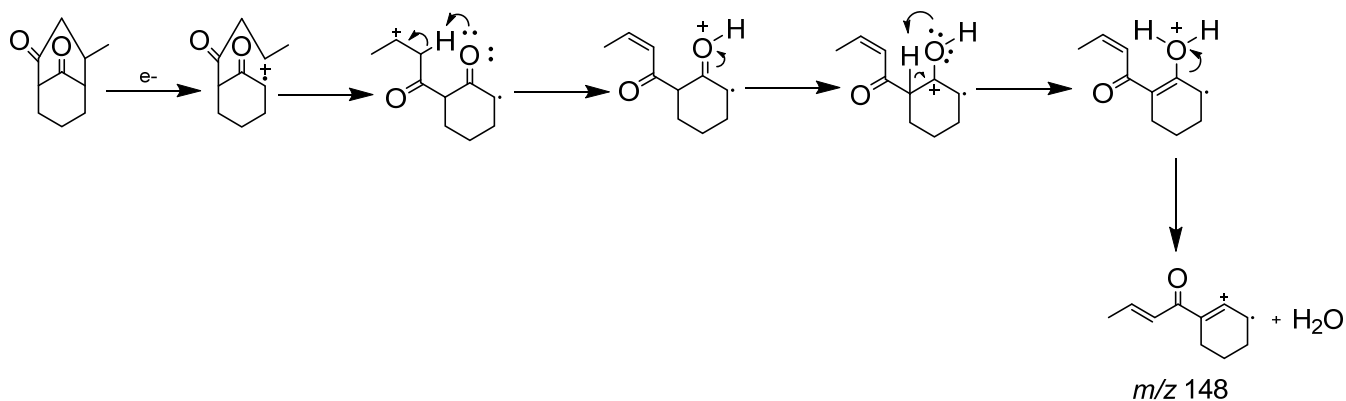
Figura 70: Espectro de massa por impacto de elétrons da BCD.

O espectro de massa da BCD (Figura 70) apresentou o pico de íon molecular com m/z 166 e o pico base com m/z 69. Na primeira fragmentação, o sinal M-18 pode ser atribuído a um perda de água formando o cátion m/z 148, conforme as propostas de mecanismo de fragmentação apresentadas nas letras a e b do esquema 22. A segunda fragmentação, pode ser atribuída a liberação de CO para formação do cátion m/z 138 (Esquema 22, letra c). A fragmentação do íon molecular m/z 128 com liberação do radical metil dá origem ao pico m/z 123 (Esquema 22, letra d). A formação do cátion com m/z 109 foi atribuída a uma sequência de fragmentação iniciada com a formação do íon de m/z 151 (o qual não aparece no espectro de massa devido a sua baixa abundância relativa) e com a liberação de um radical metila (letra e do Esquema 22). Posteriormente, ocorre a formação do íon de m/z 109 devido a liberação de um ceteno (etenona). A formação do cátion de m/z 96 foi justificada pela fragmentação do íon m/z 138 coma liberação de propeno (Esquema 22, letra f). Por último, o pico base também foi atribuído a fragmentação do íon de $m/z=$ 138. Entretanto, nessa fragmentação ocorre a formação do íon $m/z=$ 69 e a liberação do radical 3-metil-but-1-eno (Esquema 22, letra g).

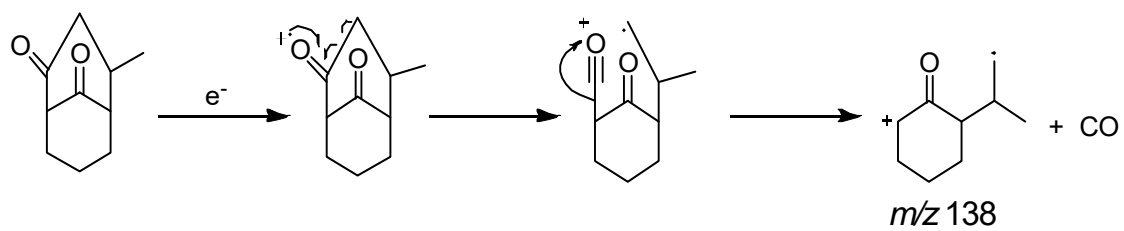
a)



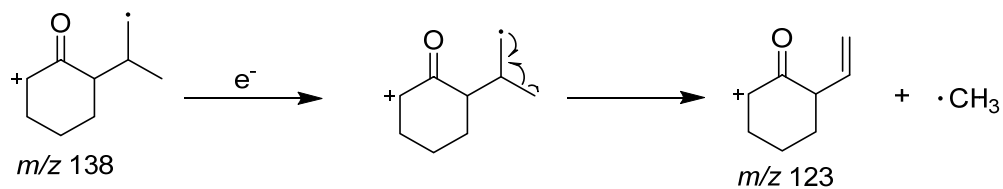
b)



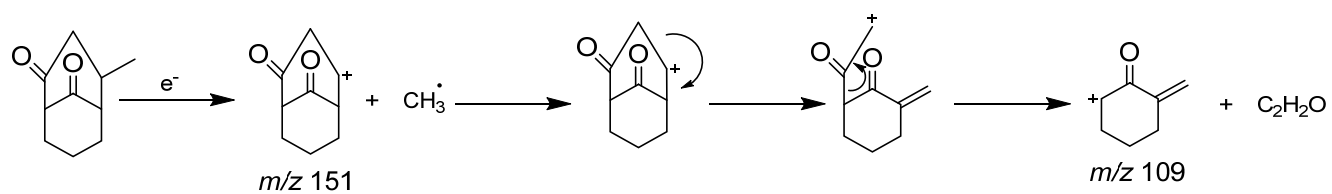
c)



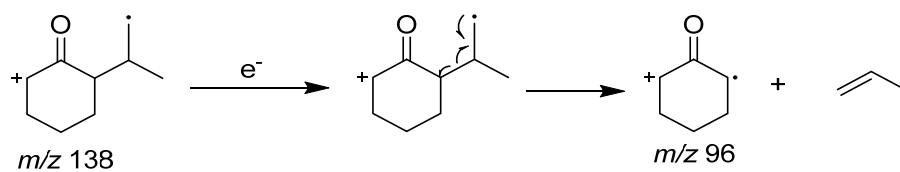
d)



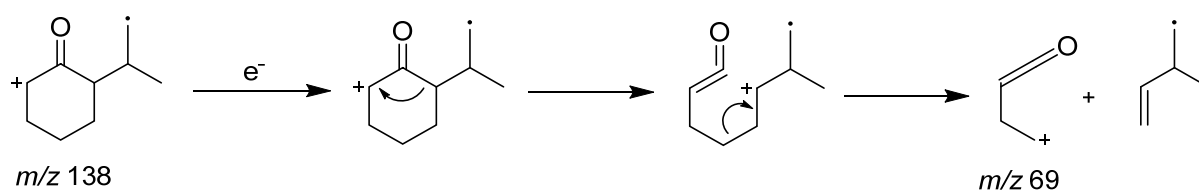
e)



f)



g)



Esquema 22: Proposta de mecanismos de fragmentação da BCD.

7. Testes de degradação forçada (estudos de estresse)

Nos testes de degradação forçada, a estabilidade da 6-oxo foi avaliada considerando os seguintes fatores: temperatura, oxidação, luz e susceptibilidade à hidrólise ácida e básica.

Todos os estudos de estresse foram conduzidos com apenas 1 (um) lote do insumo, conforme prevê o artigo 47 da RDC n°. 45/2012 da Anvisa.³⁴

7.1. Ensaio de degradação forçada em condições ácidas

Para os testes iniciais, foram preparadas soluções de 6-oxo na concentração de 5 mg/mL em HCl 0,1 mol/L, as quais foram colocadas em frascos do tipo Schlenk e permaneceram a 40 °C em estufa, em tempos que variaram de 1 a 7 dias. Após cada ensaio, as amostras (8 mL cada) foram extraídas com diclorometano (3 x 10 mL) e secas sob sulfato de sódio anidro. Depois, as soluções foram colocadas em evaporador rotativo e em bomba de vácuo, para remoção do diclorometano. Os produtos foram analisados por CG-EM (Figura 71). Os resultados indicaram que não houve a formação de produtos de degradação.

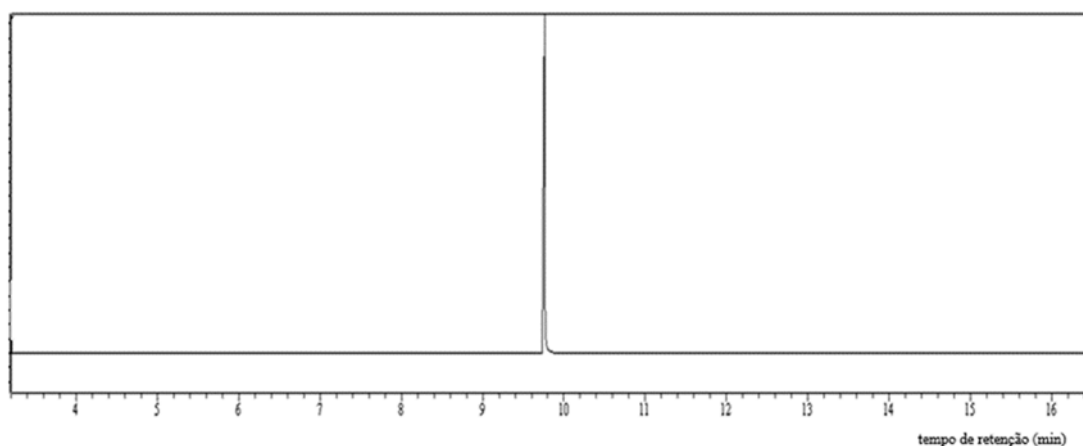


Figura 71: Cromatograma de CG-EM da amostra de 6-oxo após teste de degradação forçada em condições ácidas (HCl 0,1 mol/L, a 40 °C por 7 dias).

Em uma segunda abordagem, manteve-se a concentração inicial da solução ácida (0,1 mol/L) e elevou-se a temperatura para 60 °C. As amostras foram submetidas as essas condições por um tempo máximo de 7 dias. Contudo, também não foram encontrados indícios de formação de produtos de degradação.

Diante dos resultados anteriores, tentou-se aumentar a concentração do ácido para 1 mol/L e manter a temperatura de 60 °C. Apesar disso, foi verificado que a amostra não apresentou indícios de degradação no tempo máximo (7 dias).

Em uma última tentativa, a degradação ácida foi conduzida em soluções aquosas de HCl 6 mol/L a 75 °C por 6 horas. Visando mimetizar as condições ácidas da reação de síntese. As análises por espectrometria de massas de alta resolução - EMAR (Figura 72) não mostraram a presença de possíveis produtos de degradação. O espectro de massa obtido apresentou como íon mais abundante o sinal $(M+H)^+$ de m/z 167,1066 (íon molecular) e, em alguns casos, a presença do aduto com sódio $(M+23)^+$ de m/z 189,0884. Dessa forma, a molécula foi considerada estável para as condições de estresse utilizadas.

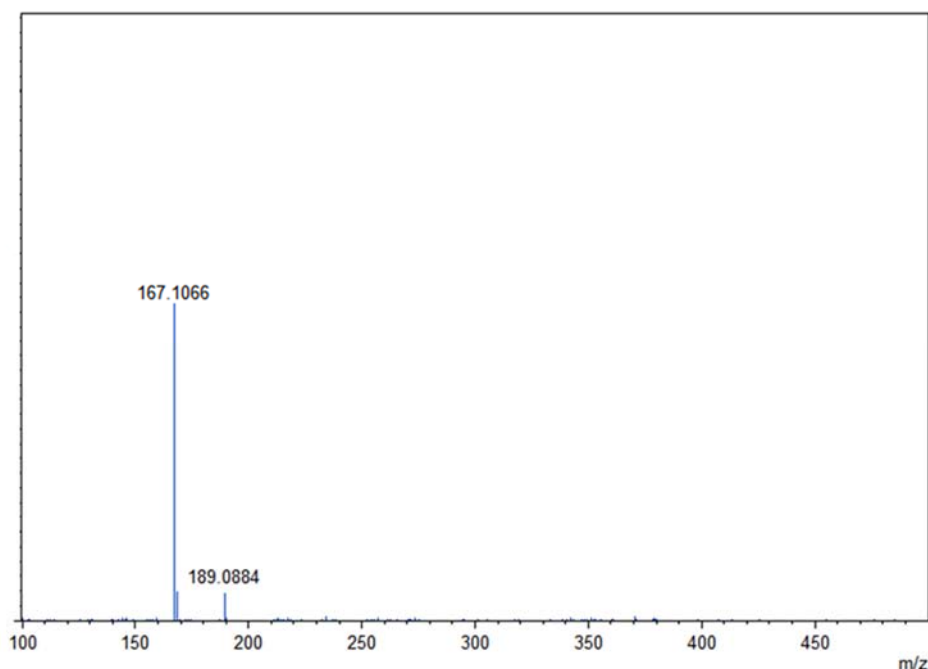


Figura 72: Espectro de EMAR da 6-oxo após teste de degradação forçada em condições ácidas (HCl 6 mol/L, 75 °C por 6 h).

7.2. Ensaio de degradação forçada em condições básicas

Para os testes iniciais de degradação forçada em soluções em soluções alcalinas, foram preparadas soluções de 6-oxo na concentração de 5 mg/mL em NaOH 0,01 mol/L. As soluções foram colocadas em frascos do tipo Schlenk e permaneceram a 30 °C, em tempos que variaram de 24 a 168 h (1 a 7 dias). Após o término de cada ensaio, as amostras (8 mL cada) foram extraídas com diclorometano (3 x 10 mL) e secas com sulfato de sódio anidro. Posteriormente, as soluções foram colocadas em evaporador rotativo e bomba de vácuo, para remoção dos voláteis. Os produtos obtidos foram dissolvidos em acetonitrila e analisados por CG-EM. Contudo, não foram identificados quaisquer produtos de degradação.

Para execução de novos testes com maior basicidade, foram preparadas soluções de 6-oxo na concentração de 5 mg/mL em NaOH 0,1 mol/L. Essas soluções foram colocadas em frascos do tipo

Schlenk e permaneceram a 30 °C, em tempos que variaram de 12 a 144 h. As amostras foram extraídas e tratadas utilizando o mesmo procedimento das amostras anteriores. Os produtos obtidos foram dissolvidos em acetonitrila e analisados por CG-EM nos seguintes tempos: 12, 24, 48, 96 e 144 h.

No cromatograma da amostra de 12 h (Figura 73, letra a), observou-se uma degradação da 6-oxo de 19,6 %, com formação de apenas uma impureza de m/z 192 (Figura 74) em 11,2 min. Para os demais tempos, observou-se uma porcentagem de degradação crescente (Figura 75), as quais apresentaram o mesmo perfil de formação de impureza. No tempo máximo (144 h), considerou-se a completa da 6-oxo, pois obteve-se uma degradação de 99,8% da amostra inicial (Figura 73, letra a).

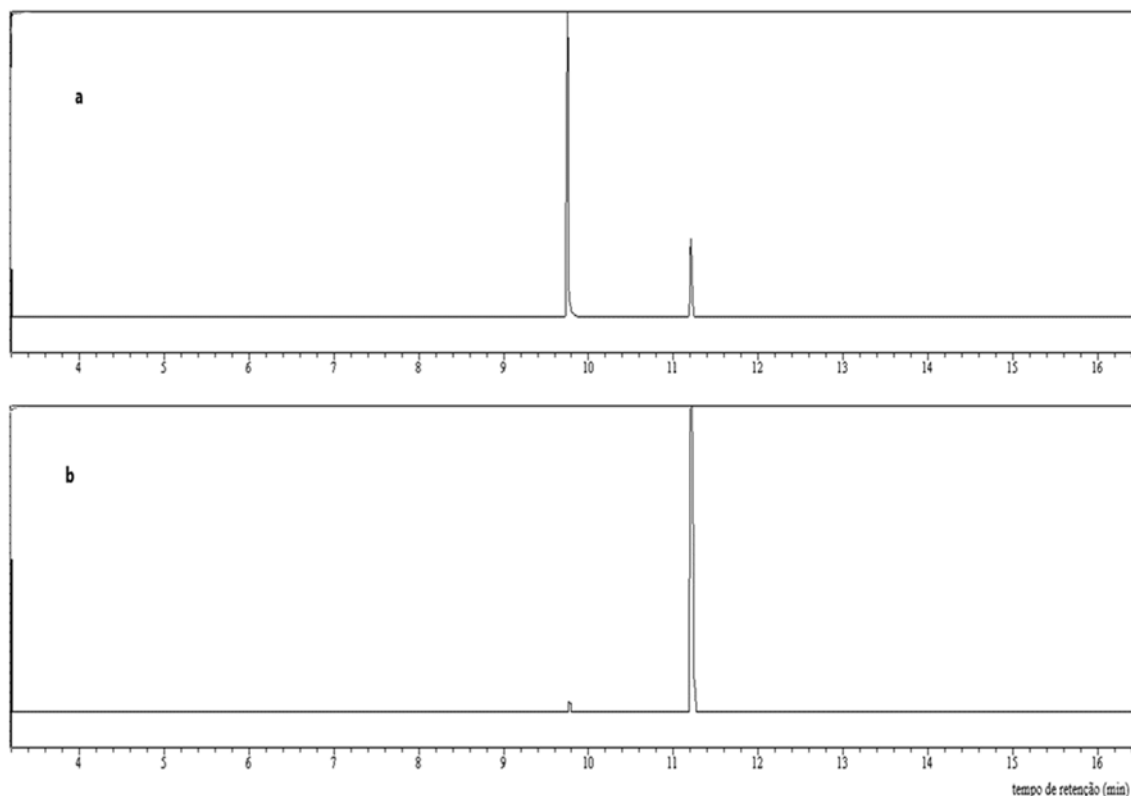


Figura 73: Cromatogramas por CG-EM das amostras de 6-oxo após os testes de degradação forçada em condições básicas (5 mg/mL em NaOH 0,1 mol/L) a 30 °C: **a-** 12 h e **b-** 144 h.

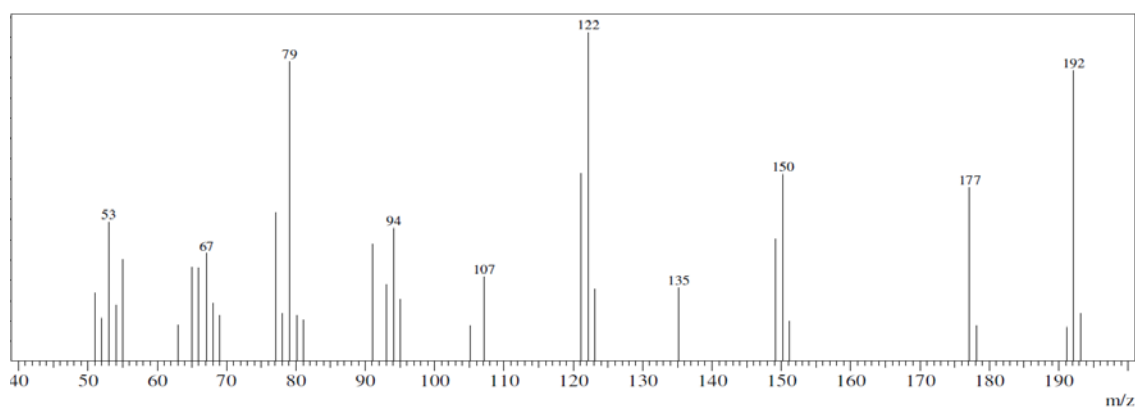


Figura 74: Espectro de massas por impacto de elétrons da impureza de m/z 192.

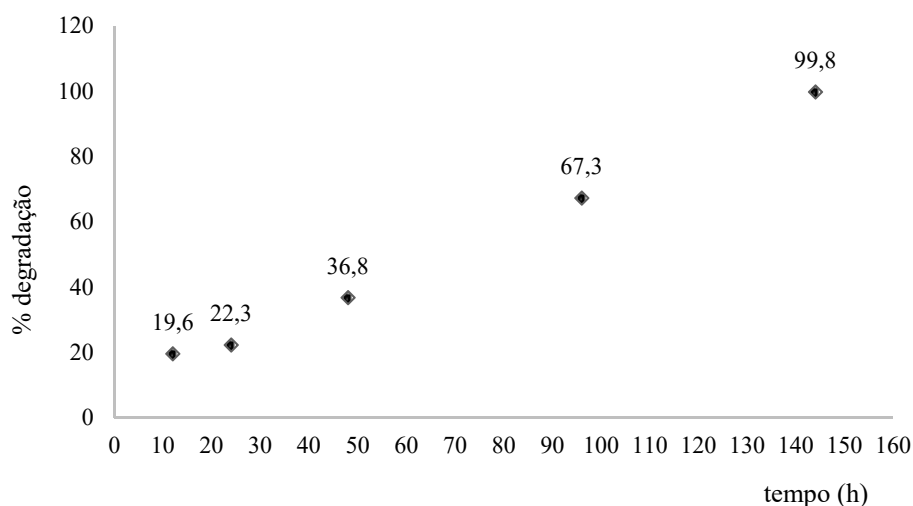


Figura 75: Porcentagens de degradação das amostras de 6-oxo em condições básicas (5 mg/mL em NaOH 0,1 mol/L) a 30 °C nos tempos: 12, 24, 48, 96 e 144 h

Com intuito de confirmar a massa molecular da impureza gerada, a amostra de 144 h foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR). O espectro de massas (Figura 76) apresentou como íon mais abundante o sinal $(M+H)^+$ de m/z 193,1224 (íon molecular). Outros íons, comuns ao espectro de massas obtido por CG-EM, também puderam ser identificados, como por exemplo: 151,0702 Da e 123,0757 Da.

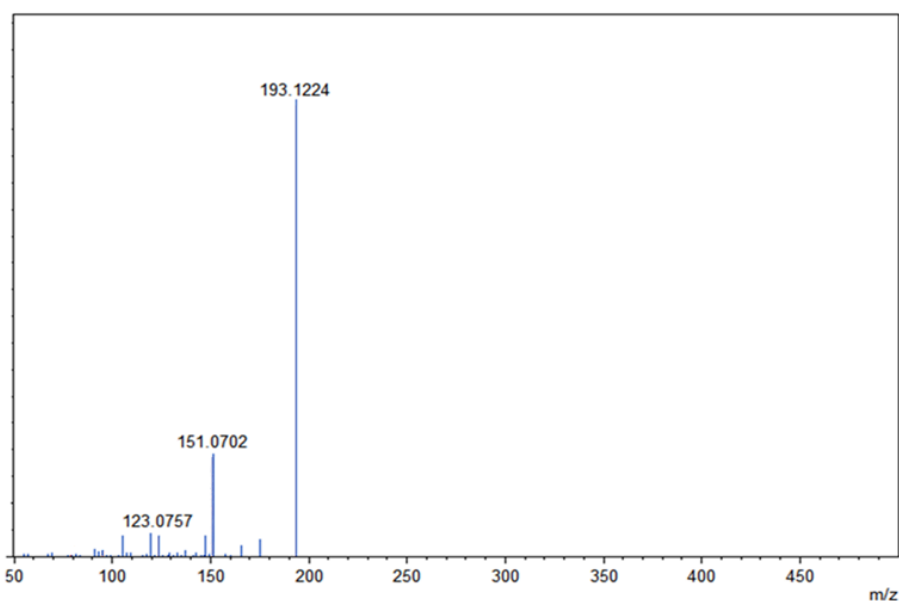


Figura 76: Espectro de massas de alta resolução da impureza m/z 192.

Considerando que alguns programas permitem o cálculo da fórmula molecular a partir de uma única massa medida, utilizou-se a ferramenta “Massa para Fórmula” do programa mMass (free open source software, 2013, versão 5.5) para gerar possíveis fórmulas moleculares para a impureza encontrada. Obteve-se como resultado mais provável a fórmula: $C_{12}H_{16}O_2$.

Na tentativa de elucidar a estrutura molecular da impureza formada, a amostra foi analisada por RMN de ^1H e ^{13}C . Os dados espectroscópicos de RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 da impureza de m/z 192 (Figura 77) demonstram que a molécula ainda mantém alguns aspectos semelhantes ao espectro da 6-oxo:

- 4,44 ppm (dq, $J = 12,8; 6,3; 3,9$ Hz, 1H) – devido aos três diferentes acoplamentos do H8, sendo dois com os hidrogênios diastereotópicos (13 e 14) e o terceiro com os hidrogênios da metila (12);
- 2,46 ppm (dd, $J = 16,7; 13,3$ Hz, 1H) e δ (ppm) 2,40 (dd, $J = 16,7; 3,9$ Hz, 1H) – devido aos diferentes acoplamentos dos hidrogênios diastereotópicos entre si e com o hidrogênio na posição 8;
- 1,41 ppm (d, $J = 6,3$ Hz, 3H) - devido ao acoplamento dos hidrogênios do grupo metila com o hidrogênio na posição 8.
- Multipletos: 2,35 – 2,12 (m, 4H) e 1,28 – 1,22 (m, 2H) – aparecem em regiões semelhantes as encontradas na 6-oxo

Outros sinais não apresentaram correlação com a molécula original, como por exemplo, os singletos largos em 5,30 ppm (1H), 1,58 ppm (6H) e em 1,26 ppm (2H) e o multipletto na região de 1,52 – 1,44 (m, 1H). Além disso, integração desses sinais elevou o número de hidrogênios de 12 para 22, o que ultrapassou o número de hidrogênios esperados para molécula, que era de 16.

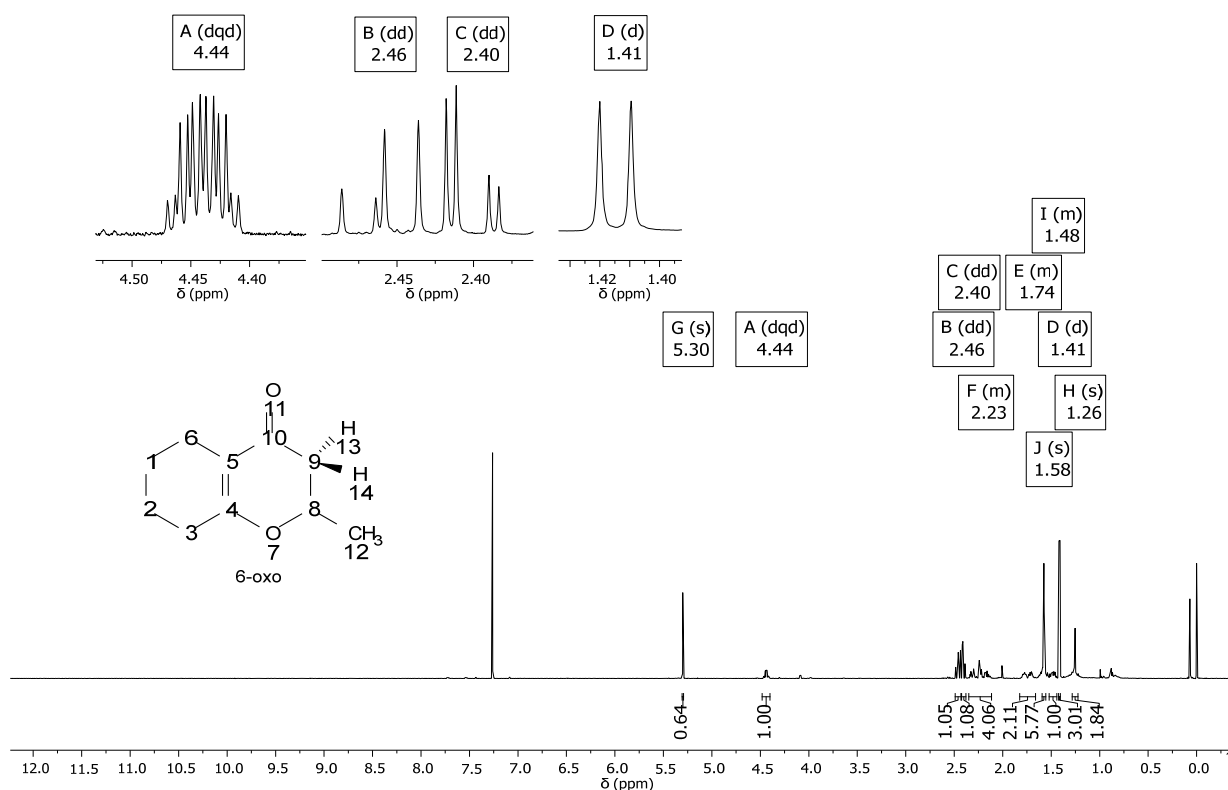


Figura 77: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) da impureza de m/z 192.

Os dados espectroscópicos de RMN ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 (Figura 78) demonstraram a presença de 14 carbonos: δ (ppm) 193,4; 164,0; 130,9; 127,3; 112,1; 77,2; 74,2; 43,3; 29,7; 25,2; 21,5; 21,3; 20,7 e 13,91, dois a mais do que o esperado para a molécula.

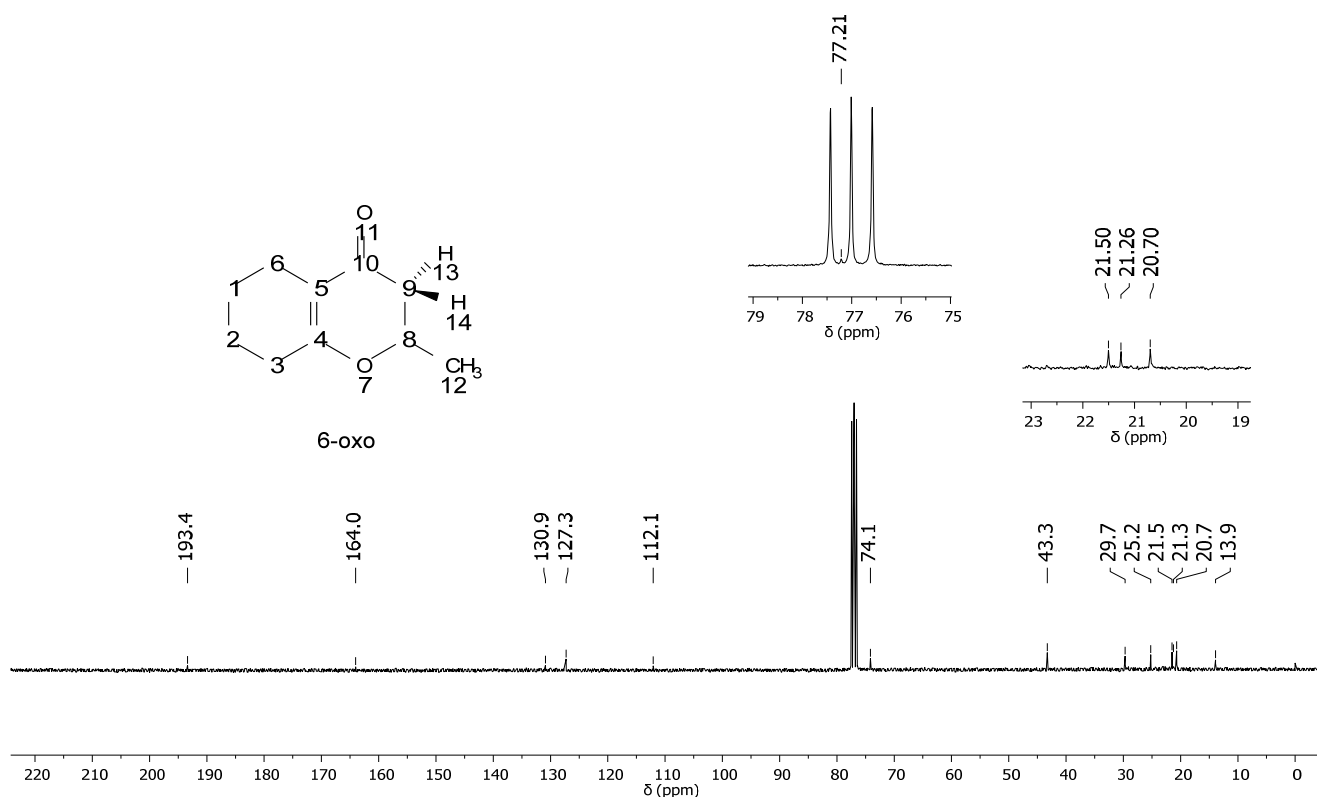


Figura 78: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da impureza de m/z 192.

Da mesma forma que no espectro de RMN ^1H , foi possível notar alguns sinais apresentaram deslocamento idênticos aos sinais obtidos para a 6-oxo: 112,1 (C5); 74,1 (C8); 43,3 (C9) e 20,7 (C12). Isso indica a parte da molécula que contém a cicloenona não sofreu degradação durante os estudos realizados.

Diante do exposto, considera-se que apesar dos dados analíticos não fornecerem informações suficientes para uma completa identificação da estrutura molecular da impureza, a molécula de m/z 192 foi isolada para e os estudos de degradação forçada em meio básico apresentaram boa reprodutibilidade. Além disso, é preciso considerar que as soluções utilizadas durante a síntese da 6-oxo possuem caráter predominantemente ácido, o que minimiza a possibilidade formação dessa impureza durante o processo.

7.3. Ensaios de degradação forçada fotolíticos

Nos testes de degradação forçada com luz, utilizou-se uma câmara construída pela equipe do Laboratório de Inorgânica de Materiais-LIMA do Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ-

UnB) (Figura 79), pois não dispúnhamos de uma câmara para testes de fotoestabilidade em nosso laboratório. Tal câmara é formada por uma caixa de madeira revestida internamente com papel alumínio, com dimensões de 420 x 620 x 700 mm (A x L x C), tampa frontal móvel, duas ventoinhas laterais e lâmpada LED (formato pera, 15 W, temperatura da cor: 6500 K e fluxo luminoso: 1350 lm). As amostras de 20 mg de 6-oxo foram colocadas em placas de Petri e permaneceram por 30 dias sob radiação direta, a uma distância aproximada de 220 mm da fonte luminosa.



Figura 79: Câmara utilizada nos testes de degradação forçada com luz

Após o experimento, as amostras irradiadas foram dissolvidas em acetonitrila e analisadas por CG-EM (Figura 80) e CLAE-UV (Figura 81). Não foram identificados quaisquer picos de impurezas nos cromatogramas das amostras analisadas.

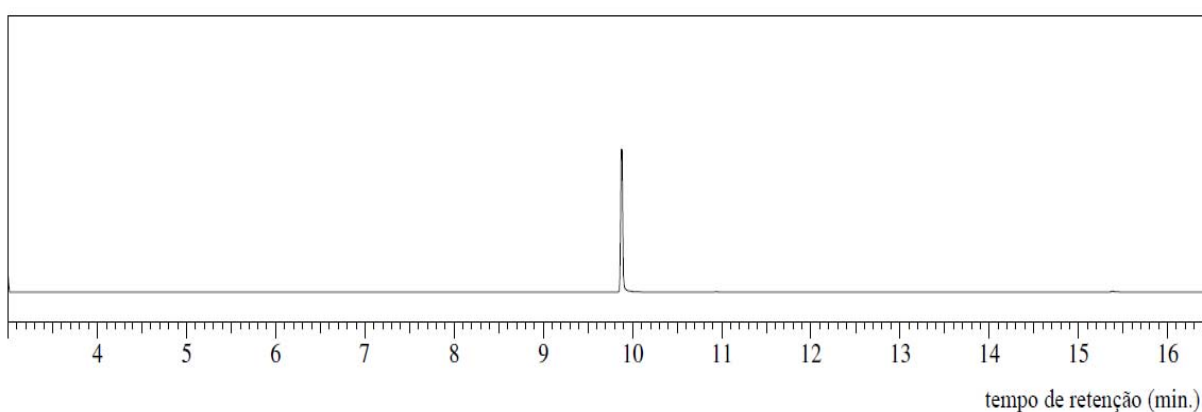


Figura 80: Cromatograma de CG-EM da amostra de 6-oxo após teste de degradação fotolítico no tempo máximo (30 dias).

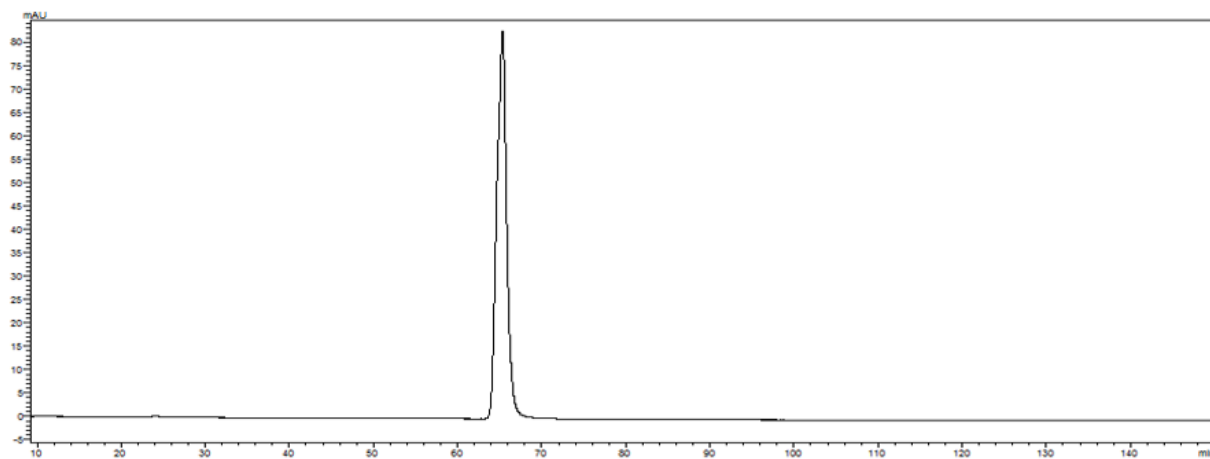


Figura 81: Cromatograma de CLAE-UV da amostra de 6-oxo da amostra de 6-oxo após teste de degradação fotolítico no tempo máximo (30 dias).

Assim, em que pese a ausência de uma câmara adequada para os estudos de fotodegradação (com controle de luminosidade, temperatura e umidade), a molécula foi considerada estável para as condições e tempo de exposição luminosa utilizados nesse estudo de estresse.

7.4. Ensaio térmico de degradação forçada

Para os ensaios de degradação sob aquecimento, amostras de 10 mg de 6-oxo foram colocadas em frascos do tipo Schlenk (Figura 82) e permaneceram em estufa a 70 °C, em tempos que variaram de 10 a 14 dias. Após os ensaios, os produtos foram dissolvidos em acetonitrila e analisados por CG-EM.



Figura 82: Frasco Schlenk contendo amostra após 14 dias sob estresse térmico em estufa a 70 °C.

De acordo com cromatogramas por CG-EM (Figura 83, letras: a e b), houve uma degradação de 17,6 % para o tempo mínimo (10 dias) e de 28,7 % para o tempo máximo (14 dias). Observou-se também que todas as amostras apresentaram apenas 3 produtos de degradação: 9,7 minutos – m/z : 162, 10,6 minutos – m/z : 178 e 10,8 minutos – m/z : 180 (Figuras 84, letras: a, b e c). Os dados sobre a porcentagem das impurezas para cada amostra foram apresentados na tabela 11.

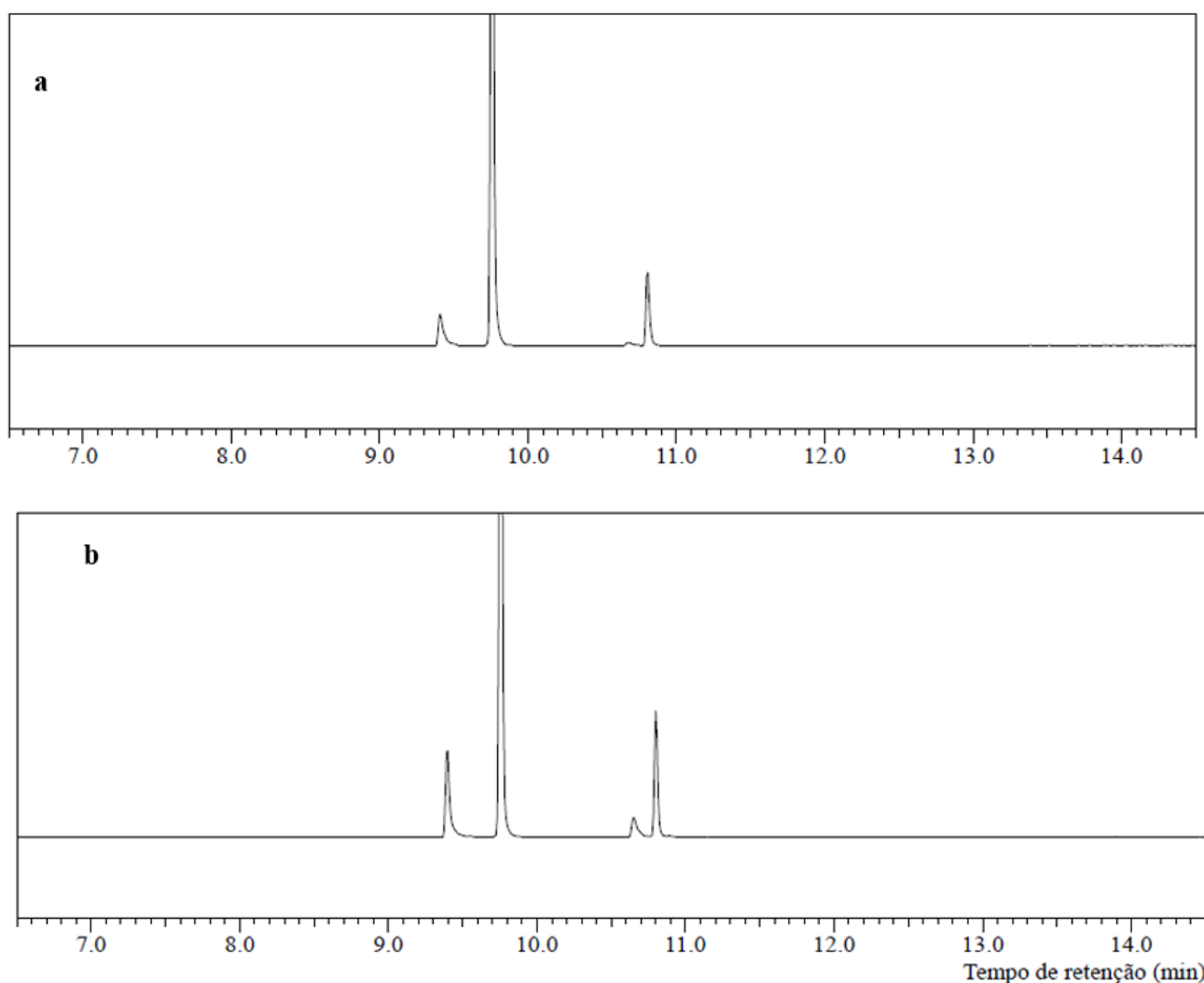


Figura 83: Cromatogramas por CG-EM das amostras de 6-oxo após os testes de estresse térmico: a- 10 dias – 70 °C e b- 14 dias - 70°C (9,4 min. - m/z 162; 9,7 min. - m/z 166 (6-oxo); 10,6 min. - m/z 178 e 10,8 min. - m/z 180).

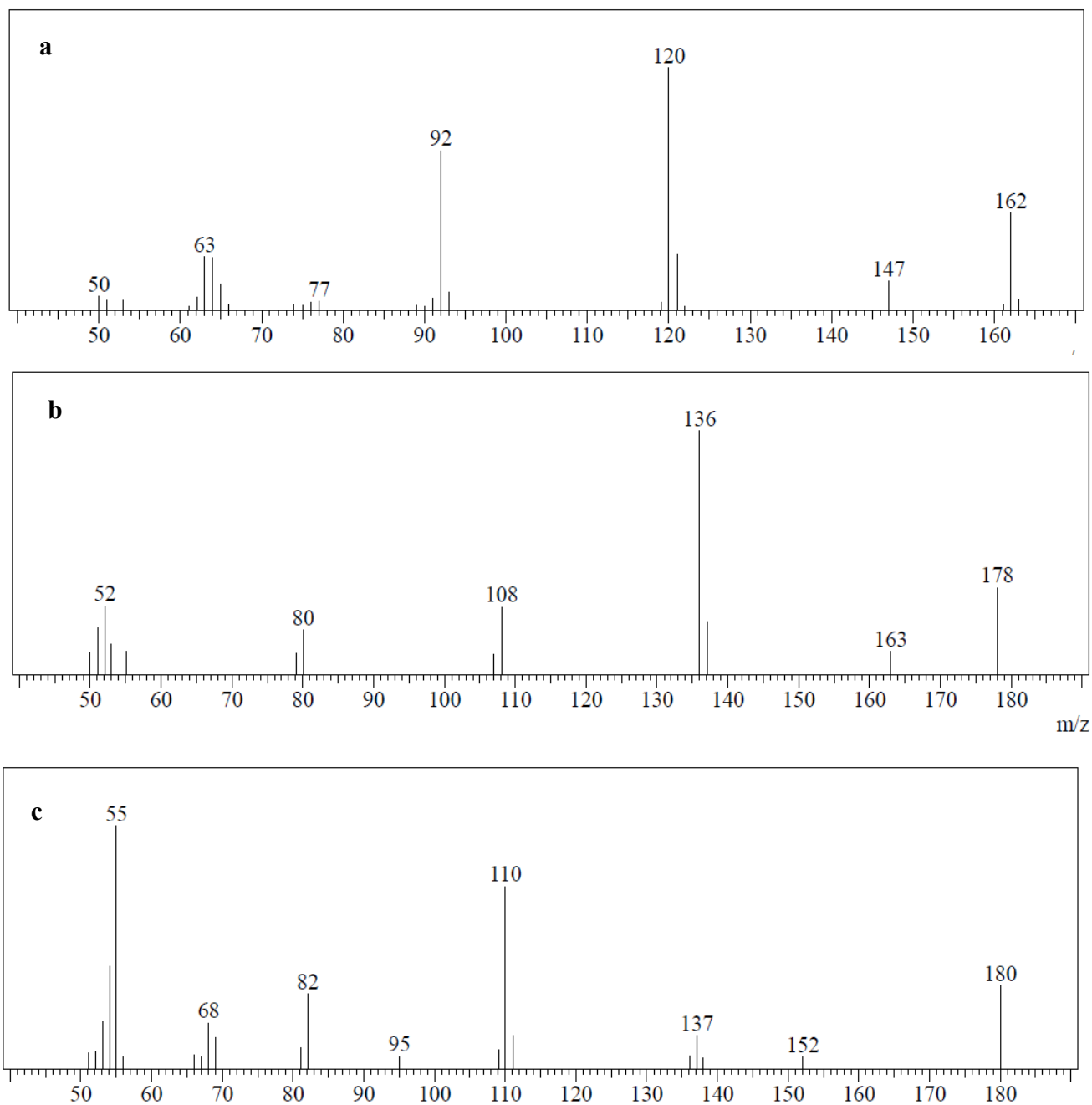


Figura 84: Espectro de massas por impacto de elétrons das impurezas geradas após os testes de estresse térmico: a - m/z 162 (9,4 min.); b - m/z 178 (10,6 min.) e c - m/z 180 (10,8 min).

Tabela 11: Dados com as porcentagens de impurezas das amostras submetidas a estresse térmico: 1 - 10 dias - 70 °C e 2 - 14 dias - 70 °C.

Amostras	Tempo	m/z 162	m/z 178	m/z 180	Impurezas totais
1	10 dias	6,9%	0,5%	10,2%	17,6%
2	14 dias	11,0%	3,7%	14,0%	28,7%

7.4.1. Isolamento e caracterização das impurezas geradas nos testes de estresse térmico

Os produtos foram separados por cromatografia em coluna, utilizando-se sílica como fase estacionária e uma mistura de acetato de etila e hexano (40:60) como fase móvel. As frações obtidas foram dissolvidas em acetonitrila e analisadas por CG-EM e EMAR. Em seguida, as amostras foram analisadas por outras técnicas analíticas (p. ex. RMN ^1H e ^{13}C) com intuito de elucidar suas fórmulas estruturais.

Os dados obtidos sugeriram que foram formadas as seguintes impurezas (Figura 85):

- m/z 162: 2-metilcroman-4-ona (**69**), acrônimo: MC;
- m/z 178: 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (**70**), acrônimo: HMC;
- m/z 180 - 2-metil-2,3,6,7-tetrahidro-4H-cromeno-4,8(5H)-diona (**71**), acrônimo: MTCD;

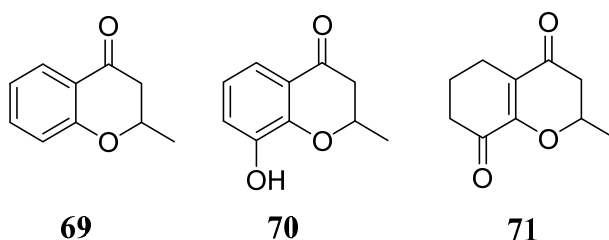


Figura 85: Estruturas moleculares das impurezas formadas no estudo de estresse térmico da 6-oxo: 2-metilcroman-4-ona (**69**); 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (**70**) e 2-metil-2,3,6,7-tetrahidro-4H-cromeno-4,8(5H)-diona (**71**).

Na sequência deste capítulo, são apresentados os dados de identificação e caracterização dessas impurezas. Além disso, são apresentadas as propostas de mecanismos para formação para cada molécula.

7.4.1.1. 2-metilcroman-4-ona (MC)

7.4.1.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Nos dados espectroscópicos de RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 , apresentados na Figura 86, podem ser observados alguns deslocamentos e multiplicidades que permitem evidenciar a estrutura da 2-metil-croman-4-ona (MC). Esses dados foram comparados aos disponíveis na literatura e demonstraram uma boa correlação.⁸²

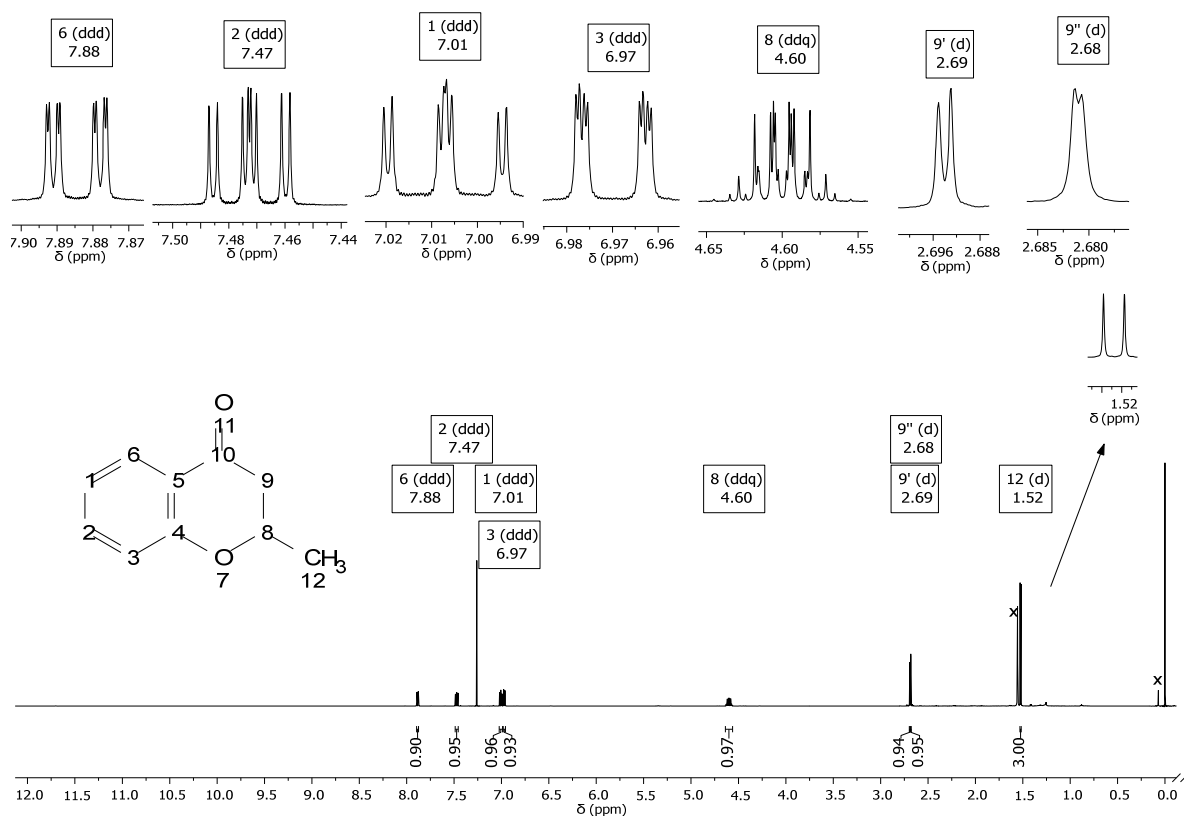


Figura 86: Espectro (RMN ^1H , 600 MHz, CDCl_3) da impureza da MC.

Em 7,88; 7,47; 7,01 e 6,97 ppm, observam-se quatro duplo duplo de dupletos (ddd) relativos aos diferentes acoplamentos dos hidrogênios aromáticos. A atribuição de cada hidrogênio foi realizada considerando-se dois fatores: as constantes de acoplamento e a estimativa de deslocamento de RMN ^1H do *software* ChemDraw Ultra 8.0. Deste modo, obteve-se os seguintes resultados: 7,88 ppm – H6 ($J = 7,9; 1,8; 0,5$ Hz); 7,47 ppm – H2 ($J = 8,4; 7,2$ e $1,8$ Hz), 7,01 ppm – H1 ($J = 7,9; 7,2; 1,1$ Hz) e 6,97 – H3 ($J = 8,3; 1,1; 0,5$ Hz). Em 4,60 ppm, observa-se um duplo duplo quarteto (ddq), devido aos três diferentes acoplamentos do H8, sendo dois com os hidrogênios diastereotópicos H9' e H9'' ($J = 8,3; 7,3$ Hz) e o outro com os hidrogênios do grupo metila H12 ($J = 6,3$ Hz). Em 2,68 e 2,69 ppm, observam-se dois dupletos (d), os quais foram atribuídos aos acoplamentos dos H9' e H9'' entre si e com o H8. Contudo, não foi possível estabelecer uma relação entre a sua multiplicidade e as constantes de acoplamento medidas, pois esperava-se que aparecessem na forma de duplos dupletos (dd). Por último, observa-se um duplete (d) em 1,52 ppm, devido ao acoplamento dos hidrogênios do grupo metila (H12) com o H8.

7.4.1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C)

O espectro de RMN ^{13}C , a 75 MHz em $\text{DMSO}-d_6$ (Figura 87), apresentou sinais para todos os carbonos da molécula. Em 192,0 ppm, observa-se o sinal de campo mais baixo do espectro, que foi atribuído a carbonila da cetona (C10). Utilizando-se a estimativa de deslocamento de RMN ^{13}C do

software ChemDraw Ultra 8.0, atribuiu-se o sinal em 162,2 ppm ao carbono aromático (C4) vicinal ao oxigênio. O sinal em 136,1 ppm foi atribuído ao carbono aromático na posição 2 (C2). Os quatro carbonos com sinais em 126,3; 121,1; 120,5 e 117,8 ppm, foram atribuídos, respectivamente, aos demais carbonos aromáticos da molécula: C6, C1, C5 e C3. O sinal em 74,1 ppm foi atribuído ao carbono metino monossustituído vizinho ao oxigênio. Em 43,8 ppm, observa-se o sinal do carbono (C9) vicinal a carbonila e, por último, o sinal de campo mais alto (20,5 ppm) foi atribuído ao grupo metila (C12).

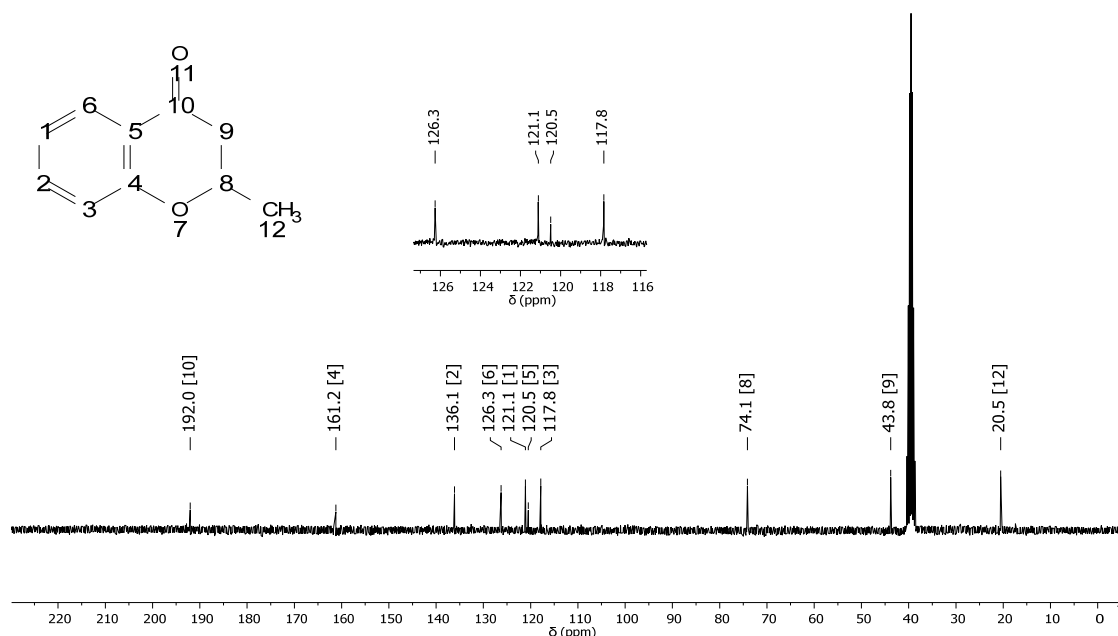


Figura 87: Espectro (RMN ^{13}C , 75 MHz, DMSO-*d*6) da impureza da MC

7.4.1.1.3. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Na análise do cromatograma (Figura 88) observa-se que a 2-metil-croman-4-ona (MC) apresenta um pico com tempo de retenção em 9,4 minutos, O cálculo de sua área percentual demonstrou uma pureza estimada de 99,9 %.

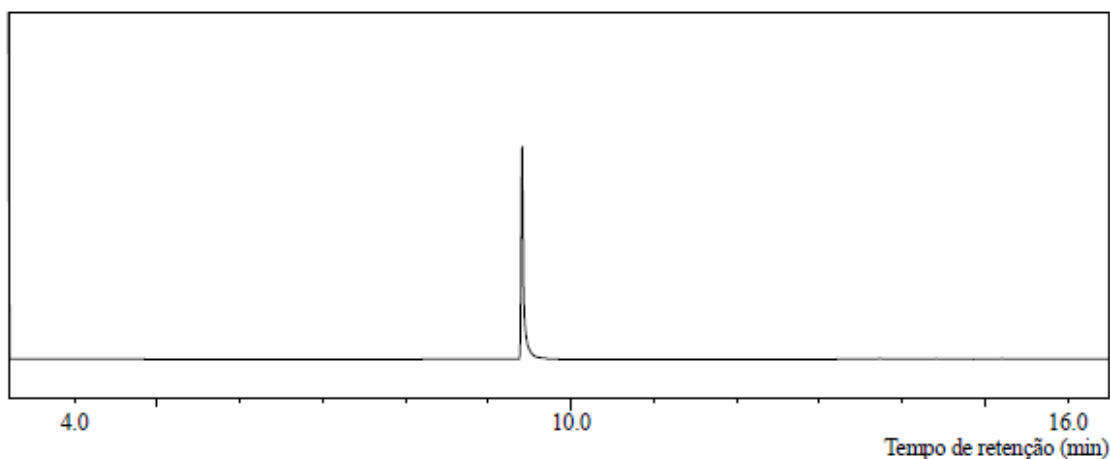


Figura 88: Cromatograma por CG-EM da impureza MC

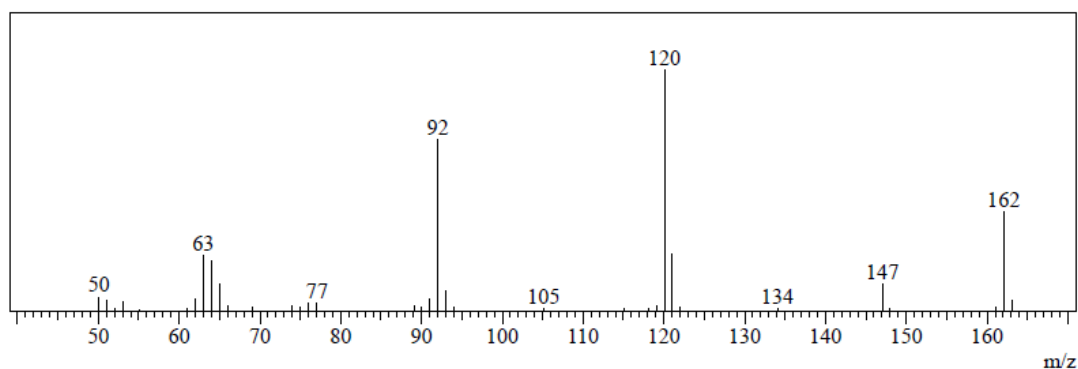
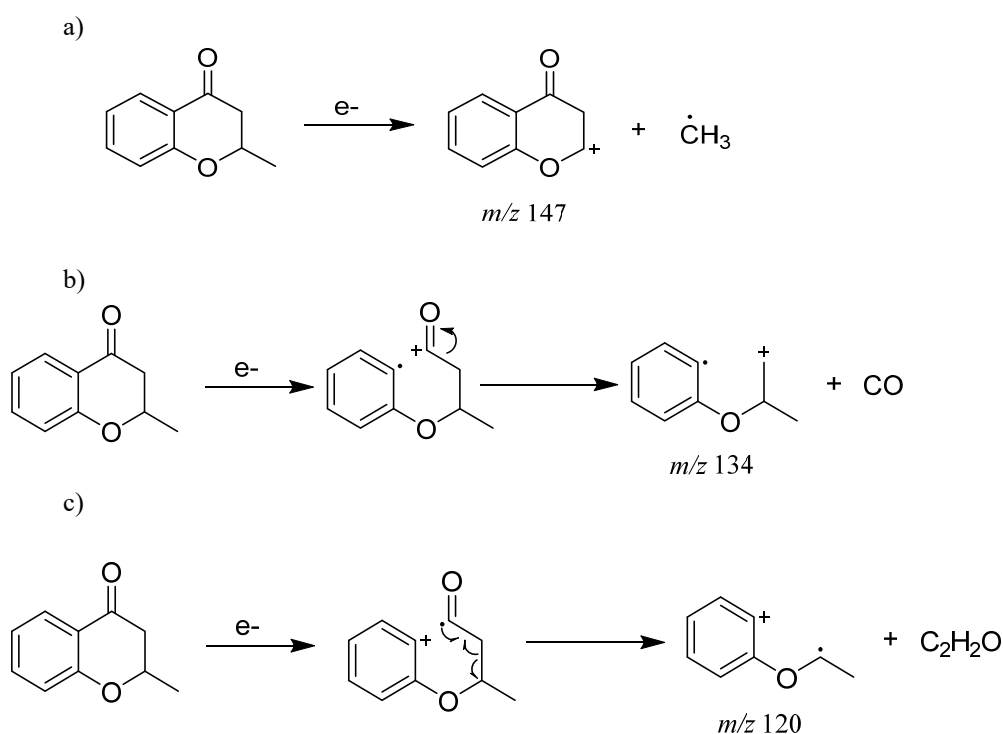
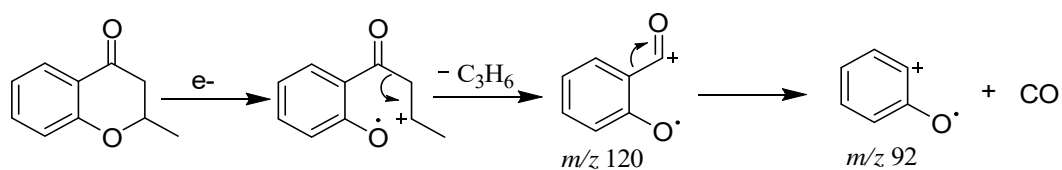


Figura 89: Espectro de massas por impacto de elétrons da impureza MC.

Seu espectro de massas apresentou um pico de íon molecular com $m/z = 162$ e um pico base com $m/z = 120$ (Figura 89). Foram apresentadas algumas propostas de mecanismo de formação de alguns fragmentos observados. O sinal M-15 foi atribuído a perda de um radical metila, conforme proposto na letra a do Esquema 23. A formação do fragmento m/z 134 foi justificada pela liberação do CO (letra b do Esquema 23). A formação do pico base m/z 120 foi explicada pela liberação de um ceteno, gerado a partir do rompimento heterolítico da ligação alfa carbonila próxima ao anel aromático, seguido do rompimento homolítico da ligação beta carbonila, conforme apresentado na letra c do Esquema 23. A presença do sinal com m/z 92 foi justificada pela formação de um fragmento de segunda geração, advindo de um fragmento m/z 120 (formado pela liberação de um propeno) com posterior liberação de CO (letra d, Esquema 23).



d)



Esquema 23: Propostas de mecanismos de fragmentação da MC.

7.4.1.1.4. Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)

O espectro de massas de alta resolução (figura 90) da impureza MC apresentou o íon esperado para molécula (M+H)⁺ de 163,0756 Da (íon molecular). Notou-se também a presença do íon (M+1)⁺ 164,0786 Da.

Utilizou-se a ferramenta “Massa para Fórmula” do programa mMass (free open source software, 2013, versão 5.5) para gerar possíveis fórmulas moleculares para a impureza encontrada. Obteve-se como mais provável a fórmula: C₁₀H₁₀O₂, conforme esperado.

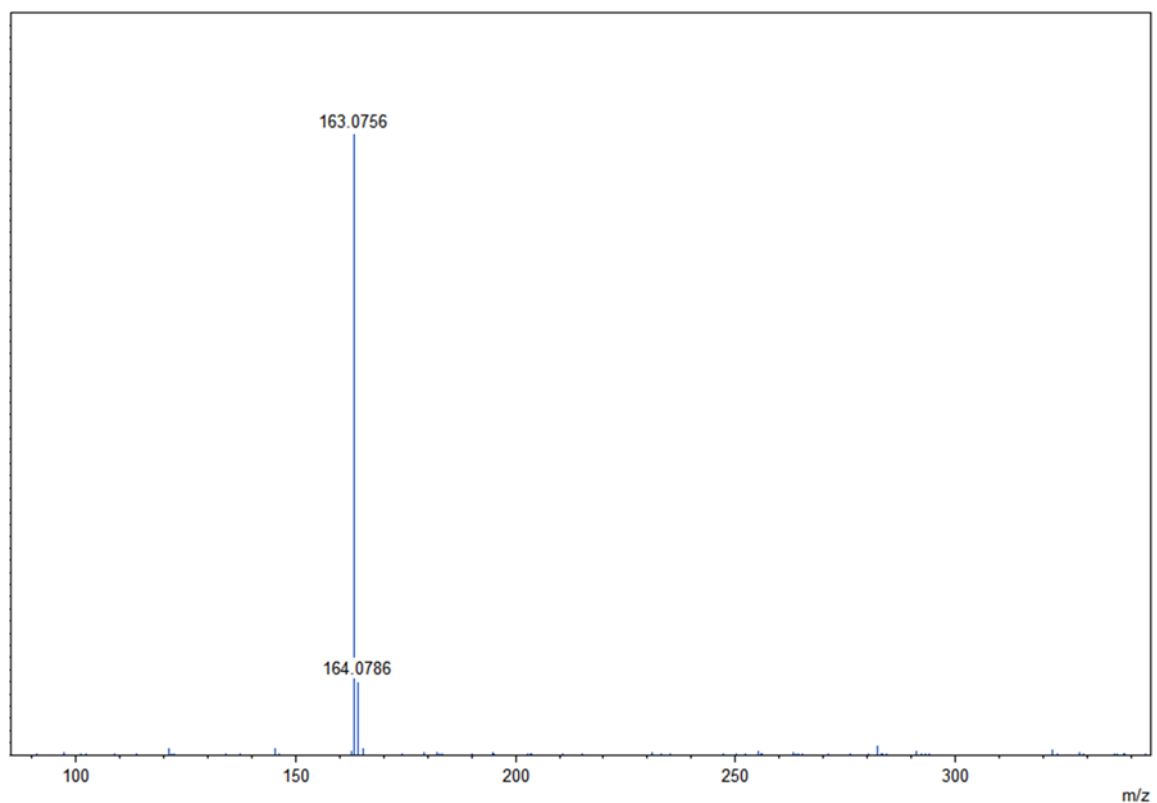
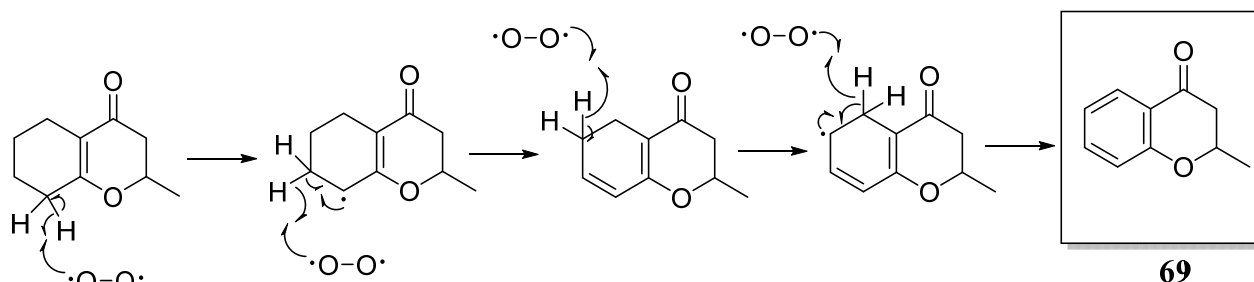


Figura 90: Espectro de massas de alta resolução da impureza da impureza *m/z* 162.

7.4.1.1.5. Proposta de mecanismo de formação da impureza MC

Neste capítulo, propõe-se um mecanismo de formação da molécula 2-metilcroman-4-ona (**69**) por meio de uma reação radicalar com o oxigênio molecular (Esquema 24). Na etapa inicial ocorre a retirada do hidrogênio alílico (na posição beta ao oxigênio do éter) pelo oxigênio molecular, formando uma espécie radicalar. Depois, ocorre a retirada do hidrogênio vicinal ao carbono radicalar, para que haja a formação da insaturação pelos radicais deixados na molécula. Essa etapa se repete para os próximos dois carbonos sp^3 , formando a estrutura aromática.



Esquema 24: Proposta de mecanismo de formação da impureza MC.

7.4.1.2. 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (HMC)

7.4.1.2.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H)

Os dados espectroscópicos de RMN 1H a 300 MHz em $CDCl_3$ da 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (Figura 91) apresentaram todos os sinais esperados para a molécula.⁸³ Em 7,42 ppm, tem-se um duplo duplo (dd), devido aos diferentes acoplamentos do hidrogênio aromático na posição beta a carbonila (H6) com os hidrogênios aromáticos H1 e H2. Em 7,12 ppm, o espectro apresenta outro duplo duplo (dd), devido aos diferentes acoplamentos do H2 com os hidrogênios H1 e H6. Em 6,92 ppm, tem-se um tripleto (t), devido ao acoplamento do H1 ($J = 7.9$ Hz) com os hidrogênios aromáticos H2 e H6. Em 5,54 ppm, tem-se um singleto (s) largo, devido ao acoplamento do hidrogênio do grupo OH. Em 4,68 ppm, tem-se um duplo quinteto (dp), devido aos acoplamentos do H8 com os hidrogênios vicinais a carbonila (H9) e também com os hidrogênios do grupo metila (H12). Na faixa de 2,75 – 2,70 ppm, tem-se um multipletto, devido aos acoplamentos dos hidrogênios vicinais a carbonila (H9) com o H8. Por último, em 1,57 ppm, tem-se um dubleto, devido ao acoplamento dos hidrogênios da metila (H12) com H8.

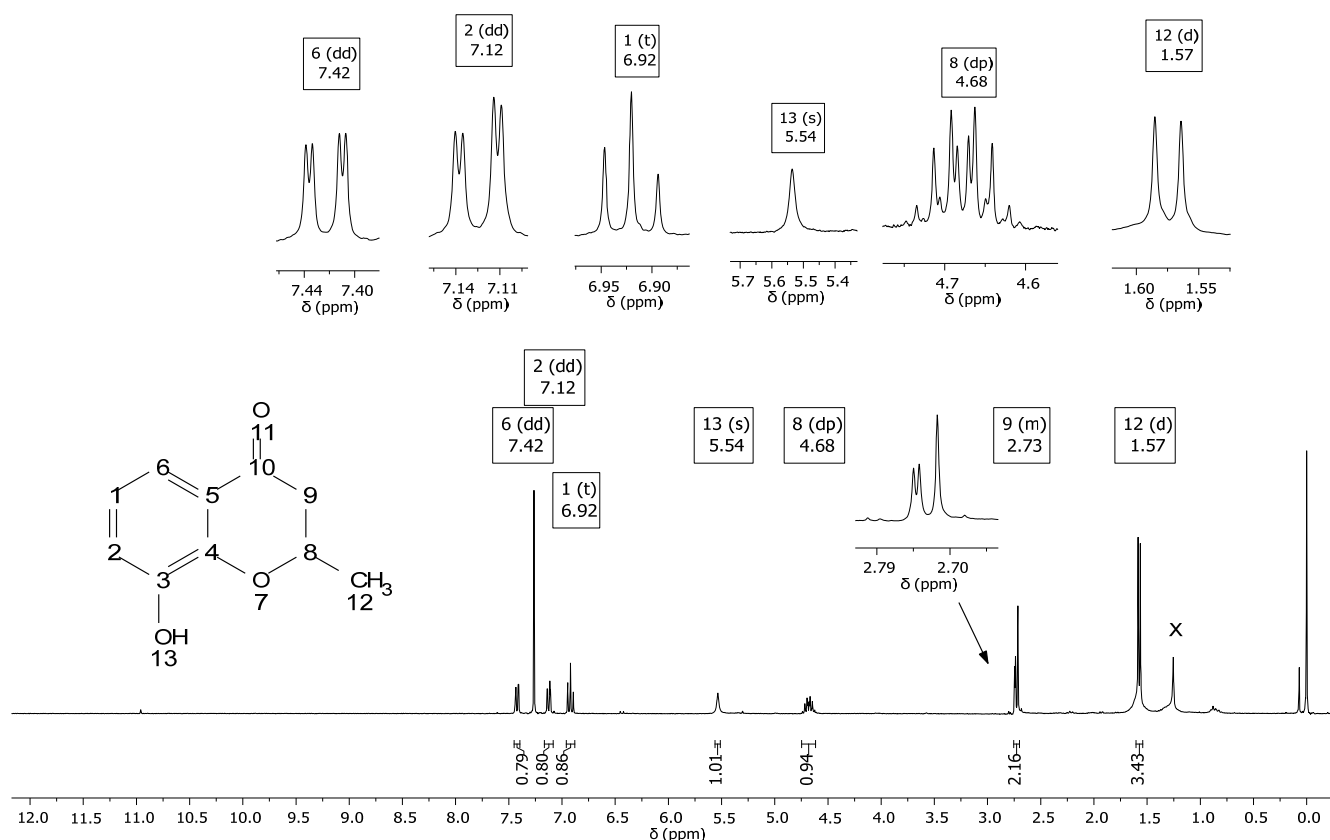


Figura 91: Espectro (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3) da impureza da HMC.

7.4.1.2.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C)

O espectro de RMN ^{13}C da 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona, a 75 MHz em CDCl_3 (Figura 92), apresentou sinais para todos os carbonos da molécula. Em 192,0 ppm, tem-se o sinal de campo mais baixo do espectro, que foi atribuído a carbonila da cetona (C10). Utilizando-se a estimativa de deslocamento de RMN ^{13}C do *software* ChemDraw Ultra 8.0, atribuiu-se o sinal em 149,1 ppm ao carbono aromático (C4), vicinal ao carbono da hidroxila, C3 em 145,3 ppm. Os quatro carbonos com sinais em 121,5; 121,2; 120,5 e 117,9 ppm, foram atribuídos, respectivamente, aos demais carbonos aromáticos da molécula: C1, C5, C2 e C6. Em 44,9 ppm, observa-se o sinal do carbono (C9) vicinal a carbonila. O sinal em 75,7 ppm, foi atribuído ao carbono metino monossustituído vizinho ao oxigênio e, por último, o sinal de campo mais alto (21,1 ppm) foi atribuído ao grupo metila (C13).

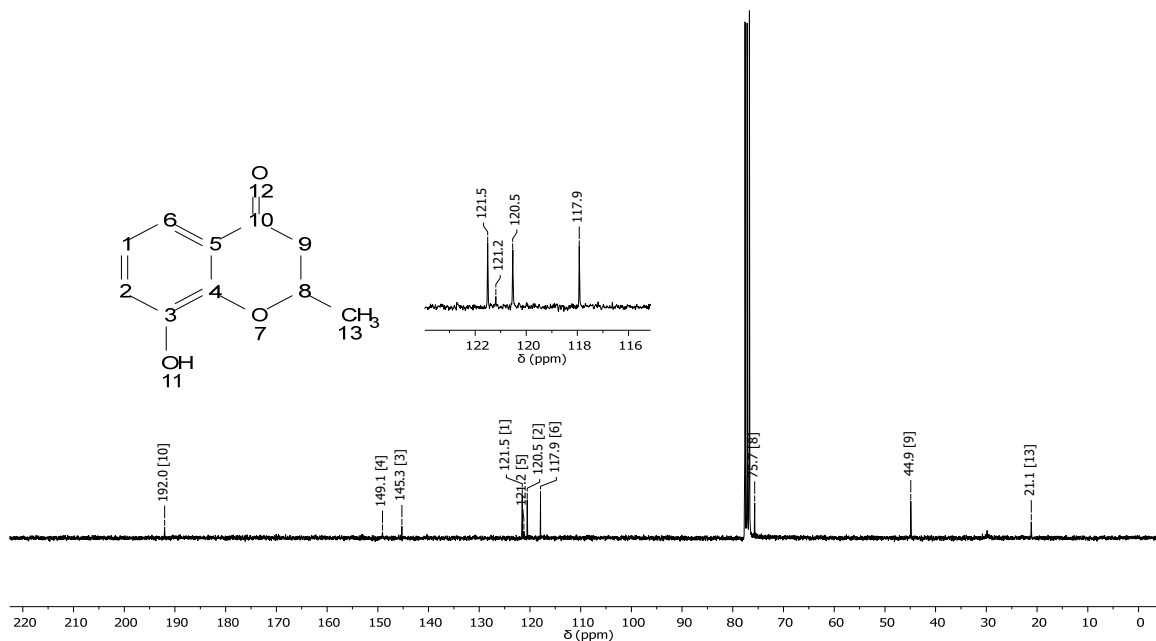


Figura 92: Espectro (RMN ¹³C, 75 MHz, CDCl₃) da impureza da HMC.

7.4.1.2.3. HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy)

No espectro de HSQC da HMC (Figura 93) foi possível observar os diversos acoplamentos C-H da molécula. Os dados confirmaram as atribuições feitas nos espectros de RMN ¹H e ¹³C. As relações foram descritas na tabela na Tabela 12.

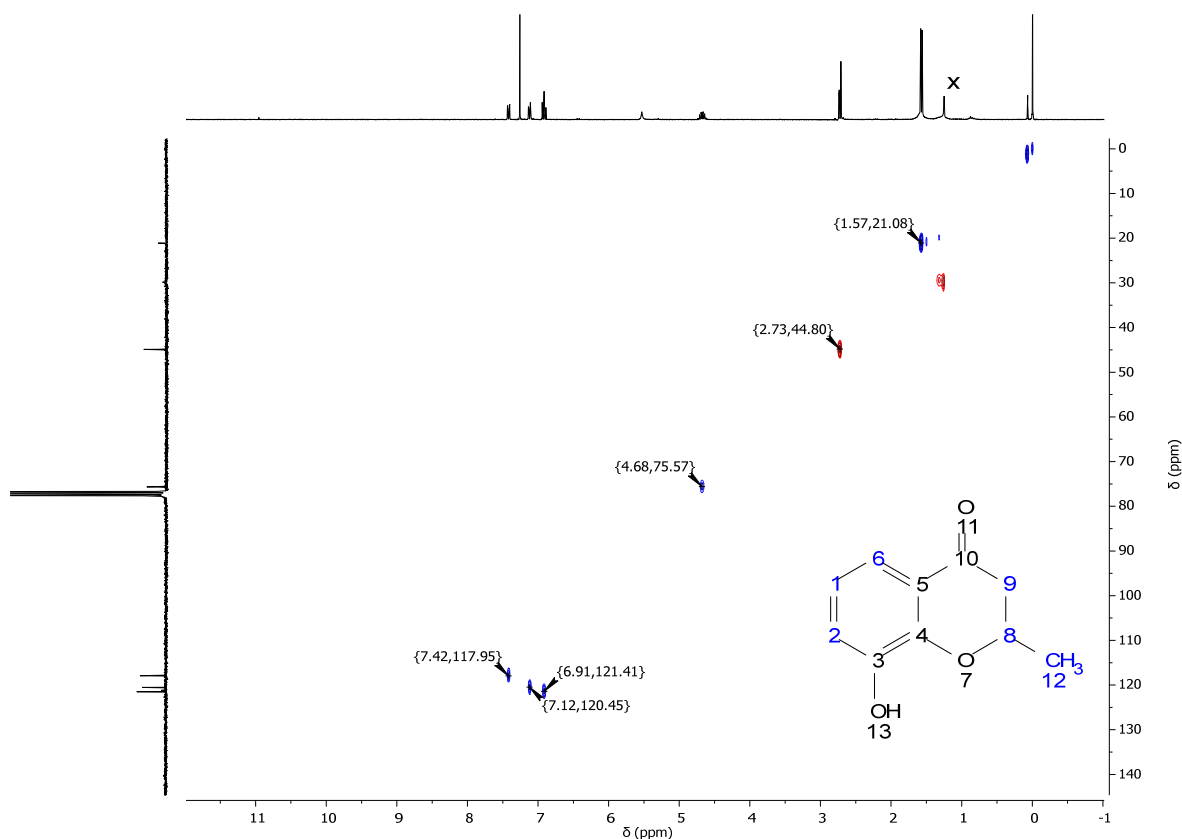


Figura 93: Espectro de HSQC da HMC.

Tabela 12: Dados espectroscópicos de HSQC da HMC.

Posição C	δ_C (ppm)	Posição H	δ_H (ppm)	Multiplicidade	Quantidade H
12	21,1	12	1,57	d	3
9	44,9	9	2,75-2,70	m	2
8	75,7	8	4,68	qd	1
6	121,2	1	6,92	t	1
2	120,5	2	7,12	dd	1
6	117,9	6	7,42	dd	1

7.4.1.2.4. Espectrometria de infravermelho

O espectro de infravermelho (Figura 94) da HMC apresenta uma banda larga, na região de 3150 cm^{-1} a 3380 cm^{-1} , relativa ao estiramento da ligação O-H. Pode-se notar também absorções características na região de 2969 cm^{-1} a 2928 cm^{-1} , relativos aos estiramentos das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{H}$ dos grupos metila e do metileno da molécula. Em 1663 cm^{-1} , pode-se observar a absorção associada ao estiramento da ligação C=O, que está conjugada com a ligação C=C do anel aromático. Em 1607 cm^{-1} , tem-se a absorção relativa ao estiramento da ligação C=C aromática conjugada a carbonila. As absorções em 1491 e 1457 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos das ligações C=C aromáticas. Em 1308 cm^{-1} , observa-se a absorção relativa ao estiramento da ligação C-O do éter e, por último, observa-se a banda mais intensa do espectro em 1206 cm^{-1} , relativa ao estiramento da ligação C-O do fenol.

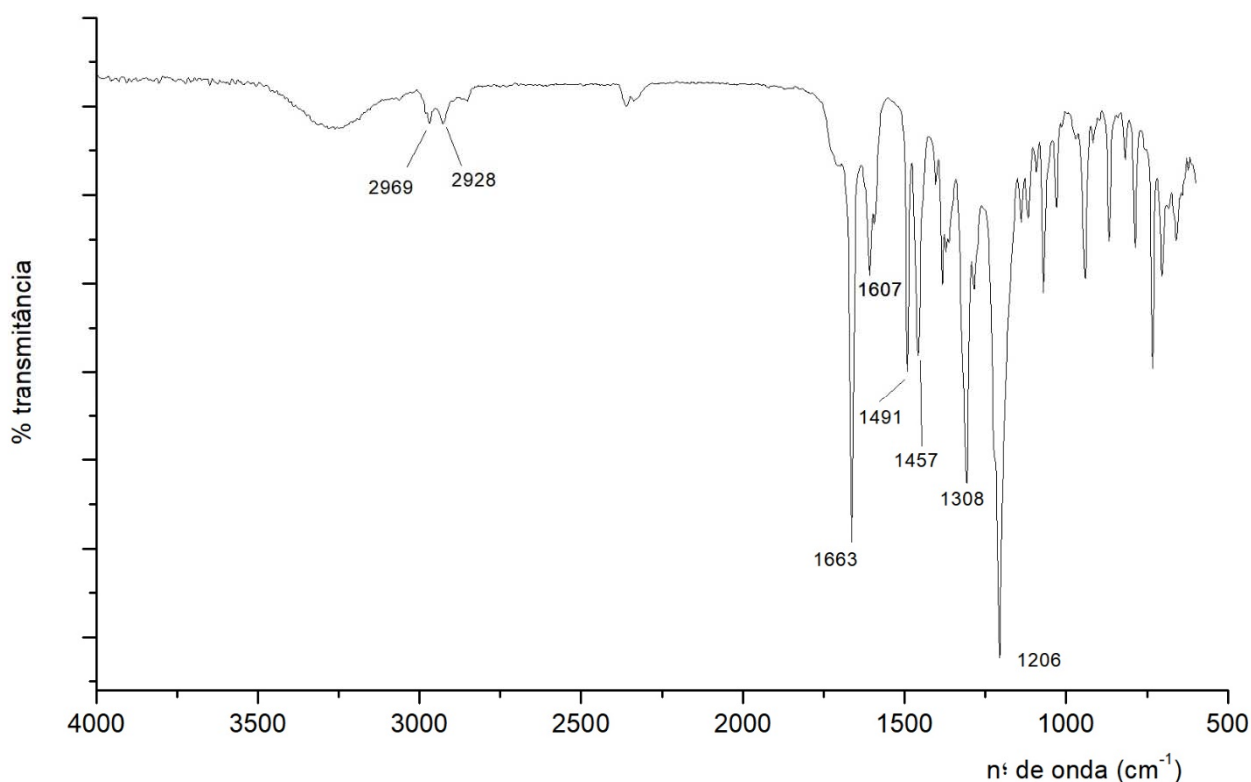


Figura 94: Espectro de Infravermelho da HMC.

7.4.1.2.5. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Na análise do cromatograma da impureza m/z 178 (Figura 95), observou-se um pico em 10,6 minutos, conforme esperado. O cálculo de sua área percentual demonstrou uma pureza estimada de 99,9 % e seu espectro de massas apresentou o sinal de íon molecular com m/z 178 (Figura 96).

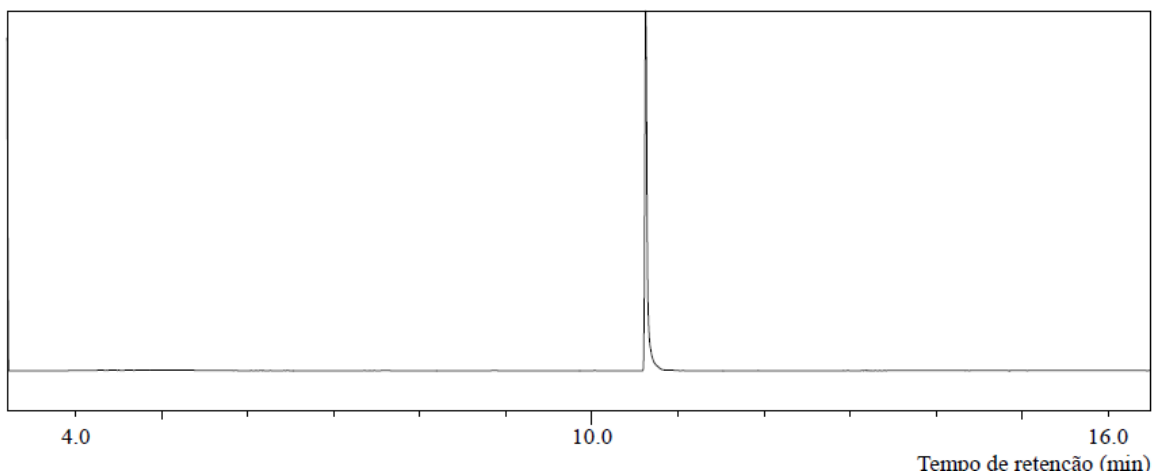


Figura 95: Cromatograma por CG-EM da impureza com m/z 178

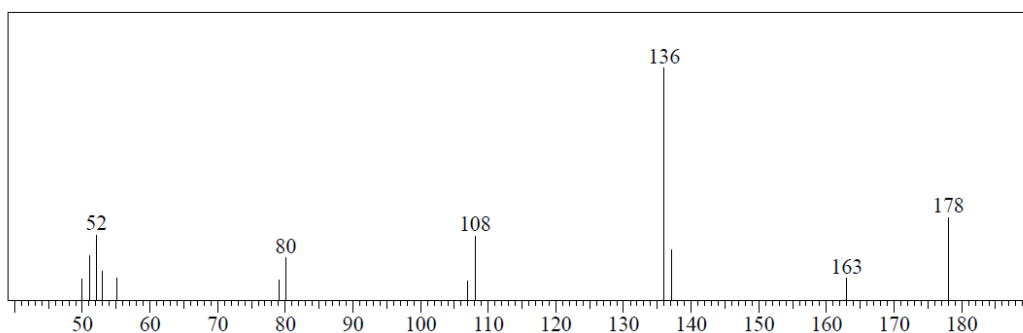
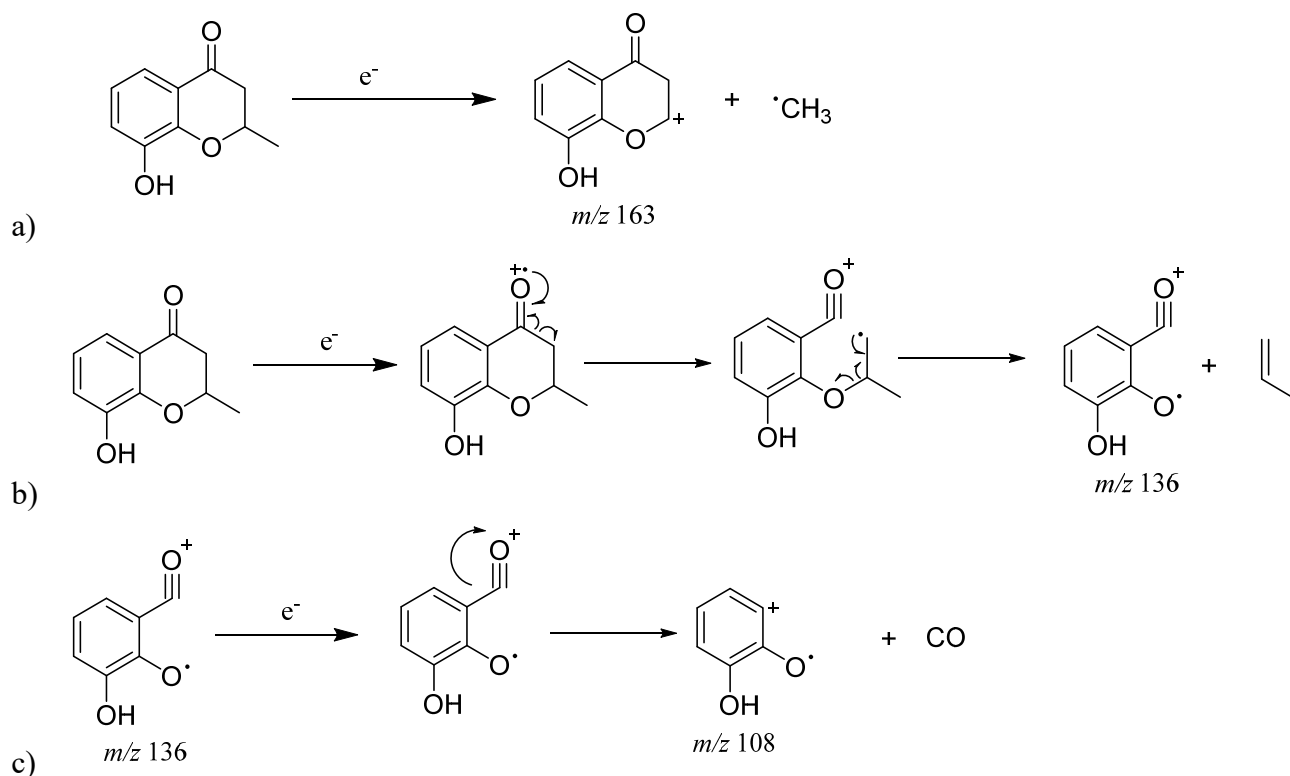


Figura 96: Espectro de massas por impacto de elétrons da impureza com m/z 178

Considerando os dados de fragmentação da HMC (Figura 96), foram propostos mecanismos para a formação de alguns dos fragmentos observados (Esquema 25). Na primeira fragmentação, o sinal m/z 15 foi formado pela perda de um radical metila da molécula (Esquema 25, letra a). A formação do fragmento m/z 136 (pico base) foi iniciada com a formação do cátion radicalar no oxigênio da carbonila, seguido dos seguintes eventos: rompimento homolítico da ligação C-C para formação do íon acílio, seguido de rompimento heterolítico da ligação C-O para a liberação de propeno (Esquema 25, letra b). A formação do fragmento de m/z 108 foi atribuída a liberação do CO pelo fragmento com m/z 136 (Esquema 25, letra c).



Esquema 25: Propostas de mecanismos de fragmentação da HMC.

7.4.1.2.6. Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)

O espectro de massas de alta resolução (Figura 97) apresentou o íon esperado para molécula protonada $(M+H)^+$ 179,0696 Da (íon molecular). Além disso, pôde-se observar também o íon $(M+H)^+$ 137,0582 Da, correspondente ao fragmento com maior intensidade (pico base) no espectro de massas obtido por CG-EM (Figura 96).

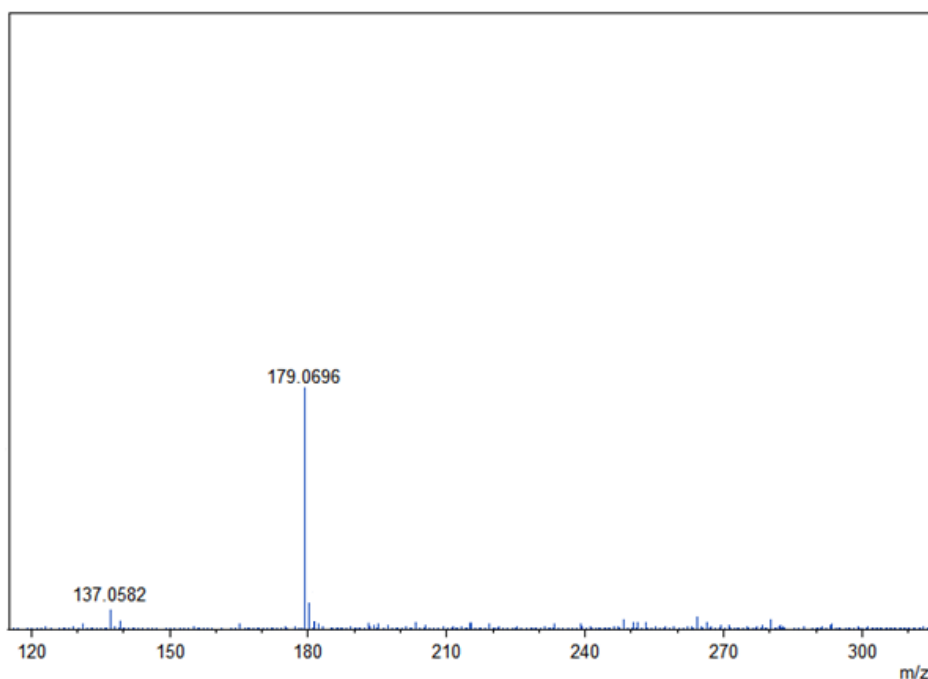
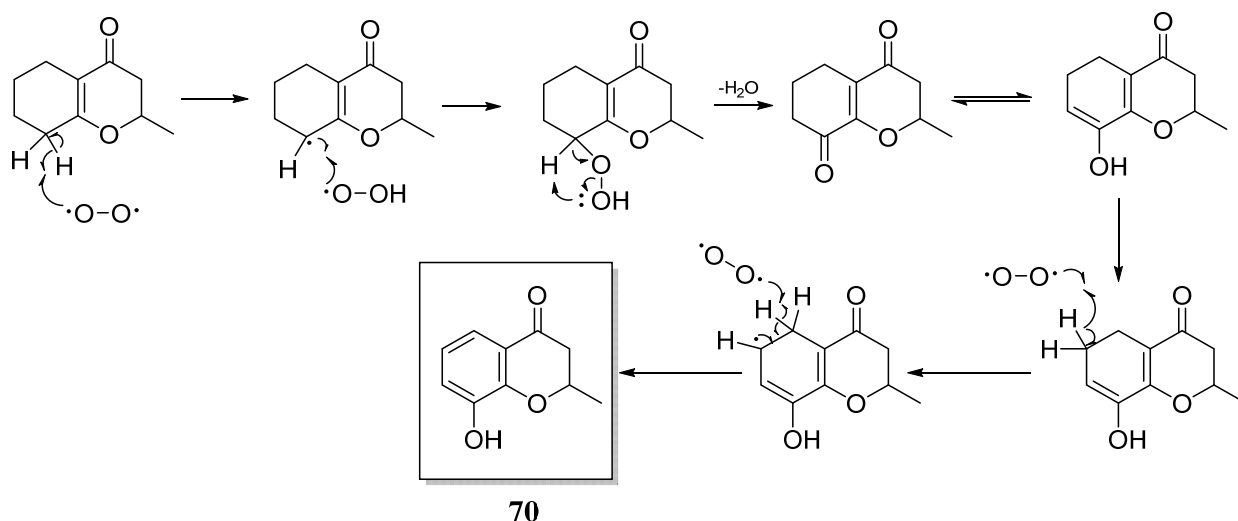


Figura 97: Espectro de massas de alta resolução da impureza m/z 192

Utilizou-se a ferramenta “Massa para Fórmula” do programa mMass (free open source software, 2013, versão 5.5) para gerar possíveis fórmulas moleculares para a impureza encontrada. Obteve-se como mais provável a fórmula: C₁₀H₁₀O₃, conforme esperado.

7.4.1.2.7. Proposta de mecanismo de formação da impureza 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (HMC)

Neste capítulo, propõe-se um mecanismo de formação da molécula 8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona (**70**) por meio de uma reação radicalar com o oxigênio molecular (Esquema 26). Na etapa inicial ocorre a retirada do hidrogênio alílico (na posição beta ao oxigênio do éter) pelo oxigênio molecular, formando o radical hidroperóxido. Depois, esse radical adiciona-se à molécula por meio de uma ligação radicalar. Em seguida, ocorre uma transferência de hidrogênio intramolecular, provocando a saída de uma molécula de água. Na próxima etapa, considera-se que a molécula desloca de seu equilíbrio para a forma enólica e, em sequência, ocorrem retiradas de hidrogênios por espécies radicalares (oxigênio molecular ou hidroperóxido), para a aromatização da estrutura.



Esquema 26: Proposta de mecanismo de formação da impureza HMC.

7.4.1.3. 2-metil-2,3,6,7-tetrahidro-4H-cromeno-4,8(5H)-diona (MTCD)

7.4.1.3.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

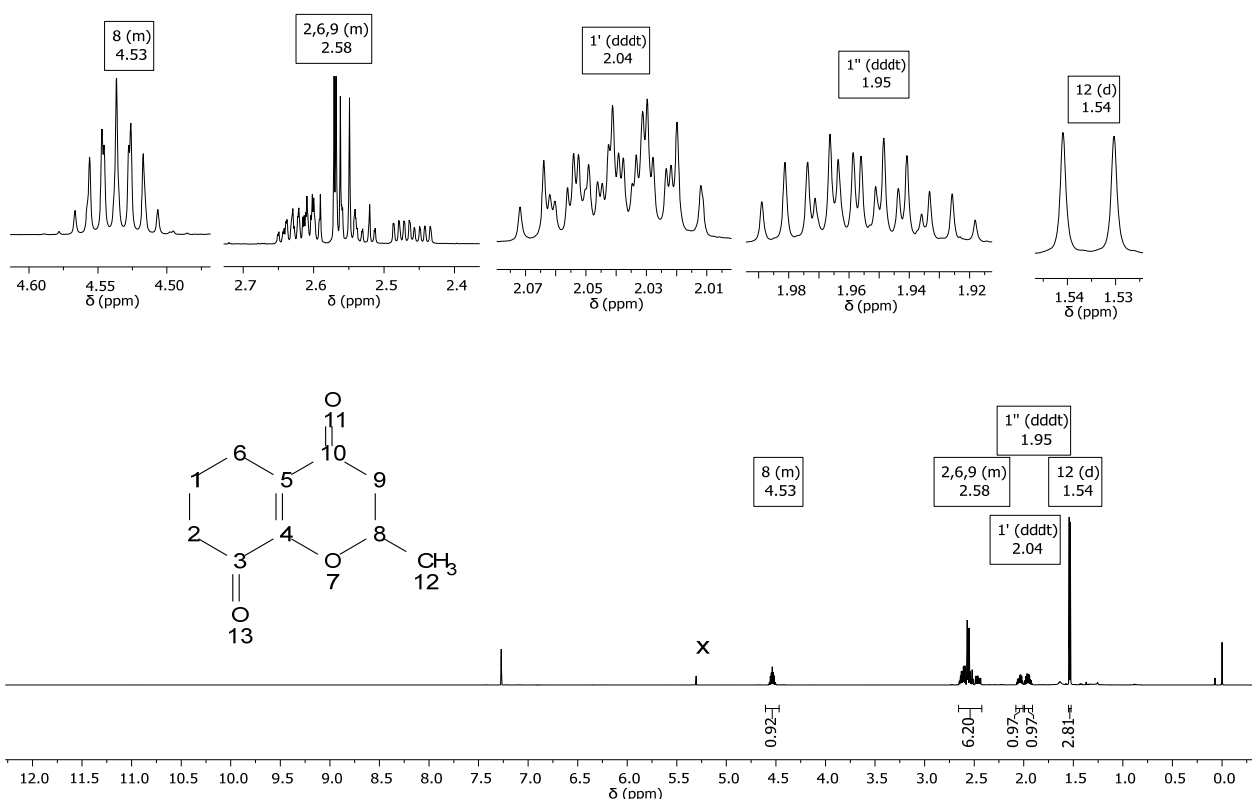


Figura 98: Espectro (RMN ^1H , 600 MHz, CDCl_3) da impureza da MTCD.

Os dados espectroscópicos de RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 da 2-metil-2,3,6,7-tetrahidro-4H-cromeno-4,8(5H)-diona (Figura 98) apresentaram os sinais esperados para a molécula.⁸⁴ Na região de 4,61 – 4,47 ppm, observa-se um multipletto, devido aos acoplamentos dos na posição 8 (H8) com os hidrogênios vicinais a carbonila (H9) e com hidrogênios do grupo metila (H12). Na região de 2,66 – 2,42 ppm, nota-se a presença de outro multipletto, o qual foi atribuído aos acoplamentos dos grupos metilenos nas posições 2, 6 e 9 da molécula. Em 2,04 e 1,95 ppm, são observados 2 (dois) duplo duplo dupletos de tripleto (dddt), atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos 1' e 1''. Por último, em 1,54 ppm, tem-se um dubleto, devido aos acoplamentos dos hidrogênios da metila (H12) com o H8.

7.4.1.3.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C)

O espectro de RMN ^{13}C , a 75 MHz em CDCl_3 (Figura 99), apresentou sinais para todos os carbonos da molécula. Em 195,8 e 195,2 ppm, observou-se os sinais de campo mais baixo do espectro, que foram atribuídos as carbonilas C10 e C3, respectivamente. Utilizando-se a estimativa de deslocamento de RMN ^{13}C do *software* ChemDraw Ultra 8.0, atribuiu-se o sinal em 156,4 ppm ao carbono vinílico C4 e o sinal em 123,9 ppm ao carbono vinílico C5. O sinal em 75,1 ppm foi atribuído ao carbono metino

monossustituído vizinho ao oxigênio (C8). Em seguida, o sinal em 43,5 ppm foi atribuído ao carbono alfa carbonila (C9) do anel hidropirano. O sinal em 39,2 ppm foi atribuído ao carbono 2, localizado na posição alfa a outra carbonila da molécula. Os sinais em 21,4 e 21,0 ppm, foram atribuídos aos carbonos metilênicos nas posições 1 e 6. Por último, observa-se o sinal de campo mais alto da molécula em 20,5 ppm, que foi atribuído ao carbono da metila (C12).

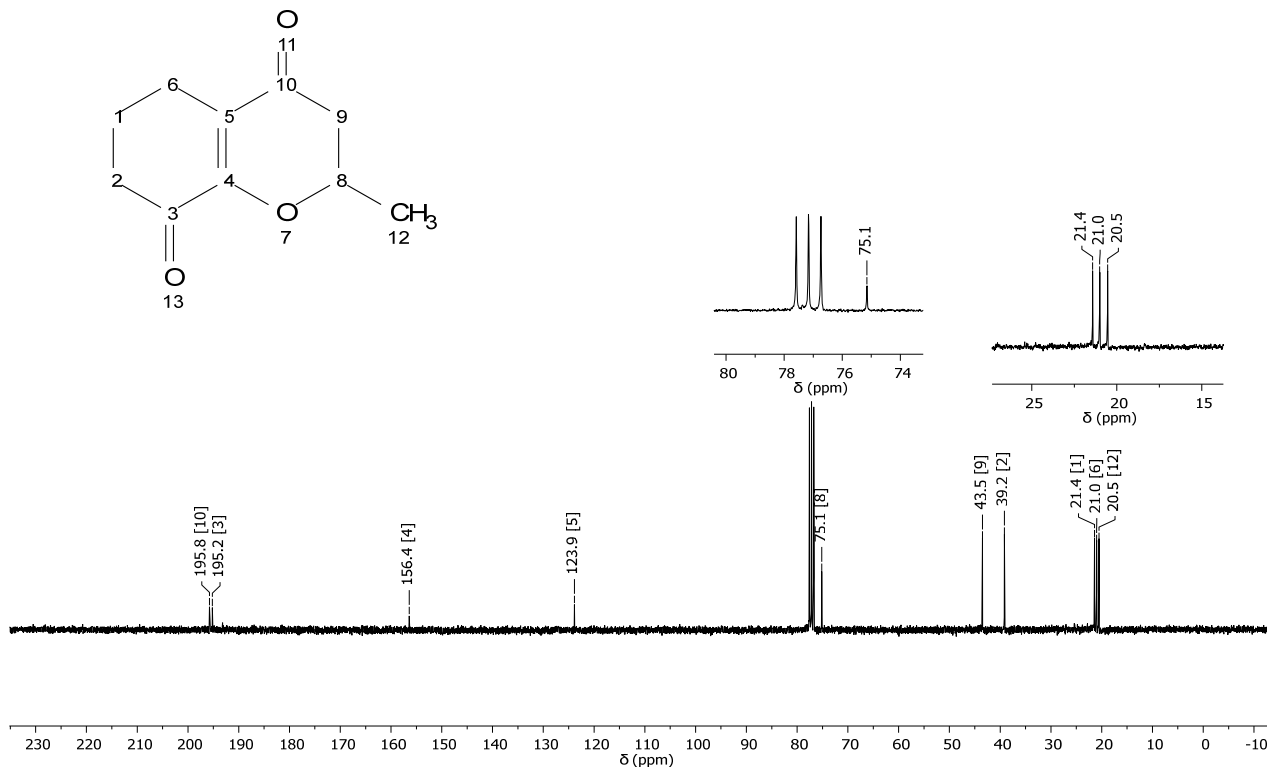


Figura 99: Espectro (RMN ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3) da impureza da MTCD.

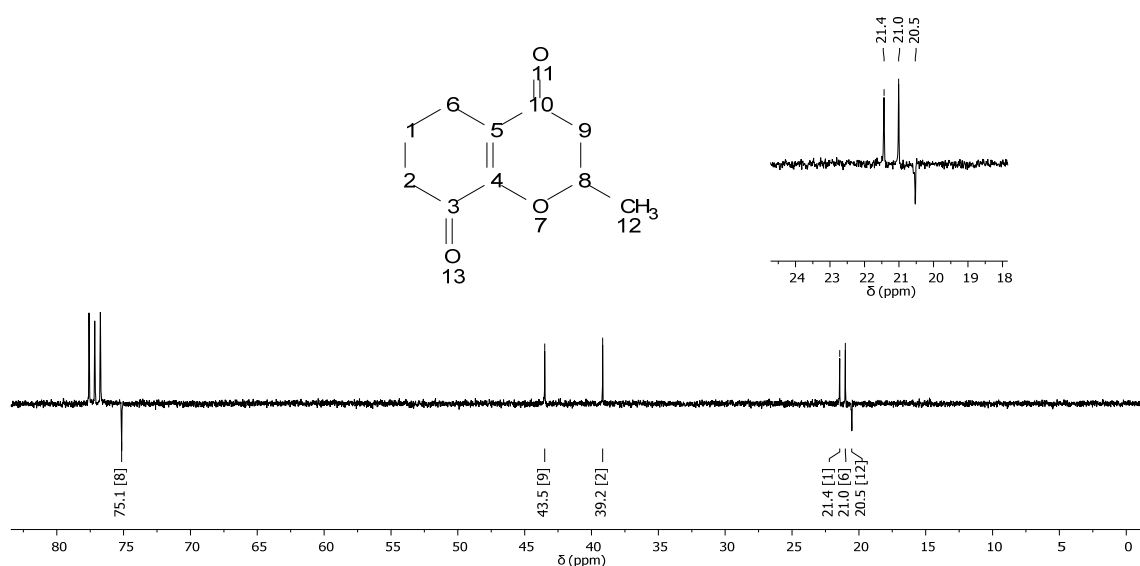


Figura 100: Espectro de RMN ^{13}C com APT (75 MHz, CDCl_3) da MTCD.

Além obtenção do espectro de RMN ^{13}C , foi realizado o experimento de carbono 13 com APT, visando a identificação e confirmação dos diferentes tipos de carbonos da molécula. No espectro (Figura

100), foi possível identificar o grupo metila em 20,5 ppm e confirmar a presença do grupo CH em 75,1 ppm. Além disso, observou-se que os demais carbonos na região de campo alto são grupos metileno, o que confirma estrutura proposta para a impureza.

7.4.1.3.3. HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy)

No espectro de HSQC da MTCD (Figura 101) foi possível observar os diversos acoplamentos C-H da molécula. Os dados confirmaram as atribuições feitas nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . As relações foram descritas na tabela na Tabela 13.

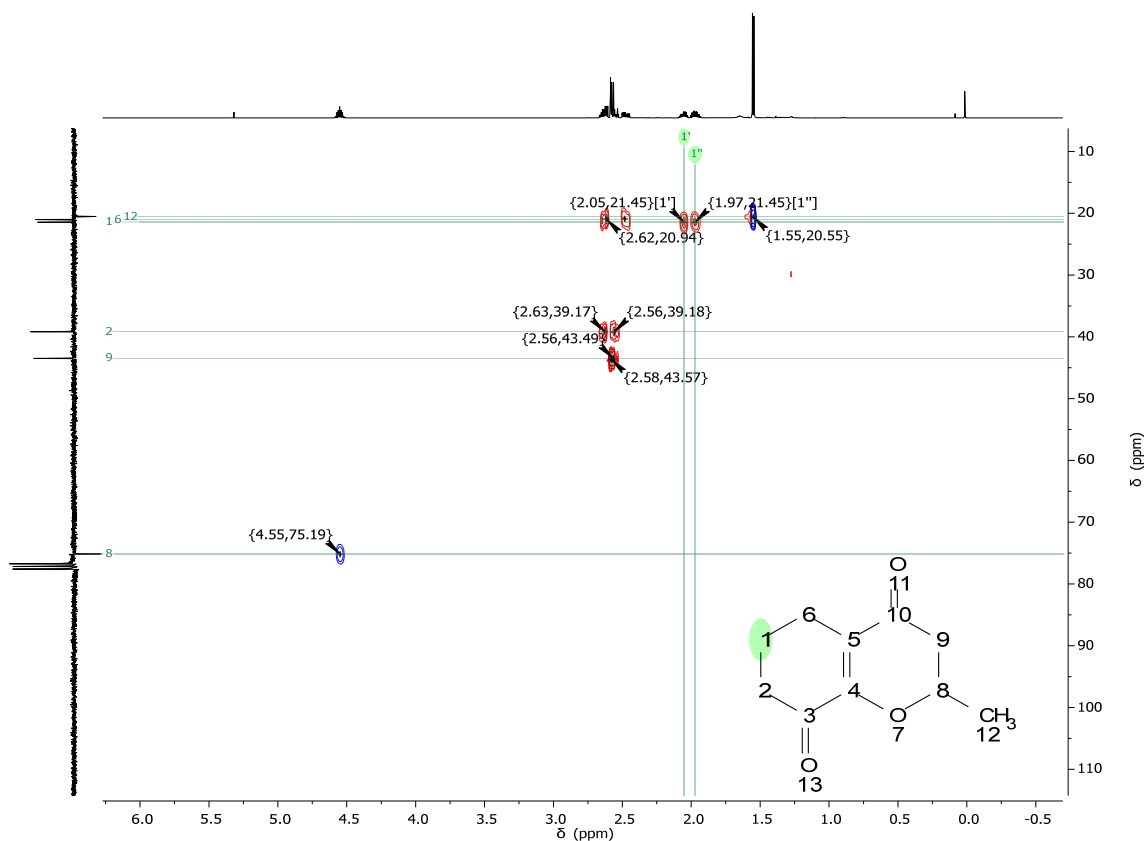


Figura 101: Espectro de HSQC da MTCD.

Tabela 13: Dados espectroscópicos de HSQC da MTCD.

Posição C	δ_C (ppm)	Posição H	δ_H (ppm)	Multiplicidade	Quantidade H
12	20,5	12	1,54	d	3
6	21,0	6	2,66 – 2,42	m	2
1	21,5	1'	1,95	dddt	1
1	21,5	1''	2,04	dddt	1
2	39,2	2	2,66 – 2,42	m	2
9	43,5	9	2,66 – 2,42	m	2
8	75,2	8	4,61 – 4,47	m	1

7.4.1.3.4. Espectrometria de infravermelho

O espectro de infravermelho da MTCD (Figura 102) apresenta absorções características que evidenciam a estrutura esperada para molécula. Em 2931 cm^{-1} , observa-se o sinal relativo ao estiramento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{H}$ dos grupos metila e metilenos da molécula. Em 1697 e 1668 cm^{-1} , podem-se observar as absorções associadas aos estiramentos das ligações $\text{C}=\text{O}$ das carbonilas. Em 1596 cm^{-1} , tem-se a absorção relativa ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$. Em 1175 cm^{-1} , observa-se a absorção relativa ao estiramento da ligação $\text{C}-\text{O}$ do éter.

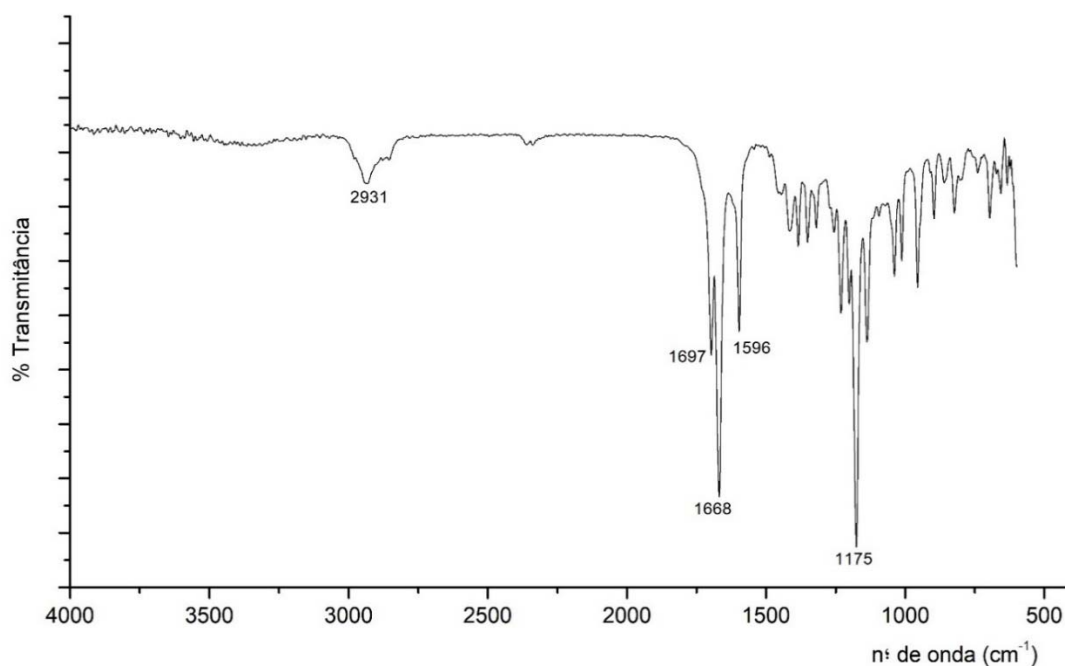


Figura 102: Espectro de Infravermelho da MTCD.

7.4.1.3.5. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Na análise do cromatograma da impureza MTCD (Figura 103), observou-se um pico em 10,8 minutos, conforme esperado. O cálculo de sua área percentual demonstrou uma pureza estimada de 99,9 % e seu espectro de massas apresentou o sinal de íon molecular com m/z 180 (Figura 104).

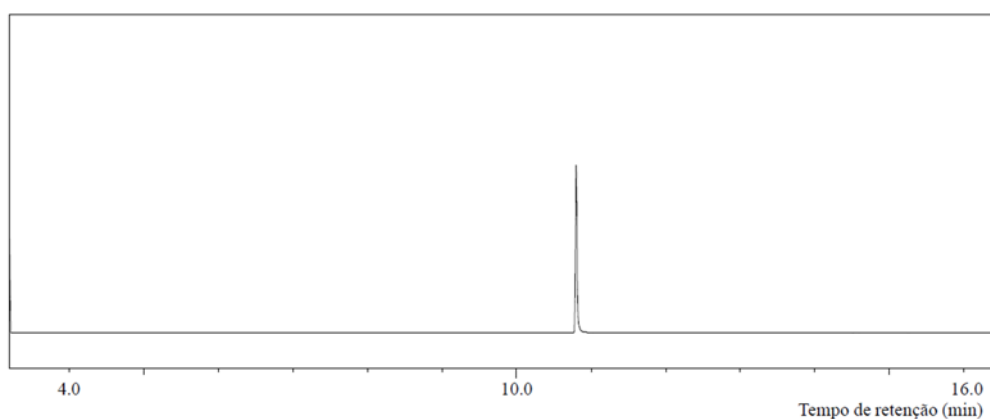


Figura 103: Cromatograma por CG-EM da impureza MTCD.

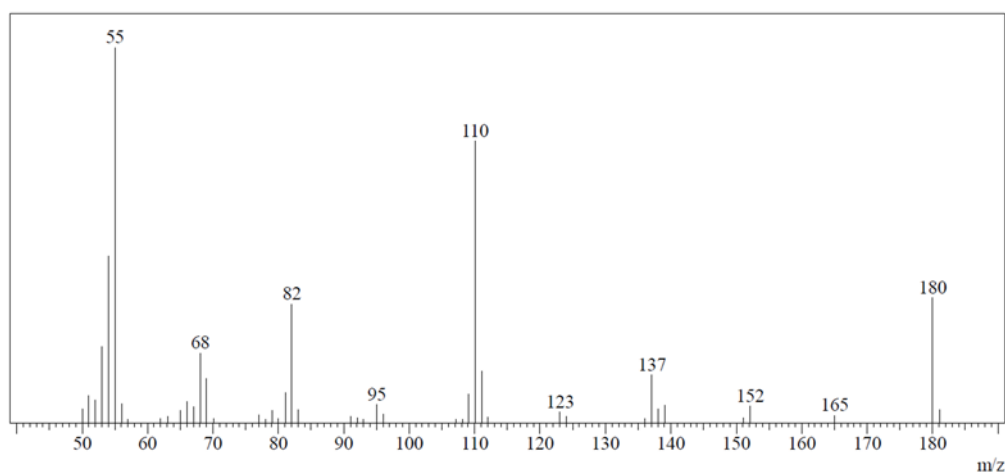
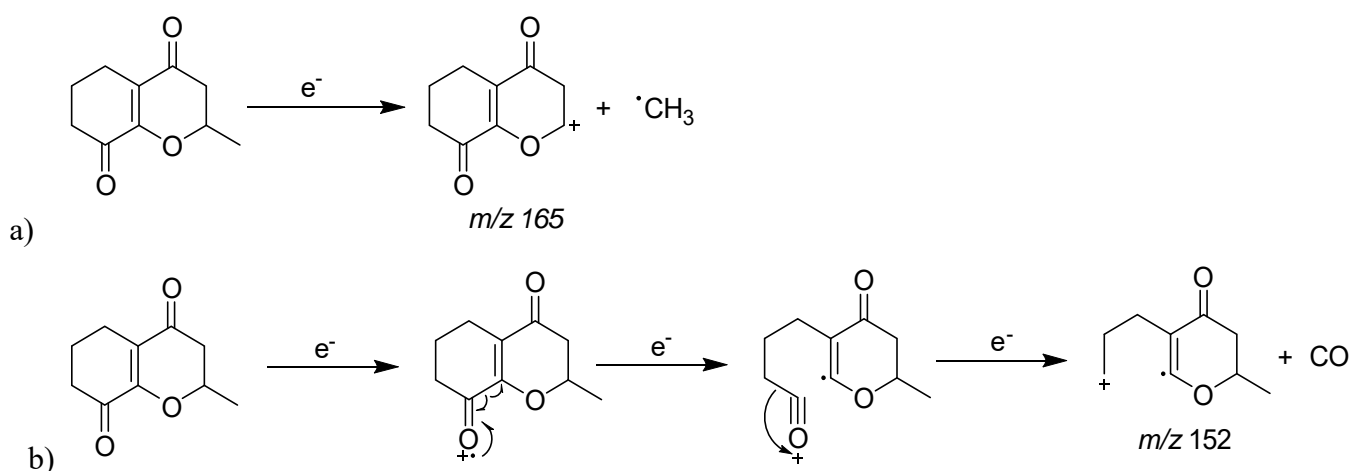
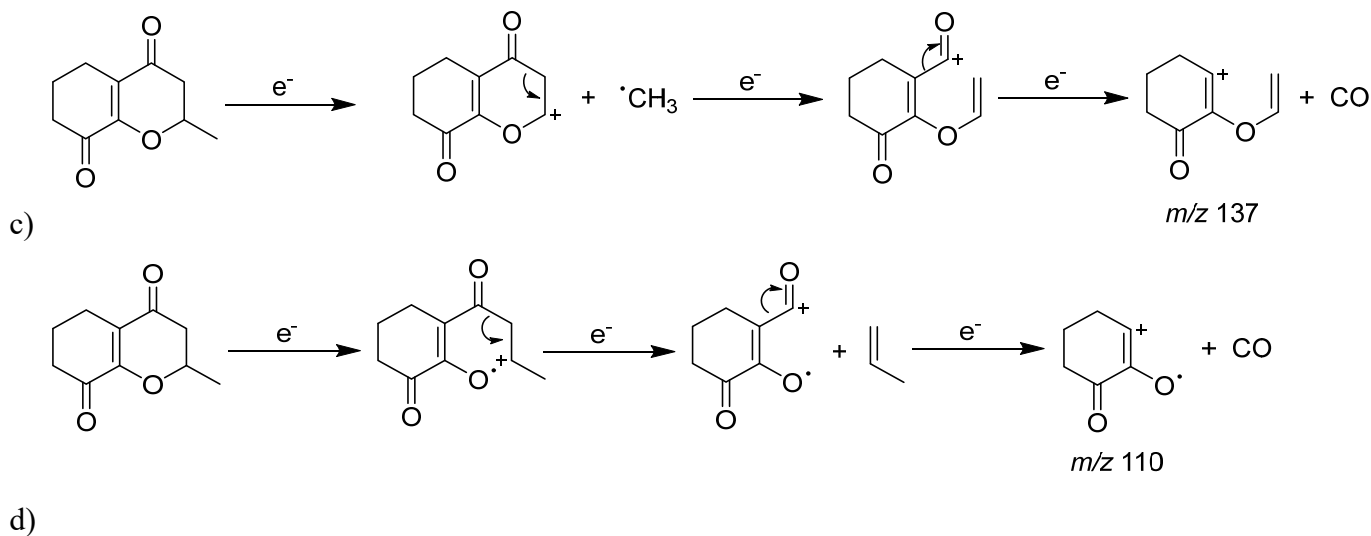


Figura 104: Espectro de massas por impacto de elétrons da impureza MTCD.

Considerando os dados de fragmentação da MTCD (Figura 104), foram propostos mecanismos para a formação de alguns dos fragmentos observados (Esquema 27). Na primeira fragmentação, o sinal M-15 foi formado pela perda de um radical metila da molécula (Esquema 27, letra a). A formação do fragmento m/z 152 foi iniciada com a formação do cátion radicalar no oxigênio da carbonila, seguido dos seguintes eventos: rompimento homolítico da ligação C-C para formação do íon acílio, seguido de rompimento heterolítico da ligação C-C para a liberação de CO (Esquema 27, letra b). A formação do fragmento m/z 108 foi atribuída a um fragmento de segunda geração, o qual é formado a pela liberação de CO a partir de um fragmento m/z 165 (Esquema 27, letra c). A formação do fragmento de m/z 110 foi iniciada com o rompimento heterolítico da ligação C-O do éter, seguido do rompimento heterolítico da ligação C-C adjacente a carbonila para a liberação de um propeno. Logo após, ocorre a liberação de CO para formação do fragmento final (Esquema 27, letra d).





Esquema 27: Propostas de mecanismos de fragmentação da MTCD.

7.4.1.3.6. Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)

O espectro de massas de alta resolução (Figura 105) da impureza MTCD apresentou o íon esperado para molécula $(M+H)^+$ de 181,0865 Da (íon molecular). Notou-se também a presença do íon $(M+1)^+$ 182,0892 Da e do aduto com sódio $(M+23)^+$ 203,0680. Além disso, pôde-se observar também o íon $(M+H)^+$ 139,0389 Da, que foi atribuído a um possível fragmento da molécula.

Utilizou-se a ferramenta “Massa para Fórmula” do programa mMass (free open source software, 2013, versão 5.5) para gerar possíveis fórmulas moleculares para a impureza encontrada. Obteve-se como mais provável a fórmula: $C_{10}H_{12}O_3$, conforme esperado.

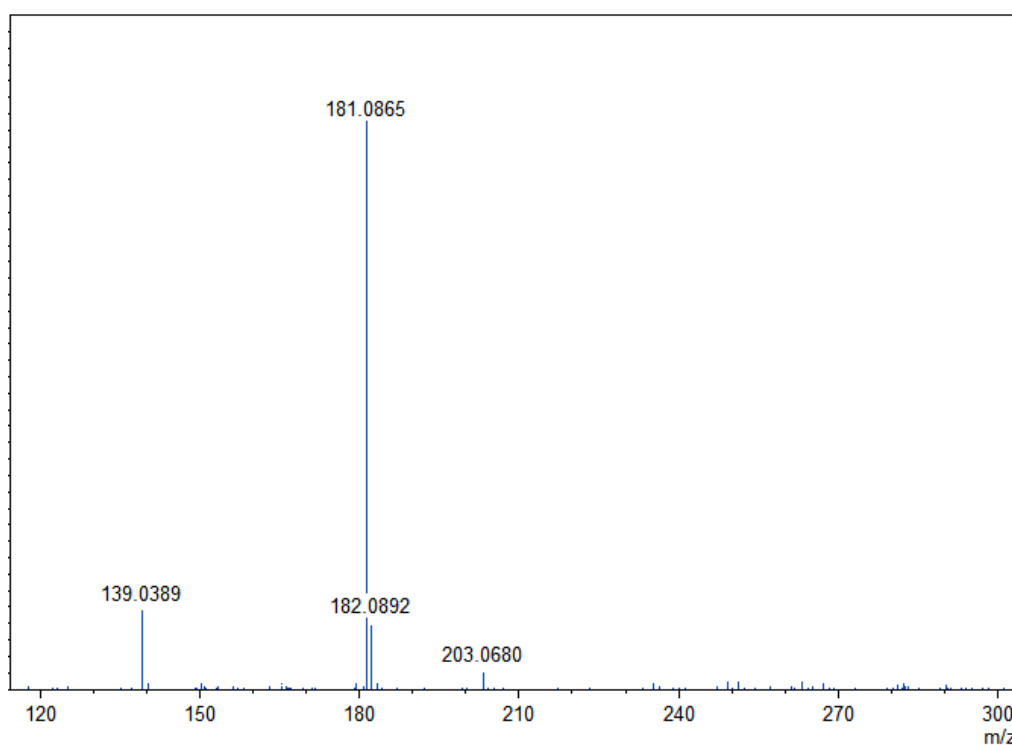
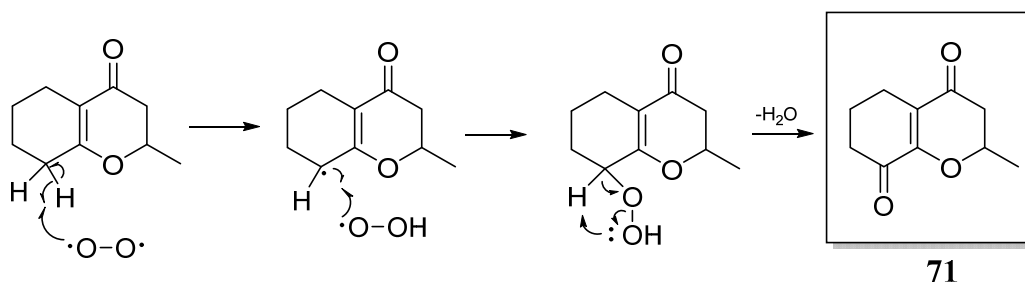


Figura 105: Espectro de massas de alta resolução da impureza MTCD.

7.4.1.3.7. Proposta de mecanismo de formação da impureza MTCD

Neste capítulo, propõe-se um mecanismo de formação da molécula 2-metil-2,3,6,7-tetrahidro-4H-cromeno-4,8(5H)-diona (**71**) por meio de uma reação radicalar com o oxigênio molecular (Esquema 28). Na etapa inicial ocorre a retirada do hidrogênio alílico (na posição beta ao oxigênio do éter) pelo oxigênio molecular, formando o radical hidroperóxido. Depois, esse radical adiciona-se molécula por meio de uma ligação radicalar. Em seguida, ocorre uma transferência de hidrogênio intramolecular, provocando a saída de uma molécula de água e formação da MTCD.

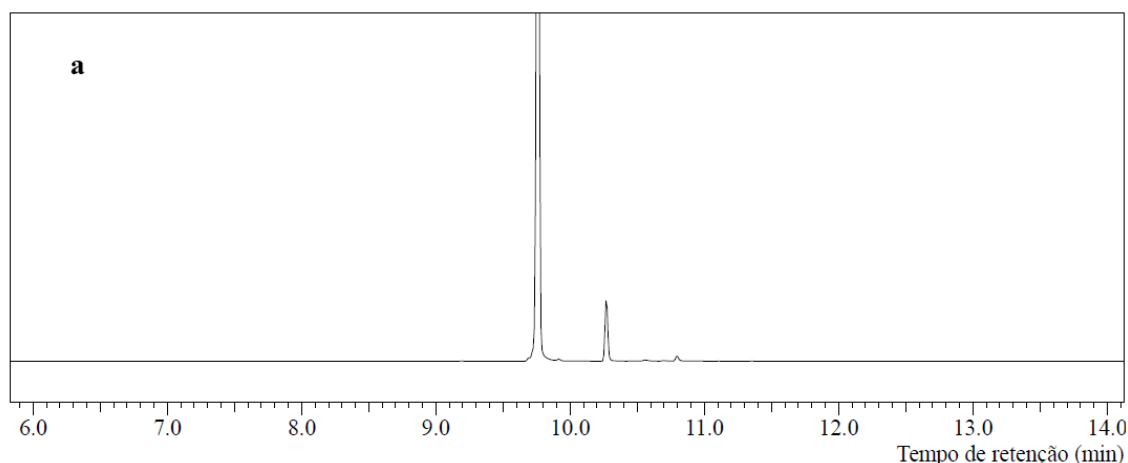


Esquema 28: Proposta de mecanismo de formação da impureza MTCD.

7.5. Ensaio de degradação forçada oxidativos

Para os ensaios de degradação oxidativos, foram preparadas soluções de 6-oxo na concentração de 5 mg/mL em H₂O₂ 10%. As soluções foram colocadas em frascos do tipo Schlenk e permaneceram a 30 °C, em tempos que variaram de 12 a 48 h. Após cada ensaio, as amostras (8 mL) foram extraídas com diclorometano (3 x 10 mL) e secas com sulfato de sódio anidro. Depois, as soluções foram colocadas em evaporador rotativo e em bomba de vácuo para remoção dos voláteis.

Para a verificação de formação de impurezas, os produtos foram dissolvidos em acetonitrila e analisados por CG-EM. Os cromatogramas mostraram uma degradação de 8% para o tempo inicial (Figura 106, letra a) e de 12 % para o tempo final (Figura 106, letra b). Todas as amostras apresentaram apenas duas impurezas, sendo a majoritária em 10,3 minutos, com *m/z* 182, e a minoritária em 10,8 minutos, com *m/z* 180.



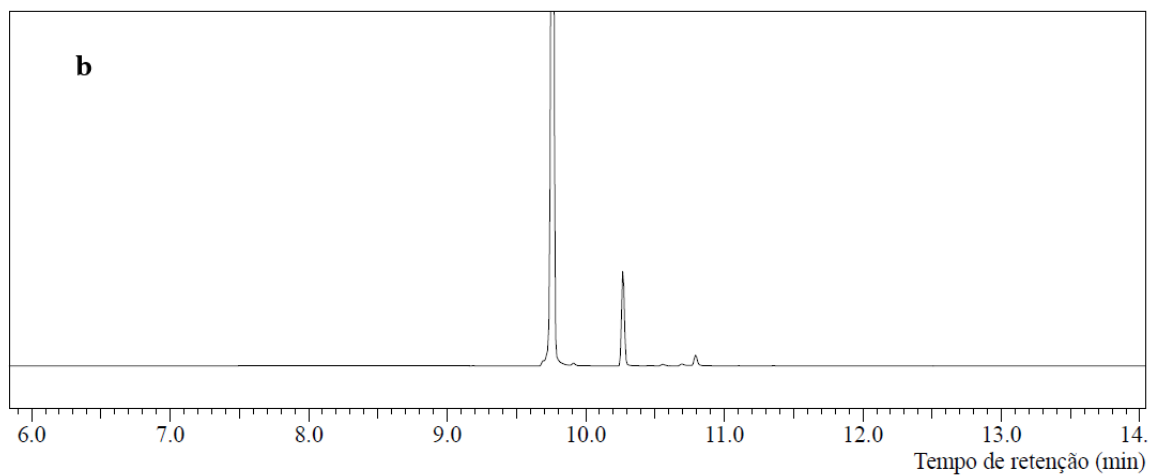


Figura 106: Cromatogramas por CG-EM das amostras de 6-oxo após os testes de degradação forçada em condições oxidativas (5 mg/mL em H₂O₂ 10%) a 30 °C, em diferentes tempos de exposição: **a-** 12 h e **b-** 48 h

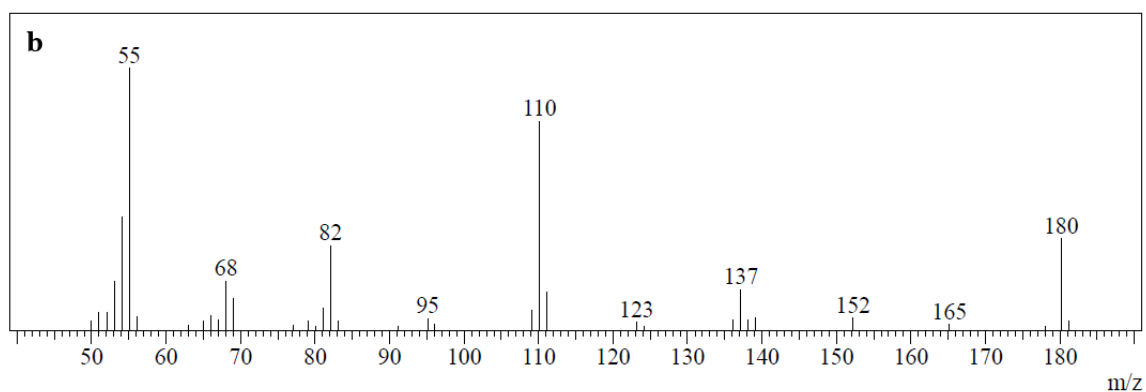
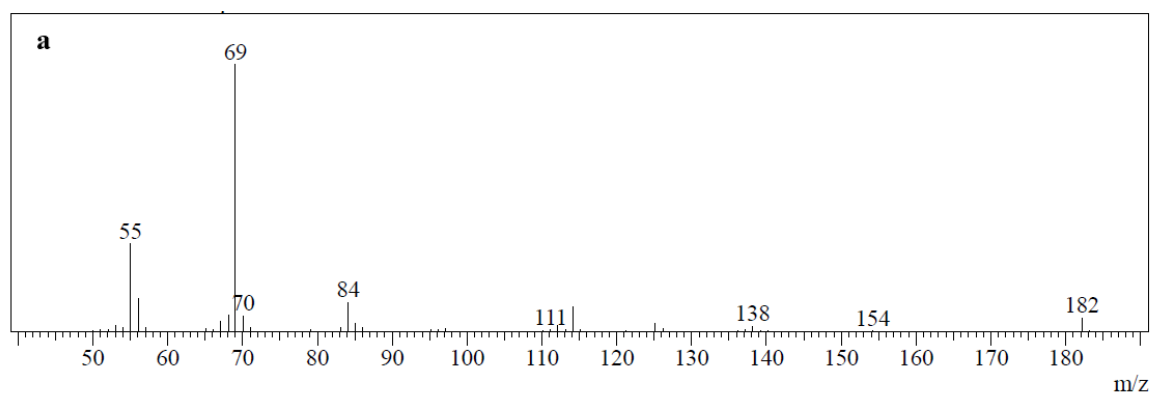


Figura 107: Espectro de massas por impacto de elétrons das impurezas oxidativas - a: m/z 182 e b: m/z 180.

Tendo em vista que a impureza de m/z 180 havia sido isolada e caracterizada após os testes de degradação térmica, buscou-se apenas o isolamento da impureza majoritária (m/z 182).

A molécula de m/z 182 foi isolada por CCD em placa preparativa, utilizando-se diclorometano como eluente. A análise por CG-EM demonstrou que foi a molécula foi obtida com uma pureza estimada de 99,8% (Figura 108).

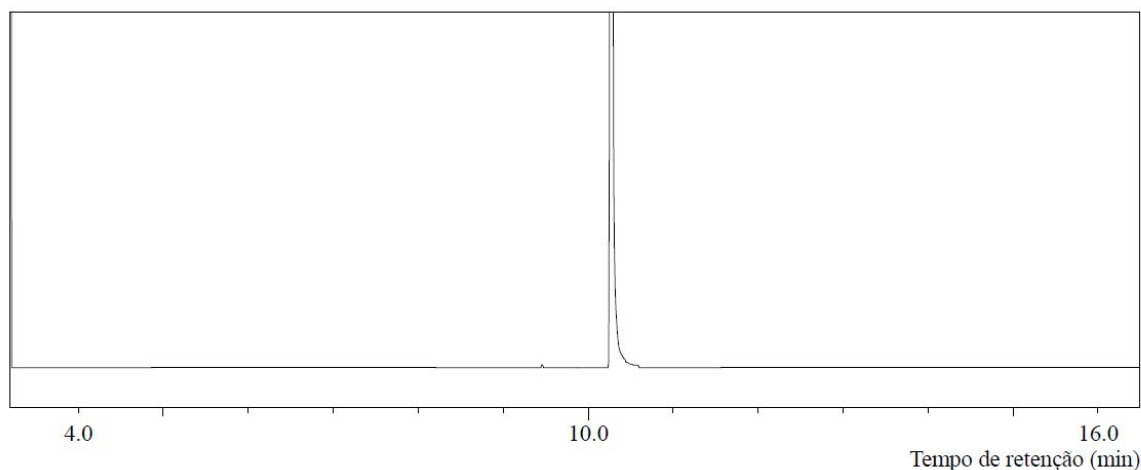


Figura 108: Cromatograma por CG-EM da impureza com m/z 182

7.5.1.1. 4-metil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[b][1,4]dioxepin-2-ona (MHBD)

7.5.1.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Nos dados espectroscópicos de RMN ^1H da impureza de m/z 182 (Figura 109), foi possível observar alguns sinais com deslocamentos e multiplicidades análogos aos da 6-oxo. Em 4,70 ppm, por exemplo, observa-se um quinteto de dubleto (qd) na mesma região do duplo quarteto de dubleto (dqd) da 6-oxo (4,44 ppm). Em 2,93 e 2,70 ppm, são observados dois duplos dubletos (dd) que também aparecem na molécula de partida. Além disso, nota-se a presença de um dubleto (d) em 1,38 ppm, integrado para 3 hidrogênios, o que indica a presença de um grupo metila oriundo da molécula original.

Os outros sinais da impureza aparecem na forma de multipletos em região de campo alto (2,26 – 2,08 ppm (4H) e 1,73 – 1,63 ppm (4H)) e foram atribuídos aos acoplamentos de grupos metilenos.

Diante do exposto, propôs-se uma fórmula estrutural para impureza, indicada na Figura 110. Seu nome químico é 4-metil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[b][1,4]dioxepin-2-ona, a qual atribuiu-se um acrônimo: MHBD.

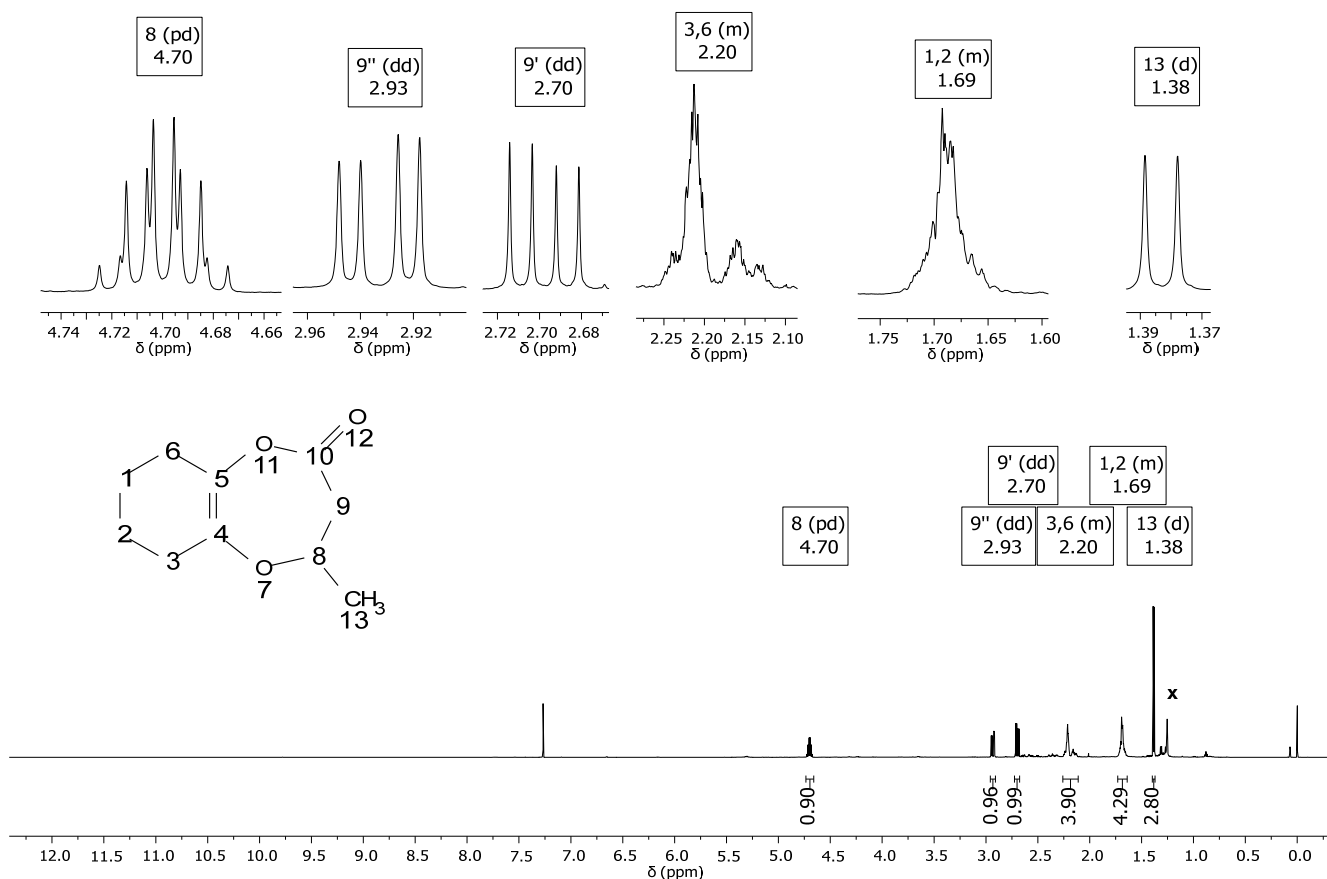


Figura 109: Espectro (RMN ^1H , 600 MHz, CDCl_3) da impureza de m/z 182 (MHBD).

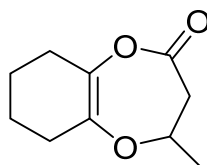


Figura 110: Estrutura molecular da impureza com m/z 182 (MHBD).

7.5.1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C)

O espectro de RMN ^{13}C , a 75 MHz em CDCl_3 (Figura 111), apresenta sinais para todos os carbonos esperados para a molécula proposta. O sinal do carbono observado em campo mais baixo (170,1 ppm) foi atribuído a carbonila do anel dihidropirano, devido ao efeito de desblindagem gerado pela anisotropia magnética da ligação $\text{C}=\text{O}$. O sinal em 137,1 ppm foi atribuído sinal do carbono insaturado vicinal ao oxigênio do éter, o qual é duplamente desblindado devido à proximidade com o átomo eletronegativo e ao efeito anisotrópico da dupla ligação. O outro sinal em campo baixo com 134,4 ppm está relacionado ao outro carbono da ligação $\text{C}=\text{C}$. O próximo sinal, em 76,9 ppm, corresponde ao carbono metino monossustituído vizinho ao oxigênio. Em seguida, o espectro apresenta um sinal em 40,9 ppm, que foi

atribuído ao carbono saturado na posição α a carbonila. Os sinais em 28,4 e 26,7 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos grupos metilenos nas posições 6 e 3, os quais são mais desblindados pela maior proximidade a insaturação nos carbonos 4 e 5 da molécula. Em sequência, o espectro apresenta os sinais dos grupos metilenos das posições 1 e 2 da molécula (22,6 e 22,7 ppm), o quais não puderam ser diferenciados devido à proximidade dos valores de deslocamento. Por último, o sinal de campo mais alto (22,0 ppm) foi atribuído ao grupo metila.

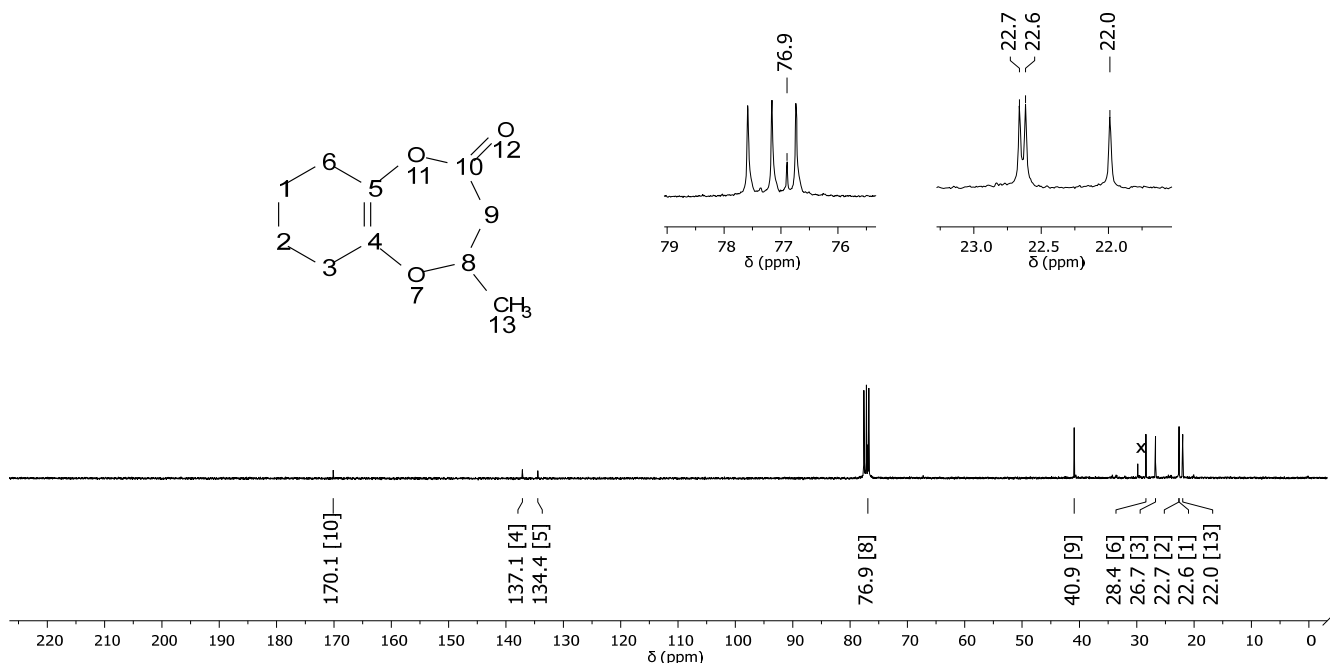


Figura 111: Espectro (RMN ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3) da impureza de m/z 182 (MHBD).

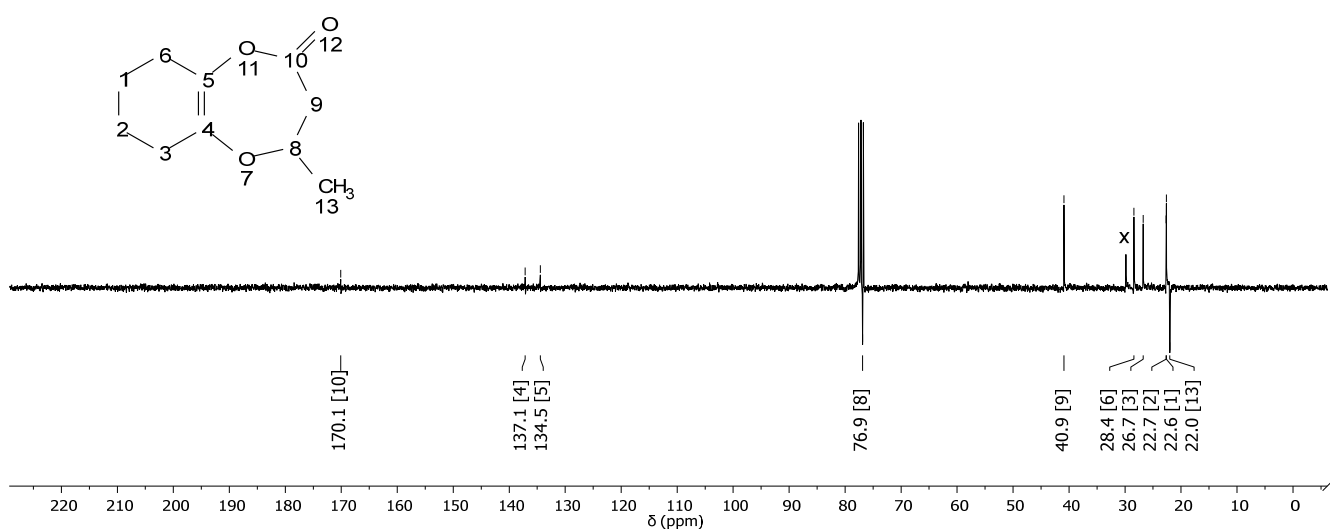


Figura 112: Espectro de RMN ^{13}C com APT (75 MHz, CDCl_3) da MHBD.

Além obtenção do espectro de RMN ^{13}C , foi realizado o experimento de carbono 13 com APT (figura 112), para identificação e confirmação dos diferentes tipos de carbonos da molécula. Por meio dos dados obtidos, foi possível identificar o grupo metila em 22,0 ppm e confirmar a presença do grupo CH em 76,9 ppm. Além disso, observou-se que, excetuando-se os carbonos em campo mais baixo (170,1; 137,1 e 134 ppm), os demais carbonos da molécula são grupos metileno, o que confirma estrutura proposta para a impureza.

7.5.1.1.3. HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy)

No espectro de HSQC da MHBD (Figura 113) foi possível observar os diversos acoplamentos C-H da molécula. Essas relações foram descritas na Tabela 14. Com isso, nota-se que apesar desse experimento não ser totalmente conclusivo quanto a diferenciação dos carbonos nos multipletos, pôde-se confirmar a atribuição dos outros sinais da molécula.

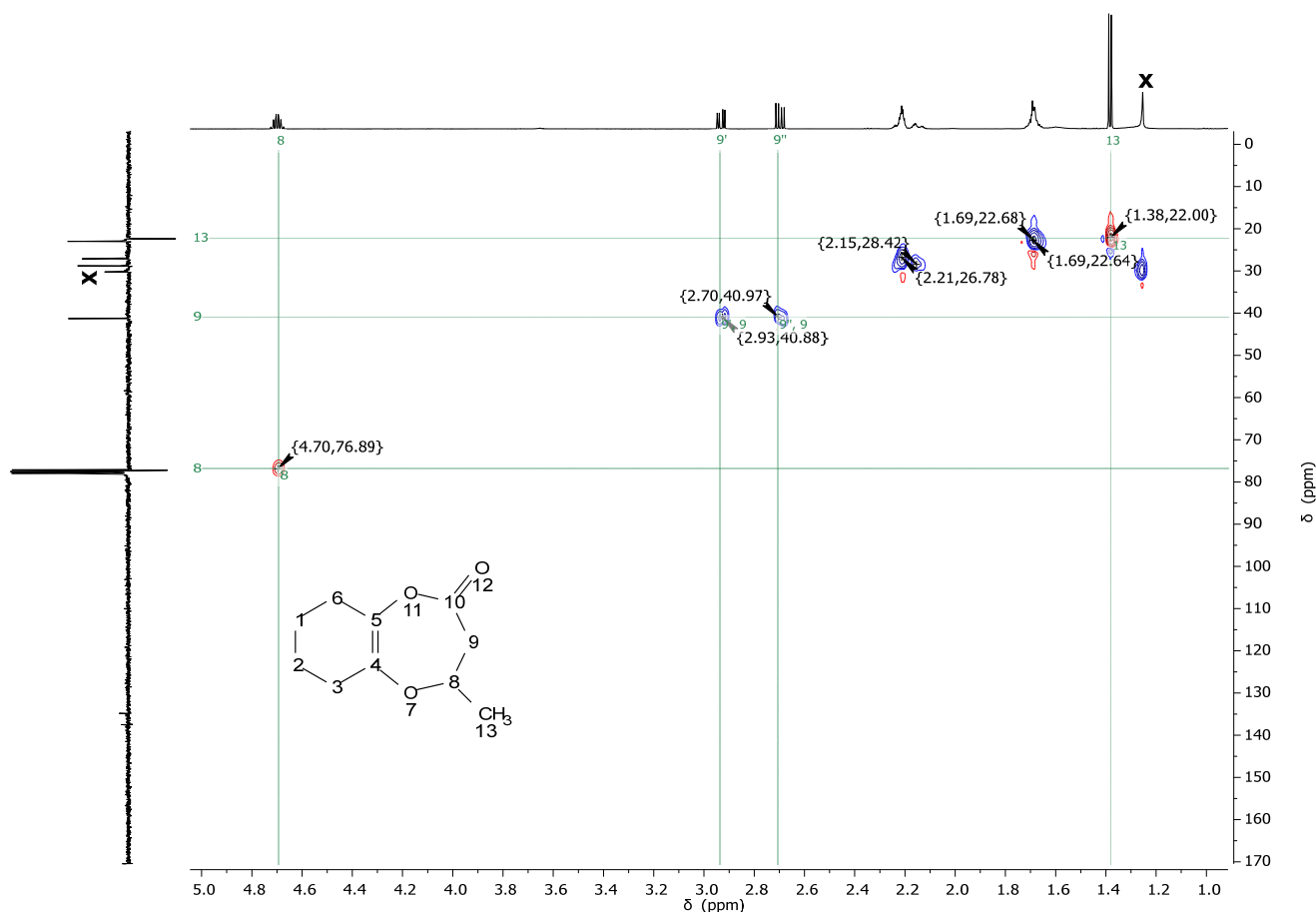


Figura 113: Espectro de HSQC da MHBD.

Tabela 14: Dados espectroscópicos de HSQC da MBHD.

Posição C	δ_c (ppm)	Posição H	δ_H (ppm)	Multiplicidade	Quantidade H
13	22,0	13	1,38	d	2
1 e 2	22,6 e 22,7	1 e 2	1,73 - 1,63	m	4
3 e 6	26,7 e 28,4	3 e 6	2,26 - 2,08	m	4
9	40,9	9 e 9'	2,70 e 2,93	dd	3
8	76,9	8	4,70	qd	1

7.5.1.1.4. Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)

A amostra da MHBD foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), com objetivo de confirmar sua massa molecular. O espectro de massas (Figura 114) apresentou como íon mais abundante o sinal $(M+H)^+$ com m/z 183,1009 (íon molecular). Os outros íons apresentados no espectro foram atribuídos aos fragmentos da molécula original, pois puderam ser identificados no espectro de massas/massas (MS^2) da amostra (Figura 115). A exceção foi o íon com m/z 181,0849, o qual foi atribuído a um possível resíduo da molécula com m/z 180 (produto de degradação minoritário), pois não foi encontrado no espectro MS^2 da impureza.

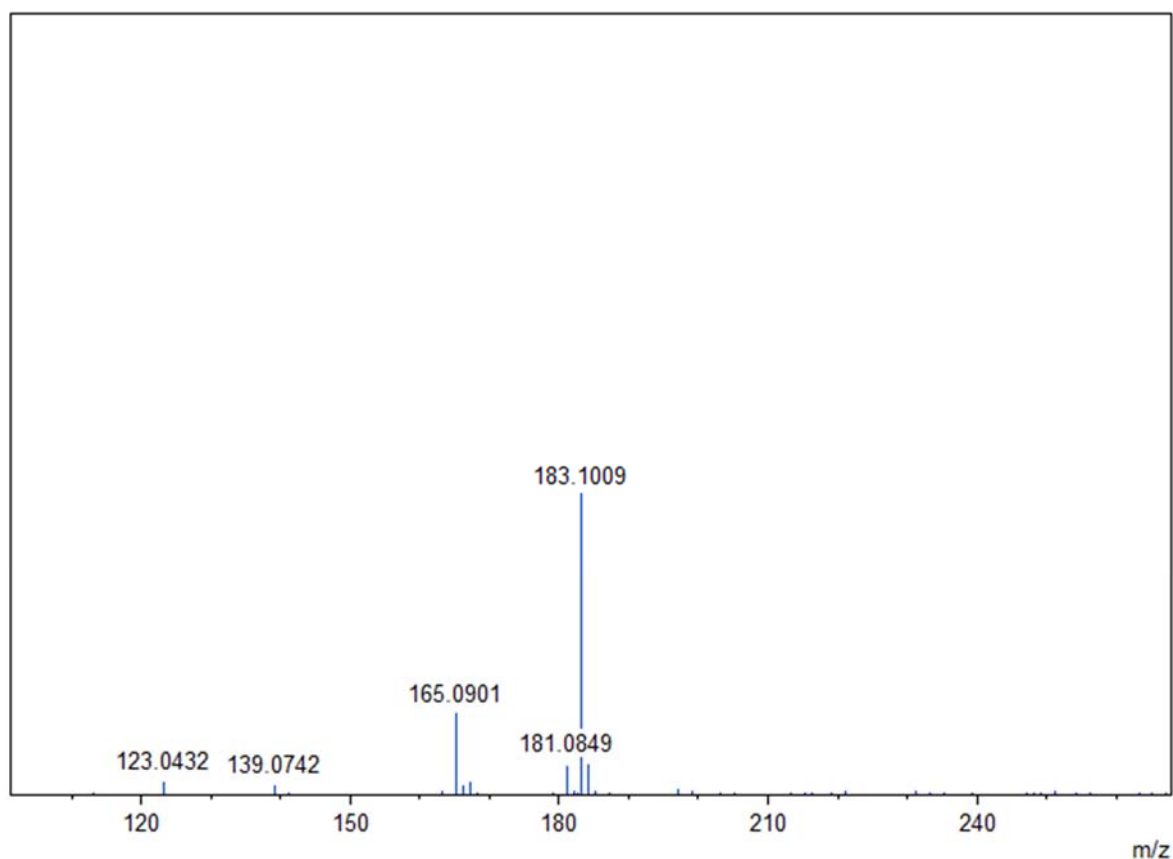


Figura 114: Espectro de massas de alta resolução da impureza m/z 182.

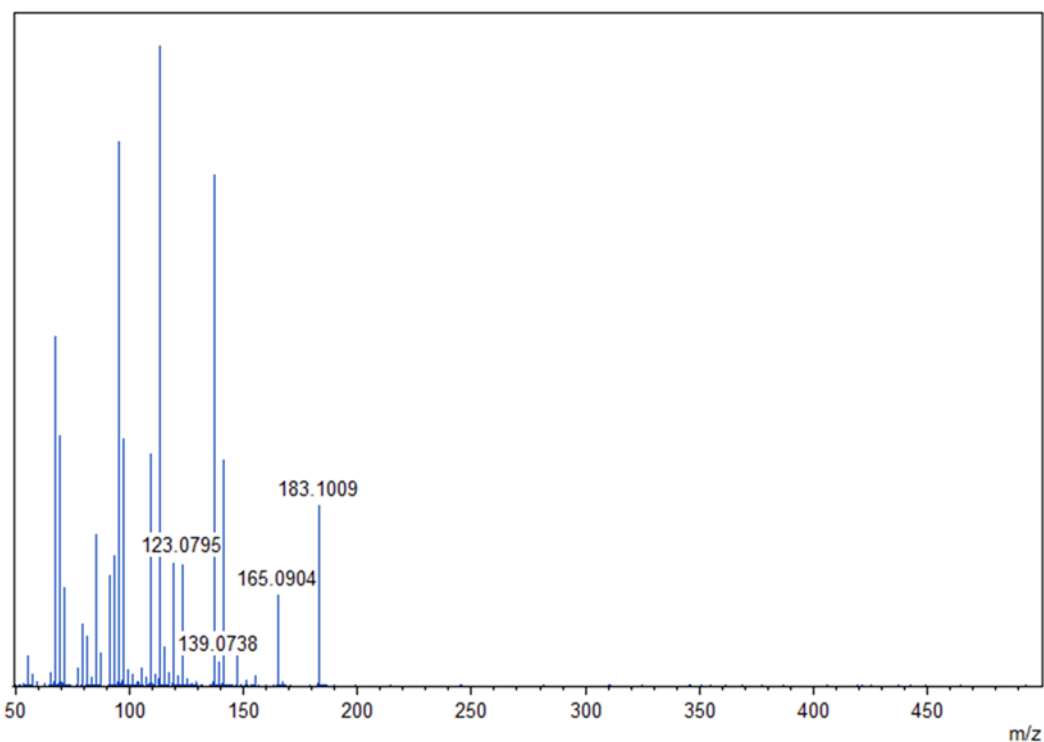
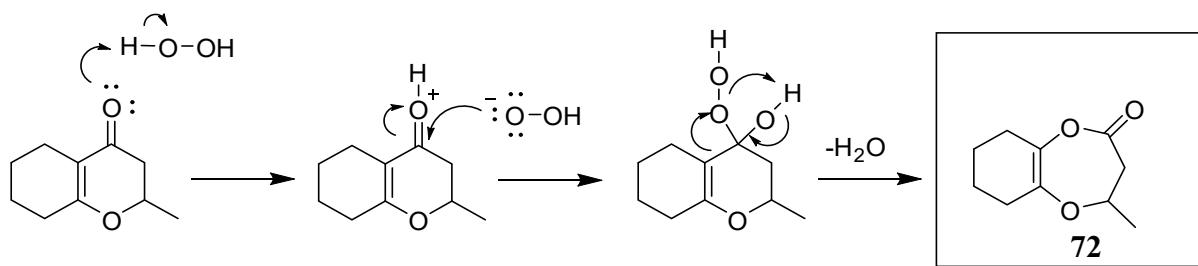


Figura 115: Espectro MS² da impureza *m/z* 182.

Utilizou-se a ferramenta “Massa para Fórmula” do programa mMass (free open source software, 2013, versão 5.5) para gerar possíveis fórmulas moleculares para a impureza encontrada. Obteve-se como mais provável a fórmula: C₁₀H₁₄O₃.

7.5.1.1.5. Proposta de mecanismo de formação da impureza MHBD

A proposta de mecanismo de formação da molécula MHBD (Esquema 29) foi baseada nas reações de oxidação de Baeyer–Villiger.^{85, 86} Nessa proposta, a reação é iniciada pela protonação da carbonila, formando o íon hidroperóxido no meio reacional. Em seguida, esse íon se liga a carbonila que, por sua vez, deslocaliza um par de elétrons da ligação C=O para o átomo de oxigênio. Por último, ocorre um rearranjo intramolecular com transferência de hidrogênio e liberação uma molécula de água para a formação da lactona MHBD (**72**).



Esquema 29: Proposta de mecanismo de formação da impureza MHBD.

8. Método indicativo de estabilidade

Segundo o guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamento da Anvisa (Guia nº 4, versão 1, de 04/12/2015), um método indicativo de estabilidade para produtos de degradação é aquele capaz de detectar e quantificar todos os produtos relevantes do perfil de degradação “real” de uma determinada substância.^{***87} Considerando que a técnica de análise recomendada para análise de produtos de degradação é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Fotodiodo (CLAE-DAD)⁸⁷, buscou-se desenvolver uma metodologia de análise por essa técnica que conseguisse identificar todas as impurezas de degradação geradas no estudo de estresse da 6-oxo e também as potenciais impurezas de processo. Para isso, as amostras das impurezas foram analisadas em um cromatógrafo Shimadzu UFLC LC-20 com detector DAD, utilizando o software LC solution® para controle do sistema, aquisição e tratamento de dados. A separação cromatográfica foi obtida utilizando a coluna GRACE C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm). A fase móvel foi composta por água (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B) em gradiente de eluição, com vazão de 1,0 mL / min. A eluição gradiente foi programada como tempo (min) / porcentagem de Solvente B - 5/5, 45/30, 75/90, com tempo de equilíbrio de 15 min. O volume das injeções foi de 30 µl. As soluções foram preparadas em concentrações de 3 a 8 µg.mL⁻¹.

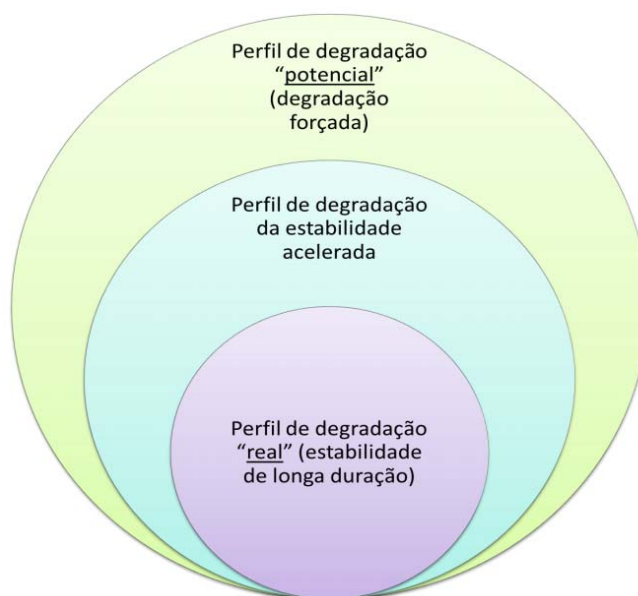


Figura 116: Relação entre os diferentes perfis de degradação obtidos por: Estudo de estabilidade de longa duração, estudo de estabilidade acelerada e estudo de degradação forçada.⁸⁷

^{***} Entende-se como perfil de degradação “real” aquele obtido por meio de estudo de estabilidade de longa duração.

As condições dos estudos de estabilidade de longa duração e acelerados estão descritas nos art. 22 e 23 da RDC nº. 45, de 09 de agosto de 2012 da Anvisa.³⁴

A principal dificuldade para desenvolvimento da metodologia de análise por CLAE-DAD, foi a separação de todas as impurezas em diferentes tempos de retenção. Contudo, conseguiu-se um método com boa seletividade (Figura 117).

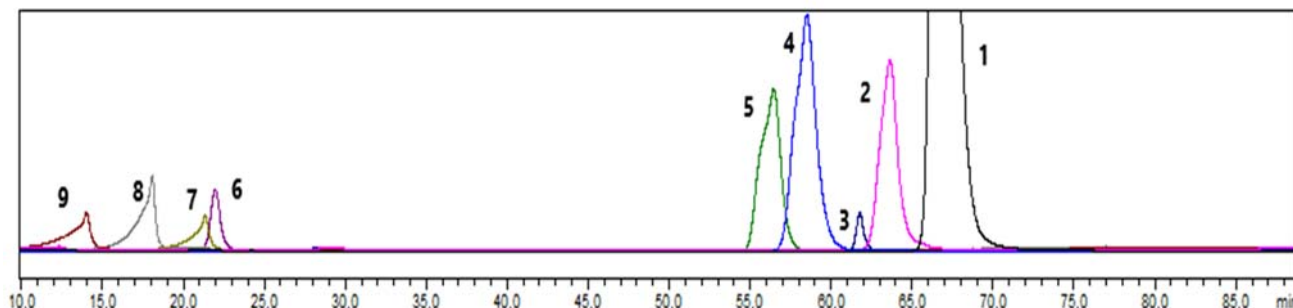


Figura 117: Cromatograma CLAE-DAD da 6-oxo (1) em 67,5 min. e de suas impurezas: m/z 166 - HCB (2) em 63,3 min.; m/z 192 (3) em 61,5 min., m/z 182 (4) em 58,5 min., m/z 162 (5) em 56,2 min., m/z 180 (6) em 22,0 min, m/z 178 (7) em 21,1 min., m/z 166 – BCD em 18 min. e m/z 155 (9) em 14 min.

Considerando que não havia padrões primários das impurezas, optou-se por tentar avaliar algumas figuras analíticas de mérito apenas para 6-oxo, considerando o disposto na RDC n°. 166/2017 da Anvisa.⁸⁸

Para avaliar a linearidade, foram preparadas amostras de 6-oxo de 1 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em acetonitrila (em triplicata). Considerando a média dos resultados das análises, construiu-se uma curva analítica (Figura 118) que apresentou um coeficiente de correlação (R) de 0,994. Esses resultados indicaram o que os valores de resposta ao método analítico foram diretamente proporcionais a concentração da 6-oxo, dentro do intervalo analisado.

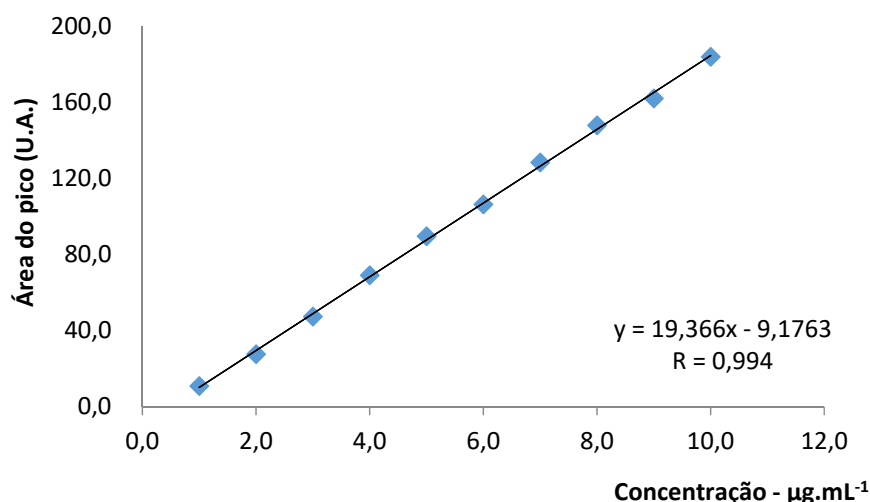


Figura 118: Curva analítica por CLAE-DAD da 6-oxo (concentrações de 1 a 10 µg.mL⁻¹).

A exatidão foi verificada a partir de 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, em 3 (três) concentrações: 1, 5 e 10 µg.mL⁻¹ em acetonitrila, com 3 (três) réplicas em cada nível (Tabela 15). O cálculo da exatidão foi realizado utilizando-se fórmula de % de recuperação da amostra (Figura 119). Considerando média dos valores, a precisão calculada foi de 99,46 %.

$$\% \text{ Recuperação: } \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Figura 119: Fórmula do cálculo da % de recuperação.

Tabela 15: Dados das leituras das amostras nas concentrações de 1, 6 e 10 µg.mL⁻¹ de 6-oxo em acetonitrila utilizados no cálculo da % de recuperação

[] teórica (µg.mL ⁻¹)	[] das amostras analisadas em µg.mL ⁻¹			média	% rec
1	0,98	0,99	0,99	0,99	98,67
6	5,99	6,01	5,98	5,99	99,89
10	9,98	9,97	10,00	9,98	99,83

O limite de detecção (LD) foi calculado de acordo com fórmula apresentada na Figura 120. O resultado obtido foi de 0,33 µg.mL⁻¹.

$$LD = \frac{3,3 \cdot DPAD}{IC}$$

Figura 120: Fórmula utilizada no cálculo do limite de detecção – LD (DPAD – desvio padrão e IC – inclinação da curva).

O limite de quantificação (LQ) foi calculado por meio da fórmula apresentada na Figura 121. O resultado obtido foi de 0,99 µg.mL⁻¹.

$$LQ = \frac{10 \cdot DPAD}{IC}$$

Figura 121 – Fórmula utilizada no cálculo do limite de quantificação – LQ (DPAD – desvio padrão e IC – inclinação da curva).

A robustez foi avaliada apenas de forma qualitativa, durante o desenvolvimento do método analítico, através de variações nas condições de fluxo da fase móvel, temperatura da coluna e concentração das amostras de 6-oxo. A modificação desses fatores não causou influência substancial na resposta analítica da 6-oxo. Ressalta-se que não se avaliou variação no pH da fase móvel, pois isto poderia provocar degradação do analito.

9. Estudo de polimorfismo da 6-oxo

No processo inicial dos estudos de polimorfismo da 6-oxo, verificou-se a possibilidade de fazer a recristalização do produto em alguns solventes apolares alternativos ao hexano. Para isso, utilizou-se as substâncias: ciclohexano, heptano e benzeno. Em todos os testes realizados, não se conseguiu recristalizar a 6-oxo em nenhum dos solventes escolhidos. As amostras apresentavam no máximo um aspecto gelatinoso que não cristalizava sob resfriamento.

Diante da dificuldade de encontrar um solvente que pudesse gerar um diferente polimorfo para a 6-oxo, resolveu-se investigar o processo de recristalização sem solvente na amostra. Dessa forma, era necessário obter dados sobre as propriedades térmicas da amostra. Em uma primeira abordagem, submeteu-se a 6-oxo a uma análise de termogravimétrica (TGA) para verificar as possíveis perdas de massa da molécula. Nessa análise, uma amostra de 7,7 mg de 6-oxo foi colocada em um cadinho de platina e aquecida de 25 a 300°C, a uma taxa de 5°C/min, sob um fluxo de gás hélio de 30 L/min, em um analisador termogravimétrico (TGA) DTG-60H – Shimadzu. De acordo com o termograma obtido (Figura 122), pôde-se observar que a massa da amostra permaneceu estável até 70 °C. Dessa forma, constatou-se a importância de não ultrapassar esse patamar de temperatura nos testes de recristalização, para que não seja iniciado um processo de degradação da amostra.

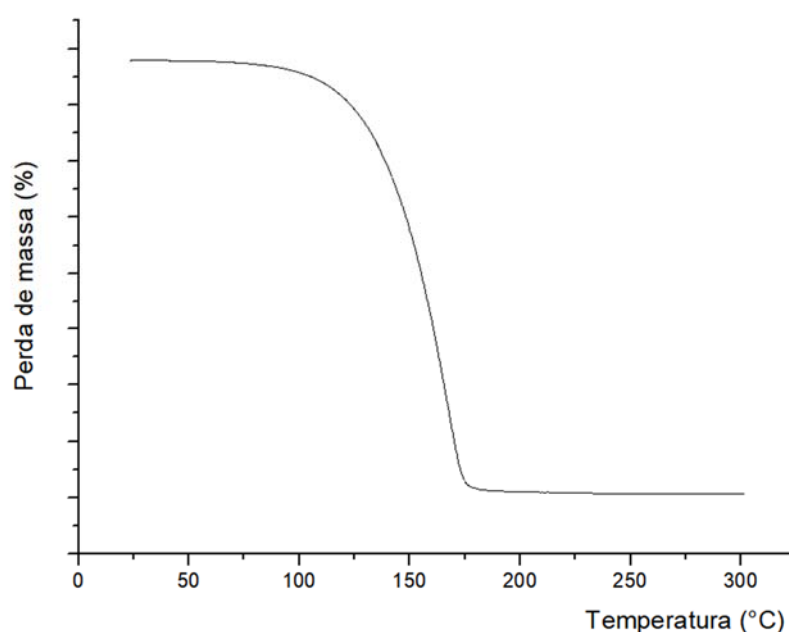


Figura 122: Termograma (TGA) da 6-oxo.

Para verificar as entalpias associadas às transições de fase da 6-oxo e determinar a temperatura na qual esses processos ocorrem, uma amostra dessa substância foi submetida a uma análise de calorimetria diferencial exploratória (DSC). Nessa análise, uma amostra de 6-oxo (4 mg) foi colocada em uma pequena panela de alumínio (selada) e submetida a um aquecimento de 20 a 70 °C a uma taxa

de 5°C/min, sob atmosfera inerte (hélio), em um calorímetro Shimadzu DSC-60. Em seguida, a amostra foi resfriada a uma taxa de 5°C/min até uma temperatura de -10 °C. De acordo com as curvas de aquecimento e resfriamento (Figura 123), observou-se que a cristalização ocorreu em uma temperatura muito diferente da temperatura de fusão da amostra. Essa informação sugeriu a possibilidade de obtenção de um novo polimorfo da 6-oxo.

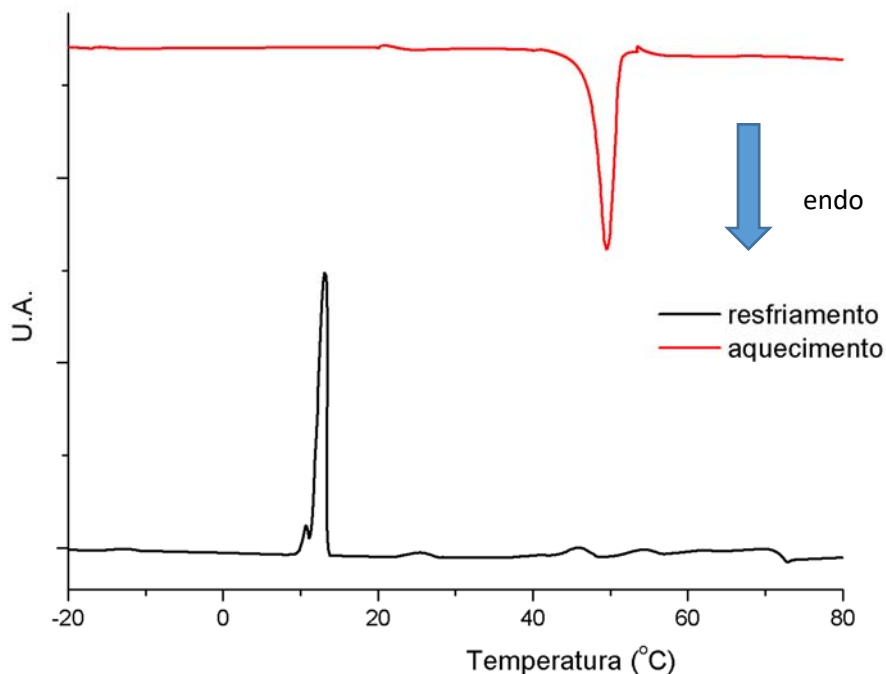


Figura 123: Curvas de aquecimento e resfriamento na análise da 6-oxo por DSC.

No intuito de reproduzir as condições utilizadas na análise por DSC, adicionou-se 15 mg de 6-oxo a um tubo Schlenk e, em seguida, sua atmosfera foi interna foi trocada por gás hélio. Depois, o tubo foi submetido a aquecimento em banho de óleo até 70 °C e rapidamente resfriado em banho de água e depois de gelo até 5°C. Durante esse processo, foi possível observar que a amostra fundiu na faixa de temperatura esperada. Contudo, não se conseguiu monitorar a temperatura de solidificação, pois o banho estava em uma temperatura fixa. Ao final, notou-se que amostra solidificada apresentava aspecto visual diferente da 6-oxo e para verificar se houve a formação de um novo polimorfo, foi realizada análise de difração de raios X de pó - PXR

Os dados de PXR foram analisados no programa MATCH- Phase Identification From Power Diffraction (Version 2, manufactured by Crystal Impact). Os difratogramas da 6-oxo (Figura 124) e da amostra recristalizada (Figura 125) apresentaram padrões diferentes. Por meio do software Match, os dados de posição e intensidade dos picos foram utilizados na indexação ^{§§§} dos parâmetros de célula

^{§§§} Indexação significa a derivação de parâmetros de célula unitária a partir de determinadas posições de pico em um padrão de difração de pó.

unitária. Os resultados mostraram que a 6-oxo apresentou parâmetros de célula unitária do tipo monoclinico (Figura 126) enquanto o sólido recristalizado apresentou parâmetros de célula unitária do tipo ortorrômbico (Figura 127).

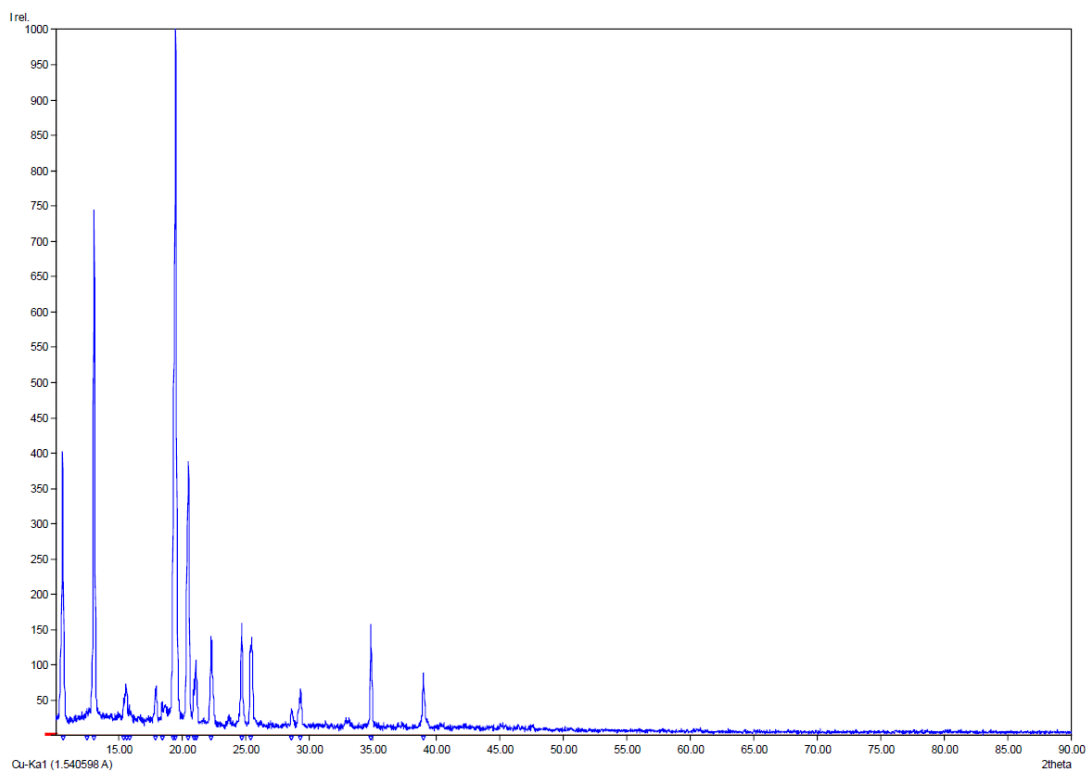


Figura 124: Difratograma da 6-oxo (PDRX).

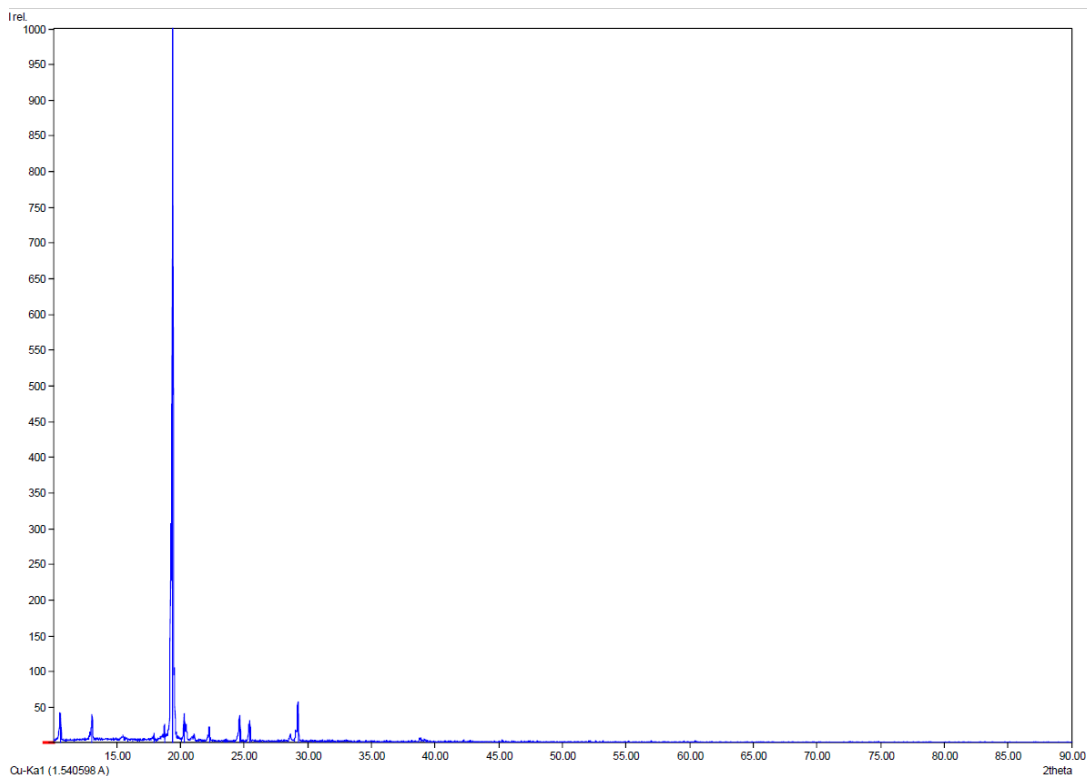


Figura 125: Difratograma da 6-oxo recristalizada (PDRX).

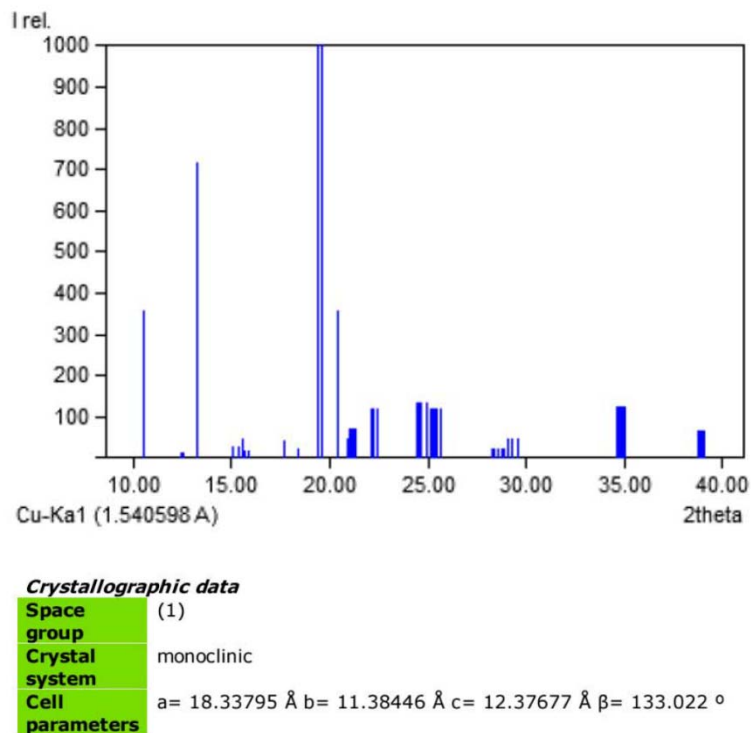


Figura 126: Dados do difratograma da 6-oxo indexados no *software* Match.

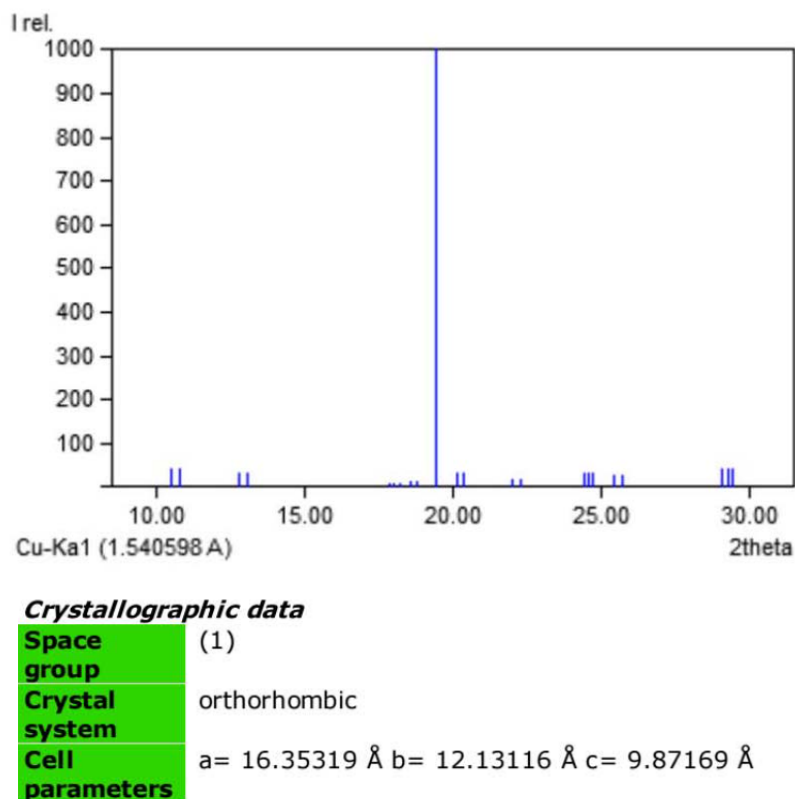


Figura 127: Dados do difratograma da 6-oxo recristalizada indexados no *software* Match.

Com intuito de confirmar a diferenças observadas nas análises PXRD, as amostras foram analisadas por espectrometria no IV médio (Figura 128). Contudo, não se conseguiu observar diferenças entre as amostras analisadas.

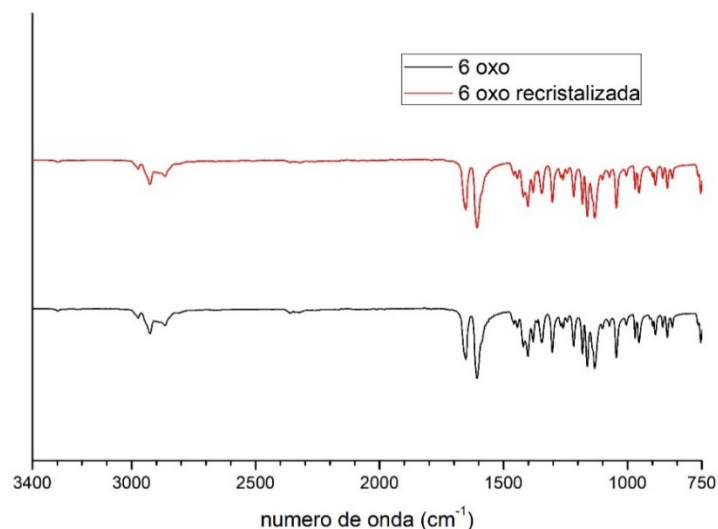


Figura 128: Espectro de IV da 6-oxo e da 6-oxo recristalizada.

Por último, amostras da 6-oxo e da 6-oxo recristalizada foram analisadas por RMN C^{13} no estado sólido (Figura 129). Contudo, os espectros não apresentaram diferenças entre os possíveis polimorfos formados. Diante disso, concluiu-se que apesar das evidências de formação de um novo polimorfo obtidas por DRX de pó, não se conseguiu confirmar a presença do polimorfo por meio das outras técnicas analíticas utilizadas.

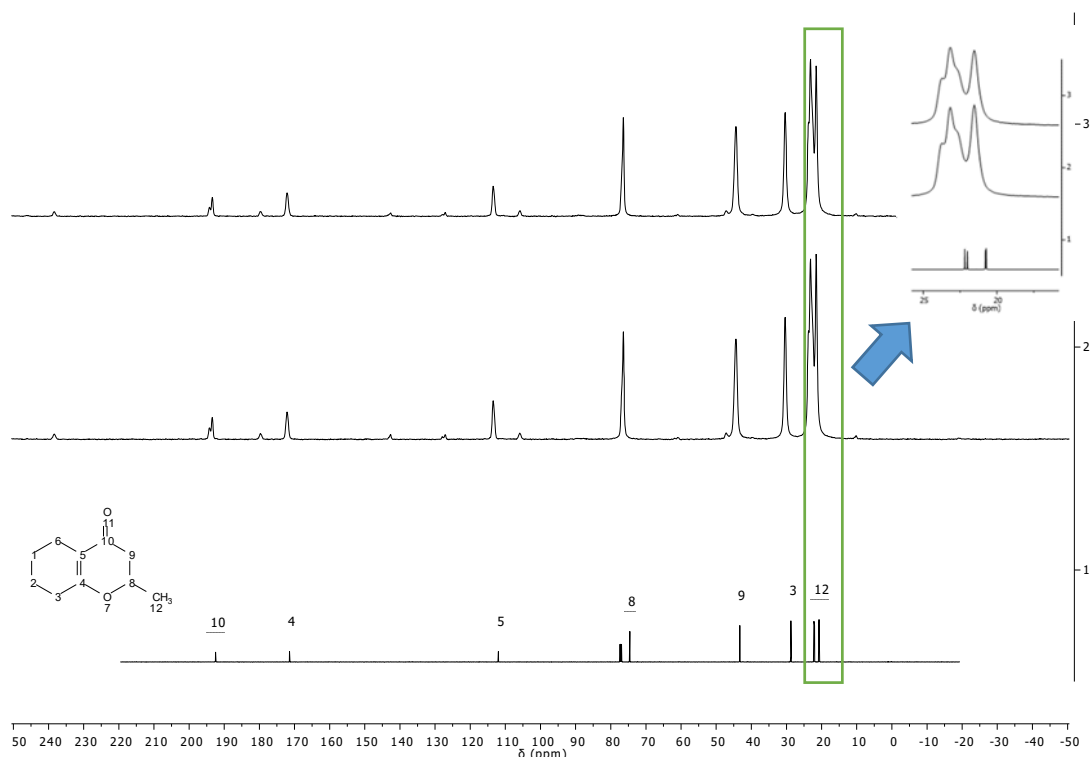


Figura 129: Comparação de diferentes espectros de RMN de ^{13}C da 6-oxo: 1 – Espectro RMN de ^{13}C da 6-oxo dissolvida em $CDCl_3$ (amostra líquida), 2 – Espectro de RMN de ^{13}C da 6-oxo no estado sólido antes da recristalização e 2 – Espectro de RMN de ^{13}C da amostra recristalizada de 6-oxo no estado sólido

10. Conclusões

O sucesso nas modificações da síntese da 6-oxo permitiu o desenvolvimento de um processo de síntese mais próximo das exigências na fabricação de IFA. Em relação à rota original, notou-se que a retirada da etapa de destilação reduzida, não impediu a obtenção do produto com alto grau de pureza e rendimento reacional satisfatório. A redução dos excessos molares dos reagentes e solventes na primeira etapa da reação, assim como a utilização de atmosfera ambiente em vez de atmosfera inerte, proporcionaram um desenho de processo mais racional e econômico. O monitoramento da reação *in situ* utilizando uma sonda de IV médio, durante a etapa de acilação, permitiu a redução dos tempos reacionais e estabelecimento de um importante controle em processo. Na última etapa da síntese, foi possível notar que os processos de purificação, utilizando-se carvão ativado e cristalização, foram efetivos na remoção das impurezas. Pois, obteve-se um produto com 99,9% pureza, considerando a metodologia de análise por RMNq. A qual também foi desenvolvida durante esse trabalho. Por último, foram feitas duas ampliações de escala (120 e 180 mmol, considerando a enamina como reagente limitante), para as quais o processo apresentou robustez e forneceu produtos com a pureza esperada.

O estudo detalhado da rota sintética nos permitiu elencar três potenciais impurezas de processo, sendo a (*E*)-1-(2-hidrox ciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB) a mais importante, por se tratar do último intermediário de síntese. Todas as impurezas de processo foram sintetizadas, isoladas e caracterizadas. Tal fato constituiu um importante passo na elaboração do perfil de impurezas da 6-oxo.

Os estudos de degradação forçada demonstraram que a 6-oxo apresenta-se estável quando exposta as condições ácidas e luminosas. Nos estudos de degradação básica, observou-se apenas a formação de uma impureza. Essa substância foi isolada, mas não foi possível elucidar sua estrutura por meio das análises realizadas. Ademais, a 6-oxo apresentou importantes impurezas oriundas da degradação forçada nas condições térmica e oxidativa. Todas as impurezas foram bem isoladas e caracterizadas. Sendo que nas condições oxidativas, foi gerada uma impureza ainda não relatada na literatura: a 4-metil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[b][1,4]dioxepin-2-ona (MHBD).

O método indicativo de estabilidade conseguiu demonstrar boa seletividade na separação das impurezas de síntese e degradação, nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Nesse aspecto, é preciso considerar que apesar de não ter sido feita uma validação da metodologia analítica, foi possível avaliar algumas figuras analíticas de mérito para análise de 6-oxo.

Quanto ao polimorfismo, não possível observar a formação de novos polimorfos nos diferentes solventes apolares testados: ciclohexano, benzeno e heptano. Contudo, verificou-se que há formação de uma nova forma polimórfica quando uma amostra fundida e depois submetida a um rápido resfriamento, sob atmosfera inerte. A ocorrência desse polimorfo foi confirmada pelas análises de difração de Raios X de pó (PDRX).

11. Materiais e Métodos

Para realização dos experimentos sob atmosfera inerte foram utilizados os gases argônio e nitrogênio, de acordo com a disponibilidade. Vidrarias para reações foram secas em estufa a 120 °C. Para secagem dos solventes diclorometano, benzeno e trietilamina, utilizamos um sistema de refluxo com hidreto de cálcio em atmosfera inerte por 4 horas.

As estruturas moleculares foram desenhadas com a utilização do programa ChemDraw®16.0.

As análises por CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo SHIMADZU GCMS-QP2010 Plus, operando com um detector de impacto de elétrons a 70 eV e equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com dimensões 30 m x 0.25 µm x 0.25 mm (modelo Rtx-5MS). A temperatura do forno foi programada entre 50 a 250 °C a uma taxa de 20°C/min para fins de integração. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 250°C. O gás transportador utilizado foi o hélio, a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min, no modo split (1:50). O volume de injeção foi de 1 µL de uma solução com concentração de 10 ppm de amostra em acetonitrila. Os dados processados através do programa GCMS solution®. Os espectros de massas obtidos foram comparados como dados da biblioteca Wiley 6th Ed. Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C a 600 MHz foram obtidos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance III HD, equipado com sonda do tipo broadband observe (BBFO) 5 mm, operando em campo magnético de 14 T e à frequência de ¹H de 600 MHz. Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C a 300 MHz foram obtidos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian (Magneto Oxford YH300 e Console Mercury Plus 300) operando em campo magnético de aproximadamente 7T. O instrumento está equipado com sonda Varian 5mm ATB (1H/19F/X e PFG). Os espectros adquiridos foram processados utilizando-se o programa MestreReNova®. Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm), tendo como referência interna o tetrametilsilano (0,00 ppm para o RMN ¹H) e o clorofórmio deuterado (7,26 ppm para o RMN ¹H e 77,0 ppm para o ¹³C). As multiplicidades das bandas de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN de ¹H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), q (quadruplete), m (multiplete), dd (duplo-duplete), ddd (duplo duplo duplete), dt (duplo triplete) e qt (quintuplete). Os dados espectroscópicos referentes aos espectros de RMN ¹H estão organizados segundo a convenção: δ deslocamento químico (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, número de hidrogênios)

Os espectros de IV foram registrados em um espectrômetro Varian 640 FT-IR, utilizando pastilha de KBr. Os dados obtidos foram processados no programa Origin®.

Os espectros de UV foram adquiridos em um espectrômetro UV-vis Cary 5000, utilizando soluções de acetonitrila na concentração de 1ppm. Os dados obtidos foram processados no programa Microsoft Excel®

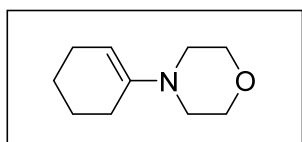
As análises de espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) foram realizadas em equipamento da marca Sciex, com injetor automático do UHPLCekspert™ Eksigent 100-XL (sem coluna), utilizando uma fonte de ionização ESI (elétron spray) e um analisador de massas TripleTOF 5600+.

12. Experimentos realizados

12.1. Síntese da enamina

Em um balão volumétrico de 125 mL com barra magnética para agitação foi introduzido 25 mL tolueno e depois os reagentes: 15,57 mL de morfolina (150 mmol) e 17,3 mL de ciclohexanona (200 mmol). Como catalisador ácido foi usado um pedaço de malha de Nafion® (0,2 cm² de área). Com os reagentes e solvente já no balão, foi montada a vidraria de Dean-Stark e condensador para refluxo. O balão foi aquecido a refluxo e mantido nesta condição por 18 horas. Ao final o Nafion® foi removido por filtração em papel de filtro e o tolueno foi removido no rotaevaporador. O resíduo resultante foi transferido para um balão de fundo redondo de volume menor e purificado por destilação à pressão reduzida (140-144°C a 30 mmHg) rendendo 16,8 mL de 1-morfolinociclohexeno (70 % de rendimento).

- **1-morfolinociclohexeno (MCE)**



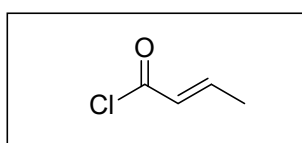
RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1,58 – 1,53 (m, 2H), 1,71 – 1,65 (m, 2H), 2,10 – 2,02 (m, 4H), 2,81 – 2,72 (m, 4H), 3,75 – 3,71 (m, 4H) e δ 4,69 – 4,66 (m, 1H).

EM (70 eV) m/z: 167(M⁺), 152, 136, 124, 108 (100), 94, 81, 67 e 54.

12.2. Síntese do cloreto ácido

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 8,6 g gramas do ácido crotônico (100 mmol), 10 mL de cloreto de tionila (16,31 g, 137 mmol), 110 mg de hidroquinona (1mmol), 160mg de enxofre (5 mmol), 0,5 g de CuCl₂ (5 mmol) e barra magnética para agitação. Notou-se que houve um resfriamento do meio reacional e liberação de gás (HCl e SO₂) o quais foram borbulhados em água. Esse sistema foi mantido sob agitação até cessar o borbulhamento do meio reacional (de 60 a 80 minutos). Após essa etapa, foi conectado condensador para refluxo e, a este último, foi conectado tubo de cloreto de cálcio. O meio reacional foi aquecido sob agitação e mantido sob condição de refluxo por 4 h. Ao término da reação foi realizada uma destilação a pressão atmosférica para separação do produto (faixa de destilação: 115-119 °C). Foram obtidos 10,2 mL (89% de rendimento) de um líquido incolor caracterizado como o cloreto de crotonila.

- **Cloreto de crotonila (CC)**



RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2,00 (dd, *J* = 7,1, 1,8 Hz, 3H), 6,10 (dq, *J* = 15,1, 1,7 Hz, 1H) e δ 7,25 (dq, *J* = 15,1, 7,0 Hz, 1H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 165, 7, 152, 8, 127,8 e 18,4.

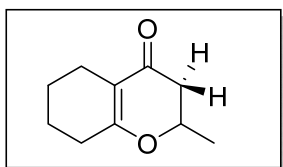
12.1. Síntese da 6-oxo

A um balão de fundo redondo de duas bocas (volume nominal 100 mL) foram adicionados: barra magnética para agitação, 4,8 mL da enamina (30 mmol), 5,4 mL de trietilamina anidra (38 mmol) e 30 mL de diclorometano anidro. Logo após, foi conectado a esse balão um funil para adição de líquidos e um tubo de cloreto de cálcio. O sistema foi resfriado em banho de gelo a uma temperatura de $5 \pm 2^\circ\text{C}$. Ao funil para adição de líquidos foram acrescentados 3,2 mL de cloreto de crotonila e 25 mL de diclorometano (anidro). A solução foi mantida sob agitação por 30 min e, então, foi iniciada a dosagem da solução do cloreto de crotonila à solução de enamina e trietilamina. Ao término da dosagem, cerca de uma hora, o meio reacional foi aquecido a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ em banho de água e mantido nesta condição por 2 horas. Após este período, foram adicionados ao meio reacional 15 mL de etanol 95% e 30 mL de solução aquosa de ácido clorídrico (10% m/m). Após a adição do álcool e do ácido, a solução foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 10 horas em banho de água a $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Ao término da etapa anterior, as fases aquosa e orgânica foram separadas. A fase orgânica foi extraída com diclorometano (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e a solução resultante foi lavada com água destilada (3 x 50 mL), uma vez com 30 mL de bicarbonato de sódio e uma vez com 30 mL de salmoura. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e, então, as fases foram separadas por filtração simples em papel de filtro. A fase líquida foi transferida para um balão de fundo redondo de volume adequado e, com auxílio de evaporador rotativo seguido de bomba de alto-vácuo, os voláteis foram removidos, rendendo uma solução castanha avermelhada.

A solução castanha avermelhada (bruto) foi colocada em um balão de fundo redondo de 50 mL para a pesagem. Logo após, foram adicionados uma mistura de AcOH (99,85%)/ HCl (37%)/ H₂O (1:1:1 mL de cada componente para cada 1 g da solução castanha avermelhada) e barra magnética para agitação. O meio reacional foi refluxado a $75 \pm 2^\circ\text{C}$, por 4 horas, sob agitação magnética. Ao término deste período, foram adicionados 20 mL de água ao meio reacional formando uma mistura bifásica. A fase orgânica foi extraída com diclorometano (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e a solução resultante foi lavada 3 vezes com 20 mL de água destilada, uma vez com 30 mL de bicarbonato de sódio e uma vez com 30 mL de salmoura. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e, então, as fases foram separadas por filtração simples em papel de filtro. A fase líquida foi transferida para um balão de fundo redondo de volume adequado e, com auxílio de evaporador rotativo seguido de bomba de alto-vácuo, os voláteis foram removidos, rendendo um sólido marrom. Esse sólido foi dissolvido a quente em uma mistura de hexano / acetato de etila (95:5 v/v, 20 mL, 38-40 °C) e mantido sob agitação em carvão ativado por 2 h. Depois, essa solução foi filtrada à vácuo sob celite. O filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo de volume adequado e, com auxílio de evaporador

rotativo seguido de bomba de alto-vácuo os voláteis foram removidos originando sólido amarelo pálido. A esse líquido foram acrescentados 10 mL de hexano a quente ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) que após resfriar a temperatura ambiente, foi resfriado a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ para cristalização completa da 6-oxo. O produto obtido foi filtrado em papel de filtro e a fase sólida seca sob vácuo obtendo-se 3,25 g de um sólido na forma de agulhas brancas (65% rendimento, P.F. $47-48^\circ\text{C}$).

- **6-oxo**



RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,44 (dq, $J = 12,7, 6,3, 4,0$ Hz, 1H), 2,46 (dd, $J = 16,7, 13,3$ Hz, 1H), 2,40 (dd, $J = 16,7, 3,9$ Hz, 1H), 2,35 – 2,12 (m, 4H), 1,82 – 1,67 (m, 2H), 1,65 – 1,44 (m, 2H), 1,42 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 192,5, 171,4, 112,0, 74,6, 43,3, 28,7 22,2, 22,0, 20,8 e 20,7

IV (KBr, ν_{max} / cm^{-1}): 2973, 2929, 2865, 1664 e 1612.

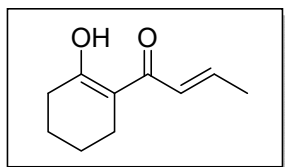
EM (70 eV) m/z : 166 (M^+), 151, 138, 124, 110, 96, 83, 68(100) e 55.

UV (λ_{max} / nm): 270

12.2. Síntese da (E)-1-(2-hidrociclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB)

Em um funil de adição de líquidos foram dissolvidos 1,6 mL (1,73 g, 17 mmol) de cloreto de crotonila em 20 mL de diclorometano (anidro). Essa mistura foi gotejada em uma solução de 2,4 mL (15 mmol, 2,5 g) de 4-(ciclohex-1-en-1-il)morfolina (MCE), 2,52 mL de trietilamina (1,81 g, 18 mmol) e 40 mL de diclorometano, sob agitação a 35°C . A reação permaneceu nessas condições por 1h e continuou sob agitação a temperatura ambiente por 20 h. Após esse tempo, a solução resultante foi filtrada para a remoção do cloridrato de trietilamina. Em seguida, o filtrado foi lavado com 20 mL de água destilada e a água de lavagem foi mantida sob a agitação com carvão ativado, em um balão de fundo de redondo 50 mL, por 4 horas. A solução resultante foi filtrada em um funil de vidro sinterizado com celite e, logo após, o filtrado foi descartado. O carvão ativado, retido na celite, foi lavado com 20 mL de etanol anidro, obtendo-se uma solução amarela. Essa solução foi secada com Na_2SO_4 , filtrada, concentrada em evaporador rotativo e, por último, seca sob vácuo. O produto obtido foi dissolvido em CH_2Cl_2 e isolado em placa preparativa utilizando-se um eluente na proporção v/v de 20% acetona/hexano. A amostra obtida apresentou-se como um líquido amarelo claro que cristalizou sob resfriamento (0,245 g, 10 % rendimento).

- **6.4.1. (E)-1-(2-hidroxiciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB)**



RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1,75 – 1,67 (m, 4H); 1,94 (dd, $J = 7,0$ e $1,7$ Hz, 3H), 2,39 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,42 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 6,36 – 6,32 (m, 1H) e 6,97 (dq, $J = 15,2$ e $7,0$ Hz, 1H).

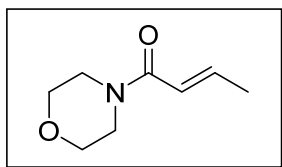
RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 191,7, 182,2, 141,6, 124,5, 106,1, 33,7, 23,7, 23,0, 21,8 e 18,7.

EM (70 eV) m/z: 166 (M^+), 151, 138, 123, 109, 95, 77, 69(100) e 55.

12.3. Síntese da (E)-1-morfolinobut-2-en-1-ona (MBE)

Em um balão de fundo redondo (volume nominal de 25 mL) foram adicionados 6 mL de diclorometano (anidro) e 0,26 mL de morfolina (3,0 mmol). Logo após, foi conectado um funil para adição de líquidos, no qual foram adicionados 0,32 mL de cloreto de crotonila (3,3 mmol) dissolvidos em 3,0 mL de diclorometano (anidro). Após a montagem do sistema, a solução de morfolina foi mantida sob agitação a 30 °C, para que fosse iniciada a dosagem da solução do cloreto de crotonila. Ao término do gotejamento, aproximadamente 60 minutos, a reação permaneceu 20 h sob banho de água a 38 °C formando, ao final, uma solução acastanhada. A essa solução foram adicionados 15 mL de água e, logo após, a fase orgânica foi extraída com três alíquotas de 10 mL de diclorometano. As fases orgânicas foram reunidas em um funil de separação e a solução resultante foi lavada três vezes com 5 mL de água destilada, uma vez com 10 mL de bicarbonato de sódio e uma vez com 10 mL de salmoura. Após as lavagens, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada, concentrada em evaporador rotativo e seca sob vácuo. Obteve-se um líquido amarelo acastanhado que cristalizou sob resfriamento. O produto foi recristalizado em hexano, obtendo-se 0,14 g de um sólido branco (31% de rendimento).

- **(E)-1-morfolinobut-2-en-1-ona (MBE)**



RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1,89 (dd, $J = 6,9$ e $1,7$ Hz, 3H); 3,75 – 3,48 (m, 8H), 6,23 (dq, $J = 15,0$ e $1,7$ Hz, 1H) e 6,90 (dq, $J = 15,0$ e $6,9$ Hz, 1H).

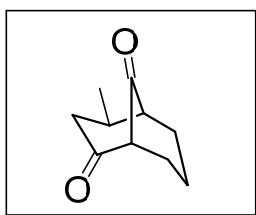
RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 18,3, 42,3, 46,2, 66,4, 121,1, 142,2 e 165,8.

EM (70 eV) m/z: 155 (M^+), 140, 126, 110, 86, 70, 69(100) e 55.

12.4.4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)

Em um balão de fundo redondo de 200 mL, sob atmosfera de argônio, foram adicionados 3,00 g (17,94 mmol, 2,87 mL) de 4-(ciclohex-1-en-1-il) morfolina (MCE) e 100 mL de benzeno anidro. A solução permaneceu em agitação por 5 minutos. Logo após, foram adicionados 1,87 g (17,94 mmol, 1,72 mL) de cloreto de crotonila. Houve a imediata formação de precipitado. A suspensão foi agitada em temperatura ambiente por 3 horas e depois mantida 10 minutos em repouso para que o benzeno fosse decantado. O precipitado foi lavado com 3 porções de 50 mL de hexano anidro e depois dissolvido em 50 mL de água destilada gelada. A solução aquosa foi mantida em repouso por 30 minutos e extraída com 05 porções de 50 mL de diclorometano. Os extratos orgânicos combinados foram secos com Na₂SO₄, filtrados e concentrados em evaporador rotativo. Na etapa final, o concentrado (óleo amarelado, 2,1 g) foi destilado a pressão reduzida em um equipamento de Kugelrohr (100 °C e 0,1 mmHg) obtendo-se 0,4 g (13%) de um óleo incolor viscoso.

- 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)



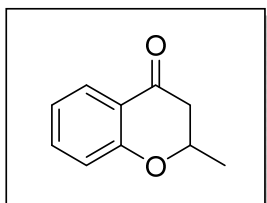
RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,05 – 3,02 (m, 1H), 2,86 – 2,65 (m, 1H), 2,51 – 2,47 (m, 1H), 2,43 – 2,36 (m, 1H), 2,19 – 1,97 (m, 5H), 1,74 – 1,57 (m, 2H) e 1,10 (d, J = 6,7 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (151 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 212,20, 209,67, 62,57, 53,36, 48,44, 35,43, 35,05, 23,27 e 18,62.

EM (70 eV) m/z: 166 (M⁺), 148,138,123,109,96,70,69 (100) e 55

12.5. Impurezas de degradação

- 2-metil-croman-4-ona (MC)



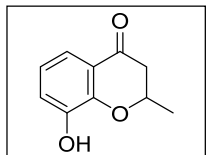
RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,88 (ddd, J = 7,9; 1,8; 0,5 Hz, 1H); 7,47 (ddd, J = 8,4; 7,2 e 1,8 Hz, 1H), 7,01 (ddd, J = 7,9; 7,2 e 1,1 Hz, 1H); 6,97 (ddd, J = 8,3; 1,1 e 0,5 Hz, 1H), 4,60 (ddq, J = 8,3; 7,3; 6,3 Hz, 1H); 2,69 (d, J = 1,3 Hz, 1H); 2,68 (d, J = 0,5 Hz, 1H); 1,52 (d, J = 6,3 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 192,0; 161,2; 136,1; 126,3; 121,1; 120,5; 117,8; 74,1; 43,8 e 20,5.

EM (70 eV) m/z: 162 (M⁺), 147, 134, 120 (100), 105, 92, 77, 63 e 50.

EMAR: calc. C₁₀H₁₀O₂ (M+H)⁺: 163,0754, obtido: 163,0756.

- **8-hidroxi-2-metilcroman-4-ona**



RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,42 (dd, $J = 7,9$ e $1,6$ Hz, 1H); 7,12 (dd, $J = 7,9$ e $1,6$ Hz, 1H); 6,92 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 5,54 (s, 1H); 4,68 (qd, $J = 8,8$ e $6,3$ Hz, 1H); 2,75 – 2,70 (m, 2H) e 1,57 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H).

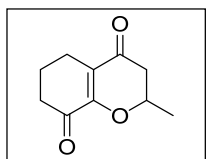
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 192,0; 149,1; 145,3; 121,5; 121,2; 120,5; 117,9; 75,7; 44,9 e 21,1.

IV (ν_{max} / cm^{-1}): 2969, 2928, 1663, 1607, 1491, 1457 1308 e 1206.

EM (70 eV) m/z : 178 (M^+), 163, 136 (100), 108, 80 e 52.

EMAR: calc. $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 179,0703, obtido: 179,0696.

- **2-metil-2,3,6,7-tetrahidro-4H-cromeno-4,8(5H)-diona**



RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,61 – 4,47 (m, 1H), 2,66 – 2,42 (m, 6H), 2,04 (dddt, $J = 13,7$; 6,9; 5,9 e 4,7 Hz, 1H), 1,95 (dddt, $J = 13,6$; 10,7; 9,1 e 4,6 Hz, 1H) e 1,54 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H).

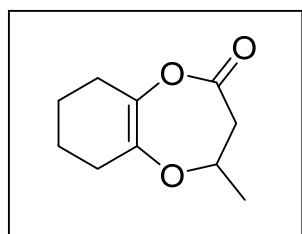
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 195,8; 195,2; 156,4; 123,9; 75,2; 43,5; 39,2; 21,4; 21,0; 20,5.

IV (ν_{max} / cm^{-1}): 2931, 1697, 1668, 1596, e 1175.

EM (70 eV) m/z : 180 (M^+), 165, 152, 137, 123, 110, 95, 82, 68, 55(100).

EMAR: calc. $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$:181,0859, obtido: 181,0865.

- **4-metil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[b][1,4]dioxepin-2-ona**



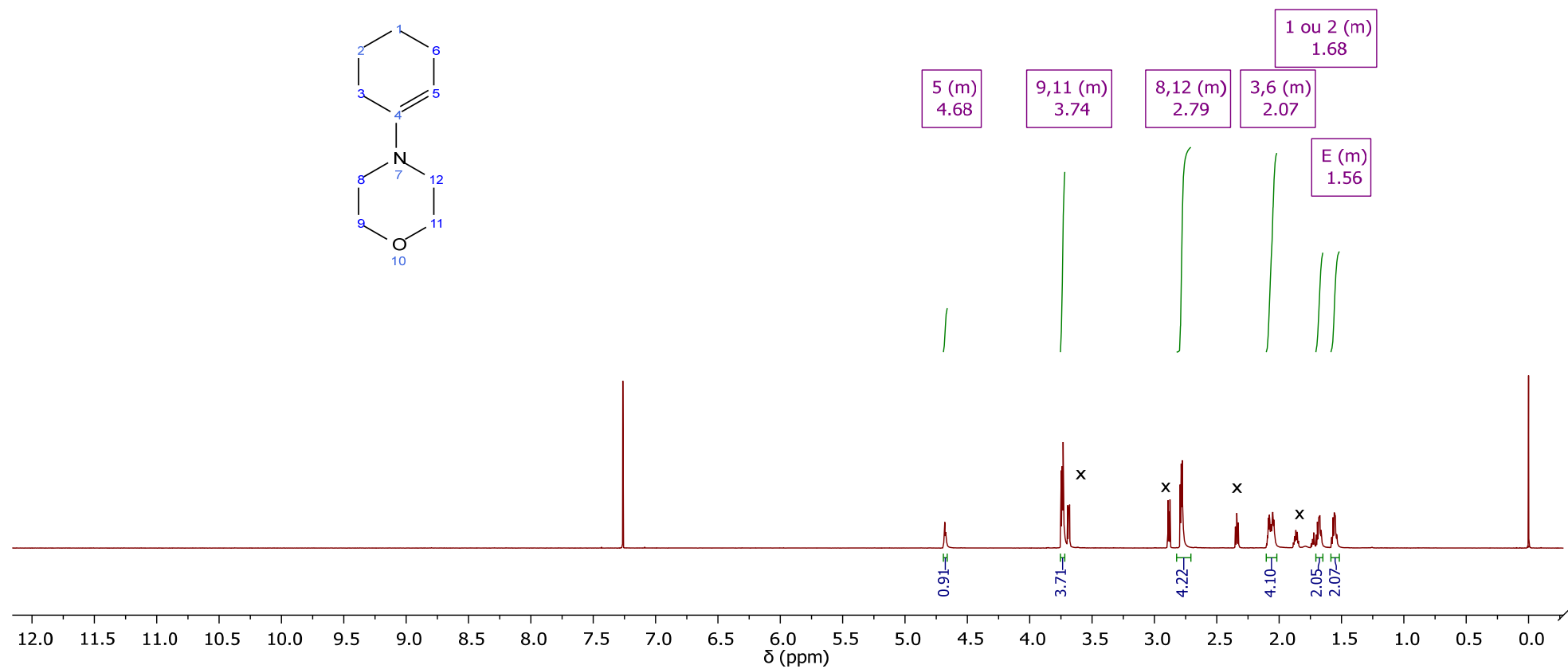
RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,70 (pd, $J = 6,4$; 4,9 Hz, 1H), 2,93 (dd, $J = 13,3$; 4,9 Hz, 1H), 2,70 (dd, $J = 13,4$; 6,5 Hz, 1H), 2,26 – 2,08 (m, 4H), 1,73 – 1,63 (m, 4H) e 1,38 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170,1; 137,1; 134,5; 76,9; 40,9; 28,4; 26,7; 22,7; 22,6 e 22,0.

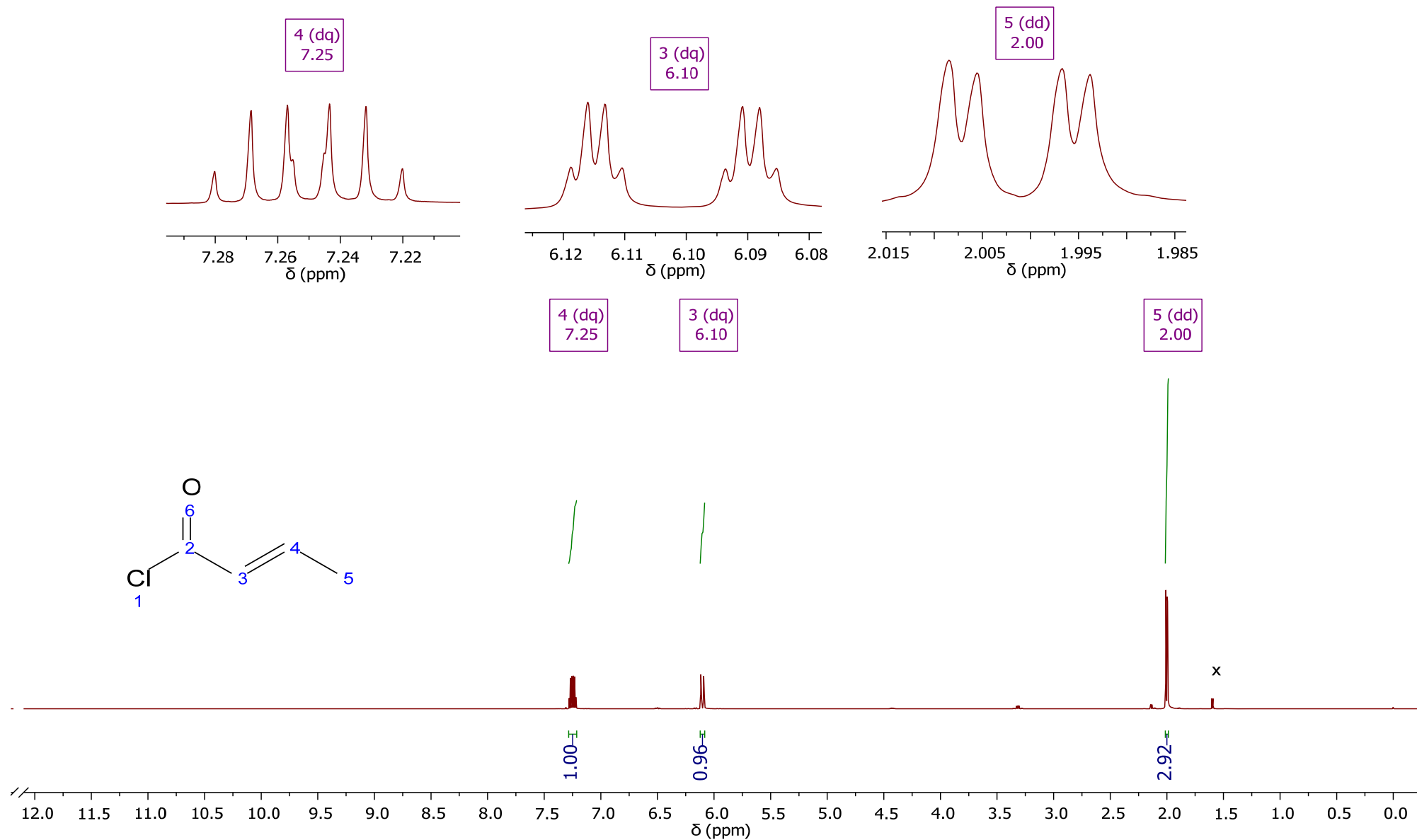
EM (70 eV) m/z : 182 (M^+), 154, 138, 114, 84, 70, 69 (100) e 55.

EMAR: calc. $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 183,1016, obtido: 181,1009.

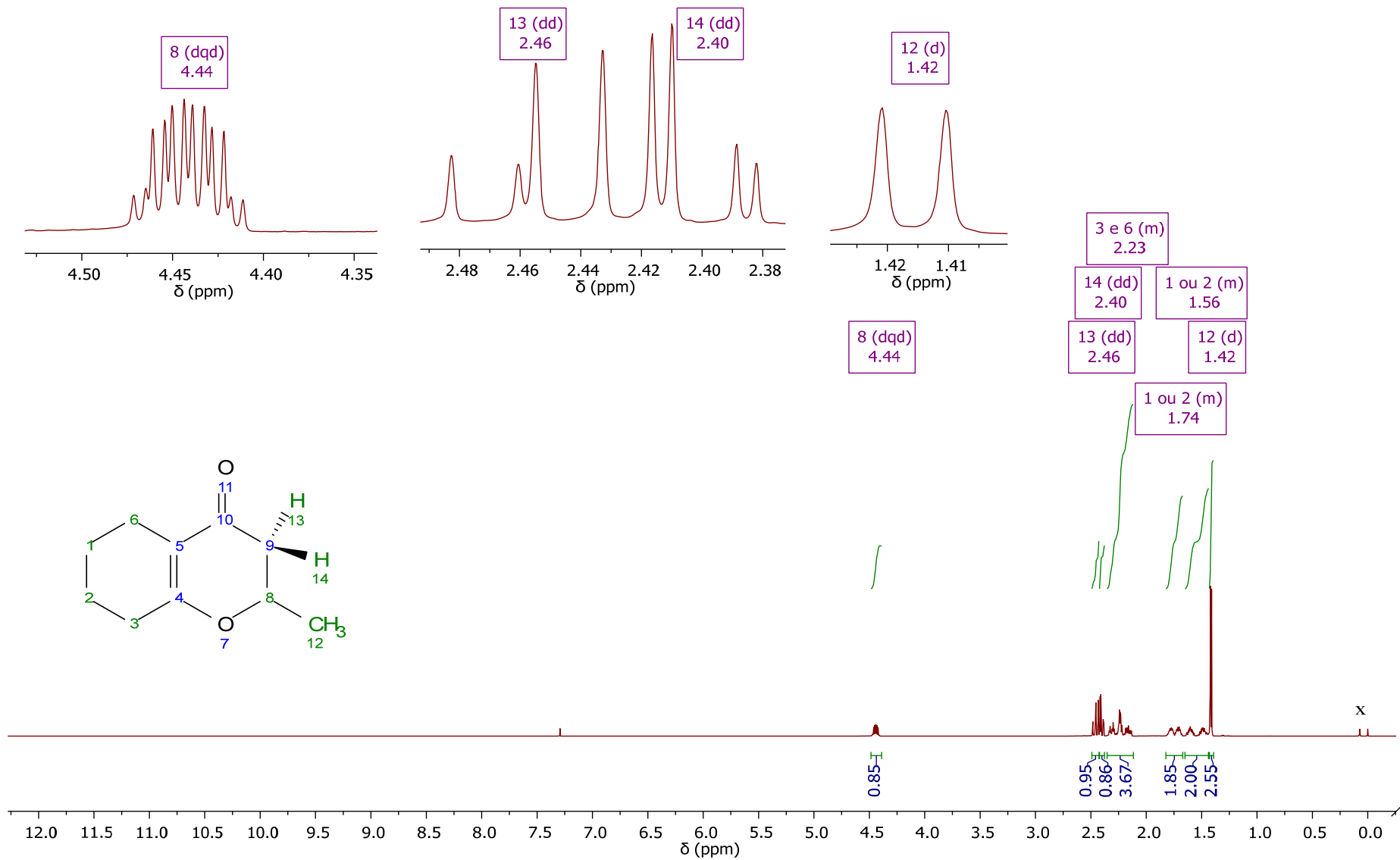
13. Anexos



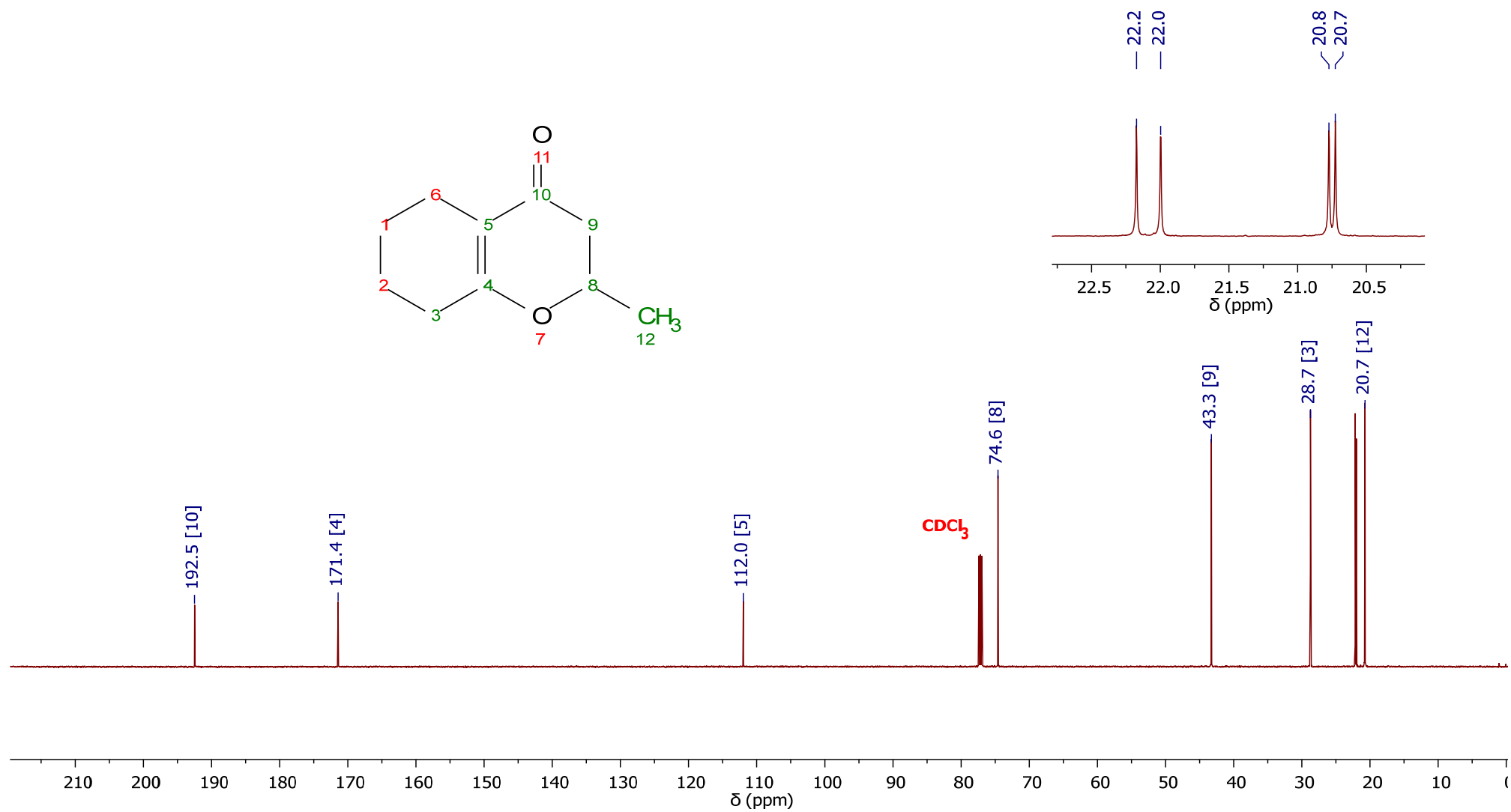
Anexo 1: Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) da 1-morfolinociclohexeno (MCE)



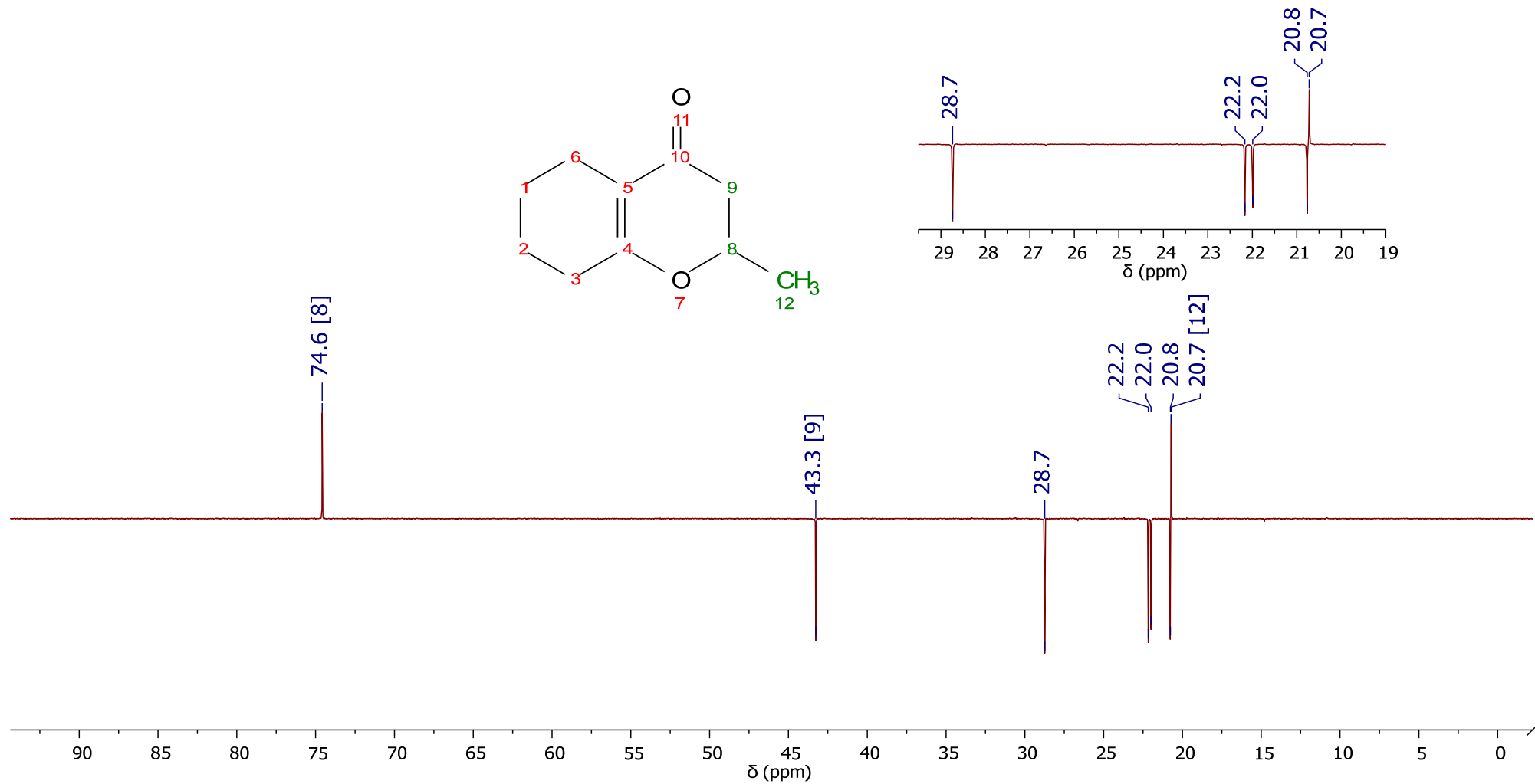
Anexo 2: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) do cloreto de crotonila (CC)



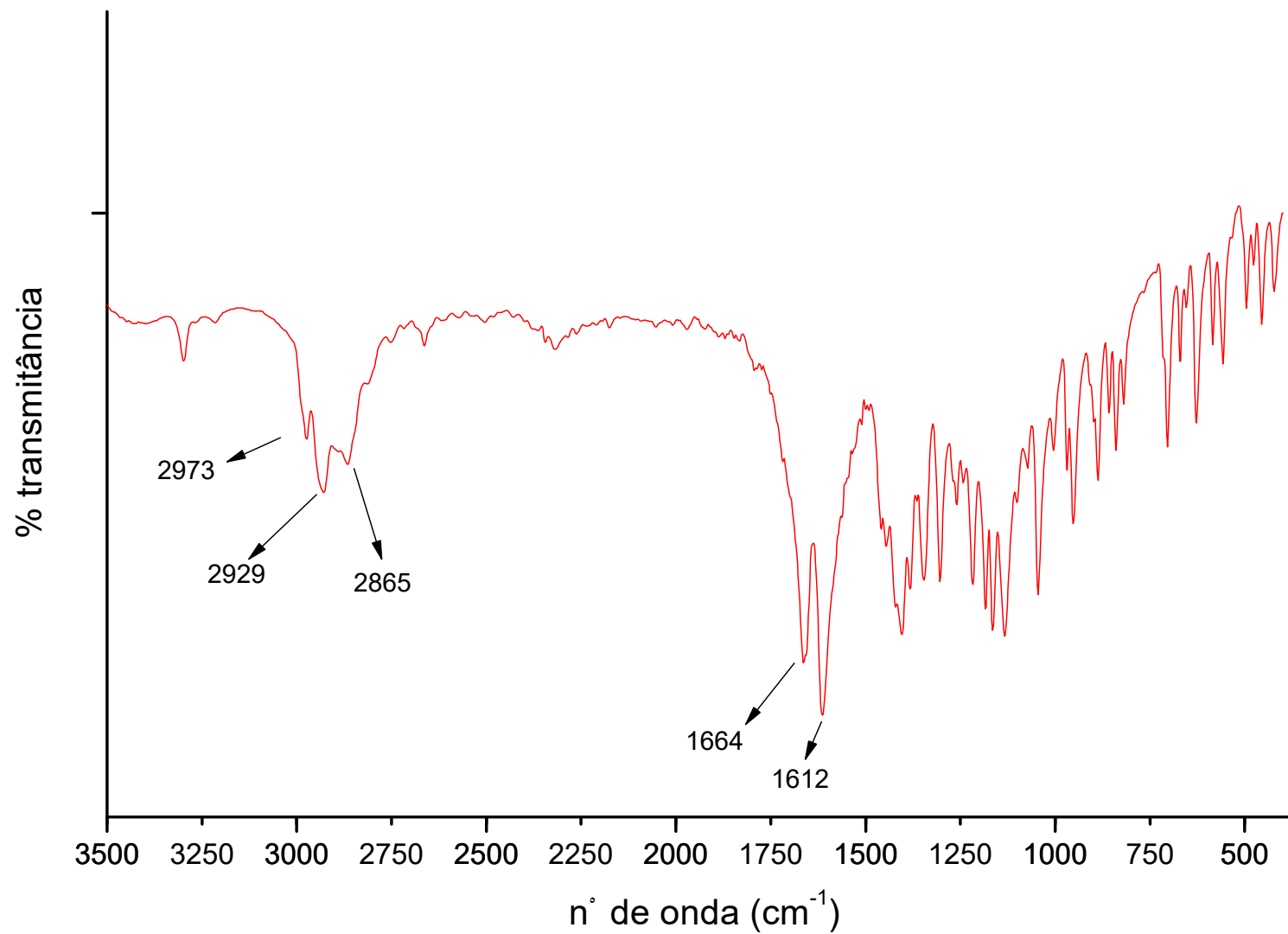
Anexo 3: Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) da 6-oxo



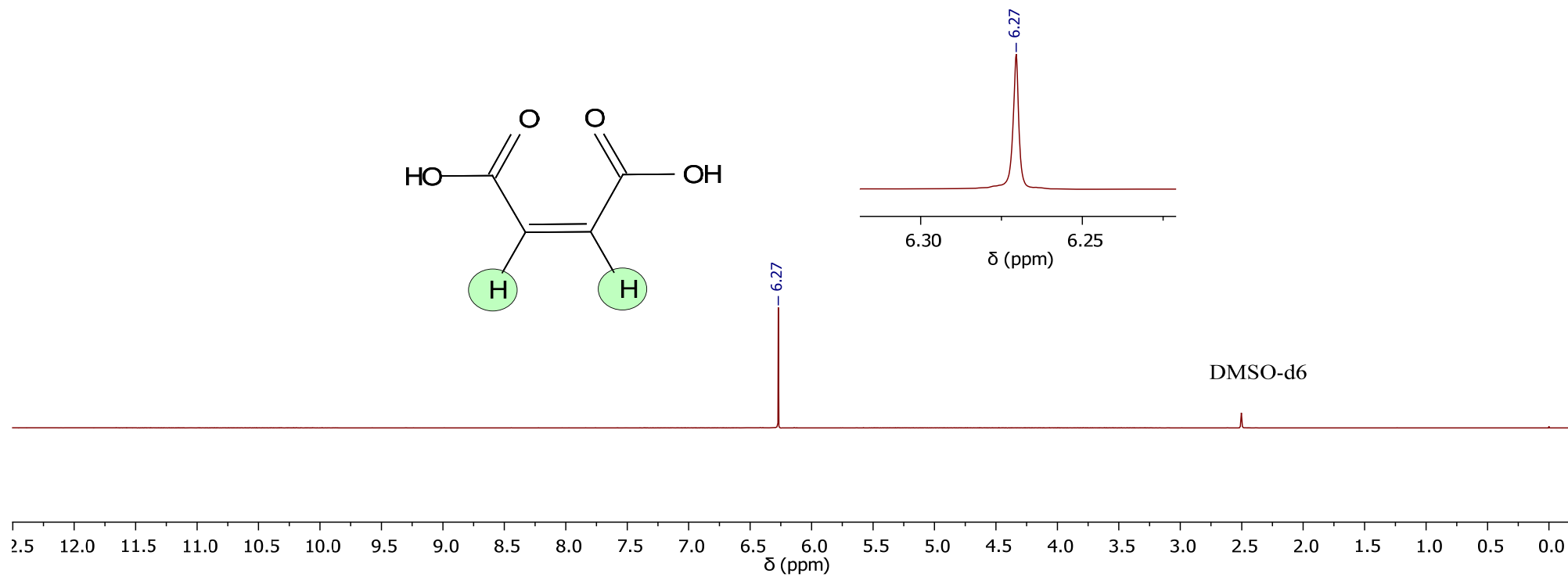
Anexo 4: Espectro de RMN ¹³C (151 MHz, CDCl₃) da 6-oxo



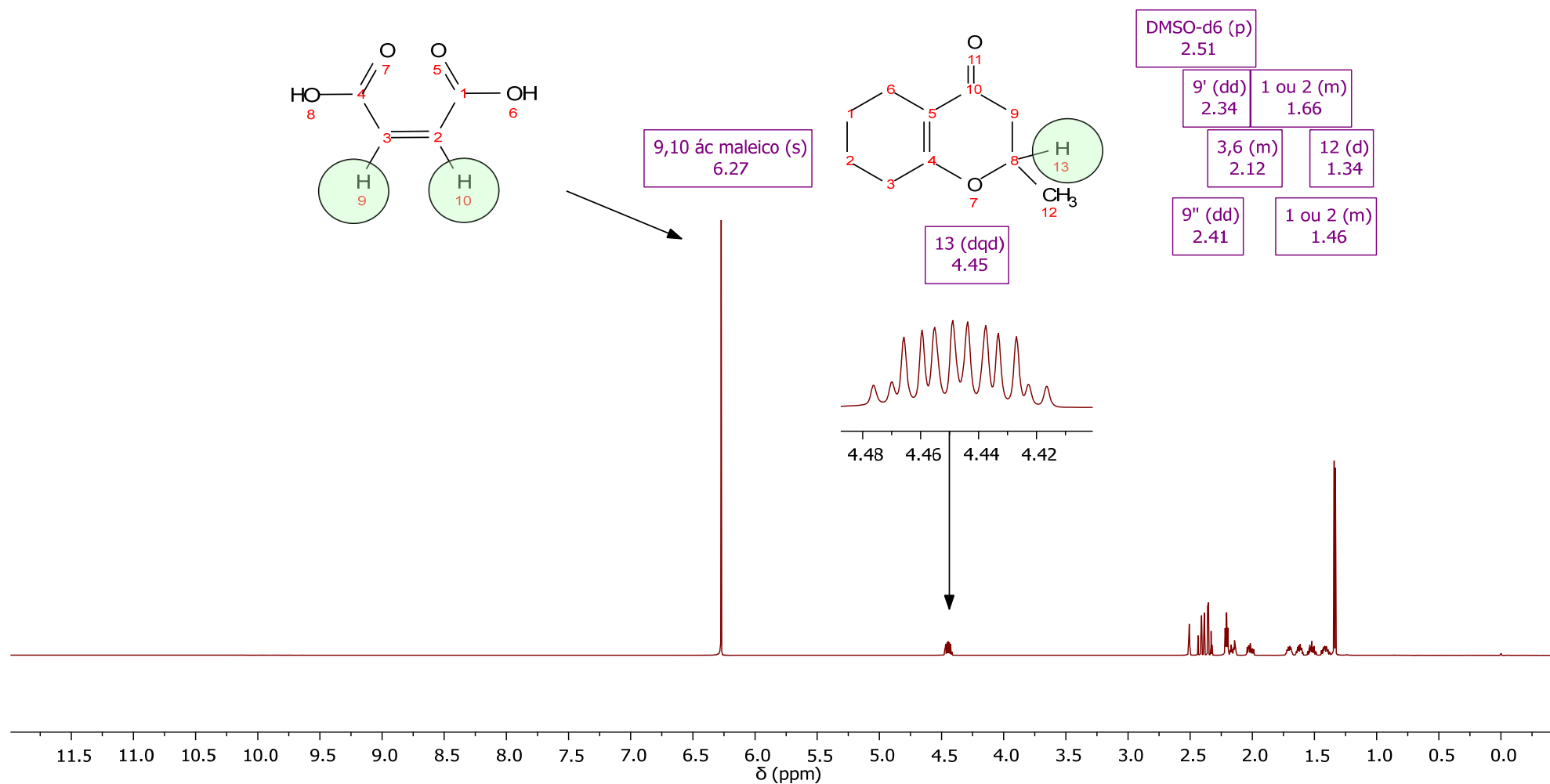
Anexo 5: Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) da 6-oxo com APT



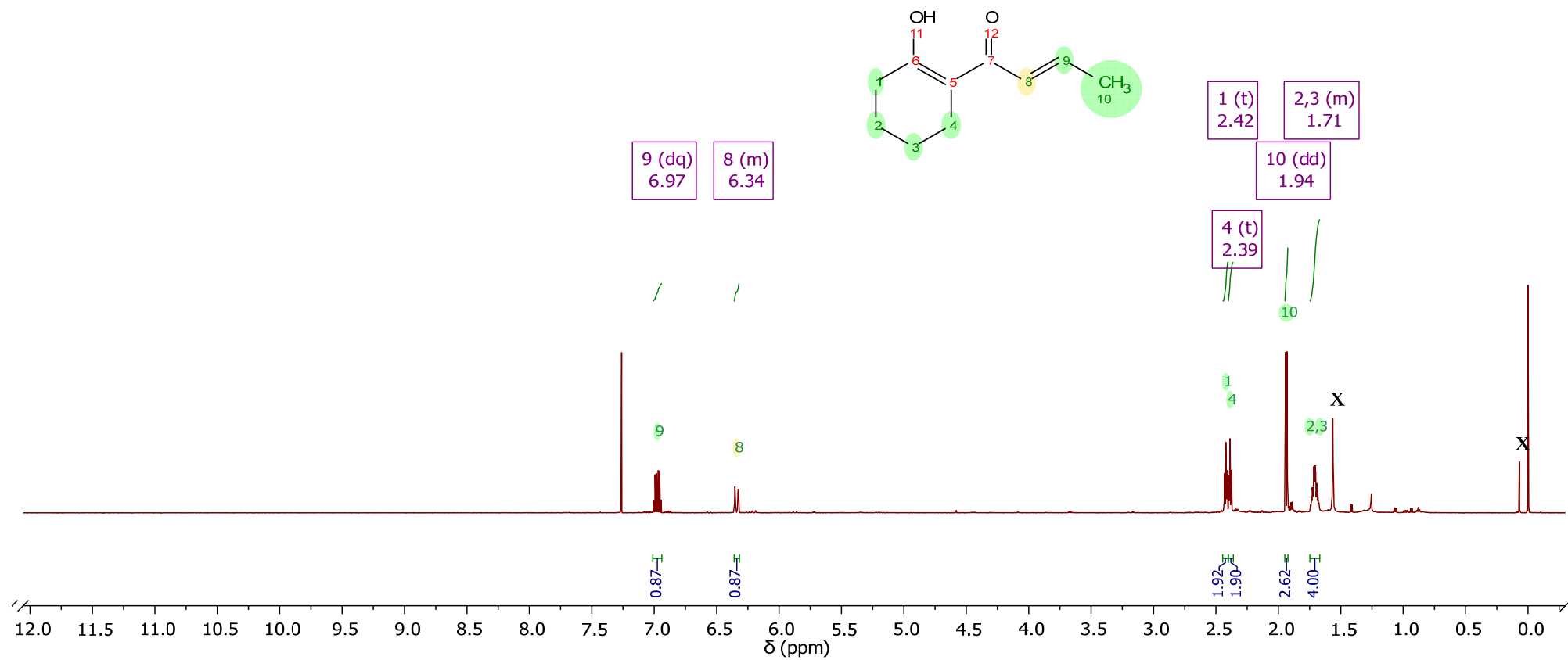
Anexo 6: Espectro de infravermelho (KBr) da 6-oxo



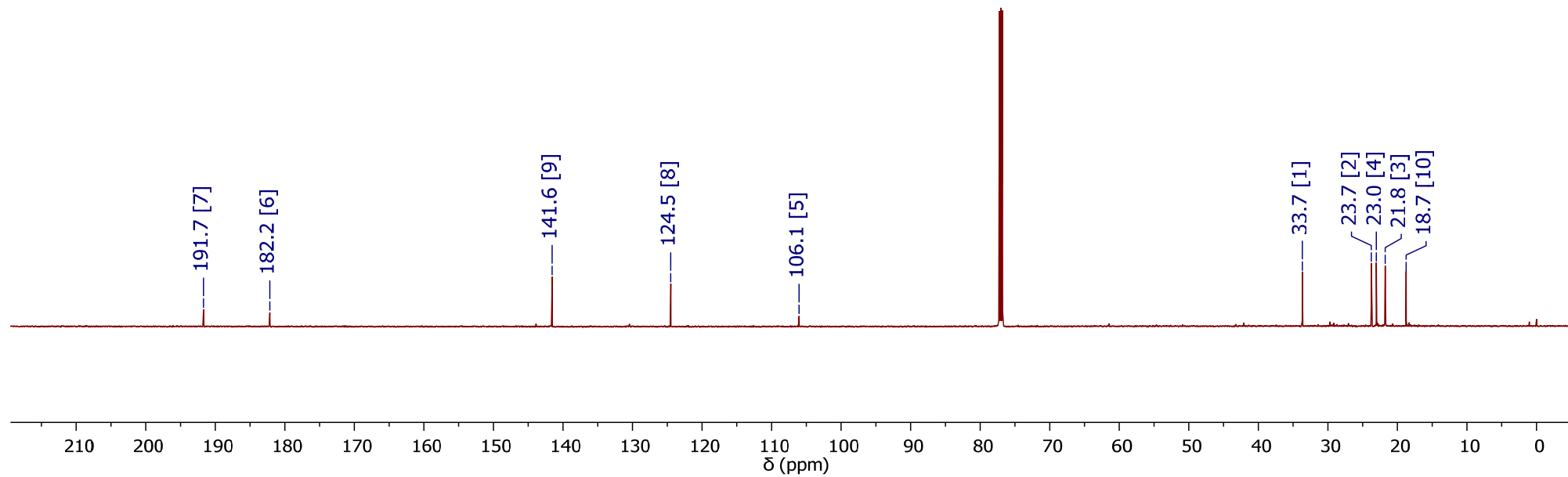
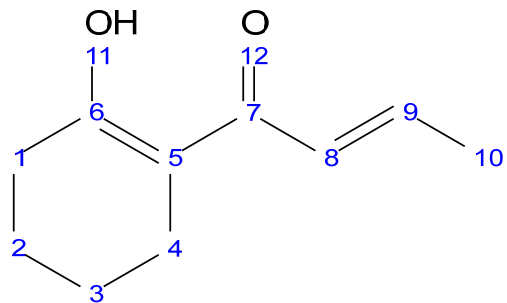
Anexo 7: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do ácido maleico



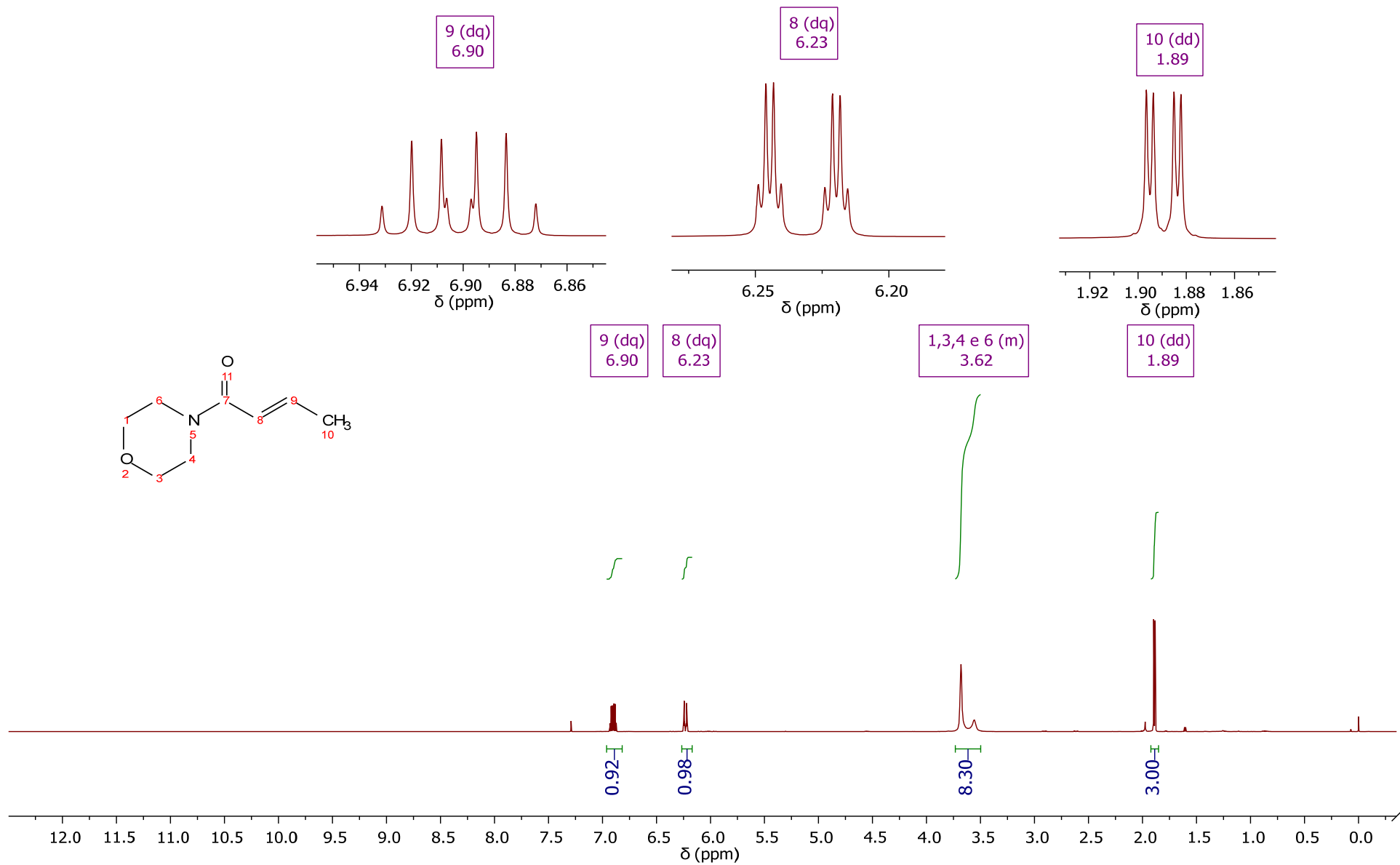
Anexo 8: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) da 6-oxo + ácido maleico



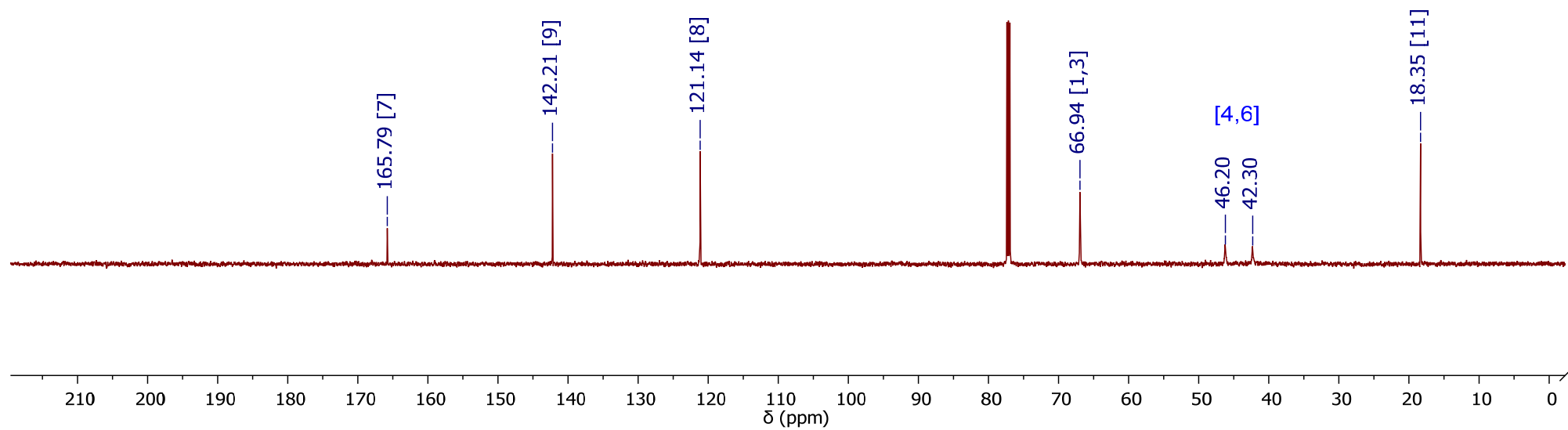
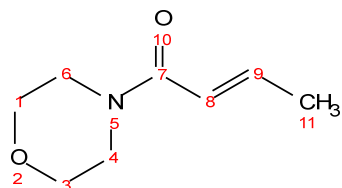
Anexo 9: Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) da (E)-1-(2-hidroxiciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB)



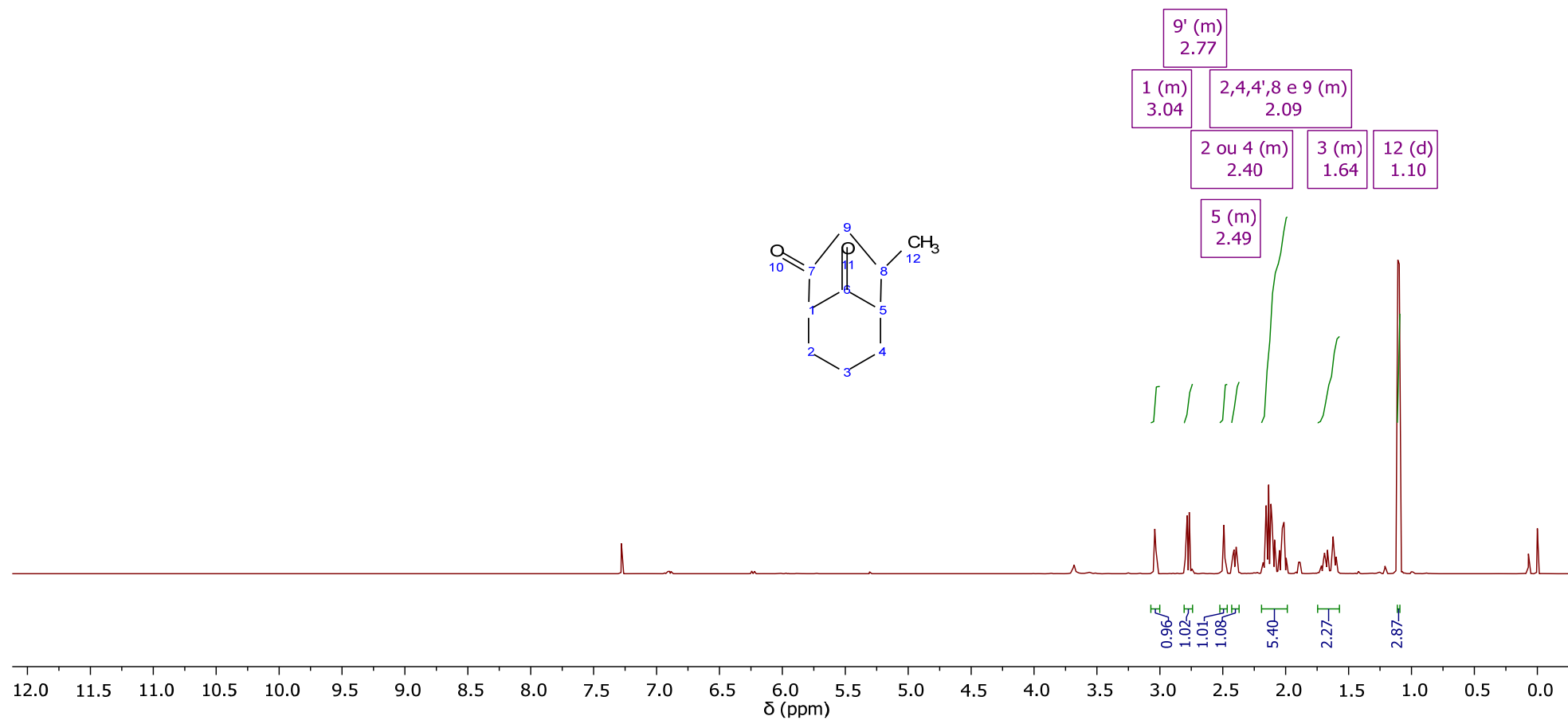
Anexo 10: Espectro de RMN ¹³C (151 MHz, CDCl₃) da (E)-1-(2-hidroxiciclohex-1-en-1-il)but-2-en-1-ona (HCB)



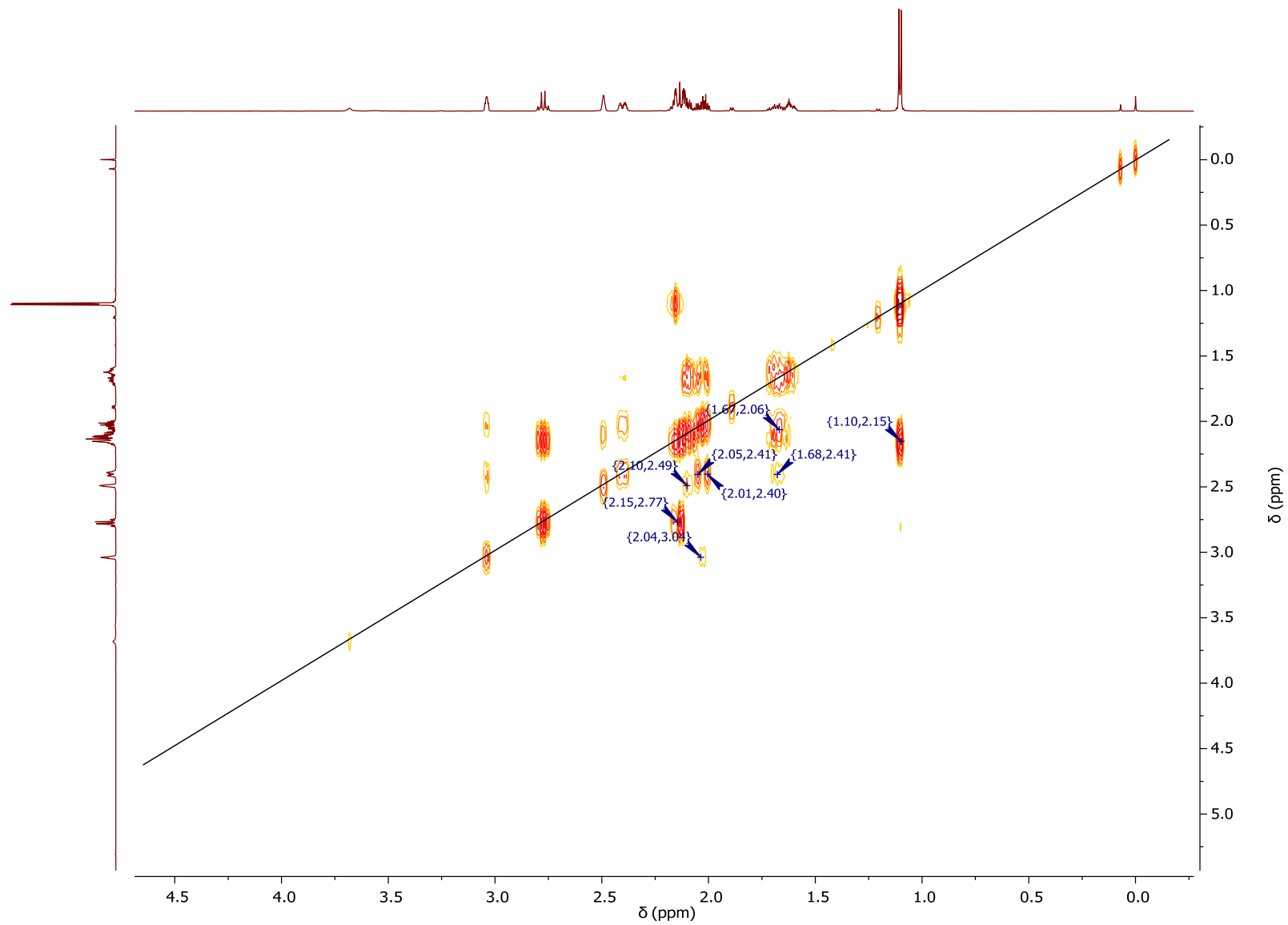
Anexo 11: Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) da (E)-1-morpholinobut-2-en-1-one (MBE)



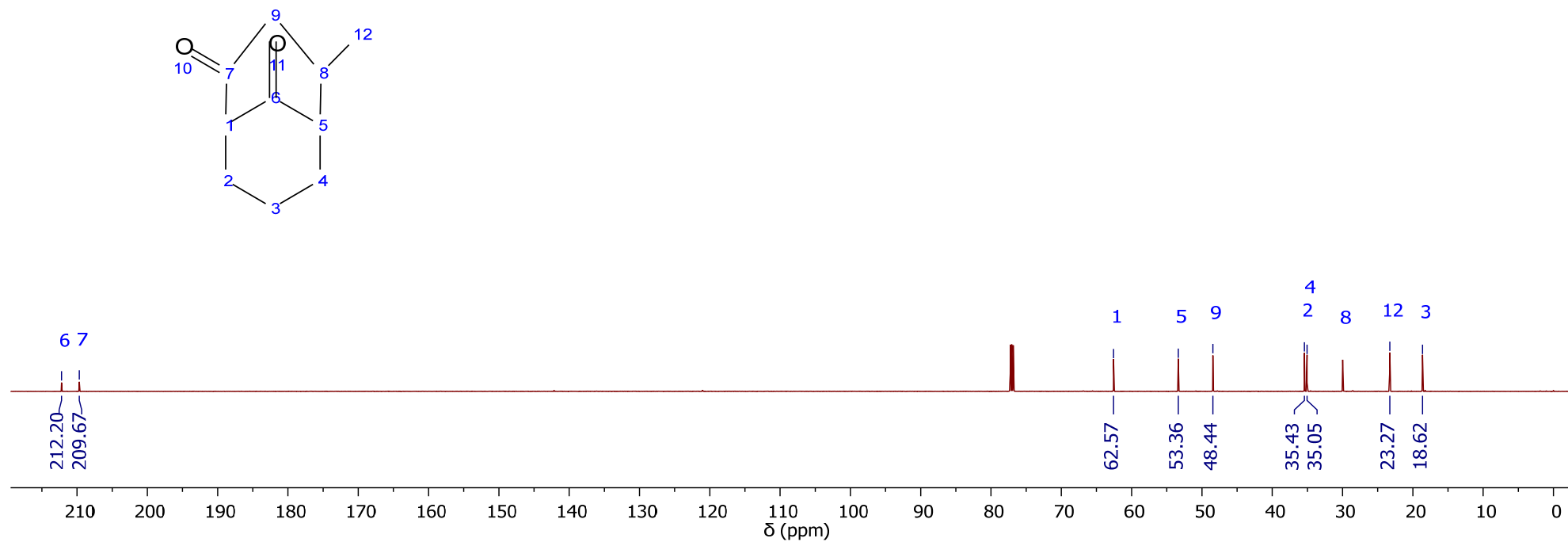
Anexo 12: Espectro de RMN ¹³C (151 MHz, CDCl₃) da (E)-1-morpholinobut-2-en-1-one (MBE)



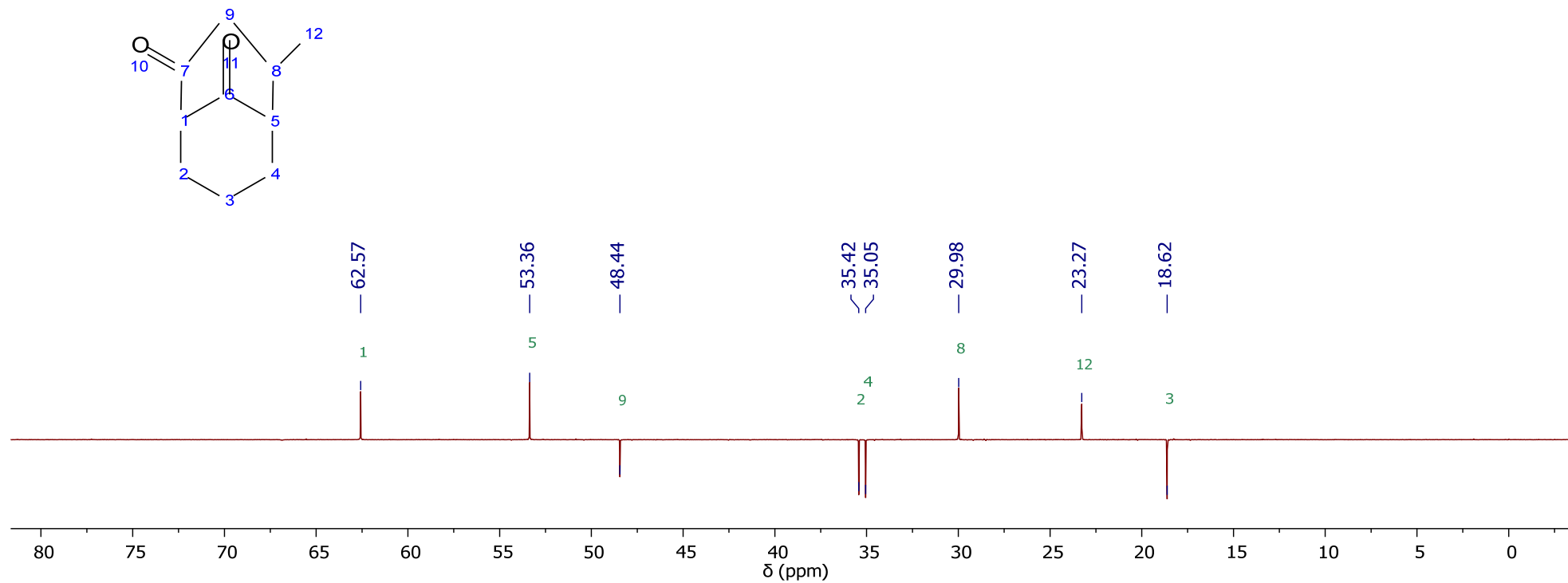
Anexo 13: Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) da 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)



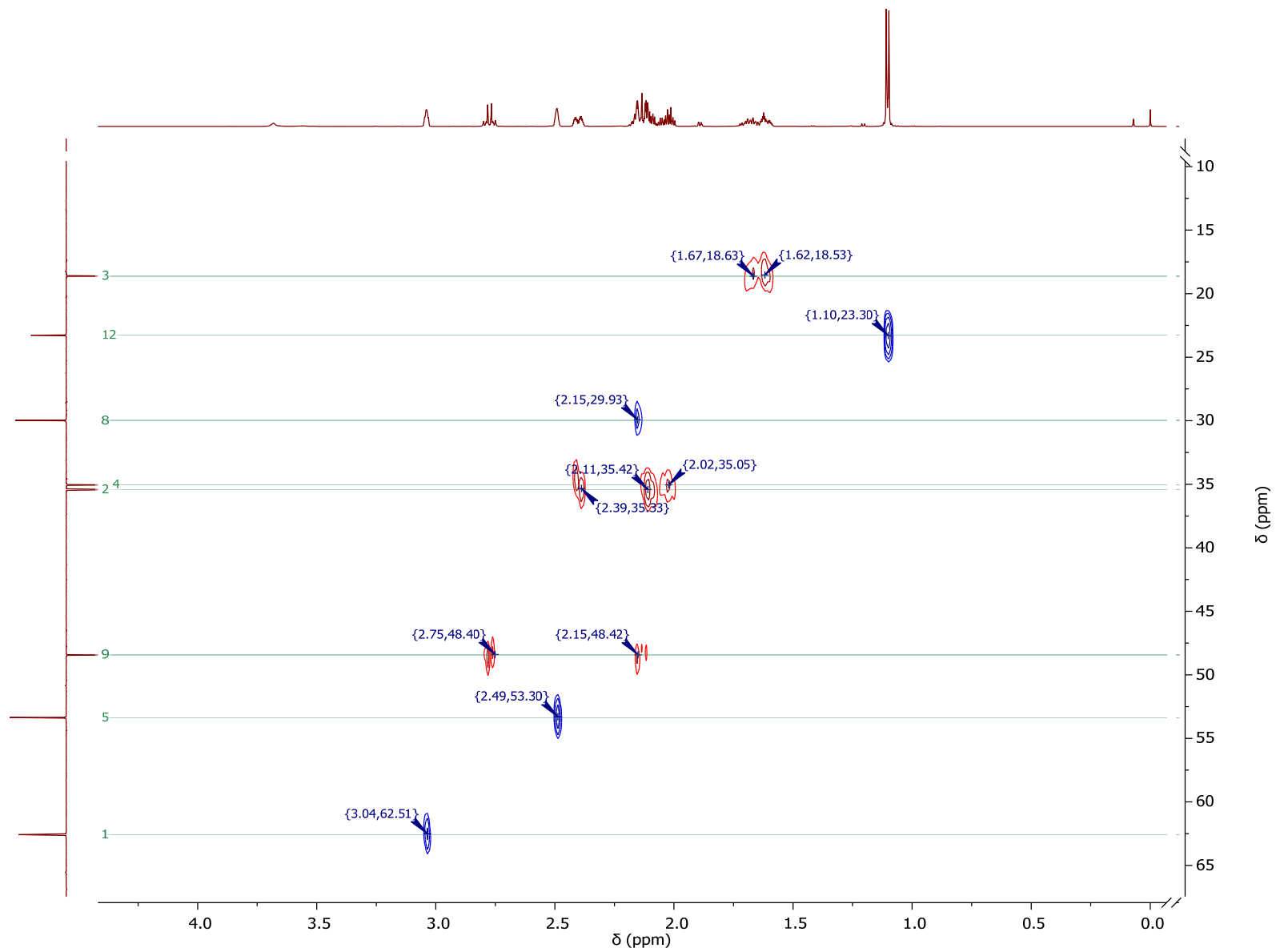
Anexo 14: Espectro de COSY da 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)



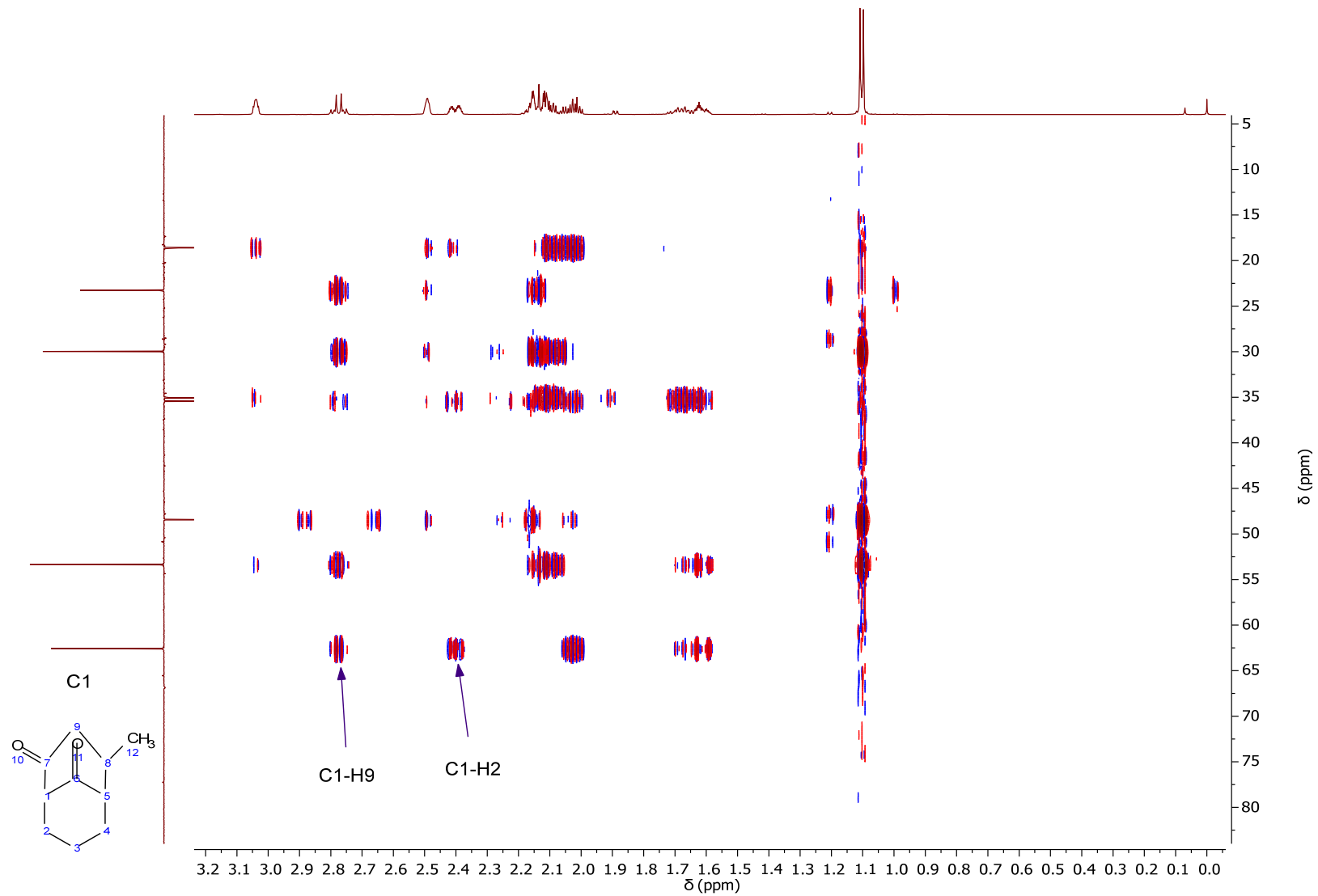
Anexo 15: Espectro de RMN ¹³C (151 MHz, CDCl₃) da 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)



Anexo 16: Espectro de RMN ¹³C com APT (151 MHz, CDCl₃) da 4-metilbicyclo[3,3,1]nonano-2,9-diona (BCD)



Anexo 17: Espectro de HSQC da BCD



Anexo 18: Espectro de HMBC da BCD

14. Referências

- ¹ T. Defoirdt, *Trends Microbiol.* **2018**, 26, 313.
- ² Ventola C. L., *Pharmacy and Therapeutics* **2015**, 40(4), 277.
- ³ Bhardwaj, A. K., Vinothkumar, K., Rajpara, N., *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **2013**, 8, 79.
- ⁴ Mattmann, M. E., Blackwell, H. E., *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 6737.
- ⁵ Reuter, K., Steinbach, A., Helms, V., *Perspect Medicin Chem* **2016**, 8, 1.
- ⁶ Cegelski, L.; Marshall. G. R.; Eldridge, G. R.; Hultgren, S., *J. Nature Rev. Microbiol.* **2008**, 6, 17.
- ⁷ Camara, M., Williams, P., Hardman, A., *Lancet Infect. Dis.* **2002**; 2:667, 76.
- ⁸ Cavalcante, R. A. F, Silva, F. L, Favero, F., Resck, I. S., Pereira, A. L., Machado, A. H. L., *Magn Reson Chem.* **2019**,1.
- ⁹ Camilli, A., Bassler, B. L., *Science* **2006**, 311, 1113.
- ¹⁰ Antunes, L. C. M.; *Ciência Hoje* **2003**, 33, 193.
- ¹¹ Waters, C. M.; Bassler, B. L. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, 21, 319.
- ¹² Eberhard A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., Oppenheimer, N. J., *Biochemistry***1981**, 20, 2444.
- ¹³ Galloway, W. R. J. D.; Hodgkinson, J. T.; Bowden, S. D.; Welch, M.; Spring, D. R. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 28.
- ¹⁴ Wong, C.S., Koh, C. L., Sam, C. K., Chen, J. W., Chong, Y. M., Yin, W.F., Chan, K. G., *Sensors* **2013**, 13, 12943.
- ¹⁵Rasmussen T. B., Givskov M. *Int J Med Microbiol* **2006**, 296, 149.
- ¹⁶ Smith, K. M.; Bu, Y. G.; Suga, H., *Chem. Biol.* **2003**, 10, 81.
- ¹⁷Geske, G. D.; Wezeman, R. J.; Siegel, A. P.; Blackwell, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12762.
- ¹⁸ Loyd, V. A. Jr., Introdução à Farmácia de Remington, Artmed Editora, **2015**, p.32-34.
- ¹⁹ Arrepia, D. B., Costa, J. C. S. da, Tabak, D., *Vigil. sanit. Debate* **2015**, 3(2), 9.
- ²⁰ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução - RDC nº 69, de 8 de dezembro de **2014**, DOU seção 1, nº. 238, 09 de dezembro de 2014, p. 43.
- ²¹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 57, de 17 de novembro de **2009**. DOU seção 1. nº. 220, 18 de novembro 2009; p.39.
- ²² Carmo, A. C. M. do, Piras, S. S., Rocha, N. F. M., Gratieri, T., *BioMed Research International* **2017**, 1.
- ²³ Glodek. M., Liebowitz, S., McCarthy, R., McNally, G., Oksanen, C., Schultz T., Sundararajan, M., Vorkapich, R., Vukovinsky, K.; Watts, C., Millili, G., *Pharmaceutical engineering* **2006**, 26, 6.
- ²⁴ Anderson N. G., *In Practical Process Research & Development*, Academic Press, San Diego, **2000**, P. 1-25

-
- ²⁵ Phansalkar, M. S., Shetgiri, N. P., *Pharmaceutical Technology Europe* **2005**, February.
- ²⁶ Adler, C., Brunner, J., Fichtner, C., Küng, P., Levis, M. K., Ruchti, H.-R., Sjöberg, A., Weber, B, *chimia* **2006**, 60, 9, 523.
- ²⁷ Ager, D. J., *Route and Process Selection, in Process Understanding: For Scale-Up and Manufacture of Active Ingredients* **2011** (ed I. Houson), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- ²⁸ Lienard, P., Gradoz, P., Greciet, H., Jegham, S., Legroux, D., *Org. Process Res. Dev.* **2017**, 21, 18.
- ²⁹ MacDonald, F. K., Burnell, D. J., *J. Organic Chem.* **2009**, 74(18), 6973
- ³⁰ Abdel-Magid, A. F., Caron, S., *Fundamentals of early clinical drug development: from synthesis design to formulation* **2006**, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey
- ³¹ Mahajan, J. R.; Resck, I. S.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **1997**, 8, 603.
- ³² Gelin, R.; Gelin, S.; Dolmazon, R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1973**, 1409
- ³³ Sajan, P. G., Rohith, T., Patil, S., Kumara M. N., *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2015**, 33(2), 50, 242.
- ³⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução - RDC nº 45, de 9 de agosto de **2012**, DOU seção 1, nº. 155, 10 de agosto 2012, p. 37.
- ³⁵ International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH), Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in new drug substances Q3A(R2), **2006**, version 4.
- ³⁶ International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH), Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in new drug substances Q3C (R6), **2016**, version 4.
- ³⁷ Pandey, S., Pandey, P., Kumar, R., Singh, N. P., *Braz. J. Pharm. Sci.* **2011**, 47, 2, 379.
- ³⁸ Singh, S., Junwal, M., Modhe, G., Tiwari, H., Kurmi, M., Parashar, N., Sidduri, P., *Trends Anal. Chem.* **2013**, 71.
- ³⁹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015, DOU seção 1, nº. 233, 7 de dezembro 2015, p. 48.
- ⁴⁰ Blessy, M., Patel, R. D., Prajapati, P. N., Agrawal, Y. K., *J. Pharm. Anal.*, **2014**, 4(3), pp. 159-165.
- ⁴¹ International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, (ICH) Harmonised Tripartite Guideline, Stability Testing Of New Drug Substances And Products Q1A (R2), **2003**, version 4.
- ⁴² Oriqui, L. R., Mori, M., Wongtschowki, P., *Shelf Life para a indústria química*, 1. ed., Elsevier, **2014**, p. 8-12.
- ⁴³ International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, (ICH) Harmonised Tripartite Guideline Impurities In New Drug Products Q3B(R2), **2006**, version 4.

-
- ⁴⁴ World Health Organization, Guidelines for registration of fixed-dose, combination medicinal products, WHO Technical Report Series, **2005**, n°.929.
- ⁴⁵ Garg, A., Solas, D. W., Takahashi, L. H., Casella, J. V., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 53, 325.
- ⁴⁶ Qi, L., Cheng, Z., Zuo, G., Li, S., Fan, Q., *Defence. Sci. J.*, **2011**, 61, 30-35
- ⁴⁷ SciFinder, Chemical Abstracts Service, < <https://scifinder.cas.org> >.
- ⁴⁸ Kleinman, M. H., Steven, W. B., Alsante K.M., Reid, D. L., Mowery, M.D., Shimanovich, R., Foti, C., Smith, W. K., Reynolds, D. W., Nefliu, M., Ott, M. A., *Mol. Pharmaceutics*, **2014**, 11 (11), p. 4179.
- ⁴⁹ Li, M., *Organic Chemistry of Drug Degradation*, **2012**, RSC Drug Discovery Series n. 29.
- ⁵⁰ Maldaner, L., Jardim, I. C. S. F. *Quím. Nova* **2009**, 32, 1, 214.
- ⁵¹ Kaushik, D., Kaur, J., Kaur, V. P., Saini, B., Bansal, Y., Bansal, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, 120, pp. 202-211.
- ⁵² Maggio, M. R., Calvo, N. L., Vignaduzzo, S. E., Kaufman, T. S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, 101, 102.
- ⁵³ Zhang, F. Zhou, J., Shi, Y. Tavlarakis, P., Karaisz, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 128, 333.
- ⁵⁴ Lu, J., Rohani, S., *Curr Med Chem* **2009**, 16, 884.
- ⁵⁵ Andrioli, A., Prado, L. D., Costa, M. A. da, Rocha, H.V.A., *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* **2014**, 35,401
- ⁵⁶ Watson, W., American Chemical Society –ACS, News- Crystallization and Polymorphism **2016**, < <https://www.acs.org/content/acs/en/pressroom/cutting-edge-chemistry/crystallization-and-polymorphism.html> >
- ⁵⁷ Prado, L. D., Rocha, H. V. A., *Rev. Virtual Quim.* **2015**, 7, 6, 2080.
- ⁵⁸ Benvenuti, E. V., *Química inorgânica: átomos moléculas, líquidos e sólidos*, 2003, Ed. UFRGS.
- ⁵⁹ Choi, Y. K.; Poudel, B. K.; Marasini, N.; Yang, K. Y.; Kim, J. W.; Kim, J. O.; Choi, H. G.; Yong, C. S., *Int. J. Pharm* **2012**, 434, 264.
- ⁶⁰ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Nota técnica n° 2/2017, registro de medicamentos novos, genéricos e similares contendo solvatos e cocristais como insumo farmacêutico ativo, 2017.
- ⁶¹ Aitipamula, S., Banerjee, R., Bansal, A. K., Biradha, K., Cheney, M. L., et. Al., *Crystal Growth & Design* **2012**, 12, 2147.
- ⁶² Jones, W., Eddleston, M. D., *Faraday Discuss.* **2014**, 170, 9.
- ⁶³ Karki, S., Friščić, T., Fábrián, L., Laity, P. R., Day, G. M., Jones, W. *Adv. Mater.* **2009**, 21,3905.
- ⁶⁴ Tsapatsaris, N., Kolesov, B. A., Fischer, J., Boldyreva, E.V., Daemen, L., Eckert, J., Bordallo, H. N., *Mol Pharm.* **2014**,11(3):1032.
- ⁶⁵ Bag, P. P., Reddy, C. M. *Cryst. Growth Des.* **2012**, 12, 2740.
- ⁶⁶ Karpinski, P. H, *Chem. Eng. Technol.* **2006**, 29, 2.
- ⁶⁷ Hünig, S., Lücke, E., Brenninger, W., *Org. Synth.* **1961**, 41, 65

-
- ⁶⁸ Mauritz, K. A.; Moore, R. B. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 4535.
- ⁶⁹ Pinheiro, S. C. L., Raimundo Jr, I. M., *Quím. Nova* **2005**, 28, 932.
- ⁷⁰ Schummer, C.; Delhomme, O.; Appenzellerb, B.M.R.; Wennigb, R.; Millet, M.; *Talanta* **2009**, 77, 1473.
- ⁷¹ Poole, C.F.; *J. Chromatogr. A* **2013**, 1296, 2.
- ⁷² Cardoso, F. S. P., Mickle, G. E., Silva, M. A., Baraldi, P. T., Ferreira, F. B; *Org. Process Res. Dev.* **2016**, 20, 306.
- ⁷³ Dolmazon, R.; Gelin, S.; *J. Heterocyclic Chem.* **1985**, 22, 793.
- ⁷⁴ Santos, M. da S., Colnago, L. A., *Quím. Nova* **2013**, 36, 2, 324.
- ⁷⁵ Malz, F.; Jancke, H.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 38, 813.
- ⁷⁶ USP- monographs; Orphenadrine Citrate,
<http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m58870.html>
- ⁷⁷ USP- monographs; Amyl Nitrite Inhalant,
<http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m4600.html>
- ⁷⁸ Hickmott, P. W., Miles, G. J., Sheppard, G., Urbani, R., Yoxall, C. T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1973**, 1514.
- ⁷⁹ Ando, K., Tsuji, E., Ando, Y, Kunitomo, J., Kobayashi, R., Yokomizo T., Shimizu T., Yamashita M., Ohta, S., Nabe, T., Kohno, S. e Ohishi, Y., *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3(11), 2129.
- ⁸⁰ Glynn, D., Bernier, D., Woodward, S., *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5687.
- ⁸¹ Harding, K. E., Clement, B. A., Moreno, L., Katalinic, J. P., *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 940.
- ⁸² Zhang, Z.; Pan C.; Wang, Z.; *Chem. Commun.* **2007**, 4686.
- ⁸³ Jefferson, A.; Wangchareontra, S.; *J. Chem.*, **1985**, 38, 605.
- ⁸⁴ Arnoldi, A.; *Synthesis* **1984**, 10, 856.
- ⁸⁵ Yu, L., Wu, Y., Cao, H., Zhang, X., Shi, X., Luan, J., Chen, T., Panc, Y., Xu, Q., *Green Chem.* **2014**, 16, 287.
- ⁸⁶ Olah, G. A., Wang, Q., Trivedi, N. J., Prakash, G. K. S., *Synthesis*, **1991**, 739.
- ⁸⁷ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamento, guia n°. 04, versão 01, 2015.
- ⁸⁸ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - RDC n° 166, de 24 de junho de 2017, DOU seção 1, n°. 141, 25 de julho de 2017.