



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO

Rodolfo Veras de Azevedo

Uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear para quantificação
de donepezila em medicamentos para Alzheimer

Brasília, Distrito Federal
2025

**Uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear para quantificação de
donepezila em medicamentos**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade de Brasília
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Química.**

**Orientadora: Profa. Dra. Aline Lima de
Oliveira Paterno**

Brasília – DF

2025

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Comparação entre neurônio saudável e com acúmulo de placas A β e proteínas tau.	8
FIGURA 2 -	Estrutura química da rivastgmina.	11
FIGURA 3 -	Estrutura química da galantamina.	11
FIGURA 4 -	Estrutura química da memantina.	12
FIGURA 5 -	Estrutura química da donepezila com indicação do centro quiral.	13
FIGURA 6 -	Síntese do fármaco donepezila. [5,6-dimetóxi-1-indanona (I), 1-benzil-4-piperidinacarboxaldeído (II), arilideno-2-indanona (III)].	13
FIGURA 7 -	Síntese de híbrido donepezila ácido ferúlico.	14
FIGURA 8 -	Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz) referente a extração do DNP utilizando D ₂ O.	24
FIGURA 9 -	Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz) referente a extração do DNP utilizando CDCl ₃ .	24
FIGURA 10 -	Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz) referente a extração do DNP utilizando MeOD.	25
FIGURA 11 -	Estrutura 3D (esferas de van der Waals) da donepezila.	25
FIGURA 12 -	Composto donepezila com átomos numerados.	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA	Doença de Alzheimer
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
OMS	Organização Mundial da Saúde
NHS	National Health Service
NMDA	<i>N</i>-metil-D-aspartato
BPF	Boas Práticas de Fabricação
AChe	Acetilcolinesterase
UV	Ultravioleta
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
FDA	Food and Drug Administration
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EM	Espectroscopia de Massas
NOE	Nuclear Overhauser Effect
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
RMNq	Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa
DIC	Detector por Ionização de Chamas
DNP	Dynamic Nuclear Polarization
BBFO	Broad Band Fluorine Observe
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
TMS	Tetrametilsilano
TSP	Ácido trimetilsililpropanóico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRAFIA	10
2.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER	10
2.2. O FÁRMACO DONEPEZILA	12
2.3. CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS	15
2.4. A RMN NO CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS	16
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GERAL	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. PREPARO DA AMOSTRA	21
4.1.1 Água Deuterada (D ₂ O)	21
4.1.2 Clorofórmio Deuterado (CDCl ₃)	21
4.1.3 Metanol Deuterado (MeOD)	22
4.2. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. TESTE DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO DA MATRIX MEDICAMENTOSA	23
5.2. ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DE RMN	26
5.3. ANÁLISES QUANTITATIVAS	28
5.3.1. RMN 600 MHz	28
5.3.1.1 Análises com solvente D ₂ O	29
5.3.1.2. Análises no solvente MeOD	30
5.3.2 RMN 60 MHz	30
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERÊNCIAS	32
ANEXO I	41

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma condição neurodegenerativa progressiva que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a principal causa de demência. O fármaco donepezila, um inibidor seletivo da acetilcolinesterase, é amplamente utilizado no tratamento da DA por aumentar os níveis de acetilcolina no cérebro e melhorar a função cognitiva dos pacientes. A análise da qualidade de medicamentos é essencial para garantir sua eficácia terapêutica, exigindo métodos analíticos confiáveis e reprodutíveis. Neste contexto, a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) se destaca como uma ferramenta poderosa para a caracterização estrutural e quantificação de fármacos. Este estudo tem como objetivo avaliar a qualidade da donepezila disponível comercialmente por meio da RMN, identificando a presença do princípio ativo e possíveis impurezas, além de desenvolver um método de quantificação que elimine a necessidade de materiais de referência certificados. Entre os solventes avaliados, MeOD e D₂O demonstraram capacidade de liberação de donepezila da matriz medicamentosa compatível com a aquisição de espectros adequados de RMN de ¹H. Contudo, apenas D₂O solubilizou adequadamente para análises quantitativas. Utilizando RMN 600 MHz e método PULCON com padrão externo, obteve-se teor médio de donepezila de $4,60 \pm 0,51$ mg/comprimido, valor estatisticamente concordante com a dosagem declarada (4,56 mg; erro relativo de 3,5%). Em contraste, ensaios com RMN 60 MHz (método de padrão interno) resultaram em $6,16 \pm 0,90$ mg/comprimido (erro relativo de 35%). Os dados do RMN 600 MHz validam a robustez metodológica para quantificação, embora discrepâncias pontuais demandem ampliação de réplicas. Para o RMN 60 MHz, otimizações experimentais são necessárias para viabilizar aplicação quantitativa confiável.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, donepezila, acetilcolinesterase, Ressonância Magnética Nuclear, quantitativo, controle de qualidade, química verde.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative condition affecting millions worldwide, being the leading cause of dementia. The drug donepezil, a selective acetylcholinesterase inhibitor, is widely used in AD treatment as it increases acetylcholine levels in the brain and improves patients' cognitive function. Drug quality analysis is essential to ensure therapeutic efficacy, requiring reliable and reproducible analytical methods. In this context, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) stands out as a powerful tool for drug quantification and structural characterization. This study aims to evaluate the quality of commercially available donepezil using NMR, identifying the presence of the active ingredient and possible impurities, as well as developing a quantification method that eliminates the need for certified reference materials. The expected results include the validation of NMR as an effective method for donepezil quality control, providing a efficient approach to pharmaceutical analysis. Among the evaluated solvents, MeOD and D₂O demonstrated capacity of releasing donepezil from the drug matrix compatible with ¹H NMR spectra acquisition. However, only D₂O provided adequate solubility for quantitative analyses. Using 600 MHz NMR and the PULCON method with an external standard, a mean donepezil content of 4.60 ± 0.51 mg/tablet was obtained, statistically concordant with the declared dosage (4.56 mg; relative error of 3.5%). In contrast, assays with 60 MHz NMR (internal standard method) yielded 6.16 ± 0.90 mg/tablet (relative error of 35%). The 600 MHz NMR data validate the methodological robustness for quantification, although sporadic discrepancies require increased replicates. For 60 MHz NMR, experimental optimizations are necessary to enable reliable quantitative application.

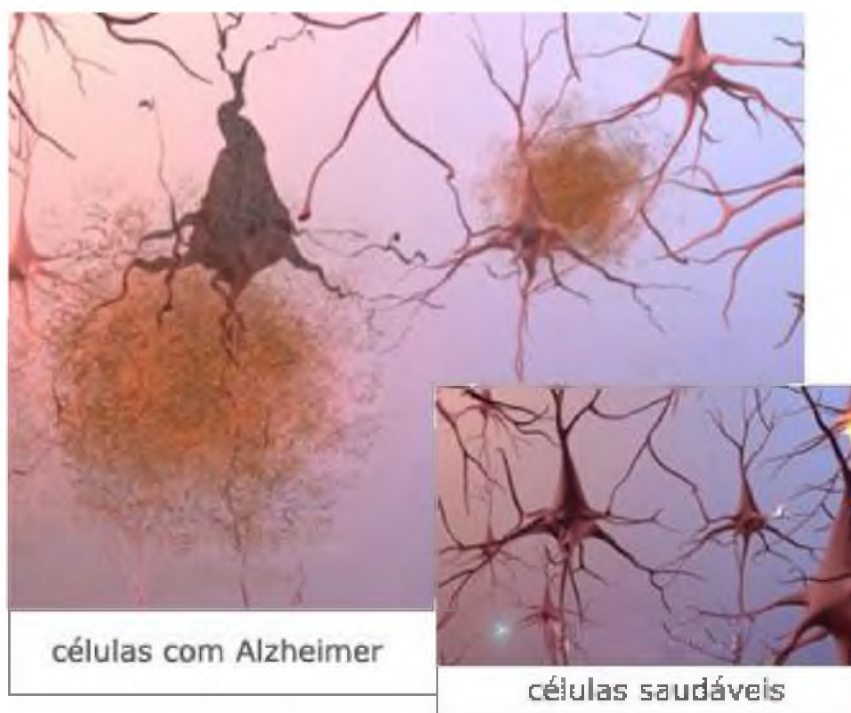
Keywords: Alzheimer's disease, donepezil, acetylcholinesterase, Nuclear Magnetic Resonance, quantitative, quality control, green chemistry.

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer é uma condição neurodegenerativa progressiva que começa com sintomas leves, como comprometimento de memória, e evolui ao longo de alguns anos (WHO, 2023). Foi estimado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que o Alzheimer seja responsável por 60-70% dos casos diagnosticados de demência em todo o mundo, tornando-se a principal causa dessa condição (WHO, 2023). A expectativa de vida após o diagnóstico varia significativamente, de alguns meses a vários anos, sendo a capacidade cognitiva global um dos principais indicadores prognósticos (SCHAFFERT et al., 2022).

A hipótese sobre o mecanismo da doença mais antiga é a hipótese colinérgica, onde se acredita que a redução dos níveis do neurotransmissor acetilcolina cause a doença. A maioria dos tratamentos farmacêuticos se baseia nessa hipótese (BREIJYEH, KARAMAN, 2020). Porém, de acordo com o NHS (2025), a hipótese mais aceita atualmente sugere que a doença de Alzheimer é causada pelo acúmulo extracelular de peptídeos beta-amiloides em forma de placas amiloides, bem como pela agregação intracelular de proteínas tau hiperfosforiladas (Figura 1). Esses eventos prejudicam a conectividade neuronal, levando à disfunção sináptica e morte neuronal.

FIGURA 1 - Comparação entre neurônio saudável e com acúmulo de placas A β e proteínas tau.



Atualmente, existem duas classes principais de medicamentos utilizadas no tratamento da Doença de Alzheimer: os inibidores da acetilcolinesterase (tacrina, rivastigmina e donepezila) e a memantina um antagonista do receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Os inibidores da acetilcolinesterase são indicados principalmente para os estágios iniciais da doença, enquanto a memantina é utilizada predominantemente em estágios moderados a graves devido à sua capacidade de modular a excitotoxicidade causada pelo excesso de glutamato devido à atividade desregulada do NMDA (WELLER, BUDSON, 2018). Recentemente, foi aprovado para uso o medicamento donanemabe, um anticorpo monoclonal humanizado que se liga especificamente a placas de beta-amiloide (A β) agregadas no cérebro. Estudos clínicos demonstraram que, em pacientes com doença de Alzheimer em estágio inicial, o fármaco promoveu uma redução de 32% no declínio cognitivo e funcional após 76 semanas de tratamento, comparado ao placebo. Seu mecanismo de ação envolve a remoção das placas amiloides, mas seu efeito sobre os emaranhados neurofibrilares de proteína tau ainda está em investigação. (SIMS et al., 2023)

O controle de qualidade de medicamentos é um aspecto crucial para garantir a segurança e a eficácia dos tratamentos oferecidos à população. Ele assegura que cada produto farmacêutico atenda aos padrões estabelecidos de pureza, concentração e estabilidade, prevenindo problemas de saúde decorrentes de desvios nesses parâmetros. Para isso, os fabricantes seguem rigorosamente as Boas Práticas de Fabricação (BPF), um conjunto de normas que regulamentam desde a escolha de matérias-primas até o processo de produção e embalagem. Este processo é auditado por órgãos reguladores, como a Anvisa, que fiscalizam o cumprimento das normas e asseguram a confiabilidade dos medicamentos disponibilizados no mercado (ANVISA, 2019). Dessa forma, o controle de qualidade não apenas reduz os riscos associados a produtos contaminados ou com concentração inadequada, mas também fortalece a confiança dos consumidores e profissionais de saúde no sistema.

Com base nesses aspectos, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a qualidade do medicamento donepezila disponível comercialmente. Para isso, pretende-se identificar os sinais característicos do princípio ativo, bem como aplicar um método de quantificação por RMN que utilize referência externa e interna, eliminando, assim, a necessidade de materiais de referência certificados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer é uma encefalopatia neurodegenerativa progressiva caracterizada pelo acúmulo de placas de β -amiloide e emaranhados neurofibrilares de tau hiperfosforilada, resultando em disfunção sináptica e morte neuronal (WHO, 2023). O prognóstico varia substancialmente, com sobrevida pós-diagnóstico oscilando entre poucos meses e mais de uma década, sendo a reserva cognitiva e a progressão neuropatológica fatores determinantes para a evolução clínica (SCHAFFERT et al., 2022).

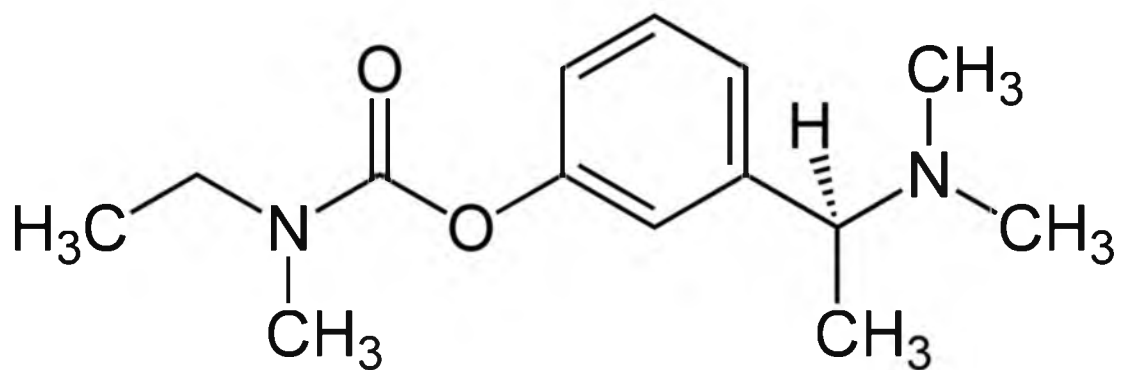
A progressão da Doença de Alzheimer é geralmente dividida em três estágios clínicos: leve, moderado e avançado. Os sintomas, que tendem a piorar com o tempo, incluem inicialmente comprometimento da memória de curto prazo, manifestado pelo esquecimento frequente de eventos recentes ou objetos pessoais. Outros sinais incluem desorientação espacial e temporal, como dificuldade em localizar objetos ou em retornar para casa após sair; surgem confusão em situações familiares, dificuldade para resolver problemas ou tomar decisões, comprometimento na compreensão de conversas ou na escolha de palavras apropriadas, além de dificuldade em realizar tarefas cotidianas. Erros no julgamento espacial, como calcular distâncias entre objetos, também são comuns. É importante destacar que os sintomas variam entre os indivíduos e sua progressão depende de múltiplos fatores (SCHAFFERT et al., 2022).

O tratamento da Doença de Alzheimer é multidisciplinar e tem como objetivo retardar a progressão da doença, aliviar sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente. Atualmente, não há cura, mas algumas abordagens terapêuticas podem minimizar os déficits cognitivos e otimizar a funcionalidade do indivíduo.

No aspecto farmacológico, os inibidores da acetilcolinesterase, como donepezila, rivastigmina e galantamina, são indicados para casos leves a moderados, pois aumentam os níveis de acetilcolina no cérebro, um neurotransmissor essencial para a memória e cognição. Para casos moderados a graves, pode-se utilizar a memantina, um antagonista do receptor NMDA que regula a atividade do glutamato e protege os neurônios contra neurotoxicidade. Além disso, novas terapias biológicas, como os anticorpos monoclonais (donanemabe), foram desenvolvidas para remover as placas de β -amiloide, mas seu uso ainda é restrito e sujeito a debate devido à eficácia limitada e aos efeitos adversos (SIMS, et al., 2023) O tratamento

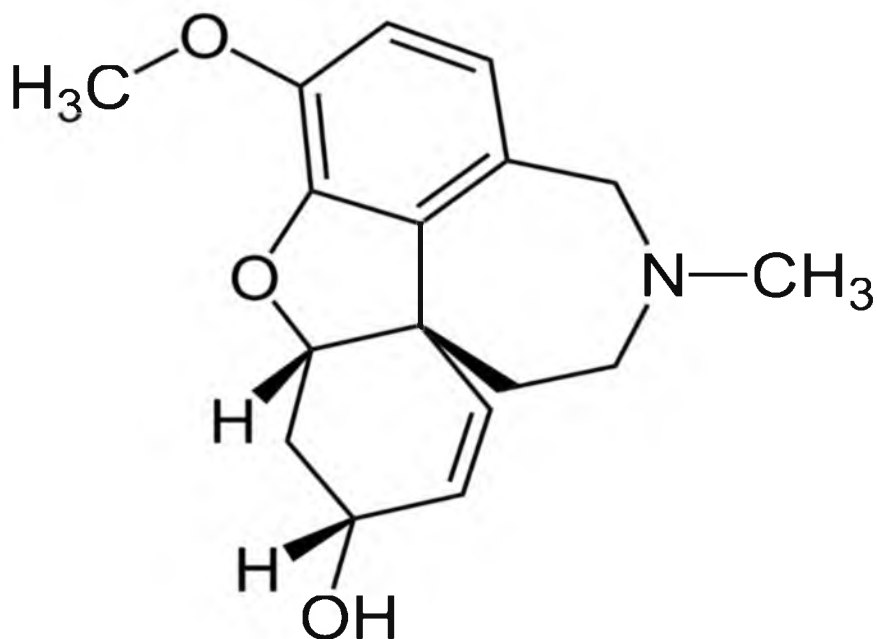
também pode incluir medicamentos sintomáticos, como antidepressivos, antipsicóticos atípicos e hipnóticos para manejar sintomas neuropsiquiátricos, como agitação, depressão e distúrbios do sono (WELLER; BUDSON, 2018).

FIGURA 2 – Estrutura química da rivastgmina.



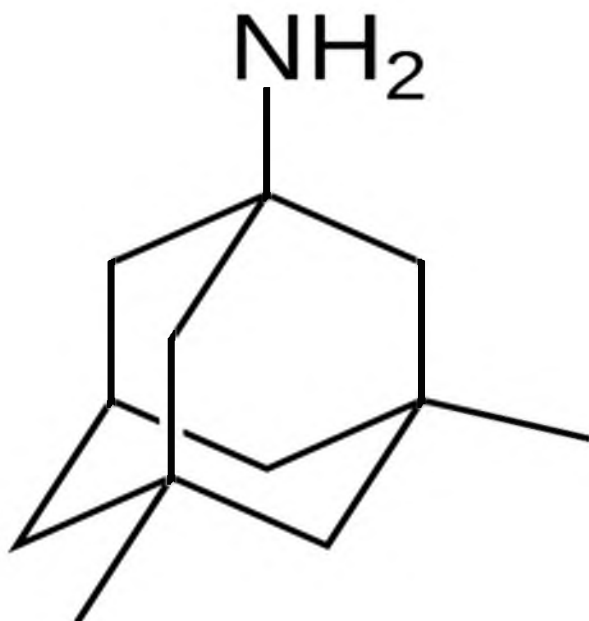
Fonte: O autor.

FIGURA 3 – Estrutura química da galantamina.



Fonte: O autor.

FIGURA 4 – Estrutura química da memantina.

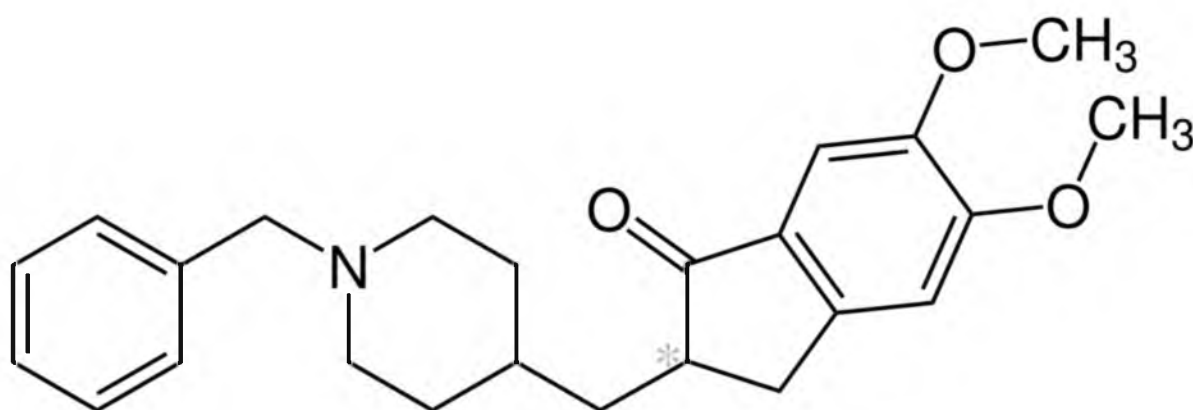


Fonte: (“File:Memantine structure.svg - Wikimedia Commons”, 2016)

2.2. O FÁRMACO DONEPEZILA

A donepezila é um fármaco amplamente utilizado no tratamento da Doença de Alzheimer, apresentada na Figura 2, que consiste em um núcleo de benzilpiperidina ligado a um grupo dimetóxi-indanona através de uma ponte metileno (PATEL et al., 2024). Essa estrutura permite que a donepezila atue como uma inibidora seletiva da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela degradação da acetilcolina, um neurotransmissor essencial para a memória e a cognição. Ao inibir a AChE, a donepezila aumenta os níveis de acetilcolina no cérebro, melhorando a comunicação neuronal e a função cognitiva em pacientes com DA (DOODY et al., 2012; HAMPEL et al., 2018).

FIGURA 5 – Estrutura química da donepezila com indicação do centro quiral.

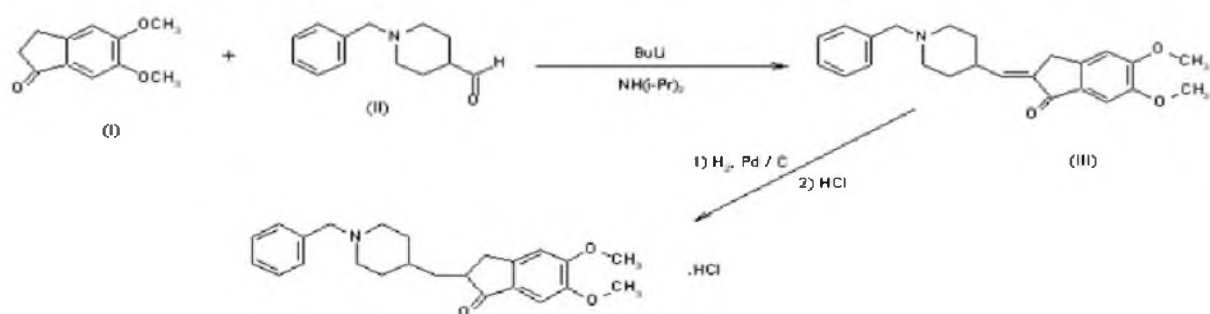


Fonte: (DENWET, 2017)

Além de sua ação primária como inibidora da AChE, estudos sugerem que a donepezila também pode interagir com outras vias patológicas da Doença de Alzheimer, como tratamento da agregação de peptídeos beta-amiloides e a fosforilação da proteína tau, embora esses efeitos ainda estejam sob investigação (NAN et al., 2016; YERDELEN et al., 2015).

A síntese da donepezila, demonstrada na Figura 3, envolve uma condensação aldólica de 5,6-dimetóxi-1-indanona e 1-benzil-4-piperidinacarboxaldeído, resultando no intermediário de arilideno-2-indanona, seguida de redução catalítica, com um rendimento total de 27% (SUGIMOTO et al., 1995). Métodos sintéticos têm explorado abordagens ecológicas e escaláveis, como a utilização de catalisadores de paládio e condições de reação menos tóxicas, visando otimizar a produção do fármaco (ELETI et al., 2006; RAO et al., 2007). A síntese industrial da donepezila tem sido aprimorada para reduzir custos e aumentar a eficiência, com métodos que eliminam a necessidade de reagentes caros e perigosos, como o *N*-butillítio, o substituindo por bases mais acessíveis, como carbonatos alcalinos (RAWAT et al., 2013).

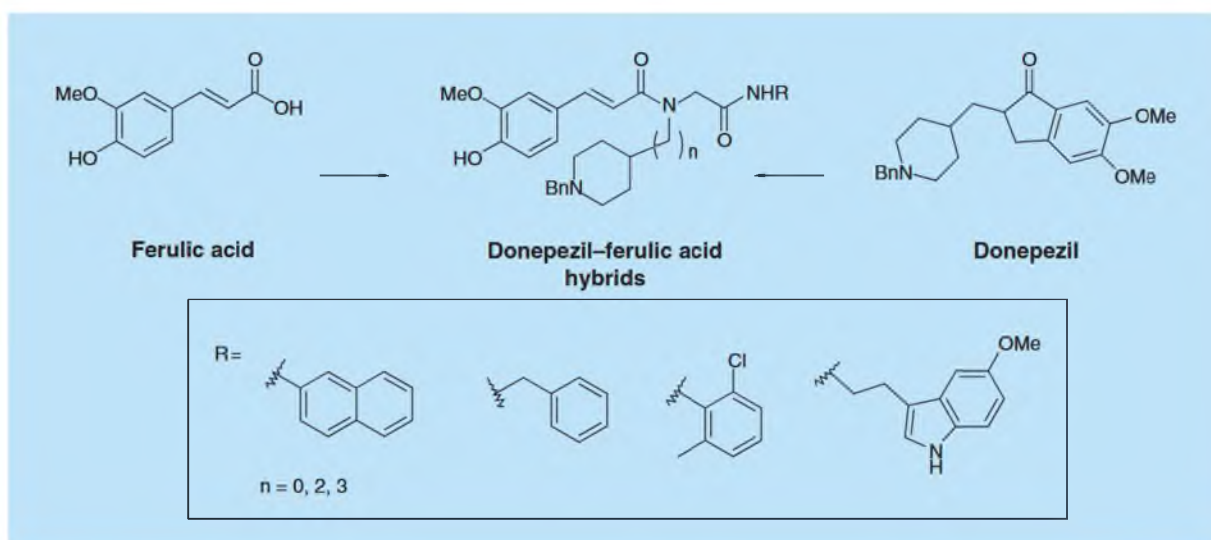
FIGURA 6 - Síntese do fármaco donepezila. [5,6-dimetóxi-1-indanona (I), 1-benzil-4-piperidinacarboxaldeído (II), arilideno-2-indanona (III)].



Fonte: MELVIN, A (2013)

O fármaco é administrado como um racemato e tem sido objeto de diversas modificações estruturais para melhorar sua seletividade e eficácia (SUGIMOTO et al., 1990; SUGIMOTO et al., 1992). Derivados e híbridos da donepezila (Figura 4), como aqueles combinados com ácido ferúlico e tacrina, têm sido sintetizados para explorar atividades multifuncionais, incluindo propriedades antioxidantes e inibição de outras enzimas envolvidas na Doença de Alzheimer (BENCHEKROUN et al., 2015; ALONSO et al., 2005).

FIGURA 7 - Síntese de híbrido donepezila ácido ferúlico.



Fonte: BENCHEKROUN et al., (2015)

A estrutura química da donepezila, seu mecanismo de ação, síntese e formulação são aspectos fundamentais para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para a Doença de Alzheimer. A compreensão desses elementos permite a criação de novos derivados e híbridos com potencial para abordar múltiplos aspectos da patologia da Doença de Alzheimer, oferecendo esperança para tratamentos mais abrangentes e eficientes (CAVALLI et al., 2008; WANG et al., 2016).

2.3. CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

O controle de qualidade de medicamentos é realizado por meio de análises físicas, químicas e biológicas, seguindo diretrizes estabelecidas por farmacopeias internacionais, como a Farmacopeia Europeia, a Farmacopeia dos Estados Unidos e a Farmacopeia Japonesa. Essas diretrizes incluem métodos padronizados para a identificação, pureza, dosagem e estabilidade dos fármacos (EUROPEAN PHARMACOPOEIA Ph. Eur., 2014; THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA USP, 2014; THE JAPANESE PHARMACOPOEIA JP, 2011).

As principais técnicas utilizadas no controle de qualidade de medicamentos incluem os métodos clássicos, como as reações de cor e precipitação, que são utilizadas para a identificação de íons e grupos funcionais. Exemplos incluem o teste com cloreto de bário para identificar a presença de íons sulfato ou a identificação de íons cloretos com nitrato de prata (EUROPEAN PHARMACOPOEIA Ph. Eur., 2014; THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA USP, 2014). Outras técnicas incluem métodos físicos de medição do ponto de fusão para confirmar pureza e rotação óptica para confirmar pureza e a identidade e de compostos (THE JAPANESE PHARMACOPOEIA JP, 2011; THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA USP., 2014).

Dentre os métodos espectroscópicos, destaca-se a espectroscopia no infravermelho (IR), que é um dos métodos mais utilizados para a identificação de fármacos, comparando o espectro da amostra com um padrão de referência (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014; THE JAPANESE PHARMACOPOEIA JP, 2011). A espectroscopia ultravioleta (UV) é outra técnica comum, empregada tanto na análise quantitativa quanto qualitativa (EUROPEAN PHARMACOPOEIA Ph. Eur., 2014). A ressonância magnética nuclear (RMN) é usada para a elucidação estrutural de moléculas complexas, incluindo proteínas e peptídeos (GÖRÖG, 2008).

A cromatografia, que inclui diversas variantes como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa (CG), é amplamente utilizada no controle de qualidade para análise de pureza e identificação de impurezas. A CLAE, por exemplo, é usada com base no tempo de retenção para analisar a pureza de substâncias (GÖRÖG, 2012). A CCD, por ser um método simples, é eficaz na identificação de impurezas, comparando valores de tempo de retenção (GÖRÖG, 2012). Já a cromatografia gasosa é empregada para compostos voláteis e pouco polares (EUROPEAN PHARMACOPOEIA Ph. Eur., 2014).

O controle de qualidade é essencial para garantir a segurança do paciente, evitando a presença de impurezas tóxicas ou que degradam o medicamento causando efeitos adversos. Também assegura a eficácia do medicamento, verificando se a dosagem e a forma farmacêutica estão corretas, e cumpre as regulamentações de órgãos como a FDA e a ANVISA. Além disso, é importante para manter a reputação da indústria farmacêutica, uma vez que produtos de alta qualidade reforçam a confiança do consumidor e evitam recolhimento (retirada do mercado) de medicamentos (EUROPEAN PHARMACOPUEIA Ph. Eu., 2014; THE UNITED STATES PHARMACOPUEIA USP, 2014; GÖRÖG, 2012).

Os principais parâmetros analisados no controle de qualidade incluem a identificação do fármaco, para confirmação da estrutura química e pureza, o teor do princípio ativo, para quantificação da quantidade de fármaco presente, e as impurezas, que envolvem a identificação e quantificação de subprodutos e contaminantes. Além disso, a estabilidade do fármaco é avaliada sob diferentes condições, como temperatura, umidade e luz, e a uniformidade de dosagem é verificada para garantir a consistência na distribuição do princípio ativo (EUROPEAN PHARMACOPUEIA Ph. Eur., 2014; THE UNITED STATES PHARMACOPUEIA USP, 2014).

2.4. A RMN NO CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

A RMN apresenta-se como uma técnica especialmente promissora para aplicações farmacêuticas. Medicamentos falsificados ou de qualidade inferior podem comprometer o tratamento de doenças e, em casos extremos, colocar a saúde dos pacientes em risco. Diante da ampla diversidade de fármacos disponíveis, das impurezas associadas e do surgimento constante de novas substâncias, a aquisição de materiais de referência certificados pode ser inviável, pela indisponibilidade de padrões adequados.

Nesse cenário, a RMN emerge como uma solução eficiente para laboratórios farmacêuticos, permitindo superar as dificuldades inerentes à análise de medicamentos. Suas aplicações incluem a identificação de princípios ativos, a determinação da composição de medicamentos multicomponentes, a avaliação de solventes residuais, a análise da composição isomérica (incluindo proporção de diastereoisômeros e excesso enantiomérico com o uso de aditivos quirais), a quantificação de proporções molares entre medicamentos básicos (protonados) e ácidos orgânicos (desprotonados) em sais, além da análise do tempo de degradação ou decomposição de medicamentos, entre outras possibilidades (KEIZERS et al., 2020; MALZ; JANCKE, 2005).

A espectroscopia de RMN é uma técnica amplamente utilizada para análise quantitativa, conhecida como RMNq, que se baseia na proporcionalidade direta entre a intensidade do sinal (I) e o número de núcleos (N) ressonantes na amostra. A equação que descreve essa relação é dada por

$$I = Ks \cdot N \quad (1)$$

Onde Ks representa uma constante dependente de variáveis como a natureza da amostra, o campo magnético, a sequência de pulsos e a temperatura.

A precisão dessa análise exige a otimização desses parâmetros para assegurar que todos os núcleos experimentem o mesmo nível de magnetização (HOLZGRABE, 2010).

Na RMNq, três principais métodos são empregados. O primeiro, denominado Método de Razão Molar Relativa, calcula a razão entre os moles de dois componentes, x e y, com base na intensidade dos sinais e no número de núcleos, conforme a equação:

$$\frac{n_y}{n_x} = \frac{I_x}{I_y} \cdot \frac{N_y}{N_x} \quad (2)$$

O segundo método é o Absoluto, que oferece duas abordagens: a primeira, chamada Método 100%, mede todas as impurezas e calcula o analito como a diferença em relação a 100% das impurezas, enquanto a segunda, o uso de Padrão Interno, calcula a pureza do analito utilizando um padrão interno, sendo calculada pela equação

$$Px = \frac{Ix}{Istd} \cdot \frac{Nstd}{Nx} \cdot \frac{Mstd}{Mx} \cdot \frac{Wstd}{Wx} \cdot Pstd \quad (3)$$

Onde I_x e I_{std} são as áreas dos sinais do analito e do padrão interno, N_x e N_{std} são o número de prótons equivalentes, M_x e M_{std} são os pesos moleculares, e W_x e W_{std} representam as massas da amostra e do padrão, respectivamente (HOLZGRABE; MALET-MARTINO, 2011). Nesse caso, a escolha do padrão interno é crucial para a precisão da técnica. Este deve ser quimicamente inerte, apresentar um sinal único, ser solúvel em solventes deuterados e ter pureza certificada. Exemplos comuns incluem 1,3,5-trimetoxibenzeno e dimetil sulfona devido à sua estabilidade e facilidade de detecção nos espectros de RMN (HATZAKIS, 2019).

O terceiro, método PULCON, que será posto em prática durante este estudo, pode ser utilizado com uma referência externa, correlacionando as intensidades de dois espectros, utilizando a seguinte equação

$$Cx = k \cdot Cstd \cdot \frac{Ix}{Istd} \cdot \frac{Tx}{Tstd} \cdot \frac{\Theta x^{90}}{\Theta std^{90}} \quad (4)$$

Onde C (x da amostra e std do padrão) é a concentração em mol/L; k é um fator de correção relacionado ao aparelho; I é a intensidade do sinal no espectro (integral); T é a temperatura (K); Θ^{90} o valor do pulso de 90°; n o número de transientes (scans). (BENEDITO, 2018)

A integração precisa dos sinais é essencial para a quantificação. A área do sinal deve ser calculada sobre uma faixa de frequência que cubra 99% da intensidade. Os parâmetros de aquisição e processamento, como *shimming*, ângulo de pulso e tempo de relaxação, são ajustados para garantir resultados precisos e reprodutíveis (WEBSTER & KUMAR, 2014). Além disso, a sensibilidade da RMNq depende de diversos fatores, incluindo o campo magnético do espectrômetro e a relação sinal-ruído, a qual pode ser otimizada com o uso de ajustes adequados no solvente, pH, temperatura e compostos que causam deslocamento químico devido as interações com o analito (SINGH; ROY, 2016; MICHALEAS; ANTONIADOU-VYZA, 2006; ZHENG; PRICE, 2010).

A RMNq é amplamente reconhecida em farmacopéias internacionais como USP, BP e EP, sendo utilizada para a identificação qualitativa, avaliação de pureza, composição de polímeros e análise de impurezas em fármacos (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012). Este método, por sua flexibilidade e precisão, continua a ser um dos mais importantes para análises quantitativas e qualitativas em diversos campos científicos. Comparado a outras técnicas analíticas, a RMNq se destaca pela sua seletividade, pois é capaz de identificar analitos mesmo na presença de impurezas, capaz de detectar concentrações de 5 µM de acordo com ZHANG et al. (2023), com menor geração de resíduos em comparação à HPLC pois se utiliza de apenas uma quantidade mínima de solvente (PEEZ et al., 2019; CIÇEK et al., 2021; KEMPRAI et al., 2020; HUSSAIN et al., 2020).

A principal vantagem da utilização de técnicas de RMNq para o controle de qualidade de medicamentos, reside no fato de que, ao contrário de outras técnicas empregadas na quantificação de compostos orgânicos, como Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), Cromatografia Gasosa acoplada a Detector por Ionização de Chamas

(CG-DIC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrofotômetro de Ultravioleta/Visível (CLAE-UV/VIS), a RMNq dispensa a necessidade de materiais de referência que contenham o analito de interesse. Isso ocorre porque o grupo funcional observado, como o núcleo de um átomo de hidrogênio não lábil, possui um coeficiente de resposta molar igual a 1, independentemente do composto analisado (HAYS, 2005). Assim, a correlação entre o sinal analítico e a concentração do analito pode ser realizada facilmente utilizando a área do sinal da amostra e um padrão interno (KELMAN; WRIGHT, 2012), um padrão externo (BURTON; QUILLIAM; WALTER, 2005) ou um sinal de referência sintético gerado eletronicamente (AKOKA; BARANTIN; TRIERWEILER, 1999), desde que o número de prótons correspondente àquela área seja conhecido. Como a quantidade absoluta de substâncias pode ser determinada utilizando padrões simples, a RMNq é considerada um método primário de medição de proporção, assim como a coulometria, a gravimetria e a titulometria (MALZ; JANCKE, 2005).

Para que as análises de RMNq forneçam dados quantitativos precisos, é indispensável assegurar que os espectros sejam adquiridos com a completa relaxação dos spins entre os pulsos. Isso exige um intervalo entre as varreduras de, no mínimo, cinco vezes o valor de T1 (tempo de relaxação longitudinal) do núcleo mais lento a ser quantificado. O descumprimento dessa exigência pode comprometer a proporcionalidade entre a área do sinal e a concentração do analito. Além disso, é fundamental considerar outros fatores críticos, como realizar a atribuição dos sinais aos seus determinados referentes no composto para garantir que o sinal utilizado para quantificação não esteja sobreposto ao de outros componentes da amostra, obter espectros com uma relação sinal/ruído adequada, assegurar a simetria e a fase correta do sinal e evitar o ganho de sinal induzido pelo efeito Overhauser nuclear (NOE, do inglês *nuclear Overhauser effect*) (HOLZGRABE, 2010).

A aplicação da RMNq na análise de fármacos tem se mostrado altamente eficaz. A técnica tem sido utilizada na quantificação de microplásticos, no controle de qualidade de compostos naturais como *Siraitia grosvenorii* e na avaliação da autenticidade de medicamentos multicomponentes (PEEZ et al., 2019; CÍÇEK et al., 2021). Além disso, sua aplicabilidade na detecção de drogas ilícitas foi demonstrada em estudos que analisaram a quantificação do 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de ecstasy apreendidos, sem a necessidade de padrões internos (HUSSAIN et al., 2020). Foi demonstrado pelo nosso grupo a robustez do RMNq na análise da pureza de várias substâncias psicoativas, apresentando alta precisão ($RSD \leq 2,67\%$), baixa incerteza ($\leq 0,44\%$, $k=2$) e limites de detecção/quantificação

adequados ($LOD < 0,8\%$, $LOQ < 2\%$), validados por comparação com dados do exercício colaborativo ICE/UNODC ($R^2 = 0,9968$) (SERRANO et al., 2020).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho de conclusão de curso tem como objetivo principal aplicar uma metodologia analítica para quantificar o princípio ativo 2-[(1-benzil-4-piperidil)metil]-5,6-dimetoxi-2,3-di-hidroinden-1-ona em formulações de Donila por RMN.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a liberação do fármaco donepezila nos solventes D_2O , MeOD e $CDCl_3$;
- Definir os parâmetros de aquisição e processamento ideais dos espectros;
- Confirmar por meio da técnica de RMN a presença de 2-[(1-benzil-4-piperidil)metil]-5,6-dimetoxi-2,3-di-hidroinden-1-ona em fármacos encontrados no comércio local.
- Quantificar por meio da técnica de RMNq de 1H (600 MHz) usando o método PULCON (padrão externo) o princípio ativo donepezila em fármaco encontrados no comércio local.
- Quantificar por meio da técnica de RMNq de 1H (60 MHz, RMN de bancada) usando o método de padrão interno o princípio ativo do DNP em fármaco encontrados no comércio local.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O medicamento utilizado para os experimentos foi da marca Donila, contendo 4,56 mg de donepezila, equivalentes a 5 mg de cloridrato de donepezila.

Os espectros foram obtidos por meio do espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III HD operando em campo magnético de 14 T e à frequência de 1H de 600 MHz e equipado com sonda do tipo Broadband Observe (BBFO) 5 mm e no equipamento de Ressonância Magnética Nuclear de bancada *X-Pulse Broadband 60MHz Analyzer* da marca Oxford operando à 1,4 T e à frequência de 60 MHz com sonda *Broadband*

5 mm, ambos localizado na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

4.1. PREPARO DE AMOSTRA

4.1.1. Água Deuterada (D₂O)

Quatro comprimidos foram individualmente pesados em balança analítica para determinação da massa média. Em seguida, os comprimidos foram triturados em almofariz até obtenção de pó homogêneo. Uma alíquota correspondente à massa média de um comprimido foi pesada em balança analítica Shimadzu AUX320 ($\pm 0,1$ mg) e transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL. Adicionou-se 770 μ L de água deuterada (D₂O) ao tubo, seguido de agitação para homogeneização inicial. A mistura foi submetida ao ultrassom QUIMIS 40 kHz por 15 minutos para completa dissolução e posteriormente centrifugada em centrífuga KASVI K14-1215P à força centrífuga relativa (RCF) de 770 por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de RMN de 5 mm para análise espectroscópica no RMN de 600 MHz.

Para as análises quantitativas no 60 MHz, dois comprimidos foram pesados individualmente na balança Shimadzu AUX320 ($\pm 0,1$ mg), triturados em conjunto em almofariz até obtenção de um pó homogêneo. Separadas duas alíquotas com a massa média entre os dois comprimidos em eppendorfs de 1,5 mL, a esses adicionados 0,8 mL de D₂O, seguido de agitação para homogeneização inicial. A mistura foi submetida a ultrassom QUIMIS 40 kHz por 15 minutos para completa dissolução e posteriormente centrifugada em centrífuga KASVI K14-1215P à RCF de 770 por 10 minutos. Os sobrenadantes foram separados e posteriormente foi adicionado o padrão de Ácido Maleico.

4.1.2. Clorofórmio Deuterado (CDCl₃)

Três comprimidos foram triturados em almofariz até obtenção de pó homogêneo. Uma alíquota de 14,1 mg do material pulverizado foi pesada em balança analítica Shimadzu AUX320 ($\pm 0,1$ mg) e transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL. Adicionou-se 700 μ L de

CDCl_3 , seguido de agitação para homogeneização inicial. A mistura foi submetida a ultrassom QUIMIS 40 kHz por 15 minutos para completa dissolução e posteriormente centrifugada em centrífuga KASVI K14-1215P à força RCF de 770 por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de RMN de 5 mm para análise espectroscópica no RMN de 600 MHz.

4.1.3. Metanol Deuterado

Três comprimidos foram triturados em almofariz até obtenção de pó homogêneo. Uma alíquota de 15,6 mg do material pulverizado foi pesada em balança analítica Shimadzu AUX320 ($\pm 0,1$ mg) e transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL. Adicionou-se 700 μL de MeOD a massa de solvente adicionada pesada, seguido de agitação para homogeneização inicial. A mistura foi submetida a ultrassom QUIMIS 40 kHz por 15 minutos para completa dissolução e posteriormente centrifugada em centrífuga KASVI K14-1215P à RCF de 770 por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de RMN de 5 mm para análise espectroscópica no RMN de 600 MHz.

4.2. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN

Para a atribuição correta dos sinais, foram realizados experimentos de RMN ^{13}C e os bidimensionais HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) e COSY (*Correlation Spectroscopy*).

Para as análises quantitativas, os espectros foram adquiridos com os parâmetros descritos na Tabela 1. Esses parâmetros foram definidos de modo a garantir a obtenção de um espectro quantitativo e uma relação sinal-ruído acima de 10 para os sinais utilizados na quantificação. Para os dados obtidos no equipamento 600 MHz, as análises quantitativas foram realizadas utilizando o método PULCON e utilizou-se dimetil sulfona (DMS) como padrão externo, com pureza certificada de 99,73%. Para os dados obtidos no equipamento de bancada 60 MHz, as análises quantitativas foram realizadas utilizando o método de padrão interno. Para isso, o ácido maleico (AM) foi utilizado como padrão interno.

Tabela 1 – Parâmetros na aquisição dos espectros de RMNq de ^1H .

Parâmetro	Abreviações (Bruker)	600 MHz (MeOD)	600 MHz (D_2O)	60 MHz (D_2O)
Número de pontos	TD	65.536	65.536	16.384
Largura da Janela Espectral	SW	20 ppm	20 ppm	42 ppm
Centro da Janela Espectral	O1	2.930,34 Hz	2.817,36 Hz	1.250,0 Hz
Tempo de Espera	D1	60 s	60 s	45 s
Dummy Scans	DS	0	0	0
Número de Scans	NS	16	16	16
Ganho do detector	RG	203	36	-
Pulso de 90°	P1	12 μs	12 μs	12 μs
Temperatura	TE	298 K	298 K	298 K

Fonte: O Autor

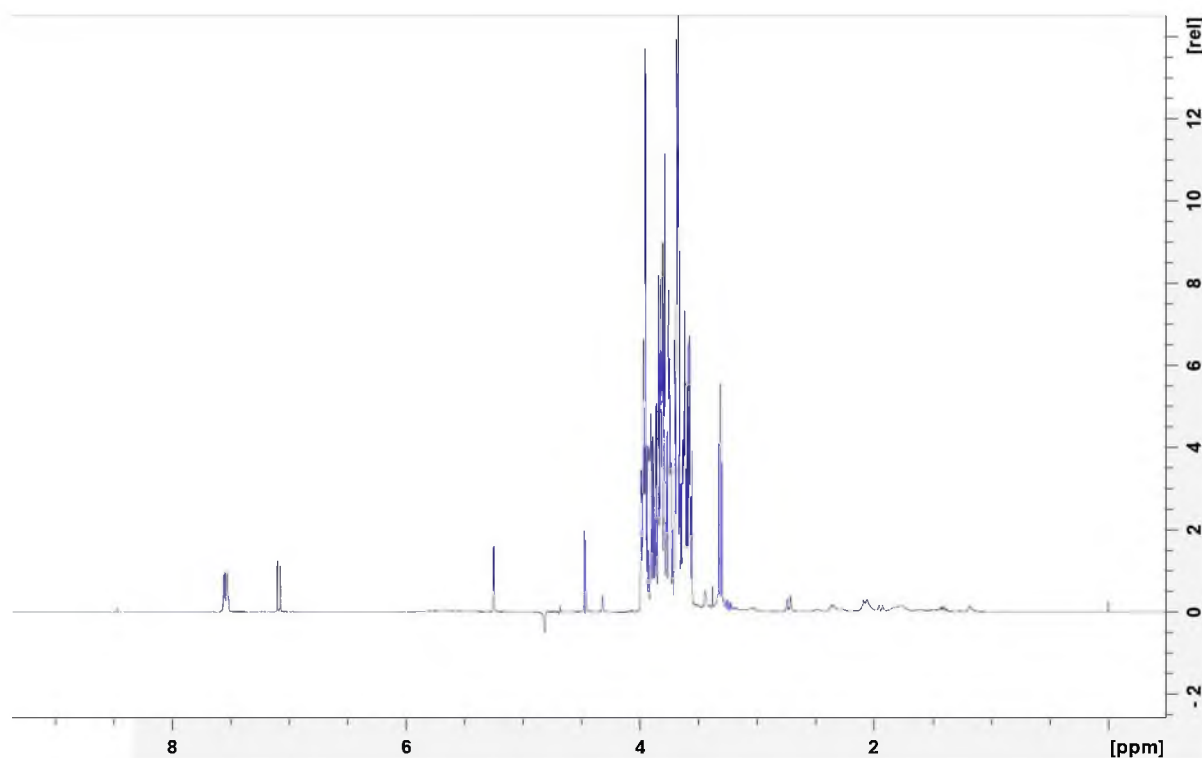
Os espectros foram processados com os softwares TopSpin 4.5.0 e MestreNova 15.1.0. Ajustes manuais de fase e linha de base foram realizados quando necessário e os espectros foram referenciados em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS) em 0 ppm. Os intervalos de integração foram definidos manualmente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO DA MATRIX MEDICAMENTOSA

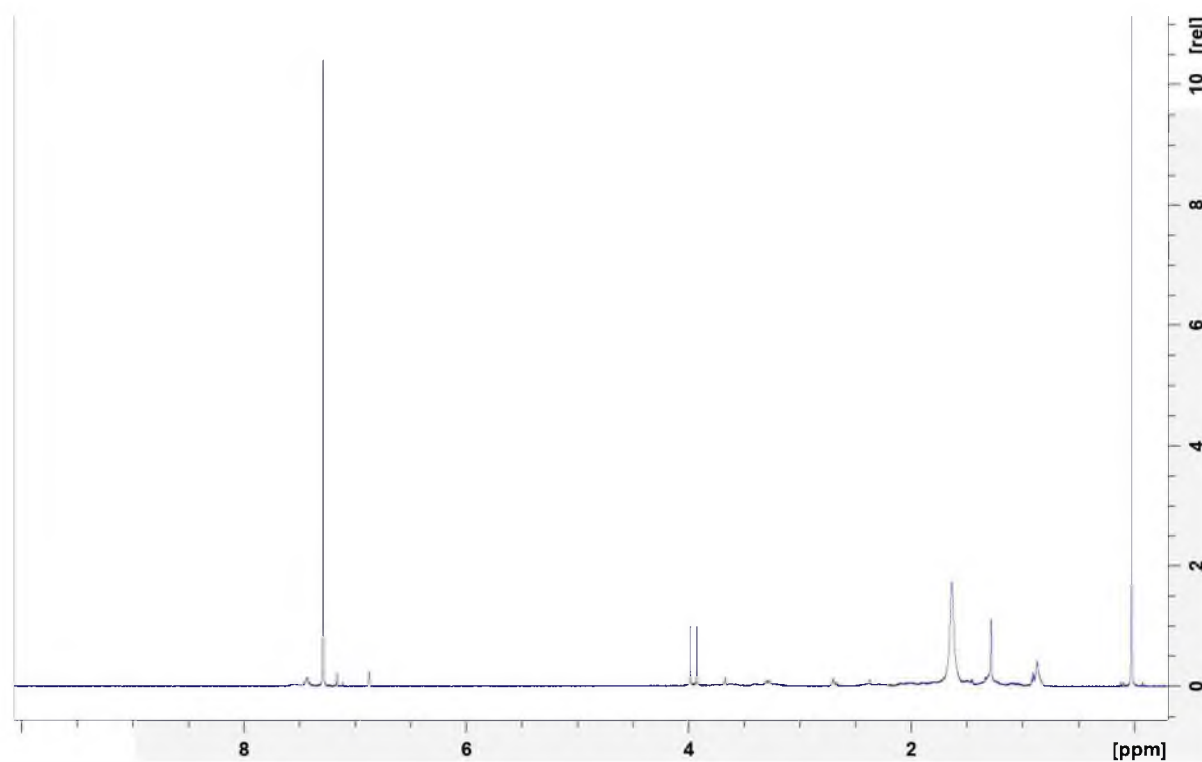
Como descrito anteriormente, todo esse estudo foi realizado utilizando drágeas do fármaco Donila obtido comercialmente. Assim, com o objetivo de determinar o solvente mais eficiente para a extração do princípio ativo donepezila e, portanto, para a sua separação dos demais excipientes presentes na formulação farmacêutica, foi realizado um ensaio comparativo empregando os solventes D_2O , CDCl_3 e MeOD. Após macerar a drágea, adicionar o solvente e realizar a extração com auxílio de sonificador, as amostras foram centrifugadas e os espectros de RMN de ^1H foram obtidos no equipamento de 600 MHz e estão apresentados nas Figuras 8-10.

FIGURA 8 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) referente a extração do DNP utilizando D_2O .



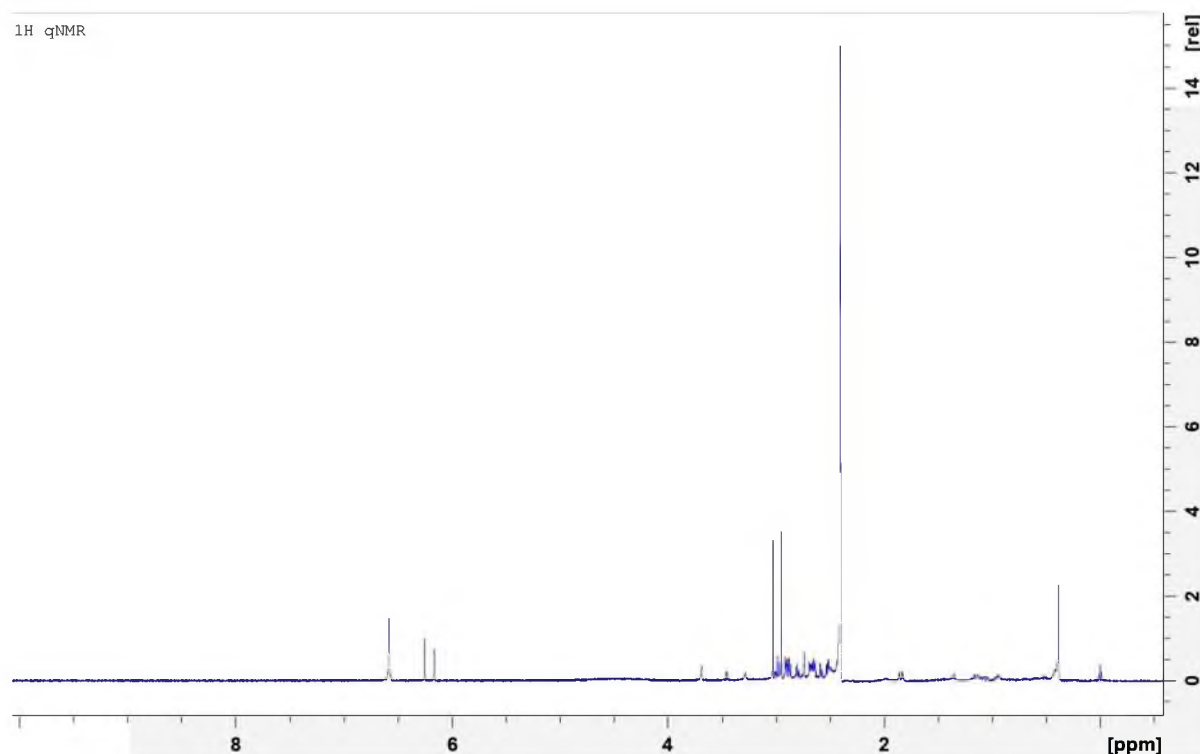
Fonte : O Autor.

FIGURA 9 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) referente a extração do DNP utilizando CDCl_3 .



Fonte: O autor.

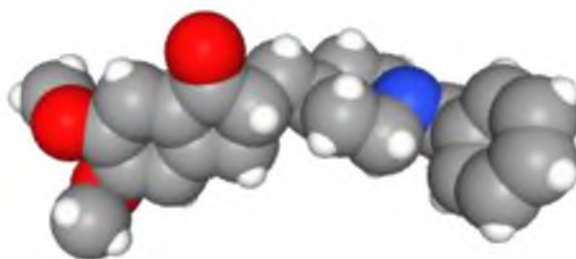
FIGURA 10 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) referente a extração do DNP utilizando MeOD.



Fonte: O autor.

Ao avaliar os resultados obtidos, observa-se que os espectros apresentam sinais na região entre 7-8 ppm e 6-7 ppm das amostras cuja extração foi feita com D_2O e MeOD, respectivamente. Essa região é característica de sinais de ^1H de anel aromático, que está presente na molécula DNP. Além disso, verificou-se a intensidade significativamente reduzida no espectro obtido em CDCl_3 , indicando baixa solubilidade do analito neste solvente. Diante desse resultado, optou-se por excluir o CDCl_3 dos estudos subsequentes, procedendo com as análises comparativas apenas em D_2O e MeOD.

FIGURA 11 – Estrutura 3D (esferas de van der Waals) da donepezila.



Fonte: O autor.

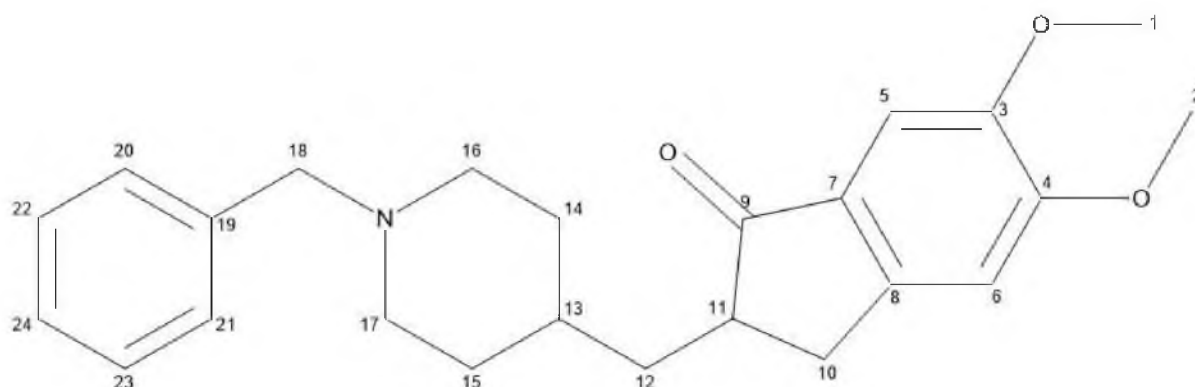
A polaridade pronunciada da molécula, decorrente da presença de três átomos de oxigênio e evidenciada pela distribuição assimétrica de carga na região esquerda (FIGURA 11), impede a liberação do fármaco em solventes estritamente apolares. O clorofórmio, embora apresente momento dipolar moderado ($\mu \approx 3.84 \cdot 10^{-30}$ C.m) disponibilizado pela PUBCHEM (2025), não possui polaridade suficiente para promover a dissolução efetiva do composto. Já a reduzida capacidade de dissolução observada para o composto em metanol em comparação com a água, apesar da polaridade deste solvente, advém justamente do fato de existirem 3 oxigênios disponíveis na molécula para formação de ligações de hidrogênio. Devido a maior capacidade da água em estabilizar espécies polares e carregadas, determinada principalmente pela maior constante dielétrica da água (78,304) disponibilizado pelo NIST (1956) em relação ao metanol (32.70) disponibilizado pela LSU (2020) e por sua habilidade em formar uma rede extensa de ligações de hidrogênio, possibilitada pelos dois átomos de hidrogênio ácidos e dois pares eletrônicos livres do oxigênio em cada molécula.

5.2. ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DE RMN

Para confirmar a presença do DNP no fármaco de estudo, foram realizados experimentos bidimensionais ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC e ^1H - ^1H COSY, tanto em D_2O

quanto em MeOD (neste com a exceção de ^1H - ^1H COSY), a fim de realizar a atribuição inequívoca dos sinais da molécula de interesse. Os espectros obtidos estão apresentados no Anexo I e a atribuição dos sinais está reunida na Tabela 2 e 3.

FIGURA 12 – Composto donepezila com átomos numerados.



Fonte: O autor.

Tabela 2 - Atribuição de sinais para donepezila solubilizada em D_2O referentes aos espectros de RMN ^1H ^{13}C e ^1H - ^{13}C (HMBC).

Numeração	δ (ppm)	Integral	^1H Multiplicidade	J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
1	3,94	-	*	-	58,8
2	3,86	-	*	-	58,4
3	-	-	-	-	158,6
4	-	-	-	-	151,3
5	7,10	1	Simpleto	-	106,8
6	7,07	1,04	Simpleto	-	110,8
7	-	-	-	-	154,6
8	-	-	-	-	130,5
9	-	-	-	-	214,8
10	3,24 e 2,73	1,53 e 1,87	Duplo duplete	3,16; 15,60	35,2
11	2,72	-	Multipleto	-	47,8
12	1,41	1,08	Multipleto	-	39,6
13-14	2,08	0,86	Multipleto	-	31,5
15-16	3,53 e 3,04	-	Simpleto	-	55,3
17	4,32	0,80	Simpleto	-	62,8
18	-	-	-	-	131,6
19-20	7,56	1,52	Multipleto	-	132,8
21-22	7,55	2,2	Multipleto	-	133,2

23 7,53 1,36 Multipleteo - 131,9

*Não é possível ver a multiplicidade devido a sobreposição de sinais.

Fonte: O autor.

Tabela 3 - Atribuição de sinais para donepezila solubilizada em MeOD referentes aos espectros de RMN ^1H ^{13}C e ^1H - ^{13}C (HMBC).

Numeração	^1H				^{13}C
	δ (ppm)	Integral	Multiplicidade	J (Hz)	δ (ppm)
1	3,95	3,17	Simpleto	-	55,3
2	3,87	3,17	Simpleto	-	55,0
3	-	-	-	-	156,7
4	-	-	-	-	156,7
5	7,18	1	Simpleto	-	103,9
6	7,09	0,96	Simpleto	-	107,4
7	-	-	-	-	150,0
8	-	-	-	-	128,6
9	-	-	-	-	208,6
10	-	-	-	-	-
11	2,78	1,58	Duplo Dupleteo	3,7 14,3	44,8
12	1,43	1,23	Tripleteo	9,46	37,5
13-14	-	-	-	-	-
15-16	-	-	-	-	-
17	3,80	-	Simpleto	-	60,8
18-19-20	7,49	4,99	Multipleteo	-	128,9
21-22-23	7,50	4,99	Multipleteo	-	130,6

Fonte: O autor.

5.3. ANÁLISES QUANTITATIVAS

5.3.1 RMN 600 MHz

As análises quantitativas realizadas no equipamento RMN 600 MHz foram obtidas utilizando o método de padrão externo PULCON. Para isso, utilizou-se a dimetil sulfona (DMS) como padrão externo, com pureza certificada de 99,73%. Uma alíquota de 10,00 mg do padrão foi pesada em balança analítica e dissolvida em 0,5718 g de D_2O . Os parâmetros de aquisição do espectro de RMN de ^1H foram: ângulo de pulso de 90° (P90) = 11,33 μs , temperatura de 298 K, número de transientes (NS) = 16, e ganho do receptor (RG) = 2. O sinal

de referência em $\delta = 3,0$ ppm apresentou integral absoluta de 57.170.554,91. Esse valor foi utilizado para o cálculo de concentração das amostras

5.3.1.1 Análises no solvente D₂O

A primeira replicata da análise quantitativa foi realizada com a mesma amostra utilizada para o teste de extração. Assim, de acordo com a equação 4, foram consideradas uma $m_a = 148,6$ mg da drácea macerada, massa do solvente $m_s = 850$ mg, massa molar da donepezila MM = 379,492 g/mol. Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos utilizando os seguintes parâmetros instrumentais: NS = 16, RG = 28,5 e P90 = 12 μ s.

Para a quantificação, selecionaram-se os sinais correspondentes aos deslocamentos químicos $\delta = 7,07$ ppm e $\delta = 7,10$ ppm, cujas integrais absolutas foram 8.789.011,7 e 9.102.315,92, respectivamente. Esses valores foram utilizados para determinar a concentração do analito, conforme a equação 4, obtendo-se o valor de 4,08 mg e 4,24 mg com o valor médio de $4,16 \pm 0,11$, correspondendo a um erro relativo de 8,7% do valor previsto pela bula do medicamento de 4,56 mg.

Outras duas replicatas foram preparadas com as seguintes condições: massa das alíquotas $m_1 = 61,9$ mg e $m_2 = 62,0$ mg e do solvente $m_{s1} = 581,4$ mg e $m_{s2} = 581,1$ mg, a massa molar da donepezila utilizada foi de 379,492 g/mol. Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos utilizando os seguintes parâmetros instrumentais: para a primeira análise NS = 16, RG = 36 e P90 = 12 μ s; para a segunda análise NS = 16, RG = 36 e P90 = 11,93 μ s.

Para a quantificação, nessa replicata também foram selecionados os sinais correspondentes aos deslocamentos químicos $\delta = 6,99$ ppm e $\delta = 7,02$ ppm, cujas integrais absolutas foram 9.712.547,03 e 9.841.460,00, respectivamente. Esses valores foram utilizados para determinar a concentração do analito, conforme a equação 4, obtendo-se o valor correspondente para um comprimido de 5,75 mg e 5,82 mg com o valor médio de $5,79 \pm 0,05$ mg, correspondendo a um erro relativo de 27% em relação ao valor previsto pela bula do medicamento de 4,56 mg.

Na análise da terceira replicata análise foram considerados os sinais correspondentes aos deslocamentos químicos $\delta = 6,99$ ppm e $\delta = 7,03$ ppm, cujas integrais absolutas foram 8.646.308,00 e 8.451.651,5, respectivamente. Esses valores foram utilizados para determinar a concentração do analito, conforme a equação 4, otendo-se o valor corresponde a um

comprimido de 5,09 mg e 4,97 mg com o valor médio de $5,03 \pm 0,08$, correspondendo à um erro relativo de 10% do valor previsto pela bula do medicamento de 4,56 mg.

É notável uma discrepância entre a dosagem declarada pelo fabricante e os valores obtidos em todas as réplicas, advindo do parâmetros experimentais utilizados. Após a exclusão da réplica 2, a média calculada entre as réplicas 1 e 3 foi de $4,60 \pm 0,51$ mg, correspondendo a um erro relativo de 3,5%. Esses resultados indicam que a técnica apresenta eficácia na quantificação da massa do analito no comprimido. No entanto, verifica-se a necessidade de aumentar o número de réplicas e realizar experimentos adicionais sob condições idênticas para validar a robustez do método.

5.3.1.2. Análises no solvente MeOD

A primeira replicata da análise quantitativa foi realizada com a mesma amostra utilizada para o teste de extração. Assim, a alíquota do medicamento foi de $m_a = 15,6$ mg e do solvente MeOD $m_s = 454,2$ mg, a massa molar do donepezila utilizada foi de 379,492 g/mol. Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos utilizando os seguintes parâmetros instrumentais: NS = 16, RG = 203 e P90 = 1 μs .

Para a quantificação, selecionaram-se os sinais correspondentes aos deslocamentos químicos $\delta = 7,08$ ppm e $\delta = 7,17$ ppm, cujas integrais absolutas foram 781030,9 e 782390,22, respectivamente. Esses valores foram utilizados para determinar a concentração do analito, conforme a equação 3. Obtendo-se correspondente a um comprimido os valores de 0,273 mg e 0,274 mg com o valor médio de $0,273 \pm 0,001$ mg, que correspondem respectivamente a um erro relativo de 94% em relação ao valor previsto pela bula do medicamento de 4,56 mg.

Assim, observa-se que a concentração de donepezila do fármaco Donila encontrada está em um valor muito abaixo do esperado. Provavelmente, esse fato se deve a menor solubilidade da donepezila no solvente MeOD, diminuindo a capacidade de extração do analito nesse solvente. Como essa discrepância é muito maior do que os valores encontrados nos ensaios com D_2O , percebe-se uma clara vantagem em utilizar esta como solvente.

5.3.2 RMN 60 MHz

As análises quantitativas por RMN de ^1H realizadas no equipamento de RMN de bancada 60 MHz foram realizadas utilizando o método de padrão interno. Como os resultados anteriores mostram que o solvente D_2O apresenta os melhores resultados de extração, esse estudo foi realizado apenas para esse solvente. Assim, para a realização dessas análises,

utilizou-se ácido maleico como padrão interno, com pureza certificada de 99,76%. As alíquotas do padrão interno foram respectivamente $m_{p1} = 12,1$ mg $m_{p2} = 10,4$ mg

As alíquotas do medicamento foram de $m_{a1} = 141,5$ mg e do solvente deuterado $m_{s1} = 839,8$ mg e $m_{a2} = 102,0$ mg $m_{s2} = 901,1$ mg, a massa molar da donepezila utilizada foi de 379,492 g/mol. Os espectros se encontram no Anexo I.

Utilizando o método de aquisição FID-H, os valores obtidos foram 6,89 mg (réplica 1) e 4,93 mg (réplica 2). Já com o método FID-H com supressão de água, os resultados foram 6,12 mg (réplica 1) e 4,93 mg (réplica 2). A média calculada foi de $6,16 \pm 0,90$ mg, correspondendo a um erro relativo de 35% em relação ao valor de referência.

O elevado erro observado em relação ao valor de referência pode ser atribuído a variações na altura da solução no tubo de RMN durante as análises.

O espectrômetro de RMN de 60 MHz apresenta vantagens operacionais em comparação com sistemas de 600 MHz, como a ausência de necessidade de um magneto supercondutor de alto campo, eliminando assim o uso de hélio líquido para refrigeração. Essa característica alinha-se com os princípios da química verde, sugerindo que otimizações metodológicas poderiam tornar a técnica ainda mais sustentável. Adicionalmente, por ser um equipamento de bancada compacto, sua portabilidade permite a realização de análises em locais remotos, ampliando suas aplicações em condições de campo.

6. CONCLUSÃO

Tanto o MeOD quanto a D₂O demonstraram eficácia na liberação do princípio ativo donepezila do medicamento Donila, mas, para fins quantitativos somente a D₂O possuía solubilidade suficiente para dissolver todo o analito.

Os resultados em D₂O utilizando o RMN de 600 MHz demonstraram maior reprodutibilidade com erro médio absoluto de 3,5% após a exclusão do outlier (réplica 2). A média $4,60 \pm 0,51$ mg está em concordância com o valor declarado pelo fabricante (4,56 mg) validando a metodologia, apesar dos erros, demonstrando a robustez do método. Para consolidar a técnica seria necessário um aumento do número de réplicas e padronização rigorosa no processo de preparação da amostra.

O RMN de 60 MHz apresentou um erro muito alto, apesar disso, visando os princípios da química verde ao não necessitar da utilização do hélio líquido e de tanta potência para o resfriamento do magneto, seria interessante continuar o estudo com este necessitando de ajustes maiores tanto nos parâmetros experimentais no equipamento como na preparação de amostra.

7. REFERÊNCIAS

AKOKA, S.; BARANTIN, L.; TRIERWEILER, M. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Analytical Chemistry*, v. 71, n. 13, p. 2554-2557, 1999.

ALONSO, D. et al. Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. *Bioorg Med Chem*, v. 13, p. 6588–97, 2005.

ANVISA. GUIA PARA BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO DE MEDICAMENTOS PARTE I. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/regulamentacao/participacao-social-antigo/dialogos-setoriais/arquivos/dialogo-setorial-sobre-boas-praticas-de-fabricacao-de-medicamentos-e-adocao-de-guias-pics-26-03-2019/guia-para-boas-praticas-de-medicamentos.pdf>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2025.

BELWAL, C. et al. Isolation, identification, and characterization of an unknown impurity in lovastatin EP. *Scientia Pharmaceutica*, v. 82, p. 43–52, 2013.

BENCHEKROUN, M. et al. Donepezil-ferulic acid hybrids as anti-Alzheimer drugs. *Future Med Chem*, v. 7, p. 15–21, 2015.

BENCHEKROUN, M. et al. Donepezil–ferulic acid hybrids as anti-Alzheimer drugs. *Future Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 1, p. 15–21, jan. 2015.

BENEDITO, L. E. Caracterização de Amostras de Cocaína por Ressonância Magnética Nuclear de 1 H. Disponível em: <http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/34172/1/2018_LuizEduardoCelinoBenedito.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2025.

BHARTI, S. K. et al. Improved quantification from H-1-NMR spectra using reduced repetition times. *Metabolomics*, v. 4, n. 4, p. 367-376, 2008.

BIRKS, J. S.; HARVEY, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2, n. 6, 18 jun. 2018.

BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, v. 25, n. 24, p. 5789, 8 dez. 2020.

BURTON, I. W.; QUILLIAM, M. A.; WALTER, J. A. Quantitative H-1 NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Analytical Chemistry*, v. 77, n. 10, p. 3123-3131, 2005.

CAVALLI, A. et al. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J Med Chem*, v. 51, p. 347-72, 2008.

CÍÇEK, S. S.; ESPOSITO, T.; GIRRESER, U. Prediction of the Sweetening Effect of *Siraitia Grosvenorii* (Luo Han Guo) Fruits by Two-Dimensional Quantitative NMR. *Food Chemistry*, v. 335, p. 127622, 2021.

CROCOLI, L. C.; ORTIZ, R. S.; MOURA, S. Development and Validation of a qNMR Method for Analyses of Legal and Illegal Formulations of Glyphosate. *Analytical Methods*, v. 11, p. 4052-4059, 2019.

DENWET. File:(RS)-Donepezil Structural Formula V1.svg - Wikimedia Commons. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:\(RS\)-Donepezil_Structural_Formula_V1.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:(RS)-Donepezil_Structural_Formula_V1.svg)>. Acesso em: 6 fev. 2025.

DOODY, R. S. et al. Reviewing the role of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, v. 9, p. 773–81, 2012.

ELETI, C. R. et al. New synthesis of donepezil through palladium-catalyzed hydrogenation approach. *Synth Commun*, v. 36, p. 169–74, 2006.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. European Pharmacopoeia, 8. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2014.

File:Memantine structure.svg - Wikimedia Commons. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Memantine_structure.svg>. Acesso em: 17 jul. 2025.

FRANCO, P. H. C.; BRAGA, S. F. P.; DE OLIVEIRA, R. B.; CÉSAR, I. C. Purity Determination of a New Antifungal Drug Candidate Using Quantitative ¹H NMR Spectroscopy: Method Validation and Comparison of Calibration Approaches. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 58, p. 97–105, 2020.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 48, p. 247–253, 2008.

GÖRÖG, S. Identification and determination of impurities in drugs. *Chemical Works of Gedeon Richter*, Amsterdam: Elsevier, 2000.

GÖRÖG, S. The paradigm shifting role of chromatographic methods in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 69, p. 2–8, 2012.

- GRIFFITHS, L.; IRVING, A. M.** Assay by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Quantification Limits. *Analyst*, v. 123, p. 1061–1068, 1998.
- HAMPEL, H. et al.** The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain J Neurol*, v. 141, p. 1917–33, 2018.
- HATZAKIS, E.** Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 18, p. 189–220, 2019.
- HAYS, P. A.** Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) methods for determining the purity of reference drug standards and illicit forensic drug seizures. *Journal of Forensic Sciences*, v. 50, n. 6, p. 1342-1360, 2005.
- HOLZGRABE, U.** Quantitative NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 57, p. 229–240, 2010.
- HOLZGRABE, U.; MALET-MARTINO, M.** Analytical Challenges in Drug Counterfeiting and Falsification—The NMR Approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, p. 679–687, 2011. D
- HUSSAIN, J. H.; GILBERT, N.; COSTELLO, A.; SCHOFIELD, C. J.; KEMSLEY, E. K.; SUTCLIFFE, O. B.; MEWIS, R. E.** Quantification of MDMA in Seized Tablets Using Benchtop ¹H NMR Spectroscopy in the Absence of Internal Standards. *Forensic Chemistry*, v. 20, p. 100263, 2020.
- KEIZERS, P.H.J.; BAKKER, F.; FERREIRA, J.; WACKERS, P.F.K.; KOLLENBURG, D.; AA, E.; BEERS, A.** Benchtop NMR spectroscopy in the analysis of substandard and falsified medicines as well as illegal drugs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 178, p. 112939, 2020.

KELMAN, D.; WRIGHT, A. D. The Importance of H-1-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Reference Standard Validation in Analytical Sciences. *Plos One*, v. 7, n. 7, 2012.

KEMPRAI, P.; MAHANTA, B. P.; BORA, P. K.; DAS, D. J.; BORUAH, J. L. H.; SAIKIA, S. P.; HALDAR, S. A ¹H NMR Spectroscopic Method for the Quantification of Propenylbenzenes in the Essential Oils: Evaluation of Key Odorants, Antioxidants and Post-Harvest Drying Techniques for *Piper betle* L. *Food Chemistry*, v. 331, p. 127278, 2020.

KIM, J. et al. Determination of the Geographical Origin of Kimchi by H-1 NMR-Based Metabolite Profiling. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 76, n. 9, p. 1752-1757, 2012.

KIZEWSKI, F. et al. Spectroscopic Approaches for Phosphorus Speciation in Soils and Other Environmental Systems. *Journal of Environmental Quality*, v. 40, n. 3, p. 751-766, 2011.

LOUSIANA STATE UNIVERSITY. Dielectric Constant. Disponível em: <<https://macro.lsu.edu/HowTo/solvents/Dielectric%20Constant%20.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2025.

LU, P. H. et al. Donepezil delays progression to AD in MCI subjects with depressive symptoms. *Neurology*, v. 72, n. 24, p. 2115–2121, 15 jun. 2009.

MALMBERG, C. G.; MARYOTT, A. A. Dielectric constant of water from 0 to 100 C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, v. 56, n. 1, p. 1, jan. 1956.

MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; VIEL, S. Liquid state H-1 high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 66, p. 1-39, 2012.

MALZ, F.; JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p. 813, 2005.

MELVIN, A. DONEPEZIL SYNTHESIS. Disponível em:
<<https://newdrugapprovals.org/2013/08/02/donepezil-synthesis/>>. Acesso em: 2 fev. 2025.

MICHALEAS, S.; ANTONIADOU-VYZA, E. A New Approach to Quantitative NMR: Fluoroquinolones Analysis by Evaluating the Chemical Shift Displacements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 42, p. 405–410, 2006. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.04.016.

NAN, D. et al. 6-Methoxy-indanone derivatives as potential probes for β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, v. 124, p. 117–28, 2016.

NAPOLITANO, J. G. et al. Orthogonal analytical methods for botanical standardization: Determination of green tea catechins by qNMR and LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 93, p. 59-67, 2014.

NARAYANAM, M. et al. Characterization of stress degradation products of benazepril by using sophisticated hyphenated techniques. *Journal of Chromatography A*, v. 1271, p. 124–136, 2013.

NERANTZAKI, A. A. et al. Novel determination of the total phenolic content in crude plant extracts by the use of H-1 NMR of the -OH spectral region. *Analytica Chimica Acta*, v. 688, n. 1, p. 54-60, 2011.

NHS. Causes - Alzheimer's Disease. Disponível em:
<<https://www.nhs.uk/conditions/alzheimers-disease/causes/>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2025.

PATEL, S. et al. Insights on synthetic strategies and structure-activity relationship of donepezil and its derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, v. 33, p. 370–405, 2024.

PEEZ, N.; JANISKA, M. C.; IMHOF, W. The First Application of Quantitative ^1H NMR Spectroscopy as a Simple and Fast Method of Identification and Quantification of Microplastic Particles (PE, PET, and PS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 411, p. 823–833, 2019. DOI: 10.1007/s00216-018-1510-z.

PHARMACOPOEIA, U. S. United States Pharmacopoeia Heparin Sodium Stage 3 Monograph. *US Pharmacopoeia*, Rockville, 2012.

RAO, R. J. et al. Efficient and industrially viable synthesis of donepezil. *Synth Commun*, v. 37, p. 2847–53, 2007.

RAWAT, A. S. et al. Synthesis of donepezil hydrochloride via chemoselective hydrogenation. *Org Process Res Dev*, v. 17, p. 16–17, 2013.

SANTOS, M. DA S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de ^1H para análises de formulações farmacêuticas. *Química Nova*, v. 36, n. 2, p. 324–330, 2013.

SCHAFFERT, J. et al. Predictors of Life Expectancy in Autopsy-Confirmed Alzheimer's Disease 1. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 86, n. 1, p. 271–281, 1 jan. 2022.

SERRANO, J. N. P. et al. Quantitative NMR as a tool for analysis of new psychoactive substances. *Forensic Chemistry*, v. 21, p. 100282, dez. 2020.

SIMPSON, A. J.; MCNALLY, D. J.; SIMPSON, M. J. NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 58, n. 3-4, p. 97-175, 2011.

SIMS, J. R. et al. Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA*, v. 330, n. 6, 17 jul. 2023.

SINGH, S.; ROY, R. The Application of Absolute Quantitative ^1H NMR Spectroscopy in Drug Discovery and Development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 11, p. 695–706, 2016. DOI: 10.1080/17460441.2016.1189899.

SUGIMOTO, H. et al. Novel piperidine derivatives. Synthesis and anti-acetylcholinesterase activity of 1-benzyl-4-2[2-(N-benzoylamino)ethyl]piperidine derivatives. *J Med Chem*, v. 33, p. 1880–7, 1990.

SUGIMOTO, H. et al. Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-(2-phthalimidoethyl)piperidine and related derivatives. *J Med Chem*, v. 35, p. 4542–8, 1992.

THE JAPANESE PHARMACOPEIA. *The Japanese Pharmacopoeia*, 16. ed. Tokyo: Ministry of Health, Labor and Welfare, 2011.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. *The United States Pharmacopeia*, 37. ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2014.

WANG, Y. et al. AChE inhibition-based multi-target-directed ligands, a novel pharmacological approach for the symptomatic and disease-modifying therapy of Alzheimer's disease. *Curr Neuropsychopharmacol*, v. 14, p. 364–375, 2016.

WEBSTER, G. K.; KUMAR, S. Expanding the Analytical Toolbox: Pharmaceutical Application of Quantitative NMR. *Analytical Chemistry*, v. 86, p. 11474–11480, 2014. DOI: 10.1021/ac502871w.

WELLER, J.; BUDSON, A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*, v. 7, n. 1, p. 1161, 31 jul. 2018.

WIDER, G.; DREIER, L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 8, p. 2571-2576, 2006.

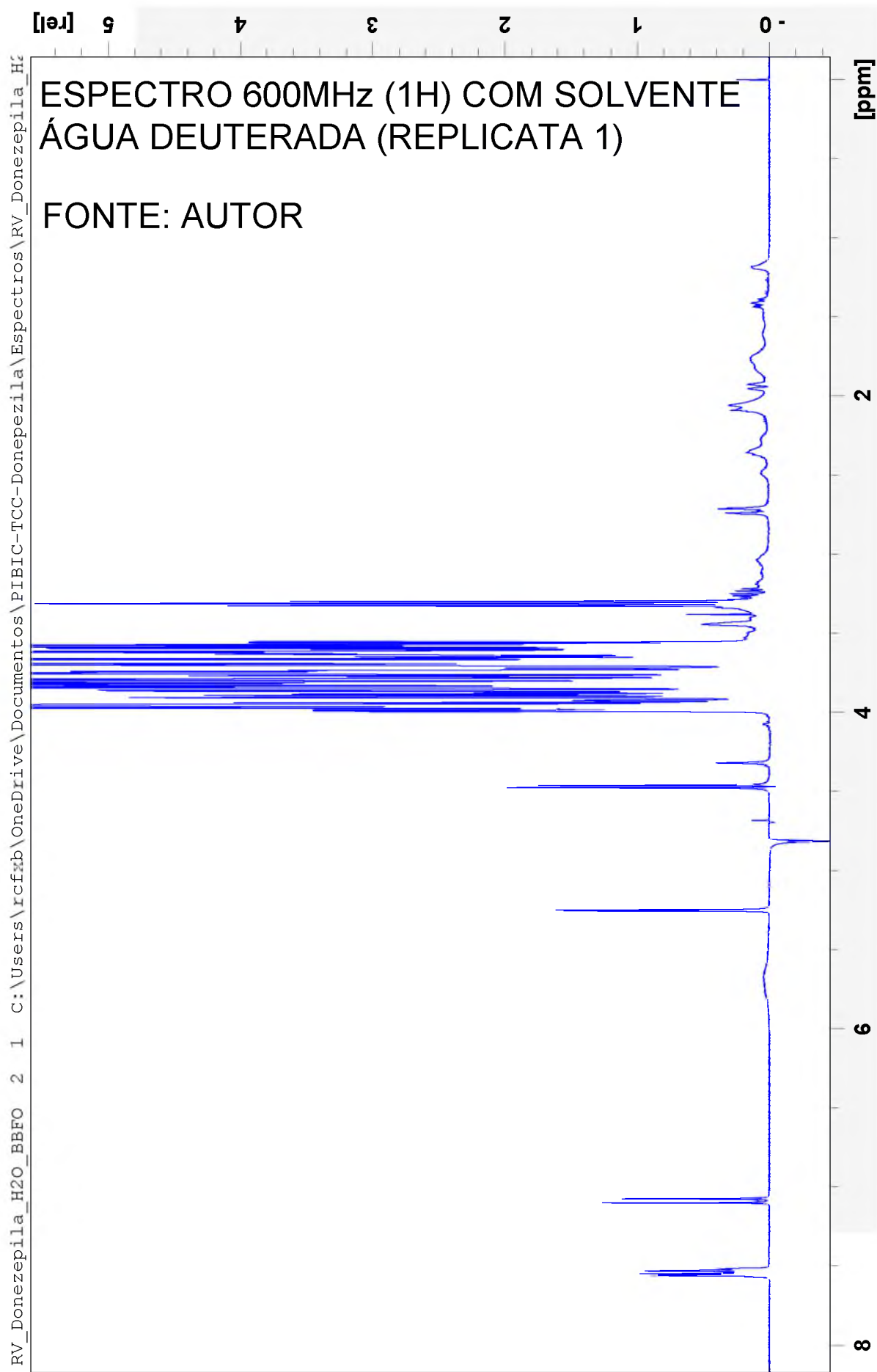
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dementia. Disponível em:
<<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 19 jan. 2025.

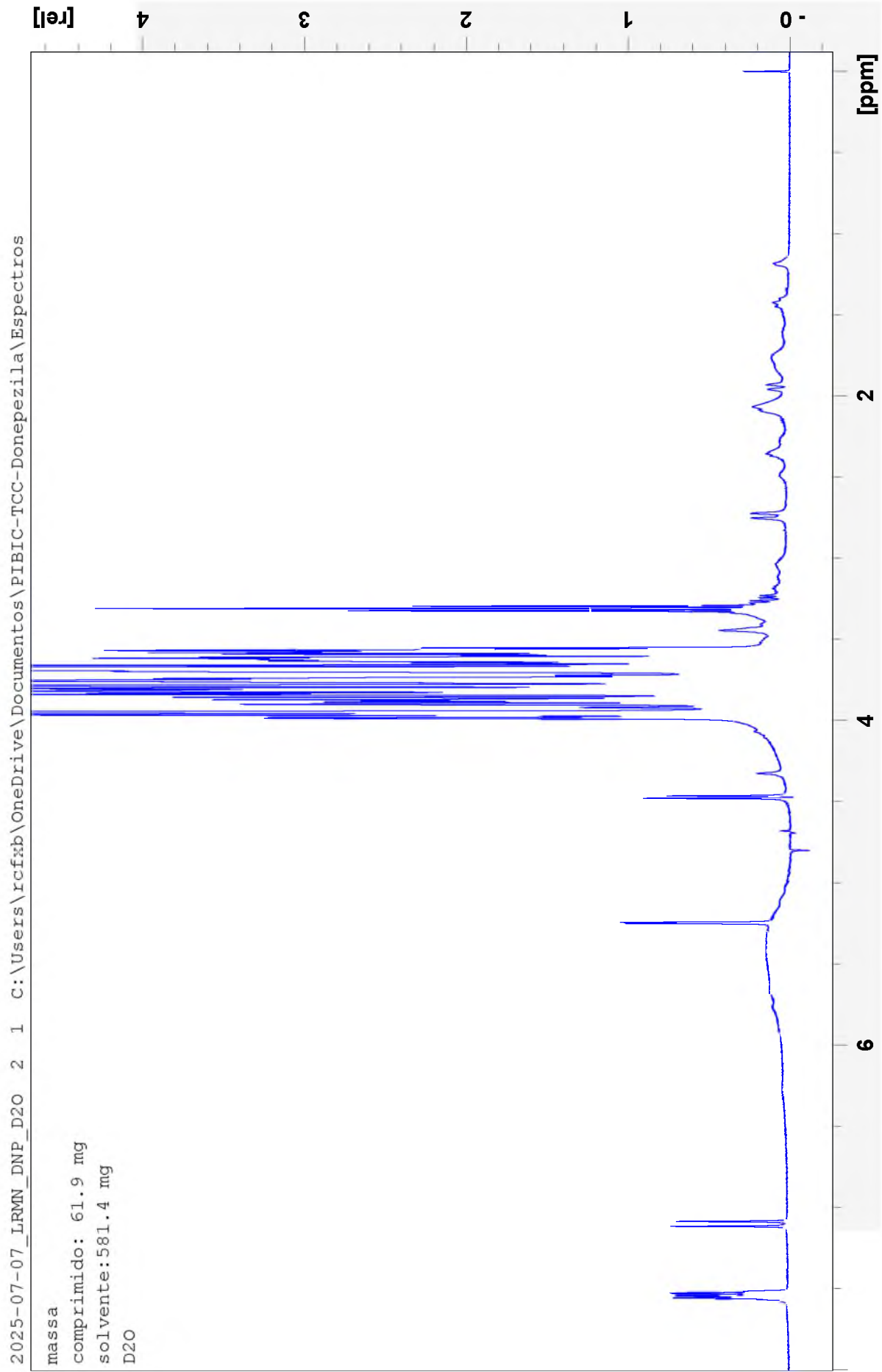
YERDELEN, K. et al. Synthesis of donepezil-based multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 25, p. 5576–82, 2015.

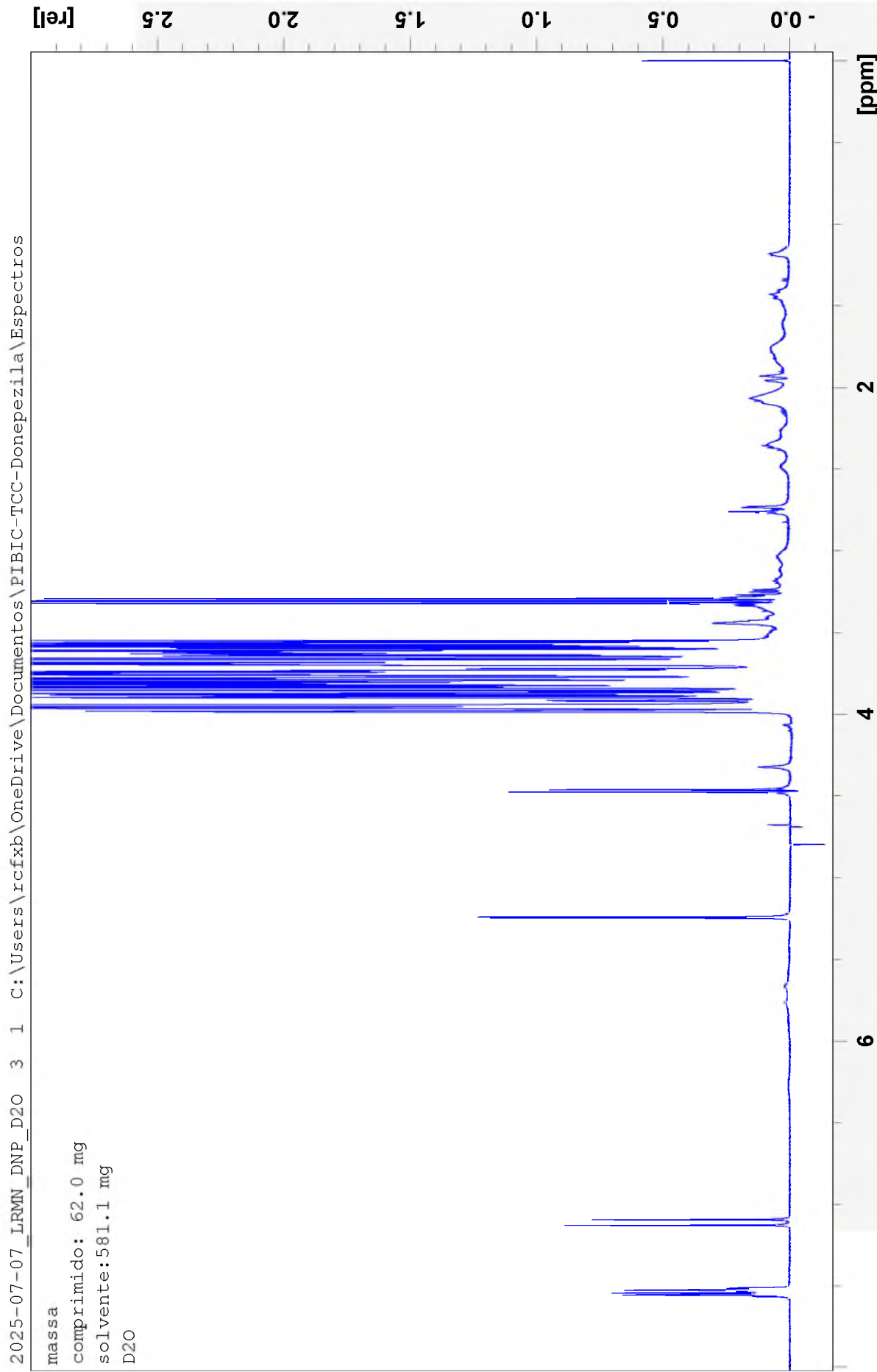
ZHANG, C. et al. Detecting Submicromolar Analytes in Mixtures with a 5 min Acquisition on 600 MHz NMR Spectrometers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 145, n. 47, p. 25513–25517, 13 nov. 2023.

ZHENG, G.; PRICE, W. S. Solvent Signal Suppression in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 56, p. 267–288, 2010. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2010.01.001.

Anexo I

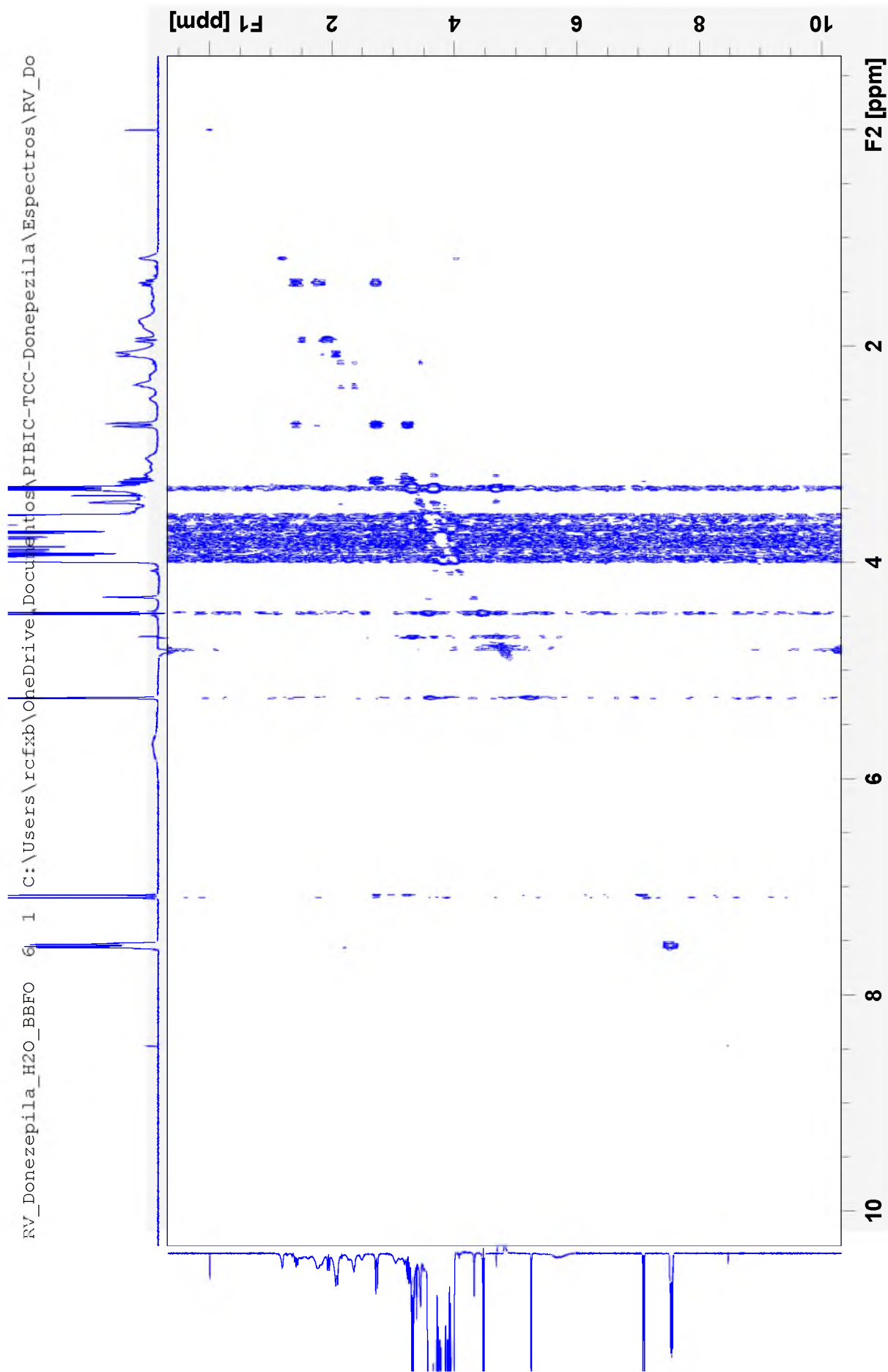






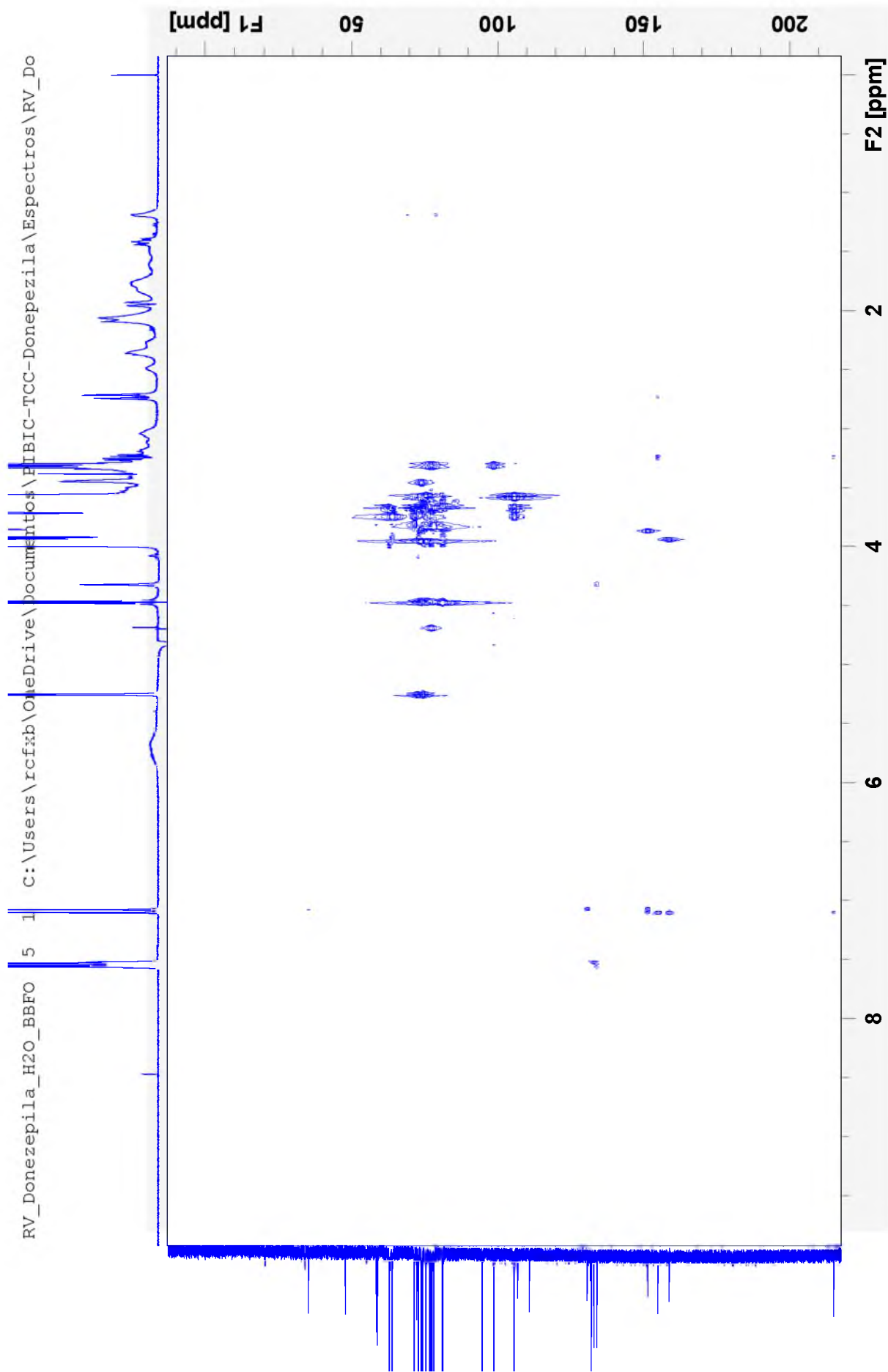
ESPECTRO 600MHz (COSY) COM SOLVENTE ÁGUA DEUTERADA
(REPLICATA 1)

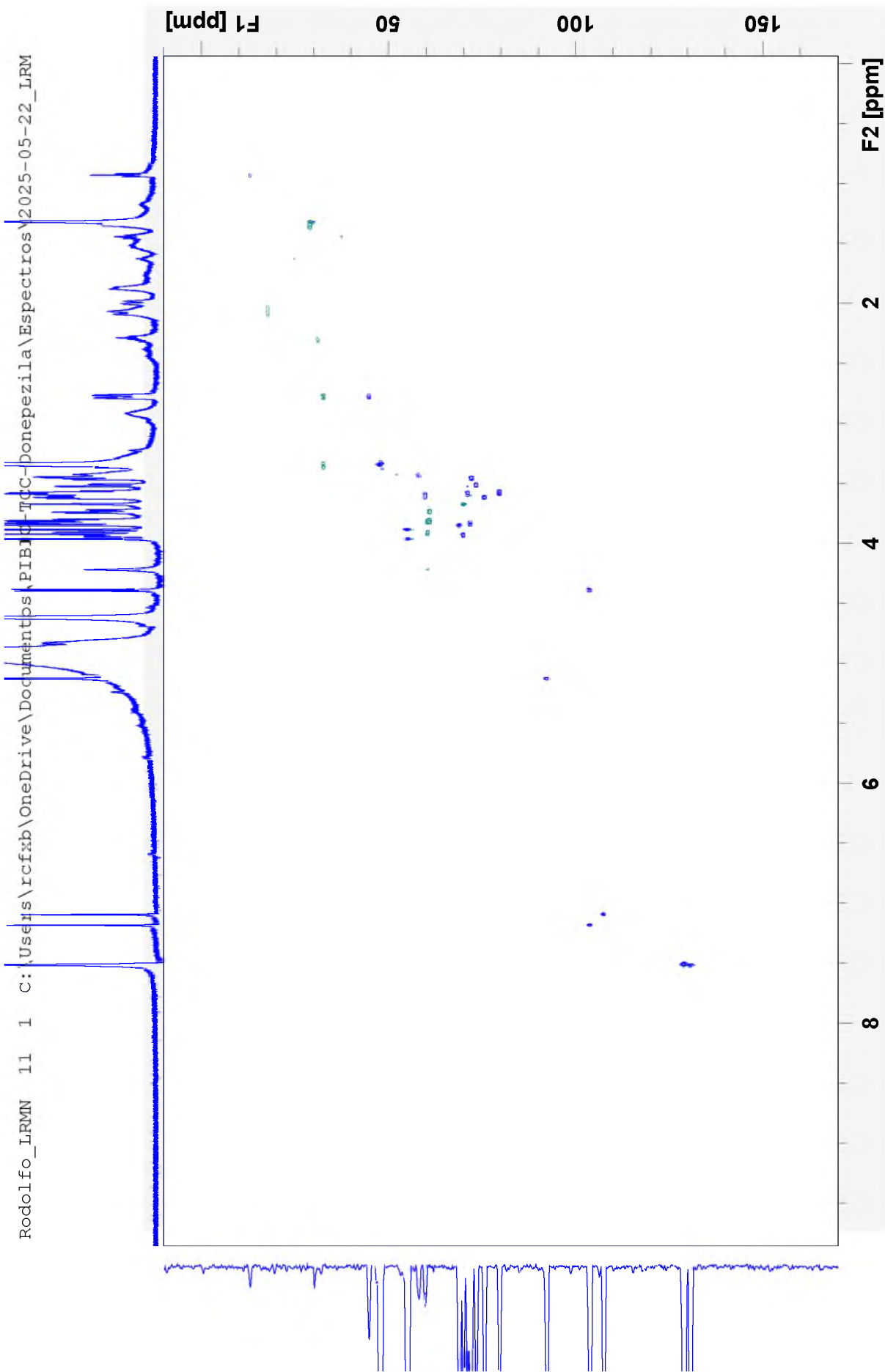
FONTE: AUTOR

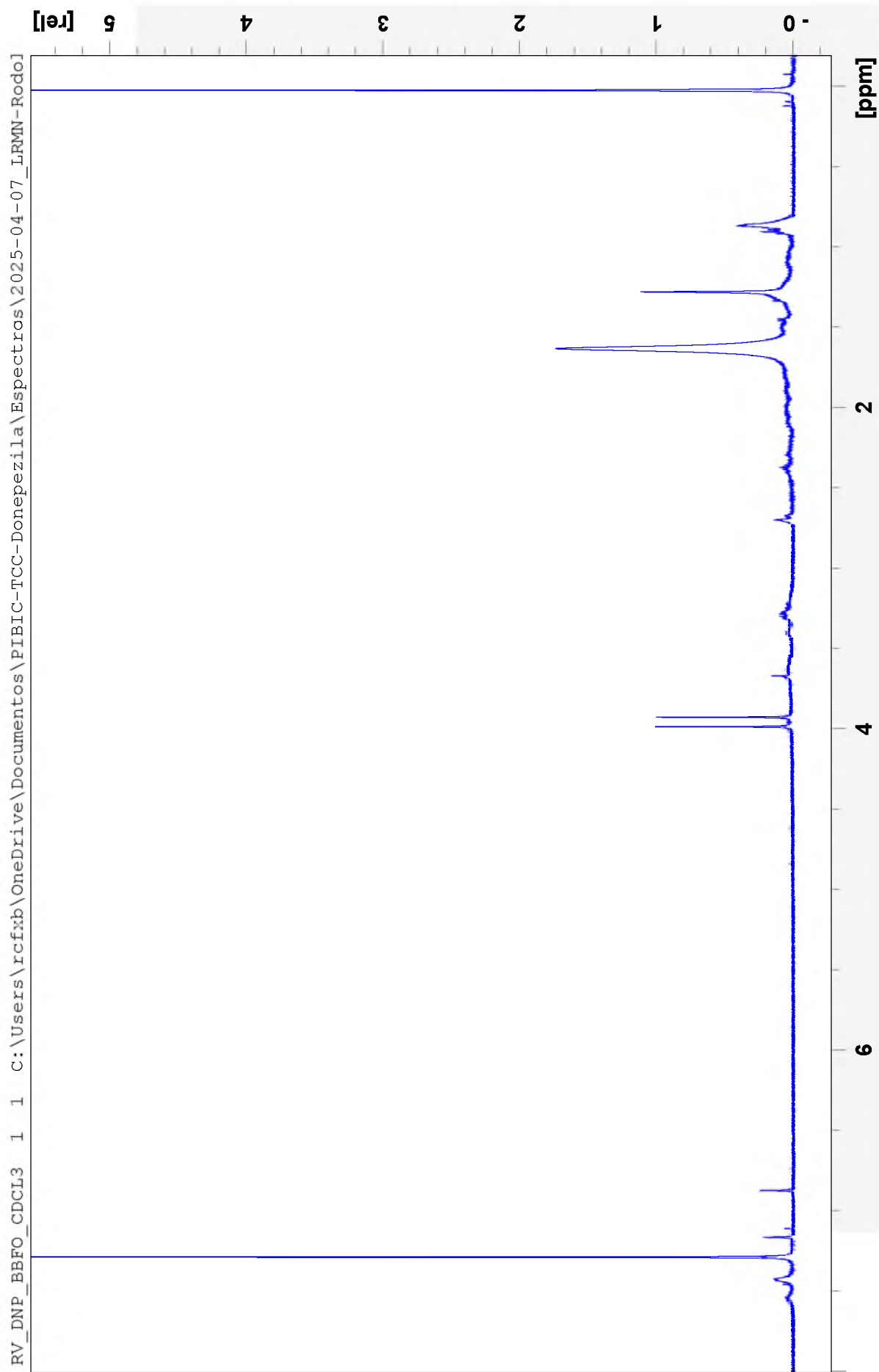


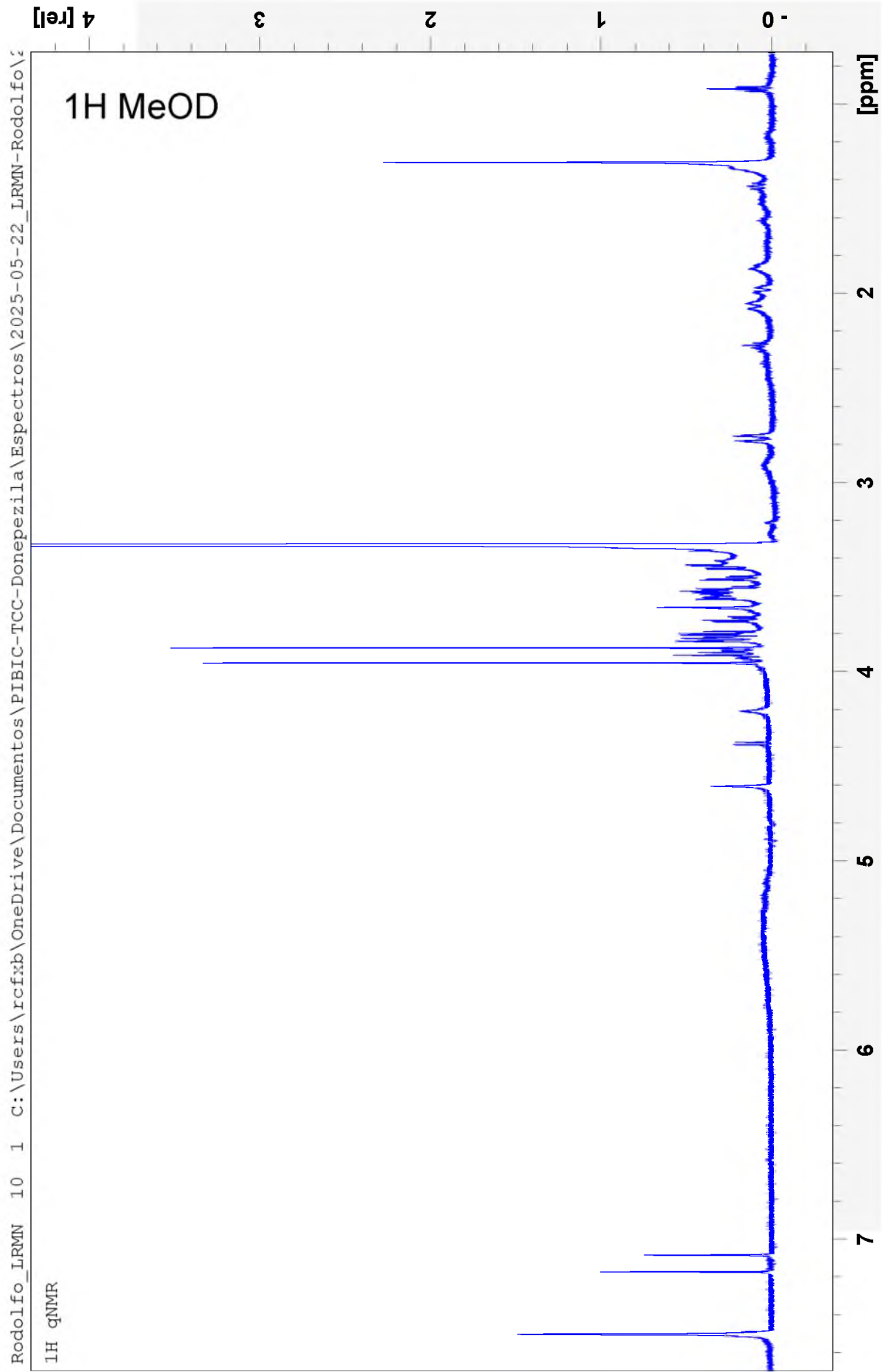
ESPECTRO 600 MHz (HMBC) COM SOLVENTE ÁGUA DEUTERADA
(REPLICATA 1)

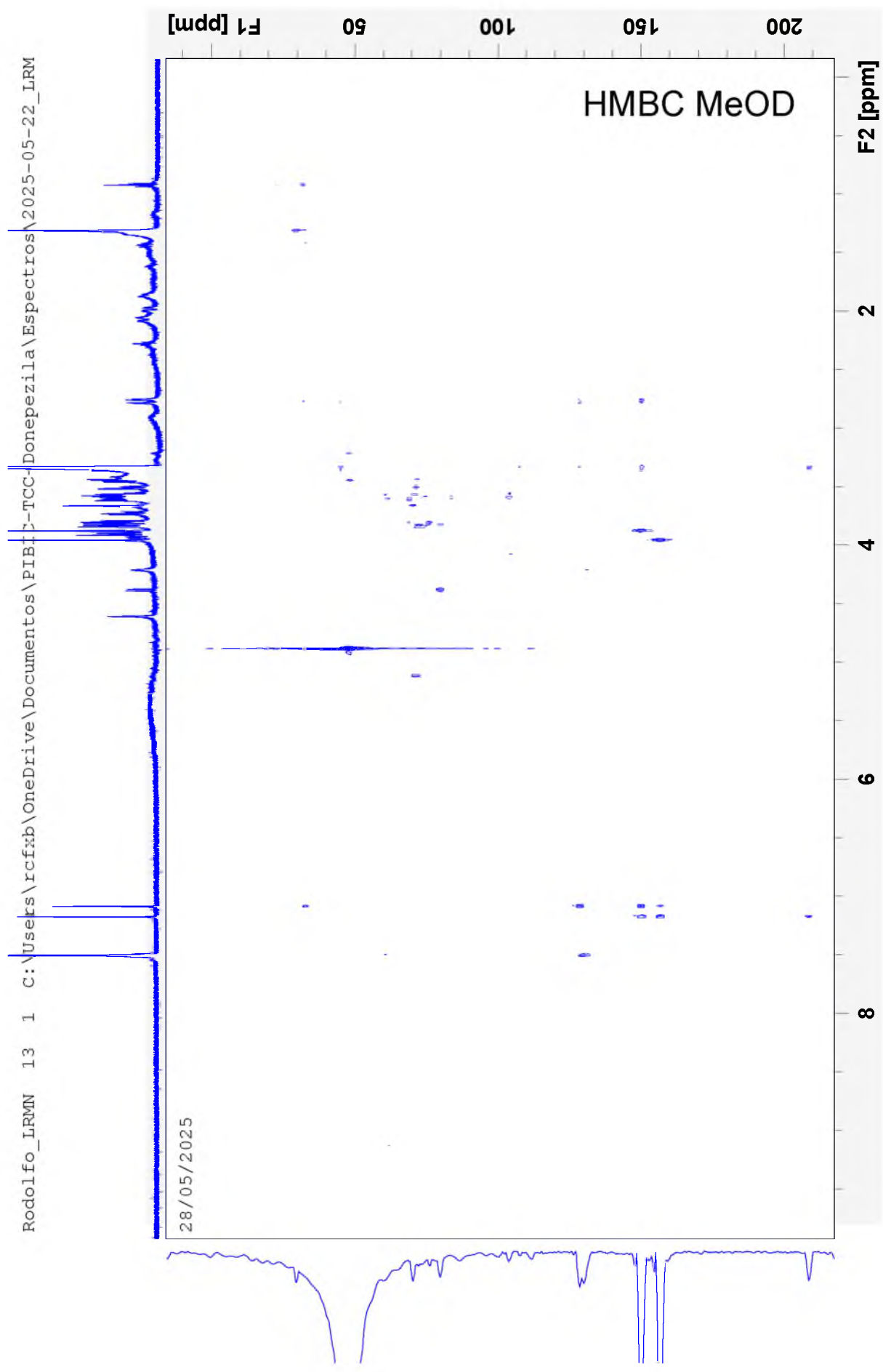
FONTE: AUTOR

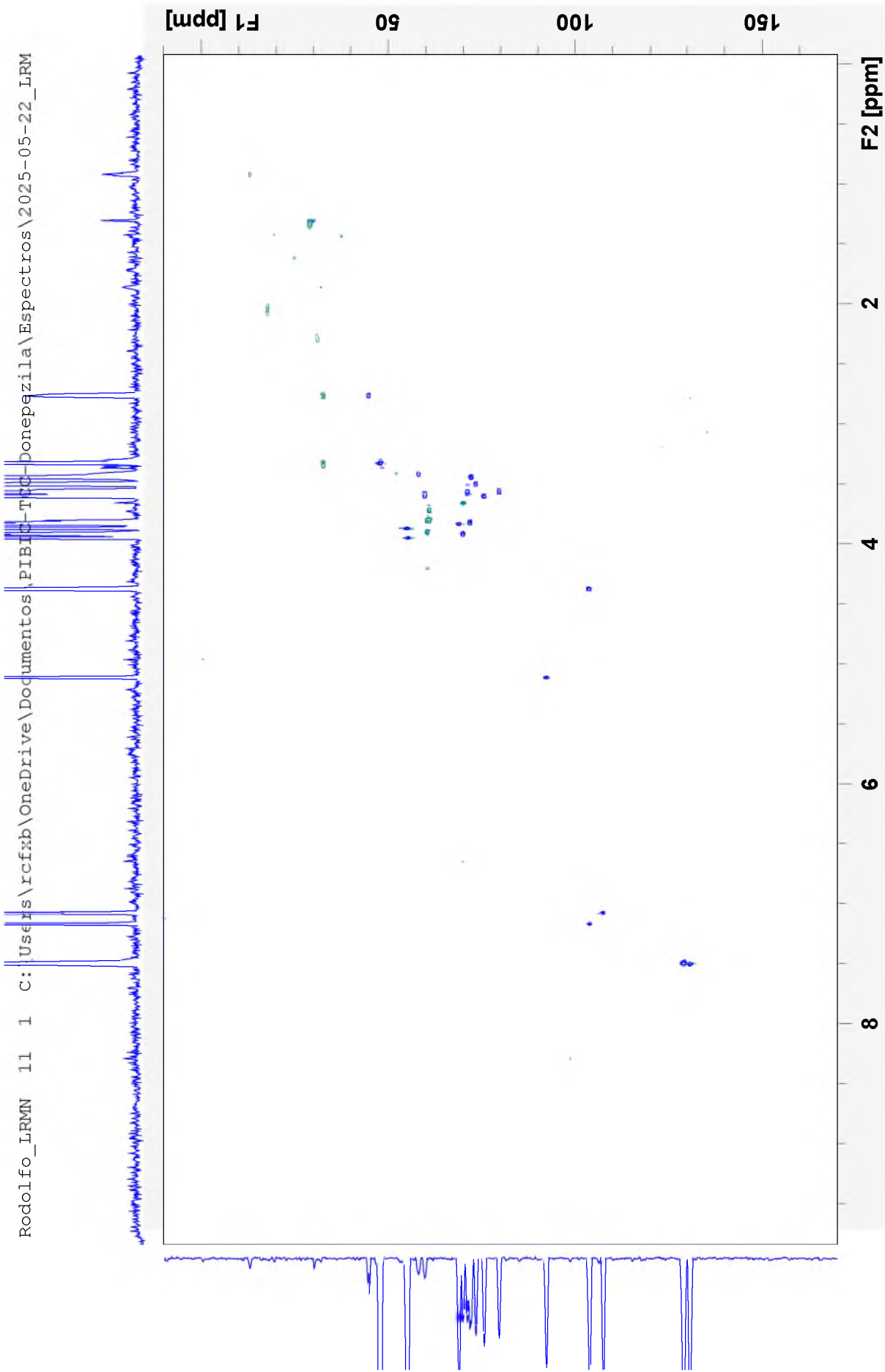








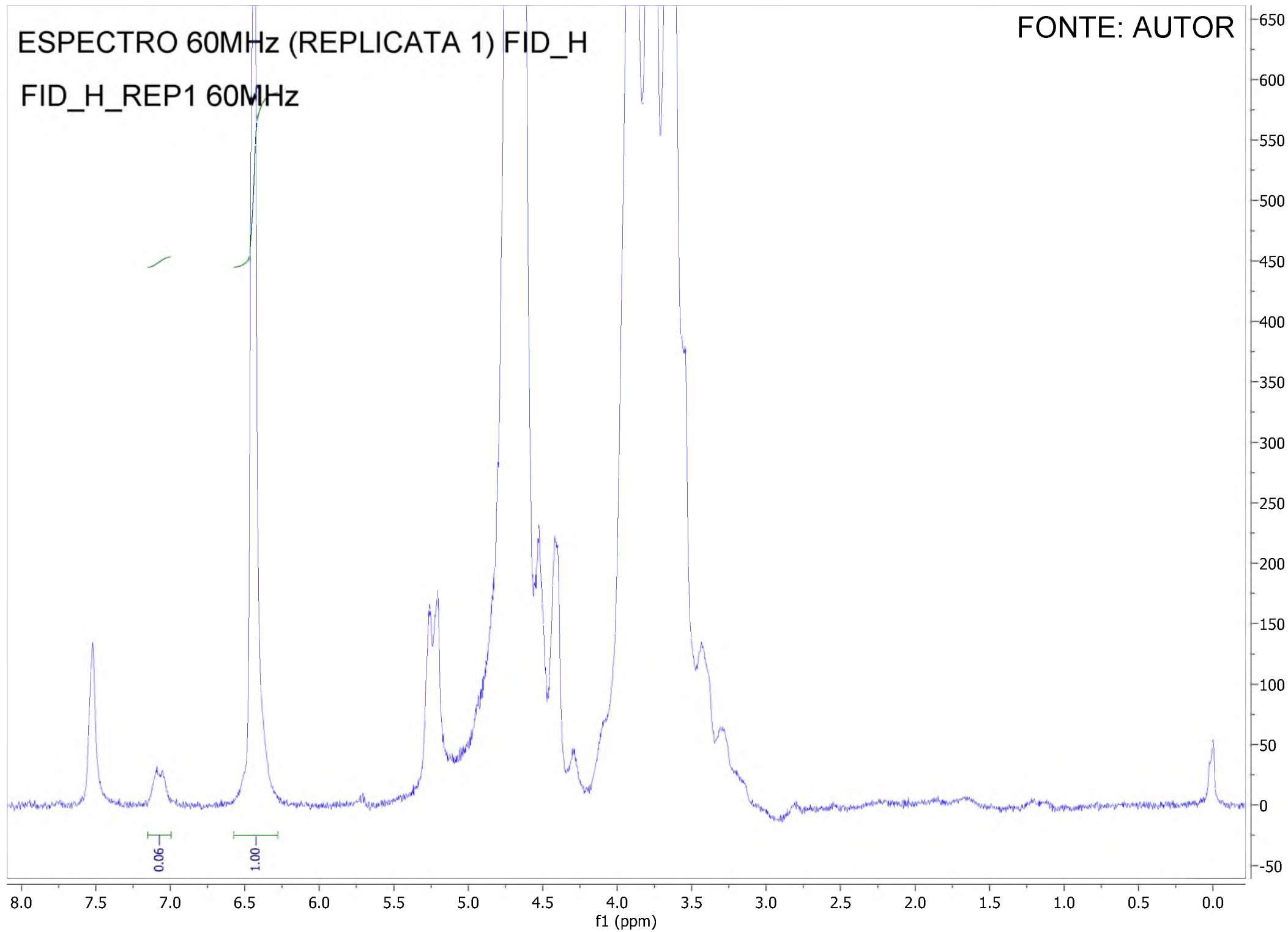




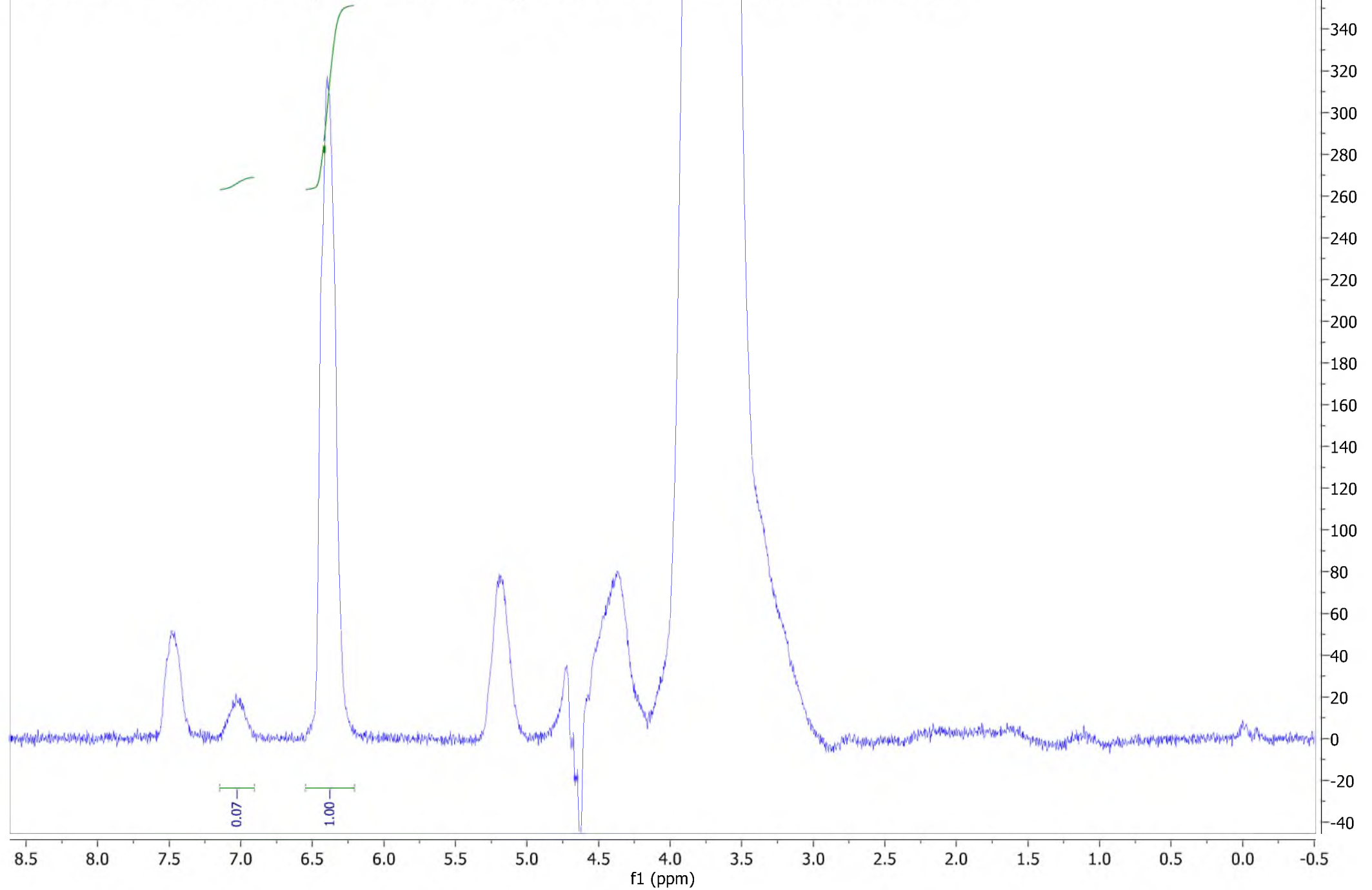
ESPECTRO 60MHz (REPLICATA 1) FID_H

FONTTE: AUTOR

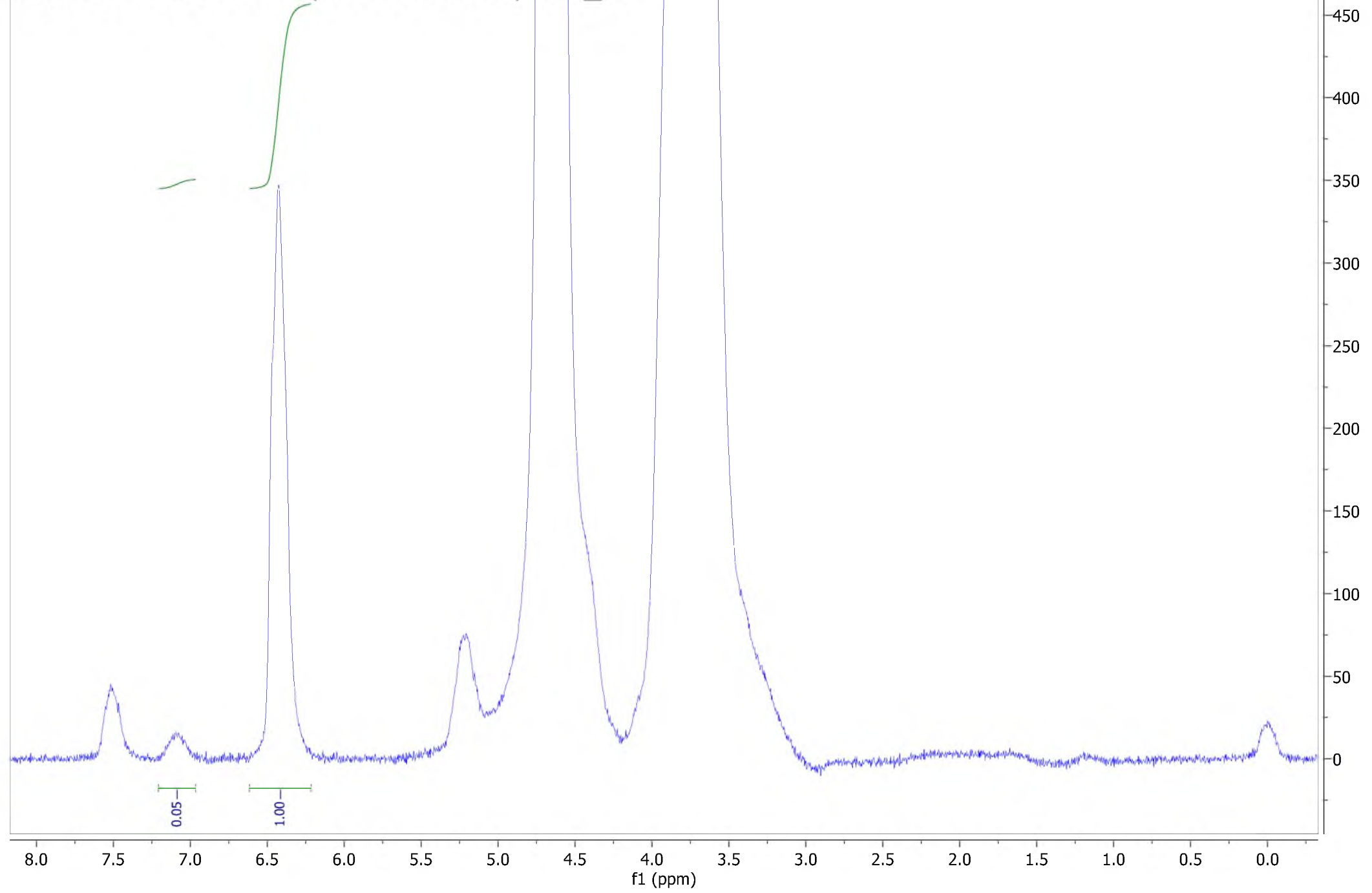
FID_H_REP1 60MHz



ESPECTRO 60MHz (REPLICATA 1) COM SUPRESSÃO DE ÁGUA



ESPECTRO 60MHz (REPLICATA 2) FID_H



ESPECTRO 60MHz (REPLICATA 2) COM SUPRESSÃO DE ÁGUA

