LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA – LQOS
COORDENADOR: PROF. LUIZ CARLOS DIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA - UNICAMP
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

PESQUISA EM FOSFOETANOLAMINA

PARTE A

CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) PARA O MCTI

ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR de ^{1}H, ^{13}C e ^{31}P

RELATÓRIO TÉCNICO-CIENTÍFICO

Prof. Dr. Luiz Carlos Dias – IQ-UNICAMP
Coordenador do *Laboratório de Química Orgânica Sintética* – LQOS

Dr. Marco Aurélio Dessoy – Pós-Doutorando – LQOS – IQ-UNICAMP

Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro – LASSBio-UFRJ
Coordenador do *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos* – INCT-INOFAR

Este relatório descreve o trabalho realizado no Laboratório de Química Orgânica Sintética (LQOS) no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Dias, em colaboração com o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, coordenado pelo Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro. O LQOS no IQ-UNICAMP e o LASSBio na UFRJ são laboratórios vinculados ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-INOFAR, http://www.inct-inofar.ccs.ufrj.br/).

LABORATÓRIO DE AVALIAÇÃO E SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS – LASSBio
COORDENADOR: PROF. ELIEZER J. BARREIRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Cx. Postal 68006 – Rio de Janeiro – 21941-910, RJ - BRASIL
http://www.lassbio.icb.ufrj.br

LABORATÓRIO DE AVALIAÇÃO E SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS – LASSBio
COORDENADOR: PROF. ELIEZER J. BARREIRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Cx. Postal 68006 – Rio de Janeiro – 21941-910, RJ - BRASIL
http://www.lassbio.icb.ufrj.br

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Conteúdo – Parte A	**Página**
ANÁLISE DE RMN DA FRAÇÃO SOLÚVEL DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) (FOSFOETANOLAMINA FORNECIDA PELO IQSC-USP E ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA CIEnP)	2
CONCLUSÃO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O: ANÁLISE DE RMN DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O DA CÁPSULA DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) - (FOSFOETANOLAMINA FORNECIDA PELO IQSC-USP E ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA CIEnP)	14
ANÁLISE DE RMN DA FRAÇÃO SOLÚVEL DA CÁPSULA DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio	16
1ª FASE: RECEBIMENTO E PESAGEM DAS AMOSTRAS DE FOSFOETANOLAMINA ENVIADAS PELO MCTI AO *LABORATÓRIO DE AVALIAÇÃO E SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS* (LASSBio), *DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ*	16
2ª FASE: ANÁLISE DO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) ENCAMINHADAS PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio	16
EXPERIMENTO DE ADIÇÃO DE MONOETANOLAMINA (MEA), À FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O: CONFIRMAÇÃO DE SUA PRESENÇA NA AMOSTRA	20
CONCLUSÕES DA ANÁLISE DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O: ANÁLISE DE RMN DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O DA CÁPSULA DE FOSFOETANOLAMINA (FOSFOETANOLAMINA FORNECIDA PELO IQSC-USP E ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio)	23
3ª FASE: ANÁLISE DE RMN-^{31}P DO CONTEÚDO INTEGRAL DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA FORNECIDAS PELO IQSC-USP E ENCAMINHADAS PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio	25
ANÁLISE GRAVIMÉTRICA	25
ANÁLISE DA FRAÇÃO INSOLÚVEL EM H_2O APÓS DISSOLUÇÃO EM HCl DILUÍDO	27
ANÁLISE DO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS NA ÍNTEGRA APÓS DISSOLUÇÃO EM HCl DILUÍDO	30
CONCLUSÃO DA 3ª FASE: ANÁLISE DE RMN-^{31}P DO CONTEÚDO INTEGRAL DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) FORNECIDAS PELO IQSC-USP E ENCAMINHADAS PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio	36
ANÁLISE GRAVIMÉTRICA	36
DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ÍONS METÁLICOS NO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA IQSC-USP -MCTI RECEBIDAS VIA LASSBio	38
ANÁLISE DE RMN DE LOTE DE 282,87 GRAMAS DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) (FOSFOETANOLAMINA FORNECIDA PELO IQSC-USP E ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA CIEnP)	40
ANÁLISE DA AMOSTRA IQSC-USP-MCTI A GRANEL - INTEGRAL	43
CONCLUSÕES	45
MATERIAL SUPLEMENTAR	49

LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA – LQOS
COORDENADOR: PROF. LUIZ CARLOS DIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA - UNICAMP
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

ANÁLISE DE RMN DA FRAÇÃO SOLÚVEL DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA (FOS)
(FOSFOETANOLAMINA FORNECIDA PELO IQSC-USP E ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA CIEnP)

Inicialmente, foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio-1, de carbono-13 e de fósforo-31 (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P) da fração solúvel em água (H_2O), de cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) provenientes do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP) encaminhadas ao *Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos* (CIEnP) pelo *Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação* (MCTI). Foram entregues no *Laboratório de Química Orgânica Sintética* (LQOS), no Instituto de Química da UNICAMP (IQ-UNICAMP), 03 (três) cápsulas de FOS do IQSC-USP, encaminhadas pelo CIEnP, via Sedex-10, no dia 05/01/2016 e recebidas no LQOS no dia 06/01/2016. As 03 (três) cápsulas foram abertas e o material sólido branco contido em cada cápsula foi pesado. O sólido branco contido nas cápsulas apresentou-se bem compactado, sendo necessário leve pressionamento da cápsula para forçar a liberação do material. O peso do material sólido contido em cada cápsula foi: cápsula 01: 480 mg; cápsula 02: 503 mg; cápsula 03: 509 mg. Em seguida, 30 mg do sólido branco da cápsula 01 foram suspensos em 0,6 mL de água deuterada (D_2O; quantidade suficiente e necessária para realizar as análises de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P). A suspensão foi submetida à agitação magnética com auxílio de barra magnética por 30 minutos, à temperatura ambiente. Observou-se que o conteúdo da cápsula não se dissolveu por completo nessas condições, restando um depósito sólido, branco, insolúvel em D_2O, que foi separado por filtração através de filtro de papel, com leve sucção. O material solúvel em D_2O que, após a filtração, resultou numa solução límpida, apresentou pH na faixa de 5-6 (medido com papel indicador de pH de "4 listras", marca Macherey-Nagel, ref. 921 10), o que caracteriza caráter levemente ácido ao meio contendo o material solúvel em D_2O.

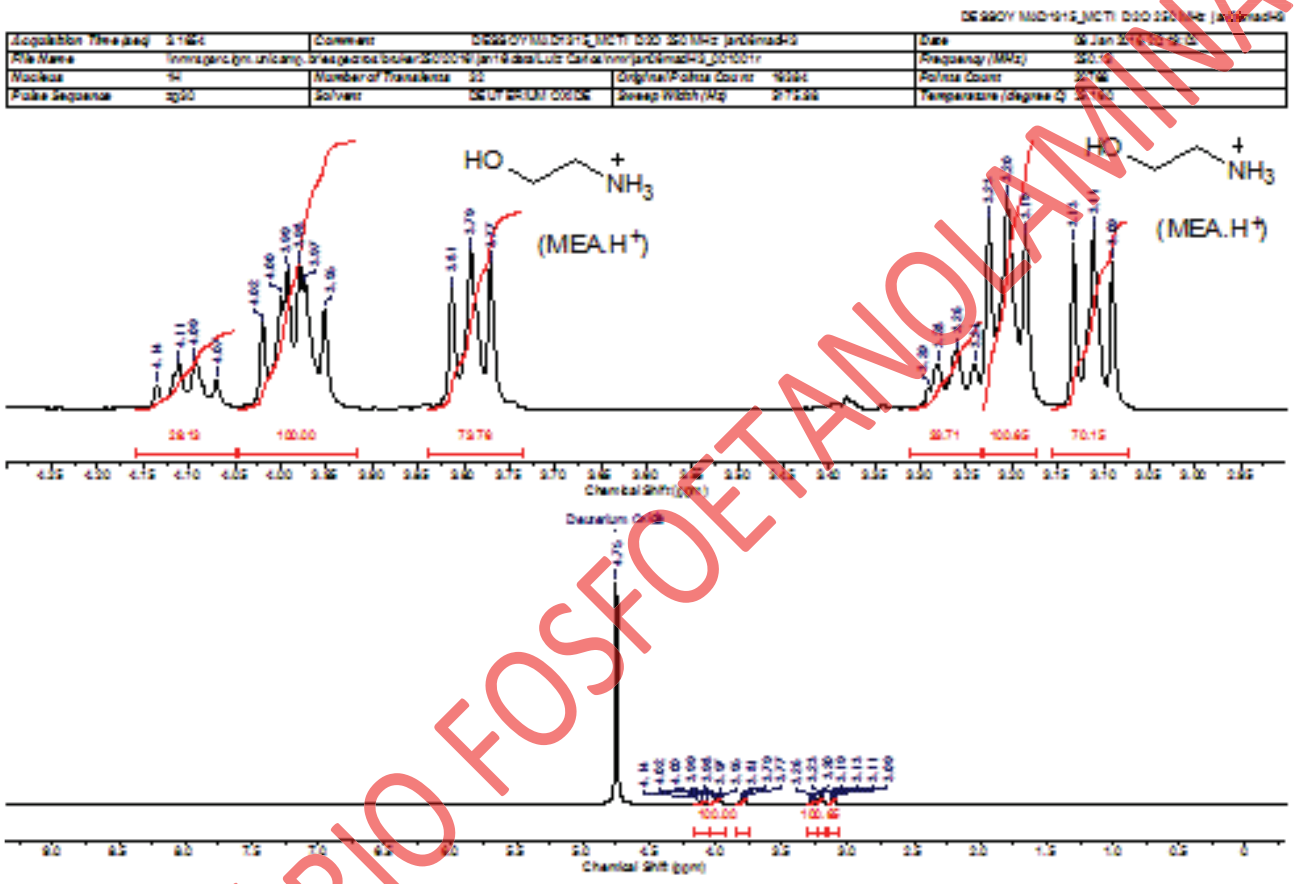
- **03 Cápsulas recebidas no LQOS; 03 cápsulas abertas, pesando: cápsula 01: 480 mg; cápsula 02: 503 mg; cápsula 03: 509 mg (todas contendo um sólido branco);**
- **30 mg de amostra; 0,6 mL de D_2O; agitação magnética por 30 minutos à temperatura ambiente; filtração; análise de RMN-^{1}H, de RMN-^{13}C e de RMN-^{31}P do filtrado límpido;**
- **pH = 5-6, determinado;**

Na figura 1, está o espectro de RMN-^{1}H em D_2O para o material solúvel da cápsula 01 em D_2O, obtido em equipamento Bruker DRX com o núcleo de hidrogênio tendo frequência de ressonância de 250,13 MHz, com expansão da região de 2,95-4,25 ppm mostrada na parte superior. O sinal na forma de *singleto* em 4,75 ppm no espectro completo mostrado na parte inferior da figura 1, refere-se à água residual (HDO) presente no solvente D_2O e serve como padrão

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

de referência interna (quando a D_2O utilizada não contém o padrão interno TMSP (ácido trimetilsililpropiônico), usado para calibrar espectros de RMN-^{1}H e de RMN-^{13}C).

Figura 1. Espectro RMN-^{1}H (250,13 MHz - D_2O) - Cápsula 01 IQSC-USP-MCTI via CIEnP - Fração solúvel em D_2O.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Neste espectro são claramente visíveis dois grupos distintos de sinais contendo um conjunto de 03 (três) sinais cada, perfazendo um total de 06 (seis) sinais diferentes, que são (multiplicidades entre parênteses): em 4,10 ppm (aparente *quarteto*); 3,98 ppm (aparente *tripleto de dubletos*); 3,79 ppm (aparente *tripleto*), 3,26 ppm (aparente *tripleto*); 3,20 ppm (aparente *tripleto*); 3,11 ppm (aparente *tripleto*), com integral das áreas relativas para cada um destes sinais na seguinte relação aproximada (da esquerda para a direita): 3:10:7:3:10:7. Um sinal adicional pode ser observado em 3,29 ppm, confirmado pela aquisição do espectro de RMN-^{1}H em equipamento Bruker DRX com o núcleo de hidrogênio tendo frequência de ressonância de 500 MHz (figura 11, página 19, sinal em 3,27 ppm). Alguns outros sinais menos intensos, relativos a

impurezas contidas na amostra, são observados na região em torno de 3,30-3,45 ppm, próximo a 3,74 ppm e entre 3,83-3,90 ppm.

Neste ponto pode-se adiantar que os dois aparente *tripletos* em 3,11 ppm (J = 5,2 Hz) e em 3,79 ppm (J = 5,2 Hz) referem-se à monoetanolamina protonada ($MEA.H^+$), cuja estrutura está mostrada na parte superior da figura 1. O sinal em 3,11 ppm aparece como um aparente *tripleto*, pois corresponde aos dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de nitrogênio, acoplando com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio. O sinal centrado em 3,79 ppm, também como um *aparente tripleto*, corresponde ao acoplamento dos átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de nitrogênio. Os aparentes *tripletos* são, na realidade, *tripletos* distorcidos: a relação entre os picos é diferente da relação teórica esperada de 1:2:1 devido à distorção causada pela protonação do átomo de nitrogênio básico desta substância, bem como pelo efeito quadrupolar causado pelo núcleo de nitrogênio-14, o que afeta a relaxação dos hidrogênios, alargando o sinal. Este efeito também pode ser observado no espectro do cloridrato da monoetanolamina, preparado sinteticamente no LQOS (figura 6, página 9), que corrobora a atribuição dada para o sal da monoetanolamina ($MEA.H^+$). Resta ainda, identificar os sinais centrados em 3,20; 3,26; 3,98 e 4,10 ppm no espectro de RMN-^{1}H, que estão discutidos nas páginas 11-13 deste relatório.

A figura 2 apresenta o espectro de RMN-^{13}C (calibrado externamente usando como padrão de referência o sinal de TMSP, δ = 0.00 ppm) adquirido em equipamento Bruker DRX com o núcleo de carbono tendo frequência de ressonância de 62,9 MHz, em D_2O, para a mesma fração solúvel em D_2O, já utilizada para a aquisição do espectro de RMN-^{1}H mostrado na figura 1, obtida da cápsula 01 IQSC-USP-MCTI enviada via CIEnP.

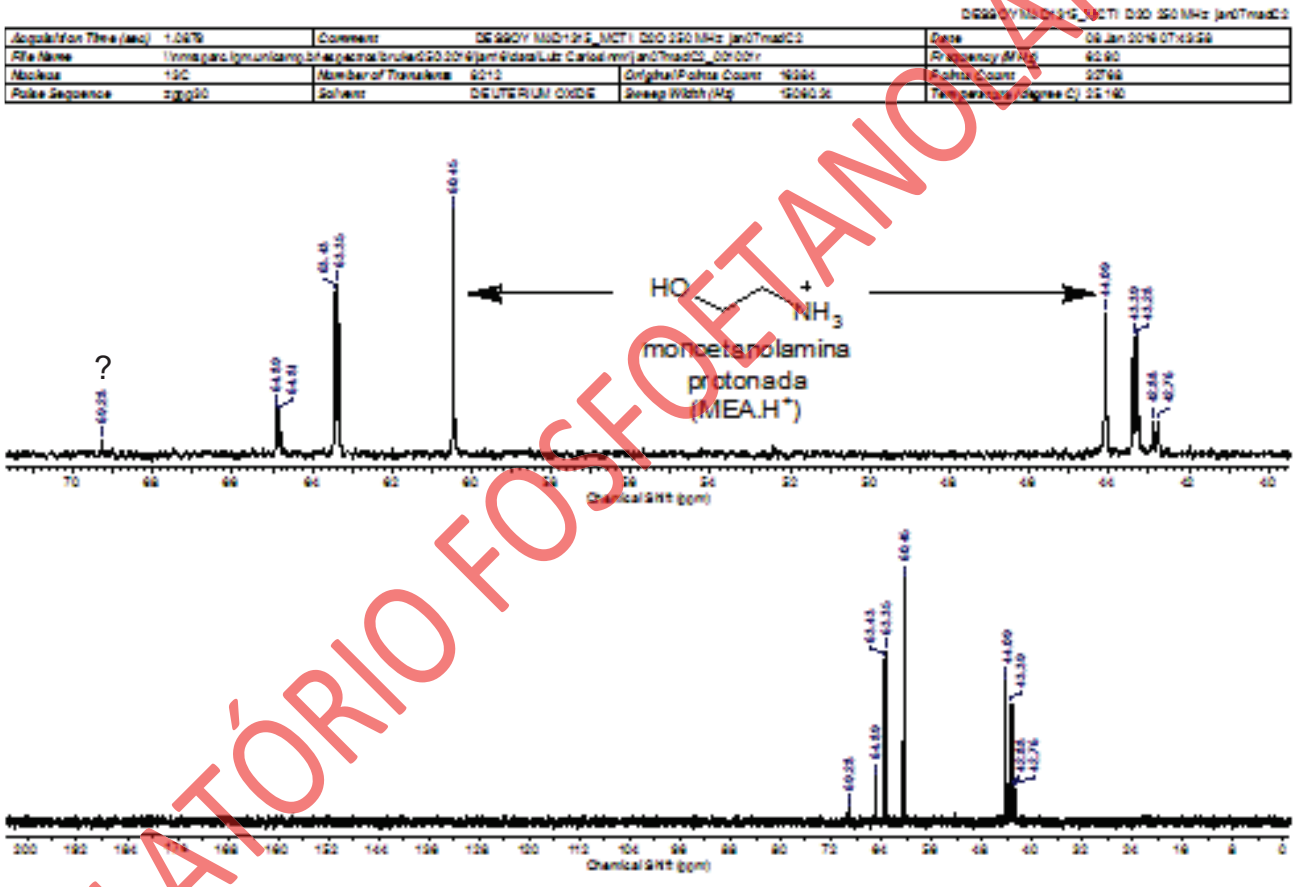
Este espectro apresentou 07 (sete) sinais na região entre 40,0 ppm e 70,0 ppm (expansão parte superior da figura 2). Com relação à multiplicidade, os sinais em 44,09 ppm e 60,45 ppm, apresentam-se como *singletos* e os sinais centrados em 42,83 ppm (d, $^3J_{C,P}$ = 7,8 Hz); 43,34 ppm (d, $^3J_{C,P}$ = 6,9 Hz); 63,39 ppm (d, $^2J_{C,P}$ = 4,6 Hz) e 64,85 ppm (d, $^2J_{C,P}$ = 5,1 Hz), apresentam-se como *dubletos*. Um sinal adicional, de menor intensidade, aparece como um *singleto* em 69,28 ppm e foi atribuído à impureza não identificada até aqui. Como este espectro foi adquirido no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio, o desdobramento dos sinais em *dubletos* é resultado do acoplamento dos núcleos de carbono com o núcleo de fósforo, que possui spin ½. A observação desse acoplamento confirma a existência de um átomo de fósforo na estrutura dos compostos relacionados.

Os sinais na forma de *singletos* em 44,09 ppm e em 60,45 ppm referem-se aos átomos de carbono da monoetanolamina protonada ($MEA.H^+$), presente na cápsula do IQSC-USP, conforme pode ser comprovado pelo espectro de RMN-^{13}C mostrado na figura 7, página 10, para o cloridrato

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

de monoetanolamina preparado no LQOS (IQ-UNICAMP). O sinal em 44,09 ppm corresponde ao átomo de carbono do grupo CH_2 ligado ao átomo de nitrogênio, enquanto o sinal em 60,45 ppm corresponde ao átomo de carbono do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio. Os deslocamentos químicos para os mesmos carbonos no espectro de RMN-^{13}C do cloridrato de monoetanolamina sintetizado no LQOS são 44,09 e 60,39 ppm (figura 7, página 10), confirmando a presença do sal de monoetanolamina entre os componentes das cápsulas estudadas.

Figura 2. Espectro RMN-^{13}C (62,9 MHz – D_2O) – Cápsula 01 IQSC-USP-MCTI via CIEnP – Fração solúvel em D_2O.



A figura 3 (página 6) mostra o espectro de RMN-^{31}P no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio, adquirido em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz, em D_2O – para a fração solúvel em D_2O - cápsula 01 do IQSC-USP-MCTI encaminhada via CIEnP, mesma amostra utilizada na aquisição dos espectros das figuras 1 e 2 (páginas 3 e 5). Na parte superior da figura 3, está mostrada uma expansão da região entre 4,5 ppm e –1,5 ppm. Este espectro evidencia claramente a presença de 03 (três) espécies distintas contendo fósforo em suas estruturas, conforme mostram os sinais em 2,74 ppm, em 0,50

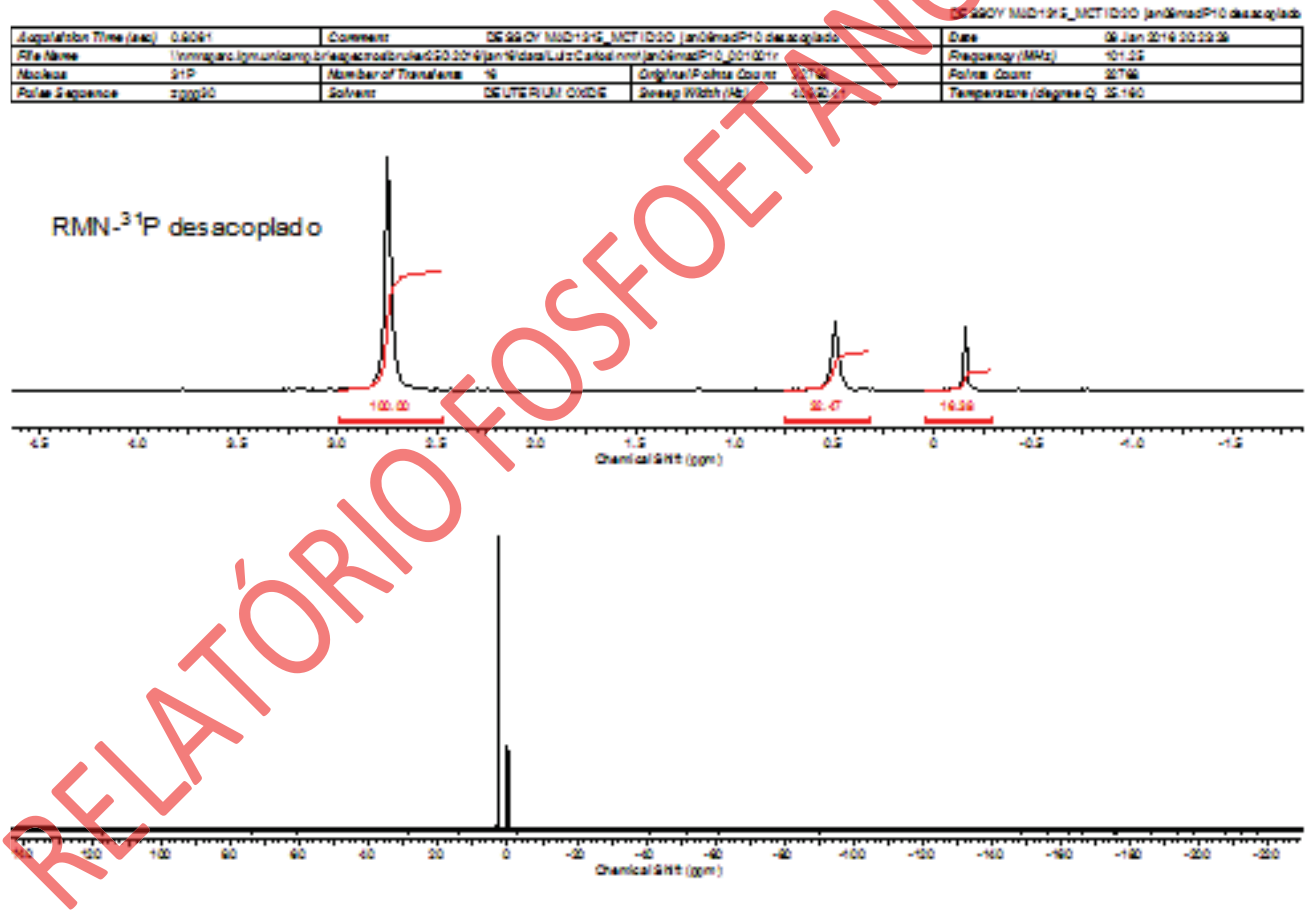
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

ppm e em –0,15 ppm, numa razão molar aproximada de **100:32:16**. Neste experimento, apenas com a fração solúvel em D_2O, nenhuma outra espécie contendo fósforo foi observada na janela espectral analisada (140 ppm a –220 ppm, parte inferior da figura 3). Ver continuação desta discussão nas páginas 10 e 11.

Nas figuras 4 e 5 (páginas 7 e 8), estão representados os espectros de RMN-^{1}H (250,13 MHz - D_2O) e de RMN-^{13}C (62,9 MHz - D_2O), respectivamente, para a monoetanolamina neutra destilada (MEA), adquirida comercialmente (marca *Sigma-Aldrich*) e utilizada como padrão neste estudo.

O espectro de RMN-^{1}H apresentado na figura 4 mostra dois *tripletos*, nas regiões de 2,73 ppm (J = 5,0 Hz) e de 3,61 ppm (J = 5,0 Hz).

Figura 3. Espectro RMN-^{31}P desacoplado (101,25 MHz - D_2O) - Cápsula 01 IQSC-USP-MCTI via CIEnP – Fração solúvel em D_2O.



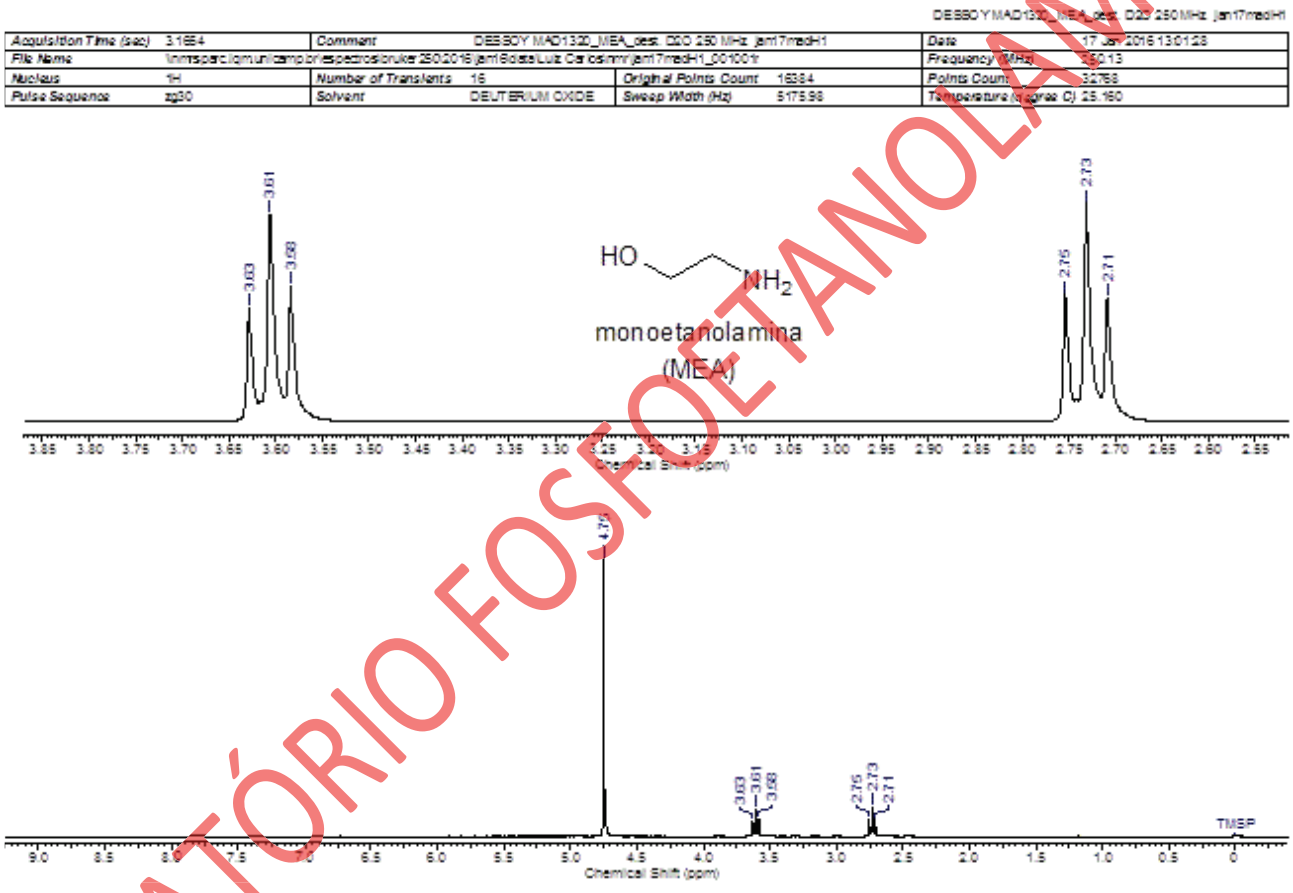
No espectro mostrado na figura 1 (página 3), os sinais em forma de aparente *tripletos* em 3,11 ppm (J = 5,2 Hz) e em 3,79 ppm (J = 5,2 Hz) correspondem à monoetanolamina protonada

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

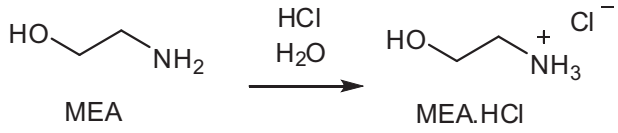
(MEA.H$^+$) e por esta razão estão deslocados para campo mais baixo em relação à monoetanolamina padrão comercialmente disponível, mostrada na figura 4, que não se encontra protonada.

Para fins de confirmação inequívoca, foi realizado um experimento complementar no qual adicionou-se HCl (ácido clorídrico) à monoetanolamina padrão para a preparação do respectivo cloridrato (MEA.HCl). Em seguida, foram adquiridos os espectros de RMN-^{1}H e de RMN-^{13}C (esquema 1, figuras 6 e 7, páginas 9 e 10, respectivamente).

Figura 4. Espectro RMN-^{1}H (250,13 MHz - D_2O) - monoetanolamina comercial destilada (MEA).



Esquema 1. Reação de monoetanolamina padrão (MEA) com HCl para formar o cloridrato da monoetanolamina (MEA.HCl)

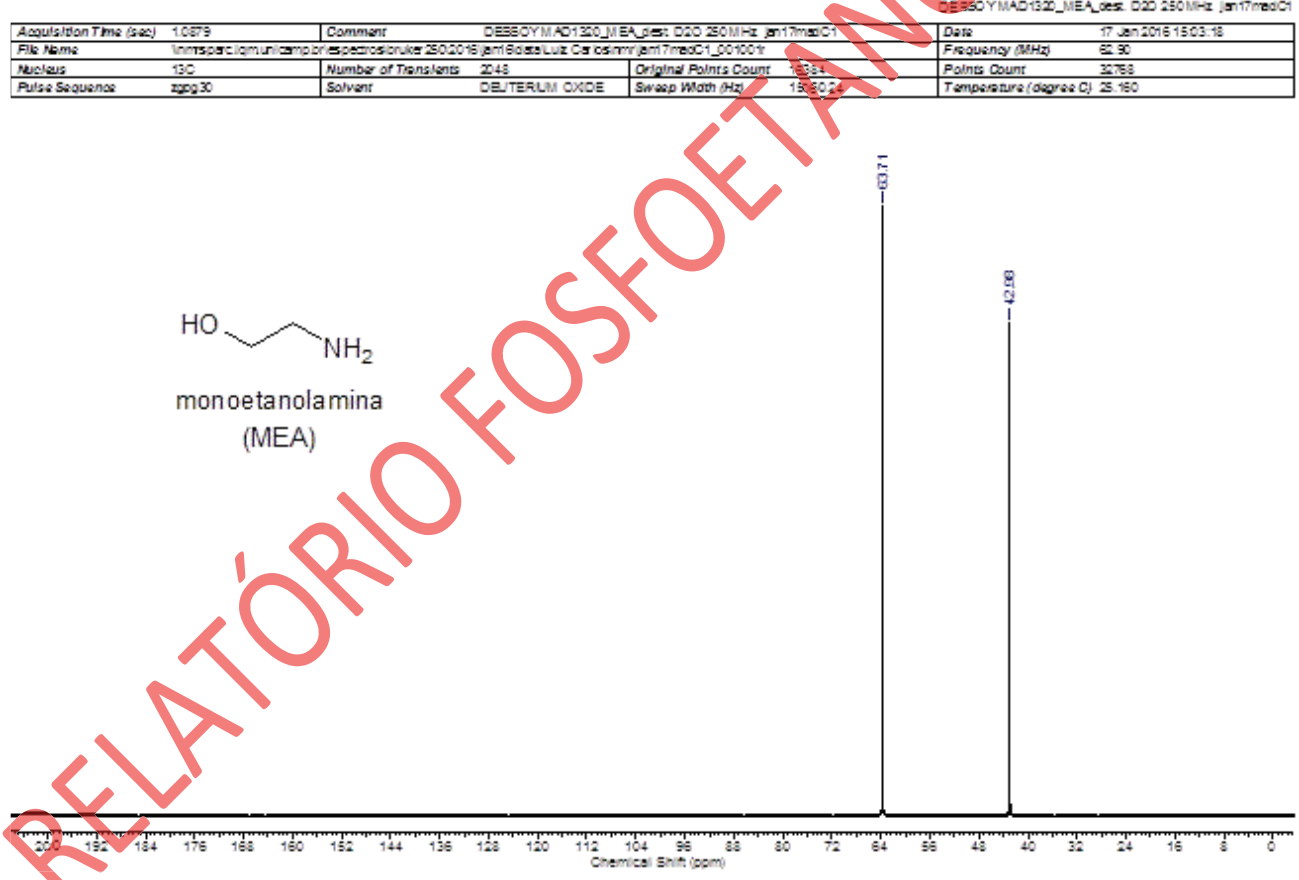


RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN-^{1}H para o cloridrato da monoetanolamina na figura 6 (página 9) são: 3,13 ppm (*J* = 5,0 Hz) e 3,81 ppm (*J* = 5,0 Hz). Assim sendo, estão em absoluta concordância com os deslocamentos químicos da espécie protonada da monoetanolamina presente na cápsula IQSC-USP-MCTI recebida via CIEnP, mostrados no espectro da figura 1 (página 3), que são de 3,11 ppm (*J* = 5,2 Hz) e de 3,79 ppm (*J* = 5,2 Hz). As constantes de acoplamento (*J*) na ordem de 5,0 Hz, são próximas para os dois compostos.

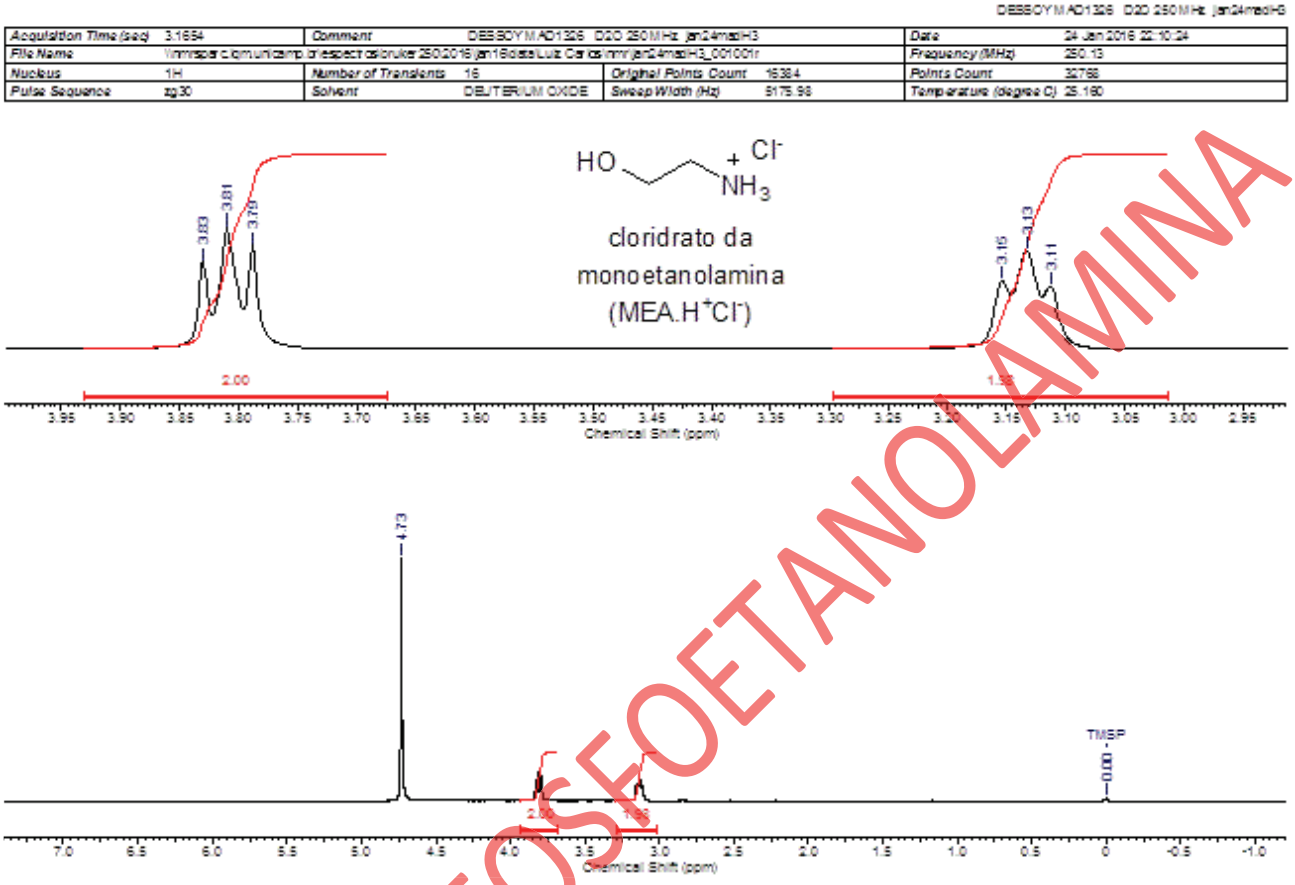
O espectro de RMN-^{13}C da monoetanolamina padrão comercialmente disponível (marca *Sigma-Aldrich*, figura 5) mostrou o átomo de carbono ligado ao átomo de nitrogênio em 42,98 ppm, mais protegido do que o mesmo átomo de carbono no espectro da amostra de FOS do IQSC-USP, em 44,09 ppm mostrado na figura 2 (página 5), visto que neste último caso o átomo de nitrogênio encontra-se protonado.

Figura 5. Espectro RMN-^{13}C (62,9 MHz - D_2O) - monoetanolamina comercial destilada **(MEA)**.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

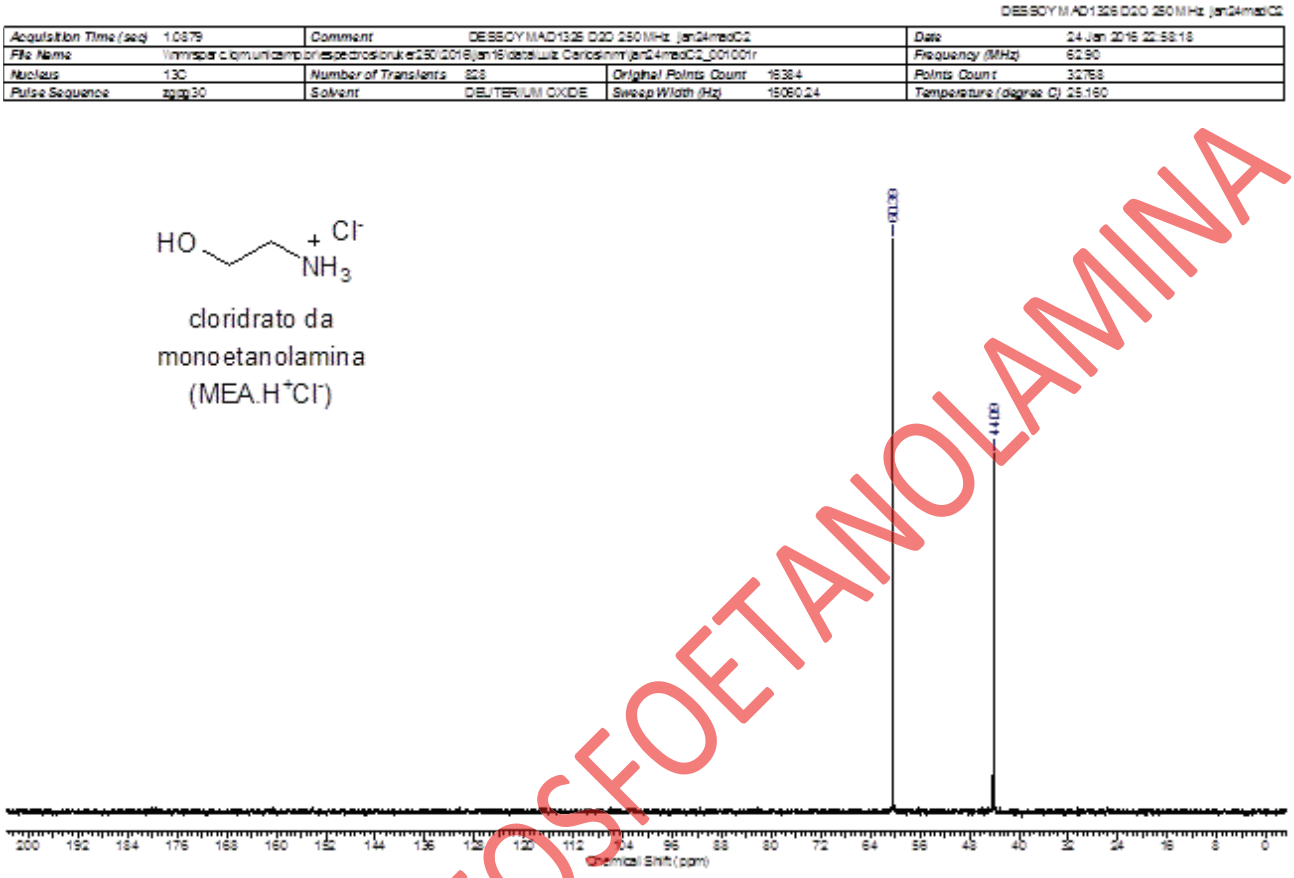
Figura 6. Espectro RMN-^{1}H (250,13 MHz - D_2O) – cloridrato da monoetanolamina **(MEA.HCl)**.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

No espectro de RMN-^{13}C da figura 2 (página 5), o sinal em 44,09 ppm, corresponde ao átomo de carbono ligado ao átomo de nitrogênio e o sinal em 60,45 ppm, corresponde ao átomo de carbono ligado ao átomo de oxigênio. Além disto, os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN-^{13}C para o cloridrato da monoetanolamina na figura 7 (página 10) são 44,09 ppm e 60,39 ppm, em total concordância com os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN-^{13}C para a monoetanolamina protonada presente na cápsula 01 IQSC-USP-MCTI recebida via CIEnP, mostrados no espectro da figura 2 (página 5), que são de 44,09 ppm e 60,45 ppm. **Estes resultados comprovam que um dos componentes presentes nas cápsulas provenientes do IQSC-USP-MCTI, recebida via CIEnP, é a monoetanolamina protonada (MEA.H^{+}).**

Figura 7. Espectro RMN-^{13}C (62,9 MHz - D_2O) – cloridrato da monoetanolamina **(MEA.H$^+$Cl$^-$)**.



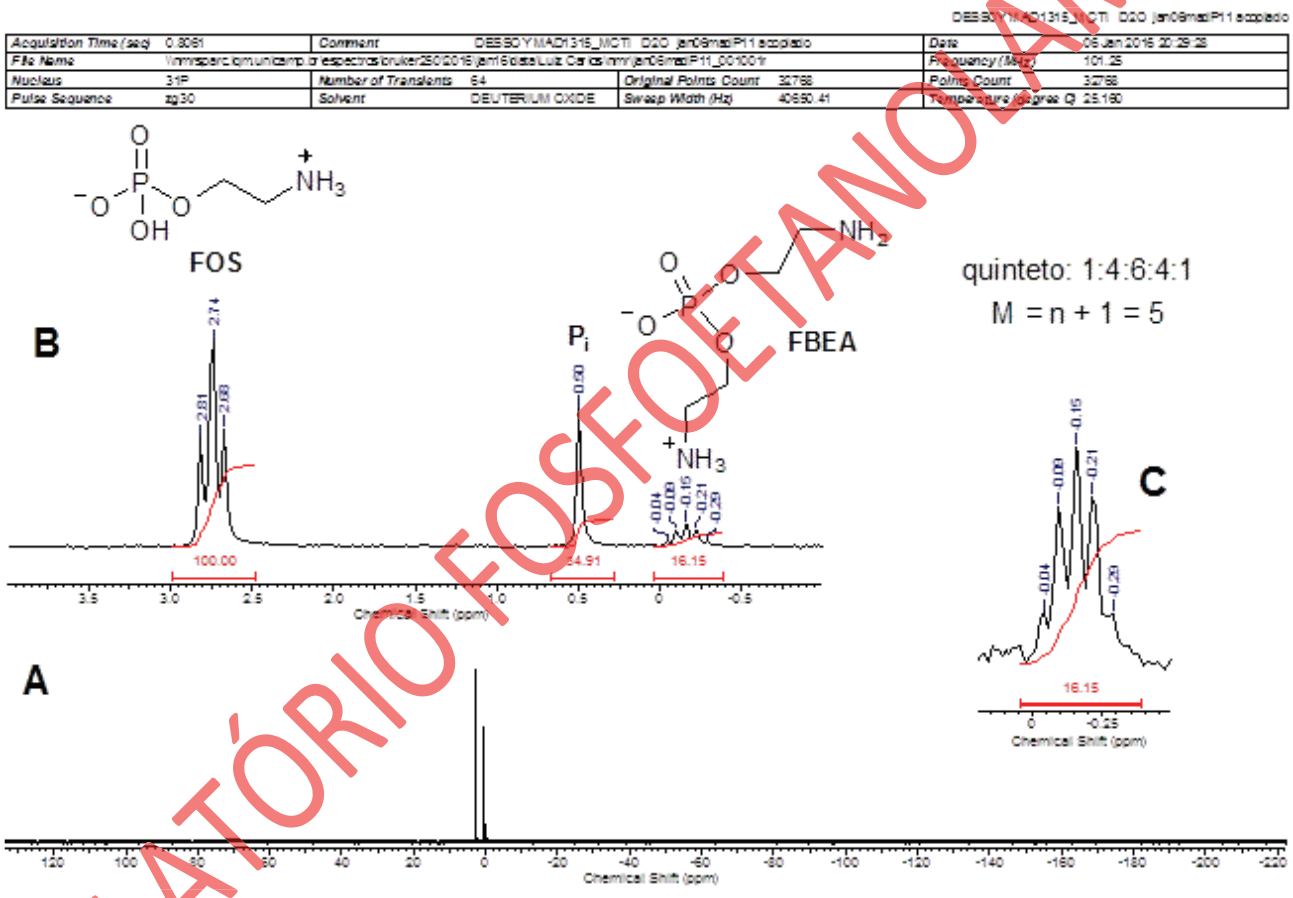
A figura 8 mostra o espectro de RMN-^{31}P totalmente acoplado (A), a expansão da região entre –0,5 ppm e 3,5 ppm (B), bem como uma expansão do sinal em –0,15 ppm (C) para a fração da amostra solúvel em D_2O, adquirido em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz - cápsula IQSC-USP-MCTI encaminhada via CIEnP, mesma amostra utilizada na aquisição dos espectros de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P com desacoplamento em banda larga de hidrogênio mostrados nas figuras 1, 2 e 3, páginas 3, 5 e 6, respectivamente. Neste experimento, observa-se o sinal de fósforo com deslocamento químico em 2,74 ppm, desdobrado em um *tripleto* com constante de acoplamento $J_{P,H}$ = 6,8 Hz. Este sinal corresponde ao átomo de fósforo presente na molécula de FOSFOETANOLAMINA (FOS) na forma de seu sal, como mostrado na expansão (B) na figura 8, sendo que o núcleo do fósforo acopla com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio, resultando num *tripleto*, conforme predito pela teoria de espectroscopia de RMN-^{31}P. O sinal em 0,50 ppm mostra apenas um *singleto* devido à presença de fosfatos inorgânicos de cálcio e magnésio (P_i) presentes no meio (como comprovado pelos experimentos apresentados nas páginas 38-39 deste relatório).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

O sinal em –0,15 ppm mostra-se desdobrado em um quinteto com constante de acoplamento $J_{P,H}$ = 6,2 Hz. Essa multiplicidade é explicada pelo acoplamento do átomo de fósforo com quatro átomos de hidrogênio não permutáveis com o meio, como dois grupos CH_2.

Estes resultados sugerem a presença na amostra de um diéster do ácido fosfórico, a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA). A estrutura da FBEA está mostrada na expansão (B) na figura 8, na forma de seu sal.

Figura 8. Espectro RMN-^{31}P acoplado (101,25 MHz - D_2O) - Cápsula IQSC-USP-MCTI via CIEnP (com expansões).



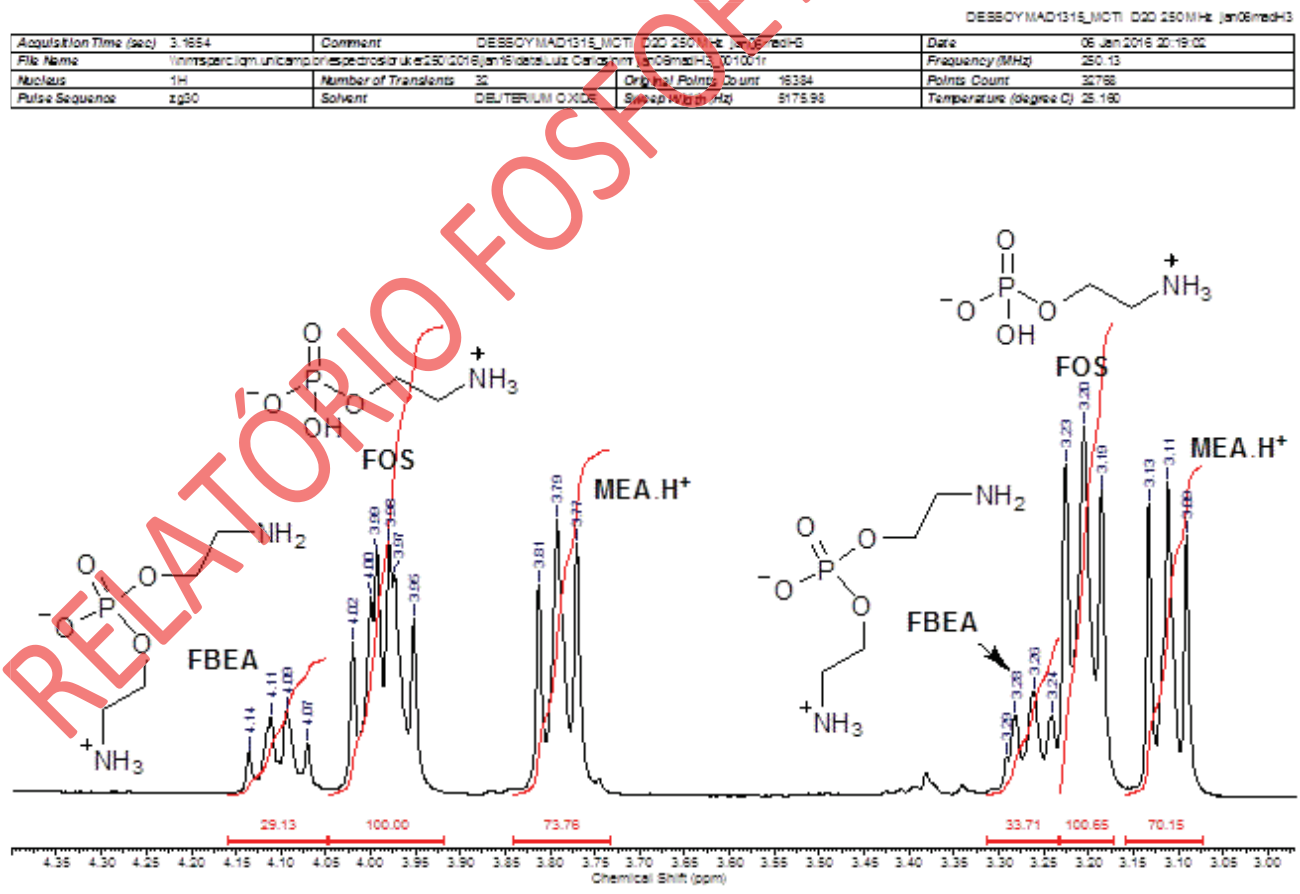
Voltando à expansão da região de 2,95 ppm a 4,25 ppm no espectro de hidrogênio-1 da figura 1 (página 3, reproduzido novamente na figura 9 (página 12), para a região de 3,00 a 4,35 ppm), pôde-se agora atribuir todos os sinais observados às três substâncias orgânicas presentes na fração solúvel em D_2O das cápsulas provenientes do IQSC-USP. A quarta espécie presente na fração solúvel em D_2O diz respeito a sais de fosfato inorgânico (P_i) na forma de cálcio e de magnésio. Dessa forma, os sinais com multiplicidade de aparente *tripletos* em 3,11 ppm e em 3,79 ppm são devidos à **monoetanolamina protonada**. Os sinais centrados em 3,20 ppm (aparente *tripleto*) e em

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

3,98 ppm (aparente *tripleto de dubletos*) correspondem à **FOSFOETANOLAMINA (FOS)** na forma de seu sal. O sinal em 3,20 ppm aparece como um aparente *tripleto*, pois corresponde aos dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligados ao átomo de nitrogênio, acoplando com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio. O sinal em torno de 3,98 ppm corresponde ao acoplamento dos átomos de hidrogênio pertencentes ao grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de nitrogênio, além do acoplamento com o átomo de fósforo (que possui spin ½, assim como o átomo de hidrogênio). Por isto este sinal aparece com 6 linhas, na forma de um aparente *tripleto de dubletos*.

Estes resultados indicam a presença da **FOSFOETANOLAMINA (FOS)** na amostra em exame, sob a forma de sal, como sugerem os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligados ao nitrogênio (3,20 ppm), em comparação com os deslocamentos químicos observados para os mesmos hidrogênios no cloridrato de monoetanolamina (3,13 ppm), sintetizado no LQOS-UNICAMP (figura 6, página 9).

Figura 9. Espectro RMN-^{1}H (250,13 MHz - D_2O) - Cápsula 01 IQSC-USP-MCTI recebida via CIEnP (expansão da região entre 3,00 ppm e 4,35 ppm).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

A presença de **FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA)** na forma de seu sal na mistura contida nas cápsulas provenientes do IQSC-USP, também pôde ser evidenciada pela análise do espectro de RMN-^{1}H reproduzido na figura 9 (página 12). O aparente *tripleto* em torno de 3,26 ppm corresponde ao acoplamento dos dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de nitrogênio com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio (o pequeno sinal em 3,29 ppm corresponde a uma impureza, ver figura 11, página 19, sinal em 3,27 ppm). O aparente *quarteto* em torno de 4,10 ppm, resulta do acoplamento dos dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de nitrogênio e com o núcleo de fósforo, que possui spin ½, assim como o núcleo de hidrogênio.

Além disto, a presença de FBEA no material contido nas cápsulas de FOS do IQSC-USP é reforçada através da avaliação dos valores das integrais dos espectros de RMN-^{1}H e RMN-^{31}P adquiridos para a parte solúvel em D_2O do conteúdo da cápsula. A inspeção das integrais no espectro de RMN-^{31}P (figura 8, página 11) indica que os valores das integrais dos sinais relativos à FOS (2,74 ppm) e o valor da integral dos sinais relativos ao diéster (FBEA, –0,15 ppm) estão numa razão de **100:15** (em números redondos). Já no espectro de RMN-^{1}H (figura 9, página 12) a razão entre as áreas relativas aos sinais correspondentes à FOS (3,98 ppm e 3,20 ppm) e à FBEA (4,10 ppm e 3,26 ppm) é de **100:30** (em números redondos), ou seja, duas vezes maior que a razão extraída do espectro de RMN-^{31}P. Essa aparente discrepância pode, no entanto, ser perfeitamente racionalizada a partir da análise estrutural desses dois compostos. Assim, tanto a FOS quanto a FBEA possuem um único átomo de fósforo em sua estrutura, logo a razão entre as áreas sob seus respectivos sinais no espectro de RMN-^{31}P expressa diretamente a razão molar na qual elas estão presentes na mistura, ou seja, **100:15**. Por outro lado, a FBEA comporta dois resíduos de monoetanolamina em sua estrutura, enquanto a FOS possui apenas um. Dessa forma, no espectro de RMN-^{1}H a razão molar de FOS:FBEA equivalente a **100:15** (conforme determinada no espectro de RMN-^{31}P) é expressa pela razão de área entre os respectivos sinais desses dois compostos de **100:30**, visto que, no caso da FBEA, o dobro de átomos gera os sinais em relação aos átomos que geram os respectivos sinais da FOS. Tanto o espectro de RMN-^{1}H como o de RMN-^{31}P levam a mesma conclusão, de que a proporção relativa entre FOS:FBEA nas cápsulas IQSC-USP é de fato **100:15**.

Voltando ao espectro de RMN-^{13}C mostrado na figura 2, página 5, os sinais centrados em 43,34 ppm e em 63,39 ppm, correspondem aos carbonos da FOSFOETANOLAMINA (FOS). O sinal em 43,34 ppm corresponde ao carbono ligado ao nitrogênio e o sinal em 63,39 ppm ao carbono ligado ao oxigênio. Os sinais centrados em 42,83 ppm e em 64,85 ppm, correspondem aos carbonos da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA). O sinal em 42,83 ppm corresponde ao carbono

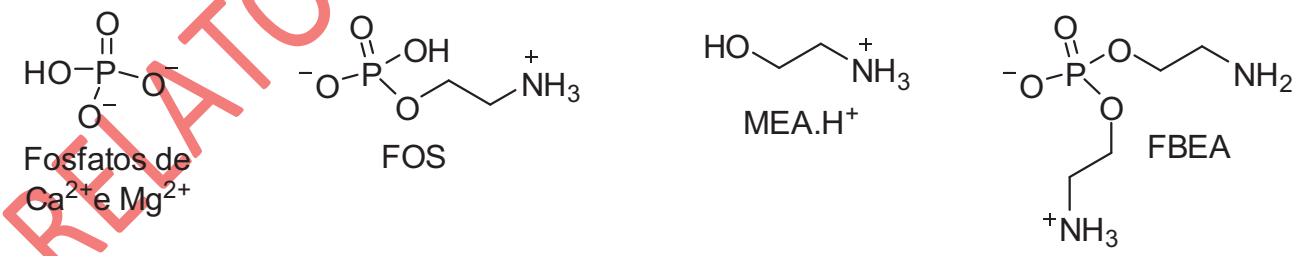
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

ligado ao nitrogênio e o sinal em 64,85 ppm ao carbono ligado ao oxigênio. Estes sinais aparecem como *dubletos* em virtude de acoplamentos com o núcleo de fósforo, que apresenta spin ½.

CONCLUSÃO DA ANÁLISE DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O: ANÁLISE DE RMN DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O DA CÁPSULA DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) - (FOSFOETANOLAMINA FORNECIDA PELO IQSC-USP E ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA CIEnP)

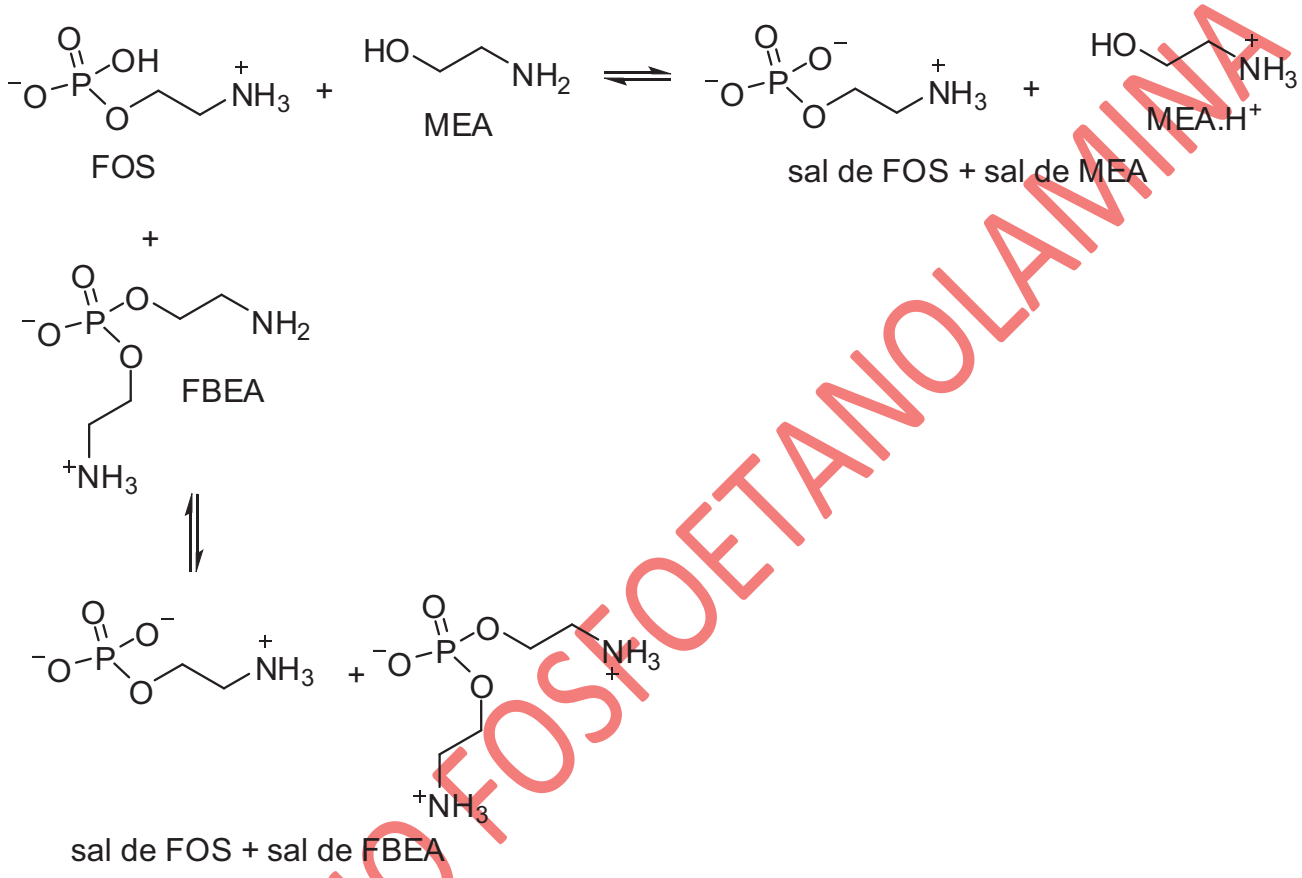
A análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1, de carbono-13 e de fósforo-31 (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P) da **fração solúvel em D_2O** permitiu a identificação de 04 (quatro) componentes presentes nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via CIEnP (esquema 2). Dentre eles, 03 (três) destes compostos contêm fósforo na sua estrutura: *componente 1:* fosfato inorgânico de cálcio e magnésio (P_i); *componente 2:* a **FOSFOETANOLAMINA (FOS)** na forma de seu sal e associada ao sal da **monoetanolamina (MEA.H$^+$)**; *componente 3:* a **FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA)**, diéster do ácido fosfórico, na forma de seu sal. O quarto componente presente nesta fração é a **monoetanolamina protonada**. Segundo a análise de RMN de ^{1}H, a razão molar entre FOS, MEA.H$^+$e FBEA é de **100:70:15**. Segundo a análise por RMN de ^{31}P, a razão molar entre FOS, P_i (fosfato inorgânico de cálcio e magnésio) e FBEA é de **100:33:16**, sendo que a relação encontrada para FOS e FBEA pelas duas técnicas é a mesma (variação considerada dentro dos limites do erro experimental inerente à técnica). Em solução de D_2O, estas espécies estão presentes em equilíbrio em virtude do pH na faixa de 5-6 para o meio. Também foi observada a presença de fosfatos inorgânicos de cálcio e de magnésio (P_i) nas cápsulas. (Experimentos comprovando a presença de cálcio e magnésio são apresentados nas páginas 38-39 deste relatório).

Esquema 2. Espécies presentes na fração solúvel em D_2O - cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via CIEnP.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Esquema 3. Equilíbrio químico entre as espécies presentes na fração solúvel em D_2O - cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS, via CIEnP, em solução de D_2O.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Outrossim, cabe ressaltar a variação observada na massa encontrada nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via CIEnP: 480 mg, 503 mg e 509 mg (página 2).

ANÁLISE DE RMN DA FRAÇÃO SOLÚVEL DA CÁPSULA DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio-UFRJ

1ª FASE: Recebimento e pesagem das amostras de FOSFOETANOLAMINA enviadas pelo MCTI ao *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas* (LASSBio), *da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ*

O *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas* (LASSBio), *da Universidade Federal do Rio de Janeiro*, recebeu no dia 07/01/2016, 360 cápsulas enviadas pelo MCTI. Estas cápsulas foram enviadas em 06 pequenas embalagens plásticas identificadas como "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA" – 500 mg.

Do total de 360 cápsulas recebidas no LASSBio, 30 cápsulas foram separadas em 03 frascos novos de vidro âmbar, contendo 10 cápsulas cada.

Os três frascos (A, B, C) tiveram o conteúdo de suas 10 cápsulas pesados individualmente, fornecendo: Frasco A = 3729 mg; Frasco B = 3964 mg; Frasco C = 3804 mg;

Baseado nos pesos desses 03 conjuntos de 10 cápsulas cada, infere-se que, em média, cada cápsula contém: frasco A = 372 mg; frasco B = 396 mg; frasco C = 380 mg.

O peso médio de cada cápsula nos 03 frascos A, B e C é de 383 mg (considerados o conteúdo mais invólucro da cápsula). Como o peso médio dos invólucros das cápsulas é de 77 mg, calcula-se o peso médio do **conteúdo** de cada cápsula de FOS em **306 mg** (383 mg menos 77 mg). Uma vez que cada cápsula deveria conter 500 mg de material, conforme informado na embalagem, as cápsulas fornecidas contêm, em média, 38,8% a menos de material, ou seja, as cápsulas contêm, em média, apenas **61,2% do peso indicado**.

2ª FASE: ANÁLISE DO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) ENCAMINHADAS PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio

Inicialmente, foram realizadas no *Laboratório de Química Orgânica Sintética* (LQOS) – IQ-UNICAMP – análises de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1, de carbono-13 e de fósforo-31 (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P) **da fração solúvel em água**, das cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) do IQSC-USP encaminhadas ao *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas* (LASSBio), *da Universidade Federal do Rio de Janeiro*, pelo *Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação* (MCTI).

Foi recebido no *Laboratório de Química Orgânica Sintética* (LQOS) um total de 60 cápsulas de "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA – 500 mg" produzidas pelo Instituto de Química da USP de

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

São Carlos (IQSC-USP), assim distribuídas: 3 frascos de vidro âmbar, contendo 10 cápsulas cada (total de 30 cápsulas) e uma embalagem plástica transparente lacrada contendo as demais 30 cápsulas. Essas cápsulas foram encaminhadas pelo LASSBio via Sedex-10, no dia 08/01/2016, tendo sido recebidas no LQOS no dia 09/01/2016.

No LQOS foram abertas 03 cápsulas (uma de cada frasco de vidro âmbar) sendo seu conteúdo pesado individualmente. O sólido branco contido nas cápsulas pôde ser facilmente despejado por simples inversão da cápsula aberta, ao contrário do observado para as cápsulas recebidas do CIEnP (bem mais compactadas). Por inspeção ótica, também foi possível constatar que a granulometria do material contido nas cápsulas provenientes de diferentes origens (LASSBio *vs.* CIEnP) é um pouco distinta: o material sólido da cápsula recebida do LASSBio apresenta-se com grânulos mais finos do que o material sólido contido nas cápsulas enviadas pelo CIEnP. Os pesos do material sólido contido em cada uma das cápsulas analisadas apresentaram grande variação: cápsula 01: 325 mg; cápsula 02: 273 mg; cápsula 03: 345 mg.

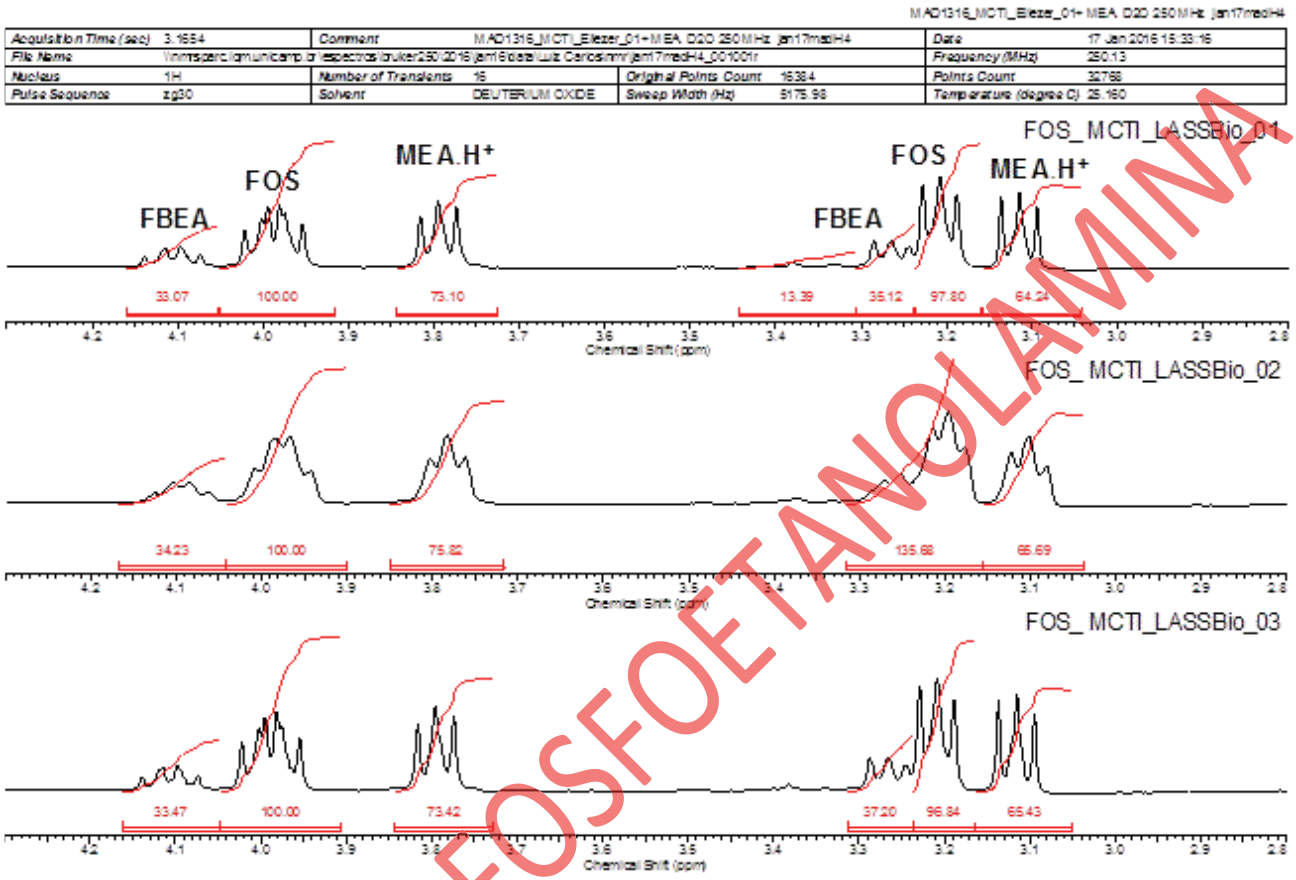
- **03 Cápsulas abertas no LQOS, pesando: cápsula 01: 325 mg, cápsula 02: 273 mg e cápsula 03: 345 mg (todas contendo um sólido branco)**
- **30 mg amostra; 0,6 mL D_2O; agitação por 30 minutos à temperatura ambiente; filtração; análise de RMN-^{1}H, de RMN-^{13}C e de RMN-^{31}P do filtrado límpido**
- **pH = 5-6, determinado;**

Foram pesados, separadamente, 30 mg de material de cada uma das cápsulas abertas (cápsulas 01, 02 e 03). Em três experimentos independentes, foram adicionados 0,6 mL de D_2O ao material de cada amostra e as misturas, assim obtidas, foram mantidas sob agitação magnética com auxílio de barra magnética por 30 minutos, à temperatura ambiente. Sob essas condições, observou-se uma dissolução apenas parcial das amostras, restando um sólido branco insolúvel que foi separado por filtração em papel de filtro. A solução límpida da fração solúvel em D_2O, obtida após filtração, apresentou valor de pH em torno de 5-6 (medido com papel indicador de pH de "4 listras", marca Macherey-Nagel, ref. 921 10), o que confere caráter levemente ácido ao meio contendo o material solúvel em D_2O. O valor de pH foi o mesmo observado anteriormente para as cápsulas recebidas do CIEnP (página 2).

Na figura 10, estão apresentados os espectros de RMN-^{1}H em D_2O (parciais) para as amostras das cápsulas 01, 02 e 03, adquiridos em equipamento Bruker DRX com o núcleo de hidrogênio tendo frequência de ressonância de 250,13 MHz, para o material solúvel em D_2O, com expansão da região de 2,80-4,20 ppm.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 10. Espectro RMN-^{1}H (250,13 MHz - D_2O) - Filtrado límpido das cápsulas 01, 02 e 03 – IQSC-USP MCTI/LASSBio.

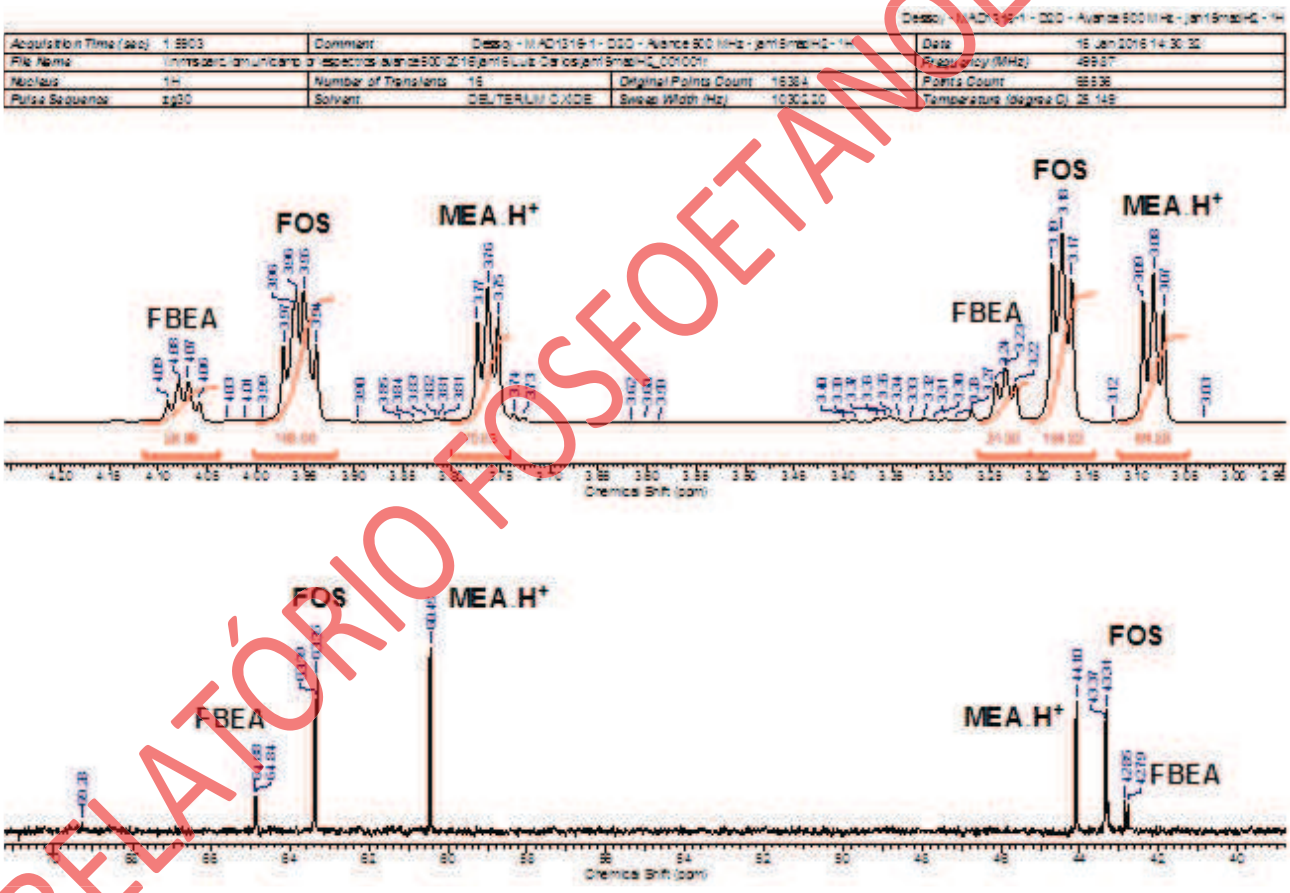


A análise destes espectros demonstrou que as mesmas espécies estão presentes nas três cápsulas provenientes do LASSBio, nas mesmas razões molares. Como na análise anterior das cápsulas provenientes do CIEnP (figura 1, página 3), pôde-se observar nitidamente a presença de seis sinais diferentes, distribuídos em dois conjuntos de três sinais cada, assim descritos (multiplicidades entre parênteses): em cerca de 4,10 ppm (aparente *quarteto*), 3,98 ppm (aparente *tripleto de dubletos*), 3,79 ppm (aparente *tripleto*), 3,26 ppm (aparente *tripleto*), 3,21 ppm (aparente *tripleto*), 3,13 ppm (aparente *tripleto*), com integral das áreas relativas para cada um destes sinais na seguinte relação aproximada, da esquerda para a direita: 3:10:7:3:10:7. Estes sinais correspondem aos compostos **FOSFOETANOLAMINA (FOS)** na forma de seu sal e associada ao **sal da monoetanolamina (MEA.H^{+})** e a **FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA)** e são exatamente os mesmos compostos observados nas cápsulas provenientes do CIEnP, inclusive apresentando as mesmas proporções. Novamente, alguns outros sinais adicionais menos intensos, são observados na região em torno de 3,30 a 3,45 ppm, em torno de 3,75 ppm e entre 3,83-3,90 ppm.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

A figura 11 reúne as expansões dos espectros de RMN-^{1}H (500 MHz, parte superior) e RMN-^{13}C (125 MHz, parte inferior) adquiridos para o filtrado límpido da cápsula 01 – IQSC-USP MCTI/LASSBio onde podemos observar a relação FOS, MEA.H^{+} e FBEA na razão molar **100:70:15**, respectivamente, muito semelhante ao observado anteriormente para as cápsulas provenientes do CIEnP (figura 1, página 3). Com equipamento de campo mais alto, o espectro de RMN-^{1}H (500 MHz, parte superior) evidencia a presença de impurezas na amostra (sinais de menor intensidade espalhados ao longo da janela espectral, entre 3,25-3,40 ppm; entre 3,55-3,74 ppm, entre 3,80-3,90 ppm e entre 3,99-4,03 ppm).

Figura 11. Espectro RMN-^{1}H (500 MHz - D_2O, parte superior) e RMN – ^{13}C (125 MHz - D_2O, parte inferior) do filtrado límpido da cápsula 01 – IQSC-USP MCTI/LASSBio



A figura 11 apresenta na parte inferior, o espectro de RMN-^{13}C (calibrado externamente usando como padrão de referência o sinal de TMSP, δ = 0.00 ppm) adquirido em equipamento Bruker DRX com o núcleo de carbono tendo frequência de ressonância de 125 MHz, em D_2O, para a fração solúvel em D_2O obtida da cápsula 01 IQSC-USP-MCTI enviada via LASSBio. Como já observado anteriormente no espectro de RMN-^{13}C para as cápsulas provenientes do CIEnP (figura

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

2, página 5), o espectro de RMN-^{13}C (parte inferior da figura 11) apresenta 07 (sete) sinais na região entre 40,0 ppm e 70,0 ppm. Com relação à multiplicidade, os sinais em 44,10 ppm e em 60,45 ppm, apresentam-se como dois *singletos* e os sinais centrados em 42,82 ppm ($^3J_{C,P}$ = 8,0 Hz), 43,34 ppm ($^3J_{C,P}$ = 7,0 Hz), 63,37 ppm ($^2J_{C,P}$ = 4,0 Hz) e 64,86 ppm ($^2J_{C,P}$ = 5,0 Hz), apresentam-se como *dubletos*. Um sinal adicional, de menor intensidade e atribuído a uma impureza não identificada, aparece como um *singleto* em 69,28 ppm.

Como este espectro foi adquirido no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio, os sinais com multiplicidade de *dubletos* referem-se a acoplamentos com o núcleo de fósforo, que apresenta spin ½. Os sinais na forma de *singletos* em 44,10 ppm e em 60,45 ppm referem-se aos átomos de carbono do **sal da monoetanolamina na sua forma protonada (MEA.H$^+$)**, presente na cápsula 01 do IQSC-USP conforme pode-se comprovar através dos espectros de RMN-^{1}H e de RMN-^{13}C mostrados nas figuras 1 e 2, páginas 3 e 5 e figuras 6 e 7, páginas 9 e 10, respectivamente. Os sinais centrados em 43,34 ppm e em 63,37 ppm, correspondem aos carbonos da **FOSFOETANOLAMINA (FOS)**. O sinal em 43,34 ppm corresponde ao carbono ligado ao nitrogênio e o sinal em 63,37 ppm ao carbono ligado ao oxigênio. Os sinais centrados em 42,82 ppm e em 64,86 ppm, correspondem aos carbonos da **FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA)**. O sinal em 42,82 ppm corresponde ao carbono ligado ao nitrogênio e o sinal em 64,86 ppm ao carbono ligado ao oxigênio. Estes sinais aparecem como *dubletos* em virtude de acoplamentos com o núcleo de fósforo, que apresenta spin ½.

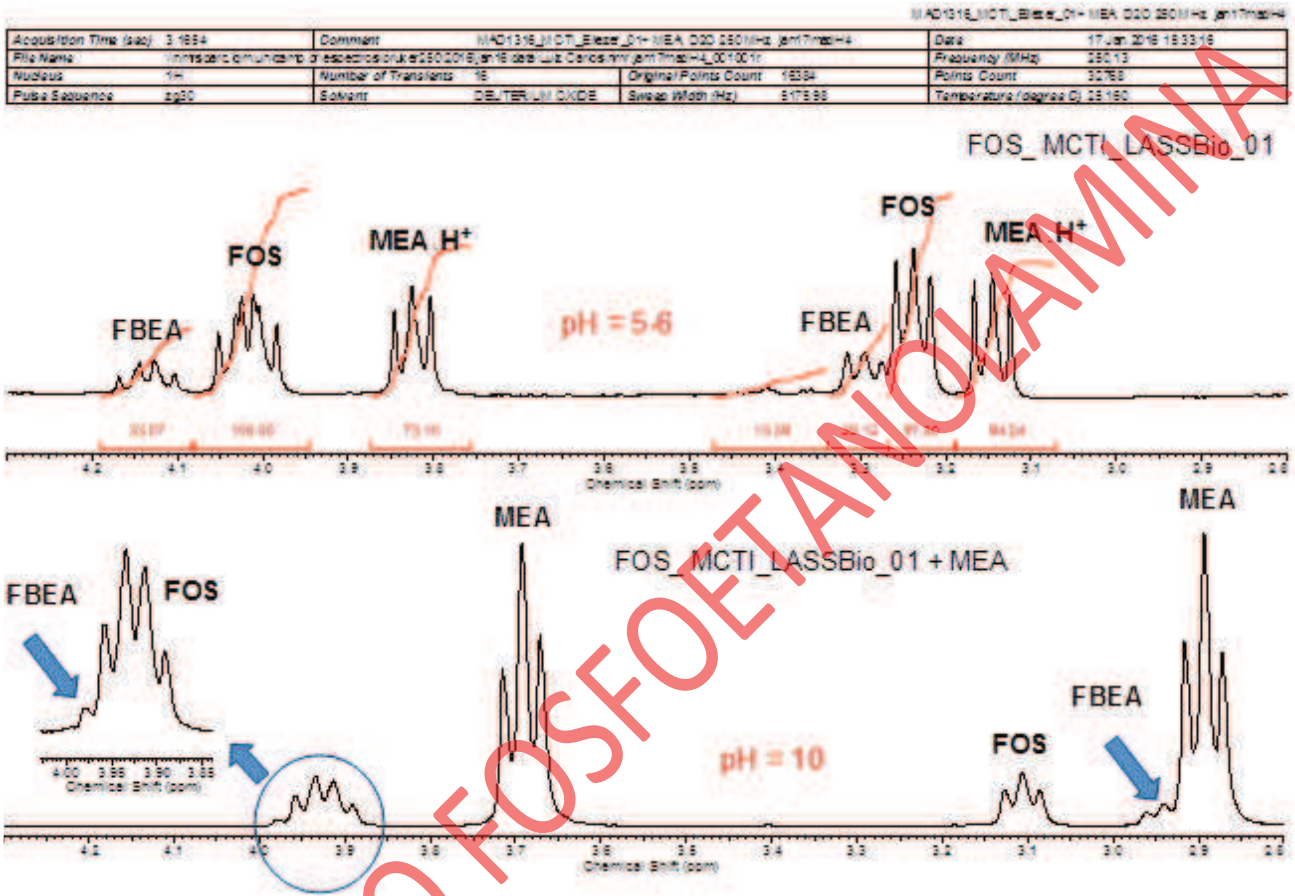
EXPERIMENTO DE ADIÇÃO DE MONOETANOLAMINA (MEA), À FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O: CONFIRMAÇÃO DE SUA PRESENÇA NA AMOSTRA

A figura 12 apresenta, na parte superior, o espectro de RMN-^{1}H do conteúdo da cápsula 01 – IQSC-USP MCTI/LASSBio, solúvel em D_2O. O pH da solução está na faixa de 5-6, levemente ácido. O espectro na parte inferior foi adquirido após adição de monoetanolamina (MEA, destilada e com altíssimo grau de pureza) até pH = 10, bastante básico) à solução em D_2O da amostra mostrada na parte superior. Como agora a MEA.H$^+$ originalmente presente no material da cápsula troca rapidamente o próton a ela associado (H$^+$) com a de MEA (base livre) adicionada, observa-se deslocamento esperado dos hidrogênios ligados ao grupo CH_2 ligado ao átomo de nitrogênio para campo mais alto. Os sinais de monoetanolamina (MEA) agora aparecem em 2,89 ppm e em 3,69 ppm, mais protegidos que os sinais da MEA.H$^+$, que aparecem em 3,14 ppm e em 3,83 ppm e já bem próximos dos sinais de MEA neutra em 2,73 ppm e em 3,61 ppm, como pode-se observar no espectro de RMN-^{1}H da figura 4, página 7.

Estes resultados confirmam, mais uma vez, a presença da monoetanolamina protonada (MEA.H$^+$) entre os componentes da cápsula proveniente do IQSC-USP-MCTI, via LASSBio.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 12. Espectro RMN-^{1}H (250,13 MHz - D_2O) – Expansão superior: Filtrado límpido da cápsula 01 IQSC-USP MCTI/LASSBio) – Expansão inferior: após adição de monoetanolamina (MEA) até pH 10.

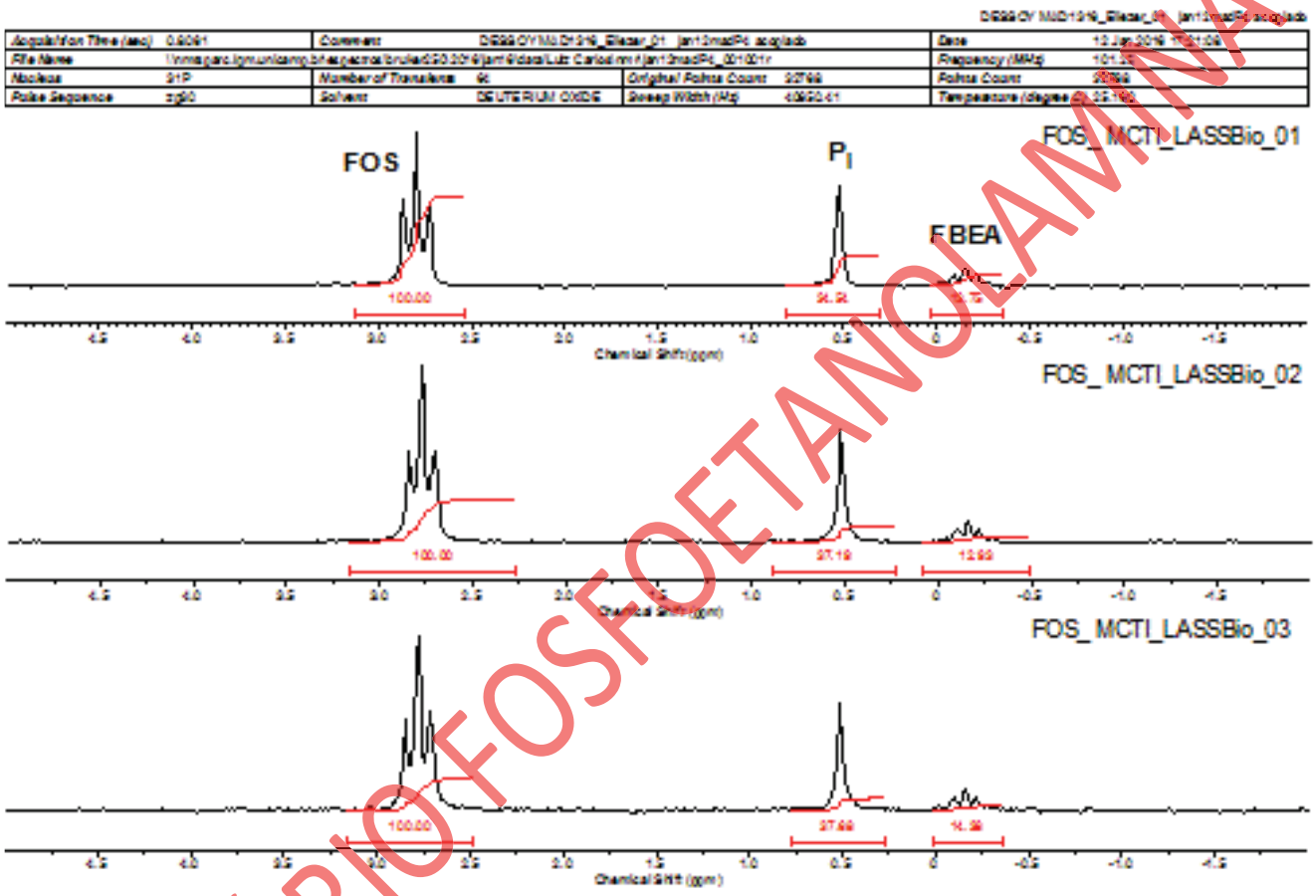


RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Na figura 13 estão apresentados os espectros de RMN-^{31}P no modo totalmente acoplado, adquiridos em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz, em D_2O, para as cápsulas 01, 02 e 03 do IQSC-USP-MCTI recebidas via LASSBio. Estes espectros mostram claramente a presença de 3 (três) espécies distintas contendo fósforo na sua estrutura, em 2,74 ppm, em 0,50 ppm e em –0,15 ppm, em uma razão molar média de **100:36:13**. Os três espectros são muito parecidos, o que mostra que o conteúdo das três cápsulas é praticamente o mesmo, contendo as mesmas espécies de fósforo e em boa concordância com as amostras enviadas pelo MCTI via CIEnP (que apresentam uma quantidade levemente maior de FBEA na sua composição), como mostrado na figura 8, página 11. Conclui-se que as mesmas três espécies de fósforo estão presentes na fração solúvel em H_2O, obtida das cápsulas IQSC-USP provenientes tanto do CIEnP como do LASSBio, sendo estas espécies a **FOSFOETANOLAMINA (FOS)**, **a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA)**, **fosfato inorgânico de cálcio e magnésio (P_i)** além da

monoetanolamina protonada (MEA.H^{+}). Experimentos comprovando a presença de fosfato de cálcio e de magnésio estão mostrados nas páginas 38-39 deste relatório.

Figura 13. Espectro RMN-^{31}P (101,25 MHz - D_2O) - Filtrado límpido das cápsulas 01, 02 e 03 – IQSC-USP MCTI/LASSBio).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Estes experimentos mostram que o conteúdo da fração solúvel em D_2O das cápsulas IQSC-USP, contém aproximadamente:

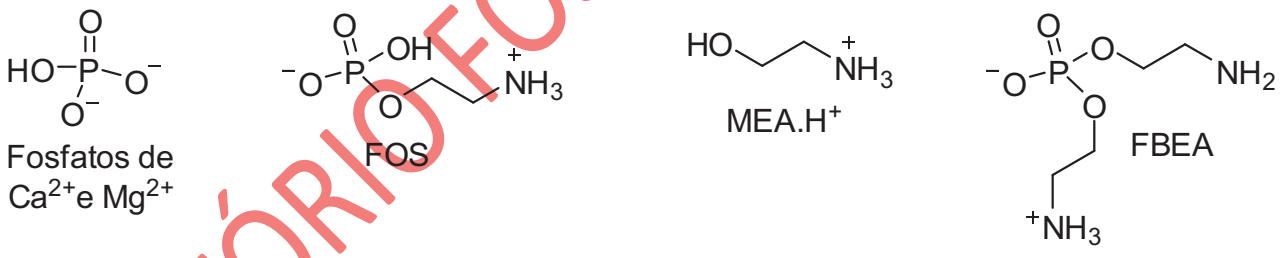
- **45,2% de FOSFOETANOLAMINA (FOS)**
- **31,7% de MONOETANOLAMINA (MEA)**
- **16,3% de Fosfatos (P_i)**
- **6,8% de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA)**

CONCLUSÕES DA ANÁLISE DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O: ANÁLISE DE RMN DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM D_2O DA CÁPSULA DE FOSFOETANOLAMINA
(FOSFOETANOLAMINA FORNECIDA PELO IQSC-USP E ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio)

Essencialmente, as mesmas conclusões da análise das cápsulas provenientes do CIEnP (páginas 14 e 15) aplicam-se ao lote recebido via LASSBio.

A análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1, de carbono-13 e de fósforo-31 (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P) da **fração solúvel em D_2O** permitiu a identificação de 4 (quatro) componentes presentes nas cápsulas fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS, via LASSBio. Podemos observar a presença de 03 (três) destes compostos que possuem fósforo na sua estrutura**:** *componente 1:* **fosfatos de cálcio e magnésio (P_i)**; *componente 2:* a **FOSFOETANOLAMINA (FOS)** na forma de seu sal e associada ao sal da **monoetanolamina ($MEA.H^+$)** e *componente 3:* a **FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA)**. O *componente 4* é a **monoetanolamina protonada ($MEA.H^+$)**. Segundo a análise por RMN-^{1}H, a razão molar entre **FOS, $MEA.H^+$** e **FBEA** é de **100:70:15** e segundo a análise por RMN-^{31}P, a razão molar entre **FOS, P_i** e **FBEA** é de **100:36:13**, respectivamente. Estas espécies estão presentes em equilíbrio em virtude do pH entre 5-6 para o meio, em solução de D_2O (esquema 4).

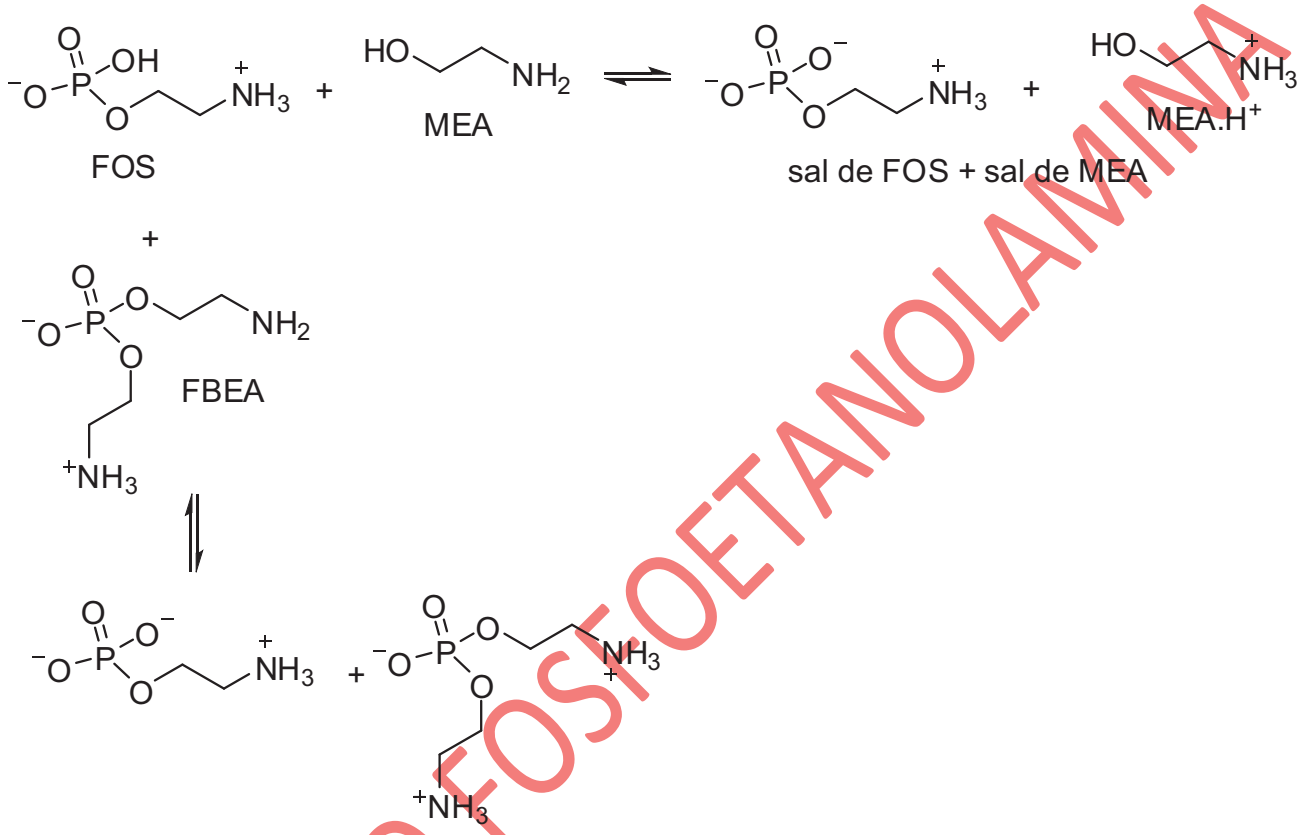
Esquema 4. Espécies presentes na fração solúvel em D_2O - cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via LASSBio.



A análise da fração solúvel mostra que as seguintes espécies podem estar em equilíbrio em meio ácido, como na solução de D_2O com pH 5-6 (esquema 5).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Esquema 5. Equilíbrio químico entre as espécies presentes na fração solúvel em D_2O - cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via LASSBio em solução de D_2O.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Cabe ressaltar a grande variação de peso do conteúdo das cápsulas como mostrado nas páginas 16, 17 e 25 deste relatório, indicando um menor rigor quanto à quantidade de material sólido presente nas cápsulas.

3ª FASE: ANÁLISE DE RMN-^{31}P DO CONTEÚDO INTEGRAL DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA FORNECIDAS PELO IQSC-USP E ENCAMINHADAS PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio

ANÁLISE GRAVIMÉTRICA

Foi efetuada uma análise gravimétrica das cápsulas encaminhadas pelo MCTI ao LQOS, via LASSBio (figura 14). Para tanto, o conteúdo de três cápsulas foi pesado separadamente: cápsula 01: 328 mg, cápsula 02: 278 mg e cápsula 03: 352 mg, totalizando 958 mg. Novamente, foi observada grande variação nas quantidades de material sólido presente em cada uma das cápsulas. O material contido nas três cápsulas foi combinado em um Erlenmeyer e recebeu a adição de 20 mL de H_2O destilada. A suspensão obtida foi deixada em banho de ultrassom por 30 minutos a temperatura ambiente (~25 ^oC, a água do banho foi trocada 2 vezes). Após 30 minutos, observou-se apenas a dissolução parcial do material sólido contido nas cápsulas. O material insolúvel foi separado através de filtração por gravidade com filtro de papel, que havia sido previamente pesado. Ao término da filtração, o material retido no filtro foi lavado com mais 10 mL de H_2O destilada. O material sólido que ficou retido no filtro de papel foi acomodado dentro de um béquer, juntamente com o filtro. A solução aquosa obtida a partir do material da cápsula solúvel em H_2O, também foi transferida para um béquer e, então, ambos foram deixados em estufa a 70 ^oC para secagem até peso constante. Após secagem, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente em dessecador, sob vácuo.

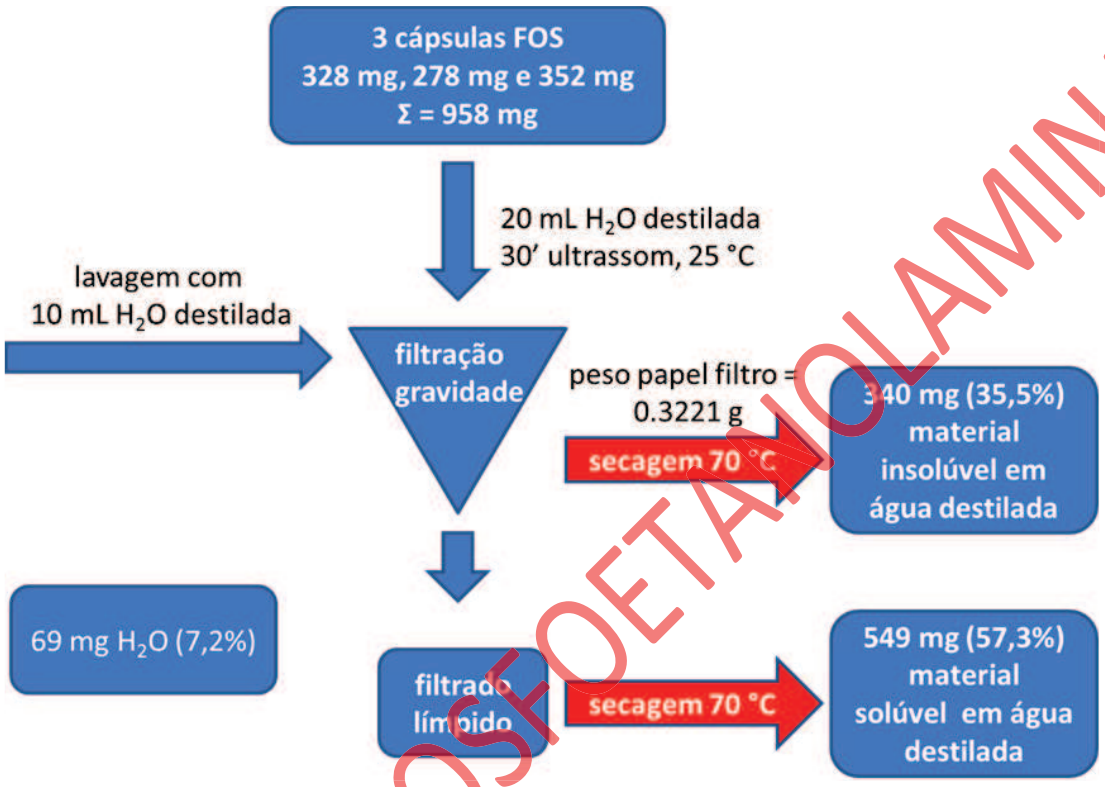
1. **Material insolúvel em H_2O:** após secagem do material sólido a 70 ^oC, o sólido branco resultante foi pesado e acusou um peso de 340 mg, o que corresponde a cerca de 35,5% do total contido nas três cápsulas, de material sólido insolúvel em H_2O, com relação a massa inicial de 958 mg.
2. **Material solúvel em H_2O:** a solução límpida do material solúvel em H_2O também foi deixada para secar a 70 ^oC, resultando em uma massa sólida de aspecto vítreo, de coloração parda, que ao ser pesado, acusou uma massa equivalente a 549 mg, correspondente a 57,3% do peso da massa inicial de 958 mg. Esse material se mostrou higroscópico, uma vez que a sua massa aumentou quando exposto à atmosfera ambiente ao mesmo tempo que o material passou a apresentar uma consistência pegajosa.

Obs. Do total de 958 mg presentes nas 03 cápsulas, cerca de 69 mg (7,2%) corresponde a H_2O, em virtude de o conteúdo das cápsulas ser higroscópico.

340 mg (material solúvel em D_2O) + 549 mg (material insolúvel em D_2O) + 69 mg (H_2O) = 958 mg (conteúdo de 3 cápsulas)

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 14. Análise gravimétrica das cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via LASSBio.

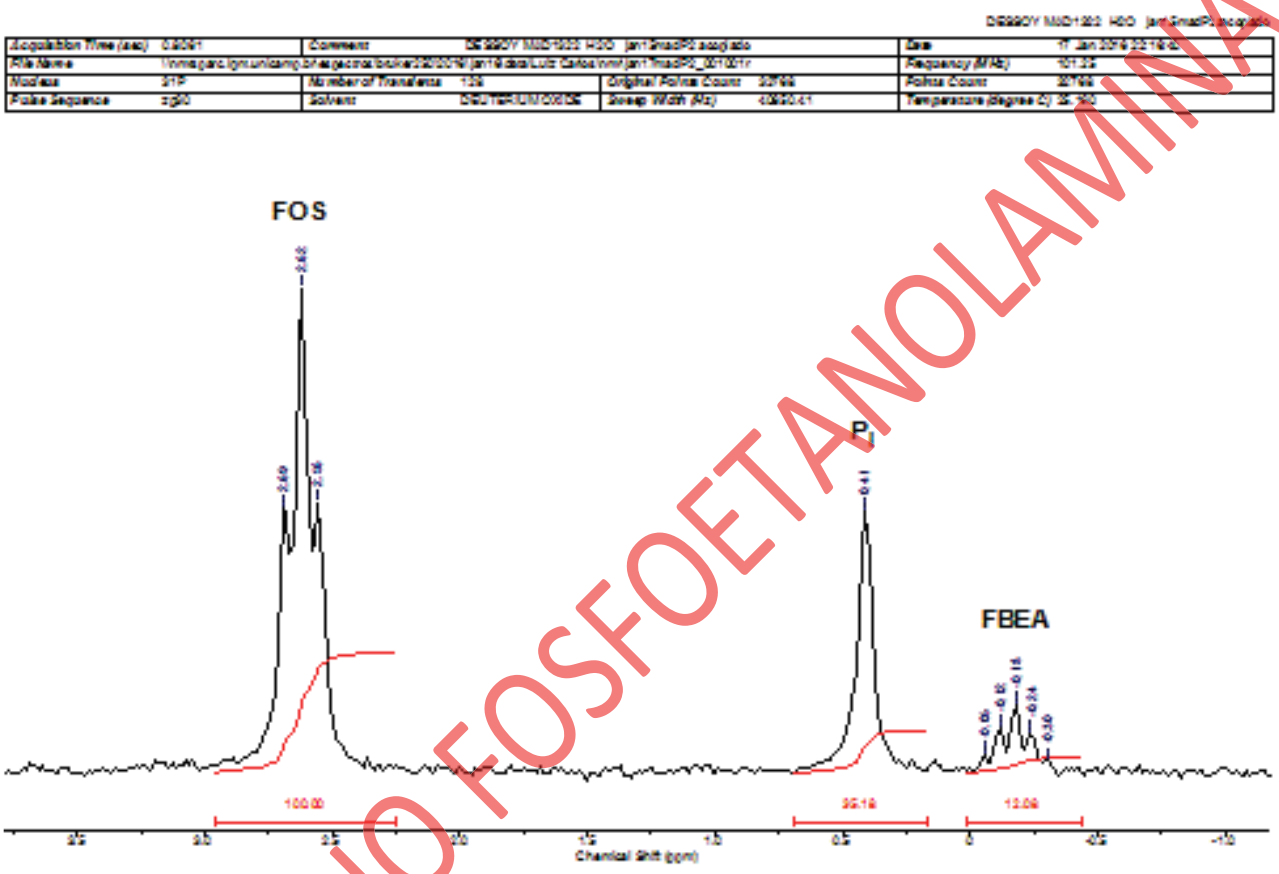


RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

A figura 15 mostra o espectro de RMN-^{31}P totalmente acoplado para a fração solúvel em H_2O, adquirido em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz, em D_2O - Cápsula IQSC-USP-MCTI recebida via LASSBio. Neste experimento, detectou-se a presença de três compostos contendo fósforo em sua estrutura (esse espectro é muito semelhante ao espectro da figura 8, página 11, como é esperado). *Primeiro componente:* um sinal de fósforo com deslocamento químico em torno de 2,62 ppm, desdobrado em um *tripleto* $J_{P,H}$ = 6.8 Hz, correspondendo ao átomo de fósforo da molécula de **FOSFOETANOLAMINA (FOS)**. O núcleo de fósforo acopla com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligados ao átomo de oxigênio, assim desdobrando em um *tripleto*, conforme previsto pela teoria de espectroscopia de RMN-^{31}P. *Segundo componente:* o sinal em 0,41 ppm mostra apenas um *singleto* e é devido à presença de fosfatos inorgânicos de cálcio e magnésio (P_i) no meio (como comprovado pelos experimentos apresentados nas páginas 38-39 deste relatório). *Terceiro componente:* o sinal em torno de –0,18 ppm aparece como um *quinteto* com constante de acoplamento $J_{P,H}$ = 6.2 Hz e indica que o átomo de fósforo está acoplando com dois grupos CH_2. Este sinal indica a presença de **FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA)** no meio. Não há outra espécie de

fósforo na fração solúvel em H_2O destilada. Este experimento confirma o que já havia sido observado anteriormente (figuras 8 e 13, páginas 11 e 22, respectivamente).

Figura 15. Espectro RMN-^{31}P (101,25 MHz - H_2O) da fração **solúvel** em água destilada da cápsula de FOS (IQSC-USP-MCTI-LASSBio).



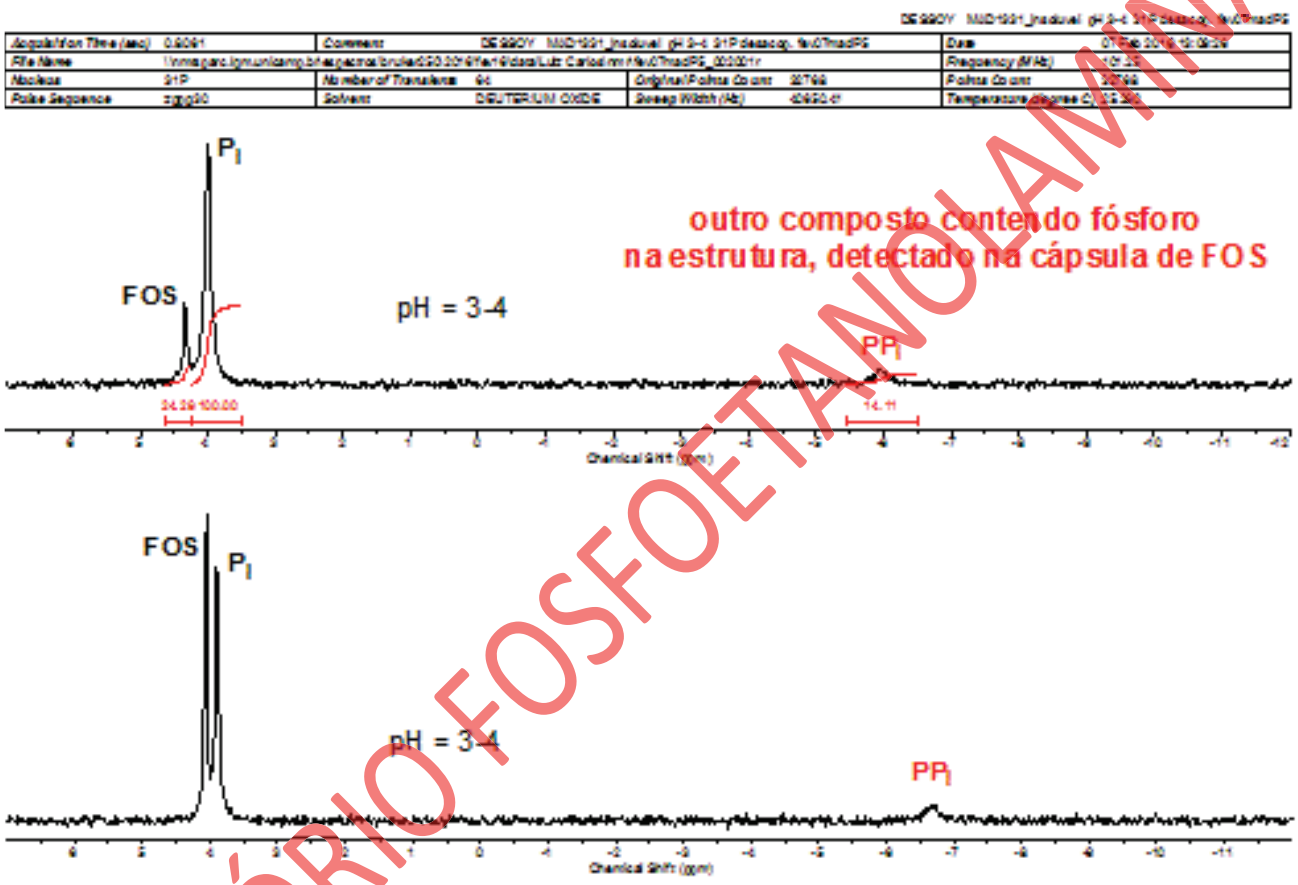
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

ANÁLISE DA FRAÇÃO INSOLÚVEL EM H_2O APÓS DISSOLUÇÃO EM HCl DILUÍDO

Em outro experimento, **a fração insolúvel** em H_2O (obtida a partir do experimento de gravimetria para cápsula IQSC-USP-MCTI, via LASSBio) foi dissolvida com solução aquosa de HCl (0,5 M), resultando em uma solução totalmente límpida, desprovida de resíduos sólidos, com pH final < 0. O valor de pH foi elevado a 3-4 pela adição de solução aquosa de hidróxido de sódio (1 M) (em pH < 0, a FOS e o P_i apresentam deslocamentos químicos muito próximos e a elevação do pH acima desse valor resulta na separação de um precipitado branco). A figura 16 mostra na sua parte superior, o espectro de RMN-^{31}P com desacoplamento em banda larga de hidrogênio adquirido em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz, em D_2O para essa amostra. Nesse espectro observa-se um sinal de fósforo com

deslocamento químico em torno de 4,2 ppm que corresponde ao átomo de fósforo da molécula de **FOSFOETANOLAMINA (FOS)** residual, não dissolvida na água destilada.

Figura 16. Espectros de RMN-^{31}P (101,25 MHz – HCl diluído) da fração **insolúvel em água** da cápsula de FOS (IQSC-USP-MCTI) a pH 3-4 (parte superior), após adição de FOS autêntica (parte inferior).

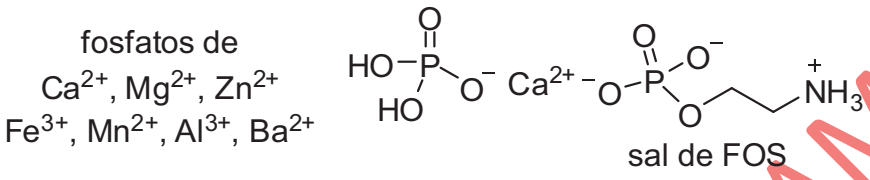


Para fins de comprovação, a parte inferior da figura 16 mostra o espectro de RMN-^{31}P com desacoplamento em banda larga de hidrogênio adquirido em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz para uma amostra que foi preparada da seguinte maneira: uma mistura contendo material insolúvel da cápsula (30 mg) e uma amostra de FOS autêntica (10 mg, sintetizada no LQOS, conforme discussão na parte B deste relatório) foi completamente dissolvida com solução aquosa de HCl (0,5 M). O valor de pH da solução resultante foi igualmente aumentado ao valor de 3-4 antes da aquisição do espectro. Pode-se observar o aumento na intensidade do sinal de FOS, após a adição de FOS pura preparada no LQOS, embora com pequena variação no deslocamento químico. Esta fração insolúvel de

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

FOSFOETANOLAMINA pode estar associada à FOSFOETANOLAMINA na forma de seu sal de cálcio combinada com fosfato de cálcio, embora outros íons metálicos como de magnésio, zinco, ferro, manganês, alumínio e bário estejam presentes no meio (esquema 6).

Esquema 6. Fosfoetanolamina em combinação com fosfato de cálcio.



O sinal em 4,0 ppm mostra a presença principalmente de **fosfatos inorgânicos (P_i) de cálcio (Ca) e magnésio (Mg)**, além de pequenas quantidades **de íons zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al) e bário (Ba)** presentes no meio (como comprovado pelos experimentos apresentados nas páginas 38-39 deste relatório). **Observou-se a presença de mais um sinal em torno de –6,0 ppm, não detectado anteriormente nas frações solúveis em H_2O, que evidencia a presença de espécies de pirofosfato inorgânico** (PP_i) de cálcio (Ca) e magnésio (Mg), além de pequenas quantidades de íons zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al) e bário (Ba), formados como produtos secundários durante o processo de síntese da FOSFOETANOLAMINA, como será demonstrado nas páginas 38-39 deste relatório. Pirofosfatos são anidridos do ácido fosfórico contendo dois átomos de fósforo em sua estrutura. Não foi possível observar a presença de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) no meio, o que comprova que a FBEA é totalmente solúvel na quantidade de água utilizada no experimento.

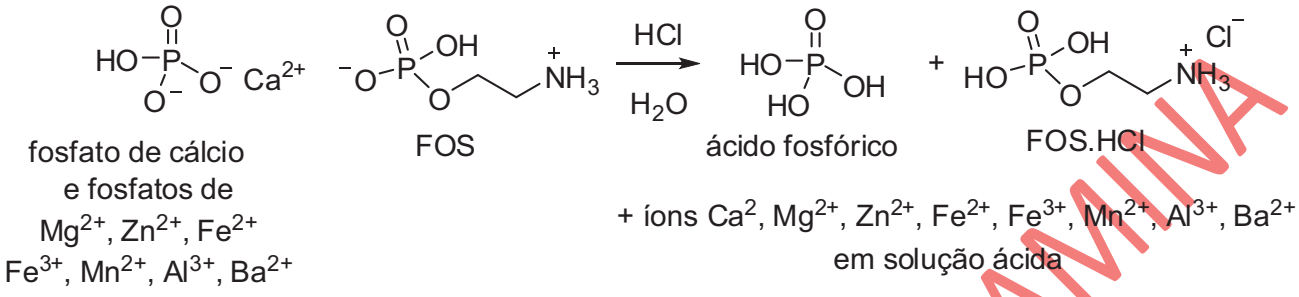
Este experimento mostra que a fração insolúvel em H_2O apresenta cerca de:

- **72,3% de fosfatos inorgânicos (P_i)**
- **17,5% de FOSFOETANOLAMINA associada a íons metálicos**
- **10,2% de pirofosfatos inorgânicos (PP_i)**

Em meio ácido, todos os sais de cálcio e outros íons metálicos serão protonados, formando ácido fosfórico, a fosfoetanolamina e íons cálcio em solução aquosa ácida (esquema 7).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Esquema 7. Fosfoetanolamina em combinação com fosfato de cálcio e outros íons metálicos em meio ácido.



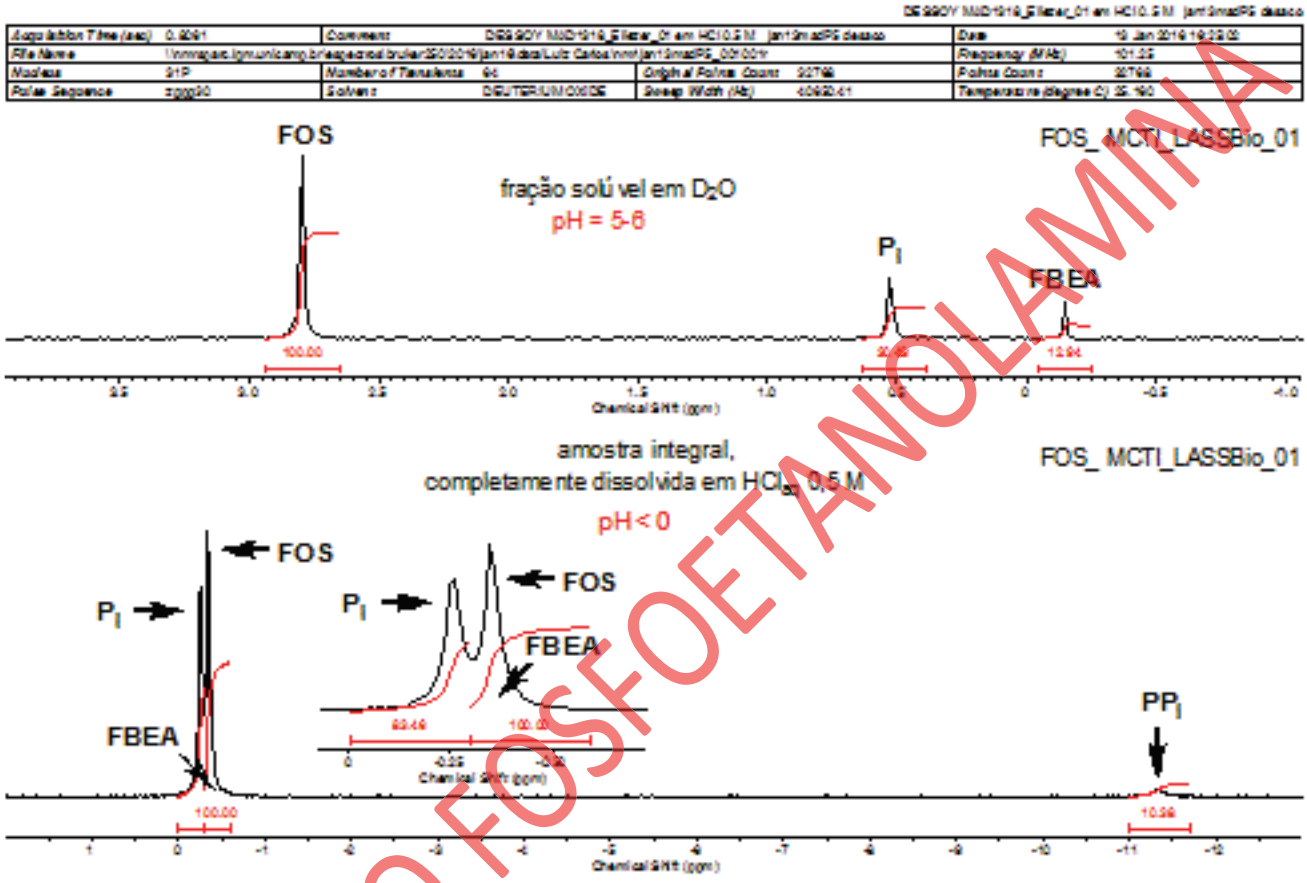
ANÁLISE DO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS NA ÍNTEGRA APÓS DISSOLUÇÃO EM HCl DILUÍDO

Em um novo experimento, uma amostra do **material integral** de uma das cápsulas de FOS IQSC-USP-MCTI recebida via o LASSBio foi **completamente** dissolvida com solução aquosa de HCl (0,5 M), resultando em uma solução totalmente límpida, apresentando pH < 0. O espectro de RMN-^{31}P com desacoplamento em banda larga de hidrogênio dessa amostra está mostrado na **parte inferior** da figura 17.

Em pH < 0, os deslocamentos químicos dos compostos fosforilados presentes na mistura contida na cápsula de FOS mudam drasticamente em relação aos deslocamentos químicos medidos para esses mesmos compostos em pH apenas levemente ácido, conforme se configura o caso do espectro de RMN-^{31}P com desacoplamento em banda larga de hidrogênio adquirido para a **fração solúvel** em água destilada do material da cápsula (pH 5-6), que é mostrado na **parte superior** da figura 17, para fins de comparação. Observa-se que em meio altamente ácido, a FOS passa a ressonar em campo levemente mais alto do que o ácido fosfórico, identificado no espectro por "P_i" (o ácido fosfórico, ácido de força moderada, é formado a partir da protonação dos sais de fosfato inorgânico presentes no meio pelo HCl, um ácido forte). A atribuição dos sinais de FOS e P_i foi feita com base na análise do espectro de RMN-^{31}P no modo totalmente **acoplado** (figura 18, página 32 e figura 20, página 35).

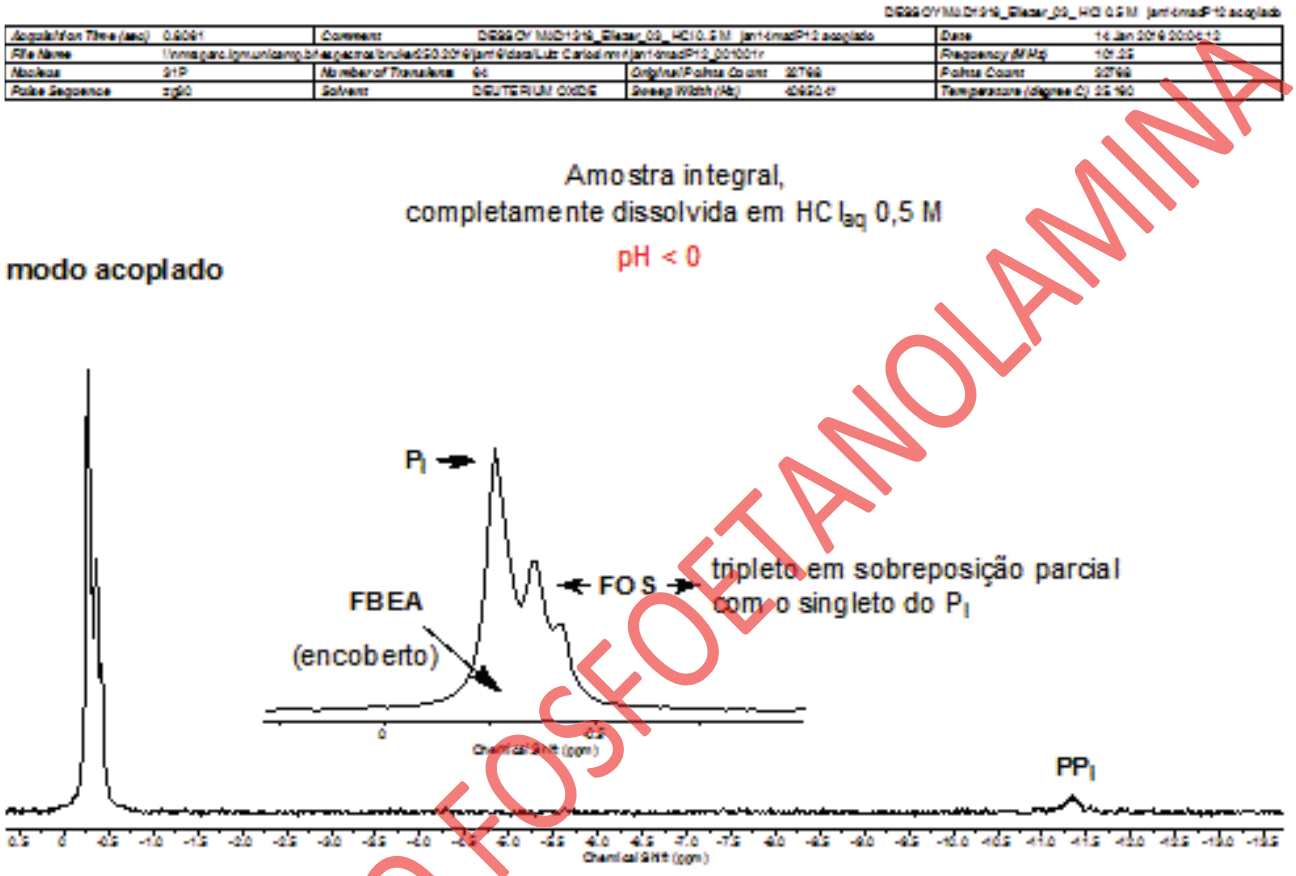
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 17. Espectro de RMN-^{31}P (101,25 MHz) - FOS - (Cápsula 01) – IQSC-USP MCTI/LASSBio) – fração solúvel em água destilada (D_2O, parte superior) e (parte inferior) após dissolução total com solução aquosa de HCl (0,5 M).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 18. Espectro de RMN-^{31}P acoplado (101,25 MHz, D_2O) - FOS - (Cápsula 01) – IQSC-USP MCTI/LASSBio) – amostra integral após dissolução total com solução aquosa de HCl (0,5 M).

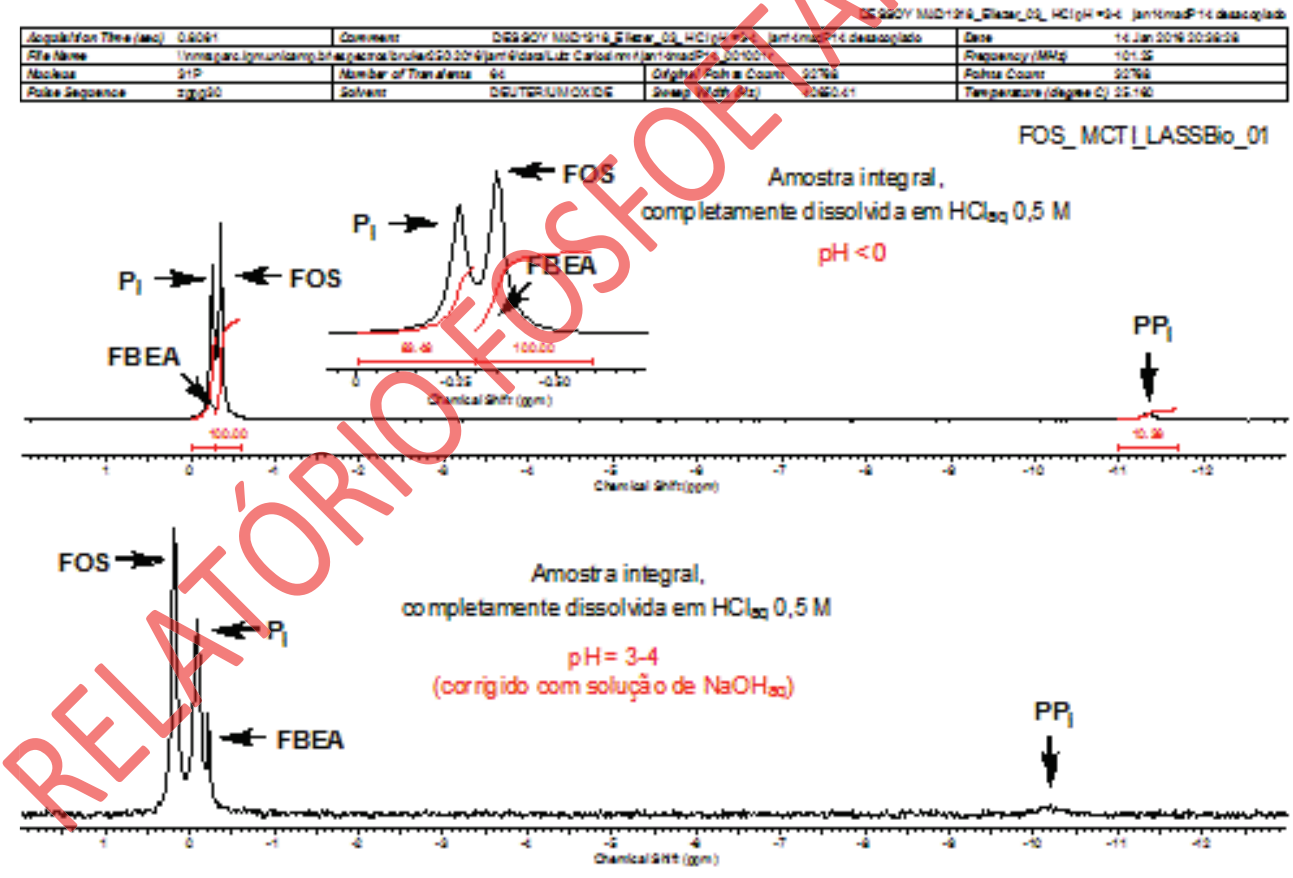


No modo totalmente acoplado, o sinal relativo à FOS diferencia-se do sinal relativo ao P_i pelo fato daquele desdobrar-se num *tripleto*, ao passo que a multiplicidade do sinal devido ao P_i continua sendo a de *singleto*. Cabe ressaltar, que neste pH baixo, a FOS e o diéster (FBEA) apresentam praticamente os mesmos valores de deslocamento químico (isso será demonstrado posteriormente nesse relatório, figura 19, página 33). O espectro de RMN-^{31}P da figura 17 (página 31) não pôde ser perfeitamente integrado uma vez que a pequena diferença de deslocamento químico entre a FOS e P_i gera sinais não completamente separados até a linha base. Contudo, a análise das integrais, ainda assim, permitiu concluir que as duas espécies estão presentes em quantidades praticamente equimolares, lembrando que o valor da integral para a área do sinal da FOS (integral = 100) nesse espectro inclui a integração do sinal da FBEA que está sobreposto ao sinal daquela e sabidamente, corresponde a aproximadamente 13, como pode ser visto na parte superior da figura 17.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Visto que os sinais devidos aos diferentes compostos fosforilados em solução com valor de pH muito baixo tendem a apresentar valores de deslocamento químico muito parecidos, acarretando na sobreposição parcial e/ou total de sinais, elevou-se o pH a valores de 3 a 4 através da adição de solução aquosa de hidróxido de sódio. A adição de quantidades maiores de solução de hidróxido de sódio com o intuito de elevar ainda mais o valor de pH levou à turbidez da amostra e à formação de um precipitado "gelatinoso". A figura 19 mostra na sua parte superior, exatamente o mesmo espectro mostrado na parte inferior da figura 17 (página 31) e, na parte inferior, o espectro de RMN-^{31}P adquirido em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz para a mesma amostra, mas com valor de pH ajustado ao valor 3-4.

Figura 19. Espectro de RMN-^{31}P (101,25 MHz – HCl diluído) - FOS – IQSC-USP MCTI/LASSBio, cápsula 01) – conteúdo integral completamente dissolvido com solução aquosa de HCl (0,5 M) (pH < 0, parte superior e pH = 3-4, parte inferior).



Comparando-se os dois espectros da figura 19, observa-se que em pH 3-4 a FOS passa a ressonar em campo mais baixo do que P_i (o campo diminui para o lado esquerdo e aumenta para o

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

lado direito). Além disso, passa-se a detectar novamente o sinal devido à FBEA, cujo deslocamento químico moveu-se para campo mais alto em resposta à mudança de pH do meio. Embora nesse valor de pH os sinais relativos aos três compostos principais da mistura contida na cápsula contendo fósforo na sua estrutura estejam todos aparentes, a integração do espectro ainda fica imprecisa devido à sobreposição parcial desses sinais.

Independentemente do valor de pH da amostra, os espectros de RMN-^{31}P da figura 19 (página 33) apresentam um **sinal alargado** em torno de –12 ou de –10 ppm, que não é detectado nos espectros de RMN-^{31}P adquiridos para a **fração solúvel em água destilada** do material contido nas cápsulas de FOS. Baseado no valor de deslocamento químico desse sinal, assume-se que ele se deva à presença de uma espécie de pirofosfato inorgânico (PP_i), que tipicamente apresenta uma estreita linha de ressonância (*singleto*) nessa região do espectro de RMN-^{31}P. O alargamento da linha espectral pode ser causado pela presença de íons divalentes como cálcio, magnésio, zinco, manganês e bário e trivalentes como alumínio e ferro presentes no meio que podem gerar sais de pirofosfato com rotação restrita. Dessa forma, os deslocamentos químicos dos dois átomos constituintes do pirofosfato deixam de ser equivalentes e, assim, passam a acoplar entre si, contribuindo para o alargamento do sinal.

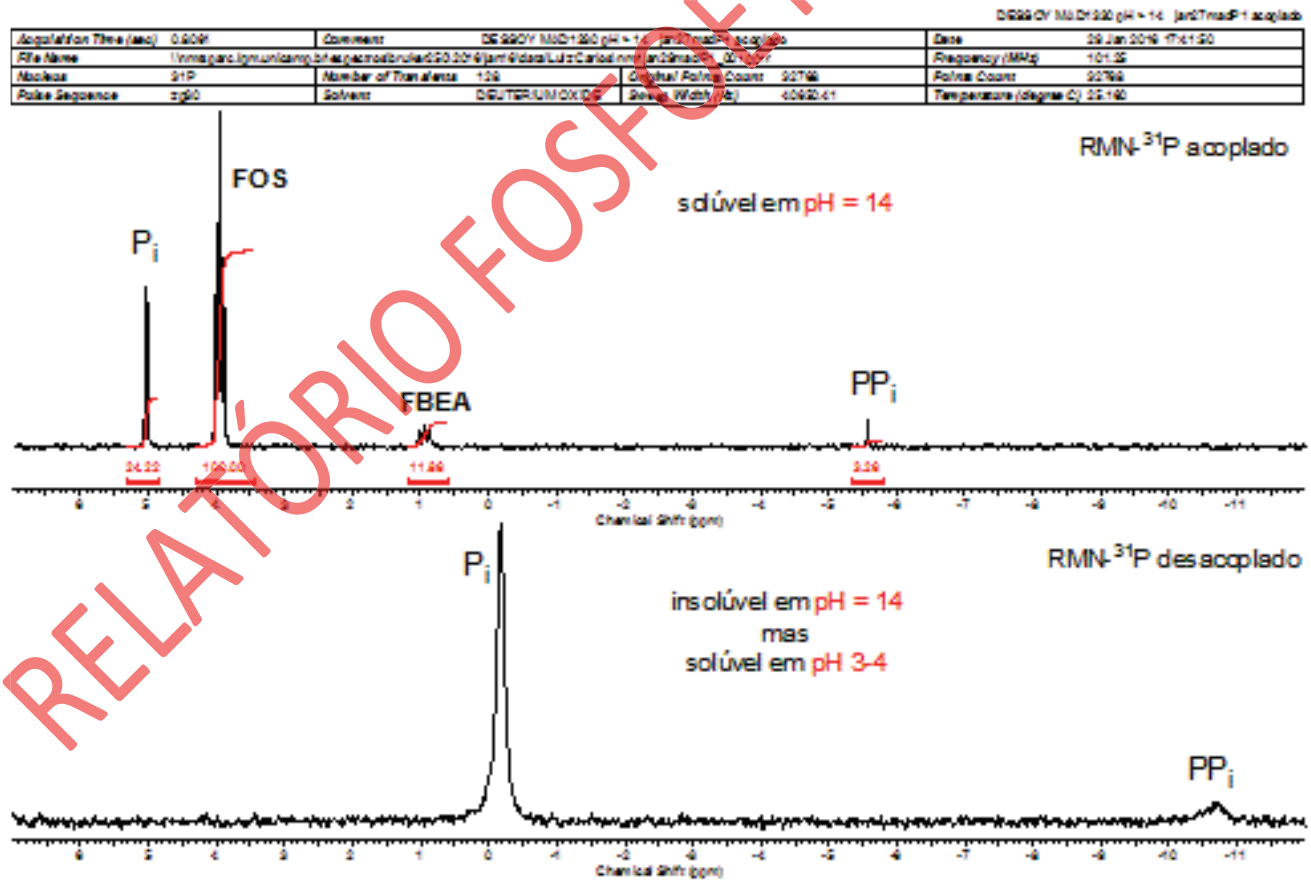
Objetivando a verificação dessa hipótese, preparou-se uma nova amostra a partir do material integral da cápsula de FOS (120 mg) que foi completamente dissolvido em solução aquosa de HCl (0,5 M). A solução límpida assim obtida foi alcalinizada (pH = 14) com solução aquosa de NaOH 6 M. Nesse valor de pH, íons divalentes como cálcio e magnésio, além de outros íons metálicos como zinco, ferro, manganês, alumínio e bário presentes no meio, costumam precipitar na forma de seus respectivos hidróxidos. O precipitado branco leitoso (gelatinoso) que se formou pela alcalinização foi removido por meio de filtração por gravidade através de filtro de papel. A solução límpida assim obtida foi submetida à análise de RMN-^{31}P em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz no modo totalmente acoplado, conforme mostrado na parte superior da figura 20. Nesse espectro, pode-se observar um fino *singleto* em torno de –5,6 ppm, região típica de ressonância de pirofosfato (PP_i) de sódio (íon monovalente) em pH altamente alcalino; dessa forma confirmando que o sinal alargado em torno de –10 ou de –12 ppm do espectro das figuras 17 e 19 é realmente devido a espécies de pirofosfato com rotação restrita. Além disso, observa-se a presença dos sinais dos demais constituintes da mistura da cápsula de FOSFOETANOLAMINA: FBEA (sinal em 0,9 ppm): FOS (sinal em 3,9 ppm) e P_i (sinal em 5,05 ppm). No entanto, chama a atenção o fato da quantidade de P_i nesse último espectro estar bastante reduzida em relação à quantidade de FOS (a razão molar FOS:P_i revelada no espectro adquirido da amostra ácida da figura 19 é em torno de 1:1).

Diante disso, o precipitado separado da solução alcalina foi redissolvido com solução aquosa de HCl (0,5 M) e a solução límpida assim obtida teve o valor de pH ajustado para 3-4 pela

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

adição de solução aquosa de hidróxido de sódio. A partir dessa amostra foi adquirido um espectro de RMN-^{31}P no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz, mostrado na parte inferior da figura 20. Observam-se dois sinais nesse espectro: um *singleto* alargado em torno e –0,2 ppm devido a fosfato inorgânico (P_i) e o sinal largo em torno de –10,8 ppm do pirofosfato inorgânico (PP_i). Baseado nesses resultados de RMN-^{31}P e no comportamento de solubilização e precipitação em resposta à mudança de pH do meio, pode-se concluir que uma parte considerável do conteúdo insolúvel em água destilada das cápsulas de FOS é formada por fosfato de cálcio, um mineral solúvel em ácidos minerais diluídos e praticamente insolúvel em pH neutro ou alcalino, além de fosfatos de magnésio (Mg), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al) e bário (Ba), como comprovado pelos experimentos descritos nas páginas 38-39.

Figura 20. Espectros de RMN-^{31}P (101,25 MHz) - FOS – IQSC-USP MCTI/LASSBio, cápsula 01 – fração solúvel em pH = 14, em modo acoplado (parte superior) e fração insolúvel em pH = 14, solubilizada em HCl_{aq} 0,5 M, seguido de correção de pH 3-4, em modo desacoplado (parte inferior).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

CONCLUSÃO DA 3ª FASE: ANÁLISE DE RMN-^{31}P DO CONTEÚDO INTEGRAL DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) FORNECIDAS PELO IQSC-USP E ENCAMINHADAS PELO MCTI AO LQOS, VIA LASSBio

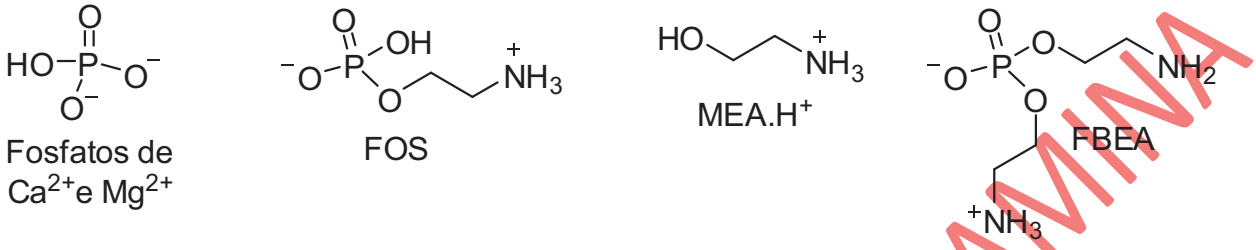
ANÁLISE GRAVIMÉTRICA

A análise gravimétrica destas cápsulas revelou que seu conteúdo apresenta 35,5% de material, insolúvel em água destilada, que em sua maior parte é constituída de fosfato inorgânico (P_i) na forma de cálcio e magnésio, mas também associado a outros íons metálicos como manganês, ferro, alumínio, zinco e bário (ver páginas 38-39 deste relatório). A análise de RMN-^{31}P da fração insolúvel em água, mas solúvel em solução diluída de HCl, permitiu observar a presença de uma quantidade residual de FOS e mais uma espécie de fósforo na amostra integral das cápsulas que não foi detectada na fração solúvel do conteúdo das cápsulas de fosfoetanolamina: pirofosfato inorgânico (PP_i, na forma de sais de cálcio e magnésio, mas também associado a outros íons metálicos como manganês, ferro, alumínio, zinco e bário), embora em quantidade bem menor do que a de fosfato de cálcio (Ca) e magnésio (Mg), além de pequenas quantidades de fosfatos de zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al) e bário (Ba). Além disso, o espectro de RMN-^{31}P da fração solúvel em água destilada mostra que cerca de 57,3% do material contido nas cápsulas é constituído de FOSFOETANOLAMINA na forma de seu sal (FOS), monoetanolamina protonada ($MEA.H^+$), FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) e fosfato inorgânico de cálcio e de magnésio (P_i). Como descrito anteriormente (páginas 25-27), cerca de 7,2% do conteúdo do material sólido presente nas cápsulas é H_2O, em virtude deste material ser higroscópico.

Em total conformidade com as análises de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1, de carbono-13 e de fósforo-31 (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P) realizadas anteriormente, a análise da **fração solúvel em H_2O** (após secagem a 70 °C e solubilização de uma amostra da massa seca em água deuterada) permitiu a identificação de 04 (quatro) compostos presentes nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via LASSBio. Dentre estes, 03 (três) compostos contém fósforo em sua estrutura: fosfatos inorgânicos (de cálcio e magnésio), a FOSFOETANOLAMINA (FOS) na forma de seu sal e associada ao sal da monoetanolamina ($MEA.H^+$) e a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA), um diéster do ácido fosfórico. Segundo a análise por RMN de ^{31}P, a razão molar entre FOS, P_i (fosfato inorgânico) e FBEA é de **100:33:16**, sendo que a relação encontrada para FOS e FBEA pelas duas técnicas (RMN-^{1}H e de RMN-^{31}P) é a mesma (variação considerada dentro dos limites do erro experimental). O quarto componente é a monoetanolamina protonada ($MEA.H^+$). Estas espécies estão presentes em equilíbrio em virtude do pH levemente ácido (pH 5-6) do meio (esquema 8).

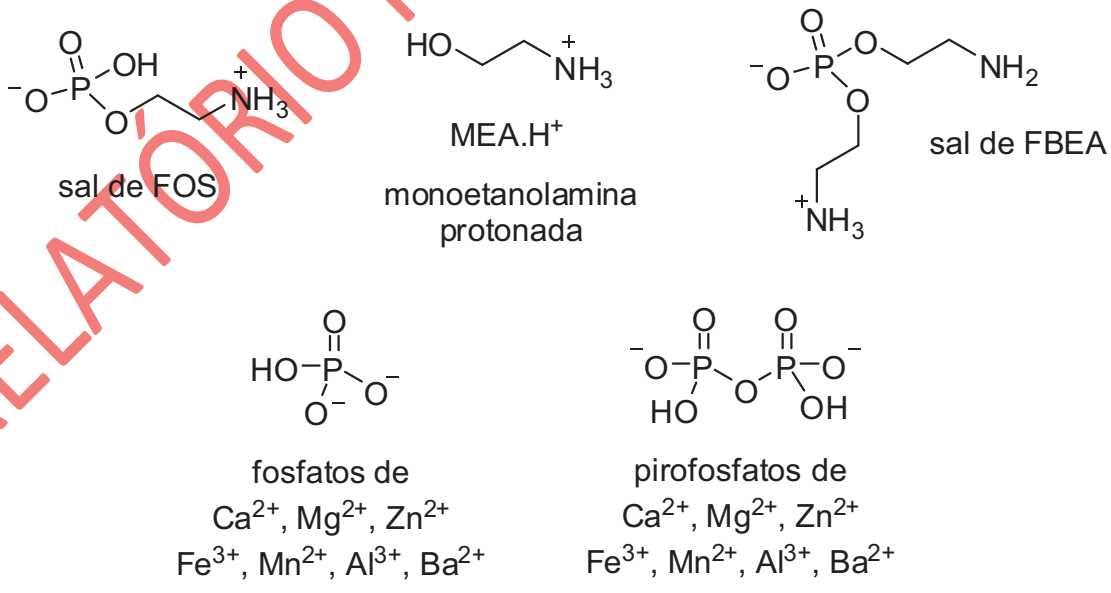
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Esquema 8. Espécies presentes na fração solúvel em H_2O destilada das cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via LASSBio.



Em última análise, considerando também a fração das cápsulas que é insolúvel em H_2O destilada, o sólido contido nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) contém 05 compostos químicos, independente da presença dos íons cálcio (Ca), magnésio (Mg), além de pequenas quantidades de íons zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al) e bário (Ba) associados (esquema 9), a saber: **(1) FOSFOETANOLAMINA na forma de seu sal (FOS); (2) Monoetanolamina protonada ($MEA.H^+$); (3) FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) na forma de seu sal; (4) Fosfatos de Ca, Mg, além de pequenas quantidades de zinco, ferro, manganês, alumínio e bário (P_i); (5) Pirofosfatos de cálcio, magnésio, além de pequenas quantidades de zinco, ferro, manganês, alumínio e bário (PP_i).**

Esquema 9. Espécies presentes nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via LASSBio.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ÍONS METÁLICOS NO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS DE FOSFOETANOLAMINA IQSC-USP-MCTI RECEBIDAS VIA LASSBio[a)]

A fração solúvel em água destilada, a fração insolúvel em água destilada e o conteúdo na íntegra de 04 (quatro) cápsulas de FOS IQSC-USP-MCTI recebida via LASSBio, foram submetidos à análise de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) com o objetivo de quantificar a presença de íons Ca^{2+}, Mg^{2+} e Zn^{2+} e outros elementos inorgânicos (tabela 1, página 39). As 04 (quatro) cápsulas foram abertas e o material sólido branco contido em cada cápsula foi pesado. O peso do material sólido contido em cada cápsula foi: cápsula 01: 342 mg; cápsula 02: 358 mg; cápsula 03: 233 mg; cápsula 04: 331 mg. Novamente, observamos grande diferença entre o peso do material sólido contido em cada cápsula.

Os parâmetros do equipamento (Perkin-Elmer, modelo Optima 8300) utilizados nas análises foram: potência de rádio frequência de 1400 W; fluxo do argônio do plasma de 15 L/min; fluxo de argônio auxiliar de 0,5 L/min; fluxo do gás de nebulização de 0,7 L/min; **sendo que as análises foram feitas em triplicata**. As amostras das cápsulas e das frações insolúvel e solúvel (solubilidade em H_2O destilada) foram dissolvidas em HCl 4% m/m. As curvas utilizadas para a quantificação dos analitos compreenderam as concentrações de 0,05-2 mg/L para Zn, Fe, Mn, Al e Ba e 10-500 mg/L para Ca e Mg. **Foram feitos testes de adição e recuperação para avaliação da exatidão do método.**

Estes testes são feitos por meio da adição de quantidades conhecidas dos analitos à amostra e posterior análise para avaliação da quantidade do elemento adicionada que é encontrada (valores expressos como % de recuperação). Foram pesadas quatro cápsulas, cuja massa total foi utilizada para a avaliação da exatidão do método e para a quantificação da concentração total dos elementos (**testes feitos em triplicata**). **Já para a quantificação na fração insolúvel, a pesagem foi feita em duplicata em função da quantidade disponível do material.** Os resultados para os testes de adição e para as concentrações dos elementos nas amostras estão apresentados na Tabela 1.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Tabela 1. Recuperações obtidas para os testes de adição e concentração dos analitos nas diferentes frações das amostras das cápsulas (n=2 para a fração insolúvel e n=4 para o conteúdo integral das cápsulas).

Íon	Recuperação (%)	Fração solúvel (mg/L)	Fração insolúvel (mg/kg)	Cápsula (mg/kg)
Ca	105 ± 2	114,3	239 ± 10 g/kg*	85,4 ± 1,4 g/kg*
Mg	84 ± 2	47,8	7,4 ± 0,1 g/kg*	5,02 ± 0,03 g/kg*
Zn	91 ± 2	< LD**	5,8 ± 0,7	1,2 ± 0,1
Fe	85± 8	< LD	109 ± 71	25,6 ± 0,3
Mn	81± 2	< LD	13,1 ± 1,1	5,6 ± 0,1
Al	98 ± 4	< LD	80,2 ± 0,8	29,7 ± 0,6
Ba	94 ± 1	< LD	16,6 ± 5,2	5,21 ± 0,04

* Os valores para Ca e Mg são mostrados em g/kg e os demais elementos em mg/kg;
**Abaixo do limite de determinação - primeiro ponto da curva analítica de calibração (0,05 mg/L).

A fração das cápsulas, solúvel em água destilada, apresenta íons cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em quantidade de mg/L. Não foi possível detectar a presença de íons zinco (Zn). Portanto, na fração solúvel em água destilada, pode-se confirmar a presença de fosfatos de Ca^{2+} e de Mg^{2+}.

A fração das cápsulas, insolúvel em água destilada, posteriormente dissolvido em HCl 4% m/m, apresenta íons cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em quantidades de g/kg, além de zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al) e bário (Ba) em quantidade de mg/kg. Portanto, na fração insolúvel em água, pode-se confirmar a presença de fosfatos de Ca^{2+} e de Mg^{2+} e de pirofosfatos de Ca^{2+} e de Mg^{2+}, além de outros íons metálicos, não decorrentes do processo de síntese química.

O conteúdo integral das cápsulas, dissolvido em HCl 4% m/m, apresenta grande quantidade de íons cálcio (Ca) e magnésio (Mg), além de pequenas quantidades de íons zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al) e bário (Ba) em quantidade de mg/kg. Portanto, o conteúdo das cápsulas na íntegra apresenta a presença de fosfatos de cálcio, magnésio, zinco, ferro, alumínio, manganês e bário, além de pirofosfatos de cálcio, magnésio, zinco, ferro, alumínio, manganês e bário.

---

a) Estas determinações foram realizadas no laboratório de pesquisas da Profa. Solange Cadore, no Instituto de Química da UNICAMP, com o auxílio da doutoranda Sra. Emanueli do Nascimento da Silva.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

ANÁLISE DE RMN DE LOTE DE 282,87 GRAMAS DE FOSFOETANOLAMINA (FOS)
(FOSFOETANOLAMINA FORNECIDA PELO IQSC-USP E ENCAMINHADA PELO MCTI AO LQOS, VIA CIEnP)

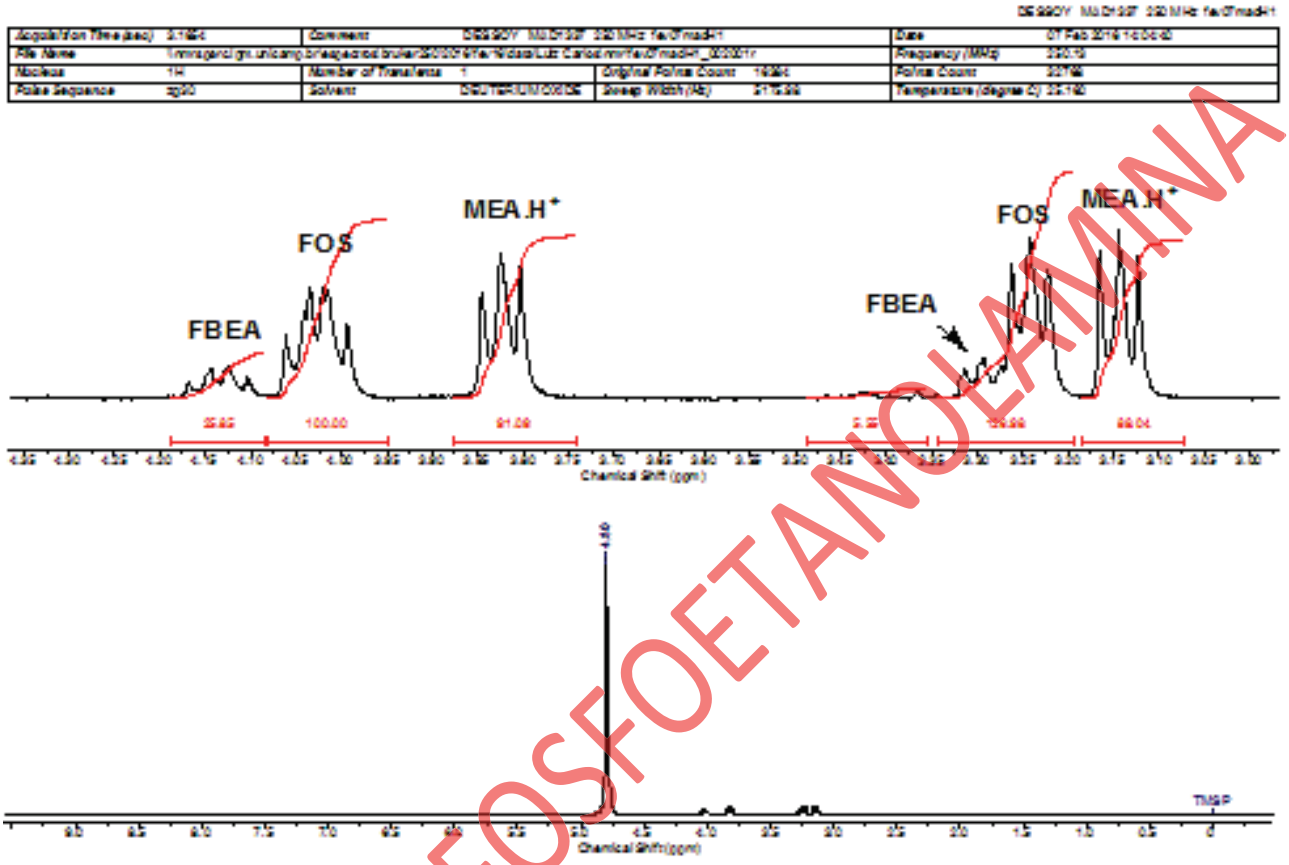
Foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1, de carbono-13 e de fósforo-31 (RMN-^{1}H, de RMN-^{13}C e de RMN-^{31}P) da fração solúvel em D_2O e da amostra integral de um lote de 282,87 gramas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) SINTÉTICA provenientes do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP) encaminhadas ao *Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos* (CIEnP) pelo *Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação* (MCTI). Foi entregue no *Laboratório de Química Orgânica Sintética* (LQOS), no Instituto de Química da UNICAMP (IQ-UNICAMP), uma amostra (não encapsulada) contendo 1,3296 gramas de FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA deste lote, como um sólido branco, encaminhada pelo CIEnP, via PAC, no dia 26/01/2016 e recebida no LQOS no dia 03/02/2016. Em seguida, 30 mg do sólido branco foram suspensos em 0,6 mL de água deuterada (D_2O; para realizar as análises de RMN-^{1}H, de RMN-^{13}C e de RMN-^{31}P da fração solúvel da amostra em D_2O). A suspensão foi submetida à agitação magnética com auxílio de barra magnética por 30 minutos, à temperatura ambiente. Novamente, observou-se que o conteúdo da cápsula não se dissolveu por completo nessas condições, restando um depósito sólido, branco, insolúvel, que foi separado por filtração em filtro de papel, com leve sucção. O material solúvel em D_2O que, após a filtração, resultou numa solução límpida, apresentou pH na faixa de 5-6 (medido com papel indicador de pH de "4 listras", marca Macherey-Nagel, ref. 921 10), o que caracteriza caráter levemente ácido ao meio contendo o material solúvel em D_2O.

Com base no espectro de RMN-^{1}H (figura 21), conclui-se que a fração solúvel deste lote de FOS apresenta a mesma mistura de componentes, inclusive impurezas, que a fração solúvel do material contido nas cápsulas do IQSC-USP-MCTI analisadas previamente. Contudo, as proporções entre os componentes não são as mesmas nos diferentes lotes. Enquanto a razão molar entre FOS, MEA.H^{+} e FBEA é de **100:70:16** no material encapsulado, esta razão muda para **100:90:13** na amostra a granel de FOS. A diferença de 3% na quantidade de FBEA nas duas amostras não é significativa pois está dentro da margem de erro inerente à técnica de análise (RMN-^{1}H, 250,13 MHz). Por outro lado, o aumento de 20% na quantidade de MEA.H^{+} é bastante expressivo.

Pela análise de RMN-^{31}P (figura 22) observa-se que nessa última amostra a quantidade de fosfato inorgânico (P_i) solúvel em água é relativamente maior, ao passo que a relação FOS:FBEA é praticamente a mesma. A razão molar FOS:P_i:FBEA da fração solúvel do material da cápsula IQSC-USP-MCTI (CIEnP) é de **100:33:16** e na amostra a granel de FOS é de **100:46:13**.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

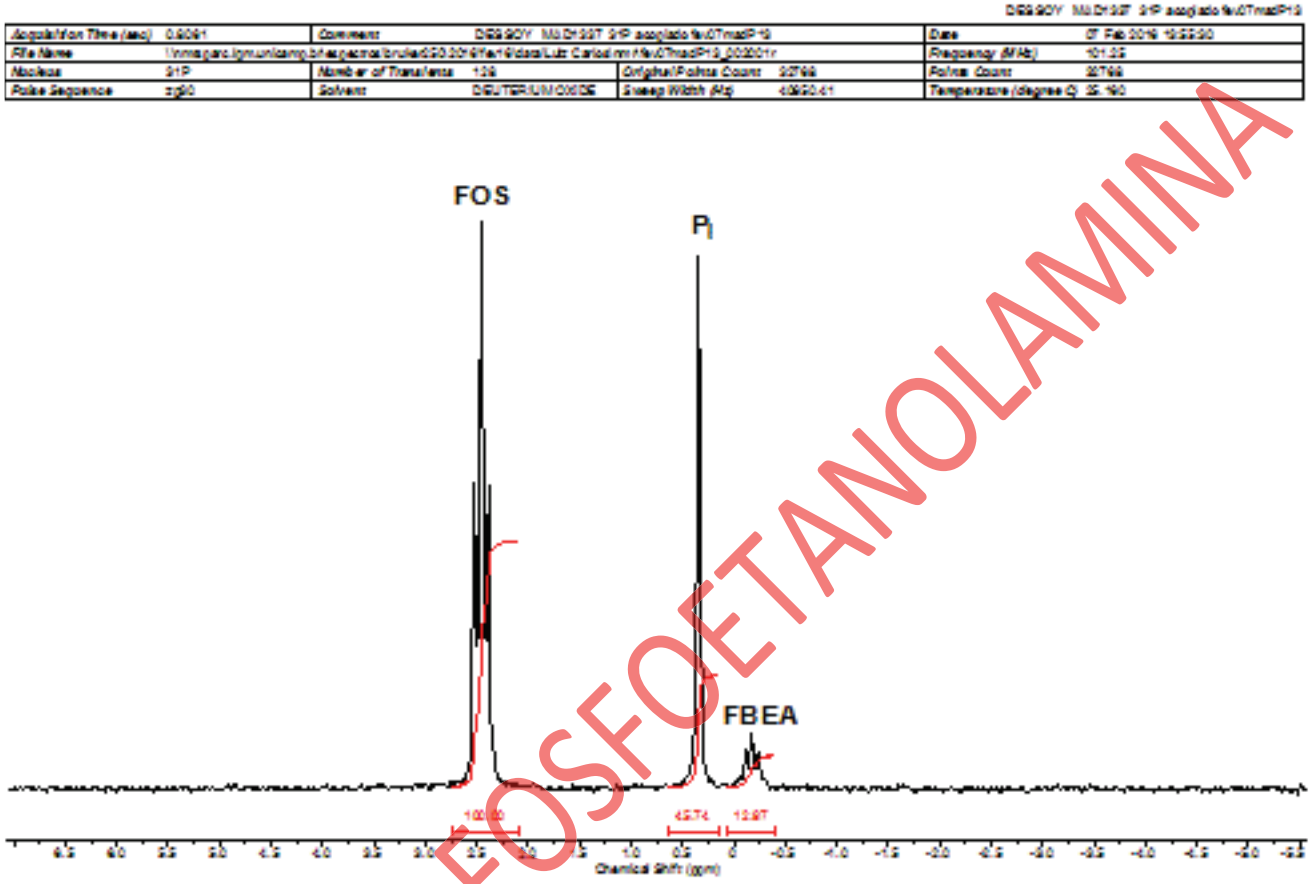
Figura 21. Espectro RMN-^{1}H (250,13 MHz - D_2O) – Amostra a granel de fosfoetanolamina sintética IQSC-USP-MCTI recebida via CIEnP (expansão da região entre 3,00 ppm e 4,35 ppm).



A análise do espectro de RMN-^{13}C (figura 23) confirma a presença de uma quantidade maior de MEA.H^{+} na composição da mistura. Essa amostra não apresenta a impureza desconhecida com deslocamento químico em torno de 69,0 ppm que se mostrou presente nas amostras do material das cápsulas IQSC-USP-MCTI analisadas previamente.

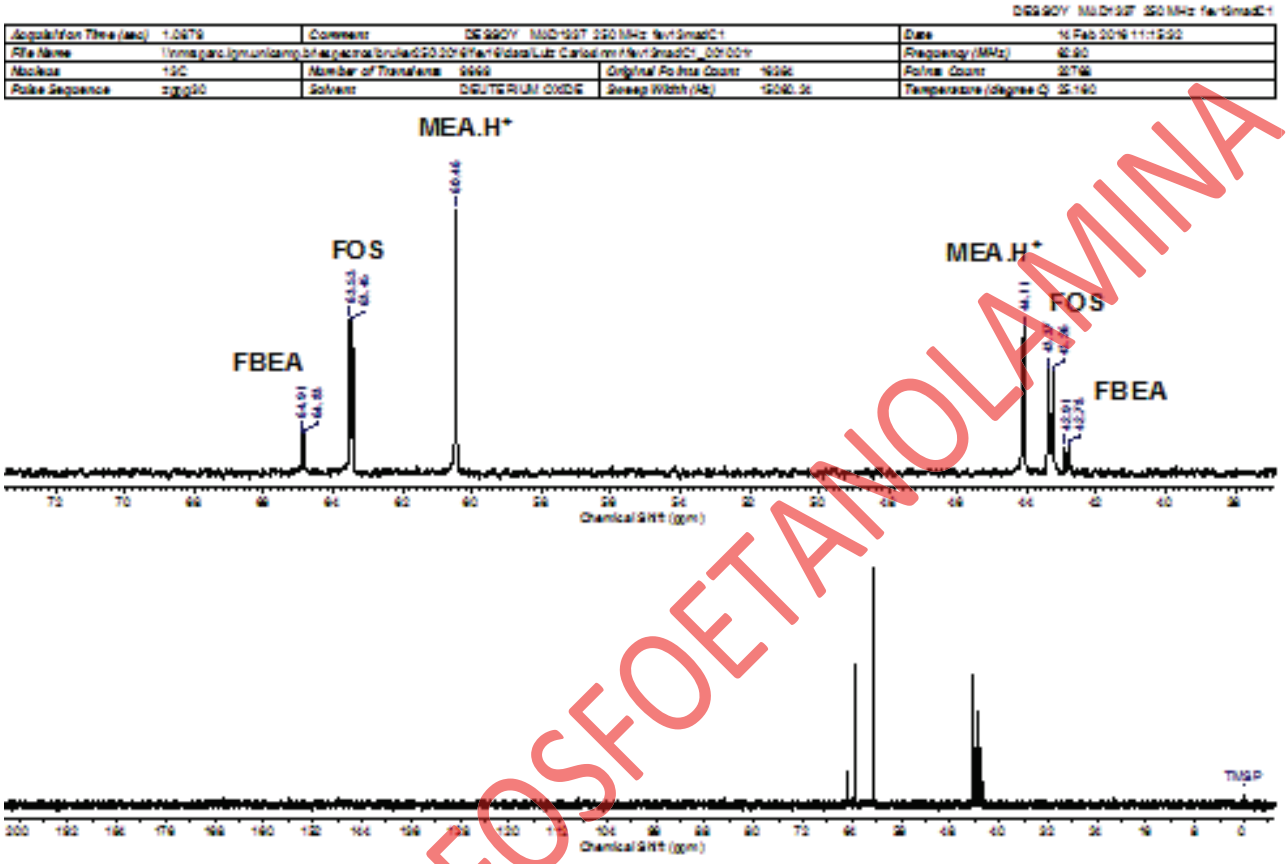
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 22. Espectro RMN-^{31}P acoplado (101,25 MHz - D_2O) – Amostra a granel de fosfoetanolamina sintética IQSC-USP-MCTI via CIEnP – Fração solúvel em D_2O.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 23. Espectro RMN-^{13}C (62,9 MHz – D_2O) – Amostra a granel de fosfoetanolamina sintética IQSC-USP-MCTI via CIEnP – Fração solúvel em D_2O.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

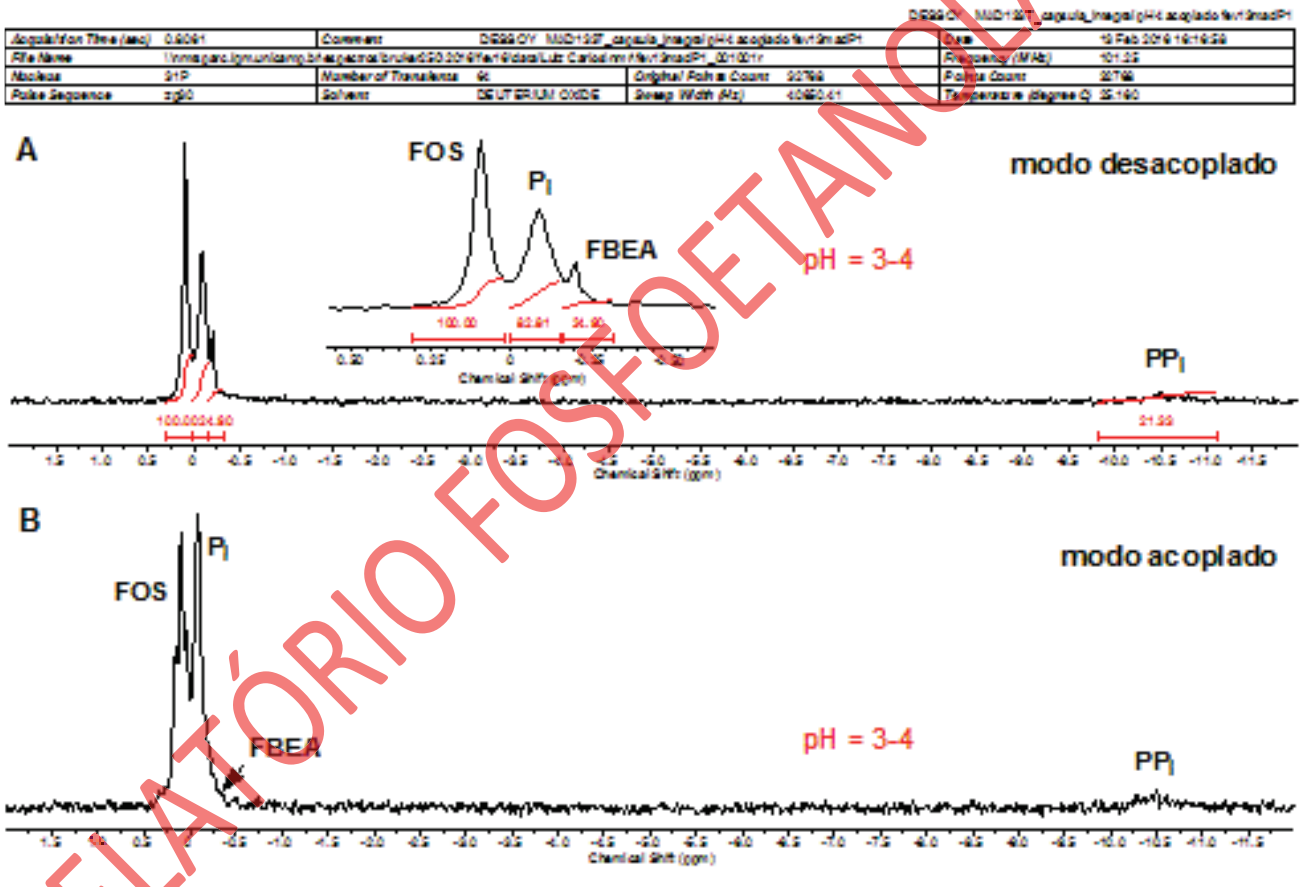
ANÁLISE DA AMOSTRA IQSC-USP-MCTI A GRANEL – INTEGRAL

A amostra de fosfoetanolamina sintética IQSC-USP-MCTI a granel (não encapsulada) recebida pelo LQOS-UNICAMP via CIEnP também teve seu conteúdo integral (fração solúvel e fração insolúvel em água destilada) analisada por meio de RMN-^{31}P em equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz. Para tanto, 30 mg do sólido branco que constitui a amostra foi completamente dissolvido em 1 mL de solução aquosa de HCl 0,5 M. A solução incolor e límpida assim obtida teve o valor de pH elevado a 3-4 pela adição de solução aquosa de NaOH 1 M (a elevação do valor de pH acima desse valor causa turbidez e formação de precipitado).

A figura 24 mostra os espectros de RMN-^{31}P obtidos a partir dessa solução. Nesse valor relativamente baixo de pH, os valores dos deslocamentos químicos dos principais compostos contendo fósforo na sua estrutura são bastante próximos, de forma que a integração precisa dos

sinais fica impossibilitada. Mesmo assim, a integração do espectro adquirido no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio (parte superior, A) permite concluir que menos da metade do fósforo presente na amostra provém da molécula de fosfoetanolamina. A amostra apresenta uma grande quantidade de fosfato inorgânico (P_i) e FBEA, conforme já havia sido demonstrado acima. Esse lote de fosfoetanolamina parece conter uma quantidade um pouco menor de pirofosfatos.

Figura 24. Espectros de RMN-^{31}P (101,25 MHz) – Amostra a granel de fosfoetanolamina sintética – IQSC-USP MCTI/CIEnP) - após dissolução total em solução de HCl aquoso 0,5 M e ajuste do valor de pH a 3-4 com solução aquosa de NaOH 1 M (A: modo desacoplado; B: modo acoplado).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

CONCLUSÕES

No *Laboratório de Química Orgânica Sintética* (LQOS), no Instituto de Química da UNICAMP, foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1, de carbono-13 e de fósforo-31 (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P) do conteúdo de cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) provenientes do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP) encaminhadas ao *Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos* (CIEnP) e ao *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas* (LASSBio), *da Universidade Federal do Rio de Janeiro*, pelo *Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação* (MCTI).

O conteúdo nas cápsulas apresenta cerca de 35,5% de material insolúvel em água destilada e cerca de 57,3% de material solúvel em água destilada, além de 7,2% de água. O material solúvel em água apresenta fosfoetanolamina, monoetanolamina protonada e fosfobisetanolamina protonada, além de pequena quantidade de fosfatos de cálcio e de magnésio. O material insolúvel em água apresenta pequena quantidade de fosfoetanolamina, pequena quantidade de pirofosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário e grande quantidade de fosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (cálcio e magnésio em maior concentração).

O conteúdo de cada cápsula IQSC-USP analisada no LQOS apresenta composição aproximada (com base em peso) de:

- **34,9% de fosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (P_i)**
- **3,6% de pirofosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (PP_i)**
- **32,2% de fosfoetanolamina (FOS) - (sendo cerca de 6,2% associada a íons metálicos)**
- **18,2% de monoetanolamina protonada ($MEA.H^+$)**
- **3,9% de fosfobisetanolamina (FBEA)**
- **7,2% de água (H_2O)**

Resumidamente, a análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1, de carbono-13 e de fósforo-31 (RMN-^{1}H, de RMN-^{13}C e RMN-^{31}P) conjuntamente com a análise de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) do conteúdo das cápsulas de FOSFOETANOLAMINA fornecidas pela IQSC-USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS

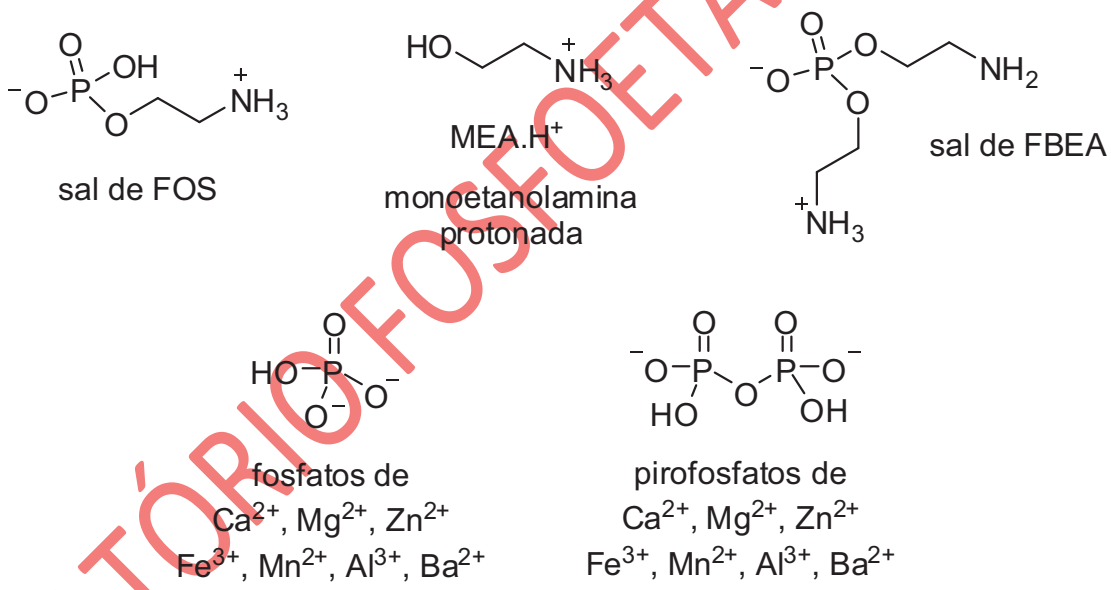
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

via CIEnP e via LASSBio, permitiu a identificação de 05 (cinco) compostos, 04 (quatro) deles contendo fósforo na sua estrutura:

(1) Fosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (P_i);
(2) Pirofosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (PP_i);
(3) FOSFOETANOLAMINA (FOS) na forma de seu sal e associada ao sal da monoetanolamina ($MEA.H^+$);
(4) Sal da monoetanolamina ($MEA.H^+$);
(5) Sal da FOSFOBISETANOLAMINA ($FBEA.H^+$), um diéster do ácido fosfórico.

Em solução de D_2O, estas espécies estão presentes em equilíbrio em virtude do pH do meio na faixa de 5-6 (esquema 10).

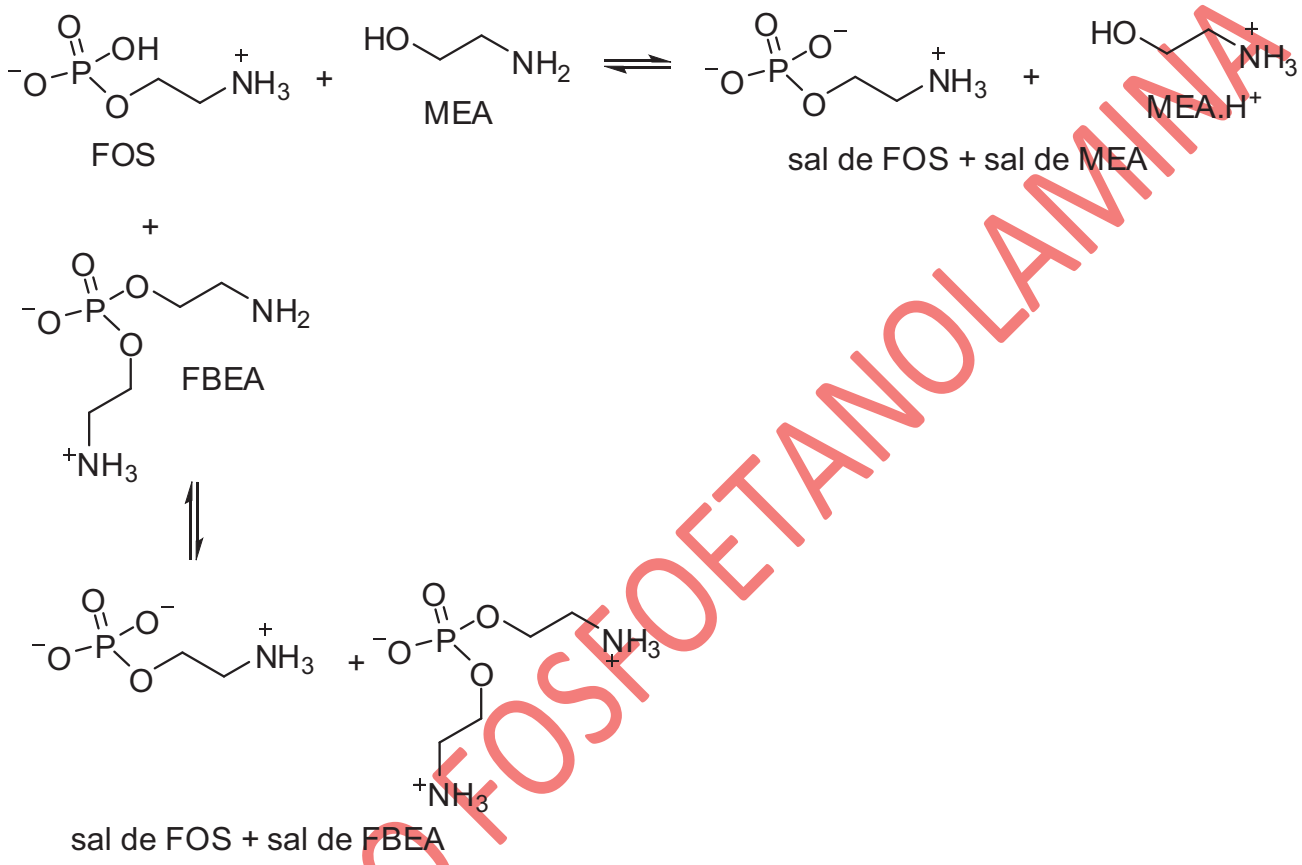
Esquema 10. Espécies presentes nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pela USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via CIEnP e via LASSBio.



A análise da fração solúvel mostra que as seguintes espécies podem estar em equilíbrio em meio ácido, em solução de D_2O, com pH 5-6 (esquema 11).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

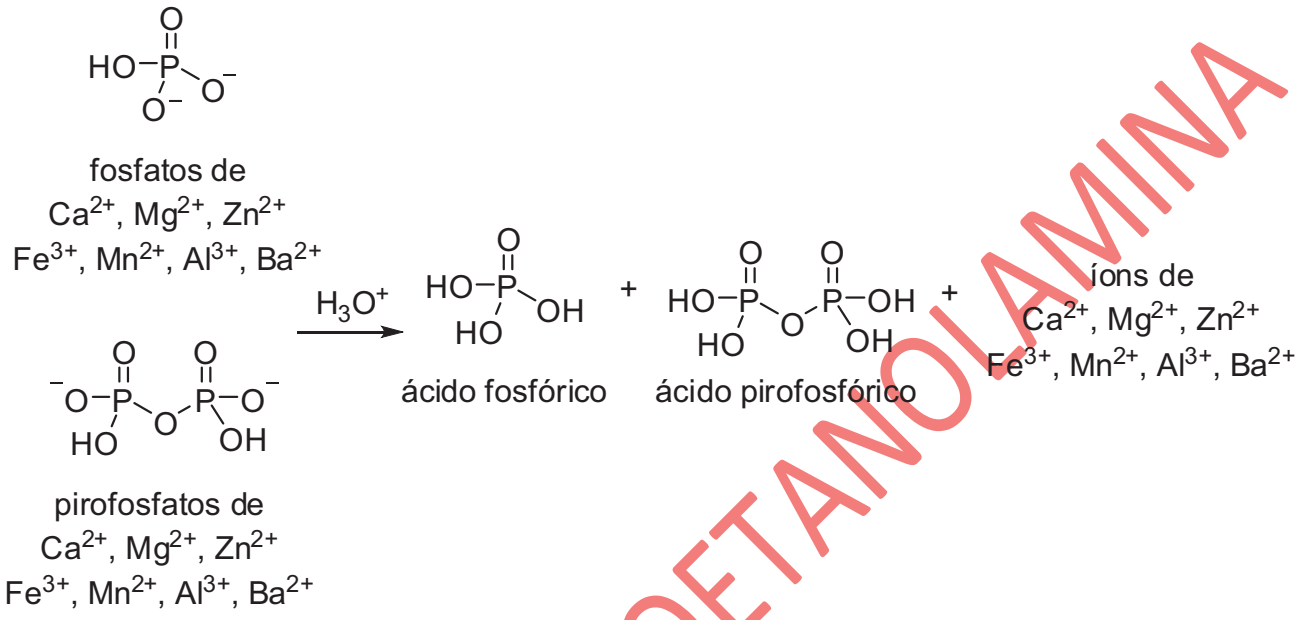
Esquema 11. Equilíbrio químico em solução de D_2O entre as espécies presentes nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pela USP e encaminhadas pelo MCTI ao LQOS via CIEnP e via LASSBio.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Foi também observado a presença de fosfatos (P_i) e pirofosfatos inorgânicos (PP_i) de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário presentes nas cápsulas, que em meio ácido, vão gerar ácido fosfórico e ácido pirofosfórico (esquema 12).

Esquema 12. Fosfatos e pirofosfatos inorgânicos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (P_i e PP_i) presentes nas cápsulas, em meio ácido.



Outros sinais de impurezas não identificadas, podem ser observados nos espectros de RMN-^{1}H e RMN-^{13}C, figura 11 (página 19).

Chama a atenção a variação em peso encontrada nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP-MCTI e encaminhadas ao LQOS via CIEnP. O conteúdo das 3 cápsulas apresentou os seguintes pesos: 480 mg, 503 mg e 509 mg. O peso declarado para o conteúdo das cápsulas é de "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA, 500 mg".

No caso das cápsulas FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP-MCTI e encaminhadas ao LQOS via LASSBio, a diferença de peso do conteúdo encontrado dentro das cápsulas foi ainda maior. Dentre o total de 60 cápsulas recebidas via LASSBio, 16 cápsulas foram abertas e pesadas. Os pesos encontrados foram: 233 mg, 273 mg, 278 mg, 304 mg, 316 mg, 317 mg, 325 mg, 328 mg, 331 mg, 342 mg, 345 mg, 348 mg, 352 mg, 358 mg, 359 mg e 368 mg. A informação contida no rótulo do recipiente é: "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA, 500 mg".

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

MATERIAL SUPLEMENTAR

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

LABORATÓRIO DE AVALIAÇÃO E SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS – LASSBio
COORDENADOR: PROF. ELIEZER J. BARREIRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Cx. Postal 68006 – Rio de Janeiro – 21941-910, RJ - BRASIL
http://www.lassbio.icb.ufrj.br

LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA – LQOS
COORDENADOR: PROF. LUIZ CARLOS DIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE QUÍMICA – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

Campinas, 09 de Janeiro de 2016

DECLARAÇÃO DE RECEBIMENTO DE AMOSTRAS

Eu, Luiz Carlos Dias, CPF número 547.239.229-20, RG número 1.502.516, registrado no CRQ IV Região com o número 04162362, Professor Titular ativo nível MS-6 do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com a matrícula número 24575-5, declaro para os devidos fins, que recebi no dia 09 de janeiro de 2016, 60 (sessenta) cápsulas rotuladas "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA", devidamente lacradas, provenientes do *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas* (LASSBio), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Rio de Janeiro-UFRJ, coordenado pelo Professor Titular Eliezer Barreiro, no âmbito do projeto de pesquisa científica colaborativo entre o *Laboratório de Química Orgânica Sintética*-LQOS, no IQ-UNICAMP, que coordeno e o *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e* Medicamentos (INCT-INOFAR), em projeto financiado pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Atenciosamente,

Luiz Carlos Dias
Professor Titular
UNICAMP

Prof. Dr. Luiz Carlos Dias
IQ - UNICAMP
Matrícula 24575-5

Prof. Luiz Carlos Dias
Professor Titular, MS-6 (Matrícula: 24575-5)
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
C.P. 6154 - CEP: 13084-971 - Campinas - SP - Brasil
FAX: (0xx)-19-3521-3023, fone: (0xx)-19-3521-3097
E-mail: ldias@iqm.unicamp.br

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA – LQOS
COORDENADOR: PROF. LUIZ CARLOS DIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE QUÍMICA – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

Campinas, 06 de Janeiro de 2016

DECLARAÇÃO DE RECEBIMENTO DE AMOSTRAS

Eu, Luiz Carlos Dias, CPF número 547.239.229-20, RG número 1.502.516, registrado no CRQ IV Região com o número 04162362, Professor Titular ativo nível MS-6 do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com a matrícula número 24575-5, declaro para os devidos fins, que recebi no dia 06 de janeiro de 2016, 3 (três) cápsulas rotuladas "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA", devidamente lacradas, provenientes do *Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos* (CIEnP, http://www.cienp.org.br/), da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, coordenado pelo Professor Titular João Batista Calixto, no âmbito do projeto de pesquisa científica colaborativo entre o *Laboratório de Química Orgânica Sintética*-LQOS, no IQ-UNICAMP, que coordeno e o *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e* Medicamentos (INCT-INOFAR), em projeto financiado pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Atenciosamente,

Luiz Carlos Dias
Professor Titular
UNICAMP

Prof. Dr. Luiz Carlos Dias
IQ - UNICAMP
Matrícula 24575-5

Prof. Luiz Carlos Dias
Professor Titular, MS-6 (Matrícula: 24575-5)
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
C.P. 6154 - CEP: 13084-971 - Campinas - SP - Brasil
FAX: (0xx)-19-3521-3023, fone: (0xx)-19-3521-3097
E-mail: ldias@iqm.unicamp.br

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

LABORATÓRIO DE AVALIAÇÃO E SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS – LASSBio
COORDENADOR: PROF. ELIEZER J. BARREIRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Cx. Postal 68006 – Rio de Janeiro – 21941-910, RJ - BRASIL
http://www.lassbio.icb.ufrj.br

CIEnP

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Florianópolis, 12 de fevereiro de 2016.

Ilmo. Sr.

Professor Luiz Carlos Dias

Departamento de Química, UNICAMP

Prezado Professor,

Informo que a quantidade de 1,3296 g da fosfoetanolamina sintética, encaminhada no dia 26 de janeiro de 2016 para análise no seu laboratório foi sintetizada pelo grupo de Química da USP - São Carlos. A amostra de fosfoetanolamina mencionada acima, foi encaminhada ao CIEnP pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação no final de dezembro de 2015 para realizar estudos pré-clínicos (282,87g).

Atenciosamente,

João Batista Calixto, PhD.
Diretor Presidente - CIEnP

LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA – LQOS
COORDENADOR: PROF. LUIZ CARLOS DIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE QUÍMICA – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

Campinas, 03 de fevereiro de 2016

DECLARAÇÃO DE RECEBIMENTO DE AMOSTRAS

Eu, Luiz Carlos Dias, CPF número 547.239.229-20, RG número 1.502.516, registrado no CRQ IV Região com o número 04162362, Professor Titular ativo nível MS-6 do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com a matrícula número 24575-5, declaro para os devidos fins, que recebi no dia 03 de fevereiro de 2016, 1,3296 gramas de "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA", devidamente lacrada, provenientes do *Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos* (CIEnP, http://www.cienp.org.br/), da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, coordenado pelo Professor Titular João Batista Calixto, no âmbito do projeto de pesquisa científica colaborativo entre o *Laboratório de Química Orgânica Sintética*-LQOS, no IQ-UNICAMP, que coordeno e o *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e* Medicamentos (INCT-INOFAR), em projeto financiado pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Atenciosamente,

Luiz Carlos Dias
Professor Titular
UNICAMP

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Prof. Luiz Carlos Dias
Professor Titular, MS-6 (Matrícula: 24575-5)
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
C.P. 6154 - CEP: 13084-971 - Campinas - SP - Brasil
FAX: (0xx)-19-3521-3023, fone: (0xx)-19-3521-3097
E-mail: ldias@iqm.unicamp.br

FIM DA PARTE A

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA – LQOS
COORDENADOR: PROF. LUIZ CARLOS DIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA - UNICAMP
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

PESQUISA EM FOSFOETANOLAMINA

PARTE B

SÍNTESE DOS COMPONENTES DA CÁPSULA DE FOSFOETANOLAMINA (FOS) PARA O MCTI

RELATÓRIO TÉCNICO-CIENTÍFICO

Prof. Dr. Luiz Carlos Dias – IQ-UNICAMP
Coordenador do *Laboratório de Química Orgânica Sintética* – LQOS

Dr. Marco Aurélio Dessoy – Pós-Doutorando – LQOS – IQ-UNICAMP

Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro – LASSBio-UFRJ
Coordenador do *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos* – INCT-INOFAR

Este relatório descreve o trabalho realizado no Laboratório de Química Orgânica Sintética (LQOS) no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Dias, em colaboração com o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, coordenado pelo Prof. Dr. Eliezer Barreiro. O LQOS no IQ-UNICAMP e o LASSBio na UFRJ são laboratórios vinculados ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-INOFAR, http://www.inct-inofar.ccs.ufrj.br/).

LABORATÓRIO DE AVALIAÇÃO E SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS – LASSBio
COORDENADOR: PROF. ELIEZER J. BARREIRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Cx. Postal 68006 – Rio de Janeiro – 21941-910, RJ - BRASIL
http://www.lassbio.icb.ufrj.br

Conteúdo	Página
ANÁLISE DA PATENTE DE SÍNTESE DA FOSFOETANOLAMINA	57
ESTUDOS DE SÍNTESE DA FOSFOETANOLAMINA NO *LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA* (LQOS) no IQ-UNICAMP	59
ANÁLISE DE RMN-^{1}H, RMN-^{13}C E RMN-^{31}P DOS PRODUTOS DE SÍNTESE QUÍMICA OBTIDOS NO *LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA* (LQOS) NO IQ-UNICAMP	67
1. FOSFOETANOLAMINA pura (FOS: 7 gramas)	67
Análise de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, RMN-^{31}P e espectrometria de massas da FOSFOETANOLAMINA preparada no LQOS (IQ-UNICAMP)	67
Análise de RMN-^{1}H	67
Análise de RMN-^{13}C	68
Análise de RMN-^{31}P	70
Análise por espectrometria de massas	72
Análise por difração de Raios X de monocristal	73
Análise de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, RMN-^{31}P da FOSFOETANOLAMINA comercial (Marca *Sigma-Aldrich*)	74
2. CLORIDRATO DA FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl: 5 gramas)	77
Análise de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, RMN-^{31}P e espectrometria de massas do cloridrato da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) preparado no LQOS (IQ-UNICAMP)	78
Análise de RMN-^{1}H	78
Análise de RMN-^{13}C	79
Análise de RMN-^{31}P	80
Análise por espectrometria de massas	81
IDENTIFICAÇÃO DOS OUTROS SUB-PRODUTOS FORMADOS NA REAÇÃO ENTRE ÁCIDO FOSFÓRICO E MONOETANOLAMINA	83
EXPERIMENTOS ADICIONAIS DE CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE FOSFOETANOLAMINA (FOS), FOSFOBISETANOLAMINA PROTONADA (FBEA.H^{+}) E MONOETANOLAMINA PROTONADA (MEA.H^{+}) NAS CÁPSULAS IQSC-USP-MCTI	86
EXPERIMENTO 1: RMN-^{31}P (101 MHz, D_2O)	86
EXPERIMENTO 2: RMN-^{1}H (250 MHz, D_2O)	88
EXPERIMENTO 3: Espectro de RMN-^{1}H de combinação de FOSFOETANOLAMINA e FOSFOBISETANOLAMINA preparadas no LQOS com monoetanolamina comercial	90
EXPERIMENTO 4: Adição de K_3PO_4 (RMN-^{31}P, 101 MHz, D_2O)	91
EXPERIMENTO 5: Verificação da estabilidade hidrolítica da FOSFOETANOLAMINA na presença de $CaCO_3$, $MgCO_3$ e $ZnCO_3$ em H_2O a 70 ^{o}C por 5 dias	93
EXPERIMENTO 6: Estabilidade de FOS LQOS e FBEA.HCl LQOS em HCl_{aq} 0,5 M e em $NaOH_{aq}$ 6 M	100
ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	102
SINOPSE	107
CONCLUSÕES	109
Material Suplementar	116

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

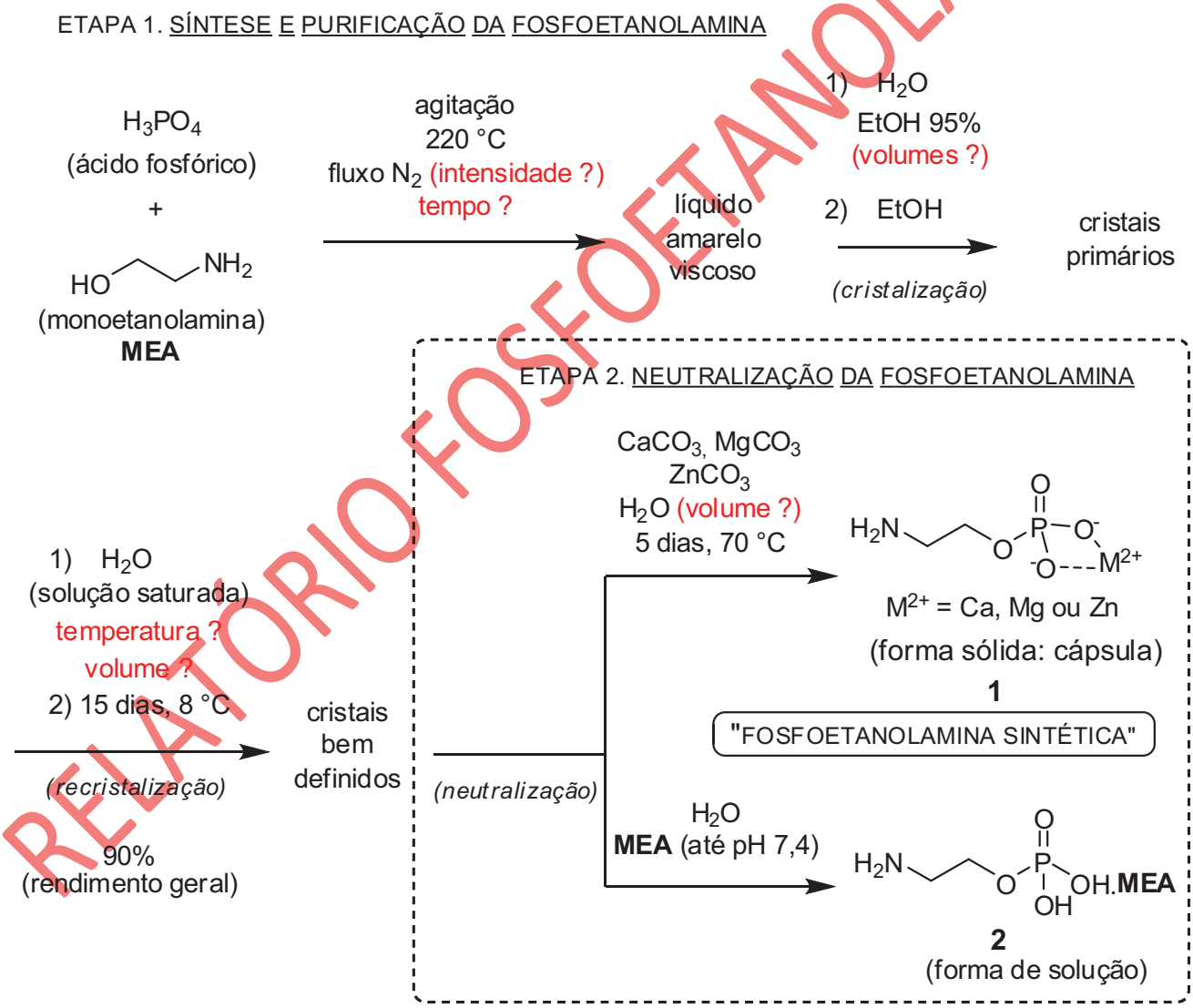
ANÁLISE DA PATENTE DE SÍNTESE DA FOSFOETANOLAMINA

Na Figura 25 está reproduzido, de forma geral, o esquema de síntese da "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA" (FOS), realizado pelo grupo do IQSC-USP, segundo patente PI0800460-9 A2, que consiste em duas etapas:

Etapa 1. Síntese e purificação da FOSFOETANOLAMINA;

Etapa 2. Neutralização da FOSFOETANOLAMINA, para a obtenção da assim denominada "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA" sólida (**1**) ou em solução (**2**).

Figura 25. Esquema de síntese da "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA", pelo IQSC-USP, segundo patente PI0800460-9 A2.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Conforme informações obtidas da patente PI0800460-9 A2, a primeira etapa consiste em neutralizar o ácido fosfórico com monoetanolamina (quantidades equimolares), sob agitação em banho de gelo. Na sequência, esta mistura é aquecida até 220 ^{o}C, sob um fluxo constante de nitrogênio. O fluxo de nitrogênio tem o objetivo de retirar a H_2O formada do meio reacional e deslocar o equilíbrio químico no sentido de formação do produto desejado, assim como evitar a oxidação dos compostos nitrogenados pela presença de oxigênio, a altas temperaturas. Segundo os autores da patente PI0800460-9 A2, esta reação resultaria em um material líquido amarelo viscoso, que após adição de H_2O e EtOH 95% levaria à formação de cristais. Uma nova etapa de recristalização a partir de solução aquosa saturada (temperatura de saturação não indicada) levaria, após duas semanas em repouso, a 8 ^{o}C, à formação de cristais bem definidos de FOSFOETANOLAMINA pura em 90% de rendimento. Estes cristais devem ser neutralizados com a adição de $CaCO_3$, $MgCO_3$ e $ZnCO_3$ em água (volume não indicado) e secos em estufa, à temperatura de 70 ^{o}C, por 5 dias, resultando, assim, na FOSFOETANOLAMINA sólida (reivindicação número 6 da patente PI0800460-9 A2). Após este procedimento, os autores sugerem a formação da **FOSFOETANOLAMINA sintética** na forma de seu sal divalente, em que M^{2+} seriam os contra íons adicionados, Ca^{2+}, Mg^{2+} e Zn^{2+}. Alternativamente, a solução aquosa de FOSFOETANOLAMINA pode ser neutralizada com monoetanolamina (MEA) até pH 7,4 para emprego como tampão biológico (reivindicação número 7 da patente PI0800460-9 A2).

Na patente PI0800460-9 A2, não há informações sobre tempo de reação a 220 ^{o}C, não há informações sobre as quantidades em volume de H_2O e EtOH a serem adicionados na etapa de formação de cristais e não há informações sobre a quantidade de EtOH anidro utilizado na etapa de obtenção de cristais de FOSFOETANOLAMINA em 90% de rendimento. Também não há informações sobre o acompanhamento e monitoramento das reações, sobre a formação de subprodutos, tampouco sobre a caracterização da FOSFOETANOLAMINA (FOS) sintética por RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, RMN-^{31}P, espectrometria de massas e análise de difração de Raios-x. Não há sequer informações sobre o ponto de fusão da FOSFOETANOLAMINA (FOS) sintética. Há apenas informações sobre a caracterização da FOSFOETANOLAMINA (FOS) através da análise das bandas no espectro de infravermelho.

Neste ponto, cabe ressaltar que nas análises das cápsulas enviadas pelo MCTI, tanto via CIEnP, como via LASSBio, realizadas no *Laboratório de Química Orgânica Sintética* - LQOS, no IQ-UNICAMP, apenas uma pequena quantidade de FOSFOETANOLAMINA (em torno de 6,2%), parece estar associada aos íons divalentes de Ca^{2+}, Mg^{2+} e Zn^{2+} reivindicados na patente PI0800460-9 A2. Ainda assim, essa associação é lábil sendo corrompida em meio aquoso com valor de pH inferior a 4 (como, por exemplo, no interior do estômago humano). Os íons Ca^{2+}, Mg^{2+} e Zn^{2+}, além dos íons Mn^{2+}, Al^{3+}, Fe^{3+} e Ba^{2+} estão presentes no material das cápsulas, na forma de fosfatos e pirofosfatos.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Novas informações muito relevantes sobre esta questão, serão apresentadas neste relatório, levando à confirmação de que a maior parte de FOSFOETANOLAMINA presente nas cápsulas IQSC-USP não está associada a sais divalentes com os metais Ca^{2+}, Mg^{2+} e Zn^{2+}.

ESTUDOS DE SÍNTESE DA FOSFOETANOLAMINA NO *LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA* (LQOS) no IQ-UNICAMP

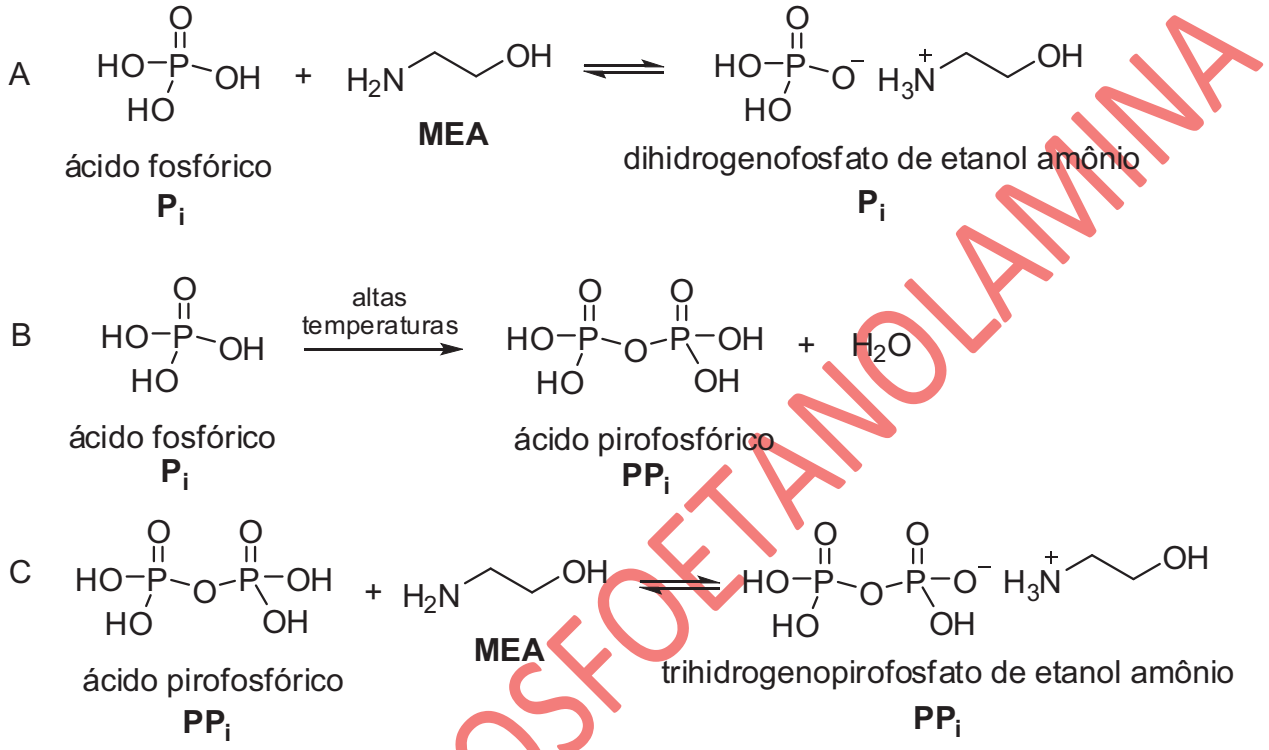
O *Laboratório de Química Orgânica Sintética* (LQOS) no IQ-UNICAMP, coordenado pelo Prof. Luiz Carlos Dias, tem mais de 20 anos de experiência na área de síntese orgânica e é um laboratório de excelência na área, com reconhecimento internacional. Com este *background*, foi relativamente simples estabelecer as melhores condições para a síntese da FOSFOETANOLAMINA, seguindo o procedimento experimental descrito na patente PI0800460-9 A2, mesmo com a ausência de detalhes relevantes.

No entanto, é antecipado que o rendimento químico obtido na síntese da FOSFOETANOLAMINA pura no LQOS foi de aproximadamente 40% nos vários experimentos piloto realizados na escala de 1 mol (mesma escala utilizada na patente PI0800460-9 A2). Os experimentos visando a síntese da FOSFOETANOLAMINA foram conduzidos na escala de 1 mol (um mol de ácido fosfórico e um mol de MONOETANOLAMINA, mesma escala descrita na patente PI0800460-9 A2). A neutralização do ácido fosfórico com a monoetanolamina (uma base) se dá pela simples mistura dos dois reagentes. O cuidado a ser tomado nesse passo consiste no controle da velocidade em que o ácido e a base são misturados, de forma que a reação fortemente exotérmica não fuja do controle. A síntese da FOSFOETANOLAMINA, propriamente dita, se dá a partir do aquecimento do dihidrogenofosfato de etanol amônio (P_i) resultante da combinação do ácido fosfórico com a monoetanolamina até uma temperatura de 220 °C (A, esquema 13). A figura 26 mostra os espectros do ácido fosfórico 85% (marca *Sigma-Aldrich*) utilizado nos experimentos de síntese da fosfoetanolamina (na parte superior) e do dihidrogenofosfato de etanol amônio (P_i), formado a partir da combinação de parte equimolares de ácido fosfórico e de monoetanolamina (na parte inferior).

Como a patente PI0800460-9 A2 não fornece maior detalhamento técnico para a condução desse processo, não mencionando sequer o tempo reacional, partiu-se de um *setup* experimental que permitiu tanto o monitoramento constante e em tempo real da evolução da temperatura interna do sistema reacional, como a leitura do volume de água liberado. Como o volume de água liberado da reação pode ser exatamente calculado (uma vez que este compreende a soma de água residual contida no ácido fosfórico (15%) e a água que é liberada a partir da condensação (esterificação) do ácido fosfórico com a monoetanolamina), o monitoramento deste serve de parâmetro para avaliação do progresso da reação - em teoria.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Esquema 13. Reação ácido-base entre ácido fosfórico e monoetanolamina e formação de fosfatos (P_i) e de pirofosfatos (PP_i). Estes intermediários estão sendo propostos neste trabalho, não tendo sido citados nas patentes do grupo do IQSC-USP.

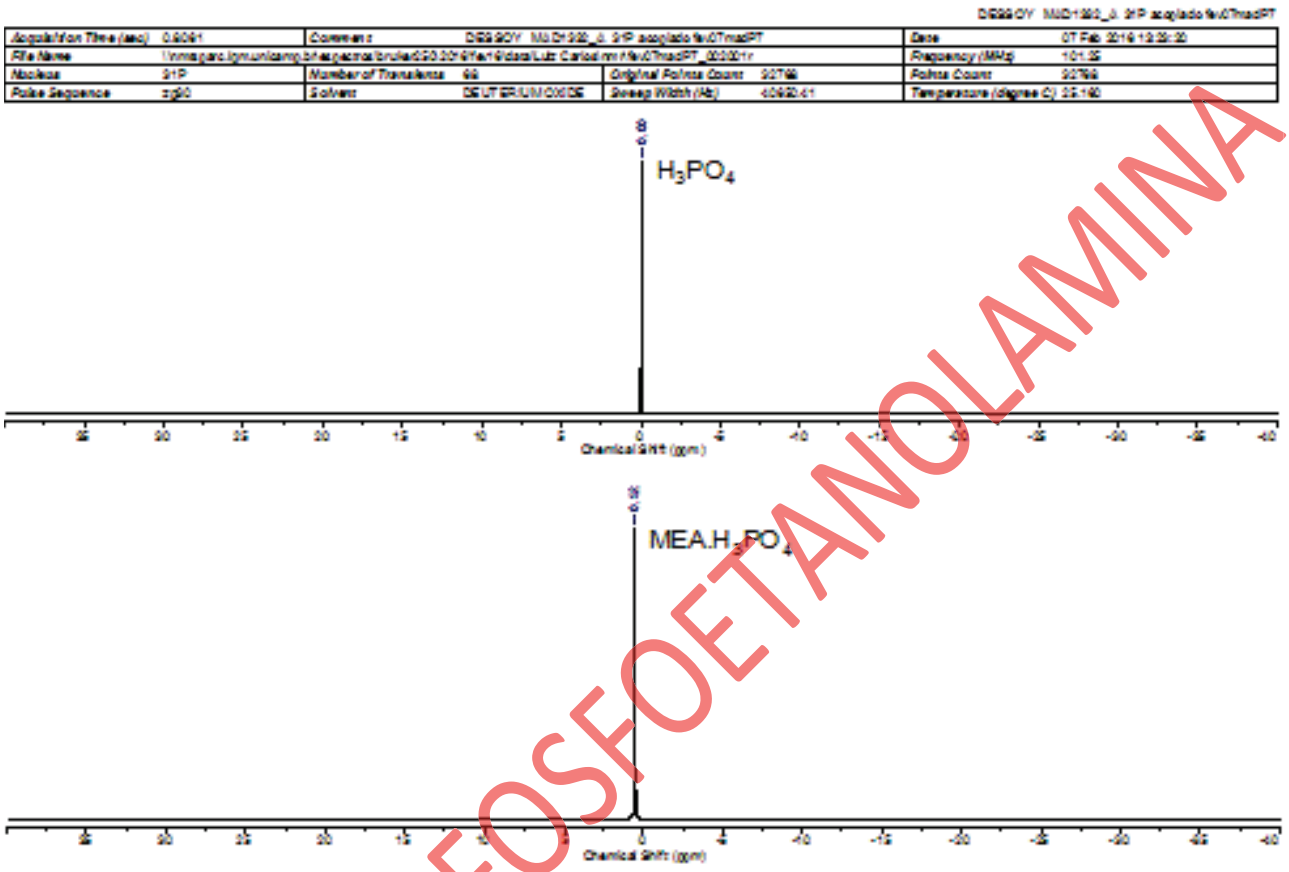


RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Na prática, contudo, esse parâmetro tem uso mais restrito uma vez que apenas uma fração da água liberada pode ser efetivamente condensada e recolhida à temperatura ambiente ou um pouco abaixo dela. A outra parte é arrastada pelo fluxo de nitrogênio que entra no sistema na forma anidra, e assim "absorve" parte da água para sair do sistema úmido. Dessa forma, o arraste do volume de água liberado na reação, pelo nitrogênio, é diretamente proporcional ao volume deste que é passado ao longo do período reacional. Ainda assim, o monitoramento do volume de água liberado é um bom indicativo para a determinação do ponto final da reação.

A altas temperaturas, o ácido fosfórico (P_i) forma ácido pirofosfórico (PP_i), com eliminação de água (B, esquema 13). O ácido pirofosfórico também reage com a monoetanolamina formando o sal trihidrogeno pirofosfato de etanol amônio, que será considerado com a mesma sigla, PP_i (C, esquema 13). Após 4h de aquecimento, 17,3 mL de água (35,3 mL do valor teórico calculado para reação completa) haviam sido coletados e uma amostra da mistura reacional foi colhida. A esta seguiu-se mais três coletas de amostras durante um período total de 12 horas de reação, momento em que a liberação de água aparentemente cessou.

Figura 26. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - D_2O) do ácido fosfórico 85% (figura superior) e do dihidrogenofosfato de etanol amônio (figura inferior).



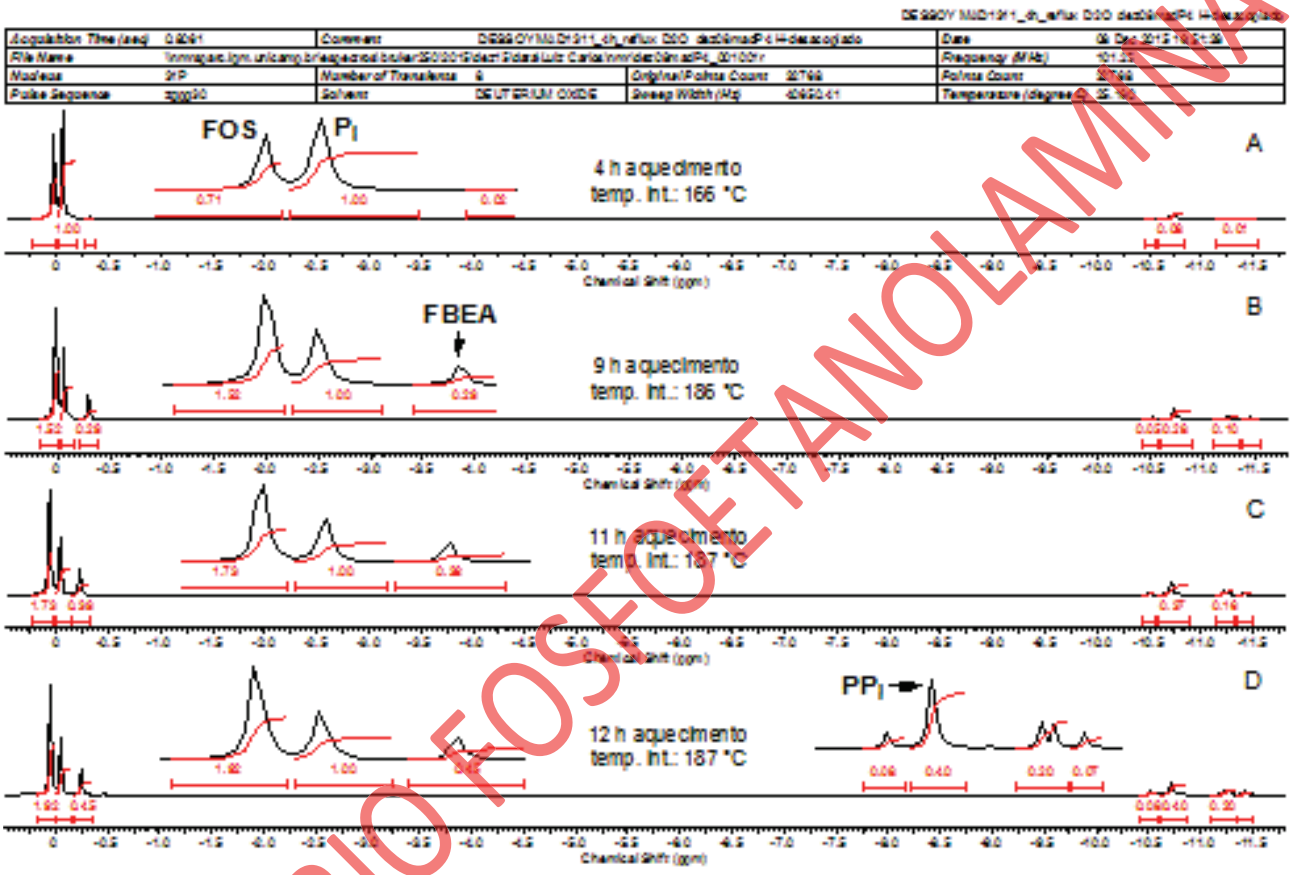
As amostras frias foram dissolvidas em D_2O e submetidas à análise de RMN-^{31}P no equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz. Os respectivos espectros obtidos nessa análise estão mostrados na figura 27.

Os espectros de RMN-^{31}P (101 MHz, D_2O) na figura 27 mostram a formação de vários produtos distintos contendo fósforo na sua estrutura. No espectro A (figura 27), após 4 h de aquecimento, a temperatura interna marcava 166 ^{o}C e pela análise do espectro de RMN-^{31}P foi possível observar a formação de FOSFOETANOLAMINA (FOS), indicada pela detecção do sinal em 0,10 ppm, a presença do sal de dihidrogenofosfato de etanol amônio (P_i) ainda não convertido, em –0,10 ppm (esquema 13). Além desses, outros sinais de menor intensidade como em –10,7 ppm, atribuído ao ácido pirofosfórico (PP_i) e a ésteres do ácido pirofosfórico (mostrados na figura 46, página 85) e traços de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA em –0,26 ppm) começam a aparecer. Neste momento, a proporção entre FOS:dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) era de 0,71:1,0.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Os sinais correspondentes à FOSFOETANOLAMINA (FOS) e FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) foram confirmados após aquisição do espectro de RMN-^{31}P totalmente acoplado, como descrito posteriormente na figura 47, na página 88, deste relatório (parte B).

Figura 27. Progresso da reação: monitoramento por **RMN-^{31}P desacoplado** (101 MHz, D_2O).



No espectro C (figura 27), após 11 h de aquecimento, a temperatura interna marcava 187 °C, a proporção de FOSFOETANOLAMINA (FOS), com relação ao dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) era de 1,73:1,0 e os sinais correspondentes a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) em –0,26 ppm e a ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i) em –10,7 já eram mais intensos.

No espectro D (figura 27), após 12 h de aquecimento, a temperatura interna marcava 187 °C, a proporção de FOSFOETANOLAMINA (FOS) aumentou com relação ao sal dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) (1,92:1,0) e os sinais correspondentes a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) e a ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i) eram ainda mais intensos. Após 12 h de aquecimento, 21,6 mL (valor teórico calculado para conversão completa: 35,3 mL) de água haviam sido coletados, valor idêntico ao volume coletado após 11 h.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Neste momento, o experimento foi interrompido. Enquanto os produtos dessa reação eram isolados, purificados e analisados, outros dois experimentos de síntese foram conduzidos. Baseado no resultado do espectro D, não se pode esperar rendimento superior a 47% para a FOSFOETANOLAMINA, nestas condições, e isto sem considerar o processo de purificação, em que há perdas. Baseado nas relações molares obtidas pela integração dos sinais do espectro, podemos observar, pelo espectro D, a presença de cerca de 47% de FOSFOETANOLAMINA, de cerca 24% de diidrogenofosfato de etanol amônio (P_i), de cerca de 11% de sal FOSBOBISETANOLAMINA (FBEA.H+) e de cerca de 18% de ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i).

A figura 28 mostra os espectros de RMN-^{31}P no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio, adquiridos no equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz, em D_2O, para acompanhamento da reação entre 1,0 equivalente de ácido fosfórico e 1,0 equivalente de monoetanolamina (MEA) com aumento na temperatura interna até 220 ^oC, conforme descrito na patente PI0800460-9 A2.

Como no experimento anterior, foram retiradas alíquotas da mistura reacional a diferentes intervalos de tempo e o progresso da reação foi monitorado por RMN-^{31}P.

No espectro A, após 12 h de aquecimento, a temperatura interna marcava 182 ^oC e pela análise do espectro de RMN-^{31}P foi possível observar a formação de FOSFOETANOLAMINA (FOS), em 0,17 ppm, a presença do sal dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) ainda não convertido em –0,05 ppm e o sinal correspondente a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) em –0,25 ppm, além de ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i) em –10,7 ppm. Neste momento, a proporção entre FOS:dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) era de 1,19:1,0.

No espectro B, após 21 h de aquecimento, a temperatura interna marcava 190 ^oC e foi possível observar aumento na proporção de FOSFOETANOLAMINA (FOS), com relação ao dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) (1,64:1,0) e aumento também nos sinais correspondentes à FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) e ao ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i) em –10,7 ppm.

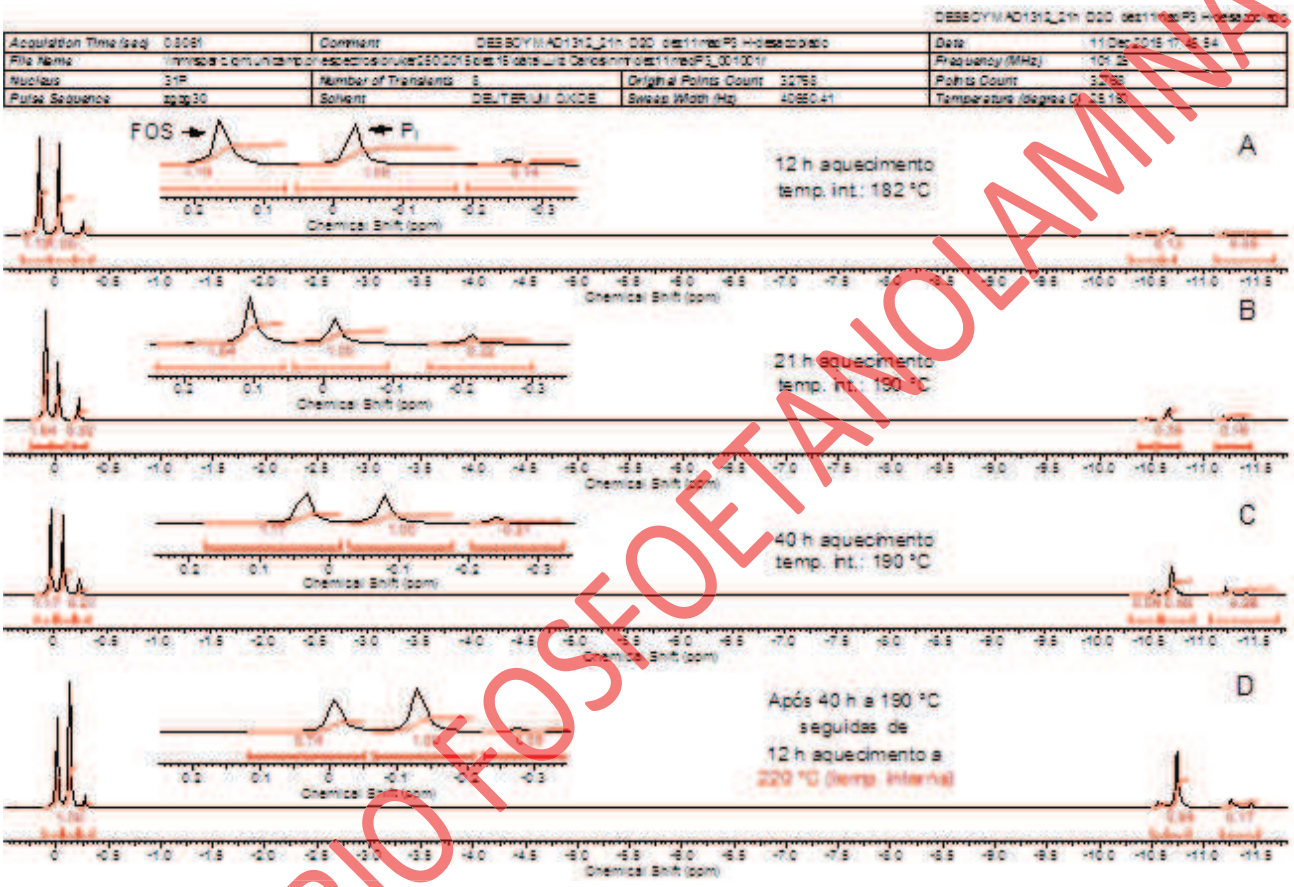
No espectro C, após 40 h de aquecimento, a temperatura interna marcava 190 ^oC, mas a proporção de FOSFOETANOLAMINA (FOS) em 0,17 ppm, com relação ao dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) em –0,05 ppm **diminuiu** (1,17:1,0) em relação ao experimento B (quando era de 1,64:1,0), mostrando que tempos reacionais longos e altas temperaturas não favorecem a formação de FOSFOETANOLAMINA (FOS), ao contrário do que está descrito na patente PI0800460-9 A2. Neste momento, o sinal correspondente a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) em –0,25 ppm era também menos intenso e o sinal de ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i) em –10,7 ppm já era mais intenso.

No espectro D, a temperatura interna marcava 220 ^oC e a reação foi mantida por 12 h nesta temperatura. A proporção de FOSFOETANOLAMINA (FOS) em relação ao dihidrogeno fosfato de

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

etanol amônio (P_i) diminuiu ainda mais (0,74:1,0), confirmando mais uma vez que longos tempos reacionais e altas temperaturas não favorecem a formação de FOSFOETANOLAMINA (FOS), ao contrário do que está descrito na patente PI0800460-9 A2.

Figura 28. Progresso da reação: monitoramento por **RMN-^{31}P desacoplado** (101 MHz, D_2O).



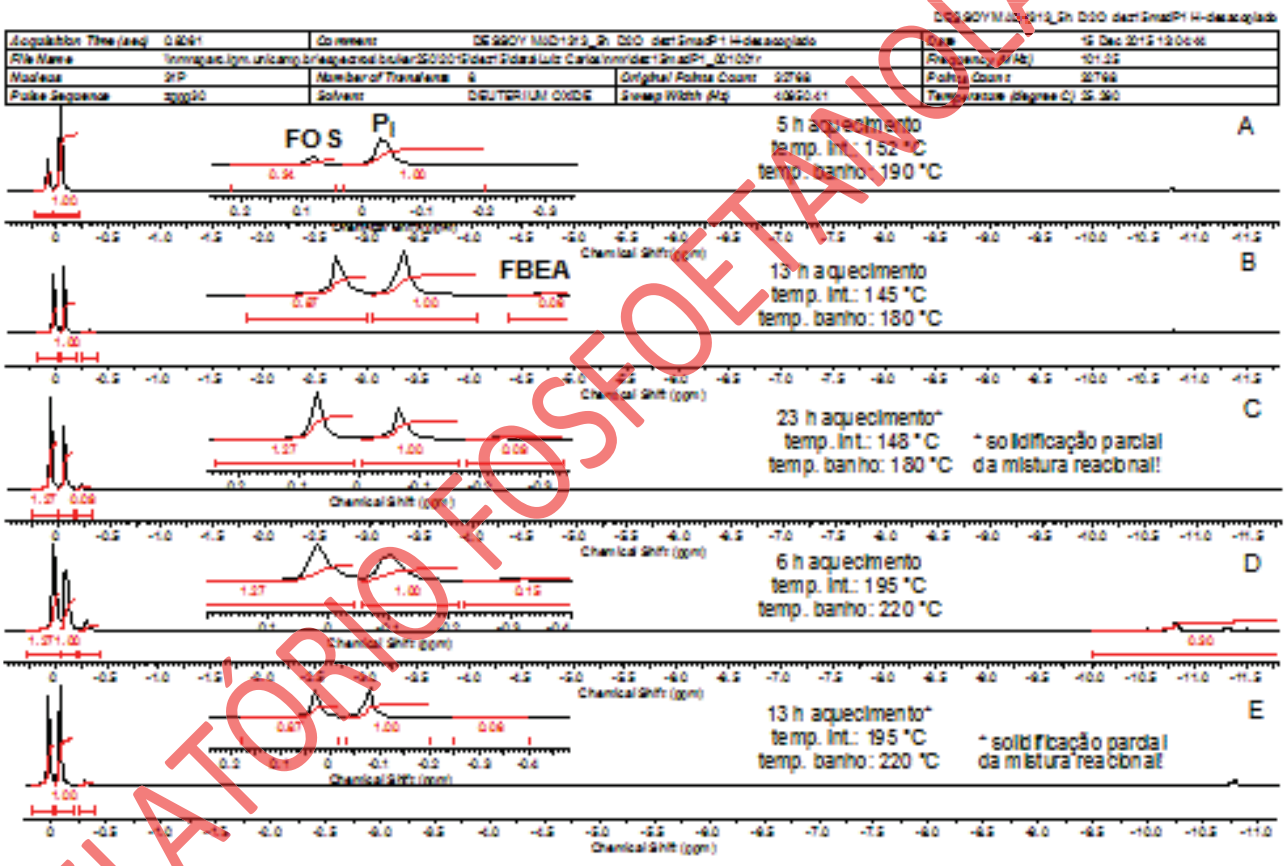
Neste momento, o sinal correspondente a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) era bem menos intenso e o de ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i) em –10,7 ppm já era muito mais intenso. Este fato curioso pode estar relacionado à eficiência com que a H_2O é retirada do meio reacional pelo gás inerte utilizado (nitrogênio), mas fica evidente que a altas temperaturas, a formação de PP_i é mais favorável, o que gera mais H_2O no meio reacional. A presença de H_2O a altas temperaturas leva à hidrólise da FOSFOETANOLAMINA (FOS) e da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA). **Embora a conversão não tenha sido completa, como fica claro pelo espectro D da figura 27, estes experimentos justificam claramente a presença de cada um dos compostos presentes nas cápsulas provenientes do IQSC-USP, como descrito na parte A deste relatório.**

A figura 29 mostra os espectros de RMN-^{31}P no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio, adquiridos no equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

de ressonância de 101,25 MHz, em D_2O, para acompanhamento da reação entre **1,1** equivalentes de ácido fosfórico e 1,0 equivalente de monoetanolamina (MEA). O objetivo do uso de pequeno excesso de ácido fosfórico era o de estudar o efeito sobre a velocidade da reação (maior velocidade em pH mais baixo?), além de verificar se o excesso de ácido fosfórico poderia suprimir a formação da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA). Novamente, foram retiradas alíquotas a diferentes intervalos de tempo e o progresso da reação foi monitorado por RMN-^{31}P com desacoplamento em banda larga de hidrogênio.

Figura 29. Progresso da reação: monitoramento por **RMN-^{31}P desacoplado** (1,1 equivalentes de ácido fosfórico + 1,0 equivalente de MONOETANOLAMINA - MEA) – 101 MHz, D_2O.



No espectro A, após 5 h de aquecimento a temperatura interna marcava 152 °C e a temperatura do banho marcava 190 °C. Pela análise do espectro de RMN-^{31}P, foi possível observar a formação de FOSFOETANOLAMINA (FOS) em 0,10 ppm e a presença de sal de dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) não convertido, em –0,10 ppm. Neste momento, a proporção entre FOS:dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) era de 0,34:1,0.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

No espectro B, após 13 h de aquecimento, a temperatura interna marcava 145 °C e a temperatura do banho marcava 180 °C. Foi possível observar aumento na proporção de FOSFOETANOLAMINA (FOS), com relação ao dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) (0,87:1,0) ao passo que começa a aparecer o sinal correspondente a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) em –0,3 ppm, além de ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i) em –10,7 ppm.

No espectro C, após 23 h de refluxo, a temperatura interna marcava 148 °C e a temperatura do banho marcava 180 °C. Foi possível observar aumento na proporção de FOSFOETANOLAMINA (FOS) em relação ao dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) (1,27:1,0) e um pequeno aumento na intensidade do sinal correspondente a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) em –0,3 ppm. Neste momento, observamos a solidificação parcial do meio reacional. A temperatura do banho foi então aumentada a 220 °C. A consequente elevação da temperatura do meio reacional levou a sua liquefação completa.

No espectro D, a temperatura interna marcava 195 °C e a temperatura do banho marcava 220 °C. A reação foi mantida por 6 h na temperatura de 220 °C. A proporção de FOSFOETANOLAMINA (FOS) com relação ao dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) se manteve constante (1,27:1,0). Neste momento, o sinal correspondente a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) em –0,3 ppm era mais intenso e o de ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i) em –10,7 ppm já era bem mais intenso.

No espectro E, após 13 h com a temperatura do banho marcando 220 °C e a temperatura interna marcando 195 °C, a proporção de FOSFOETANOLAMINA (FOS), com relação ao dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i) diminuiu (0,87:1,0), mostrando mais uma vez que longos tempos reacionais e altas temperaturas não favorecem a formação de FOSFOETANOLAMINA (FOS) e de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA).

Ao contrário do que é descrito na patente PI0800460-9 A2, este procedimento não permite a obtenção de altos rendimentos da FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura. A baixa taxa de conversão do sal dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i), bem como a co-formação de ácido pirofosfórico (PP_i), da FBEA, além de outros produtos secundários não permitem a obtenção de FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura no rendimento de 90% descrito na patente PI0800460-9 A2. A presença de H_2O a altas temperaturas leva a hidrólise da FOSFOETANOLAMINA (FOS) e da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

ANÁLISE DE RMN-^{1}H, RMN-^{13}C E RMN-^{31}P DOS PRODUTOS DE SÍNTESE QUÍMICA OBTIDOS NO *LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA* (LQOS) NO IQ-UNICAMP.

1. FOSFOETANOLAMINA pura (FOS: 7 gramas)

Na síntese realizada no *Laboratório de Química Orgânica Sintética* (LQOS), foi possível isolar 35 gramas de FOSFOETANOLAMINA (FOS), em um único lote, com mais de 99% de grau de pureza, determinado por RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P. O ponto de fusão (não corrigido) obtido para a FOSFOETANOLAMINA foi 250-253 ^{o}C.

Análise de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, RMN-^{31}P e espectrometria de massas da FOSFOETANOLAMINA preparada no LQOS (IQ-UNICAMP).

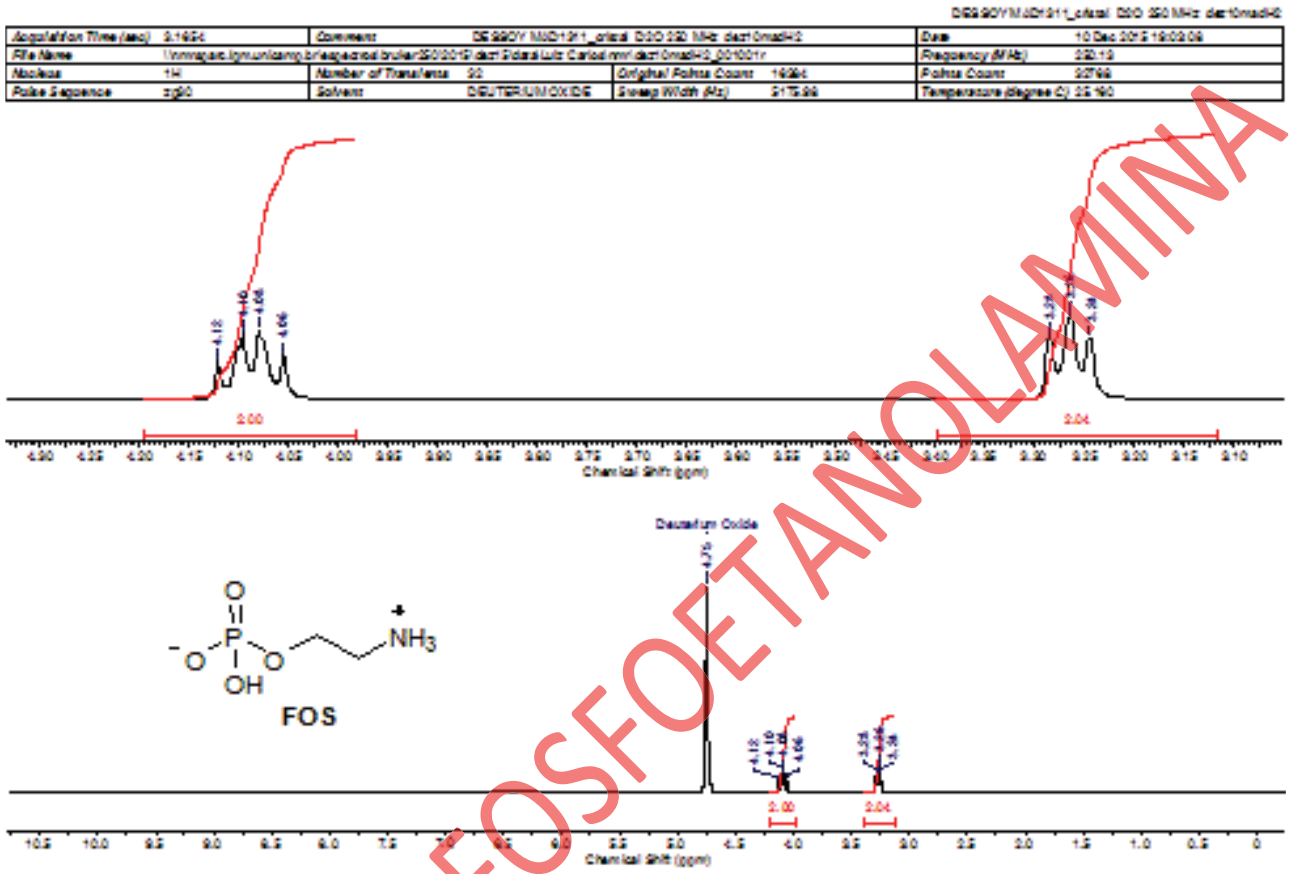
Análise de RMN-^{1}H

Com a FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura obtida no LQOS após recristalização, realizamos as análises de confirmação da sua estrutura química. O espectro de RMN-^{1}H (D_2O, 250 MHz) está mostrado na figura 30. O sinal na forma de *singleto* em 4,75 ppm no espectro na íntegra mostrado na parte inferior da figura 30 refere-se à água residual (HDO) presente no solvente D_2O e é utilizado como padrão de referência interna.

Podemos observar nitidamente a presença de dois sinais diferentes, com as respectivas multiplicidades entre parênteses, um sinal em 4,09 ppm como um aparente *tripleto de dubletos* e outro sinal em 3,24 ppm como um aparente *tripleto*, com cada sinal integrando para dois átomos de hidrogênio, como mostrado na expansão da região entre 3,05-4,30 ppm (figura 30). O sinal em 3,24 ppm aparece como um aparente *tripleto*, pois corresponde aos dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao nitrogênio, acoplando com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao oxigênio. O sinal em torno de 4,09 ppm, que aparece como um aparente *tripleto de dubletos*, corresponde ao acoplamento dos dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao oxigênio com os dois hidrogênios do grupo CH_2 ligado ao nitrogênio e também com o núcleo de fósforo-31, que possui spin ½, assim como o hidrogênio-1. Estes sinais correspondem ao composto FOSFOETANOLAMINA na forma de seu sal, com >99% de pureza. Nenhum sinal de impureza é observado no espectro de RMN-^{1}H, na janela espectral entre 0,0 ppm e 9,5 ppm.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 30. Espectro **RMN-^{1}H** (250 MHz - D_2O) - FOSFOETANOLAMINA pura preparada no LQOS (recristalizada).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Estes sinais estão presentes no espectro de RMN-^{1}H da fração solúvel em D_2O obtida das cápsulas IQSC-USP-MCTI recebidas no LQOS via CIEnP (figura 1, página 3) e via LASSBio (Figura 10, página 18), mostrados na parte A do relatório e confirmam a presença de FOSFOETANOLAMINA (FOS) no conteúdo das cápsulas IQSC-USP-MCTI (ver parte A deste relatório).

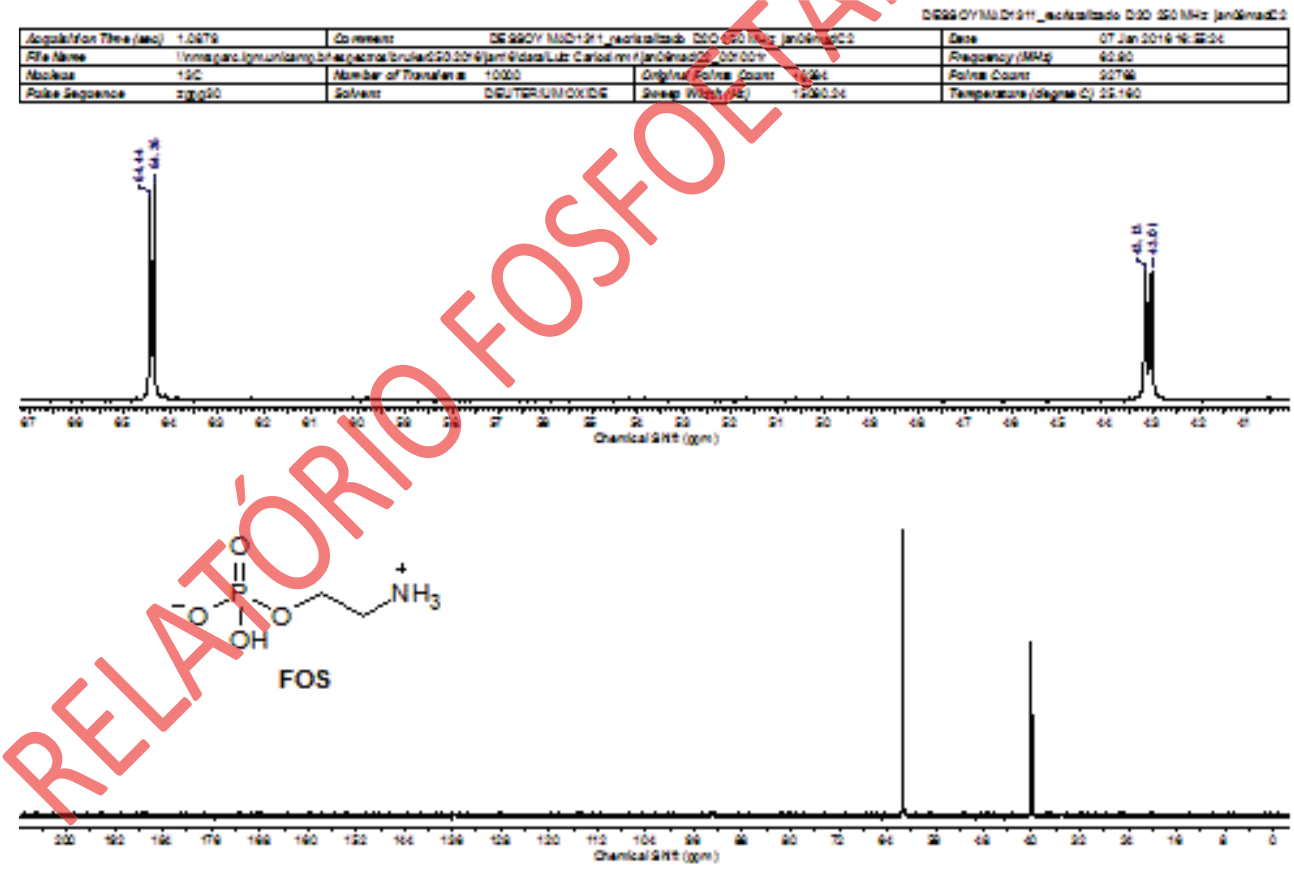
Análise de RMN-^{13}C

Na figura 31, é apresentado o espectro de RMN-^{13}C, adquirido no equipamento Bruker DRX com o núcleo de carbono tendo frequência de ressonância de 62,9 MHz, em D_2O, para a FOSFOETANOLAMINA pura preparada no LQOS após recristalização, com expansão da região entre 40,0 ppm e 67,0 ppm inserida na parte superior da figura. Este espectro apresenta dois sinais, um centrado em 43,07 ppm ($J_{C,P}$ = 7,8 Hz) e o outro centrado em 64,40 ppm ($J_{C,P}$ = 4,6 Hz), ambos com multiplicidade de *dubletos*. Como este espectro foi adquirido com desacoplamento em banda larga de hidrogênio, o desdobramento dos sinais em *dubletos* é causado pelo acoplamento dos núcleos

de carbono-13 com o núcleo de fósforo-31, que possui spin ½. O sinal em 43,07 ppm corresponde ao carbono do grupo CH_2 ligado ao nitrogênio, enquanto o sinal em 64,40 ppm, corresponde ao carbono do grupo CH_2 ligado ao oxigênio. Nenhum sinal de impureza é observado no espectro de RMN-^{13}C, na janela espectral entre 0,0 e 200,0 ppm (espectro inferior, figura 31). O espectro de RMN-^{13}C adquirido para a amostra de FOSFOETANOLAMINA preparada no LQOS é idêntico ao espectro de RMN-^{13}C obtido para uma amostra da FOSFOETANOLAMINA comercial (Marca *Sigma-Aldrich*, figura 37, página 75 deste relatório).

Estes sinais também estão presentes no espectro de RMN-^{13}C da fração solúvel em D_2O obtida das cápsulas recebidas no LQOS, via CIEnP (figura 2, página 5) e via LASSBio (figura 11, página 19) e confirmam a presença de FOSFOETANOLAMINA (FOS) no conteúdo das cápsulas IQSC-USP-MCTI (ver parte A do relatório).

Figura 31. Espectro **RMN-^{13}C** (62,9 MHz - D_2O) - FOSFOETANOLAMINA pura preparada no LQOS (recristalizada).

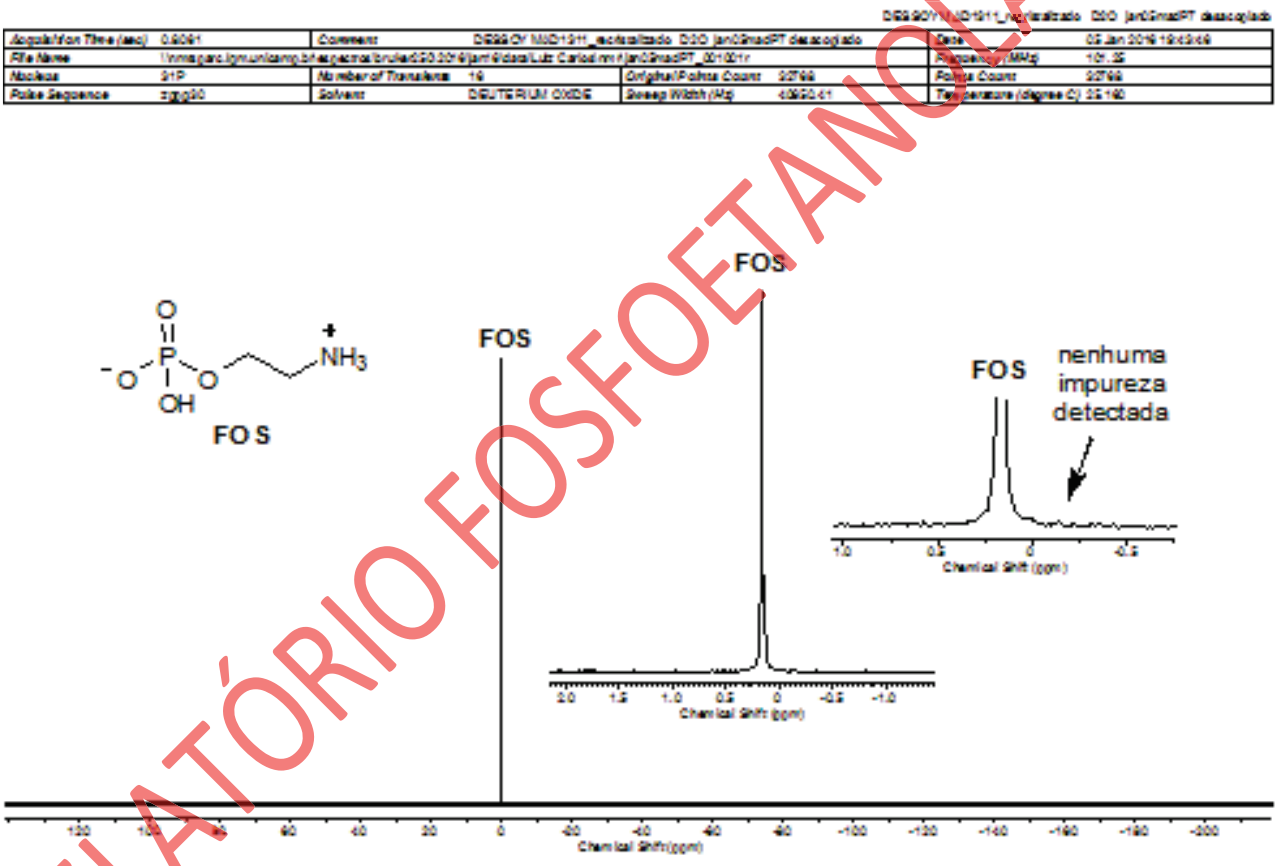


RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Análise de RMN-^{31}P

Na figura 32, apresentamos o espectro de RMN-^{31}P para a FOSFOETANOLAMINA pura preparada no LQOS após recristalização, no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio, adquirido no equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz, em D_2O. Este espectro mostra claramente a presença de apenas uma espécie contendo fósforo.

Figura 32. Espectro de **RMN-^{31}P** (101 MHz - D_2O) - **desacoplado** - FOSFOETANOLAMINA pura preparada no LQOS (recristalizada).

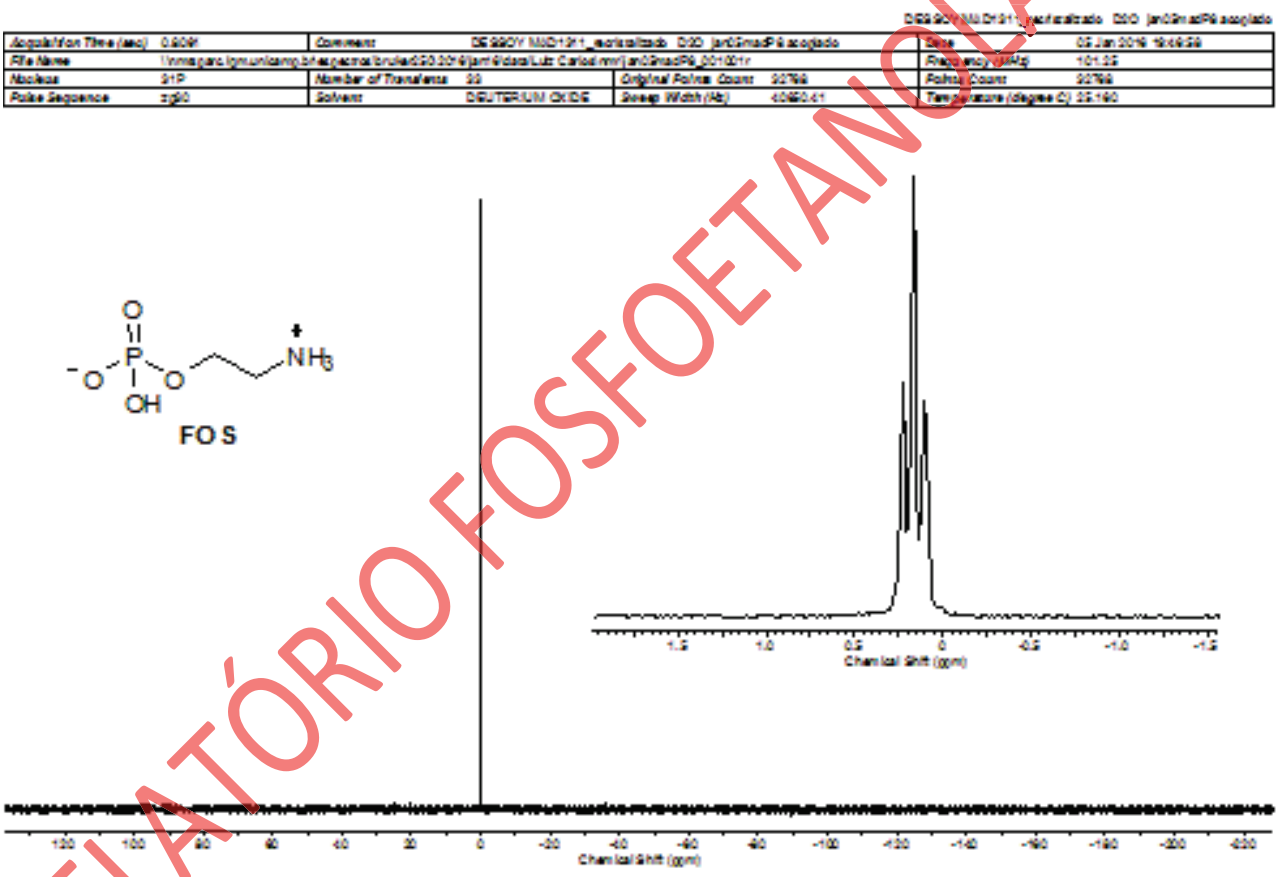


A figura 33 mostra o espectro de RMN-^{31}P totalmente acoplado para a FOSFOETANOLAMINA pura preparada no LQOS, adquirido no equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz, em D_2O (com expansão do sinal em 0,15 ppm). Neste experimento, pode-se observar que o sinal de fósforo com deslocamento químico em torno de 0,15 ppm, aparece como um *tripleto* com constante de acoplamento $J_{P,H} = 6,2$ Hz. Este sinal corresponde ao átomo de fósforo da molécula de FOSFOETANOLAMINA (FOS), sendo

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

que o núcleo de fósforo-31 acopla com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio, aparecendo como um *tripleto*. Este resultado também está de pleno acordo com os espectros de RMN-^{31}P, obtidos da fração solúvel em D_2O, das cápsulas provenientes do CIEnP (Figura 8, página 11) e do LASSBio (Figura 13, página 22), mostrados na parte A deste relatório e confirmam a presença de FOSFOETANOLAMINA (FOS) no conteúdo das cápsulas IQSC-USP-MCTI. Nenhum sinal de impureza é observado no espectro de RMN-^{31}P totalmente acoplado da FOSFOETANOLAMINA (FOS) sintetizada no LQOS, na janela espectral entre –220 e 120 ppm.

Figura 33. Espectro **RMN-^{31}P** (101 MHz - D_2O) - **acoplado** - FOSFOETANOLAMINA pura preparada no LQOS (recristalizada).



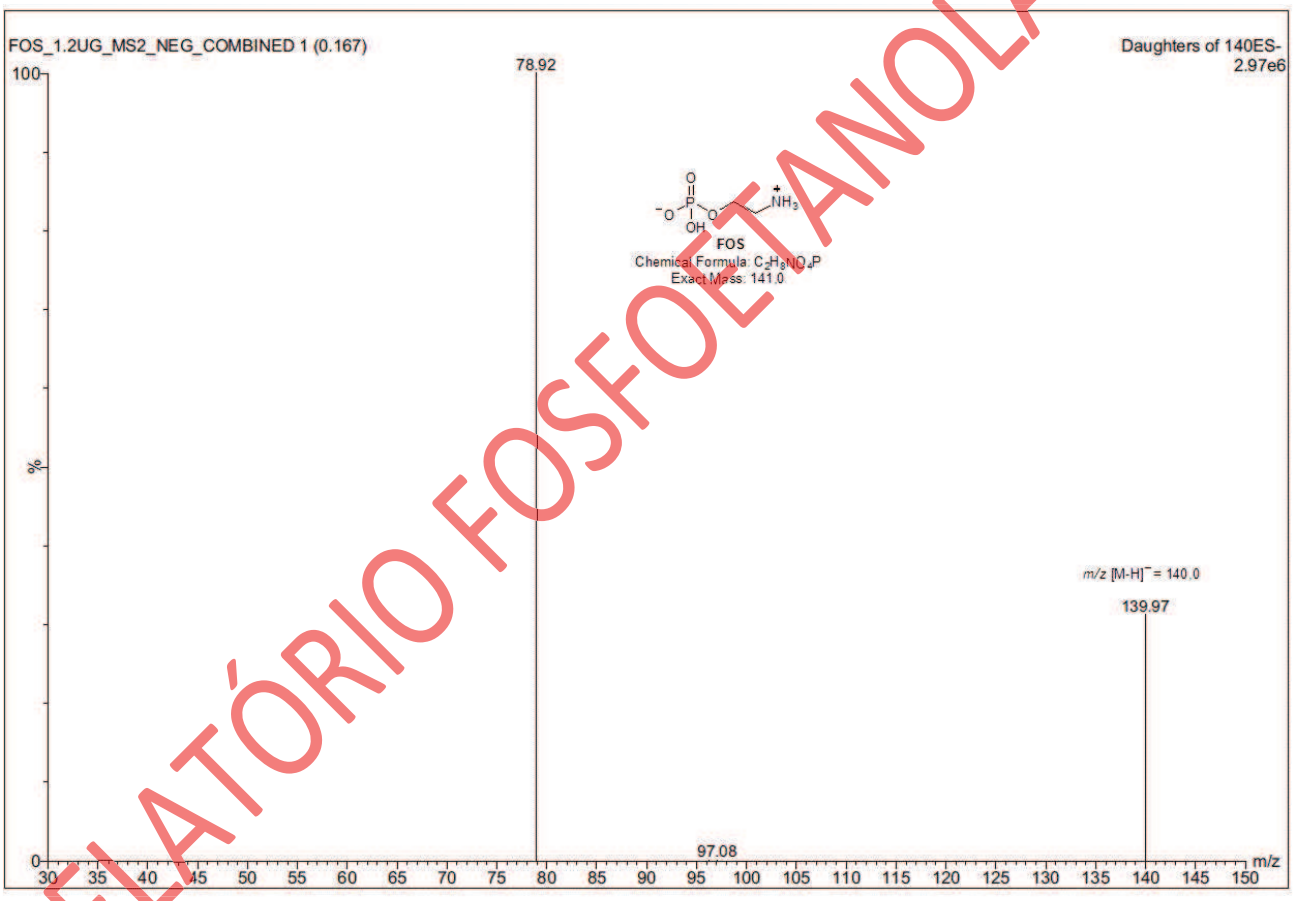
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Estes espectros estão em perfeita concordância com os espectros das amostras enviadas pelo MCTI e recebidas no LQOS, via CIEnP e via LASSBio e comprovam que um dos compostos presentes nas cápsulas IQSC-USP é a FOSFOETANOLAMINA na forma de seu sal, sem associação com os íons Ca^{2+}, Mg^{2+} e Zn^{2+}, Mn^{2+}, Al^{3+}, Fe^{3+} e Ba^{2+}. Outros experimentos serão apresentados neste relatório para confirmação desta afirmativa.

Análise por espectrometria de massas

A fosfoetanolamina sintetizada no LQOS foi analisada por espectrometria de massas de baixa resolução usando o método de ionização por electrospray.[b)] O produto pôde ser detectado tanto no espectro adquirido no modo negativo (figura 34), quanto no espectro adquirido no modo positivo (figura 35).

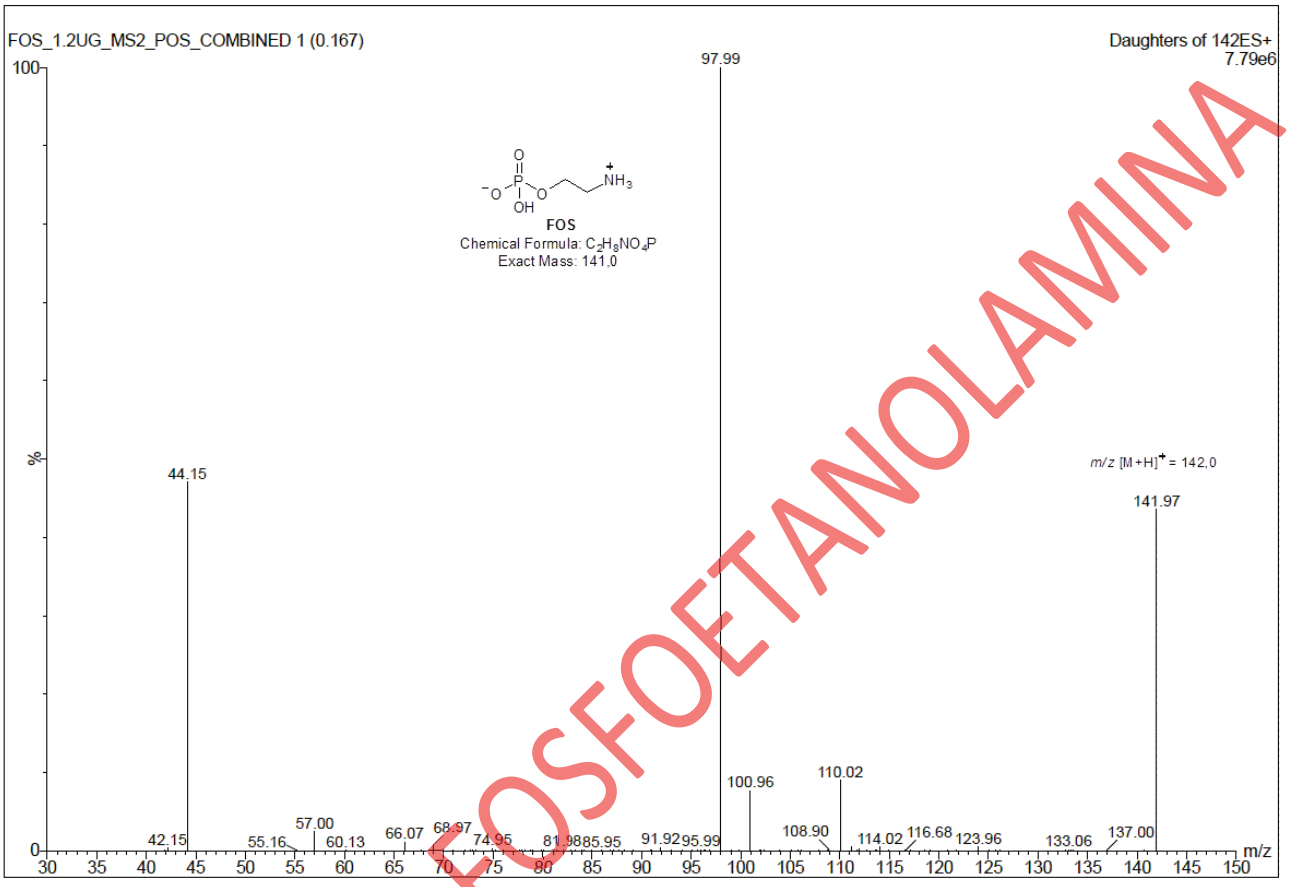
Figura 34. Espectro de massas de baixa resolução da fosfoetanolamina sintetizada no LQOS. Método de ionização: electrospray, modo negativo.[b)]



[b)] Dados do equipamento: Sistema UPLC-MS/MS: Acquity H-Class – Xevo TQS – marca Waters; Software para tratamento dos dados: MassLynx; Fonte de ionização: Electrospray nos modos de ionização positivo e negativo; Tipo de analisador: triploquadrupolo; Modos de escaneamento de massas: MS1Scan e Daughter Scan; Voltagem do cone: 25V; Voltagem do capilar: 3,5kV; Temperatura de dessolvatação: 550°C; Vazão do gás de dessolvatação (nitrogênio): 1100L/hora; Vazão do gás no cone: 150L/hora; Nebulizador: 7,0 Bar; Vazão do gás de colisão (argônio): 0,15mL/min; Energia de colisão: 22eV.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 35. Espectro de massas de baixa resolução da fosfoetanolamina sintetizada no LQOS. Método de ionização: electrospray, modo positivo.[b)]



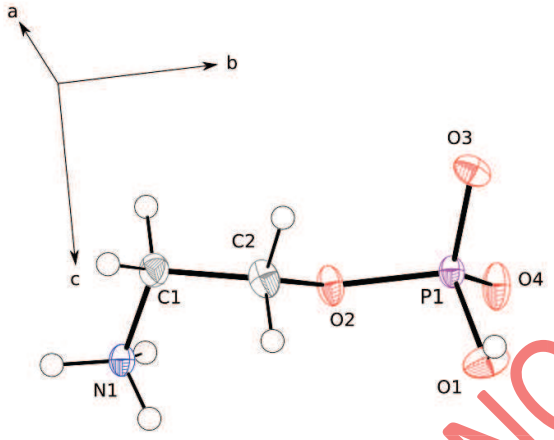
[b)] Dados do equipamento: Sistema UPLC-MS/MS: Acquity H-Class – Xevo TQS – marca Waters; Software para tratamento dos dados: MassLynx; Fonte de ionização: Electrospray nos modos de ionização positivo e negativo; Tipo de analisador: triploquadrupolo; Modos de escaneamento de massas: MS1Scan e Daughter Scan; Voltagem do cone: 25V; Voltagem do capilar: 3,5kV; Temperatura de dessolvatação: 550°C; Vazão do gás de dessolvatação (nitrogênio): 1100L/hora; Vazão do gás no cone: 150L/hora; Nebulizador: 7,0 Bar; Vazão do gás de colisão (argônio): 0,15mL/min; Energia de colisão: 22eV.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Análise por difração de Raios-X de monocristal

Como a fosfoetanolamina sintetizada no LQOS foi obtida de forma pura em estado cristalino, sua estrutura pôde ser confirmada por meio de análise de difração de raios-X de monocristal (figura 36). Pode-se observar a ligação oxigênio-fósforo e o fato do nitrogênio estar protonado, ou seja, com carga +1 e apenas um dos átomos de oxigênio (O1) da unidade fosfato estar ligado a um átomo de hidrogênio, apresentando assim carga −1.

Figura 36. Determinação da estrutura da fosfoetanolamina sintetizada no LQOS por meio de análise por difração de raios-X de monocristal.



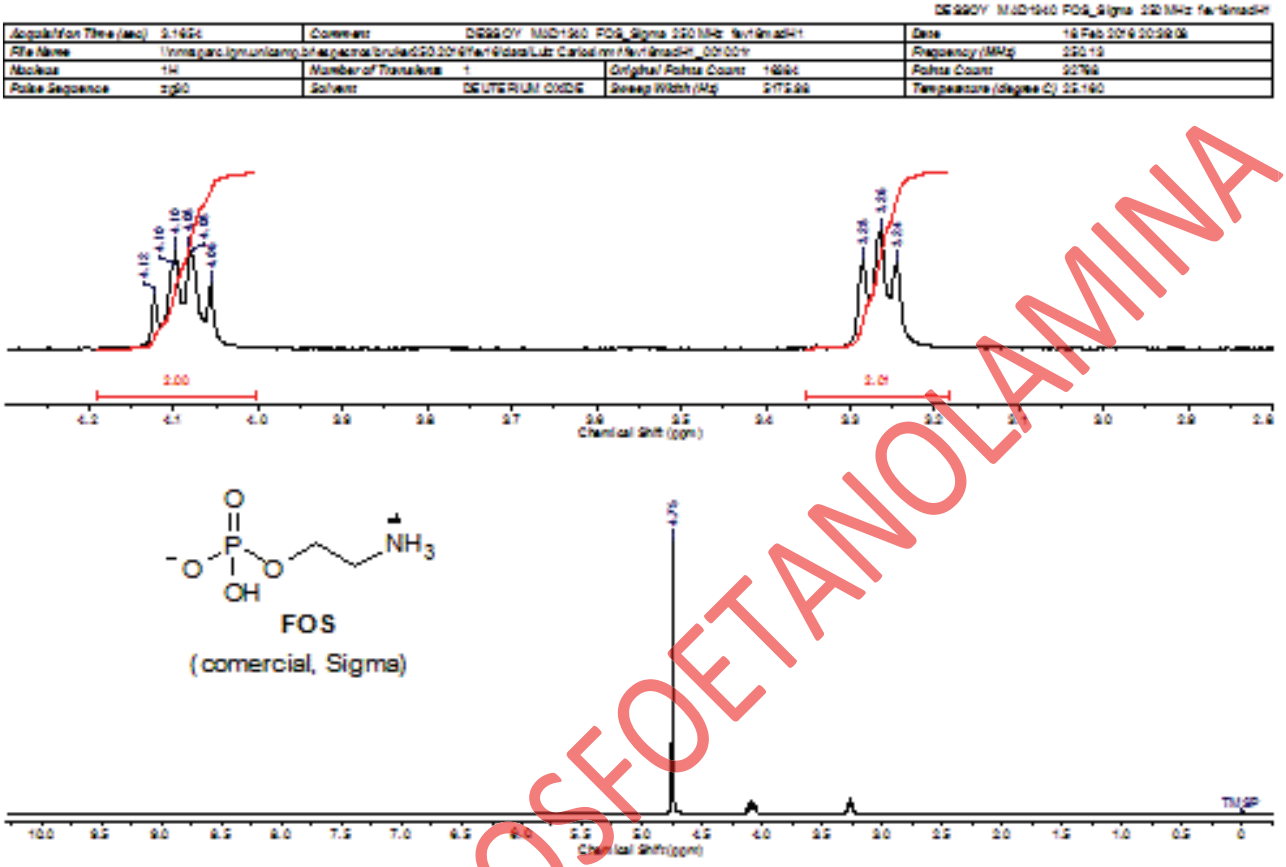
Análise de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, RMN-^{31}P da FOSFOETANOLAMINA comercial (Marca *Sigma-Aldrich*)

Uma amostra contendo 69,4 gramas FOSFOETANOLAMINA, marca *Sigma-Aldrich*, CAS 1071-23-4, PM 141,06 g/mol, Sigma-Aldrich *PCode* 101677816, código de catálogo P0-503, lote # BCBQ7961V foi enviada pelo LASSBio via SEDEX no dia 16/02/2016 e recebida no LQOS no dia 18/02/2016.

Esta amostra de FOSFOETANOLAMINA comercial foi analisada por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1, carbono-13 e fósforo-31 (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, RMN-^{31}P) com a finalidade de comparar esses espectros com os espectros correspondentes obtidos para a FOSFOETANOLAMINA preparada no LQOS. Os espectros de RMN-^{1}H (figura 30, página 68 e figura 37, página 75) e RMN-^{13}C (figura 31, página 69 e figura 38, página 76) adquiridos para a FOSFOETANOLAMINA preparada no LQOS e a comercial são idênticos. A figura 39 (página 77) mostra os espectros de RMN-^{31}P adquiridos para a mostra de FOSFOETANOLAMINA comercial no modo acoplado (parte superior, A) e desacoplado em banda larga de hidrogênio (parte inferior, B). O espectro B acusa a presença de traços de fosfato inorgânico e de FBEA, impurezas que estão ausentes no espectro RMN-^{31}P adquirido para o produto sintetizado e purificado no LQOS (figura 33, página 71).

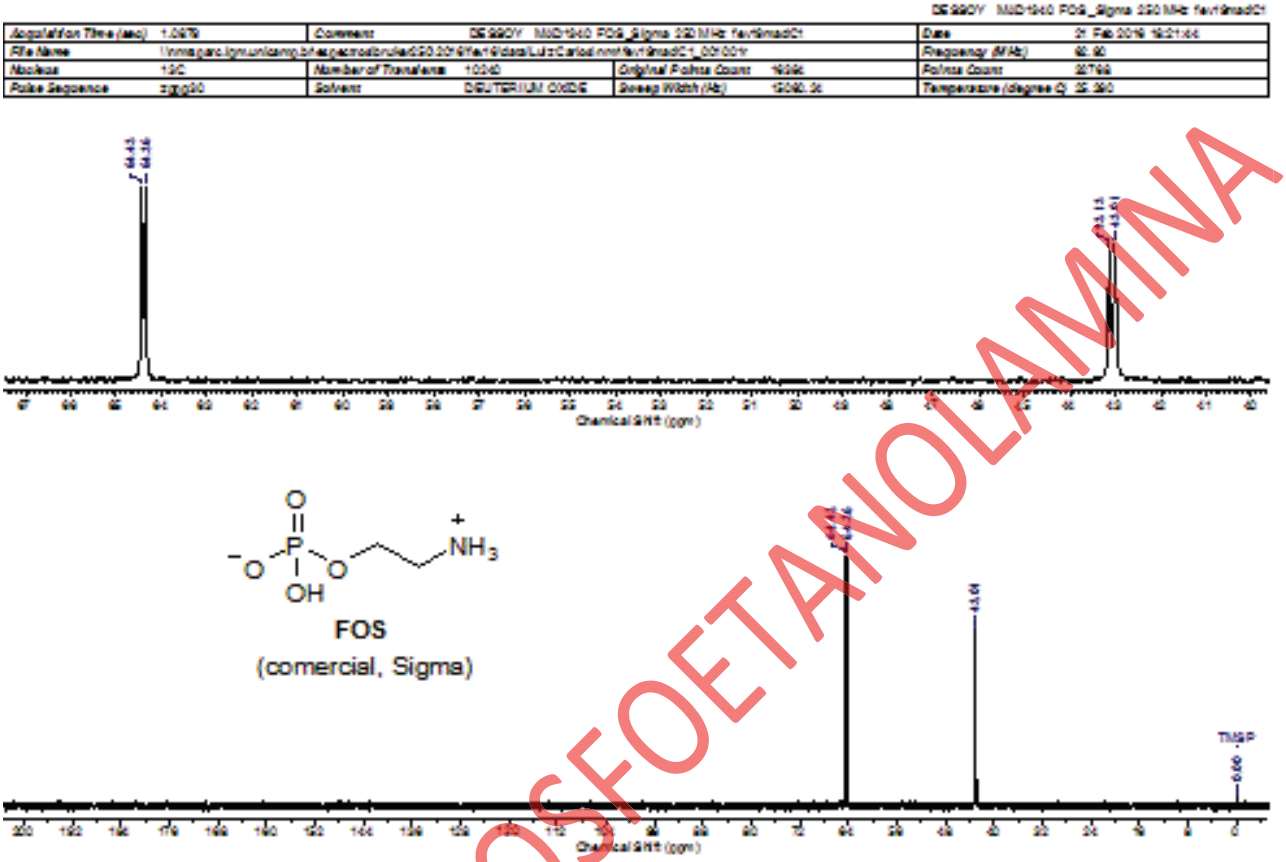
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 37. Espectro **RMN-^{1}H** (250 MHz - D_2O) - FOSFOETANOLAMINA comercial (*Sigma*).



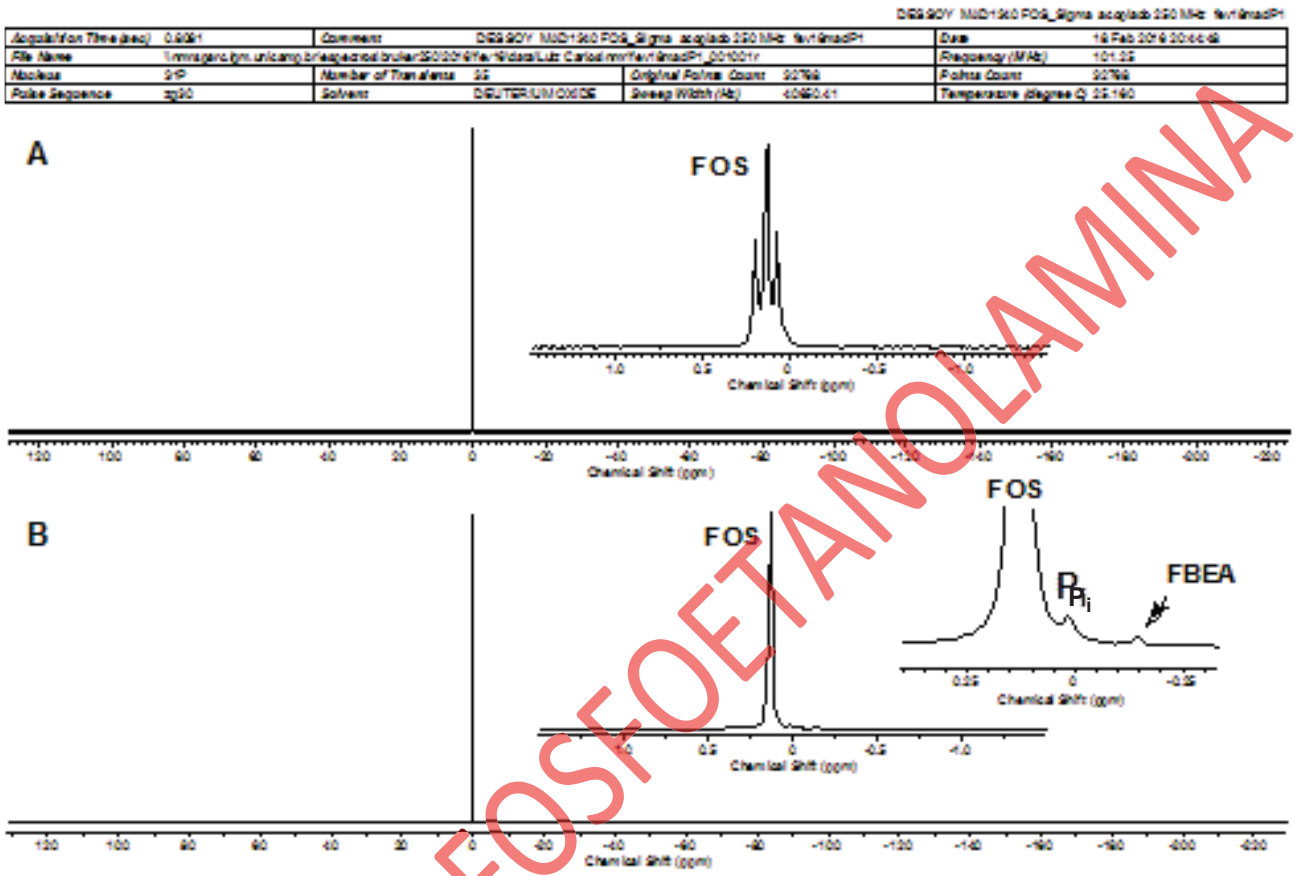
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 38. Análise de RMN-^{13}C da fosfoetanolamina comercial (*Sigma*).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 39. Análise de RMN-^{31}P da fosfoetanolamina comercial (*Sigma*). **A**: modo acoplado; **B**: modo desacoplado.

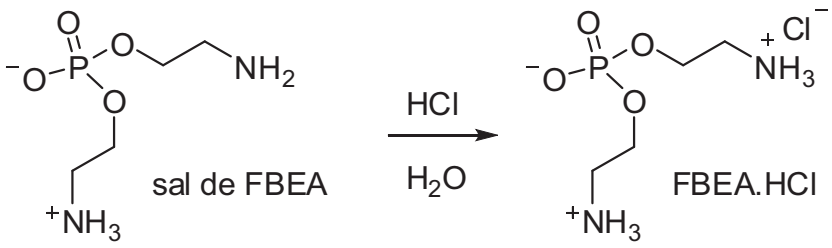


RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

2. CLORIDRATO DA FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl: 5 gramas)

Após separação e purificação dos produtos formados no experimento visando a síntese da FOSFOETANOLAMINA (FOS), foi possível isolar 5 gramas do hidrocloreto de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl), em um único lote, com alto grau de pureza, conforme determinado por RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P. O ponto de fusão (não corrigido) para a FOSFOBISETANOLAMINA foi de 252-253 ^{o}C (decomposição). O cloridrato de FOSFOBISETANOLAMINA foi preparado a partir da FOSFOBISETANOLAMINA após adição de HCl (esquema 14).

Esquema 14. Preparação do cloridrato de fosfobisetanolamina no LQOS



Análise de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, RMN-^{31}P e espectrometria de massas do cloridrato da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) preparado no LQOS (IQ-UNICAMP).

Análise de RMN-^{1}H

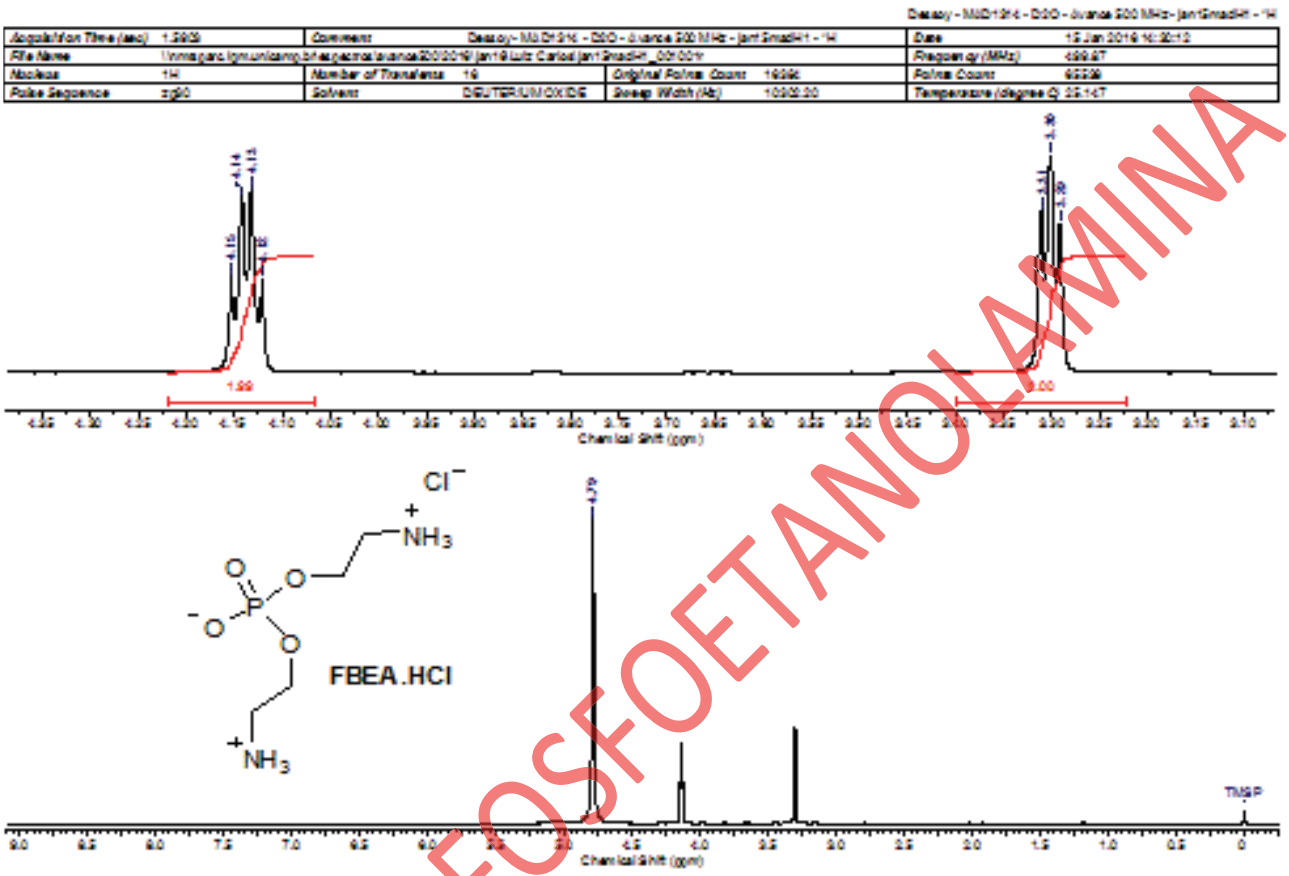
A figura 40 mostra o espectro de RMN-^{1}H (D_2O, 500 MHz) do cloridrato da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) puro, preparado no LQOS, com a expansão da região entre 3,10 ppm e 4,35 ppm na parte superior.

A estrutura do cloridrato da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) pôde ser confirmada pelo *tripleto* em 3,30 ppm (J = 5,0 Hz), correspondendo ao acoplamento dos dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao nitrogênio com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio, assim como ao *quarteto* em torno de 4,13 ppm (J = 5.0 Hz), que corresponde ao acoplamento dos dois hidrogênios do grupo CH_2 ligado ao oxigênio com os dois hidrogênios do grupo CH_2 ligado ao nitrogênio e com o núcleo de fósforo-31. Cada um destes sinais apresenta integração para dois hidrogênios, como esperado. O cloridrato de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) foi obtido com > 99% de pureza. Nenhum sinal de impureza é observado no espectro de RMN-^{1}H, na janela espectral entre 0,0 e 9,0 ppm. O sinal em 4,79 ppm corresponde a água residual (HDO) e o sinal em 0,00 ppm corresponde a TMSP, utilizados como padrões de referência interna.

Os sinais do espectro de RMN-^{1}H para o cloridrato da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) preparado no LQOS também estão presentes no espectro de RMN-^{1}H da fração solúvel em D_2O obtido do material das cápsulas recebidas no LQOS via CIEnP (figura 1, página 3) e via LASSBio (figura 10, página 18), mostrados na parte A deste relatório e confirmam a presença da espécie protonada da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.H^{+}) no conteúdo das cápsulas IQSC-USP-MCTI enviadas ao CIEnP e ao LASSBio.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 40. Espectro **RMN-^{1}H** (500 MHz - D_2O) – Cloridrato de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) preparado no LQOS.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

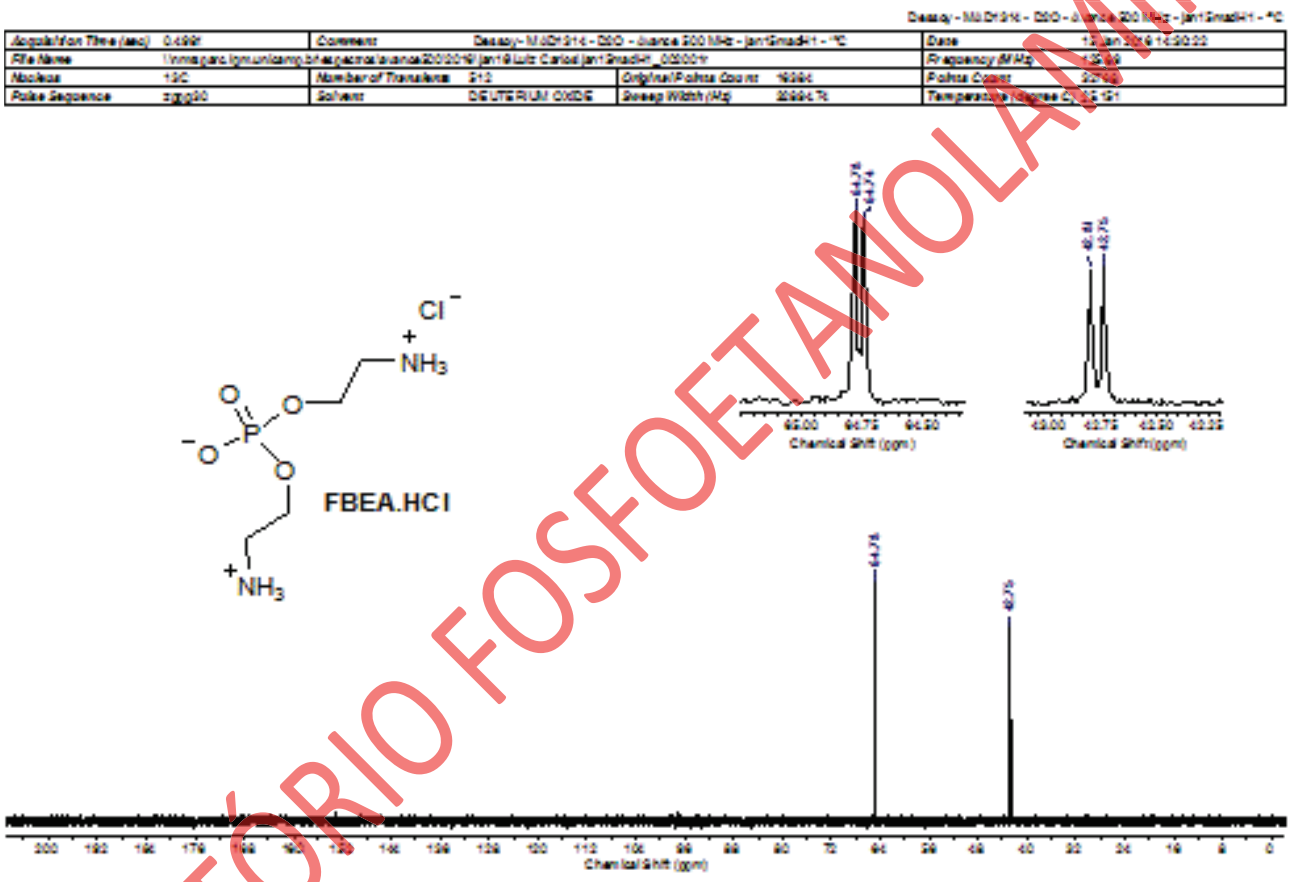
Análise de RMN-^{13}C

A Figura 41 apresenta o espectro de RMN-^{13}C, adquirido no equipamento Bruker DRX com o núcleo de carbono tendo frequência de ressonância de 62,9 MHz em D_2O, para o cloridrato da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) puro preparado no LQOS. Duas expansões, para as regiões entre 42,25-43,00 ppm e entre 64,50-65,00 ppm, são mostradas na parte superior da figura 41. Este espectro apresenta dois sinais na forma de dois *dubletos*, estando um centrado em 42,78 ppm ($J_{C,P}$ = 8,0 Hz) e o outro centrado em 64,76 ppm ($J_{C,P}$ = 5,0 Hz).

Como este espectro foi realizado no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio, os sinais com multiplicidade de *dubletos* referem-se a acoplamentos com o núcleo de fósforo-31, que apresenta spin ½. O sinal centrado em 42,78 ppm corresponde ao átomo de carbono do grupo CH_2 ligado ao átomo de nitrogênio, enquanto o sinal centrado em 64,76 ppm, corresponde ao átomo de carbono do grupo CH_2 ligado ao átomo de oxigênio. Estes sinais estão presentes nos espectros de RMN-^{13}C da fração solúvel em D_2O obtida do material contido nas

cápsulas recebidas no LQOS, oriundas do CIEnP (figura 2, página 5) e do LASSBio (figura 11, página 19), mostrados na parte A deste relatório e confirmam a presença da espécie protonada da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.H^{+}) no conteúdo das cápsulas IQSC-USP-MCTI enviadas ao CIEnP e ao LASSBio.

Figura 41. Espectro **RMN-^{13}C** (125 MHz - D_2O) – Cloridrato de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) preparado no LQOS.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

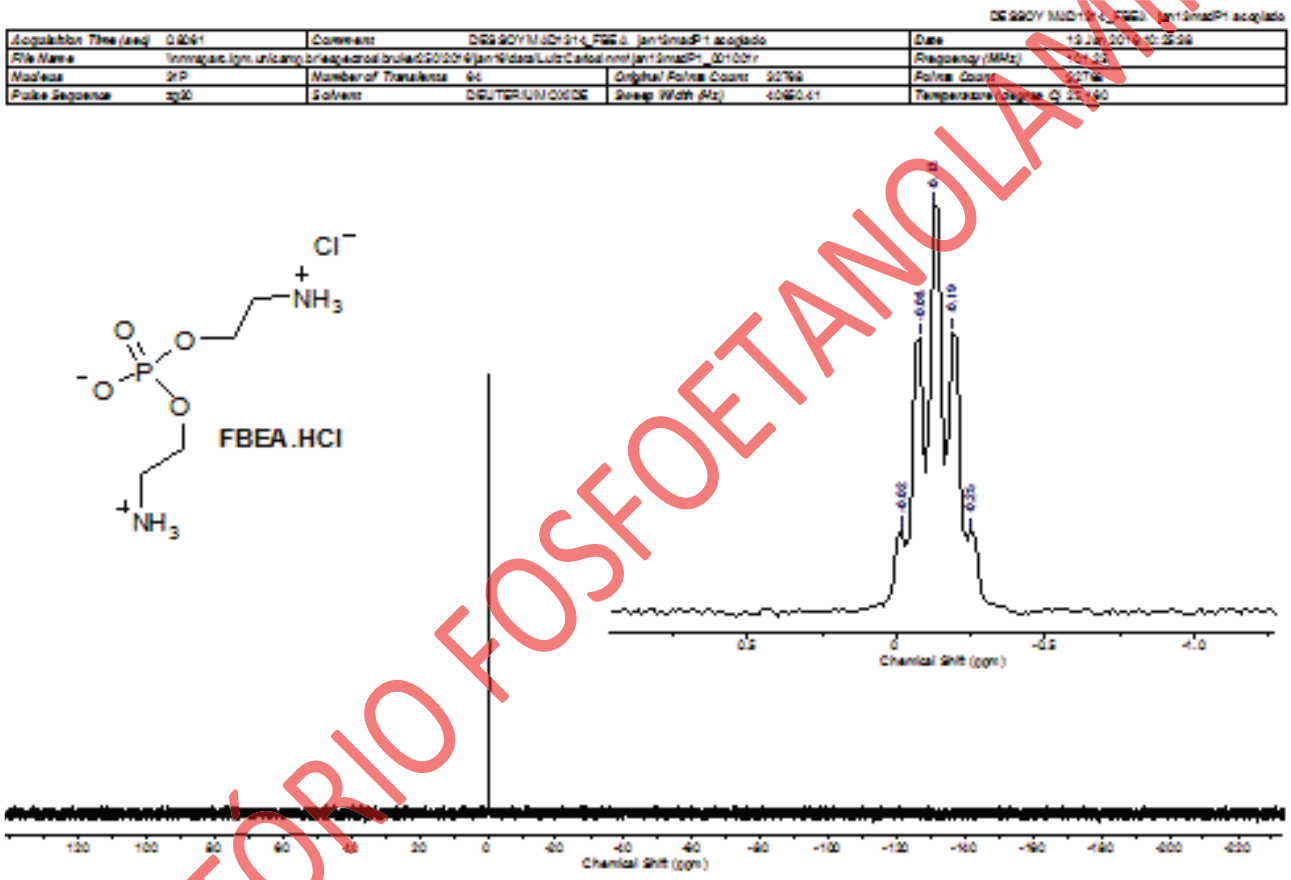
Análise de RMN-^{31}P

A figura 42 mostra o espectro de RMN-^{31}P totalmente acoplado para o cloridrato da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) puro, preparado no LQOS, adquirido no equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo a uma frequência de ressonância de 101,25 MHz, em D_2O (com expansão do sinal em –0,13 ppm, região entre 0,50 ppm e –1,0 ppm).

Neste espectro observa-se o sinal de fósforo com deslocamento químico em torno de –0,13 ppm desdobrado em um *quinteto* com constante de acoplamento $J_{P,H}$ = 6,2 Hz, indicando que o núcleo de fósforo-31 está acoplando com 2 grupos CH_2. Este sinal também aparece no espectro de

RMN-^{31}P da fração solúvel em D_2O obtida das cápsulas recebidas no lQOS via CIEnP (figura 8, página 11) e via LASSBio (figura 13, página 22), mostrados na parte A deste relatório e confirma a presença da espécie protonada da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.H$^+$) no conteúdo das cápsulas IQSC-USP-MCTI enviadas ao CIEnP e ao LASSBio.

Figura 42. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - D_2O) acoplado – Cloridrato da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) preparada no LQOS.



Neste ponto, cabe salientar que a presença de MONOETANOLAMINA protonada já havia sido confirmada nas cápsulas do IQSC-USP, como mostrado na parte A deste relatório (páginas 3-10).

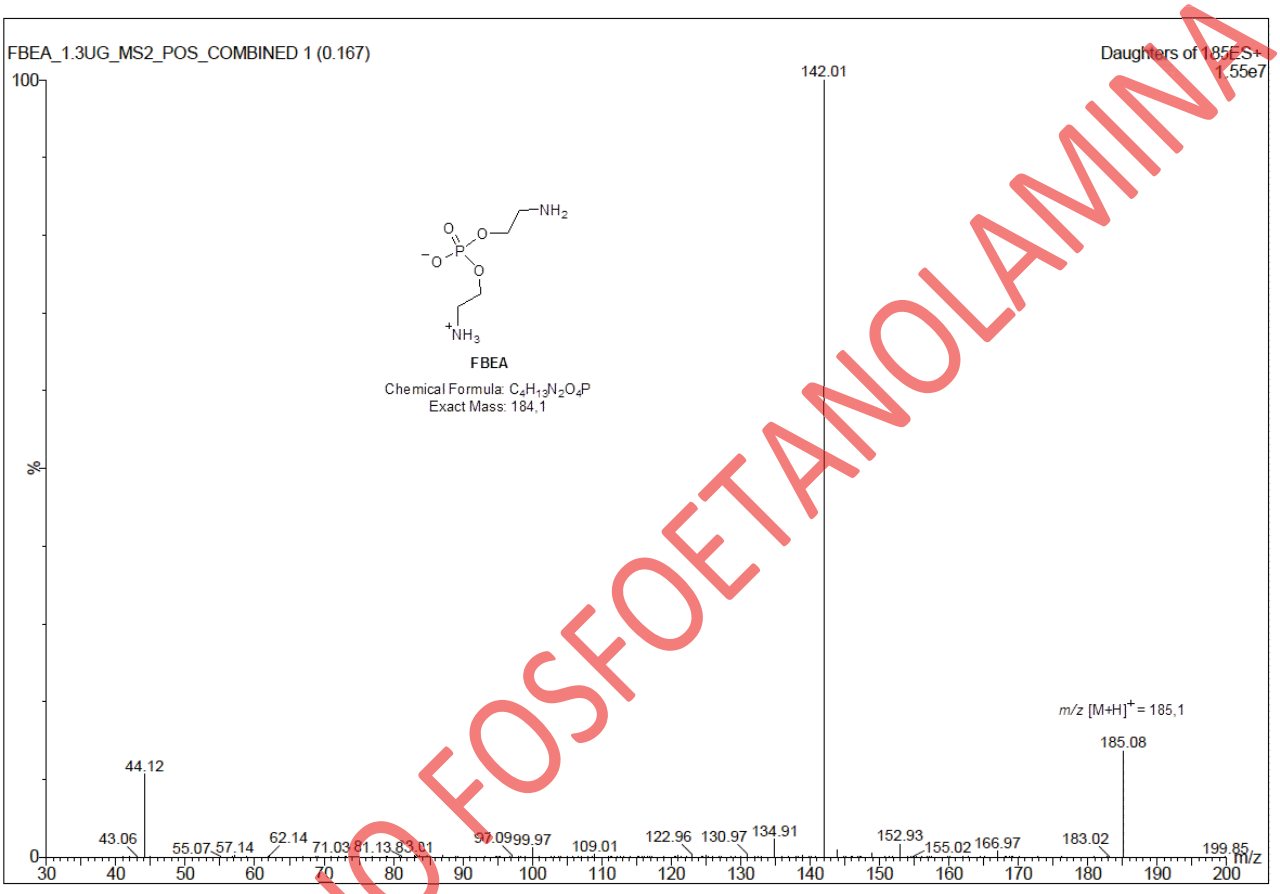
Análise por espectrometria de massas

O cloridrato de fosfobisetanolamina sintetizado no LQOS foi analisado por espectrometria de massas de baixa resolução usando o método de ionização por electrospray. O produto pôde ser

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

detectado tanto no espectro adquirido no modo positivo (figura 43), quanto no espectro adquirido no modo negativo (figura 44).[b]

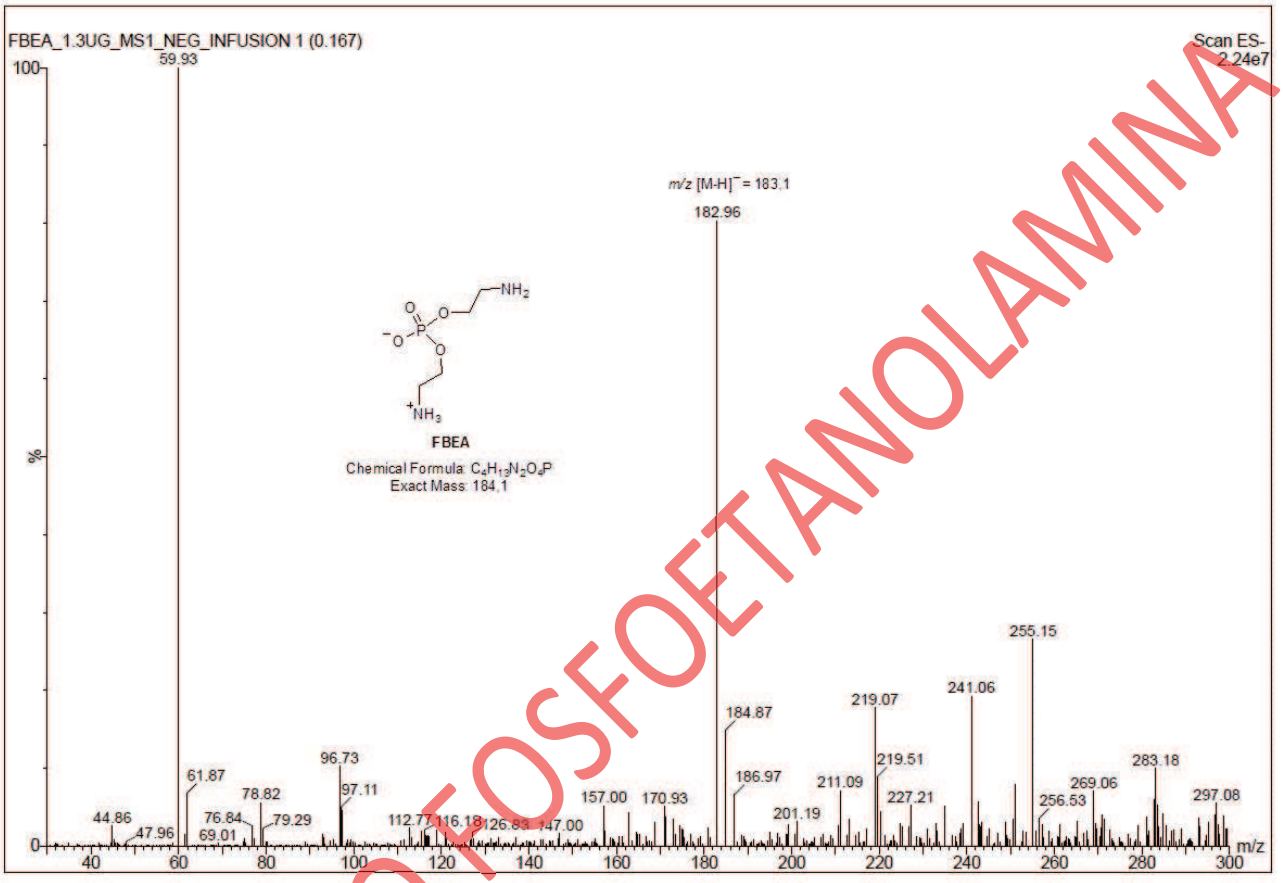
Figura 43. Espectro de massas de baixa resolução da fosfobisetanolamina sintetizada no LQOS. Método de ionização: electrospray, modo positivo.[b)]



[b)] Dados do equipamento: Sistema UPLC-MS/MS: Acquity H-Class – Xevo TQS – marca Waters; Software para tratamento dos dados: MassLynx; Fonte de ionização: Electrospray nos modos de ionização positivo e negativo; Tipo de analisador: triploquadrupolo; Modos de escaneamento de massas: MS1Scan e Daughter Scan; Voltagem do cone: 25V; Voltagem do capilar: 3,5kV; Temperatura de dessolvatação: 550°C; Vazão do gás de dessolvatação (nitrogênio): 1100L/hora; Vazão do gás no cone: 150L/hora; Nebulizador: 7,0 Bar; Vazão do gás de colisão (argônio): 0,15mL/min; Energia de colisão: 22eV.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 44. Espectro de massas de baixa resolução da fosfobisetanolamina sintetizada no LQOS. Método de ionização: electrospray, modo negativo.[b)]



[b)] Dados do equipamento: Sistema UPLC-MS/MS: Acquity H-Class – Xevo TQS – marca Waters; Software para tratamento dos dados: MassLynx; Fonte de ionização: Electrospray nos modos de ionização positivo e negativo; Tipo de analisador: triploquadrupolo; Modos de escaneamento de massas: MS1Scan e Daughter Scan; Voltagem do cone: 25V; Voltagem do capilar: 3,5kV; Temperatura de dessolvatação: 550°C; Vazão do gás de dessolvatação (nitrogênio): 1100L/hora; Vazão do gás no cone: 150L/hora; Nebulizador: 7,0 Bar; Vazão do gás de colisão (argônio): 0,15mL/min; Energia de colisão: 22eV.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

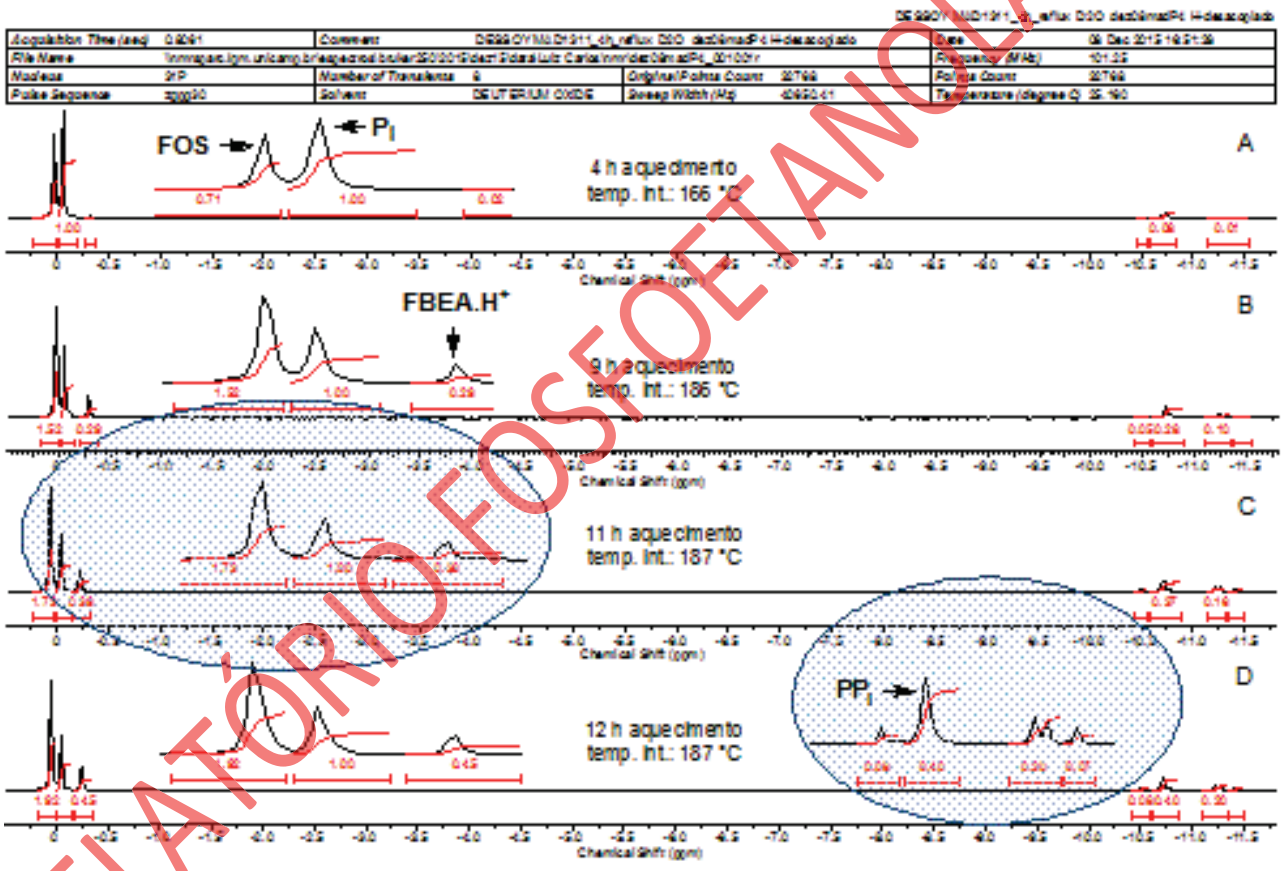
IDENTIFICAÇÃO DOS OUTROS SUB-PRODUTOS FORMADOS NA REAÇÃO ENTRE ÁCIDO FOSFÓRICO E MONOETANOLAMINA.

A próxima etapa envolveu a identificação dos outros compostos formados durante a reação de preparação da FOSFOETANOLAMINA (FOS), como observado no traço D, figura 45. O sinal em 0,10 ppm no espectro de RMN-^{31}P corresponde a FOSFOETANOLAMINA (FOS), o sinal em –0,05

ppm corresponde ao dihidrogenofosfato de etanol amônio (P_i) e o sinal em –0,25 ppm corresponde à FOSFOBISETANOLAMINA protonada (FBEA.H$^+$).

O objetivo aqui foi determinar a natureza das impurezas na região entre –10,0 e –11,5 ppm, em destaque no espectro D, figura 45. Embora estas impurezas sejam eliminadas no processo de purificação (nem todas estão contidas no material das cápsulas IQSC-USP), todas contribuem para diminuir o rendimento químico no processo de síntese da FOSFOETANOLAMINA (FOS) a partir do ácido fosfórico e da monoetanolamina, visto que segundo o espectro D da figura 45, a presença de PP_i corresponde a cerca de 18% do total de espécies de fósforo presentes no meio.

Figura 45. Progresso da reação: monitoramento por RMN-^{31}P – desacoplado (101 MHz, D_2O).

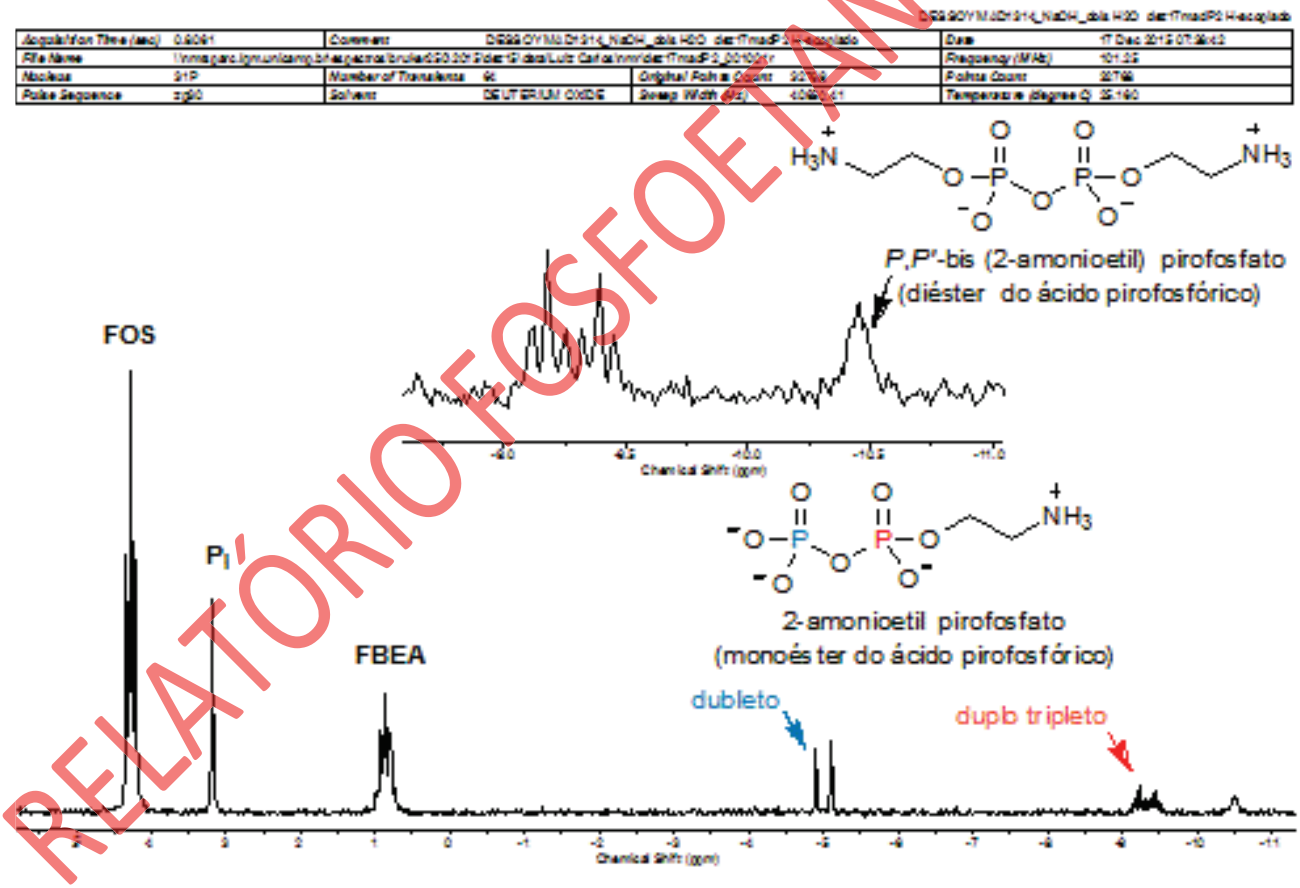


A figura 46 mostra o espectro de RMN-^{31}P no modo totalmente acoplado adquirido para uma alíquota separada durante o processo de purificação. Esta alíquota contém todos os compostos fosforilados orgânicos (além de um resíduo remanescente de fosfato inorgânico, P_i) formados durante o processo de síntese da FOSFOETANOLAMINA (FOS). O pH do meio está fortemente alcalino (pH = 13-14) pois a alíquota foi obtida durante a fase de precipitação de

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

fosfatos e de pirofosfatos (estes já não mais presentes na amostra) inorgânicos com hidróxido de sódio a partir de uma solução hidro alcoólica da mistura reacional bruta. O *tripleto* em torno de 4,4 ppm corresponde a FOSFOETANOLAMINA (FOS), o *singleto* em 3,2 ppm corresponde ao fosfato residual (P_i) e o *quinteto* em 0,9 ppm, corresponde à FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA). Os dois sinais em –5,0 ppm e em –9,3 ppm são devidos à presença de um monoéster do ácido pirofosfórico (ver figura 46, parte inferior, região entre 5,0 e –11,0 ppm). O *dubleto* em –5,0 ppm ($^2J_{P,P}$ = 21,0 Hz) corresponde ao átomo P2 (azul) da unidade difosfato acoplando com o átomo P1 (vermelho) e o *duplo tripleto* em –9,3 ppm ($^2J_{P,P}$ = 21,0 Hz e $^3J_{P,H}$ = 6,8 Hz) corresponde ao átomo P1 (vermelho) da unidade difosfato, acoplando com o átomo P2 (azul) e com os dois átomos de hidrogênio do grupo CH_2 ligado ao oxigênio no resíduo de MONOETANOLAMINA.

Figura 46. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - D_2O) - acoplado - de alíquota básica obtida durante o processo de purificação dos produtos de síntese no LQOS (IQ-UNICAMP).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

O sinal em –10,45 (expansão entre –9,0 e –11,0 ppm, parte superior da figura 46) corresponde ao diéster simétrico do ácido pirofosfórico (PP_i). Como o diéster é simétrico, os dois

núcleos de fósforo-31 apresentam o mesmo deslocamento químico. A multiplicidade esperada para este sinal seria um *tripleto* ($^3J_{P,H}$ ~ 6,8 Hz) em virtude do acoplamento do núcleo de fósforo com os dois hidrogênios do grupo CH_2 ligado ao oxigênio, similar a um dos dois *tripletos* que aparecem na região entre –9,0 ppm e –9,5 ppm do espectro. Contudo, a rotação entre o eixo de ligação do sistema P-O-P nesse diéster deve estar restrita devido ao caráter fortemente iônico, levando à distorção do sinal observado no espectro. O sinal em –10,45 ppm aparece como um *singleto* fino, bem definido no espectro de RMN-^{31}P no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio (D, figura 45).

EXPERIMENTOS ADICIONAIS DE CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE FOSFOETANOLAMINA (FOS), FOSFOBISETANOLAMINA PROTONADA (FBEA.H$^+$) E MONOETANOLAMINA PROTONADA (MEA.H$^+$) NAS CÁPSULAS IQSC-USP-MCTI.

Como a FOSFOETANOLAMINA (FOS) e o cloridrato da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) foram obtidas em elevado grau de pureza pelo processo de síntese realizado no *Laboratório de Química Orgânica Sintética* (LQOS) e a monoetanolamina é comercialmente disponível, foi realizada uma série de experimentos de RMN-^{1}H, de RMN-^{31}P e de RMN-^{13}C a partir da co-adição individual de cada composto puro ao material das cápsulas provenientes do IQSC-USP para confirmação adicional da presença destes 03 (três) compostos no material sólido contido nas cápsulas do IQSC-USP-MCTI.

EXPERIMENTO 1: RMN-^{31}P (101 MHz, D_2O)

A figura 47 mostra o resultado dos experimentos A, B e C, assim conduzidos: no experimento A, foi adquirido o espectro de RMN-^{31}P (101 MHz, D_2O) no modo totalmente acoplado para a fração solúvel em D_2O (pH 5-6) do material contido nas cápsulas IQSC-USP-MCTI (amostra de 30 mg), como já discutido anteriormente nas figuras 8 e 13, páginas 11 e 22 da parte A deste relatório, respectivamente. O espectro A mostra a presença de FOSFOETANOLAMINA (FOS) em 2,75 ppm, a presença de fosfatos inorgânicos (possivelmente dihidrogenofosfato de etanol amônio, P_i) em 0,5 ppm e a presença de FOSFOBISETANOLAMINA protonada (FBEA.H$^+$) em –0,15 ppm na razão molar aproximada de **100:37:14** para FOS:P_i:FBEA, respectivamente.

Para realizar os experimentos B e C, foram colocados cerca de 30 mg do conteúdo de uma mesma cápsula IQSC-USP-MCTI em cada um de dois tubos de ensaio diferentes, 1 e 2.

No experimento B, no tubo de ensaio 1, foram adicionados 10 mg de cloridrato de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) puro, preparado no LQOS, no estado sólido, a uma amostra sólida (30 mg) do material das cápsulas do IQSC-USP. Essa mistura recebeu a adição de D_2O (0,6 mL) e, após agitação magnética por 30 minutos à temperatura ambiente e filtração, a fração

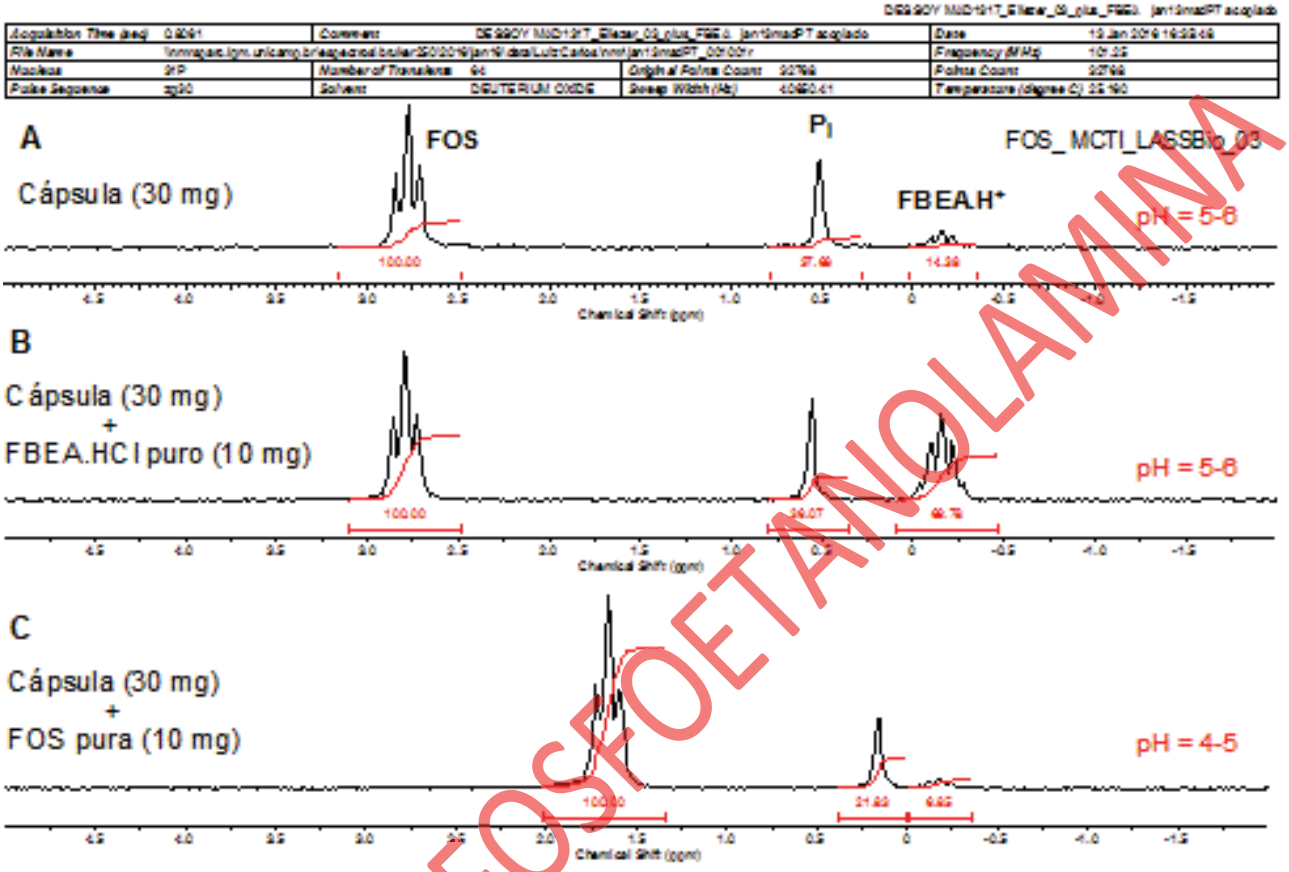
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

solúvel foi analisada por RMN-^{31}P no modo acoplado (pH 5-6). Nesse experimento, o espectro de RMN-^{31}P (101 MHz, D_2O) acusa a razão molar aproximada de FOS:P_i:FBEA.H^+ como sendo **100:36:70**, com nítido aumento na intensidade do sinal em –0,15 ppm, comprovando de forma inequívoca a presença de uma espécie protonada de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.H^+) nas cápsulas da IQSC-USP-MCTI (ver páginas 77-83 deste relatório, parte B).

O experimento C foi conduzido de forma análoga ao experimento B, com o tubo de ensaio 2, porém com a adição de 10 mg de FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura, preparada no LQOS a uma amostra sólida (30 mg) do material da mesma cápsula IQSC-USP utilizada no experimento B. Essa mistura recebeu a adição de D_2O (0,6 mL) e, após agitação magnética por 30 minutos à temperatura ambiente e filtração, a fração solúvel foi analisada por RMN-^{31}P no modo totalmente acoplado (pH 4-5). Nessa condição, o espectro de RMN-^{31}P passa a acusar uma razão molar aproximada de FOS:P_i:FBEA.H^+ de **100:22:07**, com nítido aumento na intensidade do sinal em 1,70 ppm, comprovando de forma inequívoca a presença de FOSFOETANOLAMINA (FOS) nas cápsulas IQSC-USP-MCTI. Neste experimento, é observada uma pequena variação nos deslocamentos químicos para as 03 espécies no espectro de RMN-^{31}P. Isto se dá em virtude da alteração do pH do meio (pH = 4-5) com a adição de FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura, que é ácida. De fato, os deslocamentos químicos de núcleos de fósforo são muito sensíveis a pequenas mudanças no pH do meio.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 47. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - D_2O) acoplado. Mistura Cápsula + FBEA.H$^+$ e Cápsula + FOS.

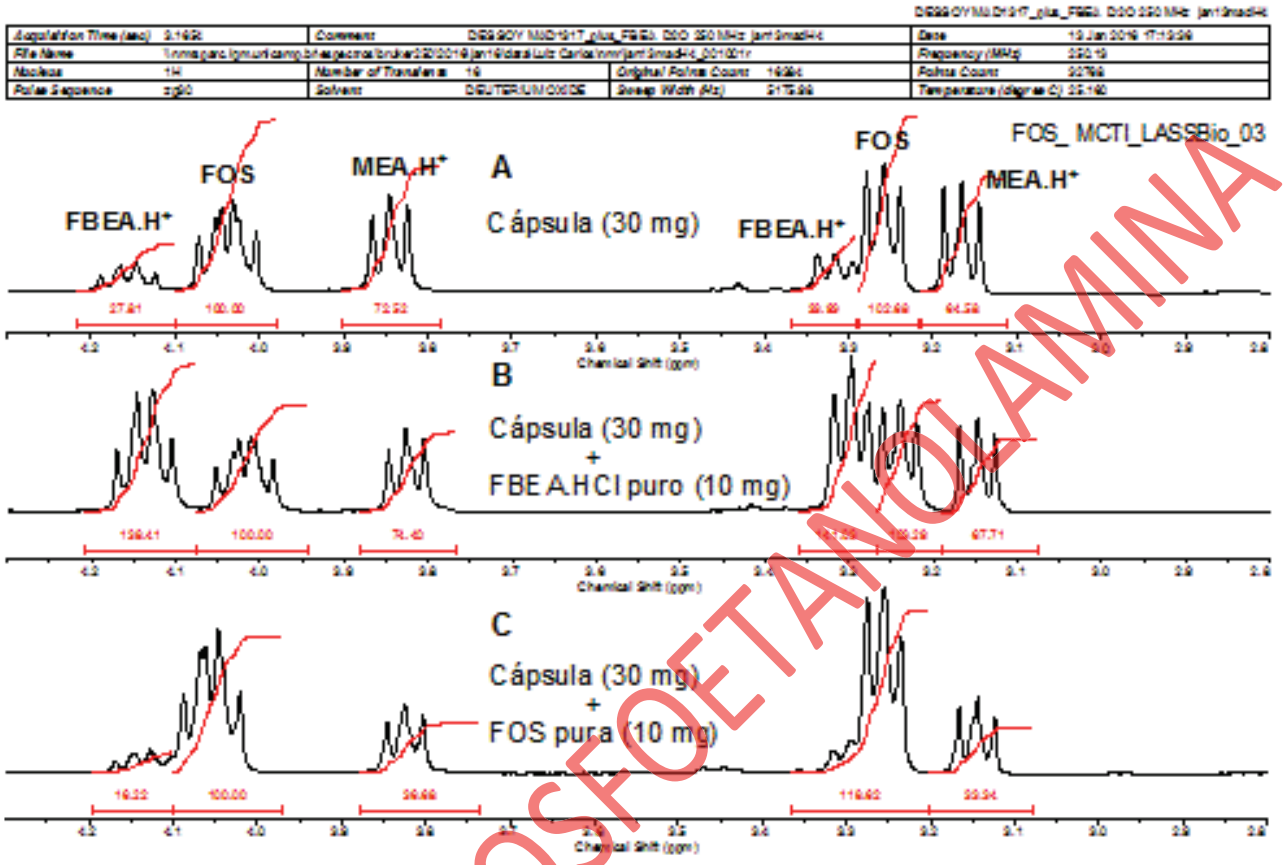


RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

EXPERIMENTO 2: RMN-^{1}H (250 MHz, D_2O)

Na figura 48 são apresentados os espectros de RMN-^{1}H (250 MHz, D_2O) relativos aos mesmos experimentos A, B e C, descritos acima. O experimento A mostra o espectro de RMN-^{1}H para a fração do material solúvel em D_2O das cápsulas IQSC-USP-MCTI, como já discutido anteriormente nas figuras 1 e 10, páginas 3 e 18, respectivamente, na parte A deste relatório. Concentrando apenas na primeira série de sinais entre 2,80 ppm e 4,20 ppm, o experimento A mostra a presença de FOSFOBISETANOLAMINA protonada (FBEA.H$^+$) em 4,16 ppm, FOSFOETANOLAMINA (FOS) em torno de 4,05 ppm e de MONOETANOLAMINA protonada (MEA.H$^+$) em 3,85 ppm. A razão molar entre FBEA.H$^+$:FOS:MEA.H$^+$ é de **28:100:72**.

Figura 48. Espectro RMN-^{1}H (250 MHz - D_2O). Mistura Cápsula + FBEA.H^{+} e Cápsula + FOS.



No experimento B, onde foram adicionados 10 mg de cloridrato de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) pura preparada no LQOS, a razão molar aproximada de FBEA.H^{+}:FOS:MEA.H^{+} mudou para **138:100:74**, com aumento na intensidade do sinal em 4,16 ppm, comprovando a presença de uma espécie protonada de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.H^{+}) nas cápsulas IQSC-USP-MCTI. O outro sinal correspondendo a FBEA.H^{+} em 3,32 ppm também teve aumento na sua intensidade de 34 para 141 (ver páginas 77-83 deste relatório, parte B).

No experimento C, onde foram adicionados 10 mg de FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura preparada no LQOS, a razão molar aproximada de FBEA.H^{+}:FOS:MEA.H^{+} mudou para **16:100:37**, com aumento na intensidade do sinal em 4,05 ppm, comprovando mais uma vez a presença de FOSFOETANOLAMINA (FOS) nas cápsulas IQSC-USP-MCTI. Neste experimento também pode-se observar o aumento da intensidade do sinal em torno de 3,25 ppm, o outro sinal da FOS (ver páginas 67-77 deste relatório, parte B).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

EXPERIMENTO 3: Espectro de RMN-^{1}H de combinação de FOSFOETANOLAMINA e FOSFOBISETANOLAMINA preparadas no LQOS com monoetanolamina comercial

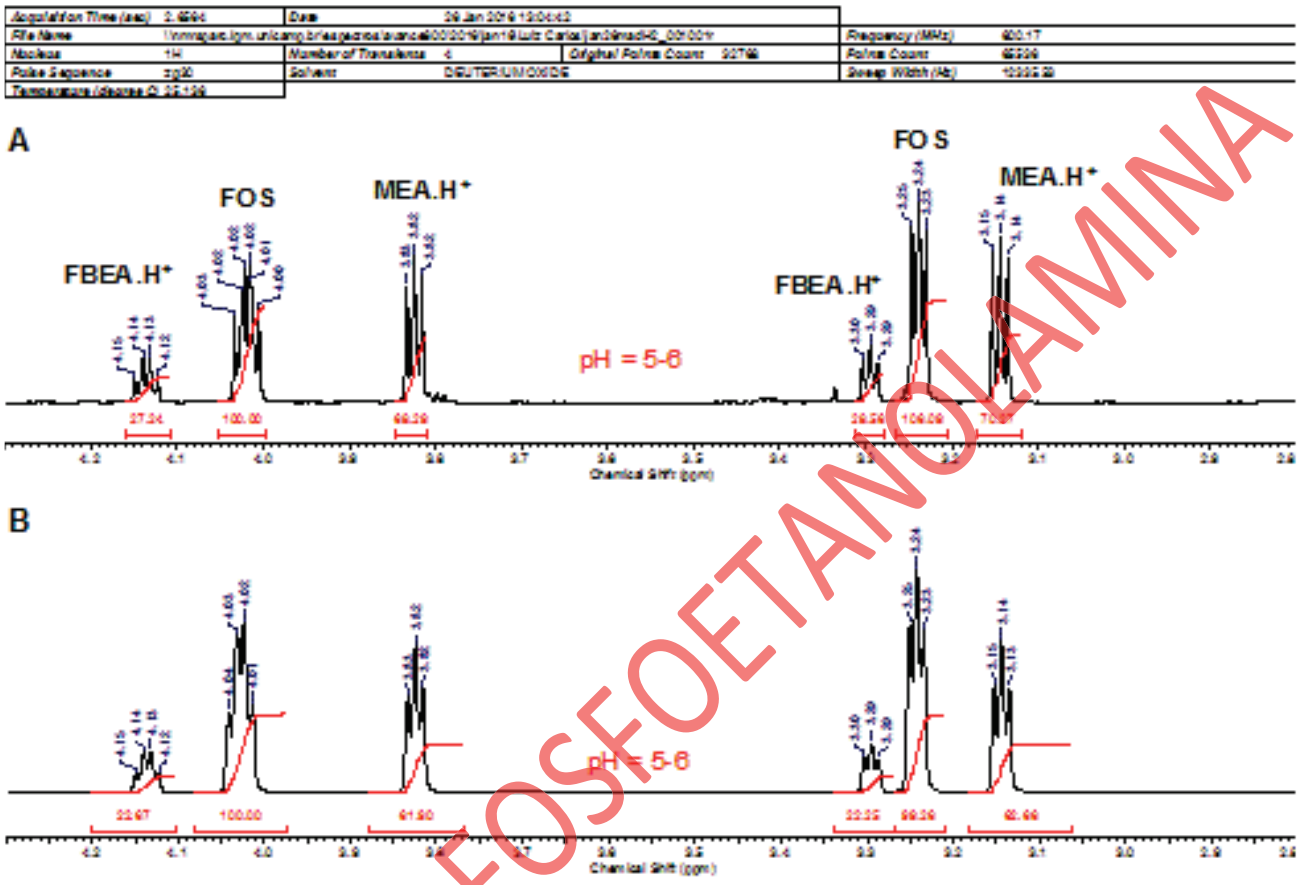
Um experimento adicional, similar ao mostrado nas figuras 47 e 48, foi realizado para demonstrar a natureza dos compostos orgânicos que compõe o material das cápsulas do IQSC-USP-MCTI (figura 49).

Para tal, foram combinados FOSFOETANOLAMINA (200 μmol) e FOSFOETANOLAMINA (FBEA.HCl) (30 μmol) sintetizados no LQOS com monoetanolamina comercial (redestilada, 140 μmol), a saber, numa razão molar FOS:FBEA.HCl:MEA de **100:15:70**, a mesma razão molar em que essas espécies químicas foram detectadas no material da cápsulas. A mistura foi completamente dissolvida em D_2O (1,2 mL) e a solução resultante foi submetida à análise de RMN-^{1}H em equipamento Bruker DRX com o núcleo de hidrogênio tendo frequência de ressonância de 600 MHz (figura 49). A parte superior (A) dessa figura mostra uma expansão do espectro de RMN-^{1}H, também a 600 MHz, da fração solúvel do material das cápsulas IQSC-USP-MCTI e a parte inferior (B) a expansão da mesma região do espectro da mistura descrita acima com os compostos preparados no LQOS Pela comparação dos espectros, observa-se uma perfeita concordância entre ambos, mais uma vez comprovando a natureza dos constituintes da cápsula de FOS. Observa-se, ainda, que o grau de pureza do material contido nas cápsulas é inferior ao grau de pureza da mistura dos produtos sintetizados no LQOS. Cabe ressaltar que, inclusive, o valor de pH das duas soluções é o mesmo: 5-6.

Estes experimentos servem como mais uma prova de que tanto a FOSFOETANOLAMINA (FOS) como a FOSFOBISETANOLAMINA protonada (FBEA.H$^+$) e a MONOETANOLAMINA protonada estão presentes nas cápsulas da USP.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 49. Espectro RMN-^{1}H (600 MHz - D_2O). Fração solúvel da cápsula IQSC-USP-MCTI (A) e mistura de FOS e FBEA.HCl sintetizadas no LQOS com monoetanolamina comercial (B).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

EXPERIMENTO 4: Adição de K_3PO_4 (RMN-^{31}P, 101 MHz, D_2O)

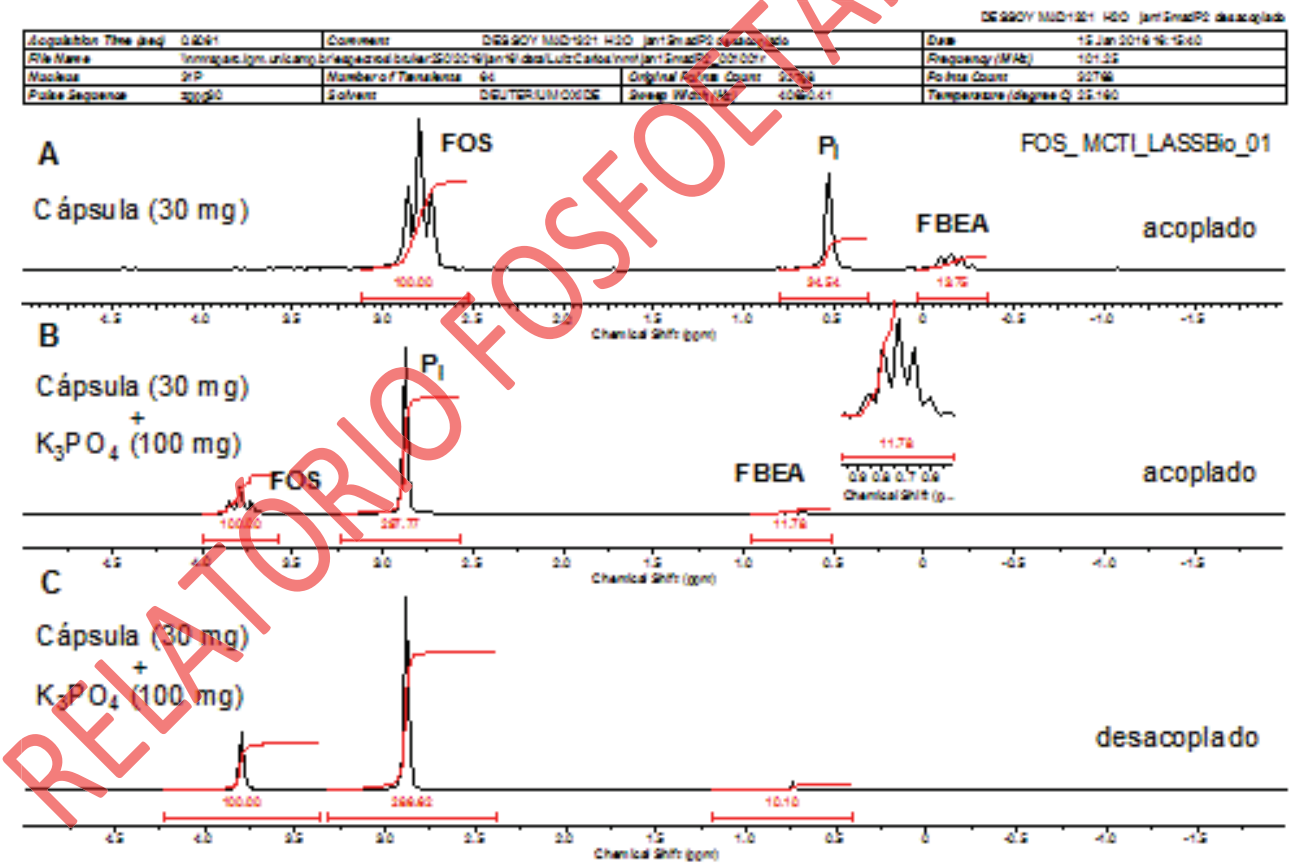
Outro experimento importante envolveu a adição de fosfato de potássio (K_3PO_4) à fração solúvel em água do conteúdo das cápsulas IQSC-USP-MCTI. O experimento A na figura 50 mostra o espectro de RMN-^{31}P, adquirido no modo acoplado, para a fração solúvel em água do material original da cápsula IQSC-USP-MCTI. Observa-se os sinais relativos à FOSFOETANOLAMINA (FOS) na forma de *tripleto* em 2,76 ppm, de P_i como *singleto* em 0,55 ppm e de FOSFOBISETANOLAMINA protonada (FBEA.H$^+$) em –0,15 ppm na razão molar aproximada de FOS:P_i:FBEA de **100:34:14**.

No experimento B, 100 mg de K_3PO_4 sólido foram adicionados a uma amostra sólida (30 mg) do material da cápsula IQSC-USP-MCTI. Essa mistura recebeu a adição de D_2O (ca. 1 mL) e após agitação e filtração, a solução límpida obtida foi submetida à análise de RMN-^{31}P. Como K_3PO_4 é básico, ocorre uma alteração no pH do meio, afetando, assim, os valores dos deslocamentos químicos das espécies de fósforo presentes no meio. Contudo, é possível concluir que não há outras espécies contendo fósforo na sua estrutura presentes no meio. Há um aumento na

intensidade para o sinal correspondente a P_i, como esperado, mudando a razão molar de FOS:P_i:FBEA para **100:298:12**.

O espectro de RMN-^{31}P mostrado no experimento C (figura 50) foi adquirido para a mesma amostra que deu origem ao espectro B, contudo aquele foi adquirido no modo totalmente acoplado, enquanto este foi adquirido no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio, onde todos os sinais aparecem como s*ingletos*. Em última análise, esse experimento deixa claro, mais uma vez, que o hipotético "SAL DE FOSFOETANOLAMINA", como fora proclamado, não existe. O espectro de RMN-^{31}P evidencia que com a adição de uma fonte externa de fósforo contendo contra íons distintos àqueles já presentes no meio, há uma rápida redistribuição de íons (inclusive afetando o valor de pH) entre as espécies aniônicas presentes no meio, de forma que o espectro de RMN-^{31}P continua apresentando o mesmo conjunto de sinais, embora com deslocamentos químicos diferentes.

Figura 50. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - D_2O) - Mistura Cápsula FOS, P_i, FBEA + K_3PO_4.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

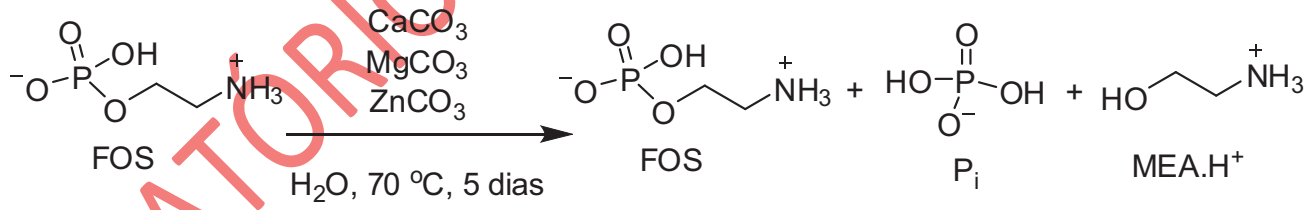
EXPERIMENTO 5: Verificação da estabilidade hidrolítica da FOSFOETANOLAMINA na presença de $CaCO_3$, $MgCO_3$ e $ZnCO_3$ em H_2O a 70 °C por 5 dias

Três experimentos muito relevantes relacionados à fase de neutralização do processo de fabricação da forma sólida da fosfoetanolamina sintética descrito na patente PI0800460-9 A2 foram realizados. Este estudo foi motivado por observações preliminares que indicaram a provável labilidade hidrolítica da FOSFOETANOLAMINA sob aquecimento prolongado. Os três experimentos foram conduzidos simultaneamente em estufa a 70 °C, conforme descrito abaixo.

EXPERIMENTO 5.1

Em um tubo de ensaio (1,4 cm de diâmetro por 15 cm de altura) contendo FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura sintetizada no LQOS (1 mmol), foram adicionados $CaCO_3$ (0,42 mmol), $MgCO_3$ (0,11 mmol) e $ZnCO_3$ (0,06 mmol), combinados na mesma razão molar descrita na patente PI0800460-9 A2 (proporção FOS:$CaCO_3$:$MgCO_3$:$ZnCO_3$ = **100:42:11:6**, respectivamente). Como na patente não consta nenhum tipo de informação relativa à quantidade de água utilizada nesse processo, usou-se neste experimento, de forma arbitrária, 5 mL de água para suspender a mistura de sólidos acima. A mistura foi suspensa em H_2O e a suspensão resultante foi deixada em estufa a 70 °C por 5 dias (esquema 15). O sólido branco seco assim obtido foi suspenso em D_2O (2 mL), agitado magneticamente com auxílio de um agitador magnético, a suspensão foi filtrada e a solução límpida resultante foi submetida à análise de RMN-^{1}H (figura 51) e de RMN-^{31}P (figura 52). Os espectros de RMN-^{1}H da fosfoetanolamina pura estão mostrados na figura 30, página 68, parte B.

Esquema 15. Tratamento de FOSFOETANOLAMINA com $CaCO_3$, $MgCO_3$ e $ZnCO_3$ em água a 70 °C.

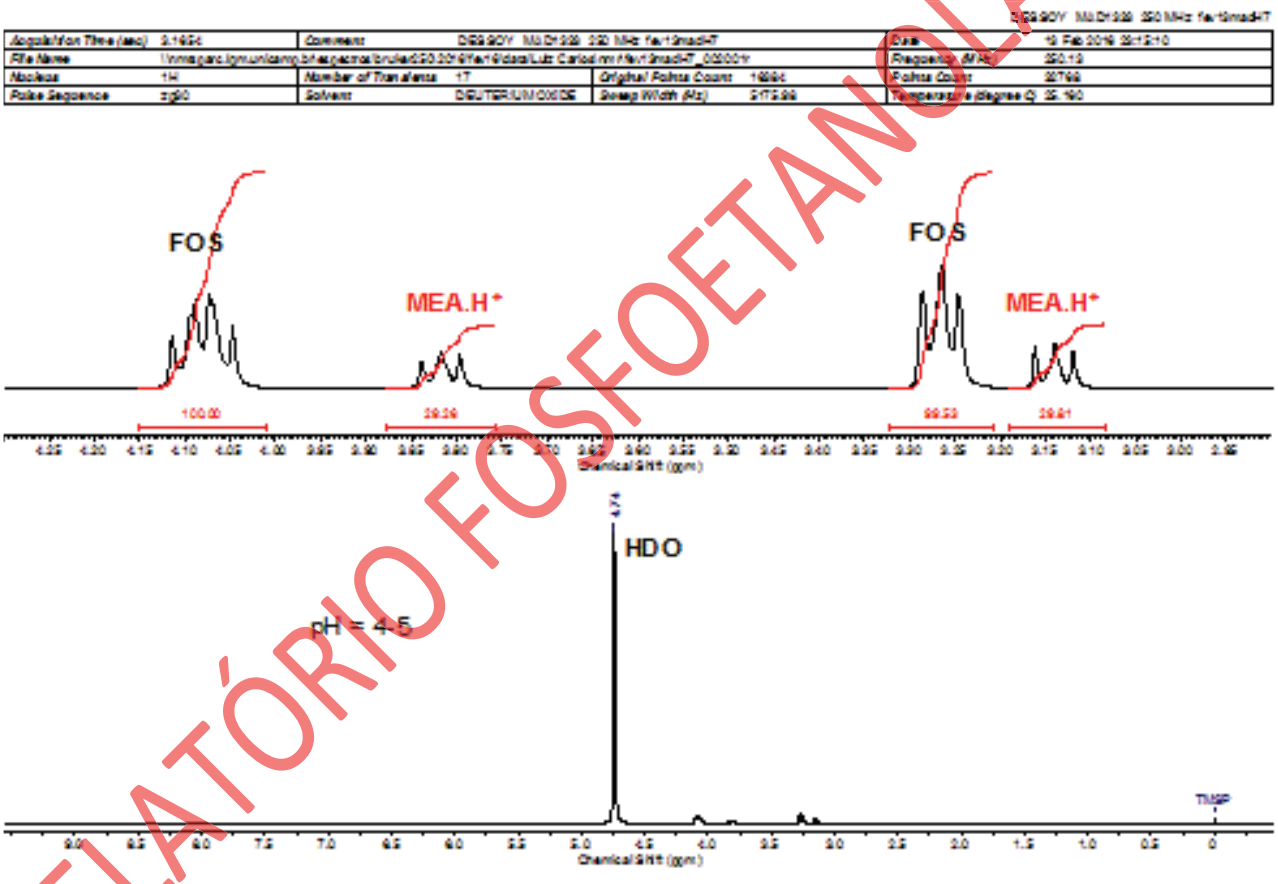


A análise do espectro de RMN-^{1}H (figura 51) mostra o aparecimento de sinais correspondentes à monoetanolamina protonada (MEA.H$^+$), em 3,12 ppm e em 3,83 ppm, provenientes da hidrólise da FOSFOETANOLAMINA (FOS), durante o processo de aquecimento a 70 °C. A razão molar de FOS:MEA.H$^+$ de **100:29** detectada no espectro de RMN-^{1}H corresponde a uma taxa de hidrólise de 22% da FOS pura originalmente usada no experimento.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

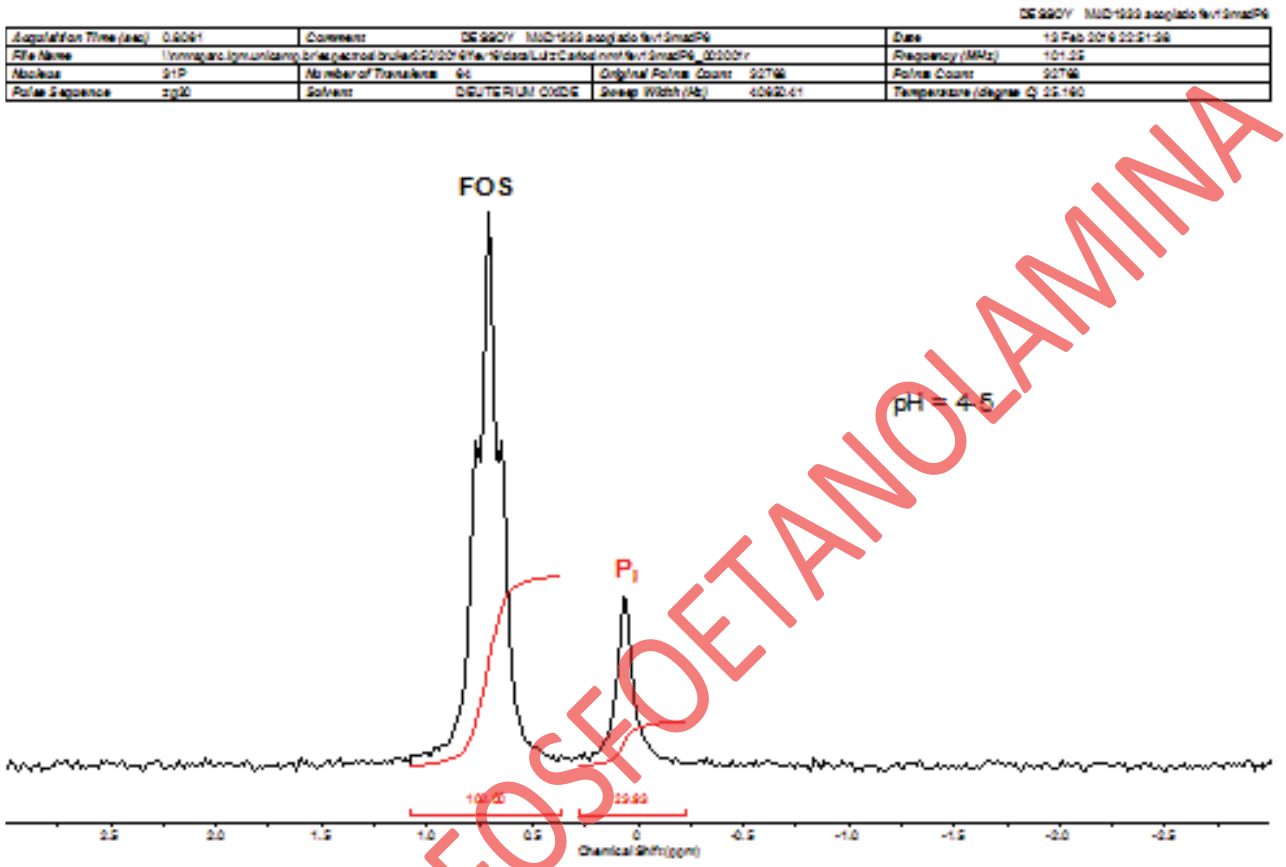
A hidrólise da FOS pode ser confirmada também pela análise do espectro de RMN-^{31}P (figura 51), que acusa o aparecimento de fosfato inorgânico (P_i) na mistura (sinal em 0,10 ppm). Pelo espectro de RMN-^{31}P, a taxa de hidrólise da FOS é de 19%. A diferença de 3% pode ser atribuída ao erro experimental inerente à técnica de análise, que está nessa ordem de magnitude. Outrossim, para se obter uma determinação quantitativa da taxa de hidrólise mais precisa, os experimentos deveriam ser conduzidos em replicata, o que extrapola o escopo e os objetivos desse estudo.

Figura 51. Espectro RMN-^{1}H (250 MHz - D_2O) – FOS pura LQOS após tratamento com $CaCO_3$, $MgCO_3$ e $ZnCO_3$ a 70 °C em água.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 52. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - D_2O) – FOS pura LQOS após tratamento com $CaCO_3$, $MgCO_3$ e $ZnCO_3$ a 70 °C em água por 5 dias.



O espectro de RMN-^{31}P da fosfoetanolamina pura está mostrado na figura 33, página 71, parte B.

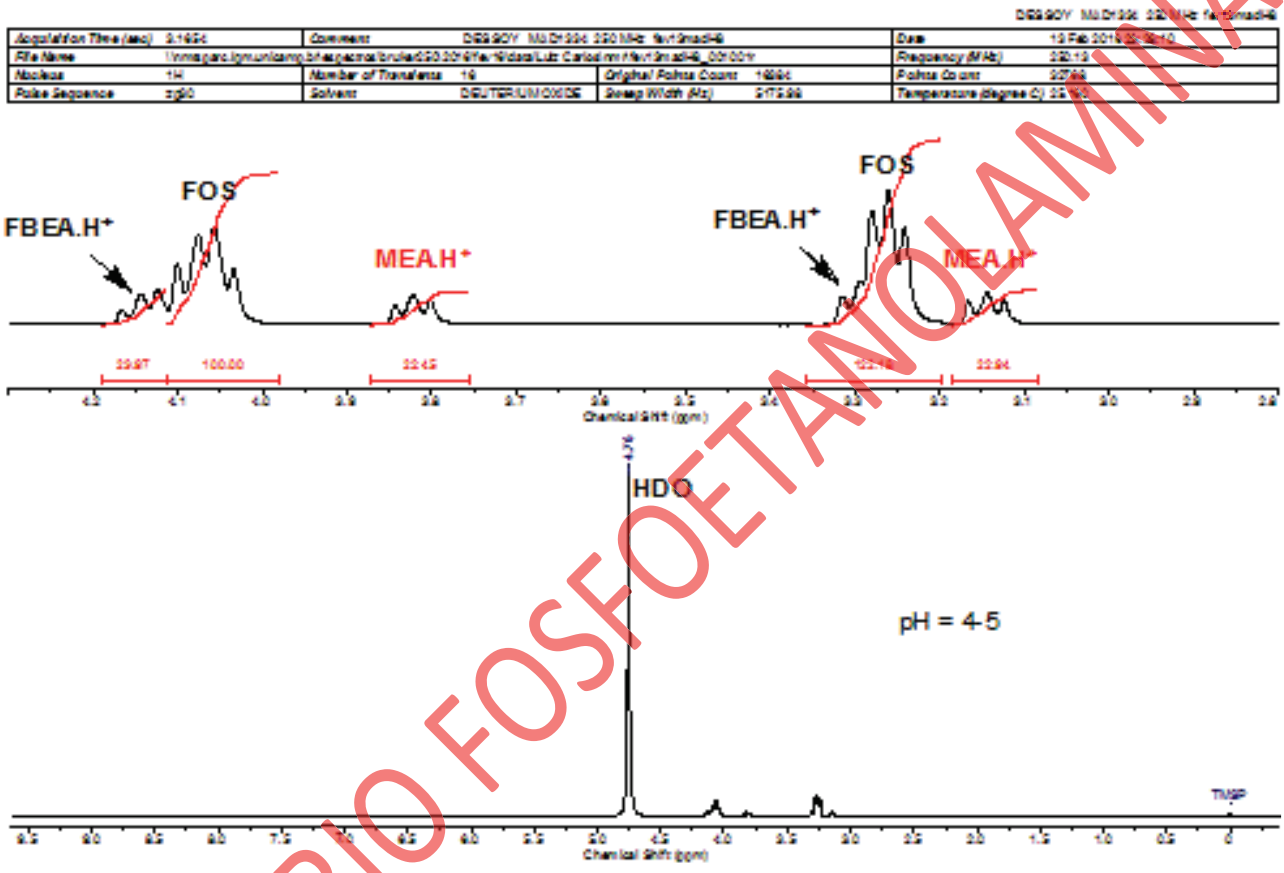
EXPERIMENTO 5.2

Esse experimento foi conduzido de forma análoga ao experimento 5.1 descrito acima, sendo que a única diferença consistiu na adição de FBEA.HCl (0,15 mmol) à mistura experimental. A análise do espectro de RMN-^{1}H mais uma vez acusou a hidrólise parcial da FOS sob as condições experimentais (figura 53). A taxa de hidrólise é similar àquela observada no experimento anterior, mas não pôde ser determinada com a mesma precisão pelo fato dos sinais da FOS e do FBEA.HCl estarem parcialmente sobrepostos. Cabe ressaltar, que o espectro de RMN-^{1}H obtido após aquecimento da mistura de FOS e FBEA não apresenta sinais das impurezas que podem ser detectadas nos espectros de RMN-^{1}H do material das cápsulas de FOS IQSC-USP-MCTI, significando que elas não são formadas durante o processo de aquecimento. Assim sendo, as impurezas vêm de um processo de purificação ineficaz do produto bruto da síntese ou de uma fonte de contaminação

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

externa ao processo de produção. O espectro de RMN-^{31}P da fosfobisetanolamina pura está mostrado na figura 39, página 77, parte B.

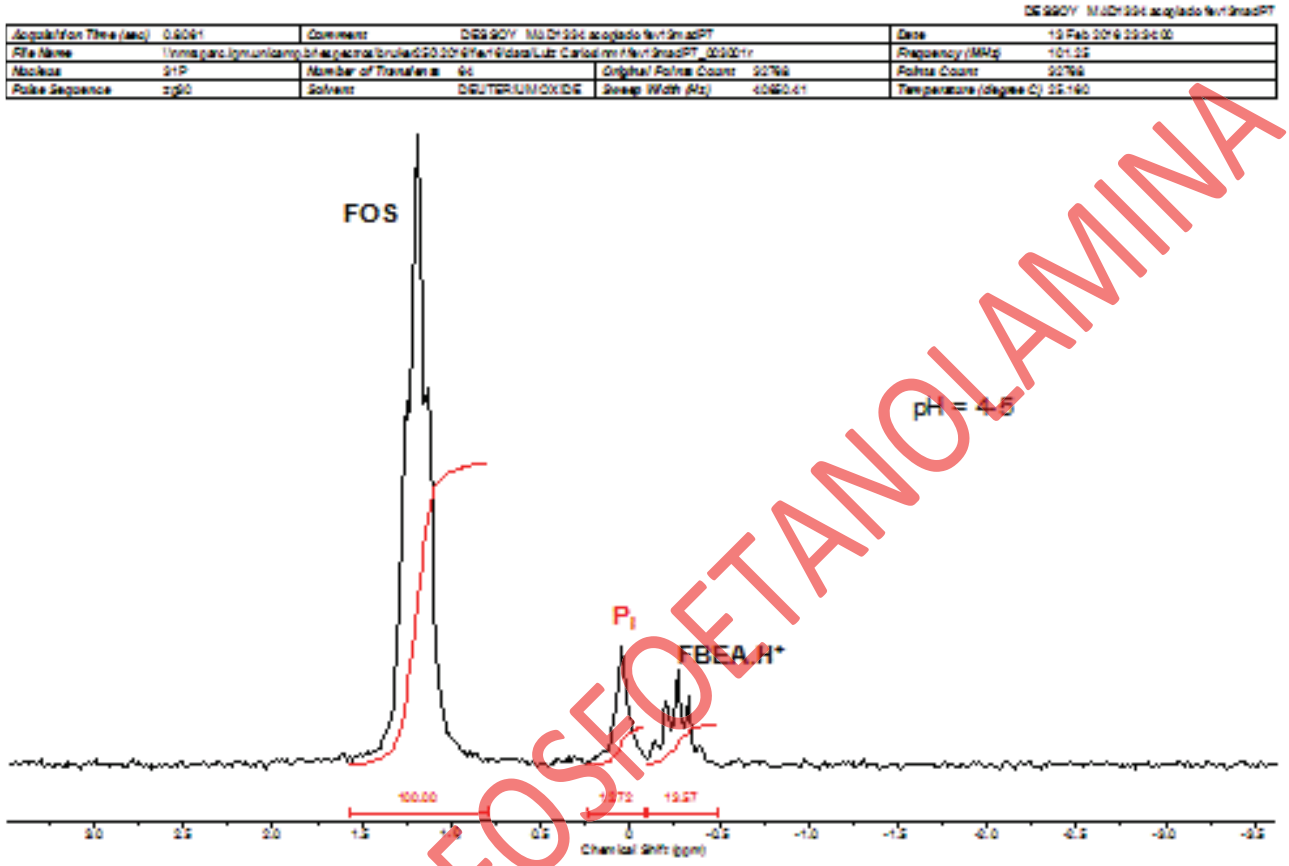
Figura 53. Espectro RMN-^{1}H (250 MHz - D_2O) – FOS e FBEA.HCl puros sintetizados pelo LQOS após tratamento com $CaCO_3$, $MgCO_3$ e $ZnCO_3$ a 70 °C em água por 5 dias.



O espectro de RMN-^{31}P totalmente acoplado (figura 54) também evidencia a hidrólise parcial da FOS (e/ou FBEA) através da presença de sinal de P_i. Contudo, a análise desse espectro sugere que a taxa de hidrólise foi menos pronunciada (em torno de 10%). Mais uma vez, esse estudo deveria ser replicado a fim de garantir uma precisão maior no que se refere à extensão do grau de hidrólise, o qual não é o objetivo desse estudo. O espectro de RMN-^{31}P da fosfobisetanolamina pura está mostrado na figura 42, página 81, parte B.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 54. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - D_2O) acoplado – FOS e FBEA.HCl puros sintetizados pelo LQOS após tratamento com $CaCO_3$, $MgCO_3$ e $ZnCO_3$ a 70 °C em água por 5 dias.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

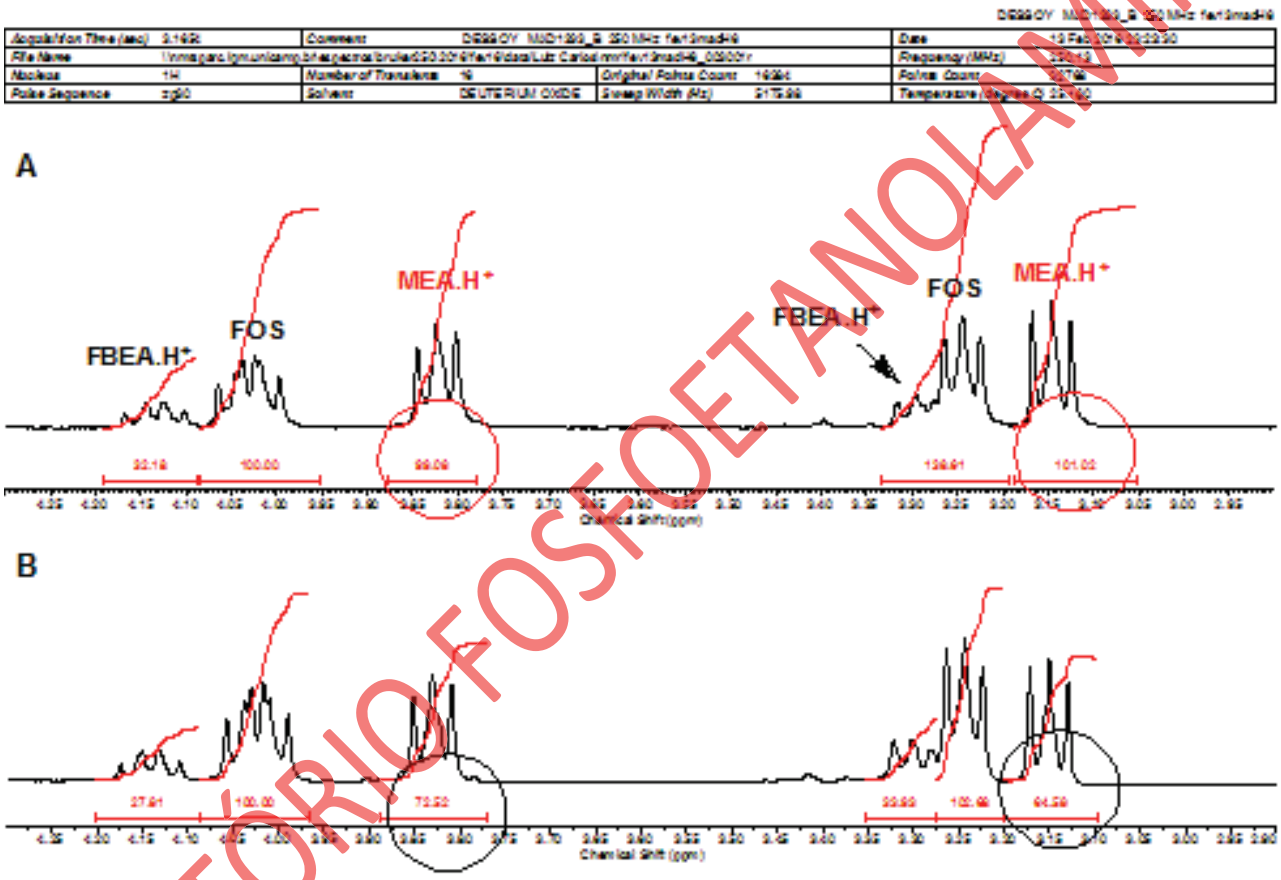
EXPERIMENTO 5.3

Em um terceiro experimento, executado para fins de controle, uma amostra do material da cápsula (30 mg) foi suspensa em 5 mL de água destilada em um tubo de ensaio (1,4 cm de diâmetro por 15 cm de altura). A amostra então recebeu o mesmo tratamento que as duas anteriores e ao final foi submetida à análise de RMN-^{1}H (figura 55) e de RMN-^{31}P totalmente acoplado (figura 56).

A figura 55 mostra as expansões entre a região de 2,95-4,25 ppm dos espectros de RMN-^{1}H (adquiridos no equipamento Bruker DRX com o núcleo de hidrogênio tendo frequência de ressonância de 250,13 MHz) da fração solúvel em D_2O do material da cápsula IQSC-USP-MCTI recebida via LASSBio. Na parte inferior da figura (traço B) aparece o espectro da amostra obtido a partir da dissolução do material que não recebeu tratamento térmico, ou seja, da composição original do material da cápsula. Na parte superior (traço A) é mostrado o espectro da amostra após ela ter sido submetida ao tratamento térmico a 70 °C durante 5 dias em meio aquoso.

Comparando os dois espectros, nota-se um aumento substancial (em torno de 20%) da quantidade de $MEA.H^+$ no espectro superior em relação ao espectro inferior, demonstrando que mesmo na ausência dos carbonatos, a molécula de FOSFOETANOLAMINA sofre hidrólise em conseqüência do tratamento térmico prolongado.

Figura 55. Espectro RMN-^{1}H (250 MHz - D_2O) – Fração solúvel em D_2O do material da cápsula FOS IQSC-USP-MCTI. **B**: antes e; **A**: após aquecimento a 70 °C em água por 5 dias.

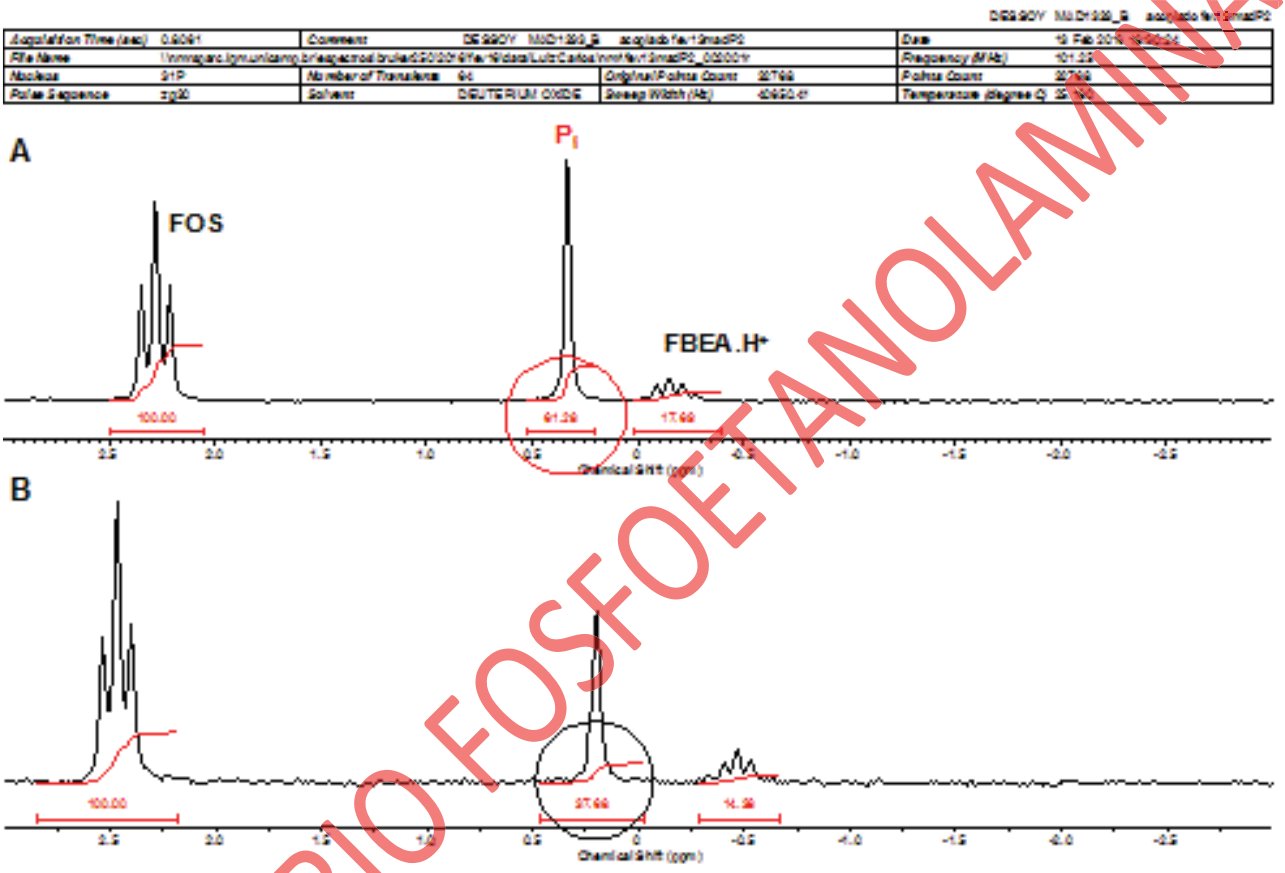


A figura 56 mostra as expansões entre a região de −3,00 ppm e 3,00 ppm dos espectros de RMN-^{31}P totalmente acoplado (adquiridos no equipamento Bruker DRX com o núcleo de fósforo tendo frequência de ressonância de 101,25 MHz) da fração solúvel em D_2O do material da cápsula IQSC-USP-MCTI recebida via LASSBio. Na parte inferior da figura (traço B) aparece o espectro da amostra obtido a partir da dissolução do material que não recebeu tratamento térmico, ou seja, da composição original do material da cápsula. Na parte superior (traço A) é apresentado o espectro da amostra após ela ter sido submetida ao tratamento térmico a 70 °C durante 5 dias em meio aquoso. Comparando os dois espectros, observa-se que a relação FOS:P_i de **100:38** antes do

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

tratamento térmico mudou para **100:61**, confirmando a taxa de hidrólise de 20% da FOS original durante o processo de aquecimento.

Figura 56. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - D_2O) acoplado – Fração solúvel em D_2O do material da cápsula FOS IQSC-USP-MCTI. **B**: antes e; **A**: após aquecimento a 70 °C em água por 5 dias.



O único efeito observado na adição de $CaCO_3$, $MgCO_3$ e $ZnCO_3$ é promover hidrólise parcial da FOSFOETANOLAMINA. Não há formação da FOSFOETANOLAMINA dos íons metálicos ou FOSFOETANOLAMINA sintética em quantidade apreciável, como consta na patente PI0800460-9 A2. A adição dos carbonatos acima mencionadas, na realidade, somente causa a neutralização e subsequente precipitação das espécies de fosfato e pirofosfato contaminantes da FOSFOETANOLAMINA utilizadas na etapa de neutralização, dando origem ao material insolúvel do conteúdo das cápsulas de FOSFOETANOLAMINA.

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

EXPERIMENTO 6: Estabilidade de FOS LQOS e FBEA.HCl LQOS em HCl_{aq} 0,5 M e em $NaOH_{aq}$ 6 M

Nesse experimento, uma mistura contendo FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura e cloridrato de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA.HCl) também puro, ambos preparadas no LQOS, na razão molar FOS:FBEA.H^+ de **100:15** foi dissolvida em solução 0,5 M de HCl (mesma solução usada para dissolver o material insolúvel das cápsulas IQSC-USP-MCTI em água destilada). A solução fortemente ácida (pH < 0) foi deixada à temperatura ambiente por 5 horas e então o espectro de RMN-^{31}P no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio foi adquirido (parte superior da figura 57).

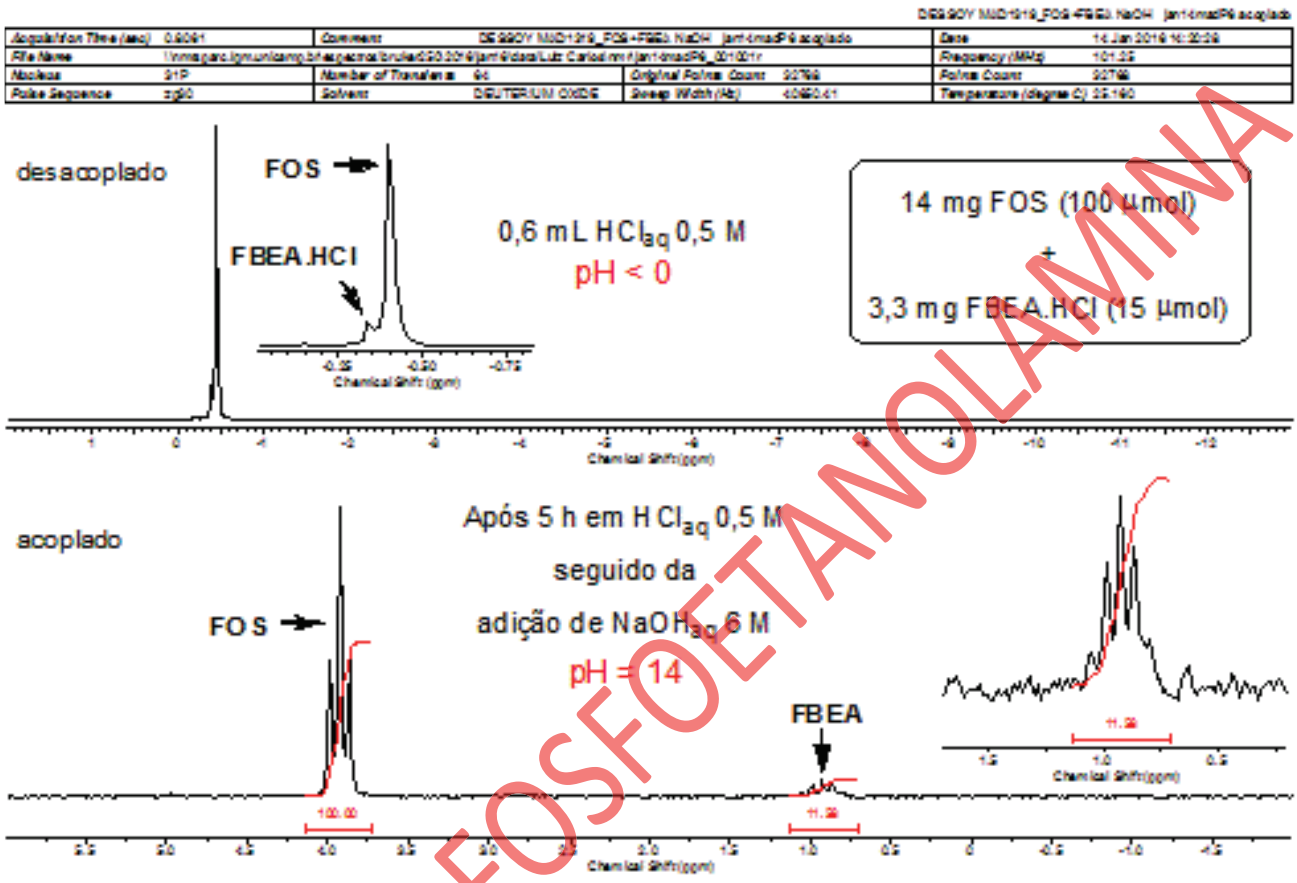
A análise de RMN-^{31}P no modo com desacoplamento em banda larga de hidrogênio mostra que, nesse valor de pH, os sinais relativos à FOS e ao FBEA.HCl ficam muito próximos. O FBEA.HCl passa a ressonar em campo levemente mais baixo do que a FOS, ao contrário do que é observado em meio com pH apenas levemente ácido ou levemente alcalino. O espectro de RMN-^{31}P no modo totalmente acoplado dessa amostra (figura 58) resulta na sobreposição completa dos sinais (devido ao alargamento do sinal causado pelo desdobramento devido ao acoplamento com os átomos de hidrogênio dos grupos CH_2).

A solução ácida (pH < 0) foi alcalinizada com solução de NaOH 6 M, até pH em torno de 14 e, em seguida, foi submetida à análise de RMN-^{31}P totalmente acoplado (parte inferior da figura 57), que mostra apenas a presença de FOSFOETANOLAMINA (FOS) em torno de 3,95 ppm e de FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) em torno de 0,9 ppm. Como o pH do meio está básico, os deslocamentos químicos de fósforo-31 sofrem pequena alteração.

É interessante observar que as espécies FOSFOETANOLAMINA (FOS) e FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) são relativamente estáveis quimicamente tanto em pH ácido como em pH básico, à temperatura ambiente, visto que no espectro da parte inferior da figura 57 não aparece nenhum sinal relativo a P_i, o produto de hidrólise passível de detecção nesse experimento.

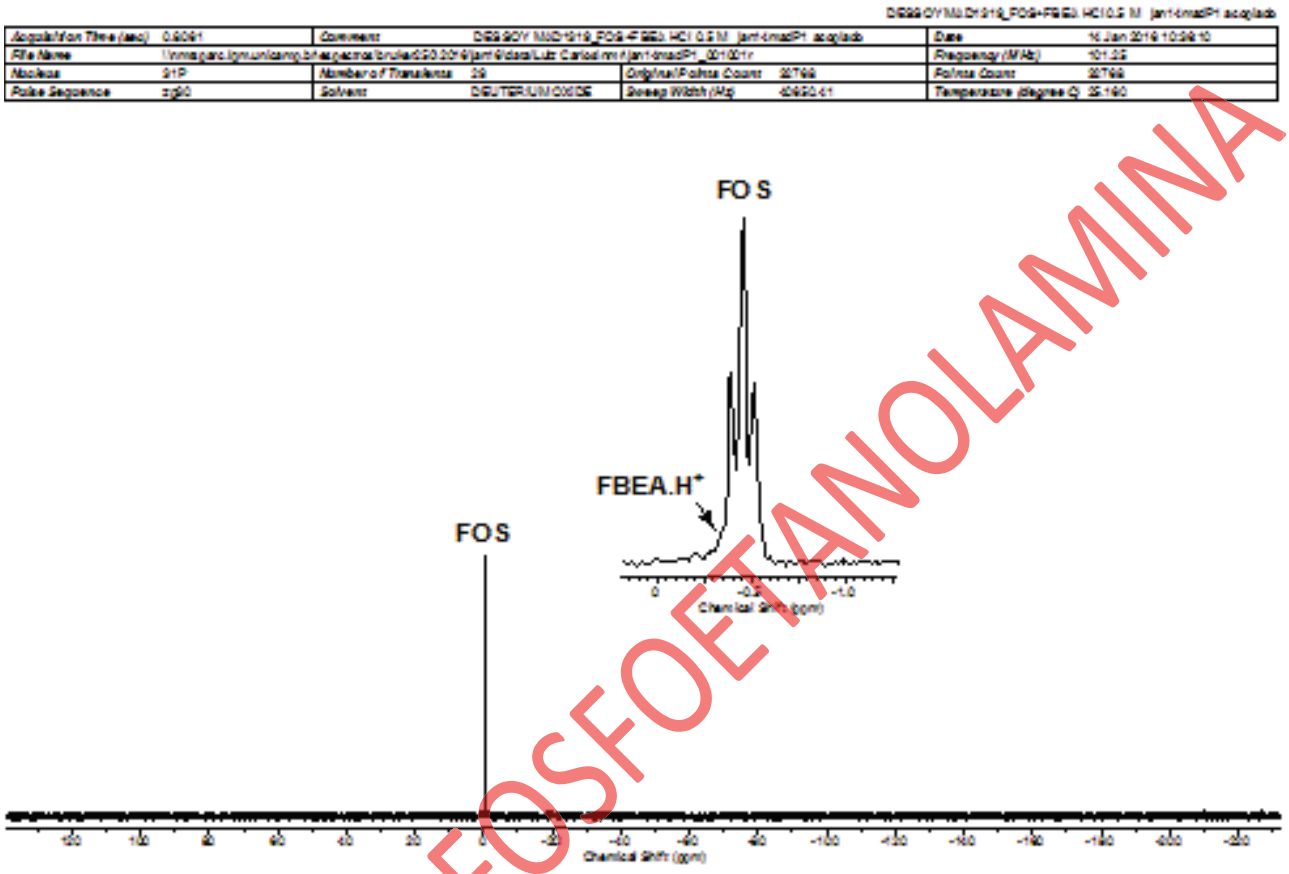
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 57. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - H_2O) mistura de FOS LQOS e FBEA.HCl LQOS em meio ácido (parte superior) e meio básico (parte inferior).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 58. Espectro RMN-^{31}P (101 MHz - H_2O) no modo totalmente acoplado da mistura de FOS LQOS e FBEA.HCl LQOS em meio ácido.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Nesse ponto, é de suma importância destacar que frente aos métodos de análise espectroscópicos modernos ora disponíveis, a espectroscopia vibracional na região do infravermelho (assim como está descrita na patente PI0800460-9 A2), passou a ser uma técnica obsoleta no que diz respeito ao seu emprego para fins de elucidação estrutural e determinação de grau de pureza de compostos orgânicos. Nesse contexto, a espectroscopia no infravermelho caracteriza-se como uma técnica com "nichos" de aplicação somente. Ela é bastante versátil para detecção e/ou confirmação da presença de determinadas funções químicas em moléculas orgânicas, que apresentem bandas de absorção bem características, por exemplo. A espectroscopia no infravermelho também é uma ferramenta bastante usada para a verificação rápida da integridade de uma determinada substância (ou mistura) a partir da simples comparação

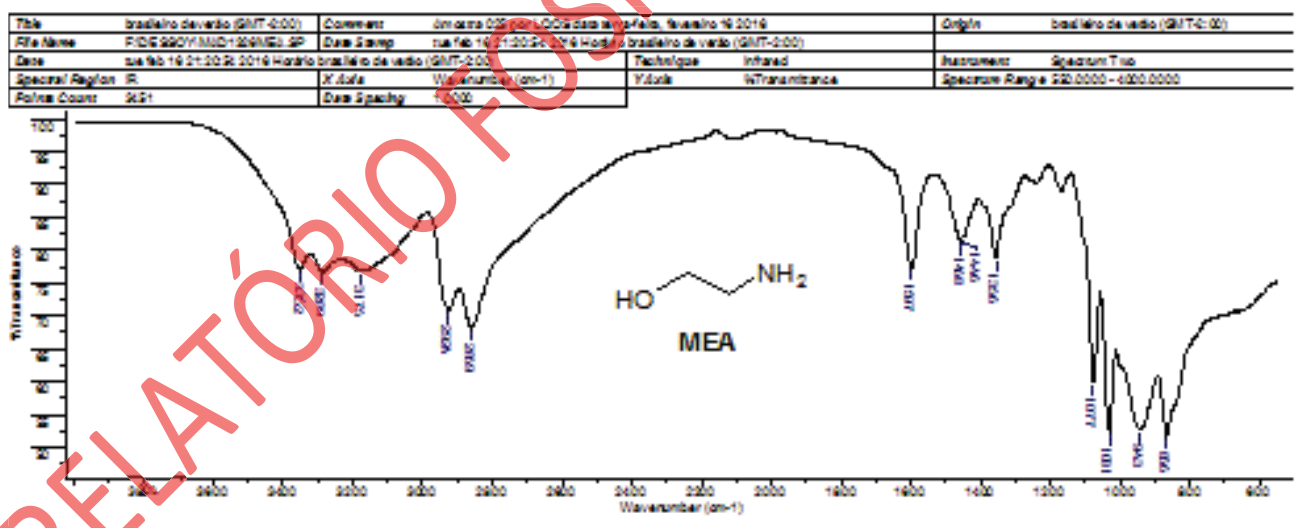
do espectro de uma amostra desta com o espectro de referência previamente obtido a partir do material (ou mistura) autêntico.

Dado o fato da espectroscopia de absorção no infravermelho ser a única técnica empregada para a caracterização da fosfoetanolamina sintetizada pela equipe do Instituto de Química da USP de São Carlos, adquiriu-se os espectros de alguns compostos sintetizados ou envolvidos na síntese usando essa técnica, para fins de comparação.

Os espectros de infravermelho foram adquiridos em um aparelho FT-IR *Spectrometer* Perkin-Elmer, modelo *Spectrum Two* em modo ATR.

Nas figuras 59-63 estão mostrados os espectros de infravermelho para a monoetanolamina comercialmente disponível (marca *Sigma-Aldrich*) (figura 59), para o cloridrato da monoetanolamina preparado no LQOS (figura 60), para a fosfoetanolamina preparada no LQOS (figura 61), para a cloridrato da fosfobisetanolamina preparado no LQOS (figura 62) e para uma mistura **100:70** de fosfoetanolamina e monoetanolamina preparada no LQOS (figura 63). A figura 64 apresenta o espectro de infravermelho adquirido para o material sólido contido nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA IQSC-USP-MCTI.

Figura 59. Espectro de infravermelho para a monoetanolamina comercialmente disponível (marca *Sigma-Aldrich*).



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 60. Espectro de infravermelho para o cloridrato da monoetanolamina preparado no LQOS.

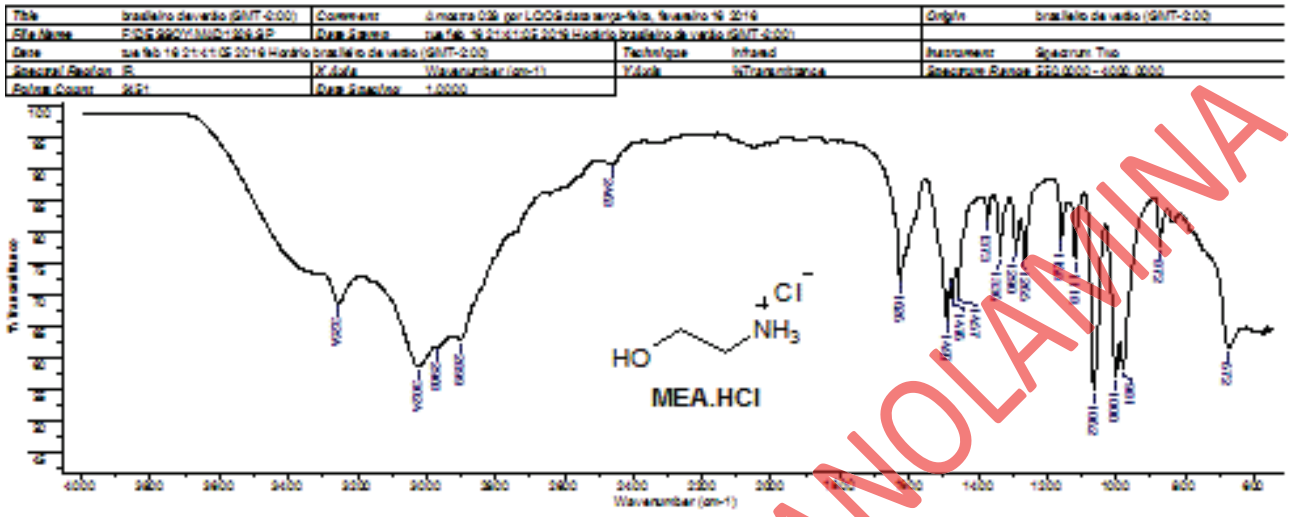
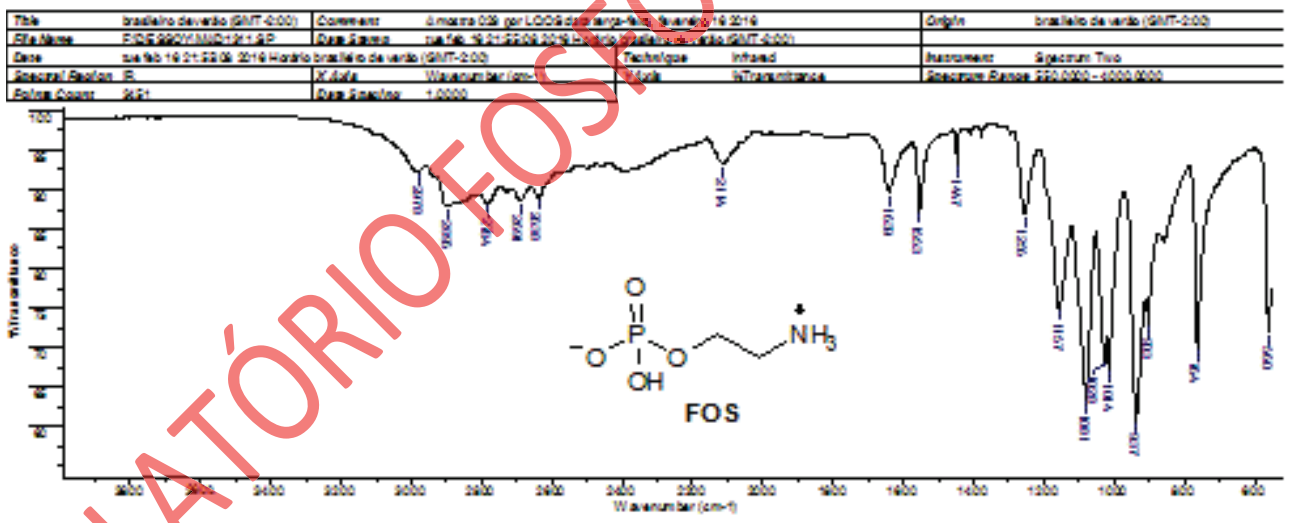


Figura 61. Espectro de infravermelho para a fosfoetanolamina preparada no LQOS.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 62. Espectro de infravermelho para o cloridrato da fosfobisetanolamina preparado no LQOS.

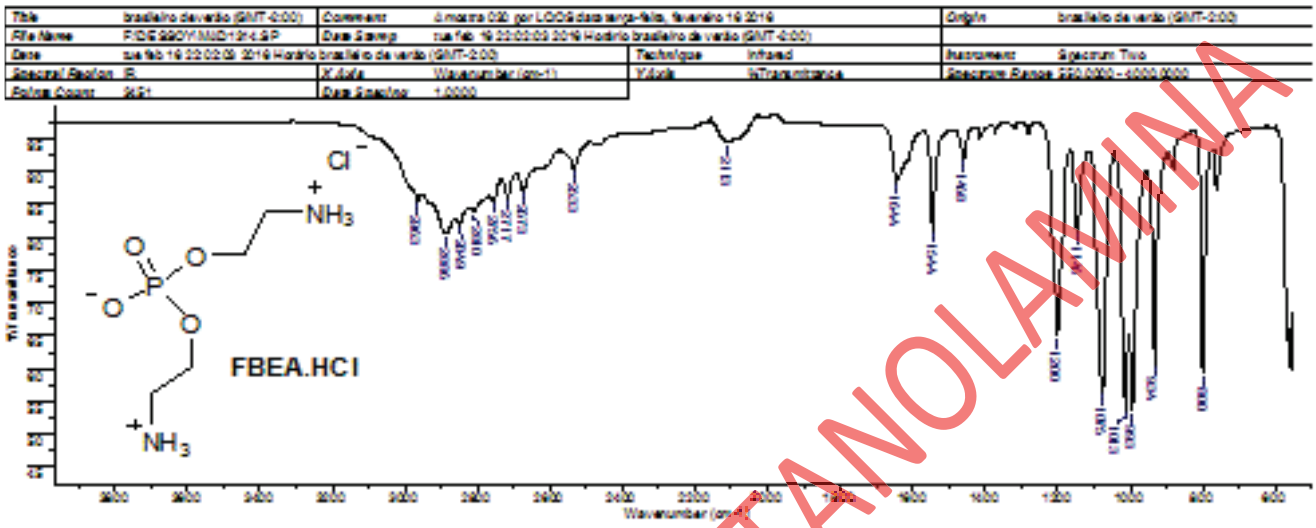
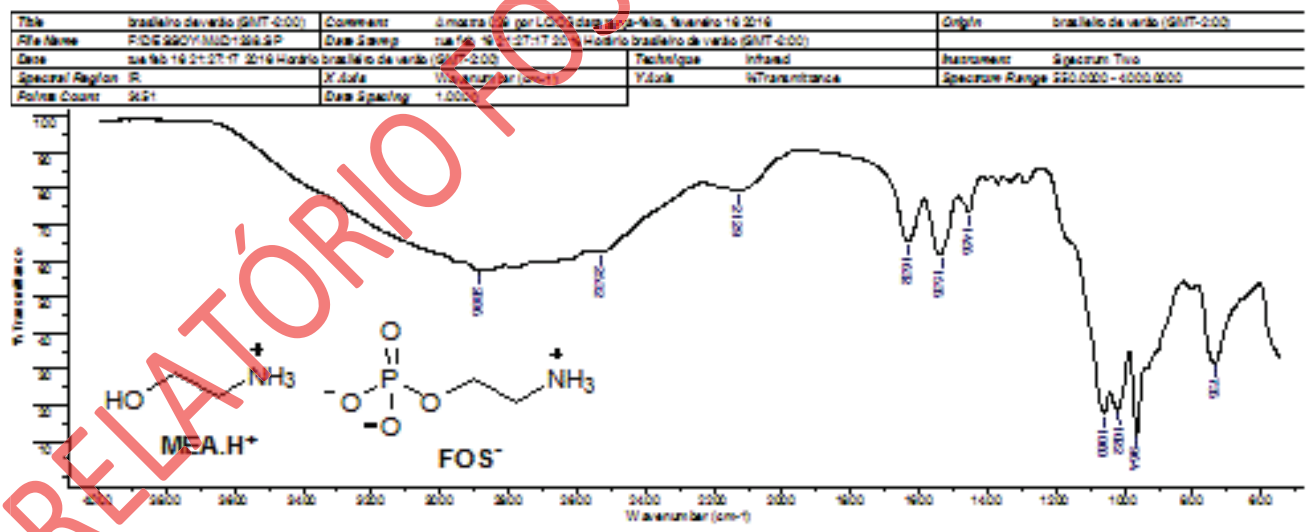
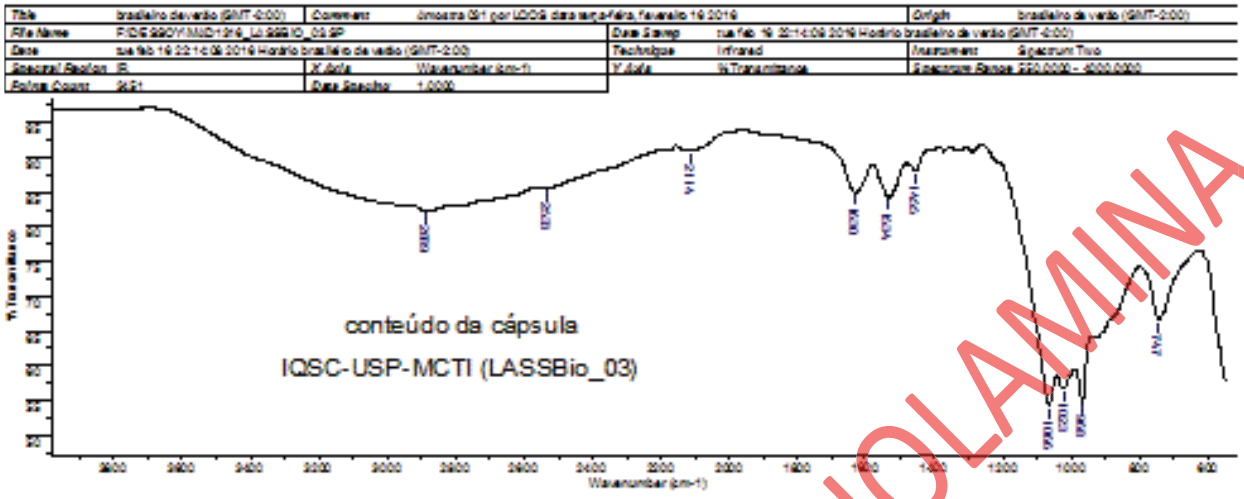


Figura 63. Espectro de infravermelho para a mistura **<u>100:70</u>** de fosfoetanolamina e monoetanolamina preparada no LQOS.



RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Figura 64. Espectro de infravermelho para o conteúdo da cápsula IQSC-USP-MCTI (Lassbio_03).



Na figura 61, que mostra o espectro de infravermelho adquirido para uma amostra de FOSFOETANOLAMINA sintetizada no LQOS, pôde-se identificar TODAS as bandas "características" descritas para fosfoetanolamina na patente PI0800460-9 A2, como segue na tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Bandas de absorção na região do infravermelho para a FOSFOETANOLAMINA sintetizada no IQSC-USP e no LQOS

Fosfoetanolamina IQSC-USP (Número de onda / cm^{-1})	Fosfoetanolamina LQOS (Número de onda / cm^{-1})
3417 – 2560	3417 – 2560
2117	2114
1641	1639
1556	1553
1448	1447
1259	1255
1084 – 941	1081 – 937
1030	1028

Chama a atenção a grande diferença entre o espectro de infravermelho da fosfoetanolamina sintetizada no LQOS (figura 61, que é perfeitamente condizente com o espectro de infravermelho da fosfoetanolamina reproduzido no corpo da patente PI0800460-9 A2) e o espectro de infravermelho adquirido para o conteúdo da cápsula IQSC-USP-MCTI (Lassbio_03, figura 64) que, por sua vez, é praticamente idêntico ao espectro de infravermelho adquirido para a mistura **100:70** de fosfoetanolamina e monoetanolamina preparada no LQOS (figura 63).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

SINOPSE

Nesse trabalho foi realizada a análise química do conteúdo das cápsulas de FOSFOETANOLAMINA produzidas pelo IQSC-USP e enviadas pelo MCTI ao LQOS-UNICAMP via CIEnP e via LASSBio. Como complementação ao trabalho de análise, descrito na parte A deste relatório, foram realizados ensaios de síntese da FOSFOETANOLAMINA a partir do ácido fosfórico e da MONOETANOLAMINA, com base no procedimento descrito na patente PI0800460-9 A2 (*Instituto Nacional da Propriedade Industrial*).

O procedimento descrito na patente PI0800460-9 A2 omite uma série de parâmetros importantes para o controle de uma reação química, como o tempo reacional e os volumes dos solventes empregados nos subsequentes procedimentos de purificação do produto bruto. Na ausência dessas informações, a sua reprodução em termos qualitativos e quantitativos (rendimento químico) fica comprometida.

Uma vez que a informação sobre o tempo reacional não está disponível, monitorou-se o progresso da reação ao longo do tempo, por meio de espectrometria de ressonância magnética nuclear de fósforo-31 (RMN-^{31}P), à medida que a temperatura interna do sistema se elevava a 220 °C (temperatura ótima para garantir um rendimento reacional de 90%, segundo os autores da patente PI0800460-9 A2).

A figura 65 mostra os resultados obtidos em diferentes intervalos de tempo. No início, (espectros de RMN-^{31}P das amostras A e B) observa-se um incremento na formação de FOS, FBEA e PP_i. Contudo, à medida que o tempo reacional e a temperatura aumentam (espectros C e D), observa-se um leve declínio na quantidade de FOS e FBEA presentes na mistura reacional, ao passo que a formação de pirofosfatos (PP_i) tem um forte incremento.

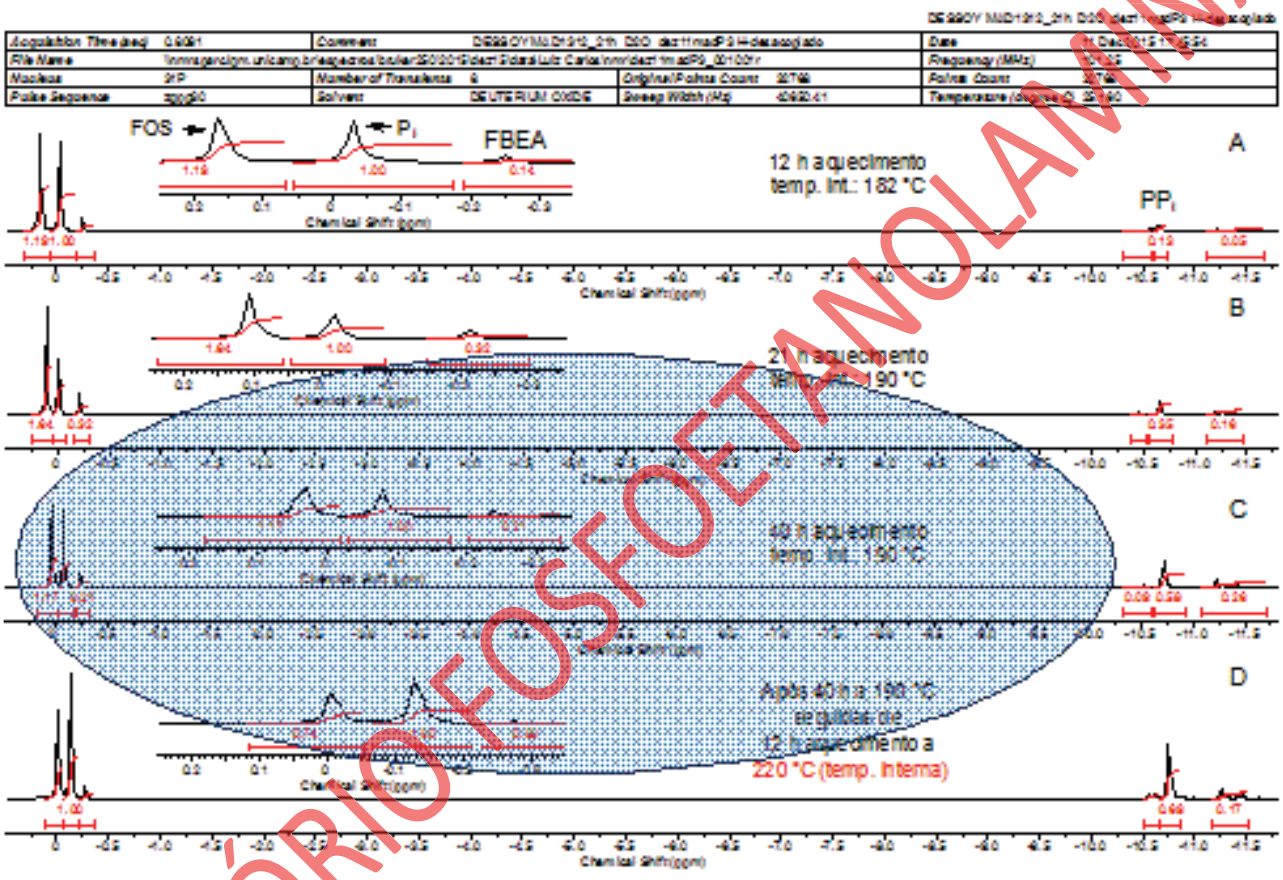
Muito embora os detalhes reacionais não sejam conhecidos, os resultados desse experimento induzem à conclusão de que dificilmente a FOSFOETANOLAMINA (FOS) BRUTA, ainda sem purificação por recristalização, poderá ser obtida com rendimento que chegue sequer próximo aos 90% reivindicados pelos autores, a partir do processo descrito. Além disto, é importante frisar o fato de que o processo de recristalização da FOSFOETANOLAMINA a partir da solução aquosa saturada apresenta rendimento muito baixo, uma vez que apenas metade do material dissolvido é efetivamente recuperado na forma de cristais de FOSFOETANOLAMINA pura.

Valendo-se dos resultados das análises do material das cápsulas como subsídio, pode-se sumarizar o processo de produção da FOSFOETANOLAMINA (FOS) pelo IQSC-USP da seguinte forma: A mistura reacional é aquecida, provavelmente a uma temperatura INTERNA inferior a 220 °C (temperatura informada na patente PI0800460-9 A2) por um determinado período. O produto bruto dessa reação passa por um processo de purificação (cristalização) de baixa eficiência, onde somente algumas impurezas presentes em menor proporção são removidas da

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

mistura. O produto resultante desse processo, supostamente FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura, é, na realidade, uma mistura compreendendo FOSFOETANOLAMINA (FOS), a FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA), o sal dihidrogenofosfato de monoetanolamônio (P_i) não convertido durante o processo e trihidrogenopirofosfato de monoetanolamônio (PP_i).

Figura 65. Progresso da reação: monitoramento por RMN-^{31}P - desacoplado (101 MHz, D_2O).



Essa mistura é então neutralizada com carbonatos de cálcio (majoritariamente), de magnésio e de zinco em suspensão aquosa (volume não indicado na patente) e deixada para secar em estufa a 70 °C, processo durante o qual, parte da FOSFOETANOLAMINA é hidrolisada (formando fosfato e monoetanolamina). O material sólido seco (higroscópico) resultante é encapsulado e rotulado como "SAL DE FOSFOETANOLAMINA" ou "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA". Na prática, os carbonatos de íons divalentes neutralizam o sal ácido de ácido fosfórico não convertido na reação e o pirofosfato nela formado, levando à formação de fosfatos e pirofosfatos de cálcio (e de magnésio e zinco), que são praticamente insolúveis em água, dando lugar ao material insolúvel da cápsula que equivale a cerca de 35,5% do conteúdo total. A parte

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

solúvel em água é constituída, principalmente, de FOSFOETANOLAMINA (FOS), que possui propriedades ácidas, e está associada à MONOETANOLAMINA não convertida durante a reação e FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA) formada na reação, ambas possuindo propriedades básicas, numa interação do tipo ácido-base, além de pequena quantidade de fosfatos de cálcio e de magnésio.

CONCLUSÕES

Chama a atenção a variação em peso encontrada nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP-MCTI e encaminhadas ao LQOS via CIEnP. O conteúdo das 03 cápsulas apresentou os seguintes pesos: 480 mg, 503 mg e 509 mg. O peso declarado para o conteúdo das cápsulas é de "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA, 500 mg".

No caso das cápsulas FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP-MCTI e encaminhadas ao LQOS via LASSBio, a diferença de peso do conteúdo encontrado dentro das cápsulas foi ainda maior. Dentre o total de 60 cápsulas recebidas via LASSBio, 16 cápsulas foram abertas e pesadas. Os pesos encontrados foram: 233 mg, 273 mg, 278 mg, 304 mg, 316 mg, 317 mg, 325 mg, 328 mg, 331 mg, 342 mg, 345 mg, 348 mg, 352 mg, 358 mg, 359 mg e 368 mg. A informação contida no rótulo do recipiente é: "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA, 500 mg"

A análise do conteúdo das cápsulas de FOSFOETANOLAMINA IQSC-USP-MCTI e a síntese química da FOSFOETANOLAMINA e da FOSFOBISETANOLAMINA, além do cloridrato da MONOETANOLAMINA e de uma mistura **100:70** de FOSFOETANOLAMINA e MONOETANOLAMINA, em sua forma pura foram realizados no *Laboratório de Química Orgânica Sintética* – LQOS no IQ UNICAMP. Os compostos FOSFOETANOLAMINA (FOS), FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA), CLORIDRATO DA MONOETANOLAMINA ($MEA.H^+$), uma mistura **100:70** de FOSFOETANOLAMINA e MONOETANOLAMINA, além de MONOETANOLAMINA, todos com pureza maior que 99% foram enviados para testes pré-clínicos no CIEnP.

Todos os compostos foram analisados por ressonância magnética nuclear de ^{1}H, ^{13}C e ^{31}P, IV e massas.

A análise gravimétrica demonstrou que o conteúdo das cápsulas apresenta cerca de 7,2% de água, cerca 35,5% de material insolúvel em água e cerca de 57,3% de material solúvel em água (essa relação muda levemente em função da relação massa seca/volume de água que é utilizada para a análise gravimétrica). O material solúvel em água é constituído de FOSFOETANOLAMINA (FOS), MONOETANOLAMINA protonada ($MEA.H^+$) e FOSFOBISETANOLAMINA protonada ($FBEA.H^+$), além de pequena quantidade de fosfatos de cálcio e de magnésio). Cabe ressaltar, que o fosfato detectado nos espectros de RMN-^{31}P é, também, a fonte de prótons responsável pela protonação da MEA e da FBEA no meio. Os contra íons dos sais do ácido fosfórico não podem ser determinados

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

pela técnica de RMN-^{31}P, por isso usa-se a denominação genérica (fosfato inorgânico, P_i) em sua referência.

O material insolúvel em água apresenta pequena quantidade de FOSFOETANOLAMINA (FOS) residual, pequena quantidade de pirofosfatos (ou difosfatos, PP_i) de cálcio, magnésio, manganês, alumínio, ferro, bário e zinco, e pequena quantidade de fosfatos de magnésio, manganês, alumínio, ferro, bário e zinco, mas **grande quantidade de fosfato de cálcio**. A FOSFOETANOLAMINA residual encontrada na fração insolúvel em água está de alguma forma retida à matriz da amostra, não se solubilizando mesmo quando volumes maiores de água são usados para a extração dos materiais solúveis.

Tanto o ácido fosfórico comercial, como a monoetanolamina comercial, utilizados no processo de síntese química no LQOS são livres de impurezas. Todos os produtos e subprodutos formados no processo de síntese química realizados no LQOS são originários de reações químicas entre o ácido fosfórico comercial e a monoetanolamina nas condições de reação.

A FOSFOETANOLAMINA comercialmente disponível, proveniente da *Sigma-Aldrich* é idêntica à FOSFOETANOLAMINA preparada no LQOS, mas diferente da FOSFOETANOLAMINA contida nas cápsulas IQSC-USP-MCTI, pois estas, de fato, apresentam a presença de impurezas.

Fica claro que o processo de purificação da FOSFOETANOLAMINA preparada no IQSC-USP é extremamente ineficiente. O rendimento declarado de 90% na obtenção de FOSFOETANOLAMINA não é possível de ser alcançado em virtude da formação de vários outros compostos além de FOSFOETANOLAMINA, conforme demonstrado pelo monitoramento do progresso da reação por meio de ressonância magnética de fósforo-31 (RMN-^{31}P). Ao contrário do que é descrito na patente PI0800460-9 A2, este procedimento não permite a obtenção de altos rendimentos da FOSFOETANOLAMINA (FOS). A baixa taxa de conversão do sal dihidrogeno fosfato de etanol amônio (P_i), bem como a co-formação de ácido pirofosfórico e pirofosfatos (PP_i), da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA), além de outros produtos secundários não permitem a obtenção de FOSFOETANOLAMINA (FOS) pura em 90% de rendimento. A temperaturas mais altas, próximas de 220 ^{o}C, ocorre a conversão de ácido fosfórico em ácido pirofosfórico e em pirofosfatos, com liberação de H_2O, que promove a hidrólise da FOSFOETANOLAMINA (FOS) e da FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA).

A análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1, de Carbono-13 e de Fósforo-31 (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C e RMN-^{31}P) do conteúdo integral das cápsulas de FOSFOETANOLAMINA fornecidas pelo IQSC-USP-MCTI e encaminhadas ao LQOS via CIEnP e via LASSBio, permitiu a identificação de 05 (cinco) compostos presentes nas cápsulas de "FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA" (FOS).

Pode-se observar a presença de 04 (quatro) compostos contendo fósforo em sua estrutura: (1) a própria FOSFOETANOLAMINA (FOS) na forma de seu sal; (2) fosfatos inorgânicos (de cálcio, de

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

magnésio, de zinco, de manganês, de ferro, de alumínio e de bário); (3) pirofosfatos inorgânicos (de cálcio, de magnésio, de zinco, de manganês, de ferro, de alumínio e de bário) e (4) FOSFOBISETANOLAMINA protonada (FBEA.H^+), um diéster do ácido fosfórico (ácido fosfórico esterificado com dois resíduos de MONOETANOLAMINA). O quinto componente contido nas cápsulas é uma espécie protonada da MONOETANOLAMINA (MEA-H^+), um dos reagentes usados para a síntese da FOSFOETANOLAMINA (FOS). No conteúdo das cápsulas, a FOSFOETANOLAMINA (FOS), que possui propriedades ácidas, pode estar associada tanto à MEA quanto à FBEA, ambas possuindo propriedades básicas, numa relação ácido-base, formando espécies salinas.

Segundo a análise por RMN-^{1}H, a razão molar **média** entre FOS, FBEA.H^+ e MEA.H^+ é de **100:15:70**. Segundo a análise por RMN-^{31}P, razão molar **média** entre FOS, FBEA.H^+ e P_i (fosfato inorgânico) é de **100:16:33**. Observa-se, portanto, uma excelente concordância para as razões entre FOS e FBEA.H^+ encontradas pelas técnicas de RMN-^{1}H e RMN-^{31}P. A pequena diferença está dentro dos limites de erro experimental inerente à técnica de análise. Em solução aquosa, estas espécies estão presentes em equilíbrio em virtude do pH na faixa de 5-6 para o meio (Esquema 16).

Podemos observar a presença de 05 (cinco) compostos, sendo 04 deles contendo fósforo:

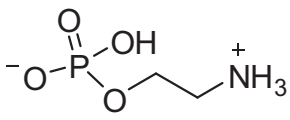
(1) Fosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco, bário e de etanol amônio (P_i);
(2) Pirofosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco, bário e de etanol amônio (PP_i);
(3) FOSFOETANOLAMINA (FOS) na forma de seu sal e associada ao sal da monoetanolamina (MEA.H^+);
(4) Sal da monoetanolamina (MEA.H^+);
(5) FOSFOBISETANOLAMINA (FBEA), um diéster do ácido fosfórico.

O conteúdo de cada cápsula IQSC-USP analisada no LQOS apresenta composição aproximada (com base em peso) de:

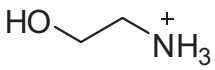
- **34,9% de fosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (P_i)**
- **3,6% de pirofosfatos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (PP_i)**
- **32,2% de fosfoetanolamina (FOS) - (sendo cerca de 6,2% associada a íons metálicos)**
- **18,2% de monoetanolamina protonada (MEA.H^+)3,9% de fosfobisetanolamina (FBEA)**
- **7,2% de água (H_2O)**

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Esquema 16. Espécies presentes nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC USP-MCTI e encaminhadas ao LQOS via CIEnP e via LASSBio.

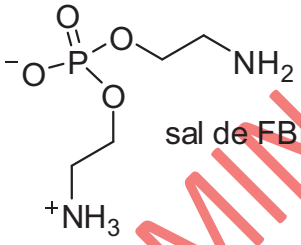


sal de FOS

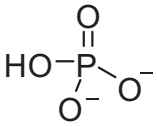


$MEA.H^+$

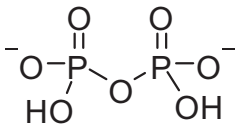
monoetanolamina protonada



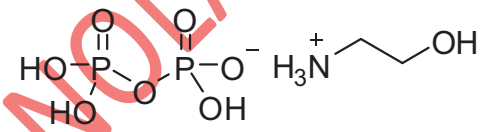
sal de FBEA



fosfatos de
Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}
Fe^{3+}, Mn^{2+}, Al^{3+}, Ba^{2+}
P_i



pirofosfatos de
Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}
Fe^{3+}, Mn^{2+}, Al^{3+}, Ba^{2+}
PP_i



triidrogeno fosfato de etanol amônio

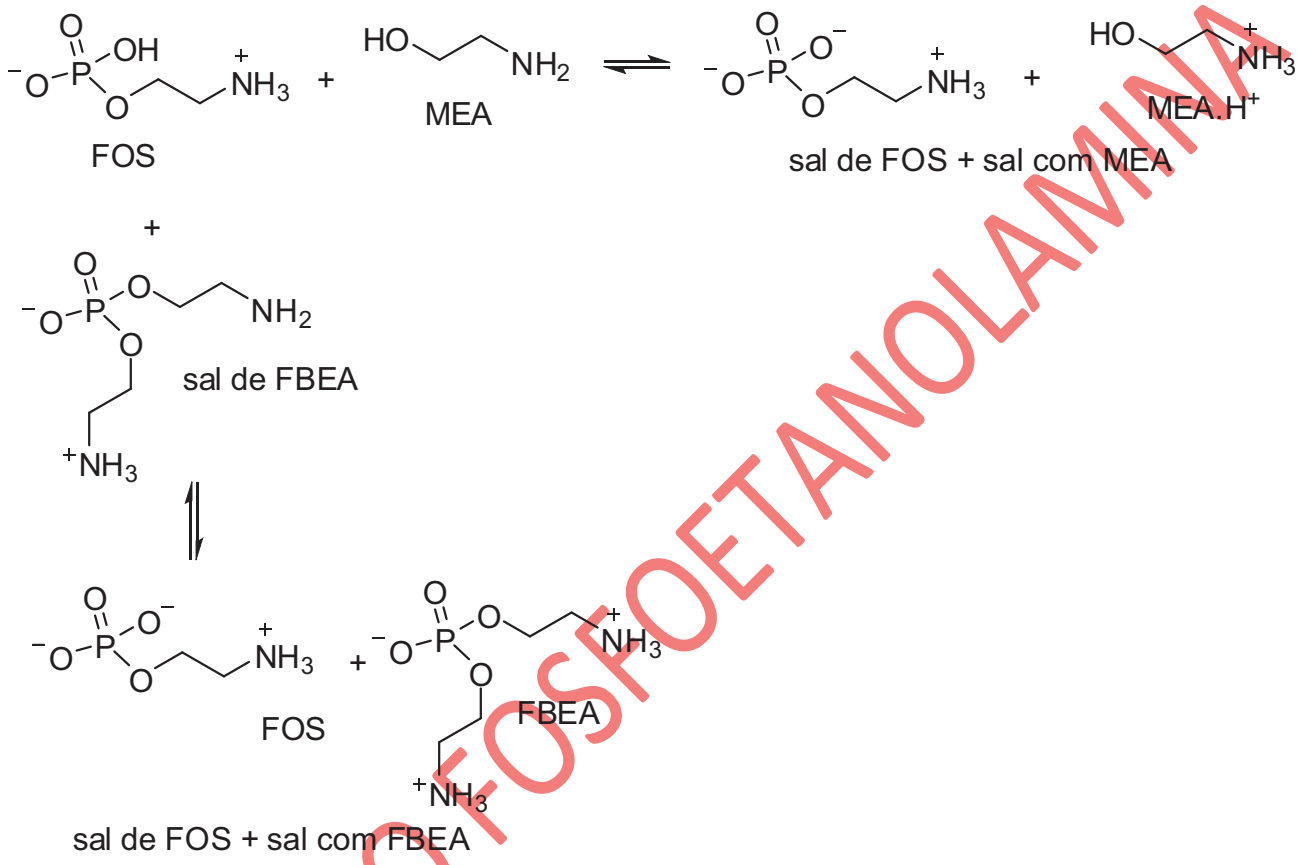
PP_i

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Todos os compostos observados nas cápsulas IQSC-USP podem ser comprovados pelo processo de síntese realizada no LQOS.

A análise da fração solúvel mostra que as seguintes espécies podem estar em equilíbrio em meio ácido, em solução de D_2O, com pH 5-6, não considerando as trocas entre D e H (Esquema 17).

Esquema 17. Equilíbrio químico em solução de D_2O entre as espécies presentes nas cápsulas de FOSFOETANOLAMINA (FOS) fornecidas pelo IQSC-USP-MCTI ao LQOS via CIEnP e via LASSBio.

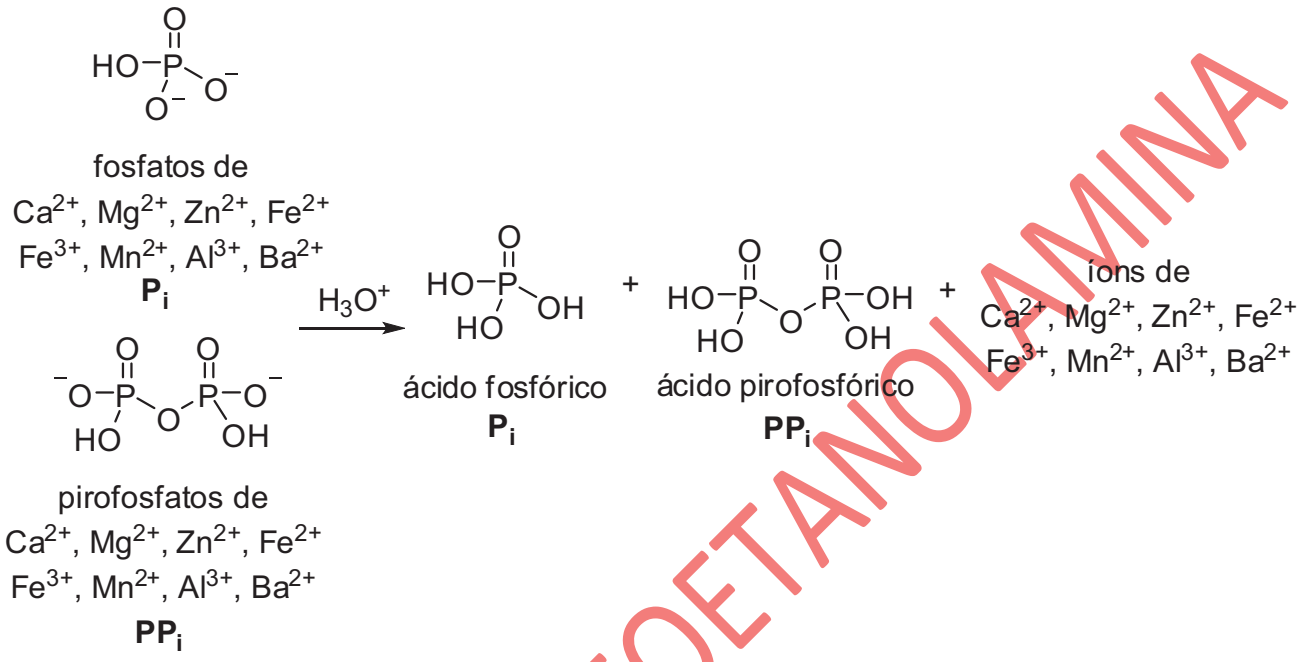


Também foi observada a presença de fosfatos e pirofosfatos inorgânicos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (P_i e PP_i) presentes nas cápsulas, que em meio ácido, vão gerar ácido fosfórico e ácido pirofosfórico (esquema 18).

Outros sinais de impurezas não identificadas, podem ser observados nos espectros de RMN-^{1}H e de RMN-^{13}C, figura 11 (página 19, parte A deste relatório).

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

Esquema 18. Fosfatos e pirofosfatos inorgânicos de cálcio, magnésio, ferro, manganês, alumínio, zinco e bário (P_i e PP_i) presentes nas cápsulas, em meio ácido.



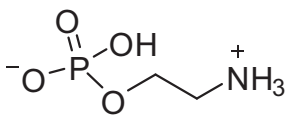
RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

COMPOSTOS PREPARADOS NO LQOS E ENVIADOS AO CIEnP PARA TESTES CLÍNICOS

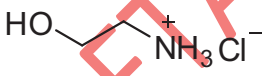
Os compostos mostrados na figura 66, com grau de pureza superior a 99% foram preparados no LQOS e enviados ao CIEnP para testes pré-clínicos.

- **FOSFOETANOLAMINA: 20,0 gramas**
- **CLORIDRATO DE MONOETANOLAMINA: 13,0 gramas**
- **FOSFOBISETANOLAMINA: 4,44 gramas**
- **MISTURA 100:70 DE FOSFOETANOLAMINA:MONOETANOLAMINA: 9,0 gramas**
- **MONOETANOLAMINA COMERCIAL: 11,82 gramas**

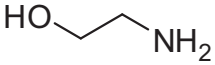
Figura 66. Compostos com alto grau de pureza preparados no LQOS e enviados para fase de testes pré-clínicos no CIEnP.



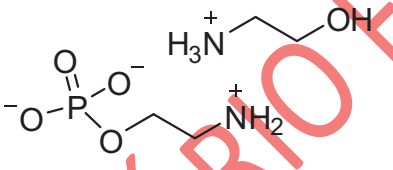
sal de FOS
20,15 gramas



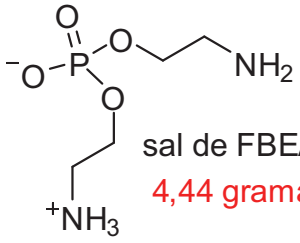
MEA.HCl
cloridrato da monoetanolamina
13,0 gramas



MEA
monoetanolamina
11,82 gramas



mistura FOS:MEA (100:70)
9,7 gramas



sal de FBEA
4,44 gramas

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

MATERIAL SUPLEMENTAR

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA – LQOS
COORDENADOR: PROF. LUIZ CARLOS DIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA - UNICAMP
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

Campinas, 18 de janeiro de 2016

Eu, Luiz Carlos Dias, CPF número 547.239.229-20, RG número 1.502.516, registrado no CRQ IV Região com o número 04162362, Professor Titular ativo nível MS-6 do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com a matrícula número 24575-5, declaro para os devidos fins, que as três amostras científicas que transporto NÃO SÃO INFLAMÁVEIS, NEM PERIGOSAS, SÃO NÃO-BIOLÓGICAS, NÃO-INFECCIOSAS E NÃO-RADIOATIVAS. Estas amostras científicas, **MAD 1311 (FOS)** (6,05 gramas), **MAD1314 (FBEA)** (4,44 gramas) e **MEA** (11,82 gramas), estão sendo transportadas para fins de testes no CIEnP no Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos (CIEnP, http://www.cienp.org.br/), da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, coordenado pelo Professor Titular João Batista Calixto, no âmbito de projeto de pesquisa científica colaborativo entre o laboratório de pesquisas no IQ-UNICAMP, que coordeno e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-INOFAR), em projeto financiado pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Atenciosamente,

Luiz Carlos Dias
Professor Titular
UNICAMP

Prof. Dr. Luiz Carlos Dias
IQ - UNICAMP
Matrícula 24575-5

Prof. Luiz Carlos Dias
Professor Titular, MS-6 (Matrícula: 24575-5)
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
C.P. 6154 - CEP: 13084-971 - Campinas - SP - Brasil
FAX: (0xx)-19-3521-3023, fone: (0xx)-19-3521-3097
e-mail: ldias@iqm.unicamp.br

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

CIEnP

DECLARAÇÃO DE RECEBIMENTO

Eu, João Batista Calixto, Diretor do Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos - CIEnP, declaro para devidos fins que recebi os frascos listados abaixo, obtidos no Instituto de Química – UNICAMP, sob os auspícios do INCT - INOFAR devidamente lacrados e em condições apropriadas para análise.

- Frasco 1 – Lot: MAD1314(FBEA) – 16.01.2016 – 4,44g
- Frasco 2 – Lot: MAD1311(FOS) – 18.01.2016 – 6,05g
- Frasco 3 – MEA – Nuclear – Redestilada – Dez.2015 – 11,82 g

João Calixto — 18/01/16

Diretor — Data

João Batista Calixto

João B. Calixto, PhD
Diretor - CIEnP

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA – LQOS
COORDENADOR: PROF. LUIZ CARLOS DIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA - UNICAMP
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA – LQOS
COORDENADOR: PROF. LUIZ CARLOS DIAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE QUÍMICA – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA
Cx. Postal 6154 - Campinas - 13083-970, SP - BRASIL
http://www.iqm.unicamp.br

Campinas, 18 de Fevereiro de 2016

DECLARAÇÃO DE RECEBIMENTO DE AMOSTRAS

Eu, Luiz Carlos Dias, CPF número 547.239.229-20, RG número 1.502.516, registrado no CRQ IV Região com o número 04162362, Professor Titular ativo nível MS-6 do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com a matrícula número 24575-5, declaro para os devidos fins, que recebi no dia 18 de fevereiro de 2016, um frasco contendo 69,4 gramas de FOSFOETANOLAMINA, marca *Sigma-Aldrich*, CAS 1071-23-4, PM 141,06 g/mol, Sigma-Aldrich *PCode* 101677816, código de catálogo P0-503, lote # BCBQ7961V, proveniente do *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas* (LASSBio), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Rio de Janeiro-UFRJ, coordenado pelo Professor Titular Eliezer Barreiro, no âmbito do projeto de pesquisa científica colaborativo entre o *Laboratório de Química Orgânica Sintética*-LQOS, no IQ-UNICAMP, que coordeno e o *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e* Medicamentos (INCT-INOFAR), em projeto financiado pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Atenciosamente,

Luiz Carlos Dias
Professor Titular
UNICAMP

Prof. Luiz Carlos Dias
Professor Titular, MS-6 (Matrícula: 24575-5)
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
C.P. 6154 - CEP: 13084-971 - Campinas - SP - Brasil
FAX: (0xx)-19-3521-3023, fone: (0xx)-19-3521-3097
E-mail: ldias@iqm.unicamp.br

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA