

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
GRUPO DE CRISTALOGRAFIA

**Avaliação da dependência com a pressão de propriedades
estruturais de compostos orgânicos de interesse farmacêutico**

Rosane de Paula Castro

Goiânia - 2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Rosane de Paula Castro

Título do trabalho: Avaliação da dependência com a pressão de propriedades estruturais de compostos orgânicos de interesse farmacêutico

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Rosane de Paula Castro

Ciente e de acordo:


Prof. Dr. José Ricardo Sabino
Orientador

Data: 07/05/2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
GRUPO DE CRISTALOGRAFIA

Avaliação da dependência com a pressão de propriedades estruturais de compostos orgânicos de interesse farmacêutico

Rosane de Paula Castro

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Física.

ORIENTADOR: *Prof. Dr. José Ricardo Sabino*

Goiânia - 2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

de Paula Castro, Rosane

Avaliação da dependência com a pressão de propriedades
estruturais de compostos orgânicos de interesse farmacêutico
[manuscrito] / Rosane de Paula Castro. - 2018.

x, 99 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo Sabino.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Física (IF), Programa de Pós-Graduação em Física, Goiânia, 2018.
Bibliografia.

Inclui fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Cristalografia de raios X. 2. Altas pressões. 3. Diamond anvil
cell. I. Sabino, José Ricardo, orient. II. Título.



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Física
Programa de Pós-Graduação em Física

Ata Nº 36 de defesa de tese de
Rosane de Paula Castro para
obtenção do título de Doutora em
Física.

Aos 07 dias do mês de maio de 2018, às 14h00min, no Anfiteatro I do Instituto de Física da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Física, composta pelo **Prof. Dr. José Ricardo Sabino** (orientador e presidente da Banca – IF/UFG), **Prof. Dr. Carlos Basílio Pinheiro** (DF/UFG), **Prof. Dr. Sauli dos Santos Júnior** (FCT/UFG), **Prof. Dr. Leandro Felix de Sousa Bufaiçal** (IF/UFG) e **Prof. Dr. Tertius Lima da Fonseca** (IF/UFG) para julgar a tese de doutorado de **Rosane de Paula Castro**, intitulada: **"Avaliação da dependência com a pressão de propriedades estruturais de compostos orgânicos de interesse farmacêutico"**. O Presidente abriu os trabalhos agradecendo a presença dos membros da Banca Examinadora e concedeu a palavra a **Rosane de Paula Castro**, que expôs detalhadamente seu trabalho. Em seguida, os membros da Banca fizeram suas considerações e procederam à arguição da candidata. Concluída essa etapa, a Banca, em sessão fechada, deu prosseguimento ao julgamento do trabalho, atribuindo os seguintes conceitos:

Prof. Dr. José Ricardo Sabino (orientador)

APROVADA

Prof. Dr. Carlos Basílio Pinheiro (DF/UFG)

APROVADA

Prof. Dr. Sauli dos Santos Júnior (FCT/UFG)

APROVADA

Prof. Dr. Leandro Felix de Sousa Bufaiçal (IF/UFG)

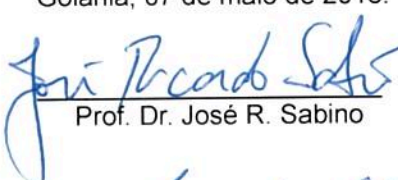
APROVADA

Prof. Dr. Tertius Lima da Fonseca (IF/UFG)

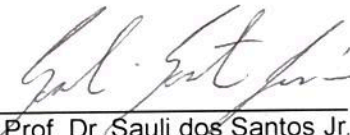
APROVADA

Novamente em sessão aberta, o presidente da Banca anunciou o resultado final do julgamento, declarando a candidata **Rosane de Paula Castro** APROVADA pela Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora.

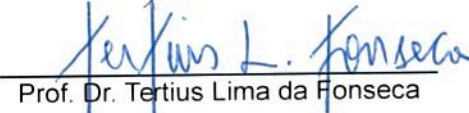
Goiânia, 07 de maio de 2018.


Prof. Dr. José R. Sabino


Prof. Dr. Carlos Basílio Pinheiro


Prof. Dr. Sauli dos Santos Jr.


Prof. Dr. Leandro F. de S. Bufaiçal


Prof. Dr. Tertius Lima da Fonseca

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

Agradecimentos

Um agradecimento mais que especial aos meus queridos pais pela dedicação, amor, incentivo e carinho. Aos meus irmãos, companheiros sempre presentes nessa jornada. Palavras não são suficientes para expressar a minha gratidão.

Ao meu orientador professor Dr. José Ricardo Sabino por todo o conhecimento compartilhado, confiança e apoio desde os anos da graduação.

Aos docentes do Instituto de Física que participaram da minha formação.

Aos amigos do Instituto de Física, pelos momentos agradáveis, que serão sempre lembrados com carinho.

Ao Instituto de Física da UFG pela oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Resumo

Nesta tese serão apresentados os resultados de determinação estrutural por difração de raios X de monocristais de candidatos a fármacos em condições ambiente de temperatura e pressão, assim como submetidos à altas pressões. A análise cristalográfica desse tipo de composto permite obter a estrutura tridimensional de maneira inequívoca. Essa informação é útil para o processo de desenvolvimento de novos fármacos a fim de se alcançar as propriedades planejadas, tais como o estudo de combinações do fármaco com os excipientes a serem utilizados para garantir a taxa de liberação esperada do fármaco no corpo humano e a otimização da interação entre o fármaco e o alvo. Além disso, durante o processo de produção na indústria farmacêutica, podem surgir fases polimórficas devido à aplicação de pressão, que ocorre durante a moagem e na preparação de comprimidos, podendo alterar a biodisponibilidade, solubilidade e estabilidade do medicamento. Assim, identificar as condições nas quais tais modificações podem ocorrer, garante a confiabilidade do produto final. Nesse sentido, no presente trabalho foram realizadas a cristalização e análise cristalográfica de candidatos a fármacos desenvolvidos pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os compostos analisados foram: LASSBio-1773 e LASSBio-1774, que possuem atividade hipoglicemiante, LASSBio-1606, com propriedade anti-inflamatória, e LASSBio-1735, que se mostrou ativo contra diversos tipos de câncer. Para os compostos LASSBio-1774 e LASSBio-1606 foi realizada também a difração de raios X em altas pressões, com a Diamond Anvil Cell (DAC), determinando suas células unitárias e analisando os efeitos da pressão sobre o arranjo cristalino. Em ambos os compostos foram observadas transições de fase reversíveis. Para o LASSBio-1774 a análise das mudanças estruturais devidas à pressão foi realizada com o auxílio dos tensores de *strain*.

Palavras-chave: Cristalografia de raios X, Altas pressões, *Diamond anvil Cell*.

Abstract

This thesis presents the structure determination using single crystal x-ray crystallography of four drug candidates under ambient conditions of temperature and pressure, as well as submitted to high pressure. The crystallographic analysis of this type of compound allows to obtain the three-dimensional structure in an unambiguous way. This information is useful for the development process of new drugs in order to achieve the planned properties, such as the study of combinations of the drug with the excipients to be used to guarantee the rate of expected release of the drug in the human body and the optimization of interaction between the drug and the target. Furthermore during the process of drug manufacturing in the pharmaceutical industry polymorphic phases may arise due to the application of pressure, which occurs during grinding and in the preparation of tablets, which may alter the bioavailability, solubility and stability of the medicament. Thus, identifying the conditions under which such modifications may occur guarantees the reliability of the final product. In this sense, the crystallization and crystallographic analysis of drug candidates developed by the Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) of the Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) was carried out. The compounds analyzed were: LASSBio-1773 and LASSBio-1774, which have hypoglycemic activity, LASSBio-1606, with anti-inflammatory properties, and LASSBio-1735, which has been shown to be active against several types of cancer. For the compounds LASSBio-1774 and LASSBio-1606 X-ray diffraction at high pressures was also performed with Diamond Anvil Cell (DAC), determining their unit cells and analyzing the effects of pressure on the crystalline arrangement. In both compounds reversible phase transitions were observed. The analysis of the structural changes for LASSBio-1774 due to pressure was performed with the aid of strain tensors.

Keywords: X-ray Crystallography, High-pressure, Diamond anvil Cell.

Lista de Abreviações

DAC Diamond anvil Cell

CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

LASSBio Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas

UFG Universidade Federal de Goiás

UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro

OMS Organização Mundial da Saúde

INCA Instituto Nacional de Câncer

CA-4 Combretastina A4

Lista de Figuras

2.1	Representação dos vetores e ângulos que definem a célula unitária	4
2.2	Plano interceptando os eixos da cela unitária em h,k e l , sendo h,k,l os índices de Miller	10
2.3	Geometria da interpretação de Bragg para a difração de raios X para planos cristalinos paralelos	11
2.4	Representação do vetor diferença entre os feixes incidente e difratado	12
2.5	Representação esquemática de um tubo de raios X	13
2.6	Transições eletrônicas no processo de produção de raios X	14
2.7	Dependência do fator de espalhamento atômico f com $\sin \theta/\lambda$. Representação quantitativa de f para alguns átomos típicos em estruturas cristalinas	17
2.8	Primeira câmara de bigornas de diamante	26
2.9	Evolução do dubleto de fluorescência do rubi com a pressão	29
4.1	Representação esquemática do método de evaporação lenta	34
4.2	Aparatos para execução do método de evaporação lenta	34
4.3	Geometria KAPPA do goniômetro do difratômetro APEX II DUO	35
4.4	Câmara de bigornas de diamante do tipo Merrill-Bassett utilizada neste trabalho	36
4.5	Representação esquemática da câmara de bigornas de diamante	37
4.6	Máquina de eletroerosão Betsa MH20 utilizada na fabricação da junta metálica	39
4.7	Tanque no qual é posicionada a junta metálica - Máquina de eletroerosão Betsa MH20	40
4.8	Crimping tool - Equipamento para fixação do fio de tungstênio ao capilar	41
4.9	Representação esquemática e foto do capilar de aço	42
4.10	Preparação de eletrodo para eletroerosão	42
4.11	Eletrodo pronto para ser utilizado	43
4.12	Difratômetro APEX II DUO	45
4.13	Câmara de bigornas de diamante do tipo Merrill-Bassett montada no goniômetro de 4 círculos no difratômetro APEX II DUO	45
4.14	Padrão de difração típico de um experimento realizado em altas pressões	47
4.15	Visualização do espaço recíproco utilizando o programa <i>reciprocal lattice viewer</i>	48

5.1	Representação plana do composto LASSBio-1471	51
5.2	Modificações estruturais do composto LASSBio-1471 produzindo os compostos LASSBio-1773 e LASSBio-1774	51
5.3	Representação plana do composto LASSBio-1773	52
5.4	Monocristais do composto LASSBio-1773	53
5.5	Representação [37] da unidade assimétrica do composto LASSBio-1773 com elipsóides a 30% de probabilidade.	54
5.6	Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1773 evidenciando as interações C9-H9B . . . Cg1 ⁱ e C16-O6 . . . Cg2 ⁱⁱ	55
5.7	Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1773 evidenciando as interações C8-H8C . . . Cg2 ⁱⁱⁱ e N2-H2 . . . O3 ⁱⁱⁱ	56
5.8	Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1773 evidenciando as interações C6-H6 . . . O1 ^{iv} [^{iv} : -1/2 + x, 1/2 - y, -z]	57
5.9	Representação plana do composto LASSBio-1774	58
5.10	Monocristais do composto LASSBio-1774	59
5.11	Representação [37] da unidade assimétrica do composto LASSBio-1774 com elipsóides a 30% de probabilidade.	60
5.12	Representação [38] do empacotamento ao longo da direção do composto LASSBio-1774 evidenciando a interação C18-H18 . . . Cg1 ⁱ	61
5.13	Representação [38] do empacotamento ao longo da direção [010] do composto LASSBio-1774 evidenciando as interações C6-H6 . . . O2 ⁱⁱ e C7-H7 . . . O2 ⁱⁱ	62
5.14	Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1774 ao longo da direção [001] evidenciando a interação C8-H8C . . . O6 ⁱⁱⁱ	62
5.15	Espectro fluorescência do rubi com excitação por uma luz de comprimento de onda de 488 nm	64
5.16	Espectro de fluorescência do rubi com excitação por uma luz de comprimento de onda de 514 nm	65
5.17	Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1774 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano bc. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02. IV - Célula unitária na pressão 03.	70
5.18	Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1774 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano ac. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02. IV - Célula unitária na pressão 03.	70

5.19	Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1774 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano ab. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02. IV - Célula unitária na pressão 03.	71
5.20	Representação plana do composto LASSBio-1606	73
5.21	Representação plana do anti-inflamatório Piroxicam	73
5.22	Cristais do composto LASSBio-1606	74
5.23	Representação [37] da unidade assimétrica do composto LASSBio-1606 com elipsóides a 30% de probabilidade.	76
5.24	Empacotamento [38] do composto LASSBio-1606 ao longo da direção [110]	77
5.25	Empacotamento [38] do composto LASSBio-1606 ao longo da direção [110] evidenciando as interações presentes	77
5.26	Empacotamento [38] do composto LASSBio-1606 ao longo da direção [110]	78
5.27	Empacotamento [38] do composto LASSBio-1606 ao longo da direção [001]	78
5.28	Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1606 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano bc. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02.	81
5.29	Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1606 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano ac. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02.	82
5.30	Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1606 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano ab. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02.	83
5.31	Representação plana da Combretastatina A4	84
5.32	Representação plana do composto LASSBio-1586	85
5.33	Representação plana do composto LASSBio-1735 (fonte: Da autora	85
5.34	Monocristais do composto LASSBio-1735	86
5.35	Representação [37] da unidade assimétrica do composto LASSBio-1735 com elipsóides a 30% de probabilidade.	86
5.36	Comparação [[38]] da unidade assimétrica dos compostos LASSBio-1586 e LASSBio-1735	88
5.37	Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1735 ao longo da direção [110]	89

5.38	Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1735 ao longo da direção [100] evidenciando as interações entre as moléculas de água e as moléculas do composto. [Operações de simetria: (<i>i</i> :1-x,-1/2+y,1/2-z), (<i>ii</i> :2-x,1/2+y,1/2-z), (<i>iii</i> :1-x,1/2+y,1/2-z), (<i>iv</i> :1-x,1/2+y,1/2-z)]	90
5.39	Representação [[38]] do empacotamento do composto LASSBio-1735 no plano bc	91

Lista de Tabelas

2.1	Os sete sistemas cristalinos e as restrições em seus parâmetros de rede	6
2.2	Os 32 grupos grupos de ponto distribuídos entre os sete sistemas cristalinos	7
2.3	Extinções sistemáticas geradas por elementos de simetria	9
5.1	Dados cristalográficos e experimentais do composto LASSBio-1773	53
5.2	Ângulos torsionais na subunidade sulfonil-hidrazona - LASSBio-1773	55
5.3	Ligações de hidrogênio para o composto LASSBio-1773	57
5.4	Dados cristalográficos e experimentais do composto LASSBio-1774	59
5.5	Ângulos torsionais na subunidade sulfonil-hidrazona - LASSBio-1774	61
5.6	Ligações de hidrogênio para o composto LASSBio-1774	63
5.7	Parâmetros de rede para as coletas em alta pressão - LASSBio-1774	67
5.8	Variação percentual com a pressão dos parâmetros de rede com relação aos respec- tivos valores em pressão ambiente com o aumento da pressão - LASSBio-1774	68
5.9	Magnitude e orientação dos eixos principais dos elipsóides de strain para o composto LASSBio-1774 no intervalo de pressão de P_{atm} a $1,92 \times 10^8$ Pa	69
5.10	Dados cristalográficos e experimentais do composto LASSBio-1606	75
5.11	Ângulos torsionais na subunidade N-acilidrazona - LASSBio-1606	76
5.12	Ligações de hidrogênio para o composto LASSBio-1606	79
5.13	Parâmetros de rede para as coletas em alta pressão - LASSBio-1606	81
5.14	Dados cristalográficos e experimentais do composto LASSBio-1735	87
5.15	Ângulos torsionais na subunidade central - LASSBio-1735	88
5.16	Ligações de hidrogênio para o composto LASSBio-1735	91

Conteúdo

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Abreviações	iii
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Sumário	x
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Tópicos de Cristalografia	3
2.1.1 Rede cristalina e célula unitária	4
2.1.2 Grupos de ponto	5
2.1.3 Grupos de espaço	7
2.1.4 Rede Recíproca	8
2.1.5 Lei de Bragg	10
2.1.6 Equações de Laue	11
2.1.7 Propriedades e produção dos raios X	12
2.1.8 Espalhamento por uma densidade eletrônica	14
2.2 Determinação e refinamento de estruturas cristalográficas	16
2.2.1 Métodos Diretos	16
2.2.2 Refinamento de estruturas cristalográficas	23
2.3 Tópicos de Cristalografia de difração de raios X por monocristais em altas pressões	24
2.3.1 Calibração da pressão utilizando fluorescência de rubi	27

2.3.2	Análise dos efeitos de pressões hidrostáticas em monocristais utilizando tensores de Strain	29
3	Objetivos	31
4	Metodologia	32
4.1	Crescimento de cristais	32
4.2	Coleta e processamento de dados	33
4.3	Apresentação da câmara de bigornas de diamante (<i>DAC</i>)	35
4.3.1	Produção da junta metálica	37
4.3.2	Construção de eletrodos de tungstênio para máquina de eletroerosão	39
4.4	Preparação da câmara de bigornas de diamante (<i>DAC</i>) para coleta de dados	43
4.5	Coleta de dados de difração de raios X de monocristais sob altas pressões	43
4.6	Processamento dos dados e determinação da estrutura	46
5	Resultados e discussões	49
5.1	Análise cristalográfica dos compostos LASSBio-1773 e LASSBio-1774	50
5.1.1	Cristalização e determinação da estrutura cristalográfica e molecular do composto LASSBio-1773	52
5.1.2	Cristalização e determinação da estrutura cristalográfica e molecular do composto LASSBio-1774 - Pressão ambiente	58
5.1.3	Difração de raios X em altas pressões do composto LASSBio-1774	63
5.2	Análise cristalográfica do composto LASSBio-1606	72
5.2.1	Cristalização e determinação da estrutura cristalográfica e molecular do composto LASSBio-1606 - Pressão ambiente	72
5.2.2	Difração de raios X em altas pressões do composto LASSBio-1606	79
5.3	Cristalização e determinação da estrutura cristalográfica e molecular do composto LASSBio-1735	83
6	Conclusões e perspectivas	92
	Referências Bibliográficas	95

Capítulo 1

Introdução

As pesquisas feitas em altas pressões são, tradicionalmente, relacionadas à geologia e são realizadas no intuito de recriar as condições de formação de minerais, por exemplo. Em Física, esse tipo de pesquisa está, geralmente, relacionado à busca de novos materiais. Há cerca de 20 anos, houve um crescimento no interesse em se estudar proteínas e compostos farmacêuticos no estado cristalino submetidos à altas pressões. Em proteínas, tenta-se verificar a desnaturação ou dobramento induzidos por pressão.

Um dos objetivos do estudo de fármacos em altas pressões é a busca por novas formas polimórficas. A análise cristalográfica nessas condições, utilizando a Diamond Anvil Cell (*DAC*), permite verificar a ocorrência de transições de fase, pois os materiais podem apresentar diversos empacotamentos cristalinos quando submetidos a diferentes condições ambientais. Durante a produção de medicamentos na indústria, têm-se a aplicação de ações mecânicas sobre as formas sólidas de fármacos, como ocorre no processo de moagem ou no processo de preparação de comprimidos. Essas etapas geram aumentos localizados de pressão que podem induzir transições de fase, produzindo fases cristalinas cujas propriedades devem ser estudadas e conhecidas. Essas diferentes conformações dos fármacos são determinantes quando se trata de suas atividades farmacológicas pois, apesar de o fármaco se mover em solução através do corpo humano, a estabilidade das formas cristalinas é importante desde o processo de produção, armazenamento, transporte até a forma de administração do medicamento a fim de garantir a biodisponibilidade. Além de ser importante

para a biodisponibilidade e para a segurança terapêutica, identificar a atividade das várias formas sólidas garante proteção da propriedade intelectual, visto que cada polimorfo pode ser patenteado separadamente [1].

Desde 2011, o Grupo de Cristalografia da Universidade Federal de Goiás (UFG) firmou uma parceria com o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O foco do LASSBio é a busca por novos candidatos a fármacos para o tratamento e controle de doenças inflamatórias, neurodegenerativas, diabetes, câncer, dentre outras. Nesse sentido, é realizado o planejamento racional desses novos compostos e a análise estrutural e farmacológica dos mesmos. O Grupo de Cristalografia da UFG está inserido em vários projetos do LASSBio, realizando a determinação estrutural por difração de raios X de monocristal desses candidatos à fármacos. Além da análise cristalográfica de monocristais em condições ambientes, o Grupo de Cristalografia tem se dedicado a analisar os efeitos da aplicação de altas pressões em monocristais de pequenas moléculas, em sua maioria candidatos a fármacos.

Este trabalho está dividido em 6 capítulos. No capítulo 2 será feita uma revisão bibliográfica abordando conceitos básicos de cristalografia de raios X de monocristais, importantes para a compreensão dos capítulos subsequentes. Serão discutidos os Métodos Diretos e de como são obtidas relações de fases entre os fatores de estruturas e, também, métodos de refinamento de estruturas cristalinas. Abordar-se-á também as técnicas de cristalografia de raios X de monocristais em altas pressões, os princípios básicos de funcionamento da *DAC* bem como suas componentes. Será feita uma discussão do método de fluorescência de rubi para medida da pressão no interior da *DAC*, das estratégias de coleta de dados em altas pressões no difratômetro APEX II DUO da Bruker e de como é realizado o tratamento dos dados. No capítulo 3 são listados os objetivos deste trabalho. No capítulo 4 será apresentada a metodologia utilizada. No capítulo 5 serão apresentadas as análises cristalográficas dos compostos LASSBio-1773, LASSBio-1774, LASSBio-1606 e LASSBio-1735. No capítulo 6 serão mostradas as conclusões e as perspectivas de trabalhos futuros.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

A seguir será apresentada a revisão bibliográfica, na qual serão discutidos os tópicos importantes para a compreensão dos capítulos subsequentes

2.1 Tópicos de Cristalografia

O estudo da cristalografia se iniciou com base em observações de minerais, particularmente da análise de seus hábitos, ou seja, da forma externa desses materiais. A partir dessas observações, os mineralogistas chegaram à conclusão de que a forma externa de um cristal seria a manifestação de uma ordem interna. Ao clivar materiais cristalinos é possível notar que, nos fragmentos obtidos, os ângulos entre certos pares de faces permanecem inalterados. A análise da morfologia ainda hoje é utilizada para identificar certos minerais [2].

Um material cristalino é composto por moléculas, ou grupos de moléculas, que se repetem de maneira periódica nas três dimensões por meio de translações, ou seja, apresentam ordem de longo alcance. Esse conceito perdurou até a década de 80, quando foram observados materiais que apresentavam ordem de longo alcance mas não apresentavam periodicidade. Esses materiais são chamados de quasicristais e apresentam simetrias que eram tidas como não cristalográficas até então. Atualmente, a definição de cristal se baseia no fato de que o padrão de difração obtido a partir de tais materiais é discreto, apresentando máximos de interferência construtiva [3].

2.1.1 Rede cristalina e célula unitária

Para descrever a estrutura cristalina de um material é necessário compreender como essas moléculas estão arranjadas e distribuídas ao longo do cristal. Para isso, define-se dois conceitos fundamentais: rede cristalina e célula unitária. A rede cristalina é uma construção matemática que se mantém invariante sob translações do tipo $\mathbf{T} = n_1\mathbf{a} + n_2\mathbf{b} + n_3\mathbf{c}$, sendo n_1, n_2 e n_3 números inteiros e \mathbf{a}, \mathbf{b} e \mathbf{c} os vetores que definirão esta rede. Cada ponto da rede apresenta a mesma vizinhança. A partir dessa rede, divide-se o espaço em paralelepípedos cujas arestas são os vetores \mathbf{a}, \mathbf{b} e \mathbf{c} , não coplanares, que preencherão todo espaço por meio de translações. A esses paralelepípedos é dado o nome de célula unitária. Além dos vetores da rede, a célula unitária é especificada também pelos ângulos entre esse vetores, α, β e γ , sendo α o ângulo compreendido entre os eixos \mathbf{b} e \mathbf{c} , β o ângulo entre \mathbf{a} e \mathbf{c} e γ o ângulo entre \mathbf{a} e \mathbf{b} . A estrutura cristalina será então a rede adicionada do motivo, que pode ser uma molécula ou um conjunto de moléculas.

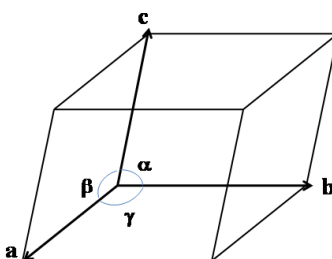


Figura 2.1: Representação dos vetores e ângulos que definem a célula unitária

Fonte: Elaborada pela autora.

O tipo de rede é caracterizado pelo número de pontos por célula unitária. Se a célula unitária tiver somente um ponto da rede, será uma célula do tipo primitiva e será representada pela letra P.

Caso haja mais de um ponto da rede por célula, a célula será denominada centrada. Se, além dos pontos nos vértices, houver um ponto no centro da célula unitária, esta será chamada célula centrada no corpo, denotada pela letra I. Caso, além dos pontos dos vértices, houver um ponto em uma das faces a centragem será denotada pela letra referente à face na qual o ponto está situado. Como último caso, se todas as faces tiverem um ponto em seus centros, a célula será do tipo F [4].

As operações de simetria completam a célula unitária primitiva a partir da unidade assimétrica, que pode ser composta por uma ou mais moléculas. Após a aplicação dessas operações sobre um objeto, sua vizinhança permanece invariante. Estas operações são classificadas em dois tipos: próprias e impróprias. As operações próprias mantêm a quiralidade do objeto enquanto que as impróprias mudam a quiralidade [4]. Um elemento de simetria pode ser um ponto, um plano ou um eixo, em torno dos quais a operação de simetria é realizada. Operações de simetria possuem a seguinte forma geral:

$$\mathbf{x}' = R\mathbf{x} + \mathbf{t} = \{R|\mathbf{t}\}\mathbf{x} \quad (2.1)$$

onde a matriz R representa operações que mantêm pelo menos um ponto fixo e \mathbf{t} , a parte translacional.

A partir de combinações entre os parâmetros de rede da célula unitária (\mathbf{a} , \mathbf{b} , \mathbf{c} e α , β , γ), chega-se a sete sistemas cristalinos (tabela 2.1). Bravais mostrou, em 1848, que é possível arranjar os pontos de uma rede cristalina de 14 maneiras diferentes combinando redes primitivas e redes com centragens de forma compatível com a simetria dos sete sistemas cristalinos. Essas combinações fornecem as 14 redes de Bravais.

2.1.2 Grupos de ponto

A combinação dos elementos de simetria leva à formação de grupos de simetria. Considerando todos os elementos de simetria e as possíveis combinações entre eles, 32 grupos de simetria serão construídos [4].

Existem restrições quanto aos tipos de eixos de rotação que podem ser combinados. Se dois eixos

Sistema cristalino	Parâmetros de rede	
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Trigonal ou romboédrico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Monoclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$
Triclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \gamma \neq \beta \neq 90^\circ$

Tabela 2.1: Os sete sistemas cristalinos e as restrições em seus parâmetros de rede

Fonte: Elaborada pela autora.

de rotação próprios se intersectam, será gerado, então, um terceiro eixo próprio, pois é necessário que a quiralidade seja mantida. Se um eixo impróprio e um próprio se combinam, o eixo gerado deverá ser impróprio. Dessa forma, verifica-se que não é possível combinar três eixos de rotação impróprios. Essas combinações devem obedecer aos seguintes axiomas da teoria de grupos [5]:

1. A multiplicação de dois elementos do grupo é associativa.
2. Deve existir o elemento identidade no grupo.
3. O produto de dois elementos do grupo deve ser também um elemento do grupo.
4. Para cada elemento do grupo, deve haver um inverso, que também pertence ao grupo.

Esses 32 grupos de simetria são os Grupos de Ponto, pois os elementos de simetria de cada grupo têm, pelo menos, um ponto em comum e, após serem aplicados, mantêm pelo menos um ponto do objeto fixo [4]. Na tabela 2.2, estão listados os grupos de ponto para cada um dos sete sistemas cristalinos.

Desses 32 grupos, 11 são centrossimétricos e 21 são não-centrossimétricos. Dentre os 21 grupos de ponto não centrossimétricos, onze são enantiomorfos e 10 são não-enantiomorfos. Os onze grupos de ponto centrossimétricos são conhecidos como Grupos de Laue.

Sistema cristalino	Centrossimétrico	Não-centrossimétrico Não-enantiomorfo	Não-centrossimétrico Enantiomorfo
Triclínico	$\bar{1}$	—	1
Monoclínico	2/m	$\bar{2} = m$	2
Ortorrômbico	2/m 2/m 2/m (mmm)	mm2	222
Tetragonal	4/m 2/m 2/m (4/mmm) 4/m	4mm, $\bar{4}m2$ $\bar{4}$	422 4
Trigonal	$\bar{3}2/m$ ($\bar{3}m$) $\bar{3}$	3m —	32 = 322 3
Hexagonal	6/m 2/m 2/m (6/mmm) 6/m	6mm, $\bar{6}2m$ $\bar{6}=3/m$	622 6
Cúbico	2/m $\bar{3}$ ($m\bar{3}$) 4/m $\bar{3}$ 2/m ($m\bar{3}m$)	— $\bar{4}3m$	23 = 332 432

Tabela 2.2: Os 32 grupos de ponto distribuídos entre os sete sistemas cristalinos

Fonte: Elaborada pela autora.

2.1.3 Grupos de espaço

Agrupando-se as 32 simetrias de ponto dos sete sistemas cristalinos condizentes com as 14 redes de Bravais teremos 73 grupos de simetria possíveis. Levando-se em consideração as operações de simetria translacionais (os eixos e planos de deslizamento), obtêm-se mais 157 grupos, totalizando 230 grupos de simetria, conhecidos como grupos de espaço, que estão tabulados detalhadamente na Tabela Internacional de Cristalografia, volume A [6]. Os grupos espaciais foram derivados no fim do século XIX, pelos matemáticos Fedorov e Schoenflies.

Uma vez que tenham sido determinados o sistema cristalino e o grupo de ponto, é possível determinar qual parte dos dados é única, ou seja, que não possui equivalentes por simetria. É fundamental obter essa informação no início da coleta de dados, pois é necessário coletar somente a parte única dos dados, visto que o restante será gerado pelas operações de simetria do grupo. Nos difratômetros com detectores pontuais, como o CAD-4, essa informação é valiosíssima pois as coletas são muito longas, e uma escolha errada de grupo de ponto pode significar várias semanas a mais de tempo de coleta.

A nomenclatura do grupo de espaço é feita de acordo com a notação de Hermann-Mauguin e

consiste na letra indicando o tipo de centragem da rede seguida pelos símbolos que indicam os elementos de simetria. Os eixos de simetria são paralelos aos eixos cristalinos correspondentes e os planos de espelho ou de deslizamento são perpendiculares aos mesmos. Por exemplo, no grupo de espaço $P2_1/c$, o grupo de espaço no qual a maioria dos compostos orgânicos cristaliza [7], a rede é do tipo primitiva e os elementos de simetria presentes são um eixo de rototranslação 2_1 paralelo ao eixo **b**, que por convenção é o eixo único desse grupo de espaço, e um plano de deslizamento ao longo de **c**, que é perpendicular ao eixo **b**. Para se obter o grupo de ponto de um dado grupo de espaço, retira-se o símbolo referente à centragem da rede, e substitui todos os elementos de simetria com componente translacional pelos seus equivalentes sem translação. No caso do grupo $P2_1/c$ o grupo de ponto referente será $2/m$ [6].

Determinação do grupo de espaço

A intensidade de uma reflexão pode ser extinta devido à interferência das ondas espalhadas por átomos em posições relacionadas por operações de simetria translacionais. Informações sobre o grupo espacial podem ser obtidas pela análise das extinções sistemáticas (reflexões que possuem zero de intensidade) de algumas famílias de reflexões. Eixos de roto-translação ocasionam extinções em reflexões ao longo da linha axial a qual o eixo é paralelo e os planos de deslizamento provocam extinções em reflexões no plano paralelo ao elemento de simetria, cortando a origem da rede recíproca. Na Tabela 2.3 estão relacionados os elementos de simetria translacionais e as extinções sistemáticas que eles provocam [6].

2.1.4 Rede Recíproca

Um recurso útil para associar as orientações dos planos cristalinos e as respectivas distâncias interplanares é conhecido como Rede Recíproca, um conceito que foi introduzido por Paul P. Ewald, em 1921 [8]. No espaço recíproco os eixos da cela unitária são definidos como vetores \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* e \mathbf{c}^* e

Família de reflexões	Elementos de simetria translacional	Condições de extinção
Nenhuma	P-rede primitiva	Nenhuma
hkl	A-rede centrada	$k + l = 2n + 1$
hkl	B-rede centrada	$h + l = 2n + 1$
hkl	C-rede centrada	$h + k = 2n + 1$
hkl	F-rede centrada	$k + l = 2n + 1$ $h + l = 2n + 1$ $h + k = 2n + 1$
hkl	I-corpo centrado	$h + k + l = 2n + 1$
0kl	b-planos de deslizamento (100) c-planos de deslizamento (100) n-planos de deslizamento (100) d-planos de deslizamento (100)	$k = 2n + 1$ $l = 2n + 1$ $k + l = 2n + 1$ $k + l = 4n + 1$
h0l	a-planos de deslizamento (010) c-planos de deslizamento (010) n-planos de deslizamento (010) d-planos de deslizamento (010)	$h = 2n + 1$ $l = 2n + 1$ $h + l = 2n + 1$ $h + l = 4n + 1$
hk0	a-planos de deslizamento (001) b-planos de deslizamento (001) n-planos de deslizamento (001) d-planos de deslizamento (001)	$h = 2n + 1$ $k = 2n + 1$ $h + k = 2n + 1$ $h + k = 4n + 1$
h00	2_1 -eixo helicoidal ao longo de a	$h = 2n + 1$
0k0	2_1 -eixo helicoidal ao longo de b	$k = 2n + 1$
00l	$2_1, 4_2$ -eixo helicoidal ao longo de c	$l = 2n + 1$

Tabela 2.3: Extinções sistemáticas geradas por elementos de simetria

Fonte: Elaborada pela autora.

obedecem as seguintes relações:

$$\begin{aligned}
 \mathbf{a}^* &= \frac{\mathbf{b} \times \mathbf{c}}{V} \\
 \mathbf{b}^* &= \frac{\mathbf{c} \times \mathbf{a}}{V} \\
 \mathbf{c}^* &= \frac{\mathbf{a} \times \mathbf{b}}{V}
 \end{aligned} \tag{2.2}$$

A cada família de planos são associados números inteiros (h, k, l) , os índices de Miller, que são índices utilizados para identificar uma família de planos cristalinos através de um ponto da Rede Recíproca. Os três índices inteiros h, k e l correspondem ao inverso da posição fracionária em que o plano cristalino corta os eixos da cela unitária convencional, conforme ilustrado na figura 2.2.

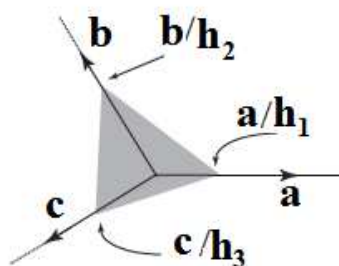


Figura 2.2: Plano interceptando os eixos da cela unitária em h, k e l , sendo h, k, l os índices de Miller

Fonte: Elaborada pela autora.

2.1.5 Lei de Bragg

A fim de explicar o espalhamento de raios X por cristais em direções bem definidas, W. L. Bragg e W. H. Bragg deduziram, em 1912, uma equação fazendo analogia da difração com reflexões por famílias de planos paralelos, formados pelos pontos do retículo cristalino. Feixes de raios X incidem sobre uma família de planos paralelos do cristal e sofrem reflexões de maneira semelhante a do espelho plano, portanto, o ângulo de incidência e o de reflexão medidos em relação ao plano são iguais. Máximos de intensidade serão observados quando ocorrer interferência construtiva, ou seja, as ondas espalhadas por planos consecutivos estiverem em fase [4].

Como se pode ver na figura 2.3, considerando que a separação entre planos sucessivos é igual a d , verifica-se que a diferença de caminho entre os raios ABC e DEF, será:

$$GE + EH = 2d \sin \theta \quad (2.3)$$

Se a radiação espalhada estiver em fase, a diferença de caminho entre os feixes deve ser um múltiplo inteiro do comprimento de onda. Assim, para uma interferência construtiva tem-se:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (2.4)$$

onde λ é comprimento de onda dos raios X e n é um número inteiro. A equação acima é conhecida como lei de Bragg.

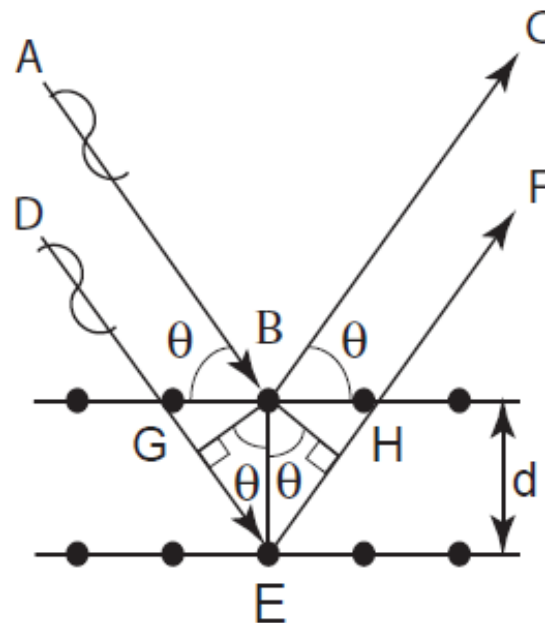


Figura 2.3: Geometria da interpretação de Bragg para a difração de raios X para planos cristalinos paralelos

Fonte: Elaborada pela autora.

2.1.6 Equações de Laue

As equações de Laue exprimem a condição para que as ondas refletidas por diferentes átomos no cristal estejam em fase e originem um máximo de interferência construtiva. Seja uma linha de átomos com espaçamento \mathbf{a} , um feixe incidente de raios X dado pelo vetor \mathbf{S}_0 e um feixe espalhado dado pelo vetor \mathbf{S} . A difração ocorrerá quando a diferença de caminho entre os feixes difratados por dois pontos diferentes da rede for igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda, ou seja:

$$\mathbf{a} \cdot \mathbf{S} - \mathbf{a} \cdot \mathbf{S}_0 = \mathbf{a} \cdot (\mathbf{S} - \mathbf{S}_0) = h\lambda \quad (2.5)$$

Para representar a rede cristalina, são necessários três vetores \mathbf{a} , \mathbf{b} e \mathbf{c} . Dessa forma, a difração ocorrerá somente nas direções que satisfaçam o sistema de três equações que são definidas como as três equações de Laue, 2.6.

$$\begin{aligned}
 \mathbf{a} \cdot (\mathbf{S} - \mathbf{S}_0) &= h\lambda \\
 \mathbf{b} \cdot (\mathbf{S} - \mathbf{S}_0) &= k\lambda \\
 \mathbf{c} \cdot (\mathbf{S} - \mathbf{S}_0) &= l\lambda
 \end{aligned}
 \tag{2.6}$$

Com base no sistema de equações 2.6, define-se um vetor que descreve a diferença de caminho entre

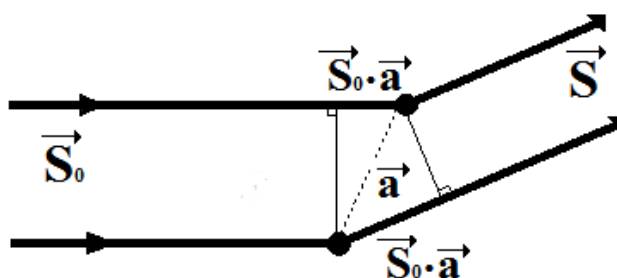


Figura 2.4: Representação do vetor diferença entre os feixes incidente e difratado

Fonte: Elaborada pela autora.

o feixe incidente e o feixe difratado, relacionando essas equações à rede recíproca, que será dado por:

$$|\mathbf{H}| = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*
 \tag{2.7}$$

sendo h , k e l inteiros.

2.1.7 Propriedades e produção dos raios X

A estrutura cristalina da matéria é analisada principalmente com base na interação de raios X com a matéria por meio do fenômeno da difração de raios X. Este fenômeno ocorre quando uma determinada onda atravessa um orifício de espaçamento com a mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da radiação incidente. Essa é a razão pela qual se utiliza raios X para esse fim, pois o comprimento de onda destes encontra-se na faixa de interesse da cristalografia estrutural, 0,5 a 3,0 Å, o intervalo que engloba todos os comprimentos de ligação entre átomos.

A radiação utilizada para experimentos de difração de raios X por cristais pode ser produzida em um tubo de raios X pela colisão de elétrons com um alvo metálico. O tubo de raios X, representado na figura 2.7, consiste de um cátodo, que é um filamento aquecido de tungstênio onde os elétrons são emitidos e acelerados até colidirem com um alvo metálico (usualmente feito de Cobre, Molibdênio, Prata ou Cromo). Esse efeito da emissão de elétrons é dito emissão termiônica. No interior desse tubo é feito vácuo para reduzir ao máximo a dissipação de energia via colisões dos elétrons com moléculas do ar. A radiação liberada pelo alvo consiste de uma mistura de um espectro contínuo e de diferentes linhas intensas de comprimentos de onda bem definidos que dependem do material do alvo metálico. A intensidade dessas linhas será proporcional à corrente do tubo e à tensão. O espectro característico de interesse será obtido quando os elétrons incidentes tiverem energia suficiente para excitar um elétron da camada K do átomo do alvo. Um elétron da camada L irá ocupar essa vancância e, então, um fóton de raios X será emitido como consequência da transição eletrônica para um estado de mais baixa energia. Esse processo está representado na figura 2.6. A energia da radiação emitida será característica do material do alvo, visto que os níveis de energia para cada átomo são específicos, logo o comprimento de onda da radiação emitida será uma característica do átomo que constituiu o alvo.

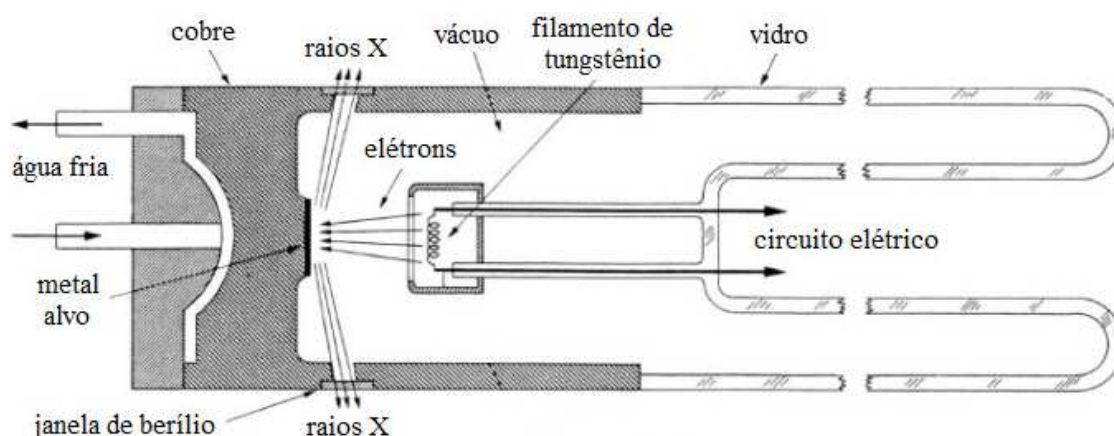


Figura 2.5: Representação esquemática de um tubo de raios X

Fonte: Adptada de "Elements of X-Ray Diffraction, B. D. Cullity".

O comprimento de onda dos raios X emitidos dependerá, além do material do alvo, das camadas

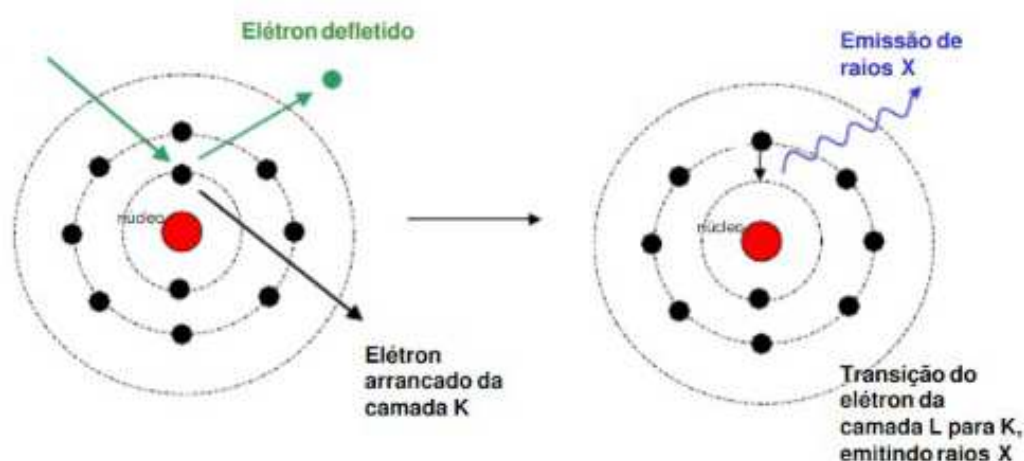


Figura 2.6: Transições eletrônicas no processo de produção de raios X

Fonte: Adaptada de "Elements of X-Ray Diffraction, B. D. Cullity".

entre as quais o elétron irá transicionar. Transições da camada L para a camada K darão origem às linhas características $K\alpha_1$ e $K\alpha_2$ e transições da camada M para a camada K darão origem às linhas características $K\beta$, que são menos intensas, por isso seleciona-se a $K\alpha$. A radiação de frenagem ou *bremsstrahlung* consiste de uma mistura de comprimentos de onda e é produzida pela desaceleração dos elétrons conforme vão atravessando o material do alvo.

2.1.8 Espalhamento por uma densidade eletrônica

A informação obtida por meio dos raios X espalhados é a distribuição eletrônica pois são as cargas que os espalham. O espalhamento de um átomo é o somatório sobre toda a distribuição espacial de elétrons atômicos (nuvem eletrônica). Assim, pode-se escrever a expressão para o fator de espalhamento atômico f como a integral:

$$f(\mathbf{H}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{H}} dv \quad (2.8)$$

O espalhamento total da célula unitária é escrito como o somatório sobre as contribuições de todos os átomos dentro da célula unitária. Esta grandeza é definida como Fator de Estrutura que é uma função da distribuição da densidade eletrônica na célula unitária, dado por:

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} = |F(hkl)| e^{i\alpha(hkl)} \quad (2.9)$$

onde f_j é o fator de espalhamento atômico para o j -ésimo átomo na cela unitária, com coordenadas x_j, y_j, z_j . Os inteiros (hkl) são os índices de Miller para a reflexão ocorrendo em uma dada direção. O fator de estrutura é um número complexo com uma amplitude e uma fase.

A estrutura cristalina e seu padrão de difração são relacionados entre si por uma Transformada de Fourier [8]. Portanto, o padrão de difração é a transformada de Fourier da densidade eletrônica da estrutura. A equação 2.11 descreve a densidade eletrônica.

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.10)$$

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (2.11)$$

A equação 2.10 é utilizada para calcular o padrão de difração esperado para a estrutura modelo e, então, ser usado durante o refinamento da estrutura cristalina comparando com o padrão de difração observado. Esses valores encontrados são os Fatores de Estrutura Calculados, $F_c(hkl)$. Essa equação descreve, matematicamente, a amplitude observada quando os raios X são difratados por um cristal.

Analisando a equação 2.11 verifica-se que é possível encontrar os máximos de $\rho(xyz)$ por meio de uma varredura sobre todos os valores medidos de h, k e l e fazendo pequenos incrementos nos valores de x, y e z mapeando, assim, todo o espaço da célula unitária. O resultado final será um mapa de densidade eletrônica no qual os máximos corresponderão às posições atômicas. Esse procedimento é conhecido como Síntese de Fourier [9]. O principal problema na resolução de estruturas cristalográficas, é que os dados disponíveis para a análise são somente as intensidades do espectro da difração de raios X pelo cristal e, destes valores, obtemos apenas os módulos dos Fatores de Estrutura. Isso é um fator limitante para a resolução de estruturas porque impossibilita o cálculo da função de densidade eletrônica por meio da Síntese de Fourier com a ausência das fases, que não são diretamente medidas durante o experimento. Esse problema é conhecido como o Problema das

Fases na Cristalografia. Um dos métodos mais utilizados para se resolver esse problema são os chamados Métodos Diretos que, devido à robustez, em termos computacionais, e eficácia, é o método correntemente utilizado para solução de estruturas de pequenas moléculas.

2.2 Determinação e refinamento de estruturas cristalográficas

Esta seção tratará de tópicos relacionados ao método de determinação de estruturas que foi utilizado neste trabalho, os Métodos Diretos, e ao refinamento dos dados obtidos apresentando, também, os fatores residuais usados para verificar a qualidade dos resultados obtidos.

2.2.1 Métodos Diretos

O termo Métodos Diretos é usado para descrever a determinação da estrutura molecular diretamente a partir das intensidades da radiação difratada sem nenhum conhecimento prévio das fases. Ele parte da hipótese de que as fases não foram realmente perdidas no processo de medida, mas estão ocultas nas relações entre intensidades medidas dos fatores de estrutura.

Os primeiros passos no desenvolvimento dos Métodos Diretos foram dados por David Harker e John Kasper em 1948, quando eles mostraram que existiam relações de desigualdade entre os fatores de estrutura e que tais relações forneceriam informações a respeito das fases. Baseando-se nas relações entre as amplitudes e as fases e nas desigualdades desenvolvidas por Harker e Kasper, Karle e Hauptman (1950) desenvolveram também relações probabilísticas entre estas desigualdades [10].

Os Métodos Diretos se baseiam nas hipóteses de que a densidade eletrônica é sempre positiva, discreta e considera os átomos como possuindo fatores de espalhamento similares, o que é verificado para a maioria dos compostos orgânicos que apresentam átomos semelhantes em termos de seus números atômicos.

O fator de espalhamento atômico tem dependência com a variação de $\sin \theta / \lambda$ conforme está ilustrado na figura 2.7, mas o interesse é encontrar as posições atômicas sem detalhes da distribuição da densidade eletrônica. Dessa forma, são definidos dois fatores de estrutura que não levam em conta a forma do átomo. São eles os fatores de estrutura unitário e normalizado [10].

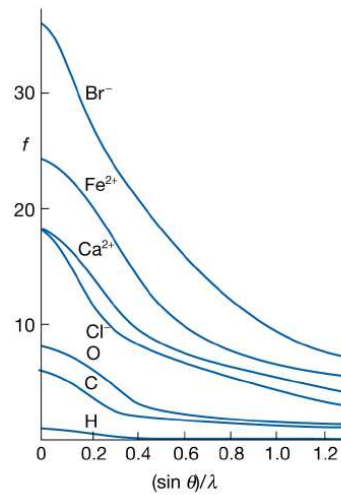


Figura 2.7: Dependência do fator de espalhamento atômico f com $\sin \theta/\lambda$. Representação quantitativa de f para alguns átomos típicos em estruturas cristalinas

Fonte: Adaptada de "Elements of X-Ray Diffraction, B. D. Cullity".

Fatores de estrutura unitário e normalizado

Esses fatores de estrutura consideram os átomos como pontuais e fazem com que o tratamento estatístico seja mais simples. Seja:

$$hx + ky + lz = \mathbf{H} \cdot \mathbf{r} \quad (2.12)$$

O fator de estrutura dado na equação 2.10 pode ser reescrito como:

$$F(\mathbf{H}) = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(\mathbf{H} \cdot \mathbf{r}_j)} \quad (2.13)$$

Então, o fator de estrutura unitário, cujo valor máximo é 1, é definido como:

$$U(\mathbf{H}) = \frac{F(\mathbf{H})}{\sum_{j=1}^N f_j} = \sum_{j=1}^N n_j e^{2\pi i(\mathbf{H} \cdot \mathbf{r}_j)} \quad (2.14)$$

onde n_j é o fator de espalhamento unitário, dado por:

$$n_j = \frac{f_j}{\sum_{j=1}^N f_j} \quad (2.15)$$

Outra definição importante nesse modelo, é o fator de estrutura normalizado, $E(\mathbf{H})$, dado por

$$E(\mathbf{H}) = \frac{F(\mathbf{H})}{(\epsilon \sum_{j=1}^N F^2)^{1/2}} \quad (2.16)$$

onde ϵ é um inteiro que representa a multiplicidade da simetria do grupo espacial sobre as intensidades.

No modelo que utiliza os fatores de estrutura normalizados, considera-se os átomos pontuais, sem vibração térmica, além de não levar em consideração o efeito do ângulo de espalhamento. Quando todos os átomos são considerados idênticos, o fator de espalhamento unitário se reduz a $1/N$, onde N é o número de átomos na cela unitária.

Desigualdades de Harker-Kasper

No cálculo das desigualdades [10], duas importantes propriedades da densidade eletrônica são levadas em consideração: a sua positividade e a simetria esférica dos átomos. Com base nas desigualdades de Cauchy-Schwarz, é possível obter outras desigualdades utilizando os fatores de estrutura unitários. Pela equação 2.14 e assumindo que a estrutura é centrossimétrica, portanto todos os fatores de estrutura serão reais, tem-se que:

$$U(\mathbf{H}) = \sum_{j=1}^N n_j \cos 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j) \quad (2.17)$$

que pode ser reescrita como:

$$U(\mathbf{H}) = \sum_{j=1}^N \sqrt{n_j} \sqrt{n_j} \cos 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j) \quad (2.18)$$

A desigualdade de Cauchy-Schwarz é dada por:

$$\left| \sum_j a_j b_j \right|^2 \leq \left| \sum_j a_j^2 \right| \left| \sum_j b_j^2 \right| \quad (2.19)$$

Identificando $a_j = \sqrt{n_j}$, $b_j = \sqrt{n_j} \cos 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)$ e $\sum_j a_j b_j = U(\mathbf{H})$, tem-se:

$$|U(\mathbf{H})|^2 \leq \sum_j n_j \sum_j n_j \cos^2 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j) \quad (2.20)$$

Sabe-se que $\sum_j n_j = 1$ e $\cos^2 \theta = \frac{1}{2}(1 + \cos 2\theta)$, então:

$$\begin{aligned}
U(\mathbf{H})^2 &\leq \sum_j \frac{n_j}{2} (1 + \cos 2\pi 2(hx_j + ky_j + lz_j)) \\
U(\mathbf{H})^2 &\leq \frac{1}{2} \left(\sum_j n_j + \sum_j n_j \cos 2\pi 2(hx_j + ky_j + lz_j) \right) \\
\therefore U(\mathbf{H})^2 &\leq \frac{1}{2} (1 + U(2\mathbf{H})) \tag{2.21}
\end{aligned}$$

Sendo a magnitude e o sinal de $U(\mathbf{H})$ conhecidos, a única incógnita será a fase de $U(2\mathbf{H})$, que será escolhida de modo a obedecer a desigualdade. Para que a fase de $U(2\mathbf{H})$ fique definida sem nenhuma dúvida, a intensidade $U(\mathbf{H})$ deve ter um valor elevado comparando-se com as demais reflexões. Como nesse tipo de abordagem lida-se com cristais centrossimétricos, os sinais possíveis serão $+1$ para fase de 0 e -1 para fase de π

Invariantes e seminvariantes de estrutura

Se a estrutura for centrossimétrica, a origem é definida no centro de inversão. Caso contrário, o elemento de simetria de mais alta ordem é tomado como origem. Para certos conjuntos de fases, quando a origem for transladada para pontos equivalentes por simetria, as fases sofrerão uma variação de um múltiplo inteiro de 2π , o que é uma mudança trivial. Tais conjuntos de fatores de estrutura são os semi-invariantes de estrutura. Todavia, existem certos conjuntos de fases que não mudam, independente da escolha da origem. Estes são os invariantes de estrutura [11].

Como exemplo, consideremos o seguinte produto triplo:

$$\begin{aligned}
F'(\mathbf{H}_1) \cdot F'(\mathbf{H}_2) \cdot F'(\mathbf{H}_3) &= |F(\mathbf{H}_1) \cdot F(\mathbf{H}_2) \cdot F(\mathbf{H}_3)| \\
&\times \exp i[\alpha(\mathbf{H}_1) + \alpha(\mathbf{H}_2) + \alpha(\mathbf{H}_3)] - 2\pi i [((\mathbf{H}_1) + (\mathbf{H}_2) + (\mathbf{H}_3)) \cdot \mathbf{r}'] \tag{2.22}
\end{aligned}$$

Para que os dois lados dessa equação sejam iguais, não importando para qual vetor r' , devemos ter

$$\mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 + \mathbf{H}_3 = 0$$

ou

$$\mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 = -\mathbf{H}_3$$

Conclui-se, a partir dessa relação, que o conjunto de fases $\alpha(\mathbf{H}_1) + \alpha(\mathbf{H}_2) + \alpha(-\mathbf{H}_1 - \mathbf{H}_2)$ não depende da escolha de origem. Esse conjunto recebe o nome de invariante triplo de fase. Se as reflexões envolvidas nesse produto possuírem altos valores de $|E(\mathbf{H})|$, então a probabilidade de que o sinal resultante do produto desse tripleto seja positivo é grande, para o caso de estruturas centrossimétricas. A relação que decorre disso é a \sum_2 , dada por:

$$s(F(\mathbf{H}_1)) \cdot s(F(\mathbf{H}_2)) \cdot s(F(-\mathbf{H}_1 - \mathbf{H}_2)) \approx + \quad (2.23)$$

onde $s(F(\mathbf{H}))$ representa o sinal de $F(\mathbf{H})$ e \approx significa provavelmente igual.

Outra relação de suma importância é a fórmula \sum_1 , dada por:

$$p_+(2\mathbf{H}|\mathbf{H}) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \tanh \left[\left(\frac{\sigma_3}{2\sigma_2^{3/2}} \right) |E(2\mathbf{H})| (|E(\mathbf{H})|^2 - 1) \right] \quad (2.24)$$

que diz a probabilidade de que $E(2\mathbf{H})$ seja positivo dadas as magnitudes de $E(\mathbf{H})$ e de $E(2\mathbf{H})$. Nessa equação, $\sigma_n = \sum_j Z_j^n$, onde Z_j é o número atômico do j-ésimo átomo [9].

Equação de Sayre

Em 1952, Sayre demonstrou que, para estruturas nas quais os átomos não diferissem muito em número atômico e tivessem posições bem definidas, a função de densidade eletrônica, $\rho(\mathbf{r})$, apresenta picos nas mesmas posições que tal função ao quadrado [9]. Dessa forma, seja:

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{H}} F(\mathbf{H}) e^{-2\pi i(\mathbf{H} \cdot \mathbf{r})}$$

então

$$\rho^2(\mathbf{r}) = \frac{1}{V^2} \sum_{\mathbf{H}_1} \sum_{\mathbf{H}_2} F(\mathbf{H}_1) F(\mathbf{H}_2) e^{-2\pi i[(\mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2) \cdot \mathbf{r}]} \quad (2.25)$$

Definindo $\mathbf{H} = \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2$, pode-se reescrever a equação 2.25 como

$$\rho^2(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{H}_1} \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{H} - \mathbf{H}_1} F(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1) F(\mathbf{H}_2) e^{-2\pi i(\mathbf{H} \cdot \mathbf{r})} \quad (2.26)$$

que pode ser vista como uma série de Fourier com coeficientes

$$G(\mathbf{H}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{H}_1} F(\mathbf{H}_1) F(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1) \quad (2.27)$$

Além do mais, $G(\mathbf{H})$ pode ser visto como um "Fator de Estrutura". Então da mesma forma que

$$F(\mathbf{H}) = f \sum_j e^{2\pi i(\mathbf{H} \cdot \mathbf{r}_j)}$$

podemos escrever

$$G(\mathbf{H}) = g \sum_j e^{2\pi i(\mathbf{H} \cdot \mathbf{r}_j)}$$

Dividindo as expressões anteriores uma pela outra, teremos

$$\begin{aligned} G(\mathbf{H}) &= \frac{g}{f} F(\mathbf{H}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{H}_1} F(\mathbf{H}_1) F(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1) \\ F(\mathbf{H}) &= \frac{f}{gV} \sum_{\mathbf{H}_1} F(\mathbf{H}_1) F(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1) \end{aligned} \quad (2.28)$$

Essa é a equação de Sayre. Se $F(\mathbf{H})$ tiver um valor alto, então a série tenderá a um sinal bem definido (+ ou -). Dessa forma:

$$s(F(\mathbf{H})) \approx s(F(\mathbf{H}_1)) \cdot s(F(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1)) \quad (2.29)$$

Fórmula da tangente

É sabido que o fator de estrutura é um número complexo e pode ser escrito na forma $F(\mathbf{H}) = A(\mathbf{H}) + iB(\mathbf{H})$.

Portanto:

$$\tan \alpha(\mathbf{H}) = \frac{I(F(\mathbf{H}))}{R(F(\mathbf{H}))}$$

Utilizando a equação de Sayre, podemos escrever:

$$\tan \alpha(\mathbf{H}) = \frac{I(\sum_{\mathbf{H}_1} F(\mathbf{H}_1) F(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1))}{R(\sum_{\mathbf{H}_1} F(\mathbf{H}_1) - F(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1))} \quad (2.30)$$

$$\tan \alpha(\mathbf{H}) = \frac{\sum_{\mathbf{H}_1} (F(\mathbf{H}_1) F(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1)) \sin(\alpha(\mathbf{H}_1) + \alpha(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1))}{\sum_{\mathbf{H}_1} (F(\mathbf{H}_1) - F(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1)) \cos(\alpha(\mathbf{H}_1) + \alpha(\mathbf{H} - \mathbf{H}_1))} \quad (2.31)$$

A equação 2.31 é a chamada fórmula da tangente. Se os fatores de estrutura das reflexões \mathbf{H}_1 e $\mathbf{H} - \mathbf{H}_1$ tiverem valores altos, a soma de suas fases, assumindo que elas já tenham sido determinadas,

fornece aproximadamente a fase da reflexão \mathbf{H} , que agora pode ser utilizada na aproximação de novas fases. Conforme novas fases são determinadas, todas as fases conhecidas são permutadas utilizando a fórmula da tangente. Esse processo é repetido até que todas as fases tenham sido determinadas [4,9]

Método da adição simbólica

Com a origem fixada, é possível determinar algumas fases iniciais. Fases adicionais receberão símbolos, + ou -, no caso centrossimétrico e receberão valores numéricos, como por exemplo $\pi/4$, $3\pi/4$, etc, no caso não-centrossimétrico. Com esse conjunto inicial de fases é possível, utilizando a fórmula da tangente, expandi-lo e obter conjuntos maiores de fase, que servirão de base para o cálculo de mapas de densidade eletrônica [9].

Figuras de mérito para as fases

Uma vez que tenha sido obtido um conjunto inicial de fases, sua confiabilidade é testada utilizando as figuras de mérito, que mostram o quanto tal conjunto satisfaz a fórmula da tangente ou a equação de Sayre, por exemplo. Uma figura de mérito que testa a confiabilidade das fases é a R_α , dada por:

$$R_\alpha = \frac{\sum_{\mathbf{H}} \alpha(\mathbf{H}) - \langle \alpha(\mathbf{H}) \rangle}{\sum_{\mathbf{H}} \langle \alpha(\mathbf{H}) \rangle} \quad (2.32)$$

onde $\langle \alpha(\mathbf{H}) \rangle$ é o valor médio das fases. Portanto R_α indica o quanto a fase $\alpha(\mathbf{H})$ desvia do valor esperado. Dessa forma, quanto menor o valor de R_α , melhor será o conjunto de fases proposto. Outra figura de mérito importante que verifica a concordância entre a estrutura proposta e a estrutura real é o índice residual R_E definido como:

$$R_E = \frac{\sum_{\mathbf{H}} E_{obs} - \langle E_{calc} \rangle}{\sum_{\mathbf{H}} \langle E_{obs} \rangle} \quad (2.33)$$

onde E_{obs} é o fator de estrutura normalizado observado e $\langle E_{calc} \rangle$ é a média dos fatores de estrutura normalizados calculados. Para que o modelo seja satisfatório R_E deve apresentar um valor próximo de zero [4].

2.2.2 Refinamento de estruturas cristalográficas

Com as fases fixadas, pode ser calculado o mapa de densidade eletrônica utilizando a equação 2.10. Como coeficientes, pode-se utilizar $|F_{obs}|$, $|F_{calc}|$, $|E_H|$, dentre outros, onde F_{obs} é o fator de estrutura observado, F_{calc} é o fator de estrutura calculado e E_H é o fator de estrutura normalizado. Os picos encontrados no mapa que utiliza $|E_H|$ como coeficiente servem para definir coordenadas iniciais para a estrutura, visto que nesse cálculo os átomos são puntiformes e os picos terão uma forma mais bem definida. Um mapa de especial interesse é o que utiliza como coeficientes $|F_{obs} - F_{calc}|$. Esse é o mapa Fourier diferença e tem como finalidade encontrar partes da estrutura que ainda não foram determinadas, identificar erros na estrutura proposta e, uma vez que os átomos não-hidrogenóides tenham sido encontrados, verificar se o mapa gerado não possui picos remanescentes. O cálculo com F_{obs} fornece a densidade eletrônica do cristal com a precisão do experimento [8].

Uma vez que todos os átomos não hidrogenóides tenham sido encontrados o modelo proposto deve ser refinado. O refinamento é realizado com o objetivo de obter parâmetros atômicos mais precisos que os do modelo inicial, tais como posições atômicas e parâmetros de deslocamento térmico. O objetivo é melhorar a concordância entre o modelo proposto e os dados coletados. No final do refinamento, o mapa Fourier diferença não deve conter nenhum pico ou buraco significativos.

Refinamento pelo método dos mínimos quadrados

Os problemas que surgem na cristalografia não são lineares, o que impede a solução direta dos parâmetros. Uma solução é fazer uso da expansão em séries de Taylor, visto que funções como seno e cosseno podem ser expandidas em termos de séries de potências. Nesse método, um conjunto de fatores de estrutura é calculado por meio de Transformada de Fourier a partir do modelo atômico [4]. As intensidades calculadas são então comparadas com as intensidades medidas. O melhor modelo irá minimizar a função:

$$S = \sum w(|F_{obs}^2| - |F_{calc}^2|)^2 \quad (2.34)$$

onde ω é um fator de peso dado por:

$$w = \frac{1}{\sigma^2(F_{obs}^2) + (aP)^2 + bP} \quad (2.35)$$

onde $P = (F_{obs}^2 + 2F_{calc}^2)/3$, a e b são parâmetros de ajuste.

Fatores residuais

A convergência do refinamento é julgada por fatores residuais que devem ser minimizados a cada ciclo. Esses fatores irão mostrar o quanto o modelo concorda com os dados [12].

Os fatores residuais utilizados são:

$$wR2 = \left[\frac{\sum w(|F_{obs}^2| - |F_{calc}^2|)^2}{\sum w|F_{obs}^2|} \right]^{1/2} \quad (2.36)$$

$$R = \frac{\sum ||\mathbf{F}_{obs}| - |\mathbf{F}_{calc}||}{\sum |\mathbf{F}_{obs}|} \quad (2.37)$$

e por fim,

$$Goof = \left[\frac{\sum w(F_{obs}^2 - F_{calc}^2)^2}{n - p} \right]^{1/2} \quad (2.38)$$

onde n é o número de reflexões únicas por simetria e p , o número de parâmetros refinados. O fator residual *Goof*, *goodness of fit*, indica a qualidade do ajuste e depende tanto da diferença entre valores observados experimentalmente e calculados quanto dos números de parâmetros e dados observados e seu valor final deverá ser próximo de 1. Para um bom conjunto de dados, os fatores residuais $wR2$ e R devem ser menores que 0,15 e 0,05 respectivamente [12].

2.3 Tópicos de Cristalografia de difração de raios X por monocristais em altas pressões

A criação da *Diamond Anvil Cell (DAC)*, figura 2.8, em 1958, foi decisiva para o desenvolvimento das pesquisas em altas pressões. Essa câmara foi desenvolvida no *National Bureau of Standards* [22] e foi utilizada inicialmente para estudos microscópicos e de infravermelho. Os primeiros

estudos cristalográficos em altas pressões foram feitos em 1960 sendo que, inicialmente, foram estudados materiais policristalinos dada a dificuldade em encapsular cristais e líquidos na *DAC*.

Com o desenvolvimento da junta metálica [13] e, em 1973, com a invenção da versão em miniatura da *DAC*, do tipo Merrill-Bassett [14], vários avanços foram feitos em cristalografia de raios X de monocristais. A junta metálica foi projetada para ser colocada entre os dois diamantes e serve como um porta-amostras evitando a extrusão dos cristais. Um outro desenvolvimento que merece destaque é o uso do líquido transmissor de pressão. Esse líquido é colocado, simultaneamente com a amostra de interesse, no orifício da junta metálica, tendo a função de manter a hidrostaticidade do meio. Como a pressão hidrostática é um parâmetro termodinâmico, os resultados obtidos sob tais condições para um dado material podem ser comparados com valores teóricos. O problema é que, após um certo valor de pressão, os fluidos se vitrificam produzindo uma situação na qual a pressão deixa de ser homogênea, o que pode levar à anomalias nos resultados obtidos que podem ser atribuídos, erroneamente, à novos fenômenos físicos. Por essa razão é essencial conhecer o limite de hidrostaticidade do meio transmissor de pressão a ser utilizado no experimento. A mistura de metanol-etanol-água na proporção de 16:4:1 é bastante utilizada como meio transmissor de pressão e vários estudos mostraram que a quasi-hidrostaticidade é mantida até 14,4 GPa. Outro meio transmissor utilizado em condições moderadas de pressão é a mistura metanol-etanol (4:1) (10,5 GPa) [15].

As interações intermoleculares entre os constituintes de um sólido cristalino determinam o arranjo tridimensional da rede. Esse arranjo, por sua vez, determinará diversas propriedades desse sólido. Uma vez que a estrutura tridimensional varie, as propriedades físicas e químicas serão alteradas. Uma forma de modificar o modo como as moléculas interagem entre si é por meio da aplicação de pressão e, utilizando as informações do arranjo tridimensional na nova condição termodinâmica, é possível obter novas propriedades. Para sólidos de interesse farmacêutico, a pressão representa um ponto fundamental em diversas etapas da produção do medicamento. Por essa razão é fundamental descrever o comportamento da molécula em questão, pelo menos no intervalo de pressão e temperatura a ser utilizado no processo industrial. As pressões geradas no processo de

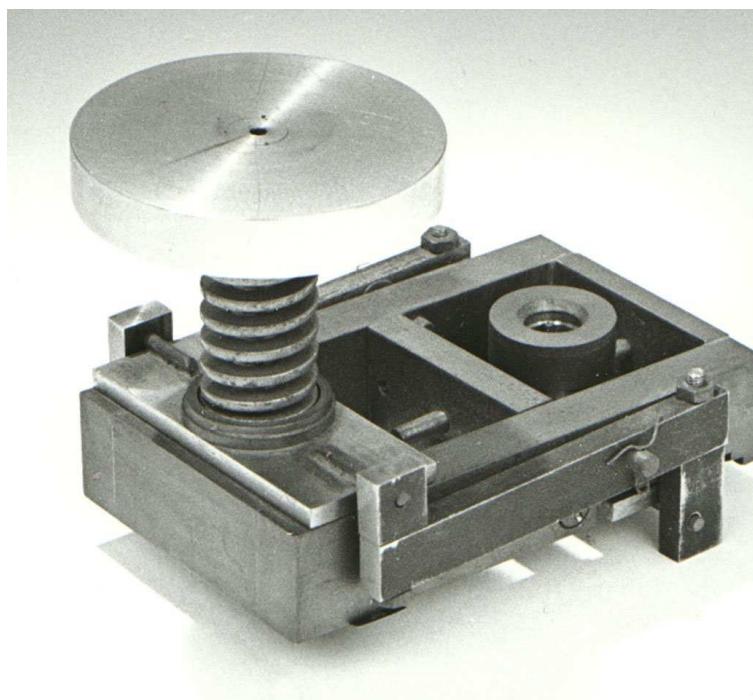


Figura 2.8: Primeira câmara de bigornas de diamante

Fonte: National Bureau of Standards

produção de comprimidos estão no intervalo de 40 à 200 MPa mas são aplicadas durante um período de tempo muito curto, geralmente menor que 1 segundo [16].

Para a indústria farmacêutica, identificar os vários polimorfos de cada fármaco é essencial pois a solubilidade pode variar bastante entre cada uma das formas e a biodisponibilidade é dependente da dissolução da cápsula no alvo desejado. Se um cristal possui vários polimorfos, é necessário um esforço para identificar e testar o maior número possível destes a fim de garantir a atividade terapêutica e reduzir potenciais riscos. Durante muito tempo, a variação das condições de cristalização foi a única maneira de se obter polimorfos mas, com a DAC, mais uma variável termodinâmica se tornou acessível, possibilitando obter polimorfos por meio da variação, também, da pressão. Vale frisar que não é possível garantir que foram encontrados todos os polimorfos de uma dada substância, independente da quantidade de condições físicas e químicas as quais tal substância foi submetida [17]. Dependendo de quão rapidamente ocorre a compressão ou descompressão ou, ainda, de quanto tempo a amostra permanece em uma dada pressão diferentes polimorfos podem ser obtidos para um

mesmo composto [18].

Sob aplicação de pressão, é possível ocorrer duas situações: reconstrução estrutural da rede cristalina, levando a uma nova fase, ou uma distorção contínua dentro dos limites de estabilidade da mesma fase. Pelo princípio de Le Châtelier é possível compreender o que ocorre no sistema quando uma pressão é aplicada: a mudança no equilíbrio ocorre em favor do estado que ocupe menor volume. A primeira resposta estrutural à pressão aplicada é a redução dos espaços vazios entre as moléculas. Em seguida, ocorre o encurtamento das interações intermoleculares, como por exemplo ligações de hidrogênio, van der Waals, C-H... π , assim como mudanças na conformação molecular, caso haja flexibilidade conformacional [19]. O empacotamento se torna mais denso e, em pressões muito elevadas, ocorre a desestabilização de ligações intramoleculares. Além disso, a compressão é altamente anisotrópica pois depende do empacotamento cristalino. O benzeno, por exemplo, se torna polimérico a uma pressão entre 24 a 30 GPa [20].

2.3.1 Calibração da pressão utilizando fluorescência de rubi

Até 1971, a *DAC* não havia sido totalmente aceita por muitos cientistas devido à falta de um método confiável, rápido e eficiente para a medida da pressão no interior da câmara. Essa dificuldade foi devida, principalmente, ao tamanho reduzido da câmara, o que dificultava a medida direta da pressão. Até então, utilizava-se a razão entre força aplicada e área para se inferir a pressão na amostra. Mas tal medida era muito imprecisa dada a dificuldade em prever como os componentes da *DAC* se deformariam para uma dada força aplicada. Outra técnica utilizada era a análise da equação de estado de um dado material (*NaCl*, *CsCl*, *SiO₂*, etc.), obtida a partir do seu difratograma de policristais ou, ainda, a mudança nos parâmetros de rede desses compostos quando submetidos à pressão. Essa última técnica era um pouco mais precisa que a primeira, porém consumia muito tempo, o que tirava a confiabilidade da medida já que muitos fatores poderiam alterar as condições nas quais se assumia que a medida estava sendo realizada [21]. Logo, a utilização da *DAC* ficou restrita aos laboratórios de geologia, pois o principal interesse era reproduzir altíssimas pressões a fim de simular o ambiente no interior da Terra ou de algumas estrelas, e não obter um valor preciso

para a pressão.

A solução para este problema veio quando um grupo de cientistas do *National Bureau of Standards*, em 1971, considerou realizar as medidas de fluorescência para verificar a dependência da pressão para vários materiais, tais como $Al_2O_3 : Cr^{3+}$ (Rubi) e $YAlO_3$. Todos esse materiais mostraram que a fluorescência tinha dependência com a pressão, porém o rubi se mostrou como o mais promissor devido ao fato de suas linhas principais de fluorescência serem intensas e bem definidas além de a dependência ter se mostrado linear até cerca de 20 GPa, figura 2.9. À pressão e temperatura ambiente, a linha R_1 do dubleto de fluorescência do rubi apresenta um comprimento de onda de cerca de 694,2 nm. Piermarini *et al.* (1975) compararam o espectro de difração do NaCl e o deslocamento da posição do pico de fluorescência R_1 do rubi em função da pressão e estabeleceram uma escala de pressão baseada no espectro de fluorescência do rubi, dada pela equação:

$$P (Gpa) = 0.274 (\lambda - \lambda_0) \quad (2.39)$$

onde λ é o comprimento de onda da linha R_1 do espectro de fluorescência do rubi à pressão P e λ_0 o valor equivalente à pressão ambiente [23].

Logo, a equação 2.39 fornece uma relação quantitativa entre a pressão aplicada e a variação no comprimento de onda da emissão da linha R .

Além de possibilitar a medida da pressão no interior da *DAC*, a fluorescência de rubi fornece também informações a respeito da hidrostática do meio, pois a largura dos picos do dubleto aumenta quando o rubi é submetido à condições de não hidrostática. Esse estudo de Piermarini *et al.* (1975) mostrou que uma quantidade muito pequena de rubi no interior da câmara, cerca de 1 por cento do conteúdo, já seria suficiente para realizar a medida da pressão. A partir de então, a técnica de fluorescência utilizando cristais de rubi começou a ser largamente utilizada em diversos tipos de experimentos em altas pressões.

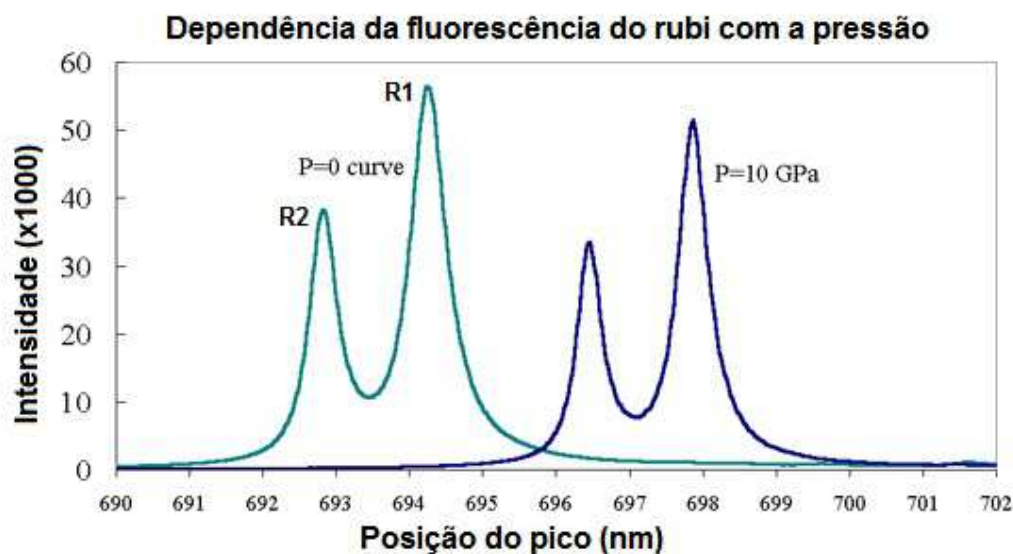


Figura 2.9: Evolução do duplete de fluorescência do rubi com a pressão

2.3.2 Análise dos efeitos de pressões hidrostáticas em monocristais utilizando tensores de Strain

De maneira geral, a rede cristalina apresenta um comportamento anisotrópico quando submetida à altas pressões. A análise desse comportamento nos fornece informações a respeito de mudanças estruturais do arranjo supramolecular. A partir da observação da variação dos parâmetros de rede com o aumento da pressão e do empacotamento em pressão ambiente é possível inferir possíveis rearranjos supramoleculares.

Uma maneira de realizar essa análise é por meio de tensores de *strain*, que são tensores de segunda ordem, que descrevem as mudanças relativas nas posições de pontos em um corpo sob deformação. Realizar essa análise significa determinar a orientação e a magnitude do *strain*, além de identificar algum possível padrão na sua variação caracterizando, assim, as mudanças no volume e na forma do corpo em questão. Sob pressão hidrostática, um certo elemento de volume esférico de raio unitário no cristal se deformará em um elipsóide, chamado de elipsóide de *strain*. Os valores dos eixos principais desse elipsóide e suas orientações com relação aos eixos cristalográficos fornecerão

2.3.2 Análise dos efeitos de pressões hidrostáticas em monocristais utilizando tensores de Strain

informações sobre possíveis modificações nas interações intermoleculares [24].

As componentes do tensor de *strain* são relacionadas ao vetor deslocamento u_i que conecta a posição de um ponto x_j antes da deformação à sua posição após a deformação, ou seja, as componentes do tensor de strain e_{ij} são definidas como:

$$e_{ij} = \frac{\partial u_i}{\partial x_j}, \quad (2.40)$$

onde $u_i = u_x, u_y, u_z$ e $x_j = x, y, z$.

Na forma matricial, o tensor de *strain* é escrito como:

$$e = \begin{bmatrix} e_{11} & e_{12} & e_{13} \\ e_{21} & e_{22} & e_{23} \\ e_{31} & e_{32} & e_{33} \end{bmatrix}$$

O tensor de *strain* é simétrico, ou seja:

$$e_{ij} = e_{ji} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) \quad (2.41)$$

Os elementos da diagonal principal descrevem distorções infinitesimais relacionadas à mudanças no volume, seja compressão ou expansão, enquanto que os elementos fora da diagonal principal, chamados de *shear strain*, descrevem distorções devidas à mudanças nos ângulos entre os vetores da base.

Capítulo 3

Objetivos

Este trabalho visa desenvolver as ferramentas básicas para a difração de raios X em altas pressões utilizando a *DAC*, incluindo todo o aparato de preparação da câmara de alta pressão e adaptação do difratômetro APEX II DUO da Bruker para esse tipo de coleta de dados, além de compreender as etapas de tratamento dos dados e análise da estrutura cristalográfica de fármacos e precursores de fármacos submetidos à condições extremas de pressão. Objetiva-se verificar a ocorrência de transições de fase cristalina para esses compostos realizando-se medidas em diversas pressões, estabelecendo as condições nas quais as transições ocorrem. Essa informação é valiosa para a indústria farmacêutica pois, durante a moagem ou durante o preparo de comprimidos, por exemplo, podem ocorrer aumentos localizados de pressão induzindo transições de fase, gerando um composto indesejado.

Paralelamente às medidas em altas pressões, objetiva-se também realizar a análise cristalográfica de compostos inéditos, candidatos à fármacos, em condições ambientes de pressão e temperatura.

Capítulo 4

Metodologia

A determinação de estruturas moleculares por meio de difração de raios X por monocristais é uma etapa importante no desenvolvimento de novos materiais das mais diversas categorias, especialmente fármacos. É nessa etapa que a estrutura tridimensional é determinada de maneira inequívoca. Sob a ótica da importância dessa técnica, faz-se necessário frisar a necessidade de fazer uma escolha sensata de amostras a serem utilizadas no experimento, se atentando para a qualidade dos monocristais a fim de obter o máximo de qualidade possível nos dados obtidos. Amostras ruins e estratégias de coleta mal estabelecidas fornecerão, obviamente, dados de qualidade baixa. Nesse caso, mesmo o melhor *software* de processamento não será capaz de integrar esses dados adequadamente.

Esta seção tratará de tópicos relacionados ao processo de cristalização e seleção de amostras para o experimento de difração de raios X por monocristais, à coleta e processamento de dados obtidos, bem como as etapas de preparação para coletas em altas pressões.

4.1 Crescimento de cristais

A qualidade dos monocristais é a parte crucial no sucesso do experimento de difração de raios X. Um cuidado especial deve ser tomado nessa etapa de modo a garantir a obtenção de monocristais adequados.

Cristais que crescem muito rapidamente tem grandes chances de apresentarem defeitos na rede. Assim, para o método escolhido de cristalização, deve-se levar em conta esse detalhe promovendo um processo mais lento de cristalização.

A técnica de cristalização mais comum é a técnica de evaporação lenta do solvente. Para sua execução prepara-se uma solução muito próxima da supersaturação de tal forma que, uma vez iniciada a evaporação, esse estado saturado será alcançado e a cristalização terá condições de iniciar. É importante garantir que não restaram partículas em suspensão na solução pois as moléculas podem se ligar a esses fragmentos formando um material amorfo.

Durante a preparação das amostras para a coleta de dados é necessário avaliar se a integridade da amostra é mantida após a mesma ser retirada da solução. Muitas amostras são sensíveis ao ar e se degradam rapidamente quando estão fora da solução. Em outras situações, moléculas do solvente utilizado na cristalização fazem parte da rede cristalina. Em temperatura ambiente e fora da solução, essas moléculas evaporarão, especialmente se o solvente utilizado for muito volátil (como por exemplo hexano e clorofórmio), deixando vacâncias na rede fazendo com que o cristal se torne inadequado para o experimento. Nesses casos o monocristal colapsará perdendo sua monocristalinidade se tornando policristal ou até mesmo um material amorfo [25].

Nesses casos, deve-se colocá-las imediatamente em óleo mineral, de modo a criar um filme protetor, ou ainda submetê-las à baixa temperatura imediatamente, reduzindo ao máximo o tempo de contato com o ar ou com a temperatura ambiente.

Os monocristais utilizados neste trabalho foram obtidos pela técnica de evaporação lenta do solvente. Os solventes utilizados nos diversos ensaios realizados foram: metanol, etanol, isopropanol, diclorometano, DMSO e clorofórmio.

Na figura 4.1 tem-se a representação esquemática do processo de evaporação lenta e na figura 4.2 uma foto de algumas cristalizações feitas no laboratório.

4.2 Coleta e processamento de dados

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada no Laboratório de Cristalografia da Universidade Federal de Goiás utilizando o difratômetro APEX II DUO da Bruker, que é um difratômetro de quatro círculos de geometria KAPPA, cujo esquema está ilustrada na figura 4.3. A radiação difratada é coletada em um detector CCD.

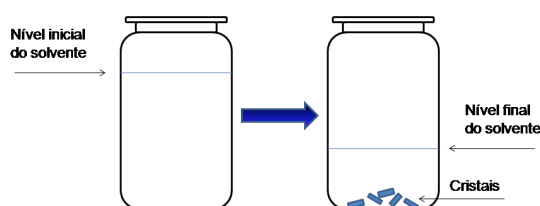


Figura 4.1: Representação esquemática do método de evaporação lenta

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 4.2: Aparatos para execução do método de evaporação lenta

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados foram coletados à temperatura ambiente (293 K) utilizando radiação de molibdênio ($\text{Mo-K}\alpha = 0.71073 \text{ \AA}$), o processo de integração de dados foi realizado com o pacote de programas SAINT da Bruker [26], as correções por absorção foram feitas com o SADABS [27] e as estruturas dos compostos em pressão ambiente foram resolvidas e refinadas usando o pacote de programas WINGX [28].

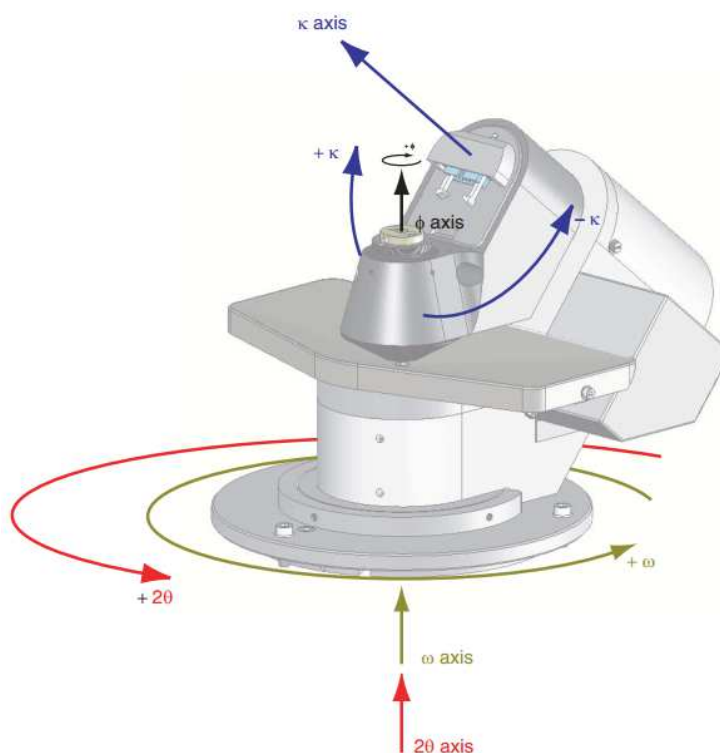


Figura 4.3: Geometria KAPPA do goniômetro do difratômetro APEX II DUO

Fonte: Manual KAPPA Series II Goniometer - Bruker.

4.3 Apresentação da câmara de bigornas de diamante (*DAC*)

A ferramenta comumente utilizada para estudar propriedades de sólidos e líquidos em altas pressões é a câmara de bigornas de diamante (*DAC*). Neste projeto utilizamos uma *DAC* do tipo Merrill-Basset, figura 4.4. Neste equipamento, a amostra é colocada entre as duas extremidades lapidadas do diamante e submetida à alta pressão quando esses dois diamantes são colocados juntos.

A *DAC* é um dispositivo simples, pequeno e capaz de gerar as mais altas pressões hidrostáticas (~ 100 GPa) alcançadas em laboratório [29]. A *DAC* consiste de dois diamantes com peso de 1/8 a 1/3 carats (1 carat = 0,2 g), com suas extremidades polidas paralelas e posicionadas opostas entre si. Originalmente, os diamantes eram montados em discos de berílio, visto que esse material é praticamente transparente aos raios X ($\mu_{Be} = 0,0048\text{mm}^{-1}$), mas os feixes que passam pelos discos de berílio aumentam o ruído no padrão de difração, produzindo anéis de difração característicos

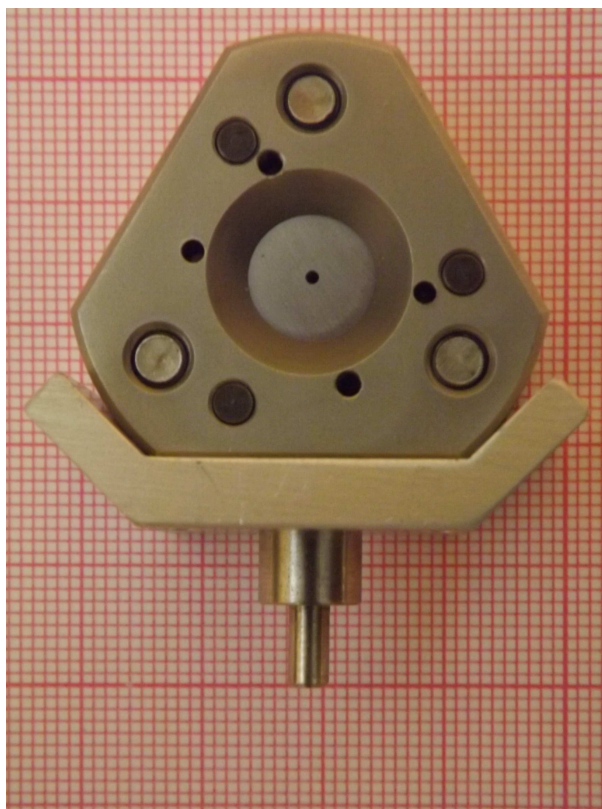


Figura 4.4: Câmara de bigornas de diamante do tipo Merrill-Bassett utilizada neste trabalho

Fonte: Elaborada pela autora.

de policristais, além de o berílio ser um material altamente tóxico. Atualmente, os diamantes são montados em discos de tungstênio ou de aço. Porém esses materiais são opacos aos raios X. Logo, ao invés de contaminar o padrão de difração, como ocorria no caso dos discos de berílio, eles bloqueiam grande parte do espaço recíproco. Uma alternativa foi produzir a câmara com um ângulo de abertura maior.

O diamante é utilizado para a construção da DAC devido à sua dureza, resistência à abrasão, baixo coeficiente de absorção linear para raios X ($\mu_{\text{diamante}} = 0,202\text{mm}^{-1}$) e boa transparência para o ultravioleta, infravermelho e luz visível, permitindo a visualização da amostra, o que facilita o processo de centragem no momento de aquisição de dados, além de permitir a realização de diversas medidas espectroscópicas. As faces planas dos diamantes tem um diâmetro de cerca de 0,6 mm. Esse diâmetro pode ser feito menor caso haja a necessidade de se aumentar ainda mais a pressão.

O princípio básico de funcionamento da *DAC* é simples e está representado na figura 4.5. Uma grande força é aplicada em uma pequena área, o que gera a alta pressão. Por essa razão, é necessária uma quantidade muito pequena de amostra, da ordem de microgramas, para se realizar a medida. Essa força é fornecida por meio de três pequenos parafusos que unem os dois discos metálicos, permitindo também o alinhamento dos diamantes.

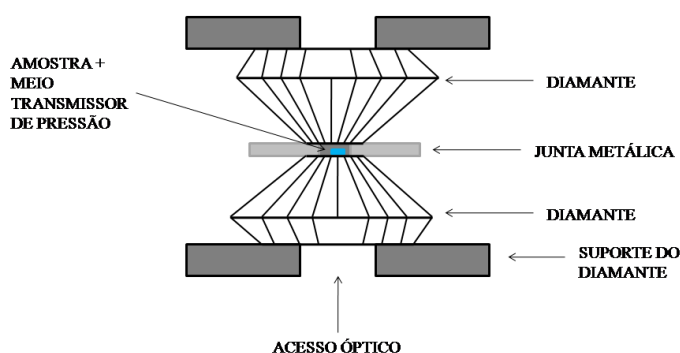


Figura 4.5: Representação esquemática da câmara de bigornas de diamante

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.1 Produção da junta metálica

A junta metálica foi utilizada pela primeira vez na *DAC* por Van Valkenburg (1962) [13]. A junta metálica, usualmente feita de aço inoxidável, é posicionada entre os dois diamantes formando uma cavidade cilíndrica na qual a amostra é colocada juntamente com o líquido transmissor de pressão. Além de servir de contenção para a amostra, a junta também fornece sustentação lateral para os diamantes, evitando tensões que poderiam levar à ruptura dos mesmos. É possível produzir orifícios que variam de 20 μm à 500 μm . Geralmente, o orifício tem cerca de metade do diâmetro da face plana do diamante. O eletrodo submetido à alta voltagem é posicionado sobre a junta metálica que fica imersa em um líquido dielétrico.

Inicialmente se prepara a junta a partir de uma lâmina metálica quadrada de aço inoxidável de cerca de 1 cm de aresta, fazendo a indentação entre os dois diamantes. Então, um orifício de diâmetro conveniente para a medida ($\sim 400\mu\text{m}$) é feito no centro da indentação. O orifício é feito por meio de eletroerosão utilizando a máquina de eletroerosão Betsa MH20 *Spark Eroder Machine* (figura 4.6) [30]. Esse equipamento permite que sejam feitos orifícios com alta precisão e de vários diâmetros dependendo do tamanho do eletrodo de tungstênio utilizado.

O eletrodo deve ter a ponta plana para uma boa perfuração. Durante a perfuração, o eletrodo é mantido fixo e a mesa na qual a junta metálica está apoiada se move verticalmente e lentamente por um processo controlado manualmente na direção do eletrodo. São produzidas várias pequenas faíscas entre o eletrodo e a junta. Cada faísca é uma pequena explosão que retira uma certa quantidade de material, tanto da junta quanto do eletrodo. O controle manual do movimento da mesa é feito de duas maneiras:

- Por observação com o microscópio de observação: a perfuração está finalizada quando não há mais faíscas quando se move a mesa para cima.

- Por observação dos leds vermelho e verde no painel frontal da máquina. A perfuração está ativa quando ambos os leds estão acesos. Quando somente o led verde estiver aceso, é necessário mover a mesa para cima até que o led vermelho se acenda. Quando somente o led vermelho estiver aceso, faz-se o movimento da mesa para baixo (a junta metálica está tocando o eletrodo) A perfuração está finalizada quando somente o led verde fica aceso ao mover a mesa para cima, indicando que não há corrente no eletrodo.

Durante o processo de perfuração o eletrodo também é erodido. Então é sempre necessário mover a mesa um pouco além da espessura da junta metálica para se ter certeza de que o furo foi finalizado. Ao final do processo, a ponta do eletrodo não estará mais plana. Quando isso ocorrer é possível planificá-la novamente com uma lixa para metal. O processo deve ser feito com bastante cuidado para não quebrar o eletrodo.

No manual do equipamento foi sugerido utilizar óleo mineral como líquido dielétrico, mas os seguintes problemas surgiram: o tempo de perfuração foi muito longo, a remoção de partículas

de metal já erodidas do furo não estava ocorrendo, o que atrapalhava o processo de perfuração e, ao final do processo, o óleo deixava uma quantidade muito grande de resíduos no tanque onde a junta metálica era posicionada, figura 4.7, dificultando a limpeza do mesmo. Foi sugerido também no manual utilizar querosene, todavia o vapor gerado durante o processo era bastante incômodo, mesmo utilizando equipamentos de proteção, e pequenas chamas se formavam nas proximidades do eletrodo. Assim, após consultas bibliográficas, foi decidido utilizar propanol como líquido dielétrico [31]. Todos os problemas anteriormente citados foram resolvidos.



Figura 4.6: Máquina de eletroerosão Betsa MH20 utilizada na fabricação da junta metálica

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Construção de eletrodos de tungstênio para máquina de eletroerosão

Os eletrodos foram feitos utilizando os seguintes materiais:

- Máquina de frisar (*crimping tool*) fornecida pela Betsa, figura 4.8.
- Capilar de aço inoxidável rígido de 50 mm de comprimento (1.6 mm O.D. , 0.5 mm I.D.) cujo

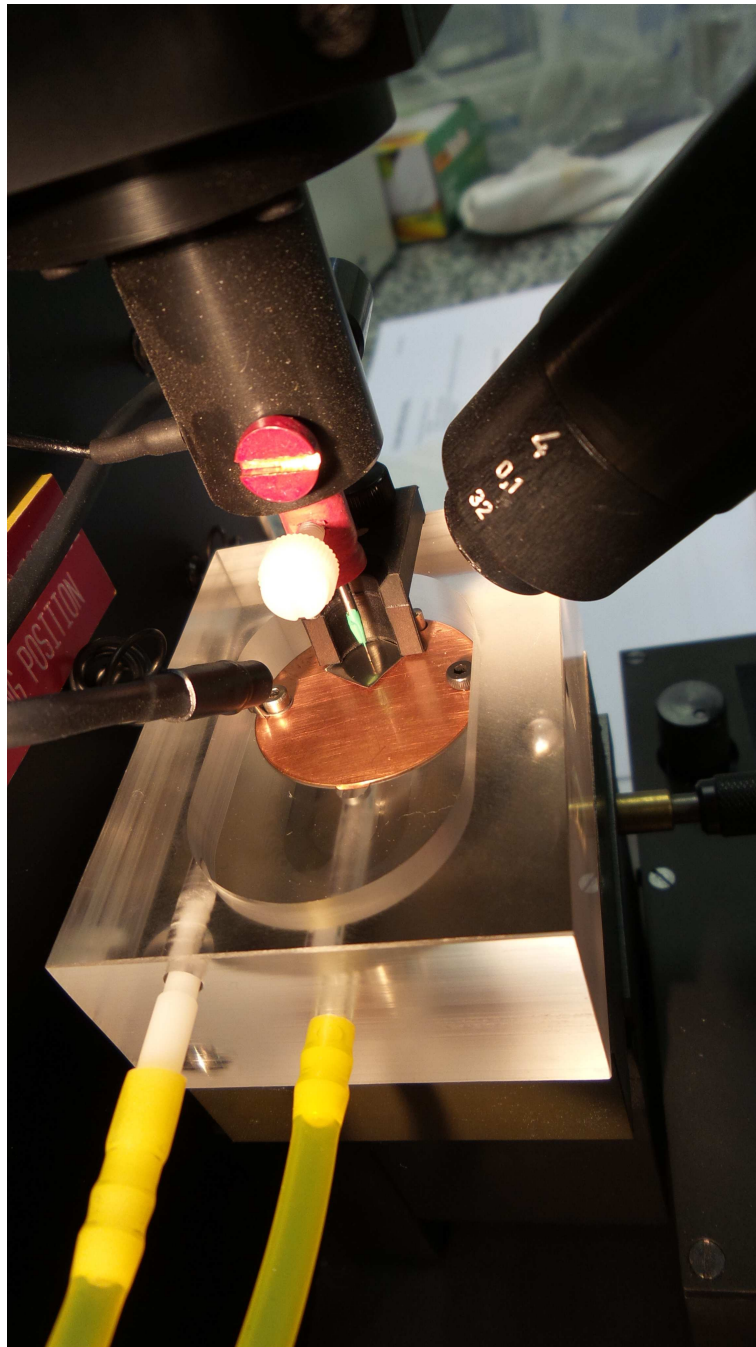


Figura 4.7: Tanque no qual é posicionada a junta metálica - Máquina de eletroerosão Betsa MH20

Fonte: Elaborada pela autora.

esquema e foto estão mostrados na figura 4.9.

- Fio de tungstênio (comprimento: 10 mm, diâmetro: $400\mu\text{m}$).
- Limatão triangular.

- Lixa para metal (BlueMetal - BOSCH - P320).



Figura 4.8: Crimping tool - Equipamento para fixação do fio de tungstênio ao capilar

Fonte: Elaborada pela autora.

Cortou-se 10 mm do fio de tungstênio utilizando um limatão triangular a fim de evitar a clivagem, que ocorreu quando foi utilizado um alicate para o corte. Após o corte, a ponta do fio foi lixada, utilizando uma lixa para metal, até que ficasse plana.

Reaproveitou-se o capilar do eletrodo fornecido com a máquina de eletroerosão cortando-se a ponta gasta no torno mecânico da UFG. Ao realizar o corte, o orifício interno do capilar fechou por conta do aquecimento gerado durante o processo. Assim, foi necessário refazer o orifício com uma broca de diâmetro 0,5 mm. Nesse novo capilar foi colocado um fio de tungstênio. Introduz-se cerca de 4 mm do fio de tungstênio no capilar de modo que a ponta meça ≈ 5 mm. Esse conjunto é inserido na *crimping tool* e a manivela é girada no sentido horário fixando o fio de tungstênio ao capilar, conforme visto na figura 4.10. Em seguida, o eletrodo estará pronto para ser utilizado, figura 4.11.

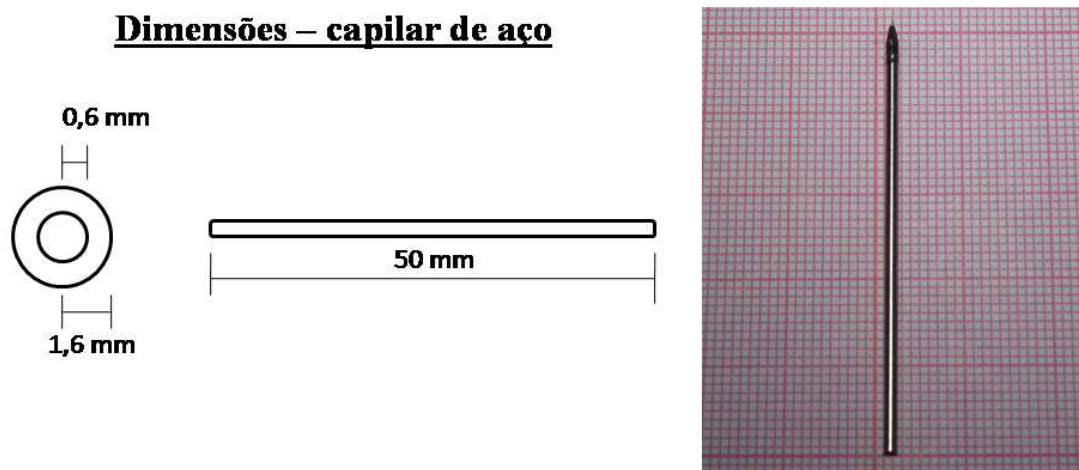


Figura 4.9: Representação esquemática e foto do capilar de aço

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 4.10: Preparação de eletrodo para eletroerosão

Fonte: Elaborada pela autora.

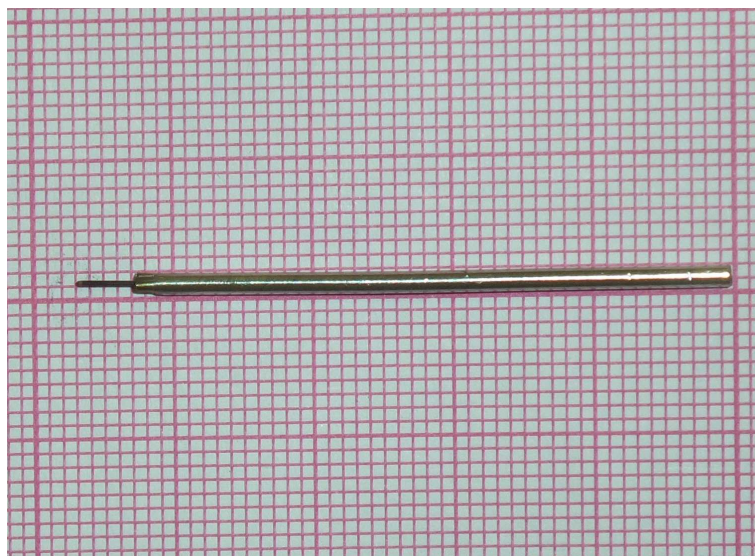


Figura 4.11: Eletrodo pronto para ser utilizado

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Preparação da câmara de bigornas de diamante (*DAC*) para coleta de dados

A junta metálica é posicionada horizontalmente em uma das faces do diamante. Em seguida, coloca-se a amostra e o líquido transmissor de pressão, que nesse trabalho foi uma mistura de metanol-etanol (4:1), na junta. A escolha do fluido depende do intervalo de pressão planejado e da solubilidade da amostra. Ao colocar o líquido, a *DAC* é fechada rapidamente para evitar a evaporação do mesmo.

4.5 Coleta de dados de difração de raios X de monocristais sob altas pressões

Embora o diamante seja transparente aos raios X, os outros componentes da *DAC*, como a junta e o metal que compõe a câmara, não são. Dessa forma, é inevitável que o padrão de difração seja contaminado por informações advindas desses materiais. Dependendo da orientação da *DAC* com relação ao feixe incidente, serão observados anéis de difração típicos de materiais policristalinos que são devidos à junta, além de regiões sombreadas pelo corpo metálico da câmara. Frequentemente, os

dados devem ser corrigidos por absorção pois as intensidades das reflexões são reduzidas devido ao sombreamento da amostra pela junta. Em um experimento à pressão ambiente, o cristal é montado de forma que todo o espaço recíproco está acessível, o que é bastante diferente para um experimento em altas pressões. O acesso limitado ao espaço recíproco em experimentos utilizando a *DAC* afetará diretamente a resolução e a completeza dos dados. Esses fatores devem ser levados em consideração em todas as etapas do experimento, ou seja, desde a coleta de dados até um possível refinamento da estrutura.

Os dados de difração de raios X em altas pressões foram obtidos utilizando o difratômetro APEX II DUO da Bruker (figuras 4.12 e 4.13) instalado no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da UFG. Para a realização do experimento utilizando a *DAC*, algumas modificações devem ser feitas no difratômetro. Deve-se usar um colimador menor de 77,60 mm e retirar o *beamstop*, a fim de permitir a rotação da *DAC*. O detector foi mantido a uma distância de 70 mm, para evitar colisão com a *DAC*, e em $2\theta = 25^\circ$ para que o feixe direto não o atingisse, já que o beam stop foi retirado. A *DAC* é posicionada com seu eixo paralelo ao feixe de raios X, quando todos os ângulos do goniômetro são iguais a zero e, em seguida, é iluminada por trás para realizar o ajuste da altura e do foco através da câmera de observação.

Para uma certa orientação da *DAC*, a região acessível do espaço recíproco está relacionada com distância até o detector e com o ângulo de abertura da *DAC* pois, após uma determinada posição, o suporte metálico da *DAC* começa a sombrear o detector. As estratégias de coleta são feitas de modo a cobrir o maior número de reflexões possível. Combina-se varreduras em ω para uma orientação fixa da *DAC* em ϕ para uma dada posição do detector em 2θ . É possível aumentar o número de reflexões realizando-se, também, a coleta de dados com diferentes orientações com relação a χ . Dessa forma, por meio de combinações de vários tipos de varreduras é possível alcançar uma quantidade considerável de todas as reflexões que poderiam ser coletadas sem a *DAC*. A radiação de cobre deve ser evitada para esse tipo de coleta de dados pois, apesar de ser mais intensa que a radiação de molibdênio, a absorção pelos diamantes será muito mais acentuada. Como precaução, deve ser feito o teste final de colisão para todas as corridas antes de iniciar a coleta.

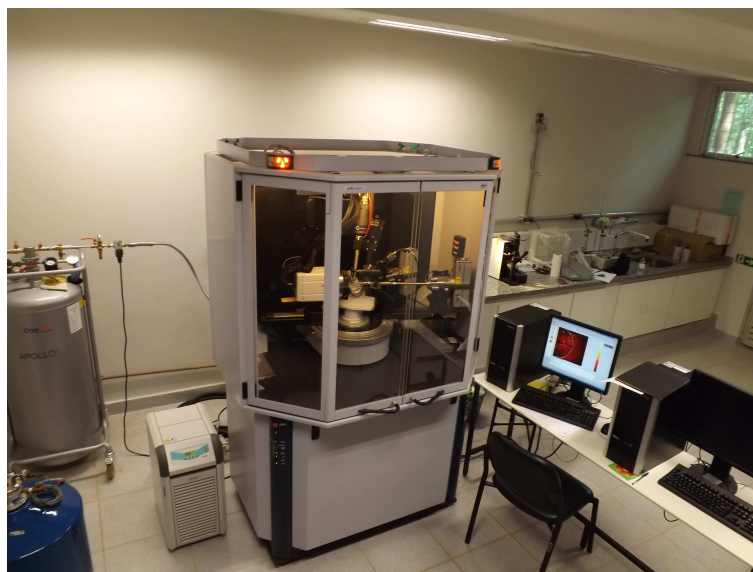


Figura 4.12: Difratorômetro APEX II DUO

Fonte: Elaborada pela autora.

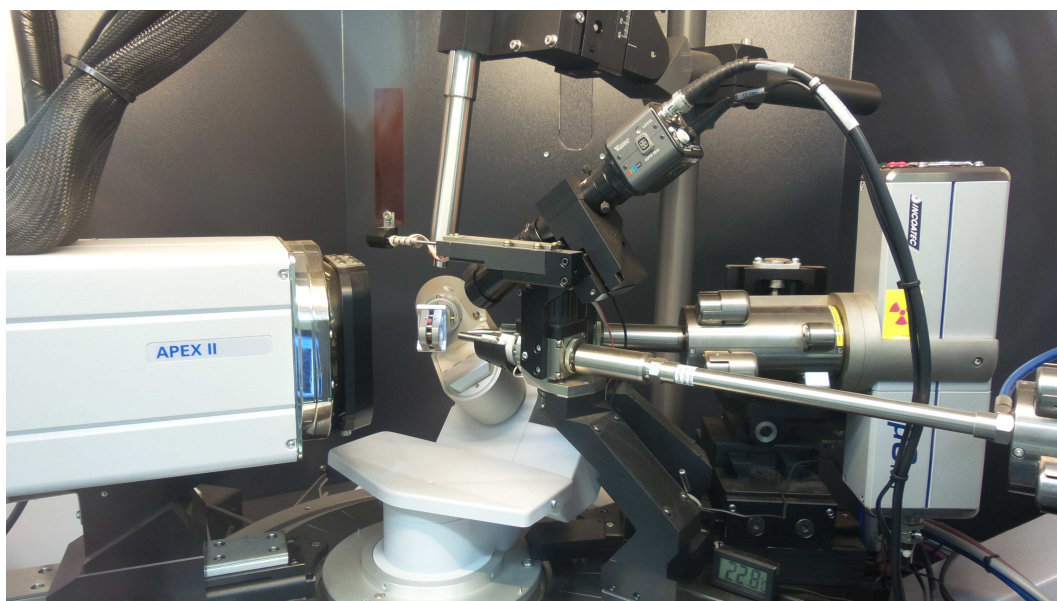


Figura 4.13: Câmara de bigornas de diamante do tipo Merrill-Bassett montada no goniômetro de 4 círculos no difratômetro APEX II DUO

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nas informações citadas no parágrafo anterior, foram feitas diversas tentativas até encontrar a estratégia de coleta adequada. Primeiramente foram realizadas varreduras em ω para

diversos valores de χ , obtendo-se os limites para os quais é possível observar a difração. Em ω , estabeleceu que o limite seria de $4,0^\circ$ à $-3,5^\circ$ enquanto que χ variou desde 90° até -40° em passos de 5° . Para cada valor de χ , foi feita uma varredura em ω . Essa estratégia de coleta foi utilizada de maneira bem sucedida em todas as coletas realizadas.

4.6 Processamento dos dados e determinação da estrutura

A determinação da célula unitária é feita somente após o término da coleta. Nessa etapa é necessário identificar quais reflexões são provenientes da amostra e quais são provenientes do diamante. Um padrão de difração típico para este caso é mostrado na figura 4.14. As regiões muito sombreadas pela junta metálica e pela *DAC* foram evitadas no planejamento da estratégia de coleta. Na busca por reflexões referentes à amostra exclui-se as regiões com reflexões de alta resolução pois nessas regiões estarão concentradas a maioria das reflexões provenientes do diamante, além de utilizar também critério de intensidade.

Outra estratégia é a visualização do espaço recíproco diretamente utilizando programas disponíveis no pacote de programas do próprio difratômetro. O programa utilizado nesse projeto é *reciprocal lattice viewer* (figura 4.15) que, por inspeção visual, permite separar as reflexões em grupos, identificando as reflexões provenientes da amostra e as que são provenientes de outras fontes e indexá-las a fim de definir a célula unitária. Essa visualização permite analisar a qualidade dos dados, verificar a existência de geminação e atribuir as reflexões à diferentes grupos de modo a indexá-las separadamente.

Após a integração, os dados devem ser corrigidos levando em consideração os efeitos de absorção pela *DAC*. Deve-se considerar também a redução das intensidades das reflexões devido ao sombreamento do monocristal pela junta. Esse efeito de sombreamento é mais pronunciado quando a amostra preenche totalmente o orifício da junta. Na prática, os efeitos do sombreamento podem ser reduzidos ajustando o tamanho da amostra.

Uma vez que os dados tenham sido convenientemente processados e corrigidos, é feita a determinação da estrutura. Os principais problemas nessa etapa são relacionados à baixa completeza, baixa re-

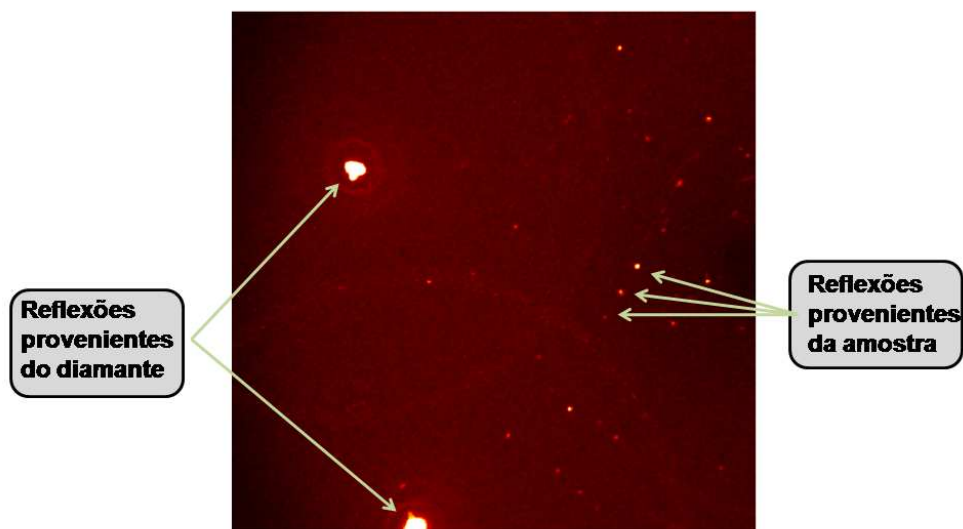


Figura 4.14: Padrão de difração típico de um experimento realizado em altas pressões

Fonte: Elaborada pela autora.

dundância, dificuldade em se alcançar regiões de alta resolução, além de a orientação da amostra alguma vez impedir o acesso à certas famílias de reflexões. Esse último fator faz com que algumas extinções sistemáticas não estejam presentes, dificultando a determinação direta do grupo de espaço.

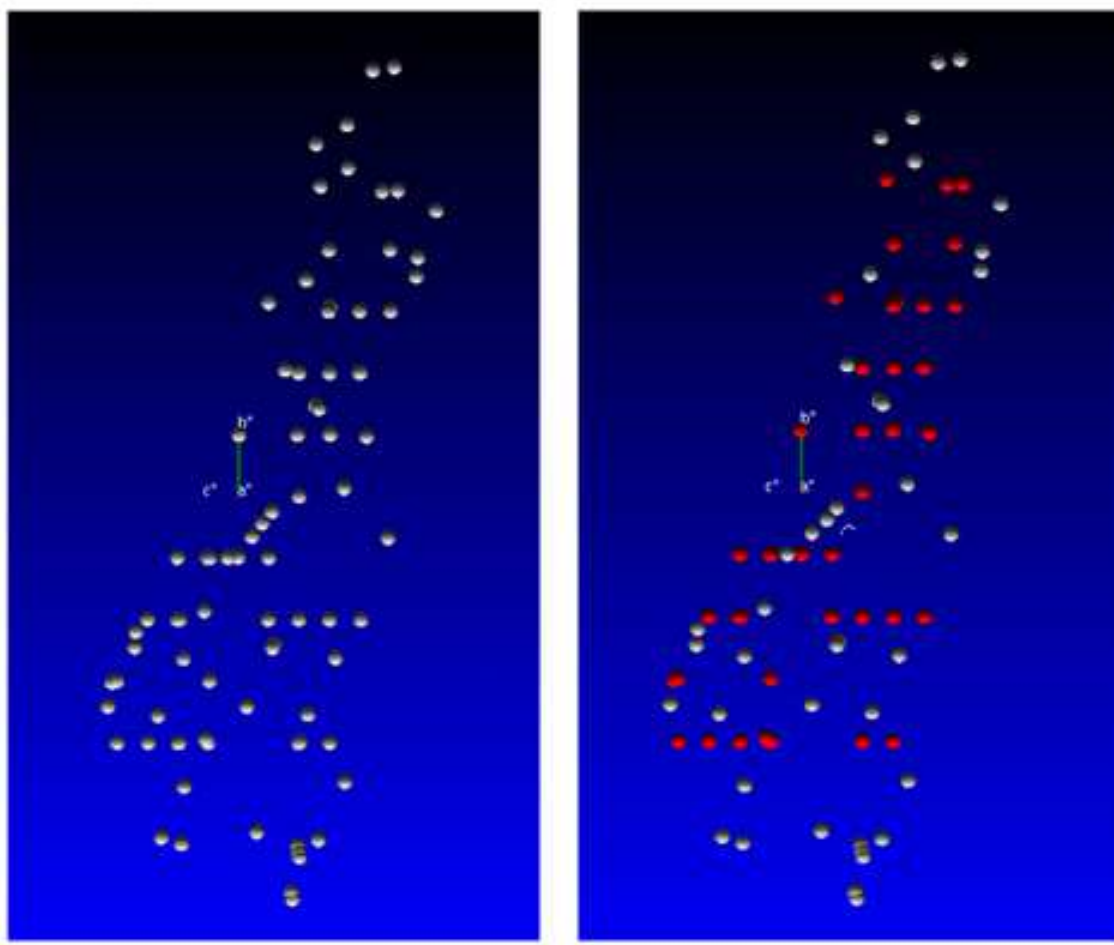


Figura 4.15: Visualização do espaço recíproco utilizando o programa *reciprocal lattice viewer*

Fonte: Imagem obtida utilizando o programa *reciprocal lattice viewer*

Capítulo 5

Resultados e discussões

A seguir serão apresentados os resultados de cristalização e caracterização estrutural utilizando difração de raios X por monocristais dos compostos LASSBio-1773, LASSBio-1774, LASSBio-1606 e LASSBio-1735. Para os compostos LASSBio-1774 e LASSBio-1606 serão discutidos, também, os resultados das coletas de dados de difração de raios X por monocristais em altas pressões.

As coletas de dados foram realizadas à temperatura de 293 K utilizando radiação de molibdênio ($\text{Mo-K}\alpha = 0.71073 \text{ \AA}$) no difratômetro APEX II DUO da Bruker instalado no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física (IF) da Universidade Federal de Goiás (UFG). As imagens foram integradas utilizando o pacote de programas SAINT da Bruker [26]. Para as coletas realizadas em pressão ambiente, os dados foram corrigidos por absorção utilizando o método multi-scan [27].

As estruturas em pressão ambiente foram resolvidas e refinadas usando os programas SHELXS-97 [39] e SHELXL-97 [40], por Métodos Diretos. Os átomos não hidrogenóides foram localizados no mapa de densidade eletrônica e foram refinadas pelo método de mínimos quadrados com os correspondentes parâmetros térmicos anisotrópicos. Nos ciclos seguintes do refinamento, os picos referentes aos átomos de hidrogênio do composto surgiram nos mapas de diferença de Fourier. Os átomos de hidrogênio são refinados isotropicamente com parâmetros individuais de acordo com os átomos aos quais estão ligados. Nos refinamentos com o SHELXL-97 [40], padroniza-se o parâmetro isotrópico do hidrogênio como $U_{iso}(\text{H}) = 1,5U_{eq}$, para grupos metil e hidroxila, e $U_{iso}(\text{H}) = 1,2U_{eq}$ para os demais casos, onde U_{eq} é o parâmetro térmico do átomo ao qual o hidrogênio está ligado. Os hidrogênios das moléculas de água foram incluídos nas posições estimadas através da

instrução CALC-OH [41].

5.1 Análise cristalográfica dos compostos LASSBio-1773 e LASSBio-1774

O diabetes melitus é uma condição crônica caracterizada pela elevada taxa de açúcar no sangue, seja pelo fato de o corpo não produzir quantidade suficiente de insulina ou por não ter uma resposta satisfatória à insulina. De acordo com a *International Diabetes Federation* [32], em 2015, mais de 5 milhões de pessoas morreram por complicações decorrentes do diabetes. Esse valor excede o número de mortes causadas por HIV, tuberculose e malária juntos. A perspectiva é de que, em 2040, chegue a 642 milhões o total de pessoas com diabetes no mundo [33]. Com base nesses números alarmantes, diversos grupos de pesquisa espalhados pelo mundo têm dedicado esforços para desenvolver fármacos cada vez mais eficientes e seguros para o tratamento dessa condição.

Nesse sentido, o LASSBio desenvolveu o composto LASSBio-1471, figura 5.1. A partir de estudos de acoplamento molecular [34], esse composto apresentou-se muito favorável como agonista do receptor PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) que participa de processos de captação e utilização de glicose pelos tecidos. O LASSBio-1471 foi testado em ratos nos quais foi induzido o diabetes. Os testes mostraram que esse composto tem efeito anti-neuropático, além da redução dos níveis de açúcar no sangue de $548,4 \pm 26,0$ mg/dL para $259,6 \pm 73,1$ mg/dL. Todavia, os estudos desses mesmos autores mostraram que a presença da subunidade 1,3-*benzodioxole* nesse composto pode inibir ou induzir o citocromo P450, o que pode levar a reações adversas e efeitos farmacológicos indesejados [35] chamando a atenção para estudos mais detalhados de toxicidade e otimização estrutural.

Com o intuito de reduzir possíveis efeitos indesejados, conforme citado anteriormente, foram planejados os compostos [36] LASSBio-1773 e LASSBio-1774 a partir de modificações estruturais do LASSBio-1471, conforme ilustrado na figura 5.2. Os testes em ratos mostraram atividade hipoglicemiante em ambos os compostos, além de efeito anti-neuropático para o composto LASSBio-1773.

Nesta seção serão apresentados os resultados de difração de raios X de monocristal para os com-

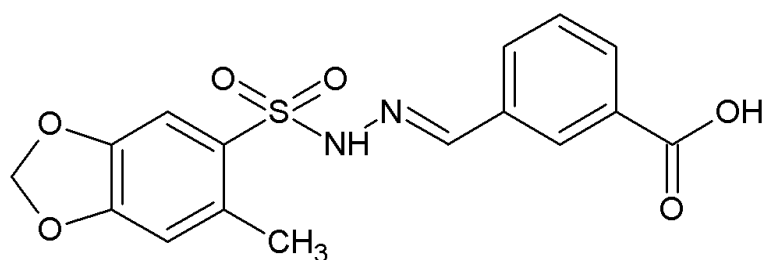


Figura 5.1: Representação plana do composto LASSBio-1471

Fonte: Elaborada pela autora.

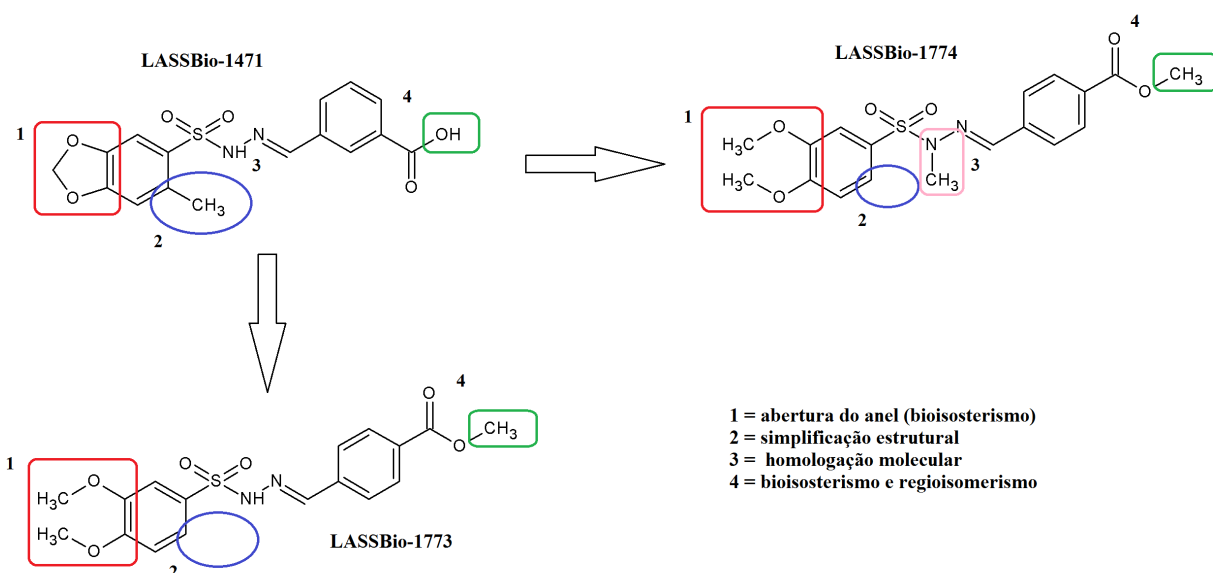


Figura 5.2: Modificações estruturais do composto LASSBio-1471 produzindo os compostos LASSBio-1773 e LASSBio-1774

Fonte: Elaborada pela autora.

postos LASSBio-1773 e LASSBio-1774. Para este último foram realizadas, também, coletas de dados para três pressões utilizando a *DAC*. O objetivo das medidas em altas pressões é verificar possíveis transições de fase bem como compreender o efeito da pressão nas distâncias intermoleculares, no volume da célula unitária e modelar os possíveis novos arranjos cristalinos. A elucidação da estrutura cristalográfica desses compostos auxiliará no entendimento do mecanismo farmacológico

por meio da determinação das interações entre as moléculas e da distribuição tridimensional dos átomos.

5.1.1 Cristalização e determinação da estrutura cristalográfica e molecular do composto LASSBio-1773

O composto LASSBio-1773 (methyl 4-(((3,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl)hydrazono)methyl) benzoate), figura 5.3, $C_{17}H_{18}N_2O_6S$, foi cristalizado pelo método de evaporação lenta solubilizando 4,3 mg do composto em uma solução de 0,2 ml de DMSO à temperatura ambiente, figura 5.4. Uma amostra transparente de formato prismático com dimensões 0,290 mm x 0,370 mm x 0,550 mm foi selecionada, com o auxílio de um microscópio com luz polarizada, para a coleta de dados de difração de raios X. A unidade assimétrica está representada na figura 5.5. Os principais dados cristalográficos estão apresentados na tabela 5.1

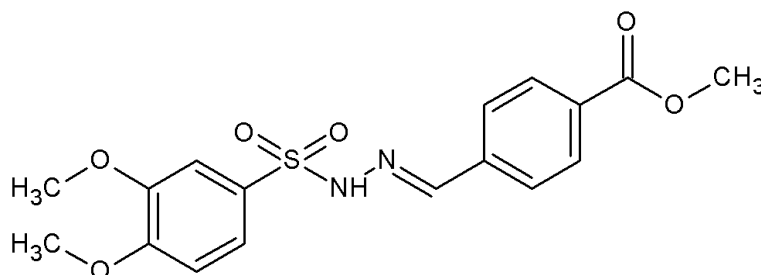


Figura 5.3: Representação plana do composto LASSBio-1773

Fonte: Elaborada pela autora.

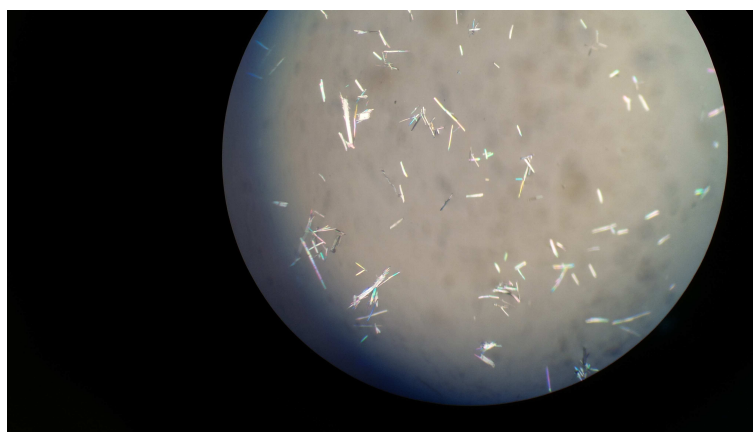


Figura 5.4: Monocristais do composto LASSBio-1773

Fonte: Elaborada pela autora.

Fórmula	$C_{17}H_{18}N_2O_6S$
Massa molecular	378,4
Sistema cristallino	ortorrômbico
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
a (Å)	7,219(2)
b (Å)	10,638(4)
c (Å)	22,669(7)
Volume (Å ³)	1740,9(10)
Z	4
Densidade(g/cm ³)	1,44
μ (mm ⁻¹)	0,224
F_{000}	792
2θ máximo (°)	59,32
Reflexões coletadas / independentes / observadas	9587 / 4397 / 4119
Número de parâmetros	243
Completeza	99,3% ($2\theta = 50^\circ$)
Redundância	2,18
R(int)	1,81
Fatores Residuais [obs]	R1=0,032
	wR2=0,085
Fatores Residuais [all]	R1=0,035
	wR2= 0,087
GooF	1,068
$\Delta\rho_{max}$ (e Å ⁻³)	0,266
$\Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	-0,212

Tabela 5.1: Dados cristalográficos e experimentais do composto LASSBio-1773

Fonte: Elaborada pela autora.

Os fragmentos metilbenzoato (C10/C11/C12/C13/C14/C15/C16/O5/O6/C17, rms deviation = 0.0326 Å) e dimetoxibenzeno (C2/C3/C4/C5/C6/C7/O3/C8/O4/C9, rms deviation = 0.0680 Å) são planares. O ângulo diédrico entre os planos passando por esses dois fragmentos é de 81,16(4)°.

Ao longo da direção [001] forma-se um arranjo do tipo *herringbone* por meio de duas interações, conforme ilustrado na figura 5.6. A primeira ocorre entre os átomos C9–H9B e o centro de gravidade Cg1ⁱ [ⁱ: 1/2 – x, 1 – y, –1/2 + z] do anel composto pelos átomos C10–C11–C12–C13–C14–C15 e a segunda é uma interação do tipo Y–X···π envolvendo os átomos C16–O6 e o centro de gravidade Cg2ⁱⁱ [ⁱⁱ: 1/2 – x, 1 – y, 1/2 + z] do anel composto pelos átomos C2–C3–C4–C5–C6–C7. Ao longo da direção [100] o empacotamento é mediado pela interação entre os átomos C8–H8C e o centro de gravidade Cg2ⁱⁱⁱ [ⁱⁱⁱ: 1/2+x, 3/2–y, 2–z]), pela interação N2–H2...O3ⁱⁱⁱ [ⁱⁱⁱ: 1/2+x, 3/2–y, 2–z]) e pela interação C6–H6···O1^{iv} [^{iv}: –1/2+x, 1/2–y, –z]. Todas estas interações estão ilustradas, separadamente por questões de clareza, nas figuras 5.6, 5.7 e 5.8 e sumarizadas na tabela 5.3.

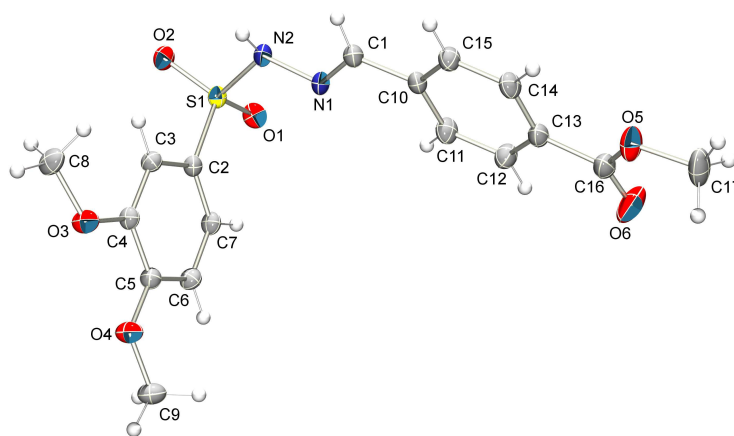


Figura 5.5: Representação [37] da unidade assimétrica do composto LASSBio-1773 com elipsóides a 30% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os ângulos torsionais na subunidade sulfonil-hidrazona estão listados na tabela 5.2

Átomos	Ângulo torsional (°)
N1-N2-S1-C2	65,6(2)
N1-N2-S1-O1	-50,5(2)
N1-N2-S1-O2	-179,4(1)
C1-N1-N2-S1	-169.1(2)

Tabela 5.2: Ângulos torsionais na subunidade sulfonil-hidrazona - LASSBio-1773

Fonte: Elaborada pela autora.

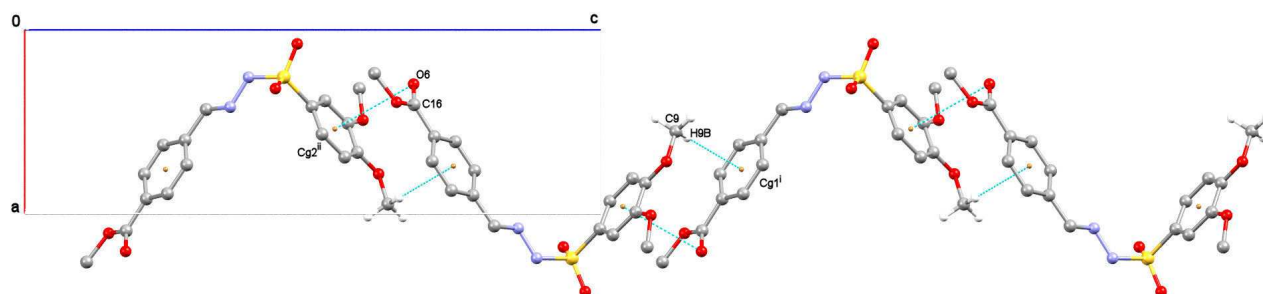


Figura 5.6: Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1773 evidenciando as interações C9-H9B...Cg1ⁱ e C16-O6...Cg2ⁱⁱ

Fonte: Elaborada pela autora.

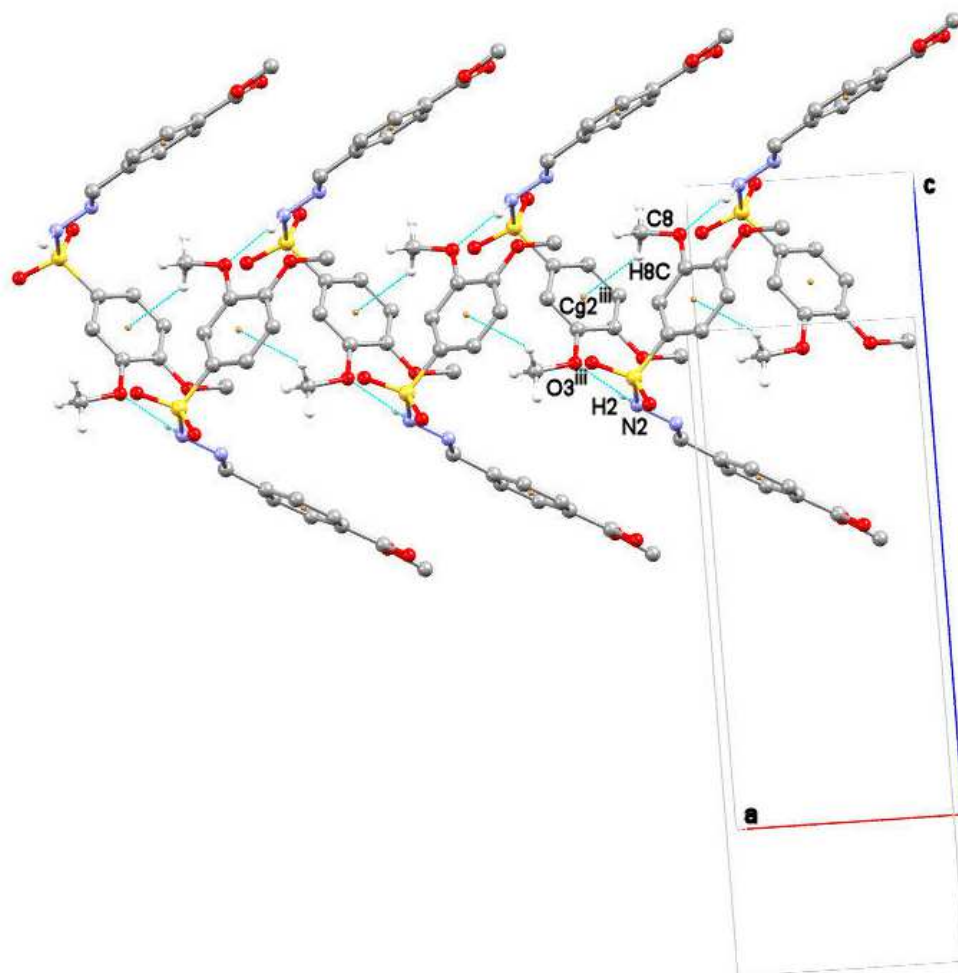


Figura 5.7: Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1773 evidenciando as interações C8-H8C...Cg2ⁱⁱⁱ e N2-H2...O3ⁱⁱⁱ

Fonte: Elaborada pela autora.

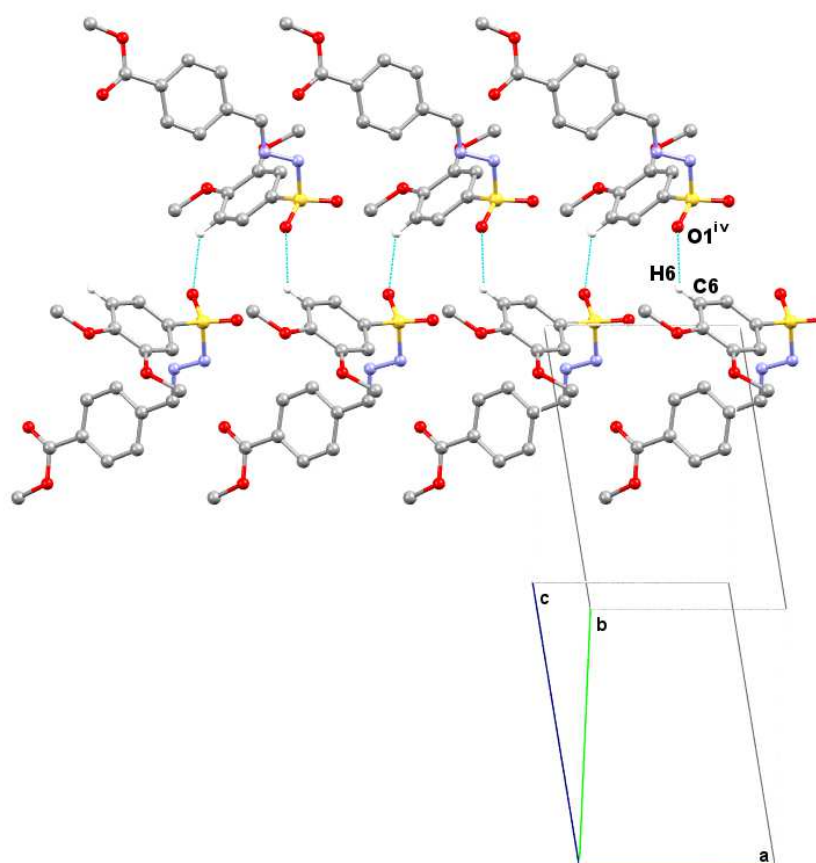


Figura 5.8: Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1773 evidenciando as interações C6-H6...O1^{iv} [$^{iv}: -1/2 + x, 1/2 - y, -z$]

Fonte: Elaborada pela autora.

X-H...Cg	H...Cg (Å)	H⊥ (Å)	X...Cg (Å)	X-H...Cg (°)	Operação de simetria
C9-H9B...Cg2 ⁱ	2,78	2,77	3,629(3)	149	ⁱ : $\frac{1}{2} - x, 1 - y, \frac{-1}{2} + z$
C8-H8C...Cg1 ⁱⁱⁱ	2,74	2,68	3,550(3)	143	ⁱⁱⁱ : $\frac{1}{2} + x, \frac{3}{2} - y, 2 - z$
Y-X...Cg	X...Cg (Å)	X-⊥ (Å)	Y...Cg (Å)	Y-X...Cg (°)	Operação de simetria
C16-O6...Cg1 ⁱⁱ	3,680(3)	3,625	3,710(3)	82	ⁱⁱ : $\frac{1}{2} - x, 1 - y, \frac{1}{2} + z$
D-H...A	D-H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D-H...A (°)	Operação de simetria
N2-H2...O3 ⁱⁱⁱ	0,84(2)	2,14(3)	2,952(3)	162	ⁱⁱⁱ : $\frac{1}{2} + x, \frac{3}{2} - y, 2 - z$
C6-H6...O1 ^{iv}	0,93	2,57	3,203(3)	105	^{iv} : $\frac{-1}{2} + x, \frac{1}{2} - y, -z$

Tabela 5.3: Ligações de hidrogênio para o composto LASSBio-1773

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2 Cristalização e determinação da estrutura cristalográfica e molecular do composto LASSBio-1774 - Pressão ambiente

O composto LASSBio-1774 (methyl 4-(((3,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl)(methyl)hydrazono)methyl)benzoate monohydrate), figura 5.9, $C_{18}H_{20}N_2O_7S$, foi cristalizado pelo método de evaporação lenta solubilizando 4,6 mg do composto em uma solução de 0,5 ml de DMSO à temperatura ambiente, figura 5.10. Uma amostra de formato prismático com dimensões 0,090 mm x 0,0100 mm x 0,210 mm foi selecionada com o auxílio de um microscópio com luz polarizada para a coleta de dados de difração de raios X. A unidade assimétrica, figura 5.11, apresenta uma molécula do composto e uma molécula de água cujos hidrogênios, por não terem sido localizados com precisão no mapa de densidade eletrônica, foram posicionados seguindo a metodologia de identificação de ligações de hidrogênio utilizando o programa CALC-OH [41]. Os principais dados cristalográficos estão apresentados na tabela 5.4

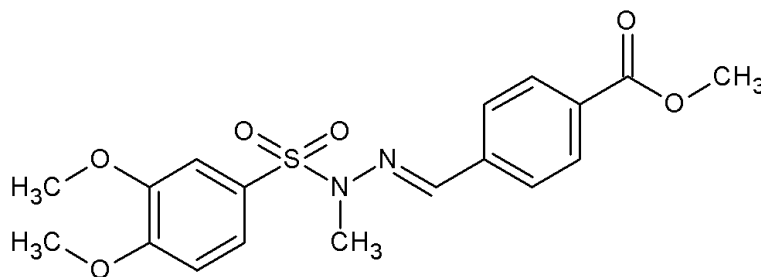


Figura 5.9: Representação plana do composto LASSBio-1774

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 5.10: Monocristais do composto LASSBio-1774

Fonte: Elaborada pela autora.

Fórmula	$C_{18}H_{20}N_2O_7S$
Massa molecular	408,4
Sistema cristallino	ortorrômbico
Grupo espacial	Pbca
a (Å)	15,0319(2)
b (Å)	9,1414(1)
c (Å)	28,9596(4)
Volume (Å ³)	3979,41(14)
Z	8
Densidade(g/cm ³)	1,36
μ (mm ⁻¹)	0,205
F_{000}	1712
2θ máximo (°)	57,0
Reflexões coletadas / independentes / observadas	33418 / 5029 / 3789
Número de parâmetros	257
Completeza	99,9% ($2\theta = 50^\circ$)
Redundância	6,6
Resolução	0,74(Å)
R(int)	2,25
Fatores Residuais [obs]	R1=0,047
	wR2=0,131
Fatores Residuais [all]	R1=0,065
	wR2= 0,145
GooF	1,023
$\Delta\rho_{max}$ (e Å ⁻³)	0,292
$\Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	-0,421

Tabela 5.4: Dados cristalográficos e experimentais do composto LASSBio-1774

Fonte: Elaborada pela autora.

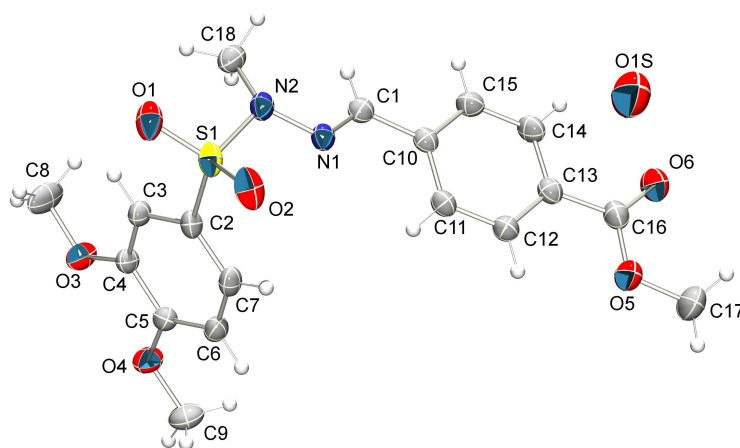


Figura 5.11: Representação [37] da unidade assimétrica do composto LASSBio-1774 com elipsóides a 30% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os fragmentos metilbenzoato (C10/C11/C12/C13/C14/C15/C16/O5/O6/C17, rms = 0.0115 Å) e dimetoxibenzeno (C2/C3/C4/C5/C6/C7/O3/C8/O4/C9, rms = 0.0320 Å) são planares. O ângulo diédrico entre os planos passando por esses dois fragmentos é de 78,90(9)°. Os ângulos torsionais na subunidade sulfonil-hidrazona estão listados na tabela 5.5

O empacotamento é mediado pela interação C-H... π entre os átomos C18–H18B e o centro de gravidade (Cg1ⁱ [ⁱ: 3/2 + x, -1/2 + y, z]) do anel composto pelos átomos C2-C3-C4-C5-C6-C7. Há também duas interações nas quais os átomos C6 e C7 participam doando elétrons para o átomo O2ⁱⁱ ([ⁱⁱ: 2 - x, 1/2 + y, 1/2 - z]), ambas tendo comprimento de ligação igual a 3,199(2) Å e uma interação do tipo π - π entre os átomos C9 e C11ⁱⁱ. Essas quatro interações favorecem o empacotamento ao longo da direção [010]. Por último, os átomos C8-H8C interagem fracamente com o átomo O6ⁱⁱⁱ ([ⁱⁱⁱ: 3/2 - x, 2 - y, -1/2 + z]) formando um arranjo do tipo *herringbone* ao longo da direção c. Todas estas interações estão ilustradas, separadamente por questões de clareza, nas figuras 5.12 , 5.13 e 5.14 e sumarizadas na tabela 5.6.

Átomos	Ângulo torsional (°)
N1-N2-S1-C2	-66,4(1)
N1-N2-S1-O1	49,32(1)
N1-N2-S1-O2	177,9(1)
C1-N1-N2-S1	165,7(1)

Tabela 5.5: Ângulos torsionais na subunidade sulfonil-hidrazona - LASSBio-1774

Fonte: Elaborada pela autora.

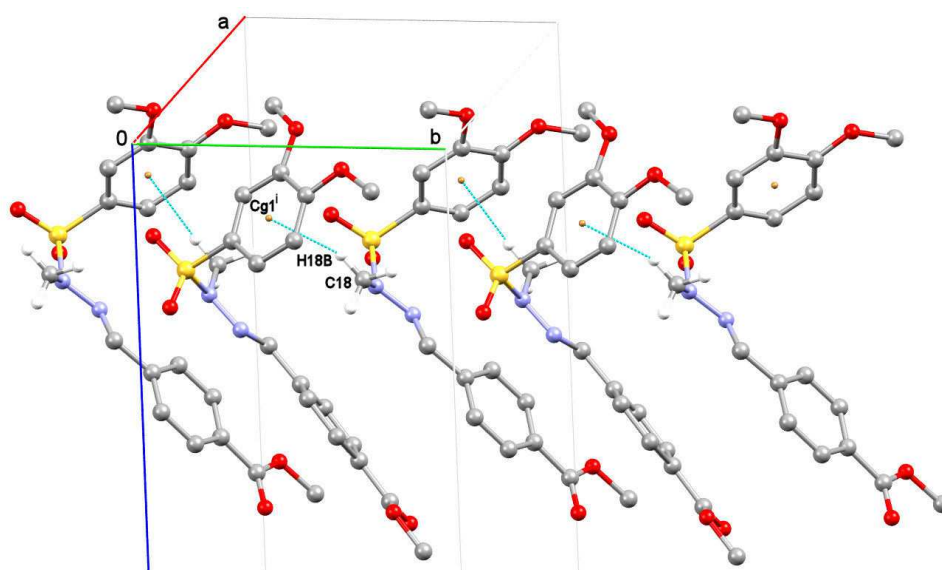


Figura 5.12: Representação [38] do empacotamento ao longo da direção do composto LASSBio-1774 evidenciando a interação $C18-H18 \cdots Cg1^i$

Fonte: Elaborada pela autora.

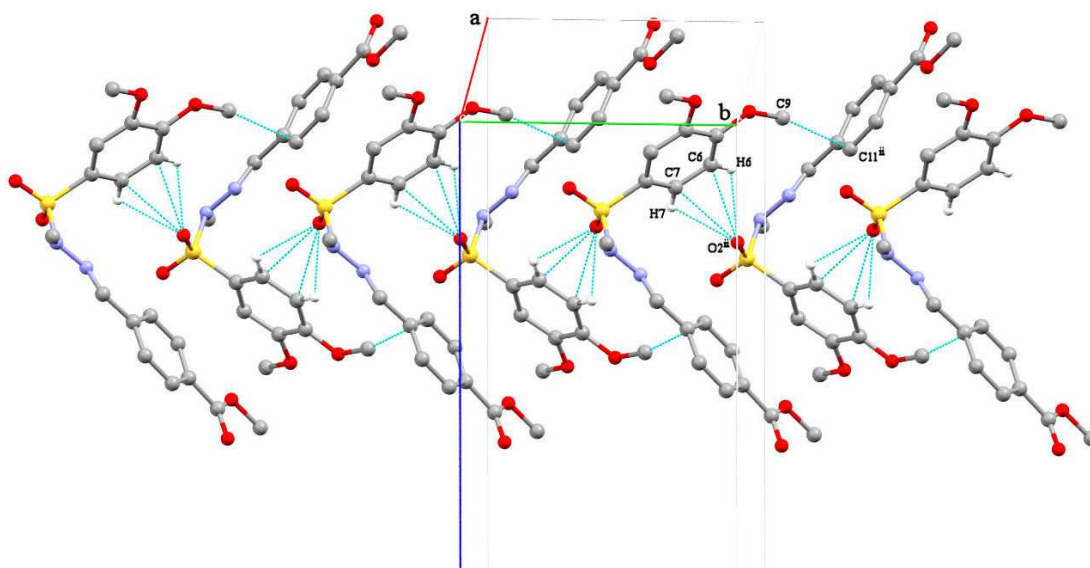


Figura 5.13: Representação [38] do empacotamento ao longo da direção [010] do composto LASSBio-1774 evidenciando as interações $C6-H6 \cdots O2^{ii}$ e $C7-H7 \cdots O2^{ii}$

Fonte: Elaborada pela autora.

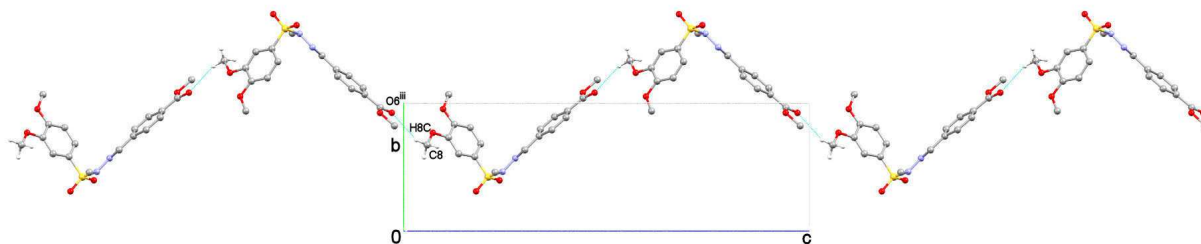


Figura 5.14: Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1774 ao longo da direção [001] evidenciando a interação $C8-H8C \cdots O6^{iii}$

Fonte: Elaborada pela autora.

D-H...A	D-H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D-H...A (°)	Operação de Simetria
C18-H18B...Cg1 ⁱ	0,96	2,76	3,592(2)	145	ⁱ : 3/2+x, -1/2+y, z
C6-H6...O2 ⁱⁱ	0,93	2,66	3,199(2)	117	ⁱⁱ : 2 - x, 1/2 + y, 1/2 - z
C7-H7...O2 ⁱⁱ	0,93	2,66	3,197(2)	117	ⁱⁱ : 2 - x, 1/2 + y, 1/2 - z
C9-C11 ⁱⁱ			3,318(3)		ⁱⁱ : 2 - x, 1/2 + y, 1/2 - z
C8-H8C...O6 ⁱⁱⁱ	0,96	2,61	3,470(3)	149	ⁱⁱⁱ : 3/2 - x, 2 - y, -1/2 + z

Tabela 5.6: Ligações de hidrogênio para o composto LASSBio-1774

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 Difração de raios X em altas pressões do composto LASSBio-1774

A amostra utilizada para coleta de dados de raios X em alta pressão foi retirada do mesmo frasco que a amostra utilizada na medida anteriormente detalhada. Foi preparada uma junta de aço de 250 μm de diâmetro na qual foi colocado o monocristal juntamente com um cristal de rubi e o líquido transmissor de pressão. A junta foi posicionada na face polida do diamante de uma câmara de bigornas de diamantes (*DAC*) do tipo Merrill-Bassett que foi, na sequência, fechada a fim de gerar um aumento da pressão na amostra. Uma mistura de metanol-etanol (4:1) foi utilizada como meio transmissor de pressão a fim de garantir que a pressão fosse aplicada uniformemente na amostra e não ao longo de uma direção específica.

As medidas de fluorescência para aferição da pressão foram realizadas no fluorímetro Horiba FluoroLog FL3-22 instalado nas dependências do Grupo de Física de Materiais (GFM) do IF-UFG. O fabricante da *DAC* sugere que os comprimentos de onda de excitação sejam de 488 nm ou de 514,5 nm. A *DAC* foi posicionada no interior do fluorímetro e foi selecionado o comprimento de onda de excitação de 488 nm. Foram testadas várias aberturas tanto da fenda de excitação quanto da de emissão e a varredura no comprimento de onda de emissão foi desde 680 nm até 740 nm. Porém, surgiu uma banda larga devida à absorção pelo corpo metálico da *DAC*. Essa banda causou aumento no ruído de fundo, conforme pode ser visto na figura 5.15 e, por essa razão, o espectro para esse comprimento de onda foi descartado. O comprimento de onda de excitação foi então modificado para 514,5 nm e a largura das fendas de excitação e de emissão foram variadas de modo a obter uma

definição conveniente para as linhas R_1 e R_2 . A medida foi feita, então, fixando a fenda de excitação em 0,9 mm e a fenda de emissão em 0,6 mm. O comprimento de onda de emissão foi varrido desde 690 nm até 695 nm e o tempo de integração foi de 5 segundos. O espectro de fluorescência do rubi para esse caso é mostrado na figura 5.16.

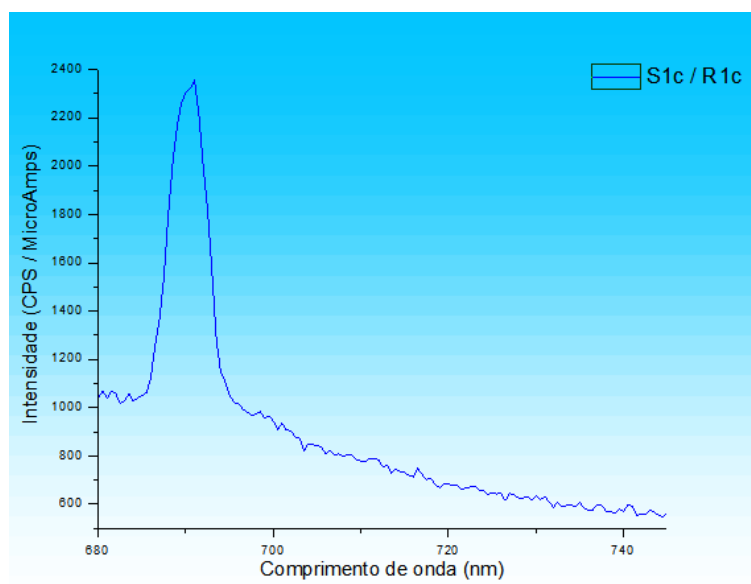


Figura 5.15: Espectro fluorescência do rubi com excitação por uma luz de comprimento de onda de 488 nm

Fonte: Imagem obtida a partir do *software* do fluorímetro Horiba FluoroLog FL3-22.

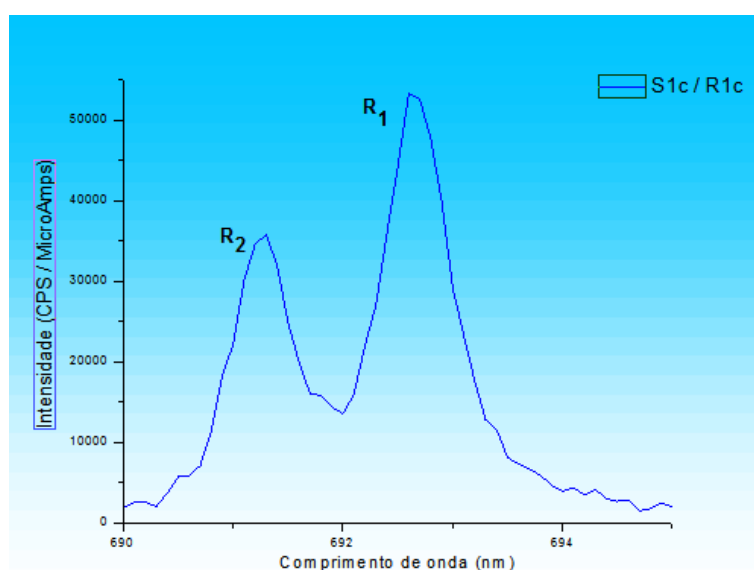


Figura 5.16: Espectro de fluorescência do rubi com excitação por uma luz de comprimento de onda de 514 nm

Fonte: Imagem obtida a partir do *software* do fluorímetro Horiba FluoroLog FL3-22.

Após a medida de fluorescência, foi realizada a coleta de dados de difração de raios X. Com os dados obtidos foi feita a indexação com o objetivo de determinar a célula unitária. O método automático utilizado pelo software do difratômetro falhou, o que levou a uma busca manual pelas reflexões provenientes da amostra de interesse. Foram excluídas da lista as reflexões mais intensas que são provenientes do diamante, e foram excluídas também as regiões sombreadas pela DAC. Com isso, foi possível determinar os parâmetros de rede da nova célula unitária, que foram: $a = 14,81 \text{ \AA}$, $b = 9,03 \text{ \AA}$, $c = 28,26 \text{ \AA}$, $\beta = 89,78^\circ$, volume = 3779 \AA^3 . Esse resultado mostrou que ocorreu uma transição da fase ortorrômbica para a fase monoclínica, além de uma redução de 200 \AA^3 no volume da célula unitária.

Após essa medida, a pressão foi aumentada com uma rotação de aproximadamente 10° em cada um dos parafusos da DAC e foi feita uma nova tentativa de medida da pressão por meio da fluorescência do rubi, porém não foi possível realizar a medida pois o cristal de rubi perdeu a monocristalinidade junto com a amostra. Dessa forma, não foi possível obter o espectro de fluorescência para esse caso e não foi possível, também, recuperar o cristal de rubi para medir os picos de fluo-

rescência à pressão ambiente e utilizar esse valor para encontrar a pressão nas condições das medidas anteriores.

Levando em conta o tempo gasto para cada medida de fluorescência e também o fato de que as medidas de pressão devem ser feitas antes e após o experimento de difração de raios X, foi decidido que não seria conveniente realizar tais medidas, pois a elevada demanda de usuários de ambos os equipamentos (Fluorímetro e Difratorômetro) não nos permitiria ter o acesso necessário para o andamento adequado das coletas. Dessa maneira, escolhemos estimar a pressão na DAC baseando no módulo volumétrico do líquido transmissor de pressão e no volume do cilindro que contém a amostra, por meio da equação 5.1:

$$B = -V \frac{P}{\Delta V_0} \quad (5.1)$$

Utilizando a equação 5.1 foi possível estimar a pressão com uma precisão média de 40%. Assim, o experimento de difração de raios X foi retomado seguindo o mesmo procedimento descrito no capítulo 4. A seguir serão discutidos os resultados obtidos para o composto LASSBio-1774 em altas pressões.

Foram realizadas três coletas em altas pressões. Foram determinados os parâmetros de rede e o volume da célula unitária até uma pressão estimada de $1,92 \times 10^8$ Pa. A determinação da célula unitária em cada pressão foi feita após o término da coleta e foram utilizadas todas as imagens obtidas no experimento, como usualmente é feito para medidas dessa natureza. Os dados referentes às três coletas estão reunidos na tabela 5.7.

A primeira coleta foi realizada sob uma pressão estimada de $5,95 \times 10^7$ Pa. A indexação da célula unitária foi feita com base no critério de $I/\sigma(I) \geq 40$ fornecendo um total de 398 reflexões com intensidade menor que 1000 contagens. Os parâmetros de rede obtidos foram: $a = 14,7673(30) \text{ \AA}$, $b = 9,0727(18) \text{ \AA}$, $c = 28,1605(56) \text{ \AA}$, $\beta = 90,405(30)^\circ$ volume = $3773(26) \text{ \AA}^3$. Assim, a célula unitária da primeira coleta apresentou uma redução de volume igual a 206 \AA^3 com relação à célula obtida em pressão ambiente. Além dessa redução, nota-se também uma transição de fase de ortorrômbico para monoclinico. Essa transição sugere que houve uma quebra na simetria original, possivelmente

modificando a unidade assimétrica.

A segunda coleta foi realizada sob uma pressão estimada de $1,27 \times 10^8$ Pa. A célula unitária foi indexada com base no critério de $I/\sigma(I) \geq 40$ obtendo um total de 1747 reflexões com intensidade menor que 1000 contagens. Esse número maior de reflexões é devido ao aumento da redundância nas reflexões não indicando, de fato, uma melhora nos dados. Nessa condição, a célula unitária obtida mostrou uma redução de 177 \AA^3 com relação à célula unitária da pressão anterior. Os parâmetros foram: $a = 14,5573(29) \text{ \AA}$, $b = 9,0297(18) \text{ \AA}$, $c = 27,3560(55) \text{ \AA}$, $\beta = 90,388(30)^\circ$ volume = $3596(12) \text{ \AA}^3$.

A terceira coleta foi realizada sob uma pressão estimada de $1,92 \times 10^8$ Pa. A célula unitária foi indexada com base no critério de $I/\sigma(I) \geq 70$, obtendo um total de 234 reflexões com intensidade menor que 5000 contagens. Nessa condição, a célula unitária obtida mostrou uma redução de 196 \AA^3 com relação à célula unitária da pressão anterior. Os parâmetros foram: $a = 14,3347(29) \text{ \AA}$, $b = 9,0644(18) \text{ \AA}$, $c = 26,1764(52) \text{ \AA}$, $\beta = 91,666(30)^\circ$ volume = $3400(30) \text{ \AA}^3$.

Foram feitas tentativas de aumentar ainda mais a pressão mas a amostra perdeu monocristalinidade, inviabilizando a continuação das coletas.

Os parâmetros de rede para cada pressão estão listados na tabela 5.7.

Coleta	Pressão (Pa)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	Volume (Å ³)
01	P_{atm}	15,0319(2)	9,1414(1)	28,9596(4)	90	3979,41(14)
02	$5,95 \times 10^7$	14,7673(30)	9,0727(18)	28,1605(56)	90,405(30)	3773(26)
03	$1,27 \times 10^8$	14,5573(29)	9,0297(18)	27,3560(55)	90,388(30)	3596(12)
04	$1,92 \times 10^8$	14,3347(29)	9,0644(18)	26,1764(52)	91,666(30)	3400(26)

Tabela 5.7: Parâmetros de rede para as coletas em alta pressão - LASSBio-1774

Fonte: Elaborada pela autora.

As diferenças na variação dos parâmetros de rede podem ser justificadas pelas interações intermoleculares que ocorrem ao longo de suas direções. O parâmetro c reduziu de 9,6% no intervalo de pressão em questão enquanto que os parâmetros a e b reduziram de 4,6% e 0,8%, respectivamente. A variação total de volume da célula unitária foi de 14,6%. Analisando a figura 5.14, é possível

verificar que a direção [001] é a de maior flexibilidade do arranjo supramolecular, o que corrobora com a maior compressão observada no parâmetro c , com relação aos demais parâmetros. A compressão da rede ao longo da direção [010] foi bastante discreta. Pelas figuras 5.12 e 5.13 nota-se que as ligações entre as moléculas são mediadas por interações do tipo $C-H \cdots \pi$, $\pi \cdots \pi$ e por uma interação de hidrogênio bifurcada, tornando o empacotamento bastante rígido ao longo do eixo b , o que dificulta sobremaneira um rearranjo das moléculas nessa direção. Já ao longo de [100], a diminuição do parâmetro a foi quase linear, assim como a redução do volume da célula unitária. O ângulo β foi se tornando mais obtuso com o aumento da pressão, o que acentuou ainda mais o caráter monoclinico do novo arranjo cristalino. Toda essa arquitetura molecular fez com que a compressão fosse anisotrópica. As variações percentuais dos parâmetros de rede estão detalhadas na tabela 5.8.

Coleta	Pressão (Pa)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	Volume (Å ³)
01	P_{atm}	15,0319(2)	9,1414(1)	28,9596(4)	90	3979,41(14)
02	$5,95 \times 10^7$	-1,8%	-0,8%	-2,8%	0,45%	-5,2%
03	$1,27 \times 10^8$	-3,2%	-1,2%	-5,5%	0,43%	-9,6%
04	$1,92 \times 10^8$	-4,6%	-0,8%	-9,6%	1,85%	-14,6%

Tabela 5.8: Variação percentual com a pressão dos parâmetros de rede com relação aos respectivos valores em pressão ambiente com o aumento da pressão - LASSBio-1774

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma maneira de representar as variações nos parâmetros de rede é por meio de *strains*, que são tensores de segunda ordem calculados a partir de dois conjuntos de parâmetros de rede. A partir da análise de *strains* é possível inferir algumas possíveis mudanças estruturais resultantes da aplicação da pressão.

Os *strains* gerados pelo aumento da pressão foram determinados utilizando o programa WINSTRAIN escrito por Ross Angel [42]. Os comprimentos dos eixos principais do elipsóide de *strain* e a orientação desses eixos com relação aos eixos cristalográficos, calculados a partir dos parâmetros de rede, são mostrados na tabela 5.9. Conforme citado anteriormente, o parâmetro b apresentou uma compressão muito sutil, o que pode ser verificado também analisando os valores dos eixos princi-

país do elipsóide de *strain*. O *strain* ϵ_3 , o menor deles, encontra-se ao longo do eixo *b* (na direção [010]) evidenciando, mais uma vez, a pouca liberdade conformacional que a estrutura supramolecular apresenta ao longo dessa direção. O maior *strain*, ϵ_1 , é encontrado formando um ângulo de 73 (°) com o eixo *a* e 17(°) com o eixo *c*. Conforme a pressão foi sendo aumentada, a orientação desse *strain* não se alterou significativamente enquanto que seu módulo aumentou gradativamente. A direção do *strain* ϵ_1 se aproxima bastante da direção ao longo da qual as moléculas formam o arranjo do tipo *herringbone*. As figuras 5.17, 5.18 e 5.19 mostram a sobreposição da célula unitária em pressão ambiente com as células unitárias nas três pressões coletadas vistas ao longo das três direções. É possível visualizar mais claramente as direções de maior e de menor flexibilidade da molécula observando o empacotamento como um todo.

Coleta	Pressão (Pa)	Tensor unitário (GPa^{-1})	Ângulo com:	<i>a</i> (°)	<i>b</i> (°)	<i>c</i> (°)
01	$P_{atm} - 5,95 \times 10^7$	$\epsilon_1 = -0,0291(3)$		73(1)	90,0	17(1)
		$\epsilon_2 = -0,0167(2)$		163,1	90,0	72,7
		$\epsilon_3 = -0,0075(2)$		90,0	180,0	90,0
02	$P_{atm} - 1,27 \times 10^8$	$\epsilon_1 = -0,0574(2)$		82,8	90,0	7,6
		$\epsilon_2 = -0,0316(2)$		172,8	90,0	82,4
		$\epsilon_3 = -0,0123(2)$		90,0	180,0	90,0
03	$P_{atm} - 1,92 \times 10^8$	$\epsilon_1 = -0,1043(2)$		77,5	90,0	14,2
		$\epsilon_2 = -0,0437(2)$		12,5	90,0	104,2
		$\epsilon_3 = -0,0084(2)$		90,0	0,0	90,0

Tabela 5.9: Magnitude e orientação dos eixos principais dos elipsóides de *strain* para o composto LASSBio-1774 no intervalo de pressão de P_{atm} a $1,92 \times 10^8$ Pa

Fonte: Elaborada pela autora.

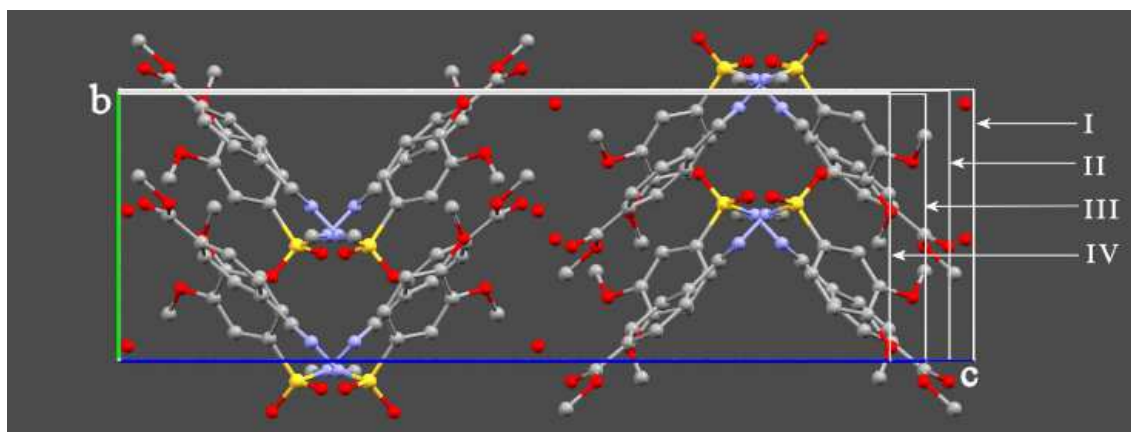


Figura 5.17: Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1774 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano bc. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02. IV - Célula unitária na pressão 03.

Fonte: Elaborada pela autora.

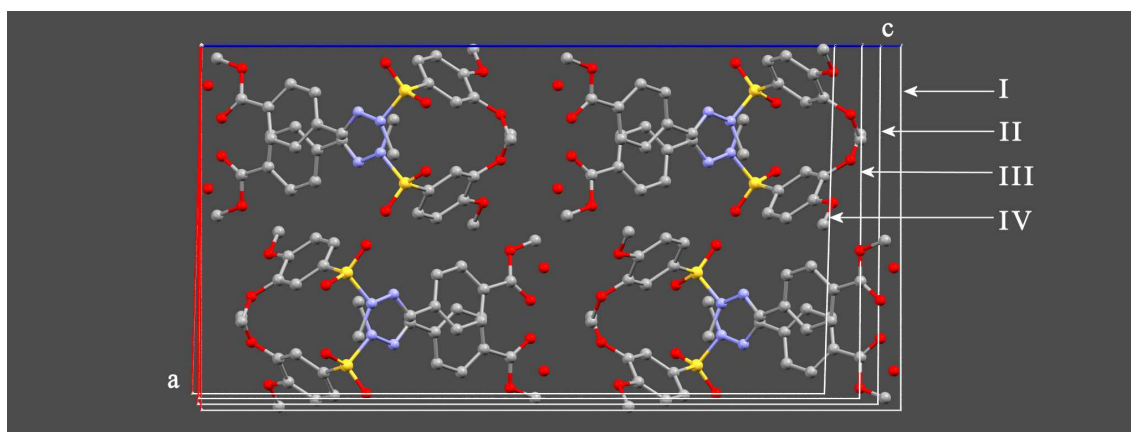


Figura 5.18: Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1774 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano ac. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02. IV - Célula unitária na pressão 03.

Fonte: Elaborada pela autora.

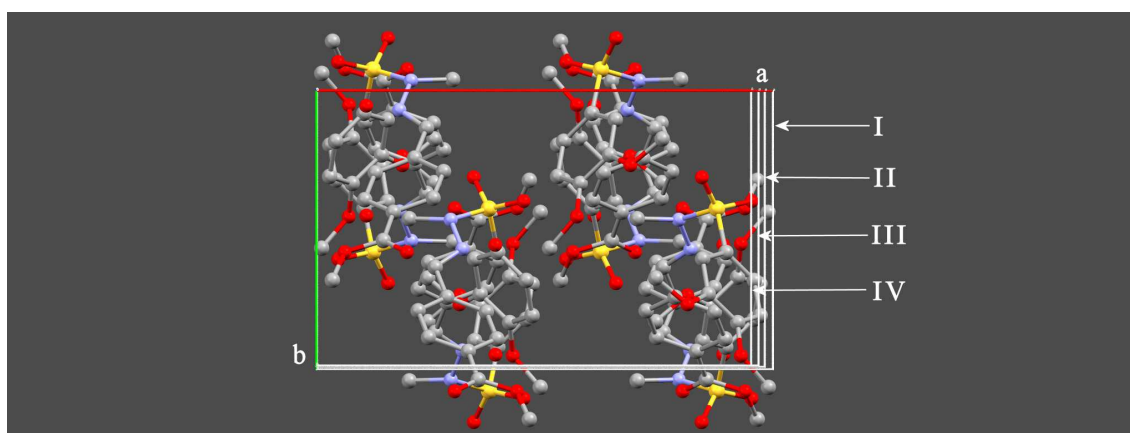


Figura 5.19: Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1774 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano ab. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02. IV - Célula unitária na pressão 03.

Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de verificar se a transição de fase é reversível foram realizadas várias determinações da célula unitária da amostra após ser retirada da *DAC*. A amostra retornou à condição inicial, com diminuições muito pequenas nos parâmetros de rede, sem perda de monocristalinidade, mostrando um caráter elástico na deformação ocorrida. Os parâmetros de rede obtidos pós-coleta em altas pressões foram: $a = 15,023(3) \text{ \AA}$, $b = 9,133(2) \text{ \AA}$, $c = 28,862(6) \text{ \AA}$ e volume = $3960(1) \text{ \AA}^3$. Antes da coleta em altas pressões esses parâmetros eram: $a = 15,0319(2) \text{ \AA}$, $b = 9,1414(1) \text{ \AA}$, $c = 28,9596(4) \text{ \AA}$, volume = $3979,41(14) \text{ \AA}^3$. Esse resultado é importante pois garante que, caso o medicamento venha a ser preparado na forma de comprimidos, não haverá alteração nas propriedades físico-químicas do mesmo. As pressões estimadas utilizadas durante o experimento estão no intervalo das pressões tipicamente utilizadas durante o processo de prensagem na indústria farmacêutica, que varia de 40 à 200 MPa, dependendo da amostra a ser preparada [1, 16]

5.2 Análise cristalográfica do composto LASSBio-1606

5.2.1 Cristalização e determinação da estrutura cristalográfica e molecular do composto LASSBio-1606 - Pressão ambiente

O processo inflamatório é uma resposta do sistema imune à ocorrência de estímulos prejudiciais tais como traumas e infecções. É comum a ocorrência de vermelhidão e aumento da temperatura local nesses casos. Esses sintomas decorrem do aumento do fluxo sanguíneo na tentativa de levar uma maior quantidade de linfócitos e outras células de defesa para a região afetada. Algumas dessas células de defesa podem causar perda de líquido no tecido, resultando em inchaço. Todos esses processos podem provocar estímulos nervosos, causando dor. Em certas doenças como, por exemplo, artrite reumatóide ou osteoartrite, o sistema de defesa do organismo inicia um processo inflamatório quando não há agentes externos a serem combatidos. Essas doenças são chamadas de auto-imunes e, nesses casos, o organismo causa danos aos seus próprios tecidos [43].

Em 1980, a Pfizer iniciou a comercialização do Piroxicam [44] (4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-1-(N-(2-pyridinyl)carboxamide)-1,1-dioxide), sob o nome Feldene, um anti-inflamatório não-esteróide inibidor da enzima cicloxigenase que possui meia-vida de aproximadamente 50 horas [45], a maior meia-vida entre os analgésicos. Ainda hoje, o Piroxicam é utilizado largamente no tratamento das doenças supracitadas, artrite reumatóide e osteoartrite.

O fragmento N-acilidrazona é reconhecido como uma estrutura privilegiada, sendo que alguns de seus derivados têm apresentado diversas atividades biológicas dentre as quais potente atividade anti-inflamatória [46]. Com base nessas informações, foi planejado, pelo LASSBio-UFRJ, o composto LASSBio-1606 [47], $C_{17}H_{15}O_4N_3S$ (figura 5.20), que é um análogo do Piroxicam, $C_{15}H_{13}O_4N_3S$ (figura 5.21), sendo obtido pela introdução de uma nova ligação dupla N=C na função amida original, transformando-o em um derivado de N-acilidrazona, e pela substituição do átomo de nitrogênio por um átomo de carbono no anel piridínico. A atividade anti-inflamatória do composto LASSBio-1606 apresentou-se mais intensa que o Piroxicam.

A estrutura cristalográfica do composto LASSBio-1606 já havia sido previamente determinada por nós com base nos dados coletados no difratômetro Enraf-Nonius CAD4 instalado no Laboratório

de Cristalografia do Instituto de Física da UFG e os resultados publicados [47]. Com a instalação do difratômetro APEX II DUO da Bruker foi feita a redeterminação estrutural em pressão ambiente e também coletas em altas pressões.

Nesta seção serão apresentados os resultados de difração de raios X em pressão ambiente por monocristais do composto LASSBio-1606, a partir dos dados obtidos no APEX II DUO. Na próxima seção será feita a análise do comportamento, em altas pressões, de seus parâmetros de rede e de possíveis rearranjos conformacionais.

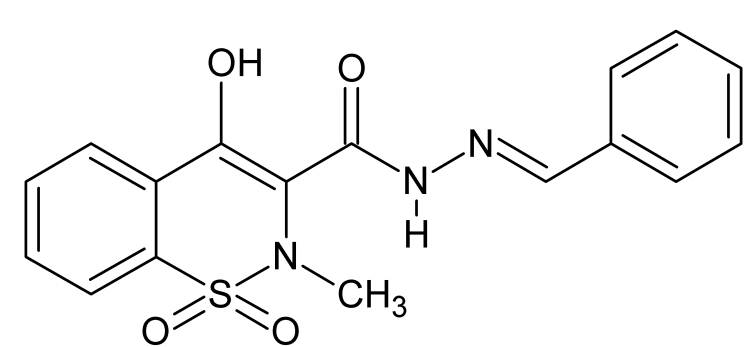


Figura 5.20: Representação plana do composto LASSBio-1606

Fonte: Elaborada pela autora.

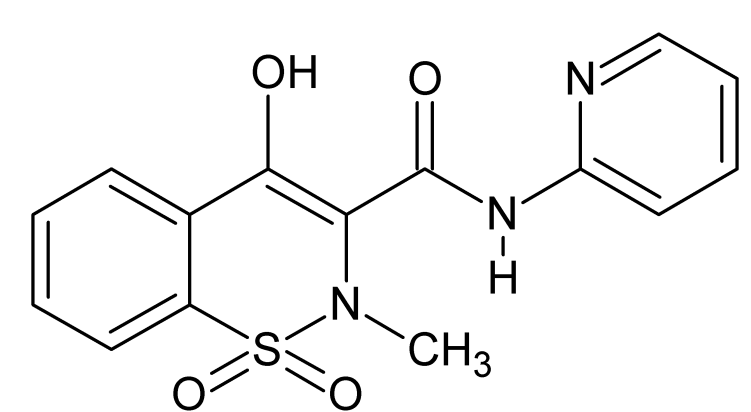


Figura 5.21: Representação plana do anti-inflamatório Piroxicam

Fonte: Elaborada pela autora.

Os monocristais (figura 5.22) foram obtidos pelo método de evaporação lenta solubilizando 6,2

mg do composto em uma solução de 0,3 ml de diclorometano e 0,02 ml de DMSO à temperatura ambiente. A amostra selecionada para a coleta de dados de difração de raios X foi de formato prismático com dimensões 0,144 mm x 0,226mm x 0,392 mm. Os principais dados cristalográficos estão apresentados na tabela 5.10. A unidade assimétrica apresenta uma molécula e está representada na figura 5.23.

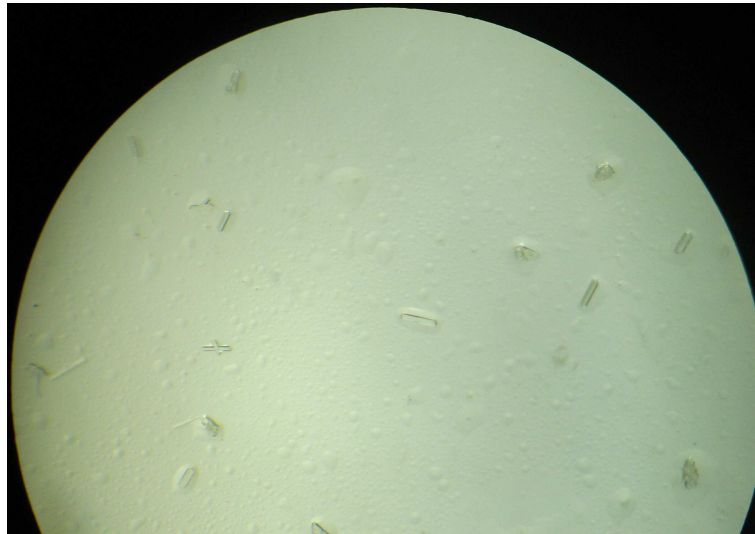


Figura 5.22: Cristais do composto LASSBio-1606

Fonte: Elaborada pela autora.

Fórmula	$C_{17}H_{15}O_4N_3S$
Massa molecular	357,4
Sistema cristalinio	monoclínico
Grupo espacial	C2/c
a (Å)	15,6979(7)
b (Å)	11,6145(5)
c (Å)	19,7205(8)
β (°)	113,152(2)
Volume (Å ³)	3305,9(2)
Z	8
Densidade(g/cm ³)	1,44
μ (mm ⁻¹)	0,224
F_{000}	1488
2θ máximo (°)	50,8
Reflexões coletadas / independentes / observadas	16054 / 3027 / 2575
Número de parâmetros	226
Completeza	99,9% ($2\theta = 50^\circ$)
Redundância	5,3
Resolução (Å)	0,83
R(int)	2,63
Fatores Residuais [obs]	R1=0,034
	wR2=0,091
Fatores Residuais [all]	R1=0,042
	wR2= 0,097
GooF	1,023
$\Delta\rho_{max}$ (e Å ⁻³)	0,265
$\Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	-0,269

Tabela 5.10: Dados cristalográficos e experimentais do composto LASSBio-1606

Fonte: Elaborada pela autora.

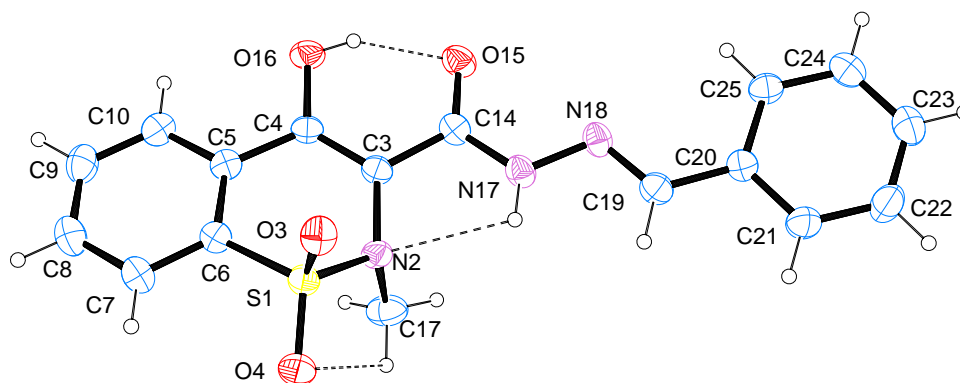


Figura 5.23: Representação [37] da unidade assimétrica do composto LASSBio-1606 com elipsóides a 30% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os anéis C5-C6-C7-C8-C9-C10 (rms deviations = 0,0082 Å) e C20-C21-C22-C23-C24-C25 (rms deviations = 0,0033 Å) se apresentaram planares enquanto que o anel S1-N2-C3-C4-C5-C6 mostrou um grande desvio da planaridade (rms deviations = 0,2003 Å). Os ângulos torsionais na subunidade N-acilidrazona estão listados na tabela 5.11.

Átomos	Ângulo torsional (°)
C3-C14-N17-N18	178,8(1)
C14-N17-N18-C19	-175,0(2)
O15-C14-N17-N18	-1,4(3)
N17-N18-C19-C20	-178,2(2)

Tabela 5.11: Ângulos torsionais na subunidade N-acilidrazona - LASSBio-1606

Fonte: Elaborada pela autora.

A interação de hidrogênio C10-H10...O3ⁱⁱ favorece a formação de um dímero em torno do centro de inversão e esses dímeros se conectam por meio da interação N17-H17...O3ⁱ. Assim, uma cadeia composta por uma dupla camada de moléculas se forma ao longo da diagonal [110]. Na figura 5.24 está ilustrada essa cadeia e na figura 5.25 há um detalhamento das interações presentes, para melhor visualização. Essa dupla cadeia é conectada por meio do contato curto C17-H17...O15ⁱⁱⁱ,

figura 5.26 que se estende ao longo da direção [110].

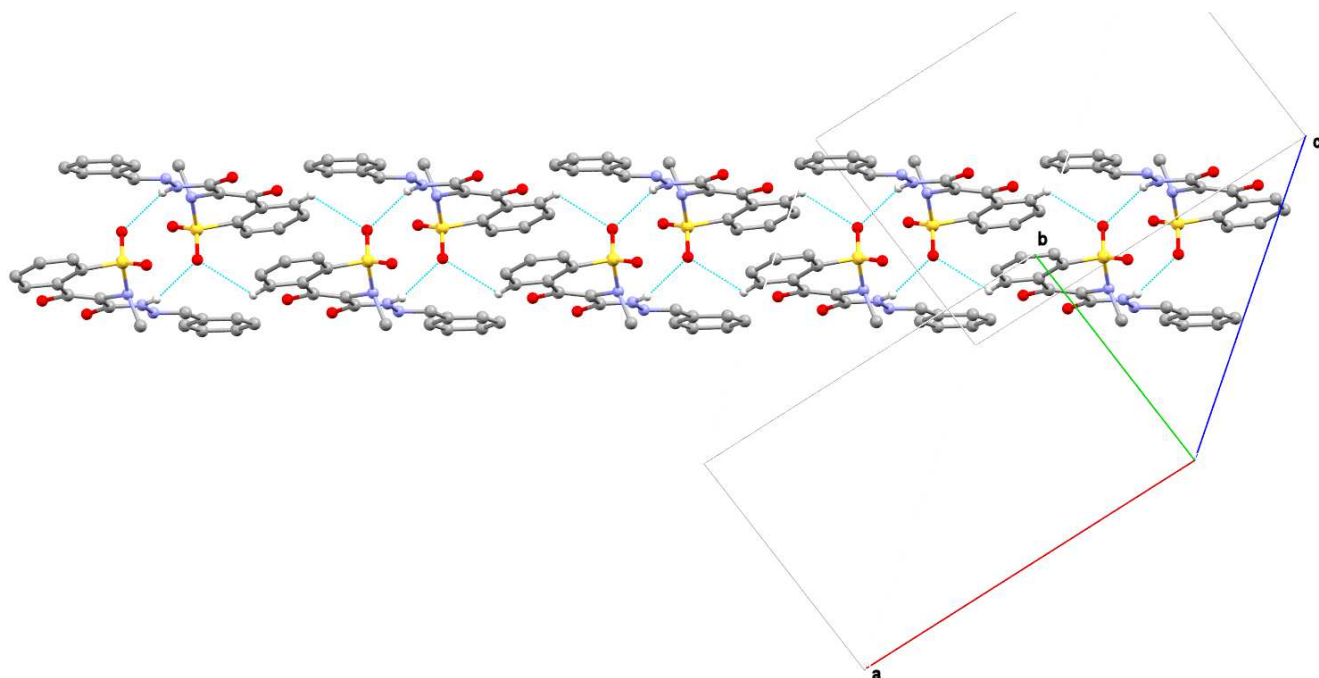


Figura 5.24: Empacotamento [38] do composto LASSBio-1606 ao longo da direção [110]

Fonte: Elaborada pela autora.

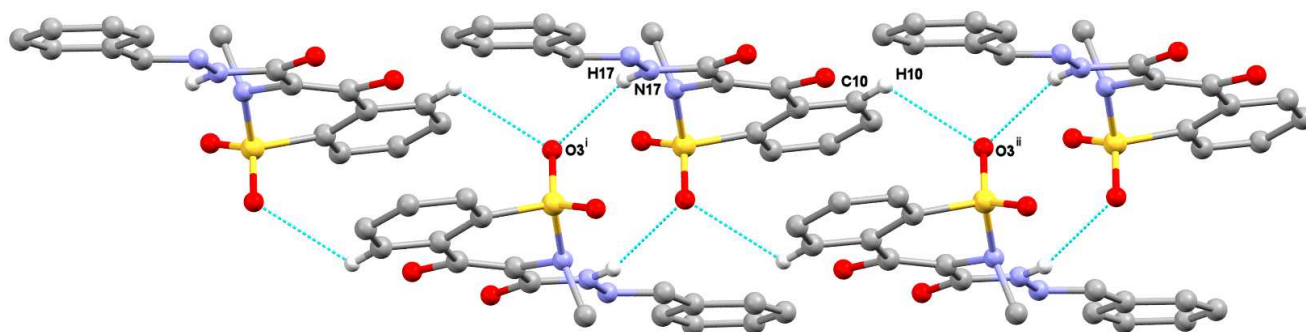


Figura 5.25: Empacotamento [38] do composto LASSBio-1606 ao longo da direção [110] evidenciando as interações presentes

Fonte: Elaborada pela autora.

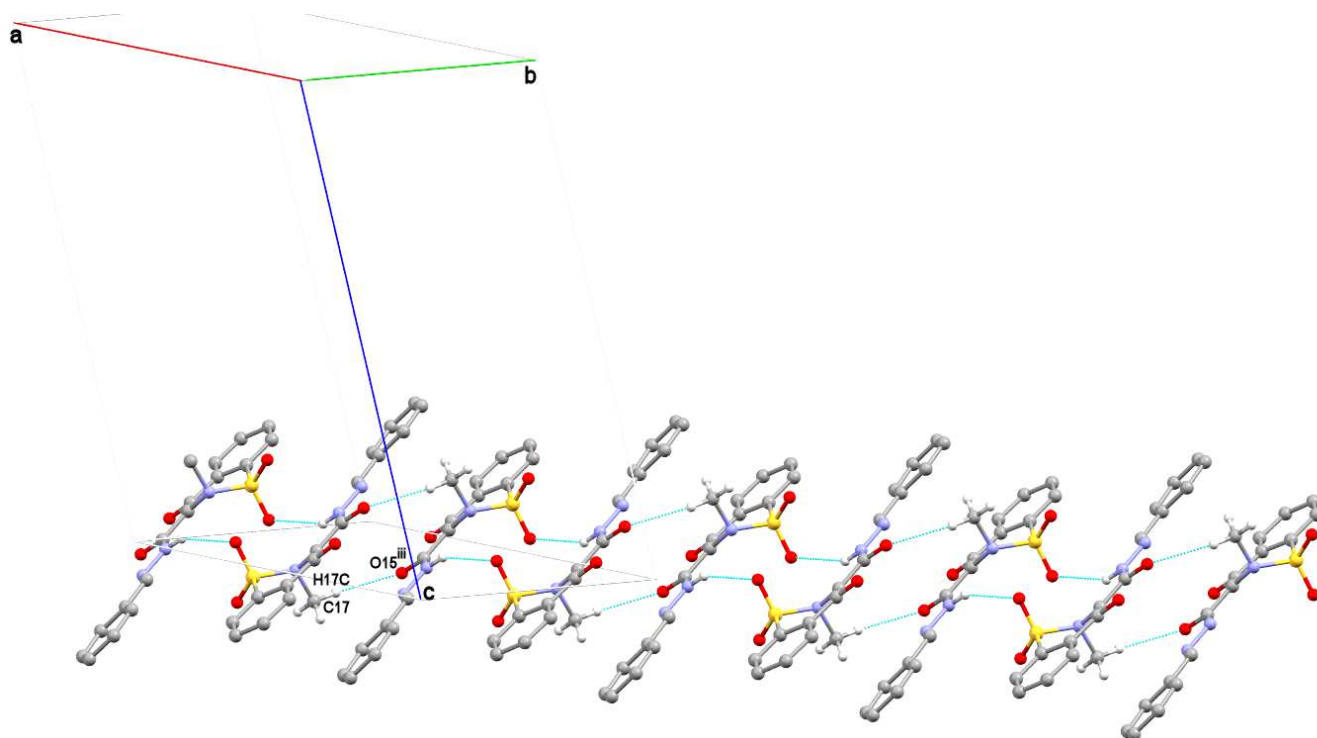


Figura 5.26: Empacotamento [38] do composto LASSBio-1606 ao longo da direção [110]

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao longo da direção [001] a interação fraca C-H... π entre os átomos C8-H8 e o centro de gravidade (Cg1^{iv} [^{iv}: $x, 1 - y, -1/2 + z$]) do anel composto pelos átomos C20-C21-C22-C23-C24-C25 leva à formação de um arranjo do tipo *herringbone*, conforme mostrado na figura 5.27.

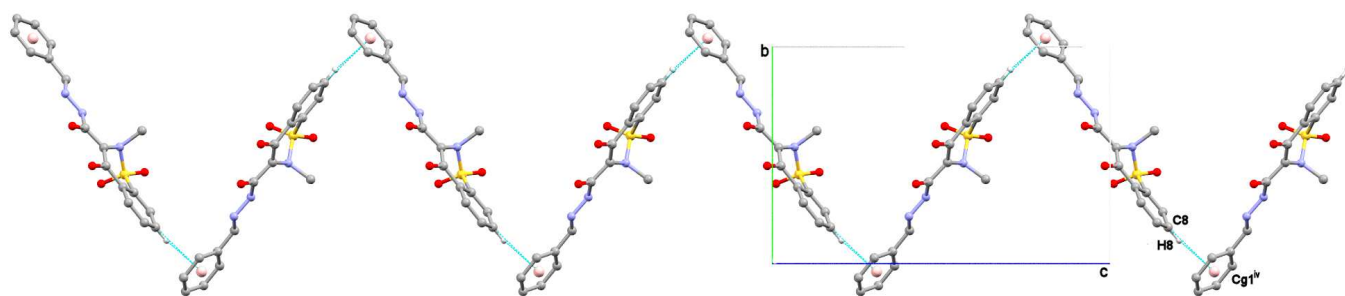


Figura 5.27: Empacotamento [38] do composto LASSBio-1606 ao longo da direção [001]

Fonte: Elaborada pela autora.

D-H...A	D-H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D-H...A (°)	Simetria
N17-H17...O3 ⁱ	0,86	2,39	3,157(3)	149	ⁱ : 2-x, 1-y, 2-z
C10-H10...O3 ⁱⁱ	0,93	2,69	3,270(2)	121	ⁱⁱ : 3/2-x, 1/2-y, 2-z
C17-H17C...O15 ⁱⁱⁱ	0,96	2,55	3,4611(4)	159	ⁱⁱⁱ : 1/2-x, 1/2-y, -z
X-H...Cg	H...Cg (Å)	H-⊥ (Å)	X...Cg (Å)	X-H...Cg (°)	Simetria
C8-H8...Cg1 ^{iv}	2,78	2,77	3,5996(5)	148	^{iv} : x, 1 - y, -1/2 + z]

Tabela 5.12: Ligações de hidrogênio para o composto LASSBio-1606

Fonte: Elaborada pela autora.

Os comprimentos de ligação do anel que contem o grupamento sulfonamida se apresentaram de acordo com outros compostos semelhantes [48, 49], exceto pela ligação C3-C4 que apresentou caráter de ligação dupla (1,359 Å). Esta ligação é de caráter simples nos outros compostos. O encurtamento nesta ligação pode ser explicado pelas ligações de hidrogênio intramoleculares N17-H17...N2 e O16-H16...O15.

5.2.2 Difração de raios X em altas pressões do composto LASSBio-1606

Foram realizadas duas coletas em altas pressões. A determinação da célula unitária em cada pressão foi feita após o término da coleta e foram utilizadas todas as imagens obtidas no experimento, como usualmente é feito para medidas dessa natureza. Os dados referentes às duas células unitárias obtidas estão na tabela 5.13.

A primeira coleta foi realizada sob uma pressão estimada de $3,98 \times 10^7$ Pa. Para a determinação da célula unitária, as reflexões foram selecionadas com base no critério de $I/\sigma(I) \geq 30$. Das reflexões obtidas a partir desse critério, foram selecionadas as reflexões com intensidade menor que 5000 contagens fornecendo um total de 831 reflexões. Os parâmetros de rede obtidos foram: $a = 11,5283(23)$ Å, $b = 15,5901(31)$ Å, $c = 19,0107(38)$ Å, $\beta = 107,4348(30)^\circ$ volume = 3259,771(350) Å³. A célula unitária da primeira coleta apresentou uma redução de volume igual a 46,19 Å³ com relação à célula obtida em pressão ambiente.

A segunda coleta foi realizada sob uma pressão estimada de $8,34 \times 10^7$ Pa. Para a determinação da célula unitária, as reflexões foram selecionadas com base no critério de $I/\sigma(I) \geq 30$. Das re-

flexões obtidas a partir desse critério, foram selecionadas as que tiveram intensidade menor que 2000 contagens, fornecendo um total de 594 reflexões. Os parâmetros de rede obtidos foram: $a = 11,260(15) \text{ \AA}$, $b = 15,197(18) \text{ \AA}$, $c = 18,485(41) \text{ \AA}$, $\beta = 107,591(52)^\circ$ volume = $3259,771(350) \text{ \AA}^3$. A célula unitária da segunda coleta apresentou uma redução de volume igual a 290 \AA^3 com relação à célula obtida em pressão ambiente.

Foram feitas tentativas de aumentar ainda mais a pressão mas a amostra perdeu monocristalinidade, inviabilizando a continuação das coletas.

A célula unitária se tornou primitiva a partir da primeira pressão, perdendo a centragem C que havia em pressão ambiente. Para analisar tal mudança foi escrito um programa que analisou o arquivo de reflexões buscando as extinções sistemáticas. Os dados fornecidos pelo programa comprovaram plenamente essa perda de simetria.

O ângulo β diminuiu com o aumento da pressão assim como o eixo c (tabela 5.13). Observando a figura 5.29, é possível visualizar a variação no ângulo e no eixo em questão. Entre as camadas superior e inferior de moléculas vistas nessa figura, não ocorre nenhuma interação intermolecular relevante, o que favorece o deslizamento entre essas camadas. As moléculas formam o arranjo do tipo *herringbone* ao longo da direção c , figura 5.28, e esse arranjo faz com que as moléculas se comportem como uma mola ao longo dessa direção. A combinação do deslizamento das camadas e o comportamento elástico do empacotamento ao longo da direção c levou ao rearranjo das moléculas nessa direção, favorecendo as variações nos parâmetros acima citadas.

Pela figura 5.30 nota-se o encurtamento do parâmetro a e aumento do parâmetro b . Essa mudança possivelmente ocorreu devido ao rearranjo da unidade assimétrica. Outro fator que suporta a ocorrência desse rearranjo é a pequena variação do volume da célula unitária, permitindo inferir que a unidade assimétrica permanece tendo somente uma molécula, porém em uma nova orientação.

A análise por tensores de strains não foi realizada para esse caso, visto que a variação nos parâmetros não foi infinitesimal.

Ao término das coletas em altas pressões, a amostra foi retirada da câmara sendo feita, imediatamente em seguida, a determinação da célula unitária em pressão ambiente. A transformação descrita

nos parágrafos anteriores foi completamente reversível. A célula unitária em pressão ambiente foi restabelecida. Os parâmetros de rede obtidos pós-coleta em altas pressões foram: $a = 15,6923(4) \text{ \AA}$, $b = 11,6165(3) \text{ \AA}$, $c = 19,7255(5) \text{ \AA}$, $\beta = 113,132(1)^\circ$ e volume = $3306,7(2) \text{ \AA}^3$. Antes da coleta em altas pressões esses parâmetros eram: $a = 15,6979(7) \text{ \AA}$, $b = 11,6145(5) \text{ \AA}$, $c = 19,7205(8) \text{ \AA}$, $\beta = 113,1524(18)^\circ$ volume = $3305,957(350) \text{ \AA}^3$.

Coleta	Pressão (Pa)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	Volume (Å ³)
01	P_{atm}	15,6979(7)	11,6145(5)	19,7205(8)	113,1524(18)	3305,957(350)
02	$3,98 \times 10^7$	11,5283(23)	15,5901(31)	19,0107(38)	107,4348(30)	3260(12)
03	$8,34 \times 10^7$	11,260(15)	15,197(18)	18,485(41)	107,592(52)	3015(14)

Tabela 5.13: Parâmetros de rede para as coletas em alta pressão - LASSBio-1606

Fonte: Elaborada pela autora.

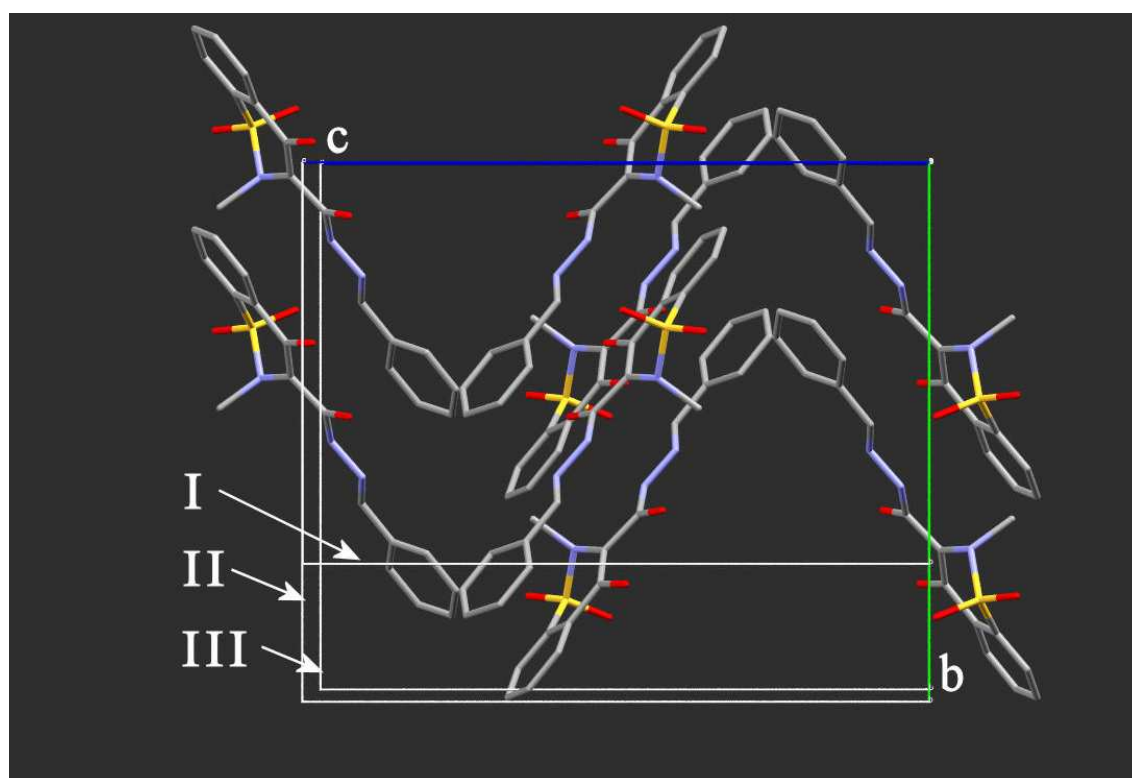


Figura 5.28: Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1606 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano bc. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02.

Fonte: Elaborada pela autora.

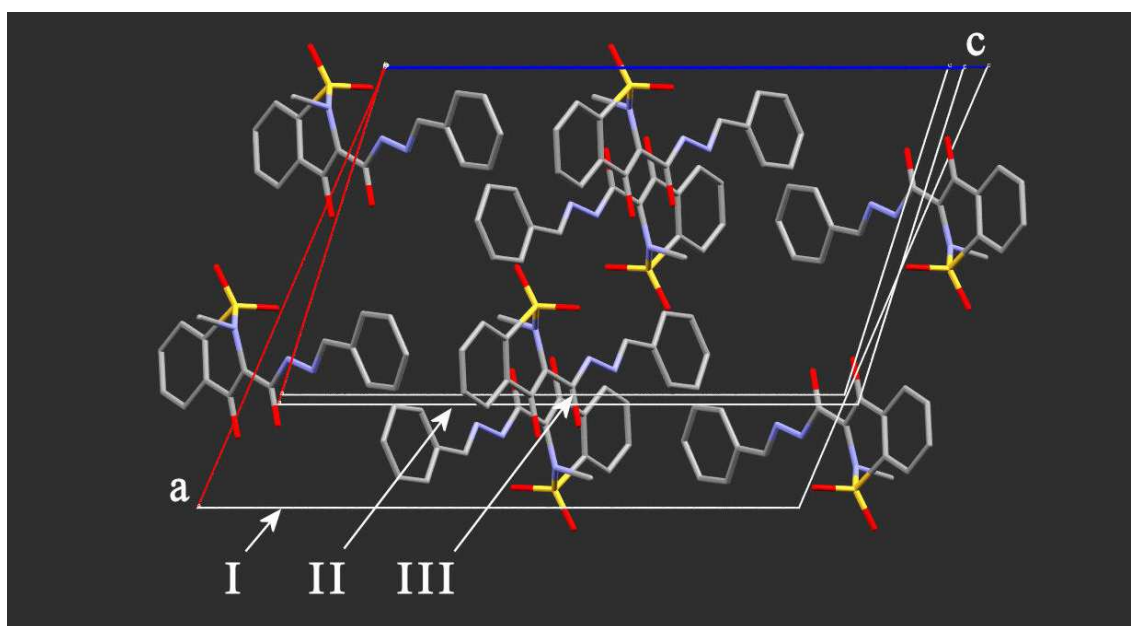


Figura 5.29: Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1606 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano ac. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02.

Fonte: Elaborada pela autora.

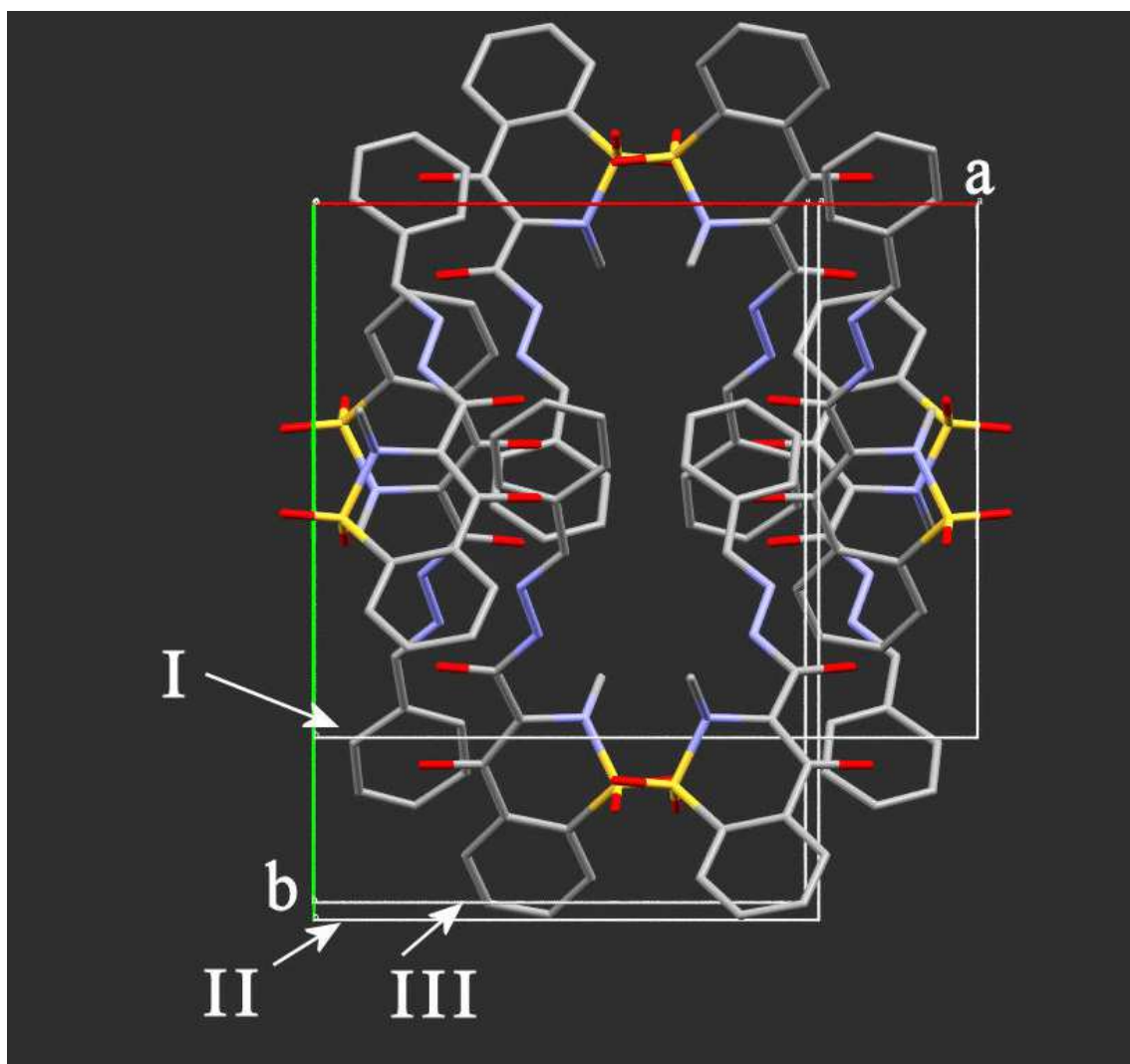


Figura 5.30: Sobreposição [38] das células unitárias do composto LASSBio 1606 em pressão ambiente e em altas pressões - Plano ab. I - Célula unitária em pressão ambiente. II - célula unitária na pressão 01. III - Célula unitária na pressão 02.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Cristalização e determinação da estrutura cristalográfica e molecular do composto LASSBio-1735

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano 8,2 milhões de pessoas vêm a óbito em todo o mundo por complicações causadas pelos mais diversos tipos de câncer [33]. Nesse cenário, o câncer tem sido a segunda causa de morte no mundo, perdendo somente para doenças cardiovasculares. No Brasil, de acordo com Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de

próstata é o mais prevalente entre os homens enquanto que, entre as mulheres, o de mama tem maior incidência. Tendo isso em vista, muitas pesquisas estão sendo conduzidas no sentido de compreender melhor as causas dessa doença, aperfeiçoar as técnicas de diagnóstico para que seja identificada cada vez mais precocemente, aumentando as chances de sobrevivência do paciente bem como identificar fármacos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento.

Nesta seção será apresentada a caracterização estrutural do composto LASSBio-1735 (figura 5.33) que, em testes *in vitro*, mostrou atividade contra diversos tipos de câncer, especialmente contra leucemia. Esses testes foram realizados pelo LASSBio-UFRJ [50], bem como a síntese do composto em questão. O composto LASSBio-1735 foi sintetizado a partir da metilação do composto LASSBio-1586 [51], figura 5.32 (cuja análise cristalográfica foi apresentada na dissertação de mestrado que precedeu este trabalho) que, por sua vez, é um análogo da Combretastina A4 (CA-4), figura 5.31. A CA-4 é um produto natural isolado a partir da *Combretum caffrum*, conhecido por apresentar potente ação inibitória no crescimento de células cancerígenas, mas que possui baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade oral e meia-vida curta, o que afeta sua eficácia.

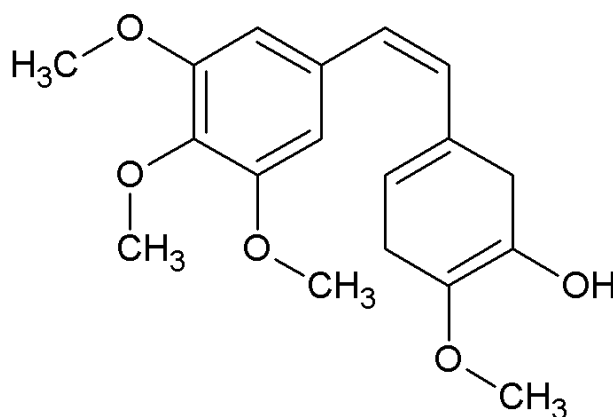


Figura 5.31: Representação plana da Combretastatina A4

Fonte: Elaborada pela autora.

O composto LASSBio-1735 (3,4,5-trimethoxy-N-methyl-N'-[(E)-phenylmethylidene] benzohydrazide), $C_{18}H_{21}N_2O_4S + 2H_2O$, foi cristalizado pelo método de evaporação lenta solubilizando 4,2 mg do composto em uma solução de 0,3 ml de DMSO:Metanol:Diclorometano (2:1:1) à tempera-

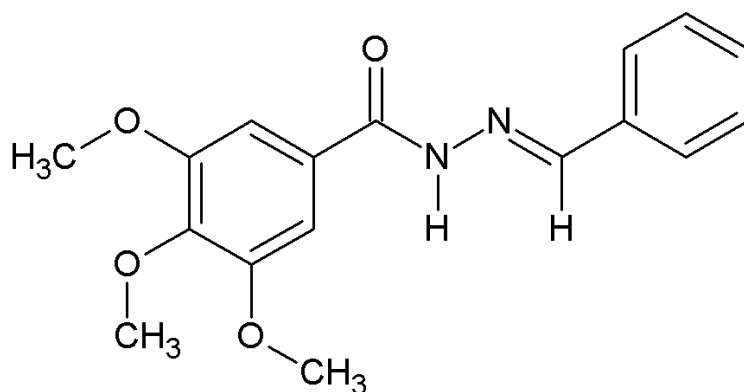


Figura 5.32: Representação plana do composto LASSBio-1586

Fonte: Elaborada pela autora.

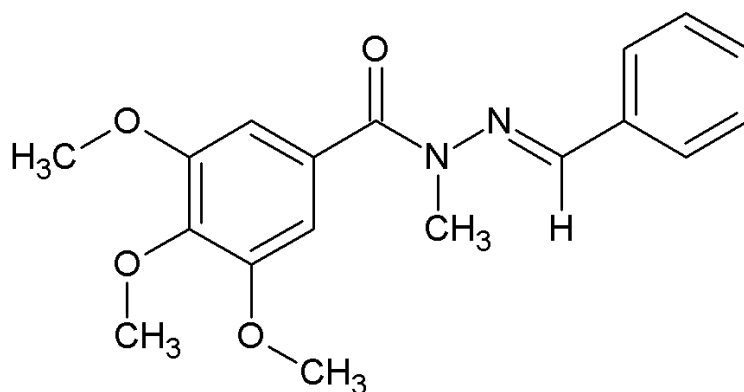


Figura 5.33: Representação plana do composto LASSBio-1735 (fonte: Da autora

Fonte: Elaborada pela autora.

tura ambiente. Os monocristais obtidos são mostrados na figura 5.34. Uma amostra transparente de formato de agulha de dimensões 0.044 mm x 0.125 mm x 0.820 mm foi selecionada com o auxílio de um microscópio com luz polarizada para a coleta de dados de difração de raios X. Para a coleta de dados, o tempo de exposição foi de 200 segundos. Esse tempo mais longo foi escolhido pois, durante a determinação da célula unitária, notou-se que a amostra espalhava muito fracamente em alto ângulo. Nesse sentido, um tempo mais longo de exposição propiciou uma melhora nas intensidades dos picos coletados. Os principais dados cristalográficos estão apresentados na tabela 5.14. A unidade assimétrica do composto LASSBio-1735 está representada na figura 5.35 e contém uma

molécula do composto e duas moléculas de água.

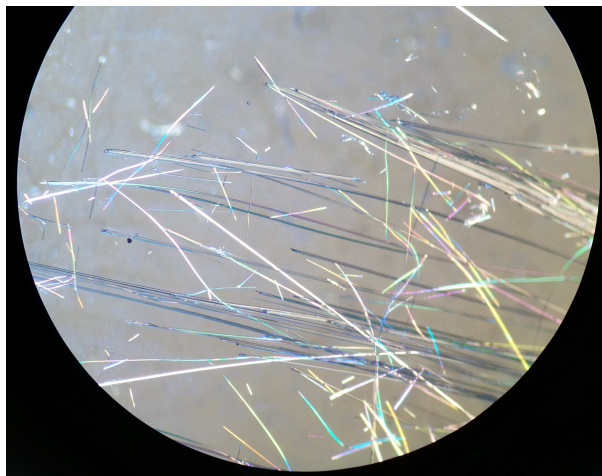


Figura 5.34: Monocristais do composto LASSBio-1735

Fonte: Elaborada pela autora.

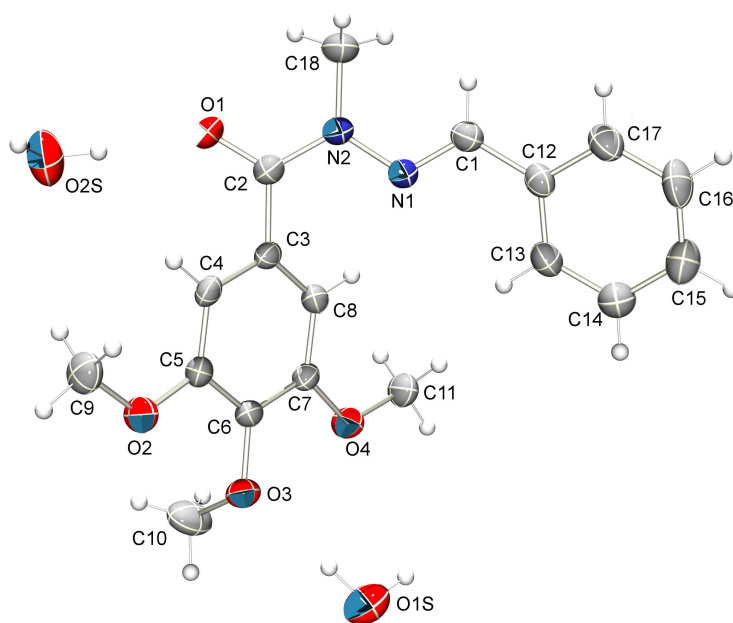


Figura 5.35: Representação [37] da unidade assimétrica do composto LASSBio-1735 com elipsóides a 30% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

O anel benzênico formado pelos átomos C12-C13-C14-C15-C16-C17 foi refinado como grupo

Fórmula	$C_{18}H_{21}N_2O_4S + 2H_2O$
Massa molecular	364,4
Sistema cristalinico	ortorrômbico
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
a (Å)	4,30(1)
b (Å)	18,62(4)
c (Å)	23,87(5)
Volume (Å ³)	1911,4(7)
Z	4
Densidade(g/cm ³)	1,27
μ (mm ⁻¹)	0,095
F_{000}	776
2θ máximo (°)	51,0
Reflexões coletadas / independentes / observadas	8052 / 3565 / 1995
Número de parâmetros	244
Completeza	97,3% ($2\theta = 50^\circ$)
Redundância	2,5
Resolução (Å)	0,83
R(int)	3,98
Fatores Residuais [obs]	R1=0,056
	wR2=0,153
Fatores Residuais [all]	R1=0,102
	wR2= 0,168
GooF	1,151
$\Delta\rho_{max}$ (e Å ⁻³)	0,184
$\Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	-0,168

Tabela 5.14: Dados cristalográficos e experimentais do composto LASSBio-1735

Fonte: Elaborada pela autora.

rígido usando vínculos geométricos para garantir a planaridade e geometria, pois o comprimento de ligação entre os átomos C15 e C16 não estava convergindo satisfatoriamente. O fragmento trimetoxibenzeno (C3/C4/C5/C6/C7/C8/O2/C9/O3 /C10/O4/C11) perdeu a planaridade devido ao átomo C10, que apresenta um desvio de -0,7198(0,0054) Å com relação ao plano formado pelos demais átomos do fragmento. O ângulo diédrico entre os planos formados por esses dois anéis é de 63,3(2)°. Todos os comprimentos de ligação do composto LASSBio-1735 estão de acordo com os comprimentos correspondentes no composto LASSBio-1586, apesar de a conformação das duas moléculas ser bastante diferente, conforme mostra a figura 5.36. Os ângulos torsionais em torno da unidade central da molécula estão listados na tabela 5.15.

Átomos	Ângulo torsional (°)
N2-N1-C1-C12	-177,5(5)
C1-N1-N2-C2	-169,6(6)
N1-N2-C2-C3	-11,9(8)
C18-N2-C2-O1	-6,8(9)
C18-N2-C2-C3	173,1(6)
O1-C2-N2-N1	168,2(6)
C1-N1-N2-C18	5,4(8)

Tabela 5.15: Ângulos torsionais na subunidade central - LASSBio-1735

Fonte: Elaborada pela autora.

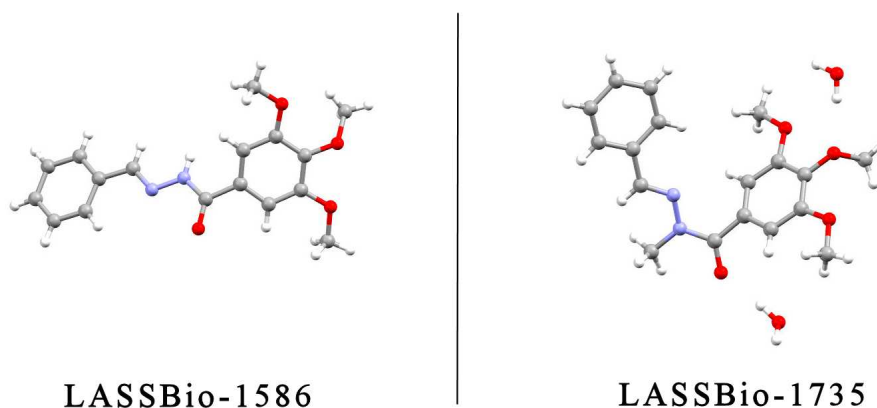


Figura 5.36: Comparação [[38]] da unidade assimétrica dos compostos LASSBio-1586 e LASSBio-1735

Fonte: Elaborada pela autora.

O empacotamento é mediado por ligações de hidrogênio que ocorrem entre moléculas de água e entre as moléculas de água e a molécula do composto. Na figura 5.37 tem-se o empacotamento ao longo da direção [110] que é mediado pela ligação $O1S-H1SA \cdots O3$ e pela ligação $O2S-H2SA \cdots O1$. Essas ligações ocorrem entre moléculas da unidade assimétrica. As ligações entre os átomos $O2S-H2SB \cdots O1S^i$ [$i:1-x, -1/2+y, 1/2-z$] e entre os átomos $O1S-H1SB \cdots O2S^{ii}$ [$ii:2-x, 1/2+y, 1/2-z$] completam o empacotamento nessa direção formando cadeias do tipo "zig-zag".

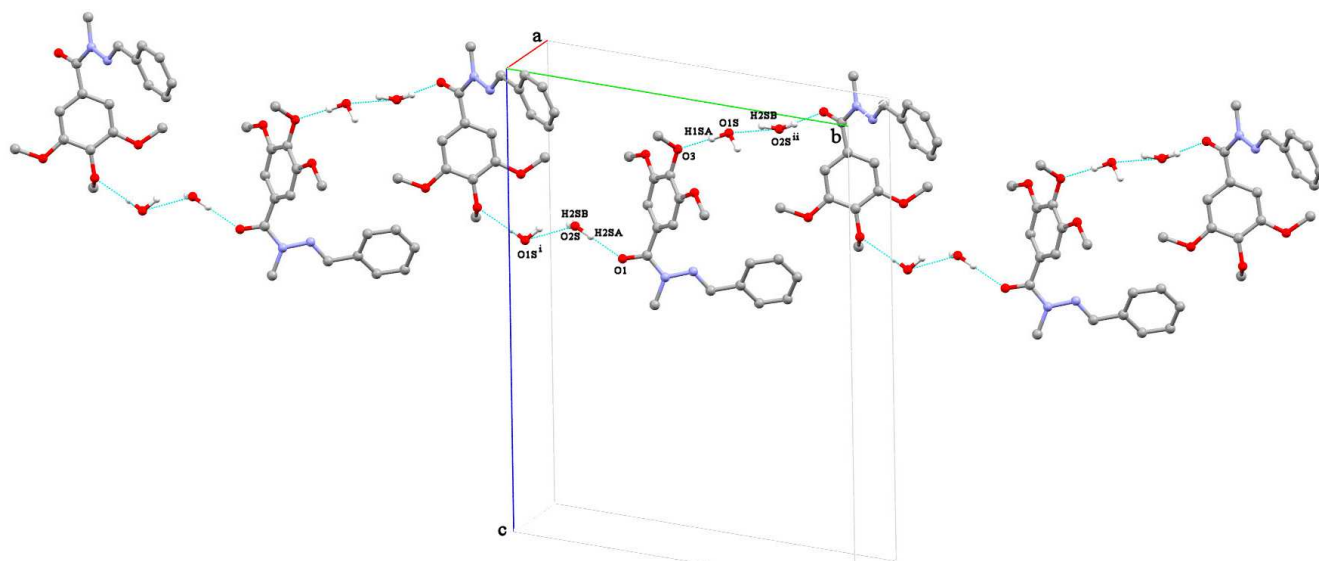


Figura 5.37: Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1735 ao longo da direção [110]

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao longo da direção [100] as moléculas de água preenchem as cavidades mediante as ligações entre as camadas de moléculas, conforme visto na figura 5.38. As camadas de moléculas formadas nessa direção são conectadas por um contato curto entre os átomos $C18-H18C \cdots O1^v$ [$v: 1/2+x, 1/2-y, 1-z$], ilustrada na figura 5.39 preenchendo o espaço ao longo do plano bc.

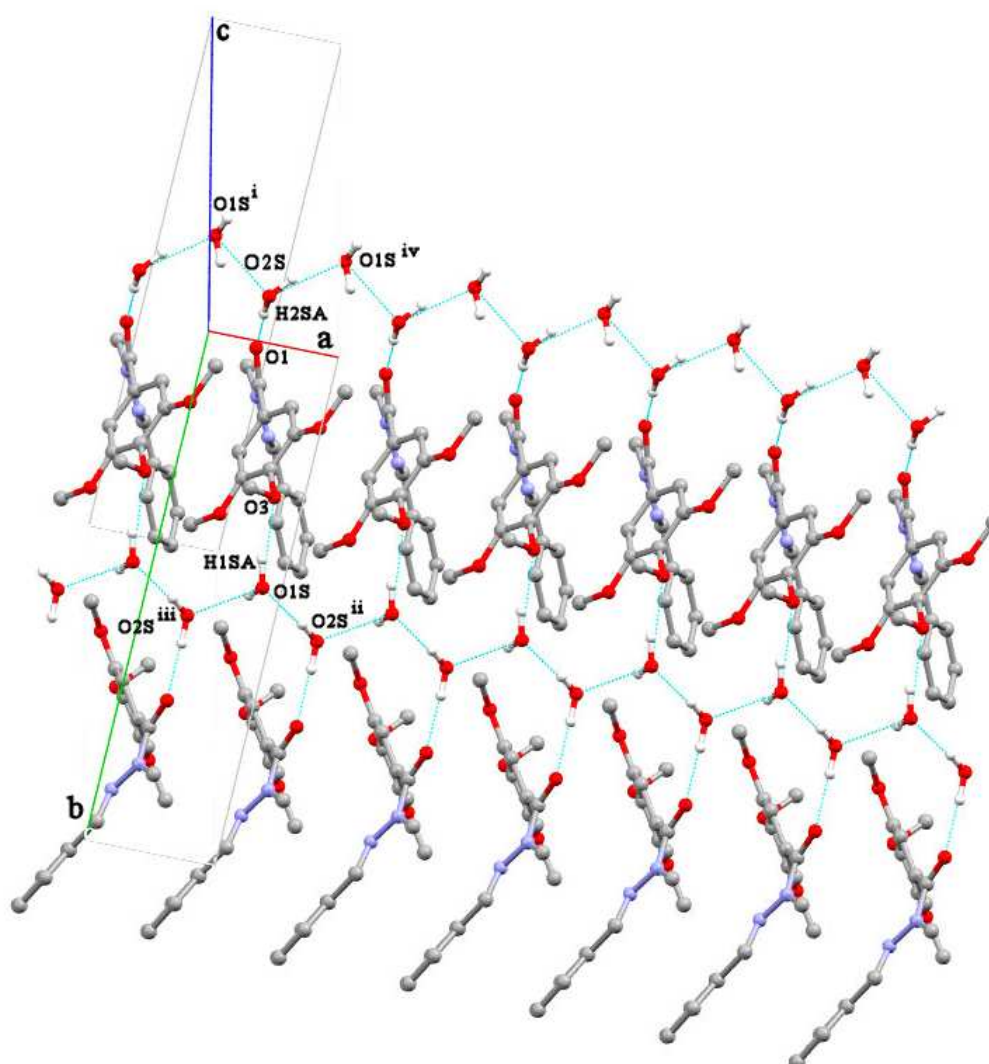


Figura 5.38: Representação [38] do empacotamento do composto LASSBio-1735 ao longo da direção [100] evidenciando as interações entre as moléculas de água e as moléculas do composto.

[Operações de simetria: (i : $1-x, -1/2+y, 1/2-z$), (ii : $2-x, 1/2+y, 1/2-z$), (iii : $1-x, 1/2+y, 1/2-z$), (iv : $1-x, 1/2+y, 1/2-z$)]

Fonte: Elaborada pela autora.

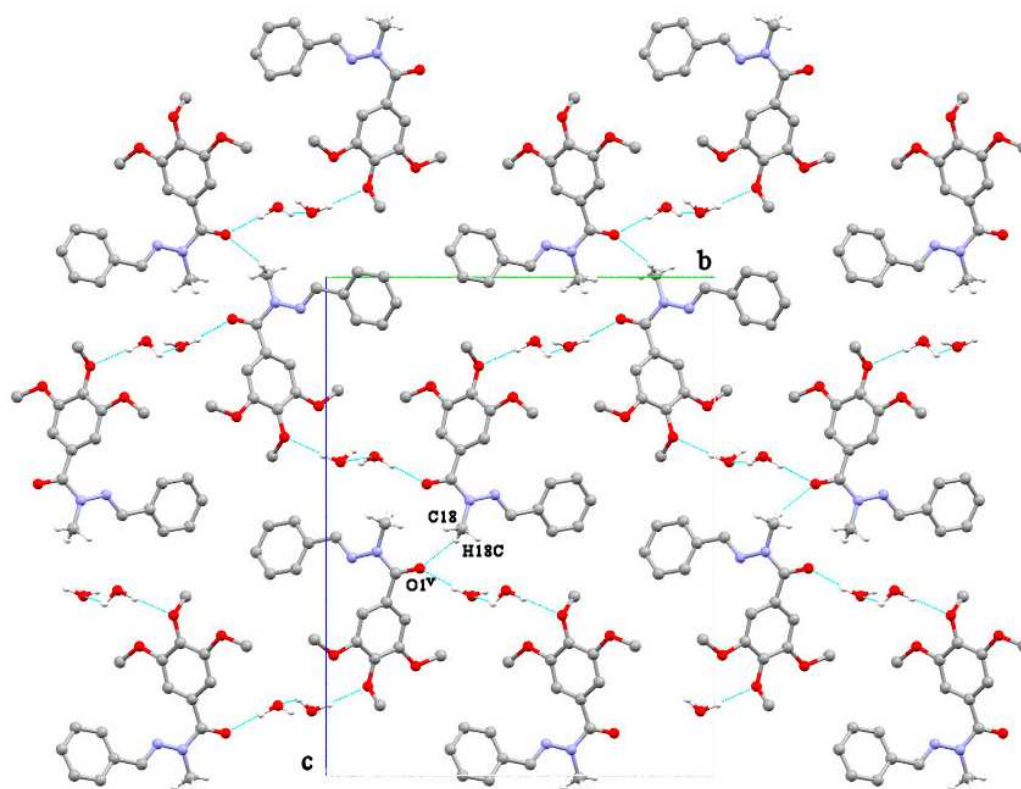


Figura 5.39: Representação [[38]] do empacotamento do composto LASSBio-1735 no plano bc

Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as interações mediadoras do empacotamento citadas nos parágrafos anteriores estão resumidas na tabela 5.16.

D-H...A	D-H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D-H...A (°)	Operação de Simetria
O1S-H1SA...O3	0,92	2,1(2)	2,96(1)	165	
O2S-H2SA...O1	0,92	1,91(7)	2,84(1)	177	
O2S-H2SB...O1S ⁱ	0,92	1,8(2)	2,71(2)	160	ⁱ : 1-x,-1/2+y,1/2-z
O1S-H1SB...O2S ⁱⁱ	0,92	2,1(2)	2,70(1)	121	ⁱⁱ : 2-x,1/2+y,1/2-z
C18-H18C...O1 ^v	0,96	2,59	3,46(1)	152	^v : 1/2+x,1/2-y,1-z

Tabela 5.16: Ligações de hidrogênio para o composto LASSBio-1735

Fonte: Elaborada pela autora.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas

Neste trabalho foi feita a cristalização e determinação das estruturas cristalográficas de quatro compostos candidatos à fármacos: LASSBio-1773, LASSBio-1774, LASSBio-1606 e LASSBio-1735. Foi realizada a análise da influência da pressão em dois desses compostos: LASSBio-1774 e LASSBio-1606. Foi estabelecida a metodologia necessária para realização do experimento de difração de raios X por monocristais em altas pressões utilizando a *DAC*. Essa metodologia incluiu a produção das juntas metálicas utilizando a máquina de eletroerosão, Betsa MH20 (*Spark Eroder Machine*), produção dos eletrodos utilizados na máquina de eletroerosão, planejamento das estratégias de coleta de dados de difração de raios X com a *DAC* e estratégias para tratamento dos dados obtidos.

Os compostos LASSBio-1773 e LASSBio-1774, apesar de diferirem somente por um grupamento metil, apresentaram estruturas cristalinas bem diferentes. No LASSBio-1774 uma molécula de água cocrystalizada com o composto desempenha um papel crucial no empacotamento cristalino.

O LASSBio-1735 difere do LASSBio-1586 por um grupamento metil. Todavia, o LASSBio-1735 cristalizou com duas moléculas de água juntamente com uma molécula do composto, fazendo que o empacotamento cristalino se tornasse bem diferente do empacotamento do LASSBio-1586.

Para o composto LASSBio-1774 foram realizadas coletas em três pressões diferentes. A análise dos resultados para esse composto mostrou uma transição de fase de ortorrômbico para monoclinico. As alterações ocorridas nos parâmetros de rede são justificadas pelo empacotamento em pressão atmosférica. A maior compressão ocorreu ao longo do eixo *c*, pois é a direção ao longo da qual há mais flexibilidade levando em conta o arranjo do tipo *herringbone* formado pelas moléculas,

o que traz um caráter elástico ao empacotamento. O encurtamento dos eixos a e b foi bem mais sutil que ao longo do eixo c , pois o empacotamento não tem a mesma flexibilidade ao longo dessas direções devido à presença de interações intermoleculares mais intensas. O comportamento em altas pressões foi analisado também por meio de tensores de strain. As direções e magnitudes das variações desses tensores com o aumento da pressão descrevem bem os possíveis rearranjos do empacotamento cristalino, visto que o strain que teve maior variação encontra-se praticamente ao longo do eixo c . Ao determinar a célula unitária em condição ambiente após a coleta em altas pressões, verificou-se que os parâmetros de rede retornaram aos valores iniciais (pressão ambiente), mostrando que a transição foi reversível, e que portanto a compressão ocorreu dentro do limite elástico do empacotamento.

Para o composto LASSBio-1606 foram realizadas coletas em duas pressões diferentes. A partir da primeira pressão, a rede cristalina perdeu a centragem do tipo C transicionando para uma rede do tipo primitiva com um encurtamento do eixo a e um aumento do eixo b . Desde a pressão ambiente até o primeiro valor de alta pressão, o volume da célula unitária variou 1,4%, indicando que houve somente um rearranjo da unidade assimétrica. Da segunda para a terceira pressão, os eixos a , b e c diminuíram 2,3%, 2,5% e 2,8% respectivamente, mostrando que o empacotamento nessa nova configuração manteve a maior elasticidade ao longo do eixo c , que é onde ocorre a formação da cadeia do tipo *herringbone*. Após as coletas em altas pressões, foi feita a determinação da célula unitária em pressão ambiente. Os parâmetros de rede retornaram aos valores iniciais, da mesma forma que o composto LASSBio-1774.

Do ponto de vista farmacêutico, para as duas moléculas analisadas em altas pressões, mesmo que ocorra a formação de um polimorfo durante o processo de produção dos fármacos, essa transformação será reversível, não comprometendo a confiabilidade dos mesmos.

Como perspectivas de trabalhos futuros, pretende-se realizar novas medidas em altas pressões dos compostos LASSBio-1774 e LASSBio-1606 aumentando a completeza dos dados e possibilitando a determinação das estruturas cristalográficas dos mesmos. A abordagem a ser utilizada será rotacionar o cristal na DAC a fim de coletar dados para diversas orientações da amostra. Para isso,

necessita-se de um método mais confiável de medida da pressão, garantindo que as coletas serão realizadas todas nas mesmas condições. A utilização de cristais de quartzo como sensores de pressão será explorada.

Bibliografia

- [1] Boldyreva, E., *Non-ambient conditions in the investigation and manufacturing of drug forms*, Current pharmaceutical Design, **22**, 4981-5000, 2016.
- [2] Glusker, J. P., Trueblood, K. N., *Crystal Structure Analysis: A Primer*, Oxford University Press, 1972.
- [3] *Report of the Executive Committee for 1991*, Acta Cryst., A48, 928, 1992.
- [4] Giacovazzo, C., Monaco, H. L., Viterbo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G., Catti, M., *Fundamentals of Crystallography*, 3^a ed., Oxford: IUCR - Oxford University Press, 2002.
- [5] Pinheiro, C.B.; Sabino, J.R., *Curso de Cristalografia Estrutural - UFMG*, 2011
- [6] *International Table for Crystallography*, vol. A, Space Group Symmetry, 5th edição, editada por Theo Hahn. The Netherlands: Springer, 2005.
- [7] Allen, F. H., *The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising*, Acta Cryst. **B58**, 380-388, 2002.
- [8] Stout, G. H., Jensen, L. H., *X-Ray Structure Determination: A Practical Guide*, Macmillan Publishing Company, 1989.
- [9] Sherwood, D., Cooper, J., *Crystals, X-ray and Proteins: Comprehensive Protein Crystallography*, Oxford University Press, 2011.
- [10] Woolfson, M. M., *Direct Methods in Crystallography*. Rep. Prog. Phys. **34**, 369-434, 1971.
- [11] Shmueli, U., *Theories and techniques of crystal structure determination*, IUCr Texts on Crystallography - 9, Oxford Science Publications, 2007
- [12] Muller, P., Irmer, R. H., Spek, A. L., Schneider, T. R., Sawaya, M. R., *Crystal Structure Refinement: A Crystallographer's Guide to SHELXL*, International Union of Crystallography - Monographs on Crystallography (Book 8), Oxford University Press., 2006.
- [13] Van Valkenburg, A., *Visual Observations of High Pressure Transitions*, Rev. Sci. Instrum., **33**, 1462, 1962.

- [14] Merrill, L., Bassett, W. A., *Miniature diamond anvil pressure cell for single crystal x-ray diffraction studies*, Rev. Sci. Instrum., **45**, n 2, 1974.
- [15] Klotz, J., *Hydrostatic limits of 11 pressure transmitting media*, Phys. D: Appl. Phys. **42**, 2009.
- [16] Fabbiani, F.P.A.; Pulham, C.R., *High-pressure studies of pharmaceutical compounds and energetic material*, Chemical Society Reviews, **35**, 2932-942, 2006.
- [17] Bernstein, J., *Polymorphism in Molecular Crystals*, International Union of Crystallography - Monographs on Crystallography (Book 14), Oxford University Press, 2008.
- [18] Boldyreva, E.V., Ashbahr, H., Weber, H.-P. *A comparative study of pressure-induced lattice strain of polymorphs of glycine Z*, Kristallogr., **218**, 231-236, 2003.
- [19] Dawson, A., Allan, D. R., Belmonte, S. A., Clark, S. J., David, W. I. F., McGregor, P. A., Parsons, S., Pulham, C. R., Sawyer, L., *Effect of high pressure on the crystal structures of polymorphs of glycine*, Crystal Growth and Design, **5**, No. 04, 1415-1427, 2005.
- [20] Pruzan, P., Chervin, J. C., et al., *Transformation of benzene to a polymer after static pressurization to 30 GPa*, J. Chem. Phys., **92**, 6910-6915, 1990.
- [21] Piermarini, G. J., Block, S., Barnett, J. D., Forman, R. A., *Calibration of the pressure dependence of the R_1 ruby fluorescence line to 195 kbar*, Journal of applied physics **46**, n. 6, 2774-2780, 1975.
- [22] Weir, C. E., Lippincott, E. R., Van Valkenburg, A., Bunting, E. N., *Infrared Studies in the 1- to 15-Micron Region to 30,000 Atmospheres*, Journal of Research of the National Bureau of Standards-A, **63A**, No. I, July-August 1959.
- [23] Forman, R. A., Piermarini, G. J., Barnett, J. D., Block, S., *Pressure Measurement Made by the Utilization of Ruby Sharp Line Luminescence* Science, **176**, 284-285, 1972.
- [24] Katrusiak, A.; McMillan, P., *High-pressure crystallography*, Proceeding of the NATO Advanced Research Workshop on High-pressure crystallography - Springer Science Business Media - LLC, Erice, Italy, 2003.
- [25] Muller, P., *Practical suggestions for better crystal structures*, Crystallography Reviews, **15**, 57-83, 2009.
- [26] Bruker, SAINT, Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2007.
- [27] Sheldrick, G. M., SADABS, Germany: Program name, 1996.

- [28] Farrugia, L. J., *WinGX - suite for small molecule single crystal crystallography*. J. Appl. Cryst., **32**, 837-838, 1999.
- [29] Couzinet, B., et al., *Optically monitored high-pressure gas loading apparatus for diamond anvil cells*, High Pressure Res., **23**, n. 4, 409-415, 2003.
- [30] Amsbury, C. R., *A spark eroder machine*, Model Engineer, *16*, 1976.
- [31] da Silva, K. P., *Propriedades estruturais e eletrônicas do cristal L-fenilalanina ácido nítrico e estrudo vibracional sob condições extremas de pressão e temperatura*, 2014. Tese (Doutorado em Física) - Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- [32] *International Diabetes Federation. IDF Diabetes*, 7 ed., Brussels, Belgium, 2015. <http://www.diabetesatlas.org>.
- [33] W.H. Organization, *World Cancer Report 2014*, International Agency for Research on Cancer (IARC), 2014.
- [34] Zapata-Sudo, G., Lima, L. M., Pereira, S. L., Trachez, M. M., Costa, F. P., Souza, B. J., Monteiro, C. E. S., Romeiro, N. C., D Andréa, E. D., Sudo, R. T., Barreiro, E. J., *Docking, Synthesis and Anti-Diabetic Activity of Novel Sulfonylhydrazone Derivatives Designed as PPAR-Gamma Agonists*, Current Topics in Medicinal Chemistry, **12**, 2037-2048, 2012.
- [35] Ogu, C. C. and Maxa, J. L., *Drug interactions due to cytochrome P450*, BUMC Proceedings, **13**, n. 4, 421-423, 2000.
- [36] Zapata Sudo, G., Karine, I., Soares, J., Fernandes, T., Costa, F. P., Sudo, R. T., Lima, L. M., *Synthesis, solubility, plasma stability and pharmacological evaluation of novel sulfonylhydrazones designed as anti-diabetic agents*, Drug Design, Development and Therapy, **10**, 28692879, 2016.
- [37] Farrugia, L. J., *ORTEP-3 for Windows - A version of ORTEP-III with a graphical user interface (GUI)*, J. Appl. Cryst., **30**, 565, 1997
- [38] Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodriguez-Monge, L., Taylor, R., van de Streek, J. and Wood, P. A., *Mercury CSD 2.0 - New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures*, J. Appl. Cryst., **41**, 466-470, 2008.

- [39] Sheldrick, G. M., *SHELXS-97 - Program for the Solution of Crystal Structures*, University of Göttingen, Germany, 1997.
- [40] Sheldrick, G. M., *SHELXL-97 Program for the Refinement of Crystal Structures*, Germany: University of Göttingen, 1997.
- [41] Nardelli, M., *Modeling hydroxyl and water H atoms*, *Journal of Applied Crystallography*, **32**, 563-571, 1999.
- [42] Angel, R. J., *WinStrain - A program to calculate strain tensors from unit-cell parameters*, 2011.
- [43] Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*, *Nature*, **454**, 428435, 2008.
- [44] Whitehouse, M. W., *Drugs to treat inflammation: A historical introduction*, *Curr. Med. Chem.*, **12**, 29312942, 2005.
- [45] Hobbs, Y. D. C.; Twomey, T. M. J., *Piroxicam pharmacokinetics in man: Aspirin and antacid interaction studies*, *Clin. Pharmacol.*, **19**, 270281, 1979.
- [46] Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J., *Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: New lead-compounds of analgesic, Antiinflammatory and antithrombotic drugs* *Curr. Med. Chem.*, **13**, 167198, 2006.
- [47] Miranda, A. S., Junior, W. B., da Silva, Y. K. C., Alexandre Moreira, M. S., Castro, R. P., Sabino, J. R., Lião, M. L., Lima, L. M., Barreiro, E. J., *Design, synthesis, antinociceptive and anti-inflammatory activities of novel piroxicam analogues*, *Molecules*, **17**, no.12, 14126-14145, 2012.
- [48] King, J. F., Yuyitung, G., Gill, M. S., Stewart, J. C., Payne, N. C., *Stereoelectronic effects in sulfonyl compounds: axial orientation of an N methyl group in a six membered sultam.*, *Canadian Journal of Chemistry*, **76**, 164-170, 1998.
- [49] Hanessian, S., Sailes, H., Therrien, E., *Synthesis of functionally diverse bicyclic sulfonamides as constrained proline analogues and application to the design of potential thrombin inhibitors*, *Tetrahedron*, **59**, 7047-7056, 2003.
- [50] Costa, F. N.; Ibiapino, A. L.; Figueiredo, L. P.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; Amaral, D. N.; Castro, C. E.; Giacomelli, F. C.; Ferreira, F. F.; *Preliminary evaluation of the encapsulation of new antidiabetic sulphonylhydrazone and antitumor Nacylhydrazone derivatives using PLGA nanoparticles*, *J. Phys. Conf. Ser.*, **617**, 1-9, 2015.

- [51] Amaral,D.N.; Cavalcanti,B.C.; Bezerra,D.P.; Ferreira,P.M.; Castro,R.P.; Sabino,J.R.; Machado, C.M.L.; Chammass,R.; Pessoa,C.; Sant'ana,C.M,R.; Barreiro,E.J.; Lima,L.M., *Docking, Synthesis and Antiproliferative Activity of NAcylhydrazone Derivatives Designed as Combretastatin A4 Analogues*, Plos One, **9**, 1-16, 2014.