

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS  
E MATERIAIS AVANÇADOS

*Amanda Laura Ibiapino*

**Caracterização físico-química dos derivados sulfonilidrazônicos –  
LASSBio-1773 e LASSBio-1774 – empregados no tratamento do  
diabetes mellitus tipo 2**

Santo André - SP  
**2016**

*Amanda Laura Ibiapino*

**Caracterização físico-química dos derivados sulfonilidrazônicos –  
LASSBio-1773 e LASSBio-1774 – empregados no tratamento do  
diabetes mellitus tipo 2**

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados da Universidade Federal do ABC como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Nanociências e Materiais Avançados.*

**Orientador: Prof. Dr. Fabio Furlan Ferreira**

**Santo André - SP  
2016**

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

Santo André, 03 de fevereiro de 2017.

Assinatura do autor: Amanda Louisa Chiapina

Assinatura do orientador: \_\_\_\_\_



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Fundação Universidade Federal do ABC**  
**Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados**  
Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP  
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017  
ppg.nanomat@ufabc.edu.br

### FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Amanda Laura Ibiapino, realizada em 13 de dezembro de 2016:

  
Prof.(a) Dr.(a) **Fabio Furlan Ferreira** (UFABC) – Presidente

  
Prof.(a) Dr.(a) **Juliana Marchi** (UFABC) – Membro Titular

  
Prof.(a) Dr.(a) **Herculano da Silva Martinho** (UFABC) – Membro Titular

  
Prof.(a) Dr.(a) **Flavio Machado de Souza Carvalho** (USP) – Membro Titular

  
Prof.(a) Dr.(a) **Marcia Carvalho de Abreu Fantini** (USP) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Márcia Tsuyama Escote** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Roosevelt Droppa Junior** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Jean Jacques Bonvent** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Luiz Fernando Grespan Setz** (UFABC) – Membro Suplente



Universidade Federal do ABC

*"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes."*

*(Martin Luther King)*

*"Dedico este trabalho ao meu Deus, ao meu amor maior, aquele que está ao meu lado nos momentos bons e ruins dessa vida. Aquele que me sustenta e me consola em dias de angústia. Aquele que sempre me diz: não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça (Isaias 41:10). A ti Senhor, meus sinceros agradecimentos. Obrigada porque nos dias em que eu me sentia fraca, tú me fizestes forte. Obrigada porque com a tua ajuda eu consegui realizar um dos maiores sonhos da minha vida."*

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus pais **Maria Auxiliadora da Silva Ibiapino** e a **João Ibiapino** pelo amor incondicional, pelo incentivo aos estudos, pelas renúncias para que eu pudesse ter uma boa educação e principalmente, por mostrarem que vale a pena acreditar nos nossos sonhos. Obrigada pela compreensão, pela confiança que sempre depositaram em mim, por estarem ao meu lado em todos os momentos, por todas as palavras de apoio e por todo carinho que sempre me deram. Mas, em especial vai meu agradecimento a minha mãe, a qual nos momentos de angústia e de preocupação sempre me deu uma palavra de renovo, sempre me dizia para não desistir, porque este era meu sonho. Mãe, obrigada por tudo, suas orações foram essenciais nestes anos. Esta conquista é nossa.

À minha irmã querida, **Micheli Vivian Ibiapino** e ao meu cunhado **Jorge Fernando de Souza** que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando em orações. Obrigada por todo carinho e amor demonstrado por mim e principalmente, por terem cuidado da minha amada mãe durante minha ausência. A ajuda de vocês foi de grande valor neste período. E por fim, não poderia deixar de agradecê-los pela vida da minha linda sobrinha **Ana Beatriz Ibiapino de Souza**, a pureza dela me contagia todos os dias. Te amo minha pequena.

À minha vó **Osmanda Almeida da Silva** e a minha tia **Teresinha Maria de Lima**, pelo amor, carinho e pelas orações. Vocês são uma bênção na minha vida.

Às minhas primas **Daniela Cláudia da Costa Silva** e **Tânia Danubia de Lima** que mesmo longe sempre me apoiaram em tudo. A amizade de vocês é uma dádiva para mim.

À minha amiga e irmã, **Laysa Pires de Figueiredo** por estar ao meu lado nestes longos anos de estudo. Seu conhecimento profissional foi de um valor imensurável para a conclusão deste trabalho. Obrigada pelos 11 anos de amizade, pelo amor, carinho e principalmente, pela parceria. Nesta cidade conseguimos superar e vencer tantas coisas - vivemos dias de luta e dias de vitória; choramos, mas também sorrimos bastante. Enfim, passamos por momentos difíceis, mas vencemos pela graça do nosso Deus. Flor, meu muitíssimo obrigada.

Ao meu orientador **Fabio Furlan Ferreira**, pela orientação, pelo incentivo, pela dedicação e paciência nestes anos de convivência. Sua experiência e seus conhecimentos foram essenciais para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. **Eliezer J. Barreiro** e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> **Lidia Moreira Lima** do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em ceder gentilmente as amostras avaliadas neste trabalho. Muito obrigada.

Ao Prof. **Dr. Humberto G. Ferraz** e ao seu aluno de mestrado **Eduardo José Barbosa** do Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica (DEINFAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, pelos ensaios de dissolução intrínseca.

Ao Prof. Dr. **Francesco Punzo** (Universidade De Catania, Itália), pela colaboração nos cálculos da predição da morfologia (método GM).

Ao técnico **Rafael Pereira** do Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais (LCCEM-UFABC), pela atenção e disposição em auxiliar nosso grupo de pesquisa.

À **Central Experimental Multiusuário (CEM-UFABC)** por disponibilizar excelentes equipamentos para a realização das medidas de análise térmica (DSC e TG).

Ao **Laboratório Didático IV** da Universidade Federal do ABC, por disponibilizar o medidor do ponto de fusão e o equipamento de FTIR para realização das análises. Em particular, o meu agradecimento ao técnico **Victor** pelo treinamento do equipamento de FTIR.

Ao **Laboratório de Física (L 403-3)** do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura. Mas em especial, meus agradecimentos ao técnico **Pedro Anastácio da Silva**, pela disposição em auxiliar nas análises.

À **banca examinadora** pelas contribuições e tempo dedicado à avaliação da tese.

Ao programa de **Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados** pela infraestrutura fornecida, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho de doutorado.

À **UFABC** e à **CAPES** pela bolsa de doutorado fornecida, à **FAPESP** e ao **CNPQ** pelos recursos financeiros do projeto de pesquisa.

Por fim, quero agradecer aos meus familiares, amigos e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

*A todos, e em especial ao meu bom Deus, muito obrigada.*



## Sumário

Resumo .....	xi
Abstract .....	xii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas .....	xv
Lista de abreviaturas .....	xvi
<b>1-Introdução .....</b>	<b>18</b>
<b>2-Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>20</b>
2.1-Diabetes Mellitus.....	20
2.2-Tratamento farmacológico.....	27
2.3-Novos derivados sulfonilidrazônicos: LASSBio-1773 e LASSBio-1774.....	29
<b>3-Técnicas empregadas na caracterização estrutural dos candidatos a fármacos .....</b>	<b>32</b>
3.1-Difração de raios X (DRX).....	32
3.1.1-A produção de raios X .....	32
3.1.2- Sistema cristalino .....	36
3.1.3-Lei de Bragg.....	38
3.1.4- Difração de raios X por policristais (DRXP).....	40
3.2- Determinação da estrutura cristalina a partir de dados de DRXP .....	43
3.3-Método de Rietveld (MR) .....	47
3.4-Análise Térmica.....	51
3.4.1-Calorimetria exploratória diferencial .....	52
3.4.2- Termogravimetria .....	54
3.5-Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	56
3.6- Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	59
3.7- Dissolução Intrínseca (DI).....	62
<b>4-Objetivos.....</b>	<b>66</b>
4.1- Objetivos gerais .....	66
4.2- Objetivos específicos.....	66
<b>5-Metodologia .....</b>	<b>67</b>
5.1-Materiais .....	67
5.2-Condições experimentais das análises.....	69
5.2.1-Difração de raios X por policristais (DRXP).....	69

5.2.2-Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	70
5.2.3-Termogravimetria (TG) .....	71
5.2.4-Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	71
5.2.5- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	71
5.2.6- Predição da morfologia do cristal .....	71
5.2.7- Dissolução intrínseca (DI) .....	73
<b>6-Resultados e discussões.....</b>	<b>74</b>
<b>6.1-Candidatos a fármacos: LASSBio-1773 e LASSBio-1774 .....</b>	<b>74</b>
6.1.1-Difração de raios X por policristais (DRXP) .....	75
6.1.2- Determinação estrutural.....	77
6.1.3- Análise térmica.....	80
6.1.4- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	87
6.1.5-Redeterminação estrutural do candidato a fármaco - LASSBio-1774 .....	89
6.1.6- Descrição das estruturas cristalinas .....	92
6.1.7- Refinamentos de Rietveld.....	98
6.1.8 Avaliação da morfologia e da velocidade de dissolução intrínseca.....	102
<b>7-Conclusão.....</b>	<b>109</b>
<b>8-Referências Bibliográficas .....</b>	<b>110</b>
<b>9-Anexos .....</b>	<b>117</b>

## Resumo

Diabetes mellitus é um problema de saúde pública com elevado ônus social e econômico. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é o subtipo mais comum e está presente em 90% a 95% dos casos. Atualmente, pessoas portadoras de DM2 têm apresentado um risco elevado no desenvolvimento de alguns tipos de cânceres, o que gera uma maior preocupação sobre a saúde a nível mundial. Diante do aumento da incidência de portadores da doença a cada ano e do impacto mundial que o diabetes vem atingindo, o propósito principal desta tese consistiu em realizar a caracterização físico-química dos candidatos a fármacos - LASSBio-1773 e LASSBio-1774, ambos os compostos apresentam atividade hipoglicemiante e são efetivos na neuropatia diabética periférica. Além da atividade hipoglicemiante, o LASSBio-1774 apresenta também atividade anti-inflamatória, o que faz do composto extremamente promissor para o tratamento do DM2. A caracterização físico-química dos compostos foi realizada pela difração de raios X por policristais (DRXP), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), dissolução intrínseca (DI) e estudos da predição da morfologia dos cristais pelo método GM (*growth morphology method*). Pelas análises dos padrões de difração foi verificado que os candidatos a fármacos são de moléculas cristalinas e de baixa simetria. No processo de indexação com os dados de DRXP foi observado que os compostos cristalizaram em sistemas ortorrômnicos, porém em diferentes grupos espaciais. O LASSBio-1773 cristalizou no grupo espacial  $P2_12_12_1$  e o LASSBio-1774 no grupo espacial  $Pbca$ . Pela análise dos dados de TG/DTG foi determinada a estabilidade térmica dos compostos. Por meio dos dados de DSC foram determinados a fusão e a pureza dos compostos. Com os dados de DSC, TG e FTIR pôde-se caracterizar o LASSBio-1773 como uma molécula anidra e o LASSBio-1774 como uma molécula monohidratada. Nas fotomicrografias de MEV e nos estudos da predição da morfologia dos cristais foram evidenciados diferentes formas de cristais para os compostos. Pelos ensaios de DI pôde-se classificar o LASSBio-1773 e o LASSBio-1774 monohidratado como compostos de baixa solubilidade.

**Palavras-chave:** diabetes mellitus tipo 2, difração de raios X por policristais, análise térmica, predição da morfologia do cristal e velocidade de dissolução intrínseca.

## Abstract

Diabetes mellitus is a public health problem with high social and economic burden. The type 2 diabetes mellitus is the most common type and is present in 90% to 95% of cases. Currently, people with type 2 diabetes mellitus have shown a high risk of developing some types of cancer, which generate a great concern about health on a global level. Given the increasing incidence of individuals with the disease each year and due to the worldwide impact that diabetes has reached, the main purpose of this thesis was to conduct the physicochemical characterization of two parent compounds - LASSBio-1773 and LASSBio-1774, both compounds exhibit hypoglycemic activity and display an anti-neuropathy effect. In addition to the hypoglycemic activity, the LASSBio-1774 also exhibits anti-inflammatory activity, making this compound extremely promising for the treatment of type 2 diabetes mellitus. The physicochemical characterization of the compounds was performed by X-ray powder diffraction (XRPD), thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), intrinsic dissolution (ID) and studies of morphology prediction by growth morphology method (GM method). The analysis of the diffraction patterns evidenced that the pharmaceutical candidates are crystalline molecules of low symmetry. Both compounds crystallized in orthorhombic space groups – LASSBio-1773 crystallized in the  $P2_12_12_1$  and LASSBio-1774 in the  $Pbca$  space groups. By means of the TG/DTG data we determined the thermal stability of the compounds. By DSC we observed the fusion and purity of the compounds. With the results from DSC, TG and FTIR it was possible to characterize the LASSBio-1773 as an anhydrous molecule and LASSBio-1774 as a monohydrate one. By inspection of the SEM photomicrographs and the studies of crystal morphology prediction we observed different crystal forms for the compounds. By intrinsic dissolution tests we could classify both LASSBio-1773 and 1774-LASSBio monohydrate as low solubility compounds.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus, X-ray powder diffraction, thermal analysis, crystal morphology prediction and intrinsic dissolution rate.

## Lista de Figuras

Figura 1: Principais sintomas do DM2.....	22
Figura 2: Ilustração dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do DM2.....	23
Figura 3: Principais complicações a longo prazo do DM.....	25
Figura 4: Ilustração da neuropatia diabética periférica.....	26
Figura 5: Estruturas químicas da rosiglitazona, pioglitazona e troglitazona.....	28
Figura 6: Modificação estrutural do tipo regioisomerismo na subunidade ácida do LASSBio-331.....	29
Figura 7: Modificações estruturais no derivado sulfonilidrazônico LASSBio-1471 para formação do LASSBio-1773 e a N-metilação na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1773 para formação do LASSBio-1774.....	30
Figura 8: Estrutura química do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774.....	31
Figura 9: Representação esquemática de um tubo de raios X.....	33
Figura 10: Produção de raios X a nível atômico.....	34
Figura 11: Representação de um espectro de emissão de raios X produzido quando se utiliza o Mo e o Cu como ânodo.....	34
Figura 12: Os níveis atômicos de energia e as emissões de radiação referentes a cada transição.....	35
Figura 13: Representação da cela unitária em suas três dimensões.....	36
Figura 14: Representação das 14 redes de Bravais.....	38
Figura 15: Representação do fenômeno da difração.....	39
Figura 16: Diagrama esquemático da sequência das etapas envolvidas na determinação da estrutura cristalina a partir de dados de DRXP.....	44
Figura 17: Representação de um refinamento de Rietveld, onde o padrão calculado está representado pela linha contínua vermelha; o padrão observado pelo símbolo “o” em preto; radiação de fundo ou background pela linha contínua verde; a diferença entre o observado e o calculado pela linha contínua azul e o pico de Bragg pela barra vertical rosa.....	49
Figura 18: Esquema de um equipamento de DSC com fluxo de calor.....	53
Figura 19: Curva típica de DSC com a indicação de seis eventos térmicos.....	53
Figura 20: Curva TG e sua derivada (DTG) da celulose microcristalina PH-102.....	56
Figura 21: Espectro de FTIR e suas variáveis (posição, intensidade e formato) para uma banda de absorção específica (representada pelo retângulo cinza).....	57
Figura 22: Representação esquemática dos componentes básicos de um microscópio eletrônico de varredura.....	60
Figura 23: Difratomogramas de raios X do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b). Para melhor efeito de visualização foi inserido uma região ampliada ( $5^{\circ}$ a $30^{\circ}$ em $2\theta$ ) em cada difratograma.....	76
Figura 24: a) Região ampliada ( $14^{\circ}$ a $20^{\circ}$ em $2\theta$ ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1774, em que o padrão observado está representado por cruzeiros pretos, o padrão calculado por uma linha vermelha, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições dos picos de Bragg pelas barras rosas; b) Região ampliada ( $24^{\circ}$ a $33^{\circ}$ em $2\theta$ ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1774. As setas amarelas evidenciam os picos nas posições $14,5^{\circ}$ e $30,0^{\circ}$ ( $2\theta$ ).....	78
Figura 25: Empacotamento da cela unitária do LASSBio-1774 ao longo do eixo c. Os átomos são indicados da seguinte forma: carbono (esferas cinzas), oxigênio (esferas vermelhas), nitrogênio (esferas azuis), hidrogênio (esferas cinzas claro) e os voids (canais amarelos).....	79
Figura 26: Curva de DSC do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b) obtida a $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de $\text{N}_2$ ( $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com massa da amostra 3,0 mg para o LASSBio-1773 e de 2,8 mg para o LASSBio-1774.....	81
Figura 27: Curva de DSC do LASSBio-1773 com ciclo de aquecimento-resfriamento obtida a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de $\text{N}_2$ ( $40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com massa da amostra de aproximadamente 3,6 mg.....	83
Figura 28: Curvas TG (preta) / DTG (vermelha) do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b) obtida a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de $\text{O}_2$ ( $60\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), com massa da amostra de 11,24 mg para o LASSBio-1773 e 7,30 mg para o LASSBio-1774.....	86
Figura 29: Espectro de FTIR do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b) obtido com resolução de $4\text{ cm}^{-1}$ na região de $4000$ a $650\text{ cm}^{-1}$ , em que as bandas de absorção características do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774	

<i>estão destacadas por seus respectivos números de onda. A região de interesse engloba a faixa entre 3650-3200 cm<sup>-1</sup> (retângulo cinza).....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 30: a) Região ampliada (14° a 22° em 2θ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1774 em que o padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado por uma linha vermelha, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições dos picos de Bragg pelas barras rosas; b) Região ampliada (24° a 31° em 2θ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1774. As setas amarelas evidenciam os picos nas posições 14,5° e 30,0° (2θ). ....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 31: a) Cella unitária do LASSBio-1774 sem considerar a molécula de água. Os espaços vazios (voids) são evidenciados por canais amarelos. b) Cella unitária do LASSBio-1774 considerando a molécula de água no interior da cela unitária. Os átomos constituintes da molécula de água são indicados da seguinte forma: oxigênio (esferas rosas) e hidrogênio (esferas azuis). ....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 32: Representação do empacotamento do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 monohidratado (b) na cela unitária ao longo do eixo c. Os átomos são indicados da seguinte forma: carbono (esferas cinzas), hidrogênio (esferas cinzas clara), oxigênio (esferas vermelhas), nitrogênio (esferas azuis) e enxofre (esferas amarelas). As moléculas de água são indicadas como: oxigênio (esferas rosas) e hidrogênio (esferas azuis escuro). ....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 33: Representação das interações de hidrogênio (linha tracejada em azul) entre os átomos N(1)–H(27)···O(16) para o LASSBio-1773 (a) e entre os átomos O(1)–H(3)···O(23) e O(1)–H(2)···O(28) para o LASSBio-1774 monohidratado (b). ....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 34: Estrutura molecular do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b). Os átomos envolvidos nos ângulos de torção estão destacados. ....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 35: Sobreposição da molécula LASSBio-1773 (em amarelo) e LASSBio-1774 monohidratado (em verde) ao longo do eixo c, mostrando diferenças conformacionais entre as moléculas. ....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 36: Empacotamento da cela unitária do LASSBio-1773 (em amarelo) e do LASSBio-1774 monohidratado (em verde) ao longo do eixo c. O volume da cela unitária do LASSBio-1773 é de 1761,41 Å<sup>3</sup> e do LASSBio-1774 é de 3975,43 Å<sup>3</sup>. ....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 37: Refinamento de Rietveld do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 monohidratado (b) em que o padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado pela linha vermelha, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições dos picos de Bragg pelas barras rosas. Para melhor efeito de visualização dos refinamentos de Rietveld foi inserido uma região ampliada (5° a 45° em 2θ) em cada gráfico. ....</i>	<i>99</i>
<i>Figura 38: Comparação entre a morfologia obtida pela microscopia (MEV) e a simulada pelo método GM para o LASSBio-1773. a) Fotomicrografia do LASSBio-1773 exibindo cristais na forma prismática. A forma dos cristais obtida pela microscopia apresenta concordância com a morfologia sugerida pelo método GM; b) Predição da morfologia do LASSBio-1773. Os índices de Miller indicam as faces morfologicamente importantes dos cristais. ....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 39: Comparação entre a morfologia obtida pela microscopia (MEV) e a simulada pelo método GM para o LASSBio-1774 monohidratado. a) Fotomicrografia do LASSBio-1774 monohidratado exibindo cristais na forma de lâminas prismáticas. A forma dos cristais obtida pela microscopia apresenta concordância com a morfologia sugerida pelo método GM; b) Predição da morfologia do LASSBio-1774 monohidratado. Os índices de Miller indicam as faces morfologicamente importantes dos cristais. ....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 40: Faces morfologicamente importantes (MI) do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 monohidratado (b). Os índices de Miller são mostrados juntamente com os respectivos arranjos das moléculas. ....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 41: Perfis de dissolução dos candidatos a fármacos LASSBio-1773 (a) e LASSBio-1774 monohidratado (b). ....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 42: Comparação entre os perfis de dissolução do LASSBio-1773 (círculos vermelhos) e do LASSBio-1774 monohidratado (retângulos pretos). ....</i>	<i>108</i>

## Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Radiações características dos principais materiais utilizados em tubos de raios X [29].</i>	35
<i>Tabela 2: Classificação dos sete sistemas de redes com suas translações e ângulos axiais [31].</i>	37
<i>Tabela 3: Principais características referentes ao LASSBio-1773 e ao LASSBio-1774.</i>	68
<i>Tabela 4: Condições experimentais para obtenção dos dados de DRXP do LASSBio-1773.</i>	69
<i>Tabela 5: Condições experimentais para obtenção dos dados de DRXP do LASSBio-1774.</i>	69
<i>Tabela 6: Parâmetros térmicos* obtidos da curva de DSC do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774.</i>	83
<i>Tabela 7: Parâmetros térmicos* obtidos das curvas TG/DTG do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774.</i>	87
<i>Tabela 8: Distâncias entre os átomos envolvidos nas interações de hidrogênio e o ângulo medido entre D, H e A. Sendo D o átomo doador e A o aceptor de ligação de H.</i>	96
<i>Tabela 9: Dados do cristal e alguns detalhes dos parâmetros obtidos nos refinamentos das estruturas cristalinas dos candidatos a fármacos.</i>	101
<i>Tabela 10: Predição da morfologia do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774 monohidratado por meio dos cálculos obtidos pelo método GM. A porcentagem da área da face total é calculada como <math>100 \times (\text{área da face hkl}) / (\text{área superficial total})</math>.</i>	105
<i>Tabela 11: Coordenadas fracionárias (x, y, z) de todos os átomos da estrutura cristalina do composto LASSBio-1773.</i>	117
<i>Tabela 12: Algumas distâncias de ligação selecionadas para o composto LASSBio-1773.</i>	119
<i>Tabela 13: Alguns ângulos de ligação selecionados para o composto LASSBio-1773.</i>	120
<i>Tabela 14: Alguns ângulos de torção selecionados para o composto LASSBio-1773.</i>	121
<i>Tabela 15: Coordenadas fracionárias (x, y, z) de todos os átomos da estrutura cristalina do composto LASSBio-1774 monohidratado.</i>	123
<i>Tabela 16: Algumas distâncias de ligação selecionadas para o composto LASSBio-1774.</i>	125
<i>Tabela 17: Alguns ângulos de ligação selecionados para o composto LASSBio-1774.</i>	127
<i>Tabela 18: Alguns ângulos de torção selecionados para o composto LASSBio-1774.</i>	129

## Lista de abreviaturas

ADA - *American Diabetes Association*  
ATR - *Attenuated Total Reflection*  
AVC - *Acidente Vascular Cerebral*  
CCNH - *Centro de Ciências Naturais e Humanas*  
CCDC - *Cambridge Crystallographic Data Center*  
CEM - *Central Experimental Multiusuário*  
CH<sub>3</sub> - *Metila*  
CIF - *Crystallographic Information Framework*  
DI - *Dissolução intrínseca*  
DPP-4 - *Dipeptidil peptidase-4*  
DM - *Diabetes Mellitus*  
DM1 - *Diabetes Mellitus tipo 1*  
DM1A - *Diabetes Mellitus tipo 1 autoimune*  
DM1B - *Diabetes Mellitus tipo 1 idiopático*  
DM2 - *Diabetes Mellitus tipo 2*  
DMG - *Diabetes Mellitus Gestacional*  
DRXP - *Difração de Raios X por Policristais*  
DSC - *Differential Scanning Calorimetry*  
DTG - *Derivada primeira da termogravimetria*  
E<sub>att</sub> - *Attachment energy*  
E<sub>cr</sub> - *Crystallization energy*  
EMA- *European Medicines Agency*  
E<sub>slice</sub> - *Slice energy*  
FAR - *Far Infrared*  
FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*  
G<sub>R</sub>- *Growth rate*  
GSAS - *General Structure Analysis System*<sup>®</sup>  
GM- *Growth morphology*  
HCl - *Ácido Clorídrico*  
HDL - *High Density Lipoprotein*  
HIV - *Human Immunodeficiency Virus*



IDF - *International Diabetes Federation*

IMC - *Índice de Massa Corpórea*

LaB<sub>6</sub> - *Hexaboreto de lantânio*

LASSBio<sup>®</sup> - *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas*

LCCEM - *Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais*

LNLS - *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron*

LP - *Fator Lorentz-Polarização*

MEV - *Microscopia Eletrônica de Varredura*

MR- *Método de Rietveld*

MID - *Middle Infrared*

NIR - *Near Infrared*

NaCl - *Cloreto de sódio*

NaHSO<sub>3</sub> - *Bissulfito de sódio*

OMS - *Organização Mundial de Saúde*

PPAR $\gamma$  - *Receptor Ativado pelo Proliferador de Peroxissomo do tipo  $\gamma$*

R<sub>Bragg</sub> - *Fator de Bragg*

R<sub>exp</sub> - *Fator R-esperado*

R<sub>wp</sub> - *Fator R-perfil ponderado*

SCB - *Sistema de Classificação Biofarmacêutica*

TG- *Termogravimetria*

T<sub>endset</sub> - *Temperatura final*

T<sub>g</sub> - *Transição Vítrea*

T<sub>onset</sub> - *Temperatura inicial*

T<sub>peak</sub> - *Temperatura do pico*

UFABC - *Universidade Federal do ABC*

UFRJ - *Universidade Federal do Rio de Janeiro*

VDI - *Velocidade de Dissolução Intrínseca*

W- *Tungstênio*

$\chi^2$  - *Goodness of fit*

ZnSe - *Seleneto de zinco*

## 1-Introdução

O diabetes mellitus (DM) foi considerado por muito tempo como uma doença de menor importância para a saúde. No entanto, atualmente configura-se como uma das principais ameaças para a saúde humana do século XXI [1]. Estimativas mais recentes da Federação Internacional do Diabetes (IDF, do inglês, *International Diabetes Federation*) indicam que 415 milhões de pessoas têm diabetes [2] e, o número de pessoas com a doença tende a aumentar para mais de 642 milhões de pessoas em menos de 25 anos, se medidas de prevenção não forem adotadas. A IDF afirma que a maior parte das pessoas com diabetes têm idade entre 40 e 59 anos, sendo que cerca de 80% vivem em países de baixa e média renda, onde a epidemia cresce em ritmo alarmante [3].

De acordo com a IDF, existe aproximadamente cerca de 193 milhões de casos não diagnosticados no mundo, o que contribui para que um grande número de pessoas com diabetes esteja progredindo para as complicações mais sérias da doença (conhecida como complicações a longo prazo ou complicações crônicas), o que incluem a insuficiência renal (nefropatia), perda da visão (retinopatia), amputação de membros inferiores (neuropatia) e as doenças cardiovasculares [2, 3].

Em consequência das complicações a longo prazo, o diabetes vem sendo apontado como uma doença que mata mais que o HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*), a tuberculose e a malária. Segundo levantamento realizado em 2015 pela IDF 5,0 milhões de pessoas no mundo morreram em decorrência do diabetes; 1,5 milhões com HIV; 1,5 milhões com tuberculose e 0,5 milhões de pessoas morreram com malária [2, 3].

O diabetes também vem sendo relacionado com o desenvolvimento do câncer. Estudos recentes sugerem que pessoas com diabetes mellitus tipo 2 têm risco mais elevado em desenvolver algumas formas de câncer, como câncer de fígado, pâncreas, cólon e reto, ovário e mama. Os potenciais fatores de riscos em comum entre as doenças incluem idade, sexo, obesidade, sedentarismo, dieta, álcool e o tabagismo. Dessa maneira, o diabetes e o câncer são doenças comuns com um tremendo impacto sobre a saúde a nível mundial [4].

Com base nos levantamentos realizados pela IDF, pode-se inferir que o quadro observado com relação ao DM no Brasil é bastante preocupante. Em 2015, o Brasil ocupou o quarto lugar dentre os dez países (China, Índia, EUA, Brasil, Rússia, México, Indonésia, Egito, Japão e Bangladesh) com maior incidência de DM, perdendo apenas para China, Índia

e EUA. No Brasil existem 14,3 milhões de pessoas portadoras da doença e, segundo estimativas para 2040, este quadro tenderá a se agravar, ou seja, serão 23,3 milhões de portadores de DM. Deste modo, o diabetes está sendo caracterizado como uma grande ameaça ao desenvolvimento global [2, 3].

Nesta tese foram avaliados dois candidatos a fármacos derivados sulfonilidrazônicos - LASSBio-1773 e LASSBio1774, planejados a partir do LASSBio-1471 por estratégia de Química Medicinal. Foram realizadas modificações estruturais do tipo abertura de anel, simplificação molecular e estratégias de regioisomerismo e metilação com o propósito de otimizar os efeitos farmacológicos no LASSBio-1471. O LASSBio-1773 apresenta atividade hipoglicemiante e o LASSBio-1774 atividade hipoglicemiante e anti-inflamatória. Ambos os candidatos a fármacos são efetivos no controle da glicemia e na neuropatia diabética periférica, uma das complicações a longo prazo associada à doença.

A avaliação estrutural dos candidatos a fármacos consistiu na caracterização físico-química e na determinação estrutural. A caracterização físico-química foi realizada com o uso das técnicas de difração de raios X por policristais (DRXP) em conjunto com o método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas, termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), dissolução intrínseca (DI) e por estudos da predição da morfologia dos cristais pelo método GM. Pelas referidas técnicas foram avaliados o arranjo estrutural, a estabilidade térmica, ponto de fusão, estado de hidratação, possíveis eventos de recristalização, morfologia e a solubilidade dos compostos. A determinação estrutural foi realizada com o uso de dados de boa qualidade de DRXP. Esses dados foram indexados fazendo uso do programa *DASH* – um programa que resolve estruturas cristalinas por meio de um algoritmo de *simulated annealing*.

## 2-Revisão Bibliográfica

Neste capítulo são abordados alguns conceitos importantes sobre o diabetes mellitus, uma doença que tem crescido em ritmo alarmante por todo o mundo e que hoje tem sido tratada no Brasil como um problema de saúde pública. Algumas estimativas quanto a prevalência da doença, e especificações de duas amostras de candidatos a fármacos planejadas para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 também são mencionadas neste capítulo.

### 2.1-Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) é definido como uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizado pela hiperglicemia crônica resultante de distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas decorrente de deficiências na secreção de insulina (absoluta ou relativa), na ação da insulina, ou ambos [5, 6].

O DM pode ser classificado quanto à sua etiologia. De acordo com a Associação Americana do Diabetes (ADA, do inglês, *American Diabetes Association*), os quatro subtipos principais são: 1) diabetes mellitus tipo 1 (autoimune e idiopático), 2) diabetes mellitus tipo 2, 3) outros tipos específicos de diabetes relacionados a defeitos genéticos da função das células beta; defeitos genéticos da ação da insulina; doenças do pâncreas exócrino; endocrinopatias; induzida por fármacos ou produtos químicos; infecções; formas pouco comuns de diabetes imuno-mediada; outras síndromes genéticas associadas ao diabetes e 4) o diabetes mellitus gestacional (DMG) [6-8]. Compreende mencionar que ainda existem duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são caracterizadas pela glicemia de jejum alterada e pela tolerância à glicose diminuída. Essas duas categorias não são classificadas como diabetes, mas como fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares [9].

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) acomete apenas 5 a 10% das pessoas portadoras da doença [1, 3, 10]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a ADA, o DM1 pode ser causado por mecanismos autoimunes (DM1A) e por mecanismos idiopáticos, ou seja, não autoimunes (DM1B)[1]. Entre os mecanismos, o DM1A é o tipo mais comum e caracteriza-se pela deficiência absoluta da secreção de insulina, resultante da destruição autoimune das células beta pancreáticas produtoras de insulina, o que leva ao desenvolvimento do diabetes. Pessoas com DM1 necessitam de administração exógena de insulina para sobreviver [3, 6]. Nesta forma de diabetes, a taxa de destruição das células beta

(células endócrinas nas ilhotas de Langerhans do pâncreas) é bastante variável, sendo rápida, principalmente quando se trata de crianças e adolescentes, e lenta em adultos. Alguns pacientes, particularmente crianças e adolescentes, podem apresentar cetoacidose (é um tipo de acidose metabólica causada por altas concentrações de cetoácidos, que pode resultar em coma ou até mesmo a morte) como a primeira manifestação da doença. Outros têm modesta hiperglicemia em jejum, que pode mudar rapidamente a hiperglicemia severa e/ou cetoacidose, que pode ser precipitada na presença de infecção ou estresse [6].

O DM1 geralmente se desenvolve rápido, apresentando como principais sintomas: sede anormal (polidipsia) e boca seca; aumento do volume urinário (poliúria); perda de peso repentina; visão embaçada; falta de energia; cansaço e fome constante [2]. Pessoas com DM1 podem levar uma vida normal, desde que façam uma combinação diária de insulina, uma dieta saudável, a prática regular de exercícios físicos e acompanhamento médico constante [3].

De acordo com a IDF, o número de pessoas que tem desenvolvido o DM1 está cada vez mais aumentando, e as razões para tais manifestações ainda não estão claras, mas há fortes indícios de que fatores de riscos ambientais e/ou infecções virais tenham contribuído para tal crescimento [2].

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais comum do diabetes, compreendendo aproximadamente 90 a 95% dos casos. O DM2 se desenvolve quando as células beta não são capazes de produzir insulina suficiente, ou quando as células do corpo (células de gordura, dos músculos e do fígado) são incapazes de responder aos efeitos da insulina, levando a um acúmulo de glicose no sangue, ou seja, a hiperglicemia [3].

A incidência dos casos de DM2 é bastante variável. Em geral, tem maior frequência após os 40 anos de idade [9]. Os pacientes com DM2 apresentam um quadro clínico silencioso e algumas vezes podem vir a ser diagnosticados já pelos sintomas das complicações a longo prazo [11].

Cerca de 80% dos pacientes com DM2 apresentam sobrepeso (índice de massa corpórea-IMC: 25 a 29,9 kg·m<sup>-2</sup>) ou obesidade (IMC: 30 a 34,9 kg·m<sup>-2</sup>), sendo estes os principais fatores para a diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos [9]. Adicionalmente, esses indivíduos tendem a apresentar hipertensão arterial, dislipidemia caracterizada por triglicérides elevados, níveis do bom colesterol (HDL, do inglês, *High Density Lipoprotein*) baixo e elevação de fatores trombogênicos, caracterizando a chamada síndrome metabólica. Em razão desses eventos, os portadores do DM2 apresentam risco

aumentado de desenvolver complicações macrovasculares, que levam às doenças cardiovasculares [10].

Aproximadamente metade dos portadores de DM2 desconhece sua condição, uma vez que a doença é pouco sintomática. Quando presente, os principais sintomas do DM2 são: aumento do volume urinário, sede excessiva, perda de peso e visão embaçada, conforme ilustrado na Figura 1. É válido enfatizar que no DM2 estes sintomas, quando presentes, se instalam de maneira gradativa e muitas vezes podem não ser percebidos pelas pessoas. Na maioria das vezes as pessoas só descobrem que têm o DM2 em decorrência das complicações a longo prazo que começam a aparecer em virtude do excesso de glicose no sangue por tempo prolongado [2]. Em contrapartida, os sintomas do DM1 se instalam rapidamente.

**Figura 1: Principais sintomas do DM2.**

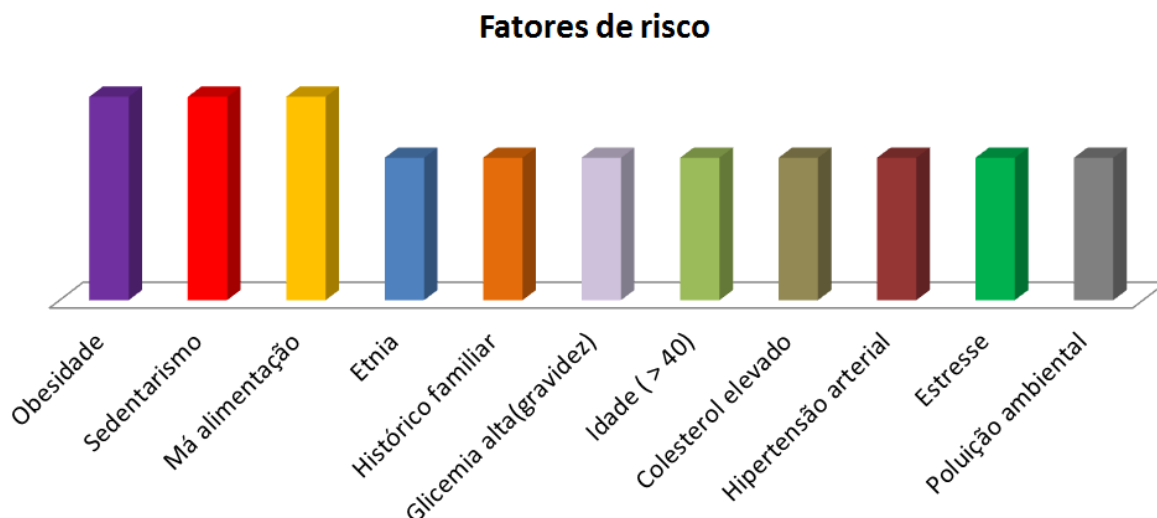
#### **Principais sintomas do DM2**



**Fonte: Ilustração elaborada pela autora.**

A origem do DM2 é complexa, multifatorial e não está totalmente esclarecida. Fatores genéticos e ambientais têm sido implicados [12, 13]. Embora as razões para o desenvolvimento do DM2 ainda não sejam conhecidas, há vários fatores de risco que contribuem para o aparecimento da doença, tais como, obesidade, sedentarismo, má alimentação, histórico familiar, idade, etnia, glicemia elevada durante a gravidez, colesterol elevado, hipertensão arterial, estresse, e até mesmo a poluição ambiental [2, 3, 13, 14]. Os principais fatores de risco para o desencadeamento do DM2 estão exemplificados na Figura 2, sendo os principais a obesidade, o sedentarismo e a má alimentação.

**Figura 2: Ilustração dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do DM2.**



**Fonte: Ilustração elaborada pela autora.**

Em contraste com os portadores do DM1, a maioria das pessoas com DM2, normalmente, não necessitam de doses diárias de insulina para sobreviver. Os portadores do DM2 são capazes de controlar os níveis glicêmicos através de uma dieta saudável, por meio do aumento de atividade física e da administração de hipoglicemiantes orais [3]. Porém, se as medidas citadas anteriormente não forem suficientes para controlar os níveis de glicose, faz-se necessária a administração de insulina em pacientes com DM2 [2].

Já o diabetes gestacional (DMG) é diagnosticado quando níveis mais elevados do que o normal de glicose no sangue aparecem pela primeira vez durante a gravidez [15]. O DMG tende a ocorrer em torno da vigésima quarta semana de gravidez. Essa condição surge porque a ação da insulina é bloqueada, provavelmente por hormônios produzidos pela placenta [3]. Uma vez bloqueada a ação da insulina, os níveis de glicose no sangue tendem a aumentar.

No Brasil, a frequência deste tipo de diabetes acomete cerca de 3% a 13% das gestações [9]. Mulheres com DMG precisam monitorar e controlar os níveis glicêmicos para minimizar os potenciais riscos para o bebê. Normalmente, isto pode ser feito através de uma dieta saudável e pela prática de exercícios moderados, do controle dos níveis glicêmicos e, em alguns casos, a administração de insulina e de hipoglicemiantes orais pode também tornar-se necessária [3].

O desenvolvimento do DMG ocorre principalmente em mulheres mais velhas, com histórico prévio de intolerância à glicose, aquelas de determinados grupos étnicos, as que têm histórico na família de DM2, mulheres obesas, e qualquer mulher que tenha elevado nível de glicose no sangue em jejum durante a gravidez [16].

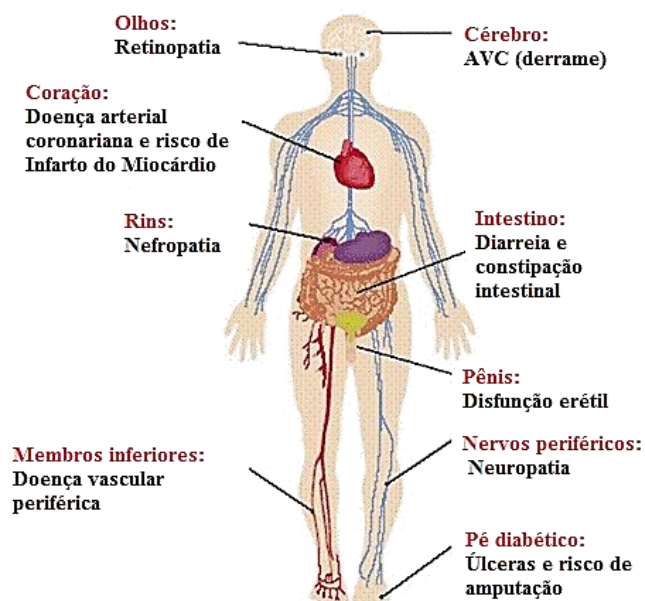
De um modo geral, as manifestações clínicas do DM são polimorfas e variam consideravelmente de paciente para paciente [17]. Alguns portadores podem também permanecer assintomáticos durante meses ou anos após a instalação da doença, sendo o seu diagnóstico efetuado casualmente em um exame de glicemia de rotina ou em uma consulta médica devido a uma complicação a longo prazo da doença [15].

As complicações do DM são divididas em agudas e crônicas [10]. As complicações agudas incluem hipoglicemia (diminuição dos níveis de glicose, com ou sem sintomas para valores abaixo de  $70 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ), cetoacidose (elevadas concentrações de cetoácidos em decorrência das altas concentrações de glicose no sangue) e síndrome hiperosmolar não cetótica (um estado de hiperglicemia grave, superior a  $600\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  a  $800 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ , acompanhada de desidratação e alteração do estado mental, desenvolvida apenas no DM2) [9].

Já as complicações crônicas, também denominadas de complicações a longo prazo, podem ser decompostas em micro e macrovasculares. As complicações microvasculares incluem retinopatia, com potencial perda de visão; nefropatia, levando à insuficiência renal; neuropatia, podendo levar à ulceração e amputação de dedos, pés e membros inferiores; enquanto as macrovasculares incluem a doença cardiovascular, que afeta o coração e os vasos sanguíneos, podendo causar complicações fatais, como a doença arterial coronariana (levando a um ataque do coração) e o acidente vascular cerebral (AVC) [2, 3]. A Figura 3 exemplifica, de forma ilustrativa, as principais complicações a longo prazo do diabetes.



**Figura 3: Principais complicações a longo prazo do DM.**



**Fonte:** Adaptado da referência [3].

Dentre as complicações a longo prazo do DM, merece destaque as doenças cardiovasculares, a nefropatia e a neuropatia diabética periférica. A neuropatia diabética periférica é uma das manifestações clínicas mais debilitantes da doença. De um modo geral, a neuropatia periférica consiste em um dano causado no sistema nervoso periférico, podendo conduzir à dor, formigamento, perda de sensibilidade, debilidade e atrofia muscular.

Vale enfatizar que inúmeros fatores estão por trás do aparecimento da neuropatia periférica, tais como diabetes, alcoolismo, tabagismo, doenças autoimunes, câncer, hipertensão, obesidade, predisposição à infecção, entre outros fatores. O DM tem sido a principal causa do desenvolvimento da neuropatia periférica. Atinge entre 40% e 50% dos indivíduos com DM2 e em menor frequência indivíduos com DM1 [18].

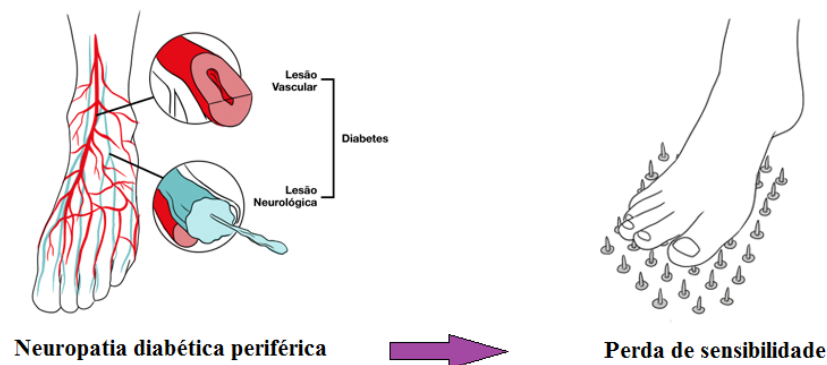
A Figura 4 mostra de forma exemplificativa danos causados aos nervos sensoriais dos pés, resultando na perda de sensibilidade dos pés. Tais manifestações são particularmente significativas porque podem levar à ulceração, infecções graves e, em alguns casos, amputações [2].

Basicamente a neuropatia diabética periférica é tratada por meio do controle glicêmico e do tratamento da dor neuropática. Somente dois medicamentos são formalmente aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA, do inglês, *Food and Drug*

*Administration*) para tratar a neuropatia diabética periférica: a duloxetina e a pregabalina. Outros compostos, como fármacos antiepilépticos e antidepressivos tricíclicos, são eficazes no tratamento da dor neuropática diabética, porém, em virtude de alguns efeitos adversos como ganho de peso, hipotensão postural, sedação, boca seca e constipação, limitam consideravelmente o uso destes fármacos em pacientes diabéticos [19].

Recentemente foi demonstrado que agonistas PPAR $\gamma$  (receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo do tipo  $\gamma$ ) podem ser efetivos no tratamento da dor neuropática [20]. A rosiglitazona e a pioglitazona são agonistas PPAR $\gamma$  empregados no tratamento do DM2, no entanto, em virtude de alguns efeitos adversos a segurança desses fármacos tem sido relatada [20]. Dessa maneira, é notória a necessidade de hipoglicemiantes orais mais eficazes no tratamento do DM.

**Figura 4: Ilustração da neuropatia diabética periférica.**



**Fonte:** Adaptado da referência [21].

Diante desse quadro, o emprego de novos hipoglicemiantes orais agonistas PPAR $\gamma$  que consigam manter os níveis glicêmicos adequados e ainda atenuar as complicações a longo prazo do DM seria essencial para a qualidade de vida dos pacientes.

## 2.2-Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico de pacientes com diabetes é realizado de formas variadas. Em pacientes com DM1, o tratamento é realizado com base na insulinoterapia, enquanto que em pacientes com DM2, ele é baseado no uso de hipoglicemiantes orais [11]. Em ambos os tipos de diabetes, além do tratamento farmacológico, também é necessário a adoção de medidas não farmacológicas, o que inclui uma boa alimentação e a prática regular de exercícios físicos.

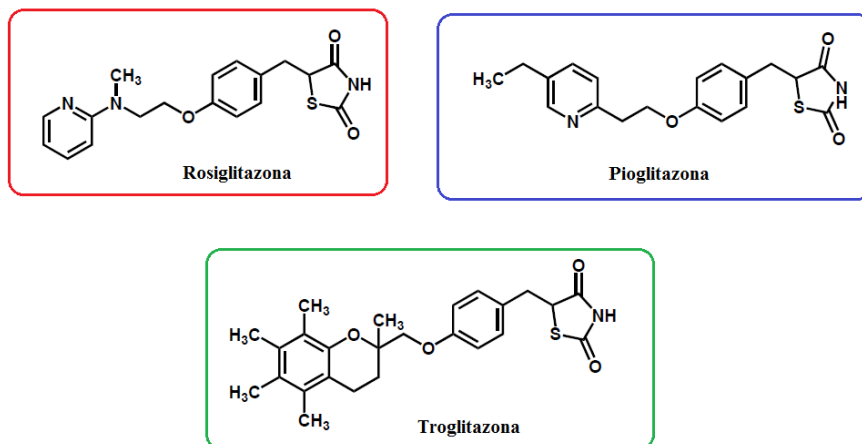
Quanto às medidas farmacológicas de portadores de DM2, existem distintas classes de hipoglicemiantes orais, sendo estas divididas em quatro classes: *secretagogos de insulina* (sulfonilureias, meglitinidas), *sensibilizadores de insulina* (biguanidas; glitazonas), *inibidores da  $\alpha$ -glucosidase* e *moduladores das incretinas*, os quais incluem os inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) e os miméticos do peptídeo-1[22].

Estes hipoglicemiantes orais são amplamente utilizados para controlar a hiperglicemia, mas não alteram o curso das complicações a longo prazo, tendo o uso limitado em decorrência dos efeitos adversos e da alta taxa de falha secundária [19].

Os agonistas PPAR $\gamma$  (fármacos da classe das glitazonas) são fármacos com grande potencial no tratamento da dor [20] e no controle glicêmico de portadores de DM2. Porém, em virtude de uma série de efeitos adversos, a segurança no uso dos mesmos tem sido colocada em questão [20]. É possível citar como efeitos adversos dos fármacos dessa classe, o aumento da creatinina plasmática e homocisteína, retenção de líquidos e redução da densidade óssea, edema periférico, ganho de peso, e um aumento do risco de insuficiência cardíaca. Além desses efeitos é possível também citar a hepatotoxicidade severa e a cardiotoxicidade observadas para os fármacos troglitazona e rosiglitazona, respectivamente. O aparecimento de tais efeitos resultou na retirada de ambos os fármacos do mercado [15]. Em 2010, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês, *European Medicines Agency*) suspendeu as vendas de rosiglitazona, e em junho de 2011, a Agência Francesa e Alemã de Medicamentos suspenderam o uso da pioglitazona, uma vez que os riscos globais da rosiglitazona e pioglitazona excediam suas vantagens. Atualmente, a rosiglitazona (Avandia) e a pioglitazona (Actos) estão disponíveis nos Estados Unidos [23]. Vale mencionar que a pioglitazona ainda está disponível no mercado brasileiro. Além dos efeitos adversos, esses fármacos abrange a classe de hipoglicemiantes orais mais caros [22], o que muitas vezes dificulta a continuidade dos pacientes ao tratamento.

Na Figura 5 estão mostradas as estruturas químicas dos agonistas PPAR $\gamma$  comercializados. Ambos os fármacos têm em comum em sua estrutura química a fórmula molecular C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>S (glitazona).

**Figura 5: Estruturas químicas da rosiglitazona, pioglitazona e troglitazona.**



**Fonte:** Adaptado da referência [19].

Diante deste cenário, uma série de agonistas PPAR $\gamma$  foi identificada no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>- UFRJ) por Zapata et al., [19].

O planejamento estrutural desta nova série de candidatos a fármacos derivados sulfonilidrazônicos foi realizado por meio de modificações estruturais no LASSBio-1471, um composto protótipo que é agonista PPAR $\gamma$  e que apresenta atividade hipoglicemiante e anti-inflamatória.

Na seção 2.3 são apresentadas as estratégias de química medicinal para obtenção dos candidatos a fármacos derivados sulfonilidrazônicos: LASSBio-1773 e LASSBio-1774.

### 2.3-Novos derivados sulfonilidrazônicos: LASSBio-1773 e LASSBio-1774

Inicialmente foram selecionados na quimioteca do LASSBio<sup>®</sup> dez compostos protótipos (LASSBio-289, LASSBio-331, LASSBio-482, LASSBio-485, LASSBio-541, LASSBio-561, LASSBio-1315, LASSBio-1314, LASSBio-1313, LASSBio-1312) com características de ligante PPAR $\gamma$  para *screening* virtual (estudos em *docking*).

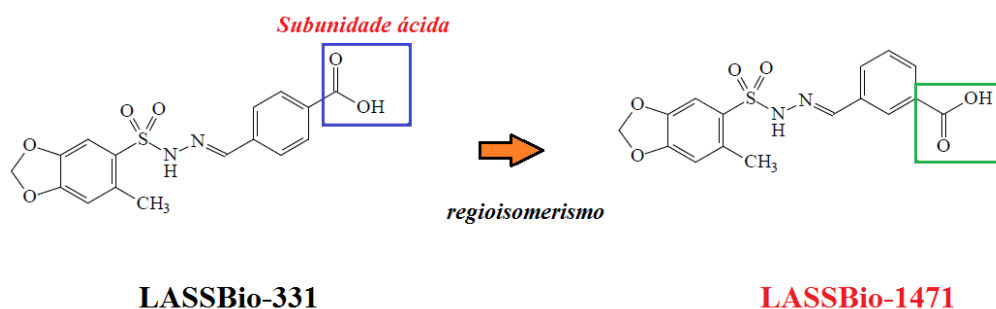
Através do *screening* virtual, a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G_{teórica}$ ) dos dez compostos foram avaliadas e comparadas com a variação da energia livre de Gibbs do composto referência selecionado – o hipoglicemiante rosiglitazona, agonista PPAR $\gamma$ , que apresenta atividade hipoglicemiante e anti-inflamatória.

Por meio do *screening* virtual foram verificados pela  $\Delta G_{teórica}$  quais dos dez compostos apresentavam melhor afinidade teórica pelo receptor PPAR $\gamma$ . Dentre os dez compostos, o LASSBio-331 foi o que apresentou melhor afinidade teórica pelo PPAR $\gamma$  com  $\Delta G_{teórica}$  de -47,6 kJ·mol<sup>-1</sup>. Vale enfatizar que o composto referência apresentou  $\Delta G_{teórica}$  de -36,8 kJ·mol<sup>-1</sup>. Por apresentar afinidade pelo ligante PPAR $\gamma$  maior que o composto referência, o LASSBio-331 foi selecionado para a síntese de uma nova série de ligantes PPAR $\gamma$  [19].

Algumas modificações estruturais do tipo regioisomerismo e bioisosterismo não-clássico foram propostas no LASSBio-331. Dessas modificações no LASSBio-331, quatro novos compostos foram originados - LASSBio-1471, LASSBio-1470, LASSBio-1503 e o LASSBio-1570. Dentre estes quatro novos compostos, o LASSBio-1471 foi o composto que apresentou melhor afinidade teórica pelo receptor PPAR $\gamma$  com  $\Delta G_{teórica}$  de -49,4 kJ·mol<sup>-1</sup>. O LASSBio-1471 foi planejado através da estratégia de regioisomerismo aplicada na subunidade ácida do LASSBio-331, conforme demonstrado na Figura 6.

Por apresentar  $\Delta G_{teórica}$  maior que a  $\Delta G_{teórica}$  do LASSBio-331, o LASSBio-1471 foi selecionado para uma nova série de derivados sulfonilidrazônicos [19].

**Figura 6: Modificação estrutural do tipo regioisomerismo na subunidade ácida do LASSBio-331.**



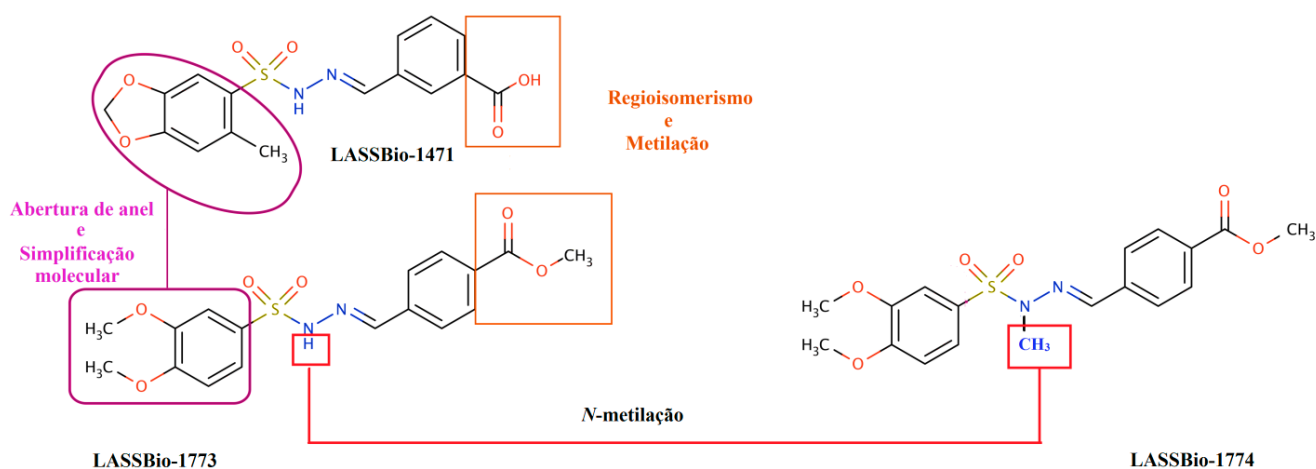
Fonte: Adaptado da referência [19].

O LASSBio-1471 é um derivado sulfonilidrazônico com atividade hipoglicemiante e anti-inflamatória, sendo efetivo no controle glicêmico e na neuropatia diabética periférica [24], uma das complicações a longo prazo mais debilitante do DM.

Com a finalidade de otimizar a propriedade hipoglicemiante e anti-inflamatória apresentada pelo LASSBio-1471 foram realizadas algumas modificações estruturais como abertura de anel, simplificação molecular, regioisomerismo e metilação no grupamento do ácido benzoico. Vale ressaltar que as modificações estruturais no LASSBio-1471 foram conseguidas mantendo a subunidade sulfonilidrazona [24].

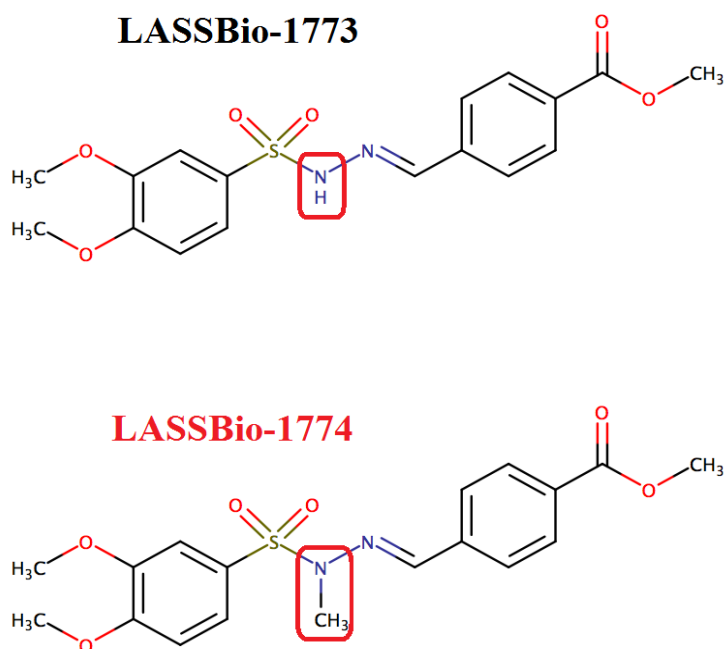
A Figura 7 ilustra as modificações estruturais efetuadas no derivado sulfonilidrazônico LASSBio-1471. A estratégia de abertura do anel e simplificação molecular está designada pela cor lilás, pela cor laranja está mostrado o regioisomerismo e a metilação no grupamento do ácido benzoico. Tais modificações no LASSBio-1471 deram origem ao LASSBio-1773, enquanto a estratégia da *N*-metilação mostrada em vermelho na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1773 originou o LASSBio-1774. A estrutura química dos derivados sulfonilidrazônicos LASSBio-1773 e LASSBio-1774 estão mostradas na Figura 8. Como pode ser observado na Figura 8 a principal diferença na estrutura química dos candidatos a fármacos consiste na adição do grupo CH<sub>3</sub> (metila) na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1774.

**Figura 7: Modificações estruturais no derivado sulfonilidrazônico LASSBio-1471 para formação do LASSBio-1773 e a *N*-metilação na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1773 para formação do LASSBio-1774.**



Fonte: Adaptado da referência [24].

**Figura 8: Estrutura química do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774.**



O LASSBio-1773 é antagonista PPAR $\gamma$  e o LASSBio-1774 agonista PPAR $\gamma$ . A atividade hipoglicemiante apresentada para os candidatos a fármacos é decorrente da presença do grupo dimetóxi e do grupamento éster no anel aromático ligado à imina, e o efeito anti-inflamatório apresentado somente pelo LASSBio-1774 é decorrente do grupo CH<sub>3</sub> na subunidade sulfonilidrazona.

Por se tratarem de moléculas inéditas, o Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais-*LCCEM* da UFABC com experiência na caracterização estrutural de vários materiais, propôs realizar a caracterização físico-química e a determinação estrutural de ambos os candidatos a fármacos. Desse modo, todas as informações referentes à parte físico-química e estrutural obtidas para os candidatos a fármacos serão muito importantes para somar aos estudos farmacológicos que já estão sendo realizados na UFRJ.

### **3-Técnicas empregadas na caracterização estrutural dos candidatos a fármacos**

Nesta seção será realizada uma breve descrição das ferramentas empregadas na caracterização físico-química dos derivados sulfonilidrazônicos - LASSBio-1773 e LASSBio-1774. Serão descritas as técnicas de difração de raios X por policristais (DRXP) aliada ao método de Rietveld (MR), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e dissolução intrínseca (DI).

#### **3.1-Difração de raios X (DRX)**

##### **3.1.1-A produção de raios X**

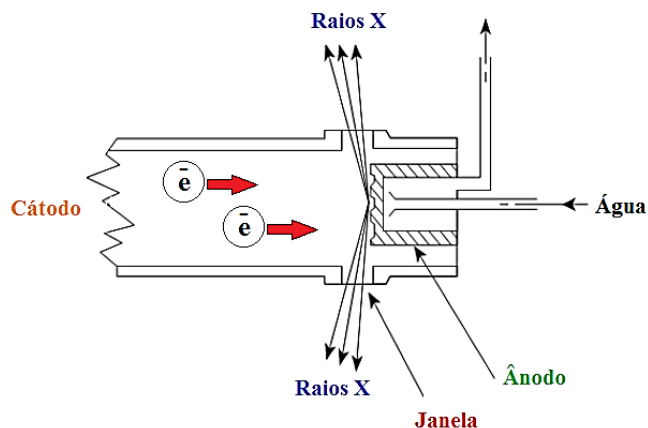
Os raios X foram descobertos por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895. Porém, a primeira experiência de difração de raios X em um monocristal só foi realizada em 1912, pelo também físico alemão Max von Laue. Desde então, os avanços verificados tanto no advento de novas instrumentações como de programas de computadores têm crescido enormemente [25].

Os raios X (ondas eletromagnéticas que possuem comprimentos de onda de  $10^{-10}$  a  $10^{-8}$  m) são produzidos em laboratório basicamente de duas maneiras distintas - uma com a utilização de tubos de raios X convencionais e outra por um síncrotron [26].

Para produzir raios X através de um tubo de raios X (Figura 9), é necessário aplicar uma diferença de potencial da ordem de 30 – 60 kV entre o cátodo e o ânodo, ambos mantidos em vácuo. Quando o filamento de tungstênio do cátodo é aquecido, liberam-se elétrons, estes são acelerados através do vácuo pela diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo, ganhando, assim, energia cinética. Quando os elétrons oriundos do cátodo se chocam com o ânodo (alvo metálico) liberam-se raios X, os quais saem do tubo por meio de janelas, geralmente de berílio (Be), conforme ilustrado na Figura 9. Contudo, a maior parte da energia cinética (cerca de 99%) é convertida em calor, por isso o ânodo deve ser continuamente resfriado com água gelada para evitar um superaquecimento [27].



**Figura 9: Representação esquemática de um tubo de raios X.**



**Fonte:** Adaptado da referência [26].

Quando os raios X são produzidos por um tubo de raios X, podem ser observados dois espectros distintos que se sobrepõem: o *espectro contínuo* e o *espectro de linhas características*.

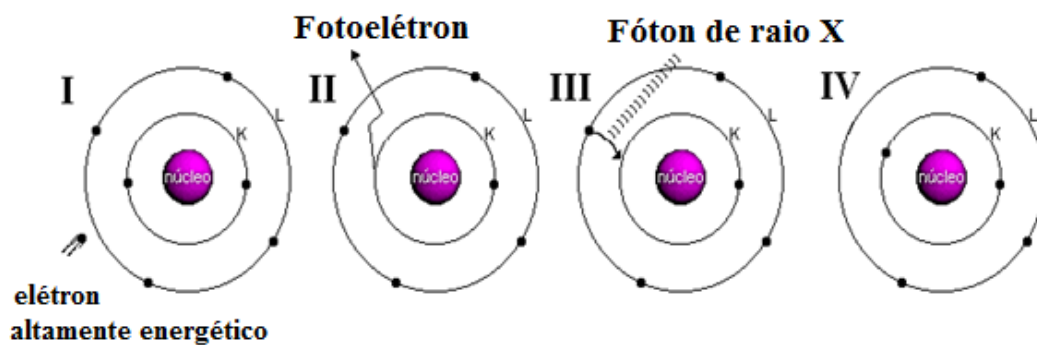
O espectro contínuo é produzido pela desaceleração dos elétrons de alta energia (velocidade), gerados no filamento do tubo de raios X, ao atingirem o ânodo. Considerando que qualquer carga acelerada emite radiação, os elétrons interagem com o campo elétrico do átomo, acelerando-os centripetamente, de tal maneira que parte da energia cinética dos elétrons é reemitida como raios X. Esta radiação policromática, também denominada desaceleração ou radiação branca é a que produz o espectro contínuo [27].

O espectro de linhas características de raios X consiste de uma série de comprimentos de onda discretos (linhas espectrais) característicos de cada elemento químico presente na amostra. Assim, a produção de raios X se dá quando uma partícula de alta energia cinética é rapidamente desacelerada. O método mais utilizado para produzir raios X é fazendo com que um elétron de alta energia gerado no cátodo colida com um alvo metálico (ânodo)[28]. Na Figura 10 está mostrado o fenômeno a nível atômico.

Quando esse elétron atinge o alvo (I), um elétron da camada K de um átomo do material é liberado na forma de fotoelétron (II), fazendo com que haja uma vacância nessa camada. Para ocupar o espaço deixado por esse elétron, um outro elétron de uma camada mais externa passa à camada K (III), liberando energia na forma de um fóton de raio X (IV). A energia desse fóton corresponde à diferença de energia entre as duas camadas e é característico de cada elemento químico [28]. A Figura 11 apresenta de forma exemplificativa

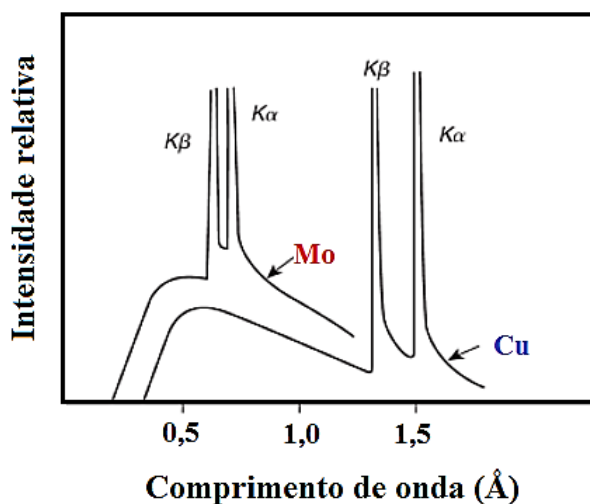
um espectro de emissão de raios X, emitido por um ânodo de molibdênio (Mo) e de cobre (Cu).

Figura 10: Produção de raios X a nível atômico.



Fonte: Adaptado da referência [28].

Figura 11: Representação de um espectro de emissão de raios X produzido quando se utiliza o Mo e o Cu como ânodo.

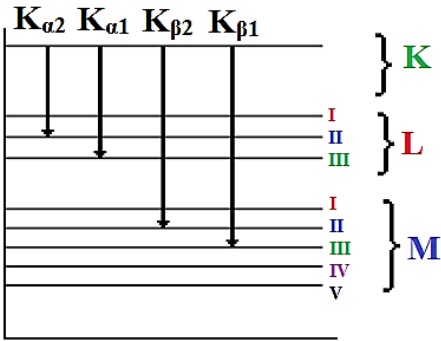


Fonte: Adaptado da referência [26].

O comportamento de um espectro de raios X é explicado pelas transições de níveis atômicos de energia. Ou seja, para cada diferente transição de níveis de energia, um comprimento de onda diferente é emitido. A radiação  $K\alpha_1$ , mostrada na Figura 12, é produzida quando um elétron transita da camada  $L_{III}$  para a camada K, enquanto que a

radiação  $K\beta_1$  é gerada quando o elétron transita da camada  $M_{III}$  para K [29]. A energia do fóton emitido equivale à diferença de energia entre as duas camadas. Por exemplo, para a radiação  $K\alpha_1$ , tem-se que  $E_{\text{fóton}} = \phi_K - \phi_{L_{III}}$ . Com essa energia, pode-se então obter o comprimento de onda através da equação  $\lambda = hc/(\phi_K - \phi_{L_{III}})$ . Como a energia para cada nível varia com o alvo metálico, cada tipo de alvo produz radiações características em diferentes comprimentos de onda. A Tabela 1 mostra os comprimentos de onda para os materiais mais utilizados em tubos de raios X [29].

**Figura 12:** Os níveis atômicos de energia e as emissões de radiação referentes a cada transição.



Fonte: Adaptado da referência [29].

**Tabela 1:** Radiações características dos principais materiais utilizados em tubos de raios X [29].

Elemento	$K\alpha_1$ (Å)	$K\beta_1$ (Å)
<b>Cu</b>	1,54056	1,39221
<b>Mo</b>	0,70930	0,63228
<b>Cr</b>	2,28970	2,08487
<b>Co</b>	1,78896	1,62079
<b>W</b>	0,20901	0,18437
<b>Ni</b>	1,65791	1,50013
<b>Fe</b>	1,93604	1,75661

Outra forma de gerar raios X é em um síncrotron, como o que existe em Campinas-SP, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) [29].

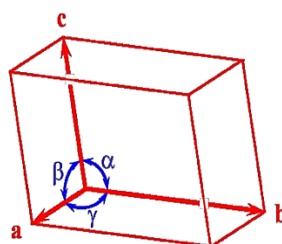
A luz síncrotron é emitida por elétrons altamente energéticos que circulam em um anel de armazenamento. Quando partículas carregadas, como os elétrons, mudam de direção ou são aceleradas, elas emitem ondas eletromagnéticas, ou luz. Esta emissão é particularmente intensa e focalizada quando os elétrons têm energias muito altas, tais que suas velocidades são muito próximas da velocidade da luz [28, 30].

### 3.1.2- Sistema cristalino

Um cristal ou monocristal pode ser definido como um sólido composto de átomos, íons ou moléculas arranjados em um padrão periódico em três dimensões. Outra definição dada a um cristal consiste na repetição uniforme de celas unitárias, onde muitos cristais juntos, espalhados de maneira aleatória, formam o policristal.

A cela unitária, por sua vez, é descrita por três vetores que coincidem com as três arestas independentes (**a**, **b** e **c**), e por três ângulos que formam entre si as direções destas arestas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Dessa maneira, pode-se definir que  $\alpha$  é o ângulo entre **b** e **c**,  $\beta$  é o ângulo entre **a** e **c**, e  $\gamma$  é o ângulo entre **a** e **b**, conforme mostrado na Figura 13.

**Figura 13: Representação da cela unitária em suas três dimensões.**



**Fonte: Adaptado da referência [27].**

A junção das arestas e dos ângulos que formam a cela unitária resulta em sete sistemas de rede. Os sete sistemas de redes existentes são: cúbico, tetragonal, ortorrômbico, romboédrico, hexagonal, monoclinico e triclínico [27, 31]. A Tabela 2 representa a classificação dos sete sistemas de redes com suas translações e ângulos axiais.

**Tabela 2: Classificação dos sete sistemas de redes com suas translações e ângulos axiais [31].**

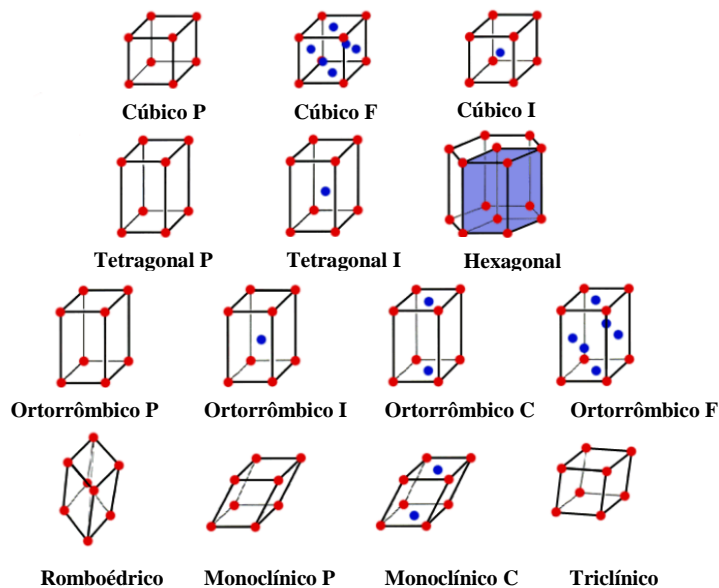
Sistemas de redes	Translações axiais	Ângulos axiais
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômbico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Romboédrico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ < 120^\circ$
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Monoclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta > 90^\circ$
Triclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

As *Redes de Bravais*, em homenagem a Auguste Bravais, é a denominação dada às configurações básicas que resultam da combinação dos sistemas de redes com a disposição dos átomos em cada uma das celas unitárias de uma estrutura cristalina, sendo estas celas entendidas como os paralelepípedos que constituem a menor subdivisão de uma rede cristalina que conserva as características gerais de todo o retículo, permitindo que por simples replicação da mesma se possa reconstruir o sólido cristalino completo.

Existem cinco arranjos básicos que descrevem o tipo de rede na cela unitária, sendo que cada arranjo é identificado por uma letra de Hermman-Mauguin. A letra **P** descreve a rede primitiva simples, **F** rede de face centrada, **I** rede de corpo centrado, **C** rede de base centrada e **R** usado especialmente para sistema romboédrico [27, 31]. As 14 redes de Bravais estão exemplificadas na Figura 14.

A combinação das redes de Bravais com os 32 grupos pontuais originam os 230 grupos espaciais. Informações mais detalhadas sobre os 230 grupos espaciais estão descritas nas Tabelas Internacionais para Cristalografia [32].

**Figura 14: Representação das 14 redes de Bravais.**



Fonte: Adaptado da referência [31].

### 3.1.3-Lei de Bragg

A difração de raios X ocorre quando uma onda em movimento encontra um conjunto de objetos espalhadores regularmente espaçados e quando o comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação é da mesma ordem de magnitude das distâncias repetidas entre os centros espalhadores [33].

Quando os raios X incidem sobre um material, interagem com os elétrons nos orbitais atômicos, espalhando raios X em todas as direções. O que dá origem à difração de raios X. Se o material que está interagindo com os raios X possui uma ordem a longo alcance, a sua rede cristalina age como uma rede de difração, dando origem a interferências construtivas para determinados ângulos de incidência. Os ângulos para os quais ocorre interferência construtiva das ondas podem ser facilmente encontrados por meio da chamada lei de Bragg. A interferência construtiva ocorrerá quando a lei de Bragg (equação 1) for satisfeita [25]. Quando a Lei de Bragg é obedecida, um pico de difração é observado.

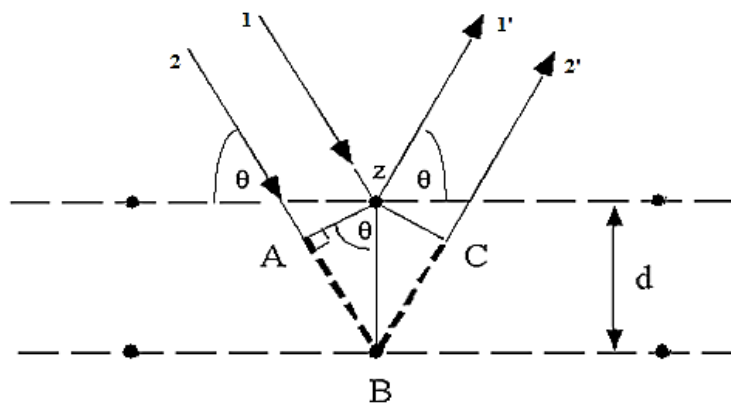
Por meio de relações geométricas entre o feixe incidente e o feixe difratado pelos planos, William Henry Bragg e seu filho William Lawrence Bragg, formularam a Lei de Bragg. Na lei de Bragg,  $d$  é o espaçamento entre planos da estrutura cristalina, definido pelos

índices de Miller ( $hkl$ ),  $\theta$  é o ângulo entre o feixe de raios X incidente e a superfície da amostra, e  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios X [25, 27, 31]. Por meio desta equação é possível obter o espaçamento entre os planos ( $d$ ), sabendo-se o ângulo de incidência ( $\theta$ ) e o comprimento de onda do feixe incidente ( $\lambda$ ) [27, 31].

$$\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

Na Figura 15 está ilustrado o fenômeno da difração de raios X, onde as linhas horizontais representam uma família de planos cristalinos ( $hkl$ ), e as setas representam os raios X incidentes e refletidos pelo cristal. O segmento ABC é a diferença de caminho seguida pelo raio 1 e 2. Logo, o segmento ABC é o caminho que o raio 2 vai percorrer a mais que o raio 1. Se esse segmento mede exatamente 1 comprimento de onda, tem-se um pico correspondente à primeira ordem da difração [34]. Sendo assim, temos que  $AB = BC = d \sin \theta$ . Portanto, o segmento  $ABC = 2 d \sin \theta$ . Desta relação geométrica origina a Lei de Bragg, mostrada na Equação 1.

**Figura 15: Representação do fenômeno da difração.**



Fonte: Adaptado da referência [31].

A partir da análise do feixe difratado é possível obter informação sobre o arranjo atômico do cristal, ou seja, simetria e distâncias interplanares que determinam a chamada cela unitária [33]. Do conhecimento das distâncias  $d_{hkl}$  entre os planos são obtidos os parâmetros de rede  $a$ ,  $b$  e  $c$  e os ângulos entre as direções dos três eixos da cela unitária  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  para os diversos tipos de estrutura cristalina [33].

### 3.1.4- Difração de raios X por policristais (DRXP)

A difração de raios X por policristais (DRXP), também denominada de difração de raios X por pó foi descoberta em 1916 na Alemanha por Debye e Scherrer e em 1917 por Hull nos Estados Unidos. Esta técnica é a mais simples para se obter dados de difração de raios X. Em vez de um monocristal com orientação definida em relação ao feixe de raios X utiliza-se uma pequena quantidade de amostra (na forma de pó), onde apenas alguns dos cristalitos estão corretamente orientados de modo a difratar, ou seja, somente uma parte dos cristalitos estão orientados de modo a satisfazer a condição imposta pela lei de Bragg.

O padrão de difração de um dado cristal, o qual compreende as posições e as intensidades dos efeitos de difração, é uma característica fundamental da substância servindo não somente para identificá-la rapidamente, mas também para uma completa determinação de sua estrutura. Assim, pode-se dizer que o padrão de difração (difratograma experimental) é semelhante a uma impressão digital da substância [33], isto é, as distâncias interplanares e suas respectivas intensidades relativas são características e específicas para cada material.

Vale enfatizar que é a estrutura cristalina de uma dada substância que determina seu padrão de difração. As posições angulares ( $2\theta$ ) determinam a forma e o tamanho da cela unitária, enquanto as intensidades relativas dos picos de difração determinam o arranjo dos átomos na cela unitária, ou seja, o conteúdo da mesma.

Há vários aspectos físicos que interferem na intensidade de um pico de difração, como por exemplo, fator de espalhamento atômico ( $f$ ), fator de estrutura, fator de multiplicidade, fator de Lorentz e de polarização, fator de deslocamento atômico, absorção, além do efeito de orientação preferencial [29, 31].

O fator de espalhamento atômico ( $f$ ) indica o poder de espalhamento do átomo, onde há uma clara correlação com os elétrons do átomo que estão expostos aos raios X, ou seja, quanto maior o número de elétrons maior o fator de espalhamento atômico. O valor de  $f$  indica o quanto um átomo pode espalhar, a um dado ângulo e um certo comprimento de onda



(geralmente os valores tabelados são dados para valores de  $\sin\theta/\lambda$ ), sendo expresso como o quociente entre a amplitude da onda espalhada por um átomo sobre a amplitude da onda espalhada por um elétron [29].

O fator de estrutura (F) leva em conta todos os átomos presentes no cristal, bem como suas posições dentro da cela unitária [31]. As posições dos átomos na cela unitária influenciam na intensidade da radiação difratada, pois o cristal é uma repetição dessas celas. Para obter esse fator é feita a soma das ondas espalhadas por todos os átomos da cela [35].

Para uma cela unitária de  $n$  átomos, cujas coordenadas fracionais são  $u_n$ ,  $v_n$  e  $w_n$  ( $n = 1, 2, 3, \dots$ ) e fatores de espalhamento  $f_i$  ( $i = 1, 2, 3, \dots$ ), o fator de estrutura para uma dada reflexão ( $hkl$ ) será:

$$F_{hkl} = \sum_{n=1}^n f_i \cdot e^{2\pi i(hu_n + kv_n + lw_n)} \quad (2)$$

O valor absoluto de (F) é definido como uma razão de duas amplitudes, ou seja, a amplitude da onda espalhada por todos os átomos da cela unitária e a amplitude da onda espalhada por um elétron [29].

A intensidade do feixe difratado por todos os átomos da cela unitária, em uma direção determinada pela lei de Bragg, é proporcional a  $|F|^2$ . É válido mencionar que o fator de estrutura independe da forma e do tamanho da cela unitária, depende somente da disposição relativa dos  $n$  átomos na cela unitária, e de seus respectivos fatores de espalhamento  $f_i$  [35].

Um outro fator importante que interfere na intensidade dos picos é o fator de multiplicidade. O fator de multiplicidade refere-se à proporção relativa de planos cristalinos que contribuem para uma dada reflexão. Por exemplo, há planos que, por terem a mesma distância interplanar, difratam na mesma posição angular, sobreposta pelo pico de outra reflexão, como é o caso, dos planos (100), (010) ou (001) para uma cela cúbica por exemplo. Somando-se a esses três os planos com  $\bar{1}$  ao invés de um, temos 6 planos contribuindo para a mesma reflexão, implicando em um fator de multiplicidade 6 [29].

Dois fatores geométricos diretamente relacionados à intensidade difratada também devem ser considerados no cálculo da intensidade relativa, isto é, o fator de Lorentz e o fator de polarização. Os dois fatores são expressos conjuntamente pela equação 3 e são chamados de fator Lorentz-polarização (LP) [27, 29].

$$LP = \frac{1 + \cos^2 2\theta}{\sin^2 \theta \cos \theta} \quad (3)$$

O fator LP refere-se a um fator geométrico que diminui as intensidades integradas dos picos difratados em ângulos intermediários, quando comparados com os valores de ângulos menores e maiores, uma vez que a quantidade de polarização depende do ângulo no qual a radiação é espalhada [31].

Por fim, aplica-se o fator de deslocamento atômico ( $e^{-2M}$ ) também conhecido como fator de temperatura à expressão da intensidade relativa. Isso se deve ao fato de que o aumento de temperatura afeta o fenômeno da difração, pois expande a cela unitária e gera efeitos como o deslocamento dos picos, a diminuição da intensidade nos picos e o aumento da radiação de fundo [29]. O fator de temperatura depende do material, do ângulo  $\theta$  e do comprimento de onda  $\lambda$ .

Acoplando todos esses fatores, obtemos a seguinte expressão para a intensidade relativa dos feixes difratados:

$$I = |F|^2 p \left( \frac{1 + \cos^2 2\theta}{\sin^2 \theta \cos^2 \theta} \right) e^{-2M} \quad (4)$$

onde,  $I$  é a intensidade,  $F$  o fator de estrutura,  $p$  o fator de multiplicidade, o termo dentro dos parênteses é o fator de Lorentz e de polarização (LP), e o termo exponencial ( $e^{-2M}$ ) é o fator de deslocamento atômico [31].

Além desses fatores, a absorção e a orientação preferencial também influenciam na intensidade difratada. A passagem dos raios X através da matéria também pode ser acompanhada por uma progressiva diminuição da sua intensidade. Esse processo, conhecido como absorção, depende essencialmente dos elementos presentes no material.

O efeito de orientação preferencial ocorre quando os cristalitos presentes em uma amostra tendem a se orientar preferencialmente em uma direção (ou conjunto de direções) do que em outras. Estes efeitos podem ser difíceis de eliminar, e estes também podem levar a medidas de intensidade incorretas [35]. Assim, uma forma de eliminar o efeito de orientação preferencial é a utilização de capilar nas análises. Quando se trabalha com amostras de fármacos, a utilização de capilares nas análises torna-se de suma importância.

No caso de amostras de fármacos, onde os cristalitos são anisotrópicos – com forma de agulhas ou plaquetas, estes se orientam no porta-amostra de forma preferencial, o que gera, o efeito de orientação preferencial, o qual pode apresentar grandes distorções no padrão de difração, e levar a possíveis erros de interpretação [36]. Além de prejudicar, por exemplo, em uma análise de quantificação de fases. Desse modo, são necessários que sejam tomados todos os cuidados no preparo das amostras (como acondicionamento em capilar de vidro), para evitar o efeito de orientação preferencial.

O uso da DRXP fornece informações extremamente úteis para uma análise de estrutura, ou seja, por meio de dados de boa qualidade é possível determinar a estrutura cristalina de um material desconhecido, determinar tamanho médio de cristalito e identificar misturas de fases.

Atualmente a DRXP conta com métodos cada vez mais sofisticados para obter o melhor ajuste de um padrão de difração experimental. Dentre os métodos empregados, merece destaque o método de Rietveld, originalmente introduzido por Hugo Rietveld em 1966 [37].

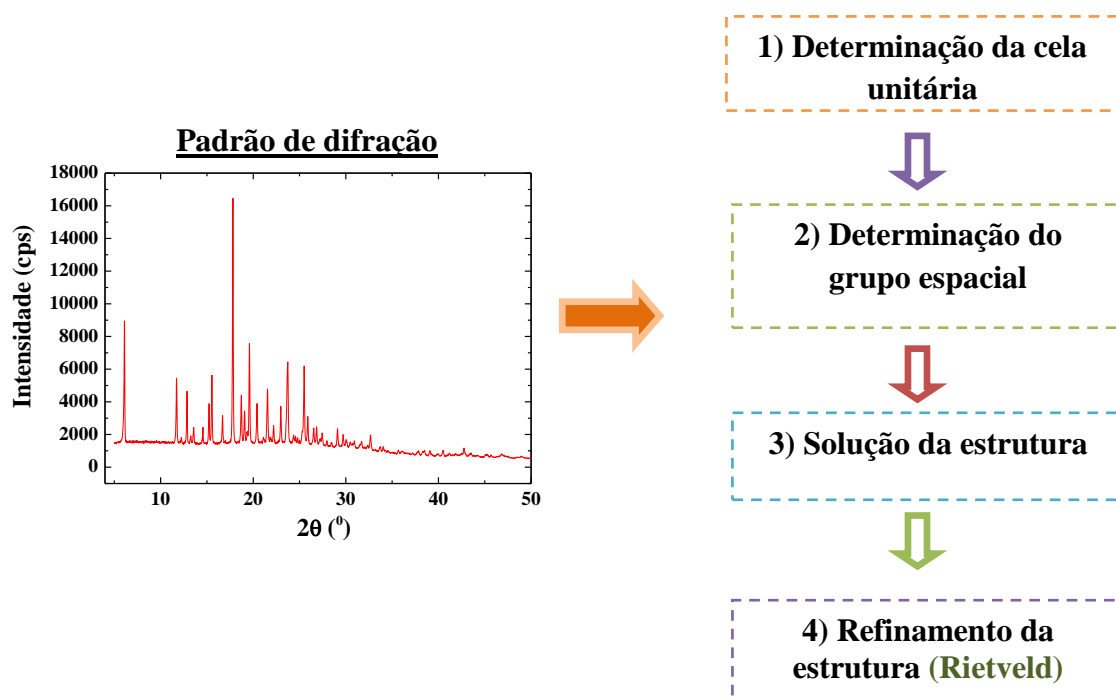
O método de Rietveld usa uma abordagem pelo método dos mínimos quadrados para obter um bom ajuste entre o perfil teórico e o experimental [37, 38]. Com o método de Rietveld, estruturas cada vez maiores estão sendo refinadas. Mais detalhes sobre o método de Rietveld pode ser encontrado na seção 3.3.

### **3.2- Determinação da estrutura cristalina a partir de dados de DRXP**

A resolução da estrutura cristalina de um dado material desconhecido a partir de dados de DRXP é um processo que envolve muitos passos, e requer a prévia identificação dos parâmetros de cela unitária e a determinação do grupo espacial. Se esses itens estiverem definidos incorretamente, o processo de resolução da estrutura provavelmente não dará certo [39].

Geralmente, a determinação da estrutura cristalina ocorre pelas seguintes etapas: 1) determinação da cela unitária (processo de indexação); 2) determinação da simetria (atribuição do grupo espacial); 3) solução da estrutura e 4) refinamento da estrutura cristalina [40], conforme mostrado na Figura 16.

**Figura 16: Diagrama esquemático da sequência das etapas envolvidas na determinação da estrutura cristalina a partir de dados de DRXP.**



**Fonte:** Ilustração elaborada pela autora.

Na etapa de indexação, o sistema cristalino e o grupo espacial são obtidos a partir do padrão de difração medido. Quando tanto a simetria da rede quanto as dimensões da cela unitária ( $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $\alpha = \beta = \gamma$ ) são desconhecidas, a indexação *ab initio* dos dados de DRXP constitui um processo de tentativa e erro no intuito de encontrar a cela unitária correta [27, 35].

A complexidade da indexação dos dados de difração de pó sem prévio conhecimento da simetria e/ou das dimensões da cela unitária é inversamente proporcional à simetria da rede, assim, quanto maior a simetria, mais simples será o processo de indexação [27, 35]. Vários programas computacionais estão disponíveis para esta finalidade, sendo os mais conhecidos TREOR, DICVOL e ITO [35, 41].

Após a obtenção dos parâmetros de cela unitária, a próxima etapa consiste em preparar os dados das intensidades do padrão de difração para a determinação do grupo espacial. Este procedimento é realizado usando uma técnica apropriada de decomposição do padrão ou ajuste de perfil [35], neste caso, as mais utilizadas para este fim são as que foram desenvolvidas por Pawley [42] e Le Bail [43].

As metodologias desenvolvidas por Pawley e Le Bail têm como finalidade ajustar o perfil do difratograma experimental pelo refinamento das variáveis que descrevam: (a) as posições dos picos (como exemplo, parâmetros da cela unitária e o deslocamento do zero), (b) *background*, (c) a largura dos picos, (d) a forma dos picos, e (e) as intensidades dos picos [41].

A atribuição do grupo espacial começa com a análise das ausências sistemáticas (ausência de reflexões com determinados índices). Em geral, só se pode ter certeza sobre a ausência de um número muito limitado de reflexões individuais em ângulos baixos. A altos ângulos é muito difícil descobrir as reflexões ausentes, e isso em decorrência da sobreposição de picos [44]. Por isso, quando se trabalha com dados de difração de pó, é bastante comum encontrar vários grupos espaciais possíveis [35]. No ajuste de perfil (Pawley), o ajuste global entre o perfil calculado e o perfil observado é exibido graficamente e expresso por meio dos índices que expressam a qualidade do refinamento, tais como  $R_{wp}$  (fator R-ponderado),  $R_{exp}$  (valor estatisticamente esperado para  $R_{wp}$ ), e o  $\chi^2$  - *goodness of fit* (fator de qualidade do ajuste) [45].

Depois da determinação dos parâmetros de cela unitária e do grupo espacial, o próximo passo consiste em estimar quantas fórmulas unitárias de uma dada molécula espera-se que estejam presentes em uma cela unitária. Para isso é necessário fazer uma comparação entre o volume estimado no processo de indexação e o volume calculado, levando em consideração o volume individual médio dos átomos. O volume individual médio dos átomos pode ser calculado com base no método proposto por Hofmann [46], em que os diferentes volumes médios ( $\bar{v}_i$ ) dos elementos são calculados à temperatura de 25 °C. Mais detalhes sobre o método pode ser encontrado na referência [46].

A solução da estrutura (terceira etapa) a partir de dados de difração de pó pode ser dividida em dois métodos: método do espaço recíproco e o método do espaço direto [47].

Uma breve descrição sobre o método do espaço direto será feita abaixo, uma vez que o algoritmo *simulated annealing* utilizado na etapa de solução da estrutura dos compostos é pela abordagem do espaço direto.

No método do espaço direto algoritmos diferentes são empregados para uma busca no espaço direto de parâmetros estruturais, e um fator de acordo (fator R) entre os dados observados (experimental) e calculados é avaliado, enquanto que o modelo estrutural é otimizado para um melhor acordo [47].

A estratégia do espaço direto para a solução da estrutura é encontrar a estrutura cristalina de teste que corresponda ao melhor acordo (ou seja, quanto menor o fator  $R$ ) entre os padrões calculado e observado. Algumas técnicas de otimização global podem ser utilizadas para este propósito, como Monte Carlo, *simulated annealing*, entre outras [47].

O método do espaço direto explora o uso das informações já conhecidas, sobre a geometria molecular, independentemente dos dados de difração de pó, antes de iniciar o cálculo da solução de estrutura. Assim, durante o processo de solução da estrutura é comum corrigir os comprimentos de ligação e ângulos aos valores padrão. Os únicos aspectos que não são previamente conhecidos e corrigidos são os valores dos ângulos de torção que definem a conformação molecular [35, 48].

No cálculo de solução da estrutura cada estrutura experimental é definida por um conjunto de variáveis estruturais que representam, para cada molécula na unidade assimétrica, a posição da molécula na cela unitária (definida pelas coordenadas  $x$ ,  $y$ ,  $z$ ), a orientação da molécula (ângulos de rotação) e os ângulos de torção desconhecidos [35].

No algoritmo *simulated annealing*, uma sequência de estruturas é gerada para a consideração como potenciais soluções de estrutura. Cada estrutura é derivada da estrutura anterior por um pequeno deslocamento aleatório da(s) molécula(s) dentro da cela unitária. Vale ressaltar que este procedimento é realizado repetidas vezes. Após este procedimento a melhor solução (ou seja, com mais baixo fator  $R$ ) é identificada e, é considerada como o modelo inicial para refinamento da estrutura [35, 48].

A validação e conclusão da estrutura são avaliadas por meio do refinamento da estrutura, o qual é realizado pelo método de Rietveld (detalhes do método – seção 3.3). Nesta etapa, há alguns índices que podem ser usados para afirmar o quão bom é o acordo entre os dados de difração observado e o calculado, sendo os mais utilizados  $\chi^2$  e  $R_{wp}$  [49]. No entanto, estes devem ser usados com muito cuidado. Um bom valor de  $R_{wp}$  vai depender muito sobre a qualidade e o tipo de padrão difração medido, por exemplo, um  $R_{wp}$  de 12% pode ser um valor muito bom para um padrão de difração obtido no síncrotron, mas seria muito ruim para dados de difração de nêutrons ou dados obtidos em laboratório. Na prática, a melhor ferramenta para avaliar a obtenção de um bom ajuste é ainda o olho de um cristalógrafo experiente [47].

Por fim, é importante enfatizar que o procedimento de determinação estrutural não é trivial. Este procedimento demanda tempo para que se chegue à resolução da estrutura. Quando se trata de fármacos, esse processo é ainda mais complicado, uma vez que compostos

orgânicos em sua grande maioria são constituídos de elementos leves, o que acaba tornando a resolução da estrutura bem mais demorada.

### 3.3-Método de Rietveld (MR)

O método de Rietveld consiste no refinamento de estruturas cristalinas, fazendo uso de dados de difração de raios X ou nêutrons, por policristais. No método de Rietveld (MR) [38], a estrutura cristalina é refinada, de forma a fazer com que o difratograma calculado se aproxime o melhor possível do difratograma observado [50].

Na área de fármacos, o método tem mostrado grande potencial, podendo ser usado para identificação e quantificação de fases cristalinas e fração de amorfo, estimativa aproximada/aparente das dimensões e forma dos cristalitos, e no refinamento de estruturas cristalinas após o procedimento final de determinação estrutural [25].

Mais precisamente, o MR realiza um ajuste do padrão de difração, refinando simultaneamente os parâmetros instrumentais (divergência axial, radiação de fundo, dentre outros), estruturais (parâmetros de cela unitária, posições atômicas, deslocamentos atômicos, ocupação atômica) e os relacionados com as características físicas da amostra analisada (tamanho de cristalito, microdeformação) [36]. Uma grande quantidade de cálculos está envolvida no método, portanto, são necessários programas computacionais bem descritos para isto [36, 51]. O GSAS (*General Structure Analysis System*) [52] e o *Topas-Academic* [53] são alguns dos programas empregados para tal finalidade.

Com o método é possível refinar parâmetros de um modelo da estrutura, porém o mesmo não resolve uma estrutura desconhecida. Assim, é necessário ter um modelo estrutural (parâmetros de cela unitária, grupo espacial e posições atômicas); ou um arquivo CIF (*crystallographic information framework*) de partida para o início do refinamento [36]. Os refinamentos pelo MR são realizados pelo método de mínimos quadrados, ou seja, a soma do quadrado da diferença para todos os pontos do difratograma deve ser minimizada para o conjunto de parâmetros utilizados na simulação, onde a quantidade a ser minimizada é dada pela Equação 5, chamada função minimização (S) [50, 54].

$$S = \sum_i w_i (y_{i(\text{obs})} - y_{i(\text{cal})})^2 \quad (5)$$

em que  $S$  equivale a somatória da diferença entre  $y_{i(\text{obs})}$  (intensidade observada experimentalmente no  $i$ -ésimo passo) e  $y_{i(\text{calc})}$  (intensidade calculada para a mesma posição). O fator peso  $w_i$  equivale a  $1/y_{i(\text{obs})}$ . Essa soma se estende por todos os pontos do difratograma [50]. A intensidade calculada em cada ponto é dada pela equação 6.

$$y_{i(\text{cal})} = R_{rsi} \sum_{\phi} S_{\phi} \sum_{h\phi} J_{h\phi} L P_{h\phi} \left| F_{h\phi} \right|^2 G_{h\phi i} a_{h\phi i} P_{h\phi} + y_{bi} \quad (6)$$

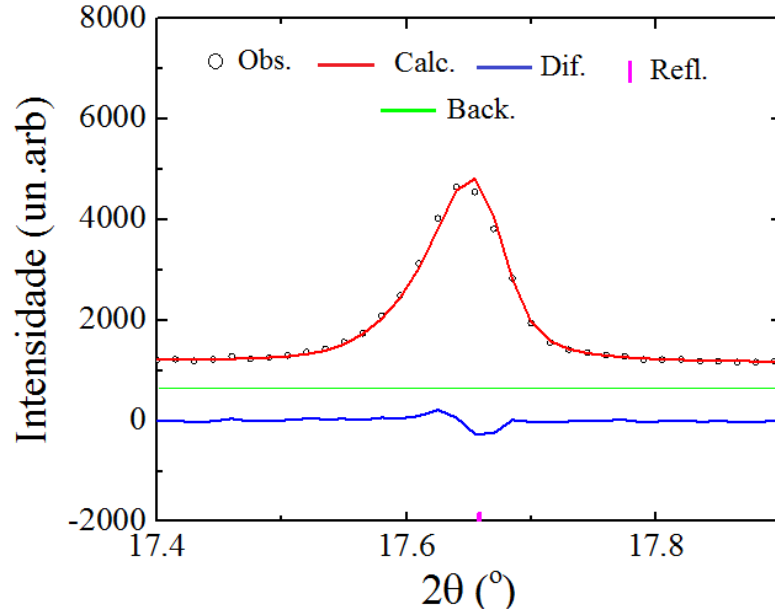
onde  $R_{rsi}$  é a correção da rugosidade superficial e  $y_{bi}$  é a intensidade da radiação de fundo no  $i$ -ésimo ponto, o sub índice  $\phi$  se refere às fases cristalinas de forma que para cada fase tem-se o fator de escala  $S$ , a multiplicidade  $J_h$ , o fator de Lorentz e de polarização  $L_{ph}$ , o fator de estrutura  $F_h$ ,  $G_{hi}$  e  $a_{hi}$  são respectivamente os valores da função de perfil e da função assimetria do pico no  $i$ -ésimo ponto e  $P_h$  é a função para corrigir a orientação preferencial [25, 50]. Esta equação leva em consideração a soma de todos os picos de todas as fases que contribuem para a intensidade no  $i$ -ésimo ponto [25].

Compreende mencionar que o modelo estrutural de partida deve estar suficientemente próximo do real para que a intensidade calculada esteja próxima da observada a fim de que o procedimento de mínimos quadrados possa convergir [36].

Na Figura 17 está mostrado o refinamento de Rietveld de um pico de difração. Basicamente, um refinamento de Rietveld consiste da sobreposição do padrão observado (o em preto) e o padrão calculado (linha contínua vermelha); da radiação de fundo ou *background* (linha contínua verde); de tracinhos verticais que mostram as posições dos picos de Bragg (barra vertical rosa); da diferença entre o padrão observado e o calculado, representado por meio de uma linha contínua em azul [34].



Figura 17: Representação de um refinamento de Rietveld, onde o padrão calculado está representado pela linha contínua vermelha; o padrão observado pelo símbolo “o” em preto; radiação de fundo ou *background* pela linha contínua verde; a diferença entre o observado e o calculado pela linha contínua azul e o pico de Bragg pela barra vertical rosa.



Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

Vale enfatizar que no início dos refinamentos a análise visual para comparar o difratograma calculado ao observado é suficiente. Porém, conforme os parâmetros vão atingindo valores próximos do “real”, distinguir visualmente não é mais possível e a avaliação deverá ser realizada com base em alguns índices que descrevem a qualidade do refinamento [25]. Os índices mais comumente usados, os quais descrevem a qualidade do refinamento, são  $R_{wp}$ ,  $R_{exp}$ ,  $\chi^2$  e  $R_{Bragg}$ .

$R_{wp}$  – fator R ponderado, definido pela Equação 7 [36, 50, 54]:

$$R_{wp} = 100 \left( \frac{\sum_i w_i (y_{i(obs)} - y_{i(calc)})^2}{\sum_i w_i y_{i(obs)}^2} \right)^{1/2} \quad (7)$$

onde os termos  $y_i$  referem-se às intensidades dos pontos. Os índices *obs* e *calc* referem-se às intensidades observadas e calculadas, respectivamente. O peso  $w_i$  é dado pelo inverso da variância de cada respectiva observação ( $=1/y_{i(obs)}$ ). O numerador na Equação 8 é a função minimização ( $S$ ) [36].

O  $R_{wp}$  é o índice que deve ser analisado para verificar se o refinamento está convergindo. Se  $R_{wp}$  está diminuindo, então o refinamento está sendo bem sucedido. No final do refinamento ele não deve estar mais variando, indicando que o mínimo já foi atingido. Se  $R_{wp}$  está aumentando, então algum(s) parâmetro(s) está(ão) divergindo do valor real, ou seja, está(ão) se afastando do valor que fornece o mínimo de  $S$  (função minimização) e o refinamento deve ser interrompido para uma análise mais detalhada dos parâmetros que estão sendo refinados [50].

$R_{exp}$  – valor estatisticamente esperado para  $R_{wp}$ , dado pela Equação 8 [50, 54].

$$R_{exp} = 100 \left[ \frac{(N - P)}{\sum w_i (y_{i(obs)})^2} \right]^{1/2} \quad (8)$$

onde  $N$  é o número de pontos utilizados no refinamento e  $P$  é o número de parâmetros refinados.

$\chi^2$  – é o fator de qualidade do ajuste (*goodness of fit*): compara o valor obtido de  $R_{wp}$  com o esperado  $R_{exp}$ . A Equação 9 mostra tal relação [50, 54].

$$\chi^2 = \frac{R_{wp}}{R_{exp}} \quad (9)$$

$\chi^2$  deve estar próximo de 1,0 ao final do refinamento, significando que nada mais pode ser melhorado, pois o  $R_{wp}$  já atingiu o limite que se pode esperar para aqueles dados de difração medidos [25]. Embora todos esses índices forneçam subsídios para julgar a qualidade do refinamento, nenhum deles está relacionado com a estrutura cristalina, e sim, apenas com o

perfil do difratograma [50]. O único índice que descreve a qualidade do modelo estrutural refinado é o  $R_{Bragg}$ .

$R_{Bragg}$  – fator de Bragg: indica a qualidade dos parâmetros estruturais refinados, sendo expresso pela Equação 10 [36, 50, 54].

$$R_{Bragg} = \frac{\sum |I_{k(obs)} - I_{k(calc)}|}{\sum I_{k(obs)}} \quad (10)$$

onde:  $I_k$  é a intensidade integrada da reflexão de Bragg de índice  $k = (hkl)$  ao final dos ciclos de refinamento. Os índices *obs* e *calc* referem-se às intensidades observadas e calculadas, respectivamente. Como a intensidade integrada está relacionada com a estrutura cristalina (tipos de átomos, posições atômicas e deslocamentos atômicos), este é o índice a ser considerado ao avaliar a qualidade do modelo estrutural refinado [50]. Um  $R_{Bragg}$  inferior ou igual a 5% sugere uma boa concordância entre o modelo estrutural refinado e o modelo real [49].

### 3.4-Análise Térmica

Análise térmica é o termo empregado para definir um grupo de técnicas pelas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura sob uma atmosfera específica [55].

Para que uma técnica térmica seja considerada como termoanalítica, três critérios devem ser satisfeitos [56]:

- 1- Uma propriedade física tem que ser medida;
- 2- A medida deve ser expressa (direta ou indiretamente) como função da temperatura;
- 3- A medida tem que ser feita sob um programa controlado de temperatura.

Entre as técnicas termoanalíticas mais importantes para caracterização do estado sólido, destacam-se a calorimetria exploratória diferencial e a termogravimetria. Ambas as técnicas se destacam especialmente na área farmacêutica, e isso em decorrência da grande

importância adquirida na caracterização de materiais e nos estudos de compatibilidade entre fármacos e excipientes [56].

A seguir será feita uma breve descrição sobre as técnicas de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria.

### **3.4.1-Calorimetria exploratória diferencial**

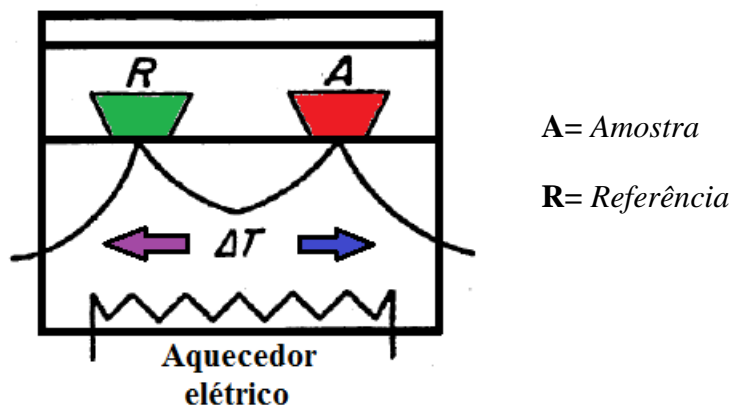
A calorimetria exploratória diferencial (DSC, do inglês, *Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material tido como referência em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura [55].

A partir das medidas realizadas por DSC, é possível observar fenômenos físicos e químicos decorrentes da variação de energia da amostra em função da razão de aquecimento aplicada sobre a mesma. Os principais fenômenos físicos que podem ser detectados por DSC, incluem: fusão, sublimação, vaporização, absorção, adsorção, dessorção, transições cristalinas, transição vítrea e transição magnética. Entre os fenômenos químicos, merece destaque as reações envolvendo cada uma das etapas de decomposição térmica da substância [55].

Baseado no tipo de equipamento, o DSC pode ser classificado em dois tipos: um que registra a diferença de potência fornecida ao sistema entre a amostra e a substância de referência - neste caso a amostra e a referência são aquecidas em compartimentos separados (DSC com compensação de potência) - e outro que mede o fluxo de calor a que as amostras são submetidas (DSC com fluxo de calor) [57, 58]. Como as análises efetuadas nesta tese foram realizadas em um equipamento que mede o fluxo de calor, será dada ênfase a este tipo de instrumento.

Os instrumentos de DSC com fluxo de calor são constituídos por um único forno, conforme mostrado na Figura 18. A amostra (dentro de panela devidamente fechada) e a referência (uma panela vazia fechada) são colocadas em um único forno sobre um disco termoeletrico. O forno é aquecido a uma taxa de aquecimento linear, e o calor é transferido para a amostra e a referência através do disco termoeletrico [58]. Neste caso, o fluxo de calor diferencial entre amostra e a referência é monitorado por termopares. Logo, a diferença no fluxo de calor da amostra e da referência é diretamente proporcional à diferença de potência das junções dos termopares [57].

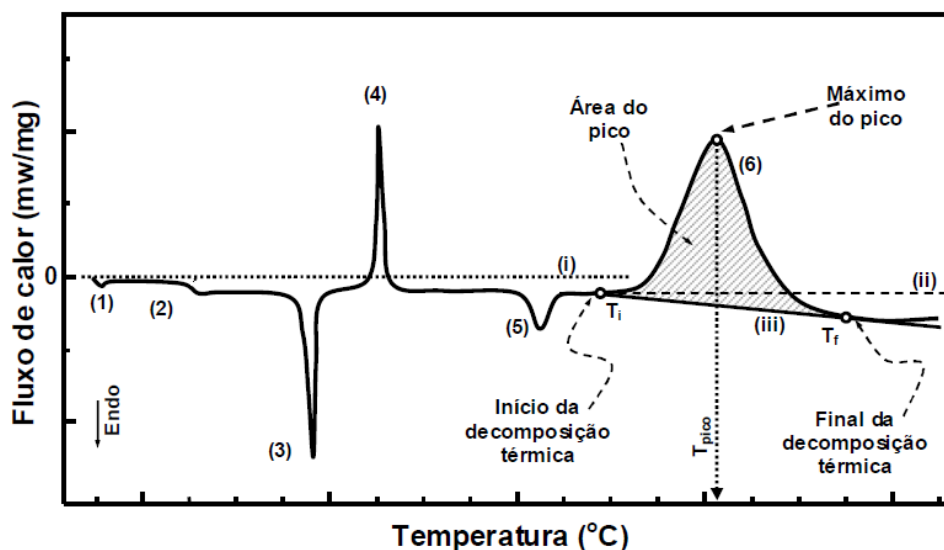
Figura 18: Esquema de um equipamento de DSC com fluxo de calor.



Fonte: Adaptado da referência [59].

Os registros das curvas de DSC, também denominados de termogramas, encontram-se como fluxo de calor *versus* temperatura, e a área do sinal é diretamente proporcional à quantidade de calor absorvido (evento endotérmico) ou liberado (evento exotérmico), sendo que a integração desse sinal fornece a quantidade de calor envolvida em  $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$  ou  $\text{cal}\cdot\text{g}^{-1}$ . É importante atentar à orientação dos registros, que sempre é disposta no termograma através de sinalização de direcionamento de eventos endotérmicos e exotérmicos [56]. Uma curva típica resultante de um experimento de DSC envolvendo eventos endotérmicos e exotérmicos está ilustrada na Figura 19. É válido mencionar que dependendo do material analisado os eventos apresentados na curva hipotética de DSC podem variar.

Figura 19: Curva típica de DSC com a indicação de seis eventos térmicos.



Fonte: Adaptado da referência [60].

O evento (1) corresponde ao início do aquecimento e não está associado à amostra. De maneira geral, ocorre com qualquer célula DSC e é atribuído ao período de estabilização do sistema à custa da potência enviada para aquecer o forno.

O evento (2) é ilustrado por uma pequena mudança da linha de base no sentido endotérmico. Esta mudança é detectada, por exemplo, quando ocorre a transição vítrea ( $T_g$ ), ou seja, a passagem do estado vítreo (mais ordenado) para o estado de “borracha” (mais flexível e menos ordenado); tal evento ocorre em função do aumento da energia rotacional, que proporciona flexibilidade e propriedades elastoméricas a materiais poliméricos, sendo também um evento característico de substâncias amorfas.

No evento (3), um pico endotérmico, quando estreito, é atribuído ao processo de fusão da amostra. O evento exotérmico (4), com pico estreito, pode ser devido à recristalização da amostra; em alguns casos o processo pode ocorrer logo após a fusão. Quando o evento (3) está associado a um processo de desidratação, o evento (4) pode corresponder à transição cristalina.

O evento (5), endotérmico, é característico da transição cristalina (pico estreito) ou então do início do processo de decomposição térmica que se inicia com absorção de energia para que ocorram rompimentos de ligações químicas e volatilização do composto químico formado. O evento (6) é típico de processos oxidativos ou de processos térmicos associados a várias etapas de decomposição térmica que ocorrem simultânea e favoravelmente com liberação de calor [60].

É válido ressaltar que em experimentos de DSC a forma, posição e número de picos são úteis para a análise qualitativa, enquanto a área sob os mesmos é de interesse quantitativo [59]. Para uma interpretação precisa de uma curva de DSC é necessário que os resultados obtidos sejam comparados às curvas TG/DTG.

### **3.4.2- Termogravimetria**

A termogravimetria (TG) é uma técnica termoanalítica em que a variação de massa da amostra é determinada em função da temperatura e/ou do tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura [61].

Os experimentos para avaliar as variações na massa de um material em função da temperatura são executados por meio de uma termobalança que deve permitir o trabalho sob as mais variadas condições experimentais, o que inclui diferentes atmosferas gasosas e massa

de amostra, variadas razões de aquecimento e/ou condições isotérmicas em temperaturas específicas, entre outras condições [34].

Os fatores que podem influenciar o aspecto das curvas TG abrangem os *fatores instrumentais* e os *fatores ligados às características da amostra*. Entre os fatores instrumentais, temos a razão de aquecimento do forno, atmosfera do forno, geometria do suporte de amostras e do forno. O segundo fator são as características da amostra, que inclui tamanho de partículas, quantidade de amostra, solubilidade dos gases liberados na própria amostra, calor de reação, compactação da amostra, natureza da amostra e condutividade térmica da amostra [55-57].

A TG pode ser aplicada em estudo da decomposição térmica de substâncias orgânicas, inorgânicas e dos mais variados tipos de materiais como minerais, carvão, petróleo, madeira, polímeros, alimentos e materiais explosivos; nos estudos sobre corrosão de metais em atmosferas controladas, em faixas muito amplas de temperatura; nos estudos sobre a velocidade de destilação e evaporação de líquidos, e de sublimação de sólidos [55].

No método termogravimétrico, convencional ou dinâmico, mais comumente empregado, a massa da amostra ( $m$ ) é continuamente registrada como função da temperatura ( $T$ ) ou tempo ( $t$ ) [56, 57].

$$m = f(T \text{ ou } t)$$

Nas curvas termogravimétricas, os desníveis em relação ao eixo das ordenadas correspondem às variações de massa sofridas pela amostra, o que permite obter dados que podem ser utilizados com finalidades quantitativas.

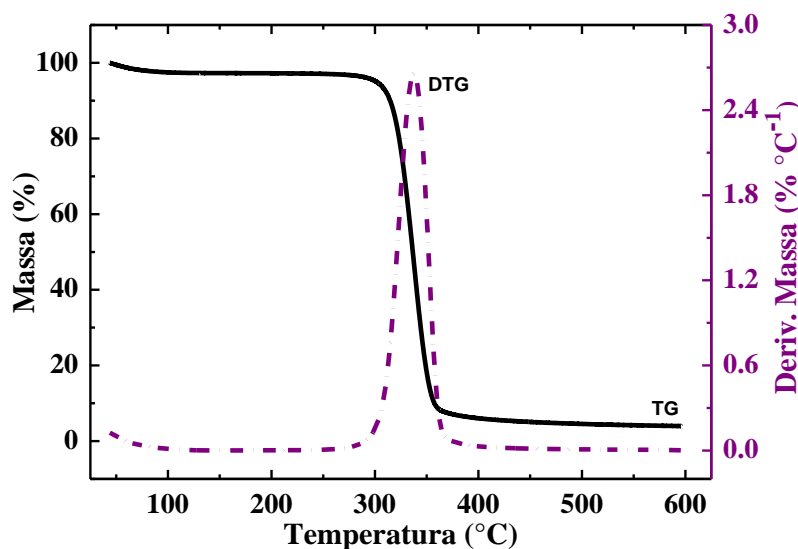
No entanto, quando se deseja obter informações mais precisas dos eventos que ocorrem em uma curva TG, utiliza-se o método da termogravimetria derivada. No método da termogravimetria derivada, a derivada da variação de massa em relação ao tempo ( $dm/dt$ ) é registrada em função da temperatura ou tempo.

$$dm/dt = f(T \text{ ou } t)$$

Neste método são obtidas curvas que correspondem à derivada primeira da curva TG (DTG) e nos quais os degraus ou desníveis são substituídos por picos que delimitam áreas proporcionais às alterações de massa sofridas pela amostra. Os picos agudos mostrados nas

curvas DTG permitem distinguir claramente uma sucessão de reações que muitas vezes não podem ser claramente distinguidas nas curvas TG [55]. A Figura 20 exemplifica uma curva TG (curva preta) e sua derivada DTG (curva lilás) do excipiente celulose microcristalina PH-102.

**Figura 20:** Curva TG e sua derivada (DTG) da celulose microcristalina PH-102.



Fonte: Adaptado da referência [51].

### 3.5-Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma técnica de inestimável importância para análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais e síntese orgânica. O infravermelho e demais métodos espectroscópicos modernos como a ressonância magnética nuclear, espectroscopia na região do ultravioleta-visível e espectrometria de massas, constituem hoje as principais ferramentas para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas [62].

Como todas as formas de espectroscopia, a espectroscopia de absorção na região do infravermelho depende da interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética [63].

Um espectro de infravermelho apresenta grande quantidade de sinais chamados de bandas, e pode ser descrito através de três variáveis: posição, intensidade e formato. A



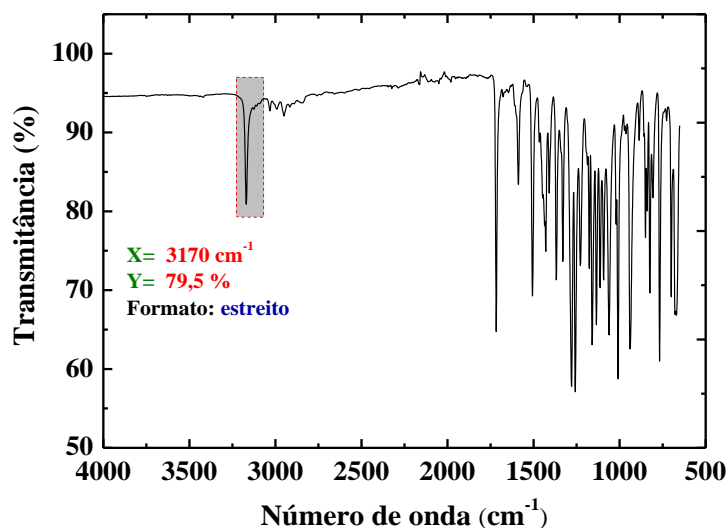
posição e a intensidade podem ser expressas em números, enquanto que o formato da banda é usualmente expresso em palavras [64].

A posição é determinada pelo eixo abscissa, onde a banda aparece, sendo esta variável sempre expressa numericamente. Geralmente, quatro parâmetros diferentes podem ser usados para descrever a posição, como energia (ergs), frequência ( $s^{-1}$ ), comprimento de onda ( $cm^{-1}$ ) e número de ondas ( $cm^{-1}$ ).

A intensidade é determinada pelo eixo ordenada. Este parâmetro pode ser expresso como porcentagem (%) de transmitância.

O formato de banda é geralmente descrito como largo, estreito e/ou agudo. Nesta etapa a observação de quem manuseia o equipamento de infravermelho tem um papel importante na descrição, pois não há uma padronização para formatos de bandas [64]. Dessa maneira, é necessário cuidado na descrição das bandas. Um típico espectro de FTIR e suas variáveis (posição, intensidade e formato) estão exemplificados na Figura 21.

**Figura 21:** Espectro de FTIR e suas variáveis (posição, intensidade e formato) para uma banda de absorção específica (representada pelo retângulo cinza).



**Fonte:** Ilustração elaborada pela autora.

O espectro de infravermelho é característico de uma molécula como um todo, assim os grupamentos e ligações apresentam absorções que geram bandas de formato característico da estrutura da molécula [51]. Deste modo, a possibilidade de dois compostos diferentes apresentarem o mesmo espectro de infravermelho é extremamente pequena, pois os espectros

de infravermelho apresentam muitas bandas. Por isso, o espectro de infravermelho é chamado de impressão digital de uma molécula. Assim, para compostos orgânicos, se duas amostras puras tiverem espectros de infravermelho diferentes, é possível inferir que se trata de compostos diferentes. Se, por outro lado, apresentarem o mesmo espectro, trata-se do mesmo composto [65]. Vale enfatizar que a escolha da faixa espectral é muito importante na identificação do material.

A região espectral que corresponde ao infravermelho compreende a radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10  $\text{cm}^{-1}$ . Dentro desta ampla faixa espectral, o infravermelho pode ser dividido em três regiões distintas - o infravermelho próximo (NIR - do inglês, *Near Infrared*) com número de onda entre 12800 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , o infravermelho médio (MID - do inglês, *Middle Infrared*) entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e o infravermelho distante (FAR - do inglês, *Far Infrared*) entre 400 a 10  $\text{cm}^{-1}$  [34, 51].

O MID é a região do espectro onde se encontra o maior número de aplicações para a análise qualitativa de compostos orgânicos, pois nessa região ocorrem essencialmente transições fundamentais e existe uma faixa espectral conhecida como região de impressão digital (1200 a 700  $\text{cm}^{-1}$ ). Nessa região, pequenas alterações na estrutura e na constituição de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição das bandas de absorção do espectro que são relacionados com a estrutura da molécula [51]. Com base nestas informações, o MID foi a região escolhida para a análise dos compostos orgânicos avaliados nesta tese.

De um modo geral, as medidas de infravermelho são realizadas em espectrômetros dispersivos convencionais e espectrômetros não dispersivos (espectrômetros com a transformada de Fourier). Embora a transformada de Fourier seja considerada complexa, atualmente ela é facilmente realizada pelos computadores pessoais modernos de alta velocidade e baixo custo [66], o que tem facilitado o uso destes espectrômetros. É válido mencionar que com o emprego da transformada de Fourier houve uma melhora significativa na qualidade dos resultados quando comparado à instrumentação dispersiva.

Na técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), três métodos de reflexão no infravermelho têm apresentado aplicações práticas na aquisição de espectros que contenham informações químicas de determinada matriz; são eles: o método por reflexão especular (ou externa); o método por reflexão difusa e o método por reflexão total atenuada (ATR, do inglês,

*attenuated total reflection*) [34], sendo este último o método empregado nas análises de FTIR dos compostos orgânicos avaliados nesta tese.

O método por ATR é considerado uma técnica de amostragem rápida, não destrutiva, que requer uma mínima preparação da amostra e permite a obtenção de espectros de amostras sólidas ou líquidas. Na espectroscopia de infravermelho por ATR, a superfície da amostra é colocada em contato com a superfície de um cristal apropriado, muitas vezes feito de seleneto de zinco (ZnSe) [34, 51, 67].

Como qualquer outra técnica, a espectroscopia de infravermelho por ATR também apresenta algumas limitações. Por exemplo, dificuldade em se obter uma boa reprodutibilidade no contato da amostra com o elemento de ATR. Isto muitas vezes é observado por meio da variação na intensidade das bandas com a pressão aplicada. Outro fator que influencia na intensidade das bandas é a área de contato entre o cristal e a amostra. Por isso, quando se deseja medidas quantitativas, é necessário colocar toda a área do cristal em contato com a amostra [34, 51, 67].

De um modo geral, a técnica de FTIR tem sido aplicada na identificação e elucidação de diferentes materiais. Na área farmacêutica tem se destacado, principalmente na identificação de fármacos e excipientes, análise de pureza, investigação estrutural, cristalinidade, interações entre fármacos e excipientes e na caracterização de estruturas polimórficas [68].

### **3.6- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

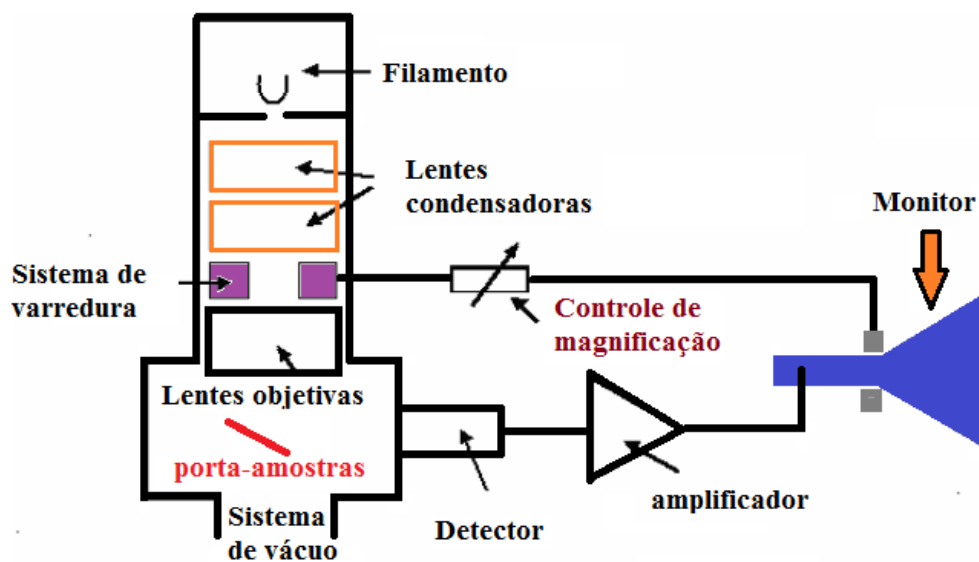
O microscópio eletrônico de varredura é um instrumento muito versátil que permite a observação e análise das características microestruturais de materiais sólidos orgânicos e inorgânicos.

O primeiro trabalho descrevendo o conceito de um microscópio eletrônico de varredura é o de M. Knoll (1935) [69]. Somente em 1965 foi então construído o primeiro microscópio eletrônico de varredura comercial pela *Cambridge Scientific Instrument Co.*. Desde então, muitos avanços têm sido feitos, principalmente em relação às fontes de elétrons, à parte eletrônica e computacional [70]. Por exemplo, os avanços dos microcomputadores e o desenvolvimento de programas específicos para operação e análise dos resultados facilitaram ainda mais a utilização do microscópio eletrônico de varredura [70].

Um equipamento de MEV convencional apresenta uma coluna óptico-eletrônica adaptada a uma câmara com porta-amostra aterrado, sistema de vácuo, detector e sistema eletrônico, conforme mostrado na Figura 22.

Geralmente, os instrumentos usam como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) ou de hexaboreto de lantânio (LaB<sub>6</sub>). O filamento de W vem sendo a fonte mais utilizada nos últimos 50 anos pela maioria dos microscópios eletrônicos, e isso em decorrência do seu baixo custo aliado ao seu bom desempenho. O filamento de LaB<sub>6</sub> apresenta brilho ainda mais intenso que o brilho do filamento de W, porém seu custo é 10 vezes maior que a fonte de W. Em aplicações onde o alto brilho da fonte não é muito necessário, como para médios aumentos (na faixa de 10000x e que são os aumentos normalmente usados para a análise de materiais), e onde se deseja um feixe bastante estável (caso da microanálise), o filamento de W pode ser considerado como a melhor opção de fonte de elétrons [70].

**Figura 22:** Representação esquemática dos componentes básicos de um microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Adaptado das referências [71, 72].

Basicamente, o princípio de um microscópio eletrônico de varredura consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja

varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra. O sinal da imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra, e o sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de W aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV [71].

Pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo, o feixe é acelerado e, em seguida, focalizado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas com um *spot* menor que 4 nm. O feixe que interage com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletados por detectores adequados e convertidos em um sinal de vídeo [71].

A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe incidente e o material da amostra [71] (os elétrons do feixe incidente que varrem a superfície da amostra são denominados de elétrons primários).

As interações feixe-amostra podem revelar informações importantes sobre a análise morfológica, a química elementar de sólidos (análise elementar), entre outras propriedades. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, uma série de radiações são emitidas como elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios X característicos, elétrons Auger, entre outras [70, 71]. No entanto, as imagens de MEV são obtidas pela detecção dos elétrons secundários e retroespalhados. Os elétrons Auger e os raios X são utilizados na análise dos elementos (análise elementar) [71].

Os elétrons secundários são elétrons que são ejetados de átomos da amostra devido às interações inelásticas dos elétrons energéticos do feixe de elétrons primários. Estes elétrons resultantes são de baixa energia ( $< 50$  eV) e formarão imagens com alta resolução (3-5 nm) [71]. São selecionados dos demais elétrons com base na energia cinética. Uma das principais características dos elétrons secundários é a baixa profundidade de escape, próxima à superfície. Deste modo, o sinal destes elétrons possui maior resolução espacial que os elétrons retroespalhados, que são bem mais energéticos e reativos com as camadas mais profundas da amostra. Normalmente os elétrons retroespalhados possuem energia que varia entre 50 eV até o valor da energia do elétron primário. Os elétrons retroespalhados de alta energia, por serem resultantes de uma simples colisão elástica, provêm de camadas mais superficiais da amostra. Logo, se somente este tipo de elétrons forem captados, as informações de profundidade

contidas na imagem serão poucas se comparadas com a profundidade de penetração do feixe [71]. Somente os elétrons secundários que são gerados bem próximos à superfície contribuem de forma expressiva para a formação do sinal e maior resolução da imagem, já que o sinal provém de uma área de seção transversal próxima do diâmetro do feixe desmagnificado pelas lentes.

Os equipamentos de MEV são extensivamente utilizados nas pesquisas das áreas biomédicas e de materiais, nas indústrias farmacêuticas, nas indústrias de semicondutores, em laboratórios de pesquisas avançadas e em muitas outras aplicações [73]. No entanto, quando se trata da análise de fármacos, a técnica se torna crucial quando se refere à questão do polimorfismo, e isso por dar informações sobre a morfologia e o tamanho de cristais [73].

### **3.7- Dissolução Intrínseca (DI)**

As propriedades sólidas dos fármacos, tais como polimorfismo, tamanho de partícula e área superficial, são fatores que influenciam diretamente na velocidade de dissolução do fármaco. Para que o fármaco possa ser absorvido e passe para corrente sanguínea, é necessário que esteja dissolvido nos fluidos biológicos. E para isto ocorrer, duas etapas são necessárias, como a desintegração da forma farmacêutica e a solubilização das partículas do fármaco. Quando a etapa de solubilização é limitante para absorção do fármaco, a velocidade de dissolução é controlada pela dissolução intrínseca deste fármaco [74].

A dissolução intrínseca (DI) é uma técnica que tem sido utilizada para caracterizar fármacos no estado sólido [73, 74]. Entre as várias aplicações da DI, destacam-se: determinação de parâmetros termodinâmicos associados com a transição de fases cristalinas, investigação do fenômeno de transferência de massa durante processo de dissolução, estudo do efeito de tensoativos e da alteração do pH para solubilização de fármacos pouco solúveis em água e a relação entre a velocidade de dissolução de uma substância ativa e a sua forma cristalina [75]. Pela técnica é possível também prever eventuais problemas de biodisponibilidade [74], e isso pelos valores de velocidade de dissolução intrínseca (VDI).

A VDI é definida como a velocidade de dissolução de uma substância pura quando são mantidas constantes as condições de área superficial, temperatura, agitação, pH e força iônica do meio [76, 77]. É determinada utilizando-se um procedimento padrão no qual uma quantidade de fármaco é compactada em um disco com superfície constante e de área definida

[74]. Geralmente os ensaios de DI são realizados em dois aparatos: no sistema de disco rotativo (conhecido como “Aparato de Wood”) e no sistema de disco fixo (estático) [74-78].

Durante os ensaios, a VDI de uma substância pura pode ser influenciada por fatores intrínsecos relacionados às propriedades do estado sólido, como polimorfismo, amorfismo, solvatação, tamanho de partícula e área superficial específica; e também por fatores extrínsecos como tampão, utilização de tensoativo, temperatura, viscosidade, força iônica do meio – relativos ao meio de dissolução, área superficial e agitação [78]. Uma das vantagens em utilizar os ensaios de DI em vez dos ensaios de solubilidade consiste no fato de que a quantidade requerida de material é bem inferior em relação ao ensaio de solubilidade convencional e possíveis alterações na estrutura cristalina do material podem ser detectadas em um gráfico de quantidade dissolvida *versus* tempo, por meio de uma curvatura da reta (podendo a mesma ser positiva ou negativa), o que não ocorre em ensaios de solubilidade.

Por exemplo, em um ensaio de solubilidade convencional, onde uma quantidade de fármaco é mantida sob agitação e temperatura constante até a saturação da solução, a determinação da real solubilidade do material pode ser comprometida devido às possíveis ocorrências de recristalizações durante o ensaio, que podem provocar alteração da forma cristalina (formação de hidratos e solvatos) [75], o que não ocorre em ensaios de DI.

Dessa maneira, nos últimos anos, os ensaios de DI vêm sendo discutido como alternativa para a determinação da solubilidade de fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) [77].

O SCB foi proposto em 1995 por Amidon et al., [79], e consiste em uma ferramenta empregada para dividir os fármacos em diferentes grupos conforme suas características de solubilidade e permeabilidade. Este sistema considera que a dissolução e a permeabilidade intestinal da substância ativa são parâmetros fundamentais na velocidade e extensão da absorção [75, 77, 79].

De acordo com o SCB, diferentes métodos podem ser usados para avaliar a solubilidade e a permeabilidade na classificação dos fármacos, sendo que vários dos métodos são recomendados pelo FDA. O FDA sugere que a realização do ensaio de solubilidade ocorra em temperatura de  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  em diferentes meios aquosos variando-se a faixa de pH de 1,0 a 7,5 [77].

Segundo o SCB os fármacos podem ser organizados em quatro classes, conforme suas características de solubilidade e permeabilidade. Os fármacos de classe I apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade; os pertencentes à classe II apresentam baixa solubilidade e

alta permeabilidade; os fármacos de classe III alta solubilidade e baixa permeabilidade, e os de classe IV apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade [77, 79].

### Cálculo da VDI

Para o cálculo da VDI utiliza-se a equação derivada da equação de Noyes e Whitney [73, 75, 77] conforme mostrado na equação 11:

$$j = \frac{Vdc}{dt} \cdot \frac{1}{A} \quad (11)$$

onde  $j$  = fluxo de dissolução ( $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $V$  = volume do meio de dissolução (mL),  $c$  = concentração do fármaco dissolvido no meio ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $A$  = área superficial da amostra ( $\text{cm}^2$ ) e  $t$  = tempo (s). O  $j$  é expresso em velocidade de dissolução por unidade de área. Para um fármaco puro  $j$  é denominado de VDI [75, 77].

Obtém-se o valor da VDI através da relação quantidade dissolvida *versus* tempo. Pela regressão linear dos pontos, tem-se a velocidade de dissolução em unidade de massa por minuto ( $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$ ) - dada pelo valor do coeficiente angular. Dividindo-se esse valor pela área superficial do compactado em centímetros quadrados, a VDI é determinada. Assim, o valor da VDI será dado em unidades de massa  $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$  [74, 77].

O gráfico obtido em ensaios de DI pode apresentar uma curvatura ou não; apresentando curvatura, deve-se considerar apenas a região linear para o cálculo da VDI. A presença da curvatura pode indicar algum erro experimental, estar relacionada com a saturação do meio ou com a transição da forma cristalina na superfície do compactado durante o ensaio [73, 77].

Os compostos, de um modo geral, podem cristalizar-se com moléculas de solventes, seja solvato ou hidrato. A presença de solvato ou hidrato na estrutura influencia nas interações intermoleculares e confere propriedades físico-químicas diferenciadas para o material em sua forma sólida [73]. Como exemplo, os fármacos na forma de hidrato ou solvato apresentam menor solubilidade e menor velocidade de dissolução que sua forma anidra. A teofilina (antiasmático) é um dos fármacos que apresenta tais características [80]. Porém, há exceções,



como os solvatos da glibenclamida (hipoglicemiante oral), os quais apresentam maiores solubilidade e velocidade de dissolução do que as formas não solvatadas [73].

Dessa maneira, não é possível estabelecer uma regra universal sobre a tendência de comportamento de um composto, pois cada forma cristalina apresenta diferentes interações intermoleculares, o que acaba influenciando a dissolução e a possível transformação de fases durante a dissolução [73]. Por isso, a importância em realizar os ensaios de DI para prever possíveis problemas de biodisponibilidade.

## 4-Objetivos

### 4.1- Objetivos gerais

O presente estudo tem por objetivo principal a caracterização físico-química dos candidatos a fármacos derivados sulfonilidrazônicos - LASSBio-1773 e LASSBio-1774.

### 4.2- Objetivos específicos

Caracterização físico-química dos candidatos a fármacos LASSBio-1773 e LASSBio-1774 com o uso da difração de raios X por policristais (DRXP) aliada ao método de Rietveld, termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), dissolução intrínseca (DI) e o método GM (*growth morphology*), com o propósito de avaliar o arranjo estrutural, a estabilidade térmica, ponto de fusão, estado de hidratação, possíveis eventos de recristalização, morfologia e a solubilidade dos compostos.

Determinação da estrutura cristalina dos candidatos a fármacos com dados de boa qualidade de DRXP para indexação dos padrões de difração e o algoritmo de *simulated annealing* implementado no programa *DASH* para resolução das estruturas cristalinas.

## 5-Metodologia

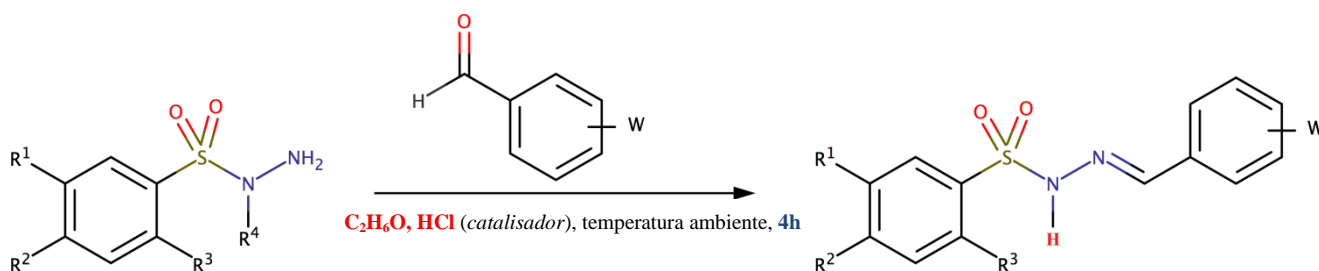
### 5.1-Materiais

Os candidatos a fármacos derivados sulfonilidrazônicos LASSBio-1773 e LASSBio-1774 avaliados nesta tese foram sintetizados no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) da UFRJ, de acordo com os protocolos de síntese descritos abaixo.

#### **Protocolo 1:** *obtenção do candidato a fármaco - LASSBio-1773*

O desenvolvimento do composto LASSBio-1773 foi baseado na síntese da sulfonilidrazona. A uma solução de sulfonilidrazida (0,2 g; 0,87 mmol) em 7 mL de etanol absoluto à temperatura ambiente, sob agitação constante foi adicionado o aldeído (0,91 mmol). Posteriormente à solubilização do aldeído foram adicionadas 2 gotas de ácido clorídrico - HCl (37%). Após o término do processo, observado por cromatografia por camada fina - CCF (aproximadamente 4 horas), o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com éter de petróleo, dando origem à sulfonilidrazona. Quando necessário, o precipitado foi purificado pelo processo de recristalização em mistura de etanol/água [24].

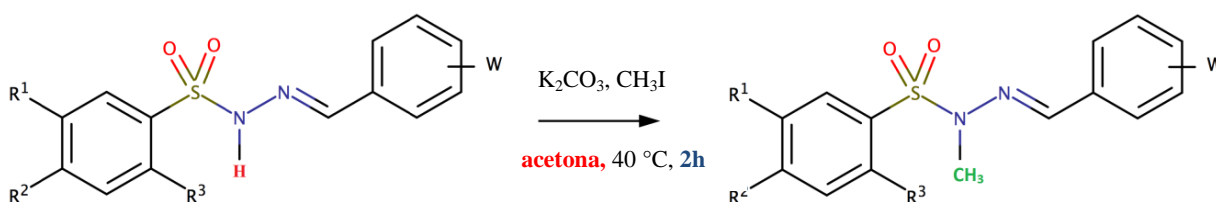
O LASSBio-1773 (E)-metil-4-(2-(3,4-dimetoxifenilsulfonilidrazono)metil) benzoato foi preparado de acordo com o método citado acima (síntese da sulfonilidrazona) pela condensação de 3,4-dimetóxiбенzenosulfonil hidrazida (4,23mmol; 1g) com 4-formilbenzoato de metila (4,42mmol; 0,726g) em 30mL de etanol. O LASSBio-1773 foi obtido como um sólido branco e com rendimento de 99% [20, 24].



## **Protocolo 2:** obtenção do candidato a fármaco - LASSBio-1774

O desenvolvimento do composto LASSBio-1774 foi baseado na *N*-alquilação das sulfonilidrazonas. Assim, a uma solução de sulfonilidrazona em acetona foram adicionados carbonato de potássio e iodeto de metila. Então a reação foi acoplada a um condensador e aquecida até 40 °C, sob agitação constante e vigorosa. Após o término, observado por CCF (aproximadamente 2 horas), a acetona foi evaporada e, adicionado etanol ao sólido residual. Então, a suspensão foi vertida em gelo, e a esse sistema foram adicionadas 3 gotas de bissulfito de sódio - NaHSO<sub>3</sub>. O precipitado formado foi filtrado a vácuo, dando origem a sulfonilidrazona *N*-metilada [24].

O LASSBio-1774 (E)-metil-4-((2-(3,4-dimetoxifenilsulfonyl)-2-metil)hidrazono) metil) benzoato foi preparado a partir da síntese da sulfonilidrazona *N*-metilada utilizando o LASSBio-1773 (0,6mmol; 0,2g), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,6mmol; 0,23g) e CH<sub>3</sub>I (1mmol; 0,06mL) em 10mL de acetona. O LASSBio-1774 foi obtido como um sólido branco e com rendimento de 75% [24].



Na Tabela 3 estão apresentadas algumas informações importantes, tais como fórmula molecular, massa molar e o aspecto físico referentes às amostras avaliadas.

**Tabela 3: Principais características referentes ao LASSBio-1773 e ao LASSBio-1774.**

Nome	Fórmula molecular	Massa molar	Aspecto físico
<b>LASSBio-1773</b>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	378,4 g·mol <sup>-1</sup>	Sólido cristalino de cor branca.
<b>LASSBio-1774</b>	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	392,4 g·mol <sup>-1</sup>	Sólido cristalino de cor branca.

## 5.2-Condições experimentais das análises

### 5.2.1-Difração de raios X por policristais (DRXP)

Os difratogramas de raios X obtidos na presente tese foram adquiridos em um difratômetro de raios X por policristais STADI-P, da marca Stoe, localizado no *Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais (LCCEM-UFABC)*, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha 1$  (1,54056 Å), tensão de 40 kV e corrente de 40 mA, com monocromador de feixe primário (cristal curvo de Ge(111)), fendas e detector linear com tecnologia *silicon strip* Mythen 1K, da Dectris®. A geometria de transmissão foi empregada na aquisição dos dados.

A varredura para o LASSBio-1773 foi realizada nas condições exemplificadas na Tabela 4. Para a medida do LASSBio-1774 foram adotadas as mesmas condições que o estipulado para a varredura do LASSBio-1773, porém, a faixa angular estabelecida foi antecipada em 1°. As condições experimentais para a medida do LASSBio-1774 estão ilustradas na Tabela 5.

**Tabela 4: Condições experimentais para obtenção dos dados de DRXP do LASSBio-1773.**

<b>Faixa angular (<math>2\theta</math>)</b> <b>6° a 89,985°</b>	<b>Passo (°)</b>	<b>Tempo de integração</b> <b>(segundos)</b>
<b>Faixa 1:</b> 6°- 25,950°	0,015	100
<b>Faixa 2:</b> 25,950°- 45,900°	0,015	200
<b>Faixa 3:</b> 45,900°- 65,850°	0,015	400
<b>Faixa 4:</b> 65,850°- 89,985°	0,015	800

**Tabela 5: Condições experimentais para obtenção dos dados de DRXP do LASSBio-1774.**

<b>Faixa angular (<math>2\theta</math>)</b> <b>5° a 90,050°</b>	<b>Passo (°)</b>	<b>Tempo de integração</b> <b>(segundos)</b>
<b>Faixa 1:</b> 5°- 26,000°	0,015	100
<b>Faixa 2:</b> 26,000°- 45,950°	0,015	200
<b>Faixa 3:</b> 45,950°- 65,900°	0,015	400
<b>Faixa 4:</b> 65,900°- 90,050°	0,015	800

As amostras foram acondicionadas em capilares de vidro especial nº 14 da marca *Hilgenberg*. O LASSBio-1773 em capilar de 0,5 mm de diâmetro e o LASSBio-1774 em capilar de 0,3 mm de diâmetro (em decorrência da pequena quantidade de amostra disponível). O porta-amostras foi mantido em rotação durante a aquisição dos dados, de modo que um maior número de cristalitos fosse banhado pelo feixe de raios X, e assim dados de boa qualidade fossem obtidos.

É válido mencionar que o acondicionamento das amostras em capilares de vidro elimina praticamente o efeito de orientação preferencial (influencia na intensidade dos picos), enquanto que no porta-amostras plano, a orientação preferencial é inevitável e chega a ser muito alta no caso de fármacos.

O efeito de orientação preferencial é algo que deve ser evitado ao máximo no preparo das amostras, uma vez que este efeito pode interferir nos resultados do ponto de vista estrutural e influenciar nos resultados quantitativos por afetar inadequadamente a intensidade dos picos. Baseado nestes conhecimentos, as medidas para ambas as amostras estudadas nesta tese foram realizadas em capilares de vidro.

Também inclui ressaltar que o tempo de integração variável adotado para as amostras foi estipulado a fim de obter uma melhora na estatística de contagem, especialmente a altos ângulos.

### **5.2.2-Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

As curvas de DSC foram obtidas mediante o emprego de uma célula calorimétrica, modelo *DSC Q-200*, da marca *TA Instruments*, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL·min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 2 °C·min<sup>-1</sup>. As amostras foram acondicionadas individualmente em placas de alumínio hermética, com massa de 3 mg para o LASSBio-1773 e de 2,8 mg para o LASSBio-1774. A faixa de temperatura na qual foram obtidos os dados de DSC variou de 20 °C até 300 °C. Todas as análises foram realizadas na *Central Experimental Multiusuário* (CEM), localizada na Universidade Federal do ABC (UFABC).

### 5.2.3-Termogravimetria (TG)

As curvas TG/DTG para ambas as amostras foram obtidas mediante termobalança *TGA Q-500*, da marca *TA Instruments*, sob atmosfera dinâmica de O<sub>2</sub> (60 mL.min<sup>-1</sup>), em uma razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>, utilizando panela de platina (Pt), e o intervalo da massa esteve entre 11,24 mg para o LASSBio-1773 e 7,30 mg para o LASSBio-1774. As faixas de temperatura nas quais foram obtidos os dados de TG iniciaram da temperatura ambiente (25 °C) até 500°C para ambas as amostras.

### 5.2.4-Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR de ambas as amostras foram obtidos em um espectrômetro por transformada de Fourier, da marca *Perkin Elmer Frontier* modelo *100 FT-IR*, equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe, à temperatura ambiente, na faixa de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup> e com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas no *Laboratório Didático IV (úmido)*, localizado na Universidade Federal do ABC (UFABC).

### 5.2.5- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopia foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura compacto JCM-6000, da marca JEOL, empregando como fonte emissora um filamento de tungstênio. As amostras foram recobertas com ouro, utilizando *sputtering*. As amostras foram montadas separadamente em suportes de alumínio, em fita condutora de dupla face de carbono. As fotomicrografias foram obtidas nas voltagens de 5 e 10 kV. As análises de microscopia e a deposição foram realizadas no *Laboratório de Física I*, localizado na Universidade Federal do ABC (UFABC).

### 5.2.6- Predição da morfologia do cristal

A predição e o estudo da morfologia do LASSBio-1773 foram realizados utilizando um protocolo preliminar incluído no pacote Material Studio 7.0 da Accelrys®. O arquivo CIF contendo todas as informações cristalográficas foi usado como arquivo de entrada para a

energia de minimização usando o COMPASS implementado no módulo Forcite do pacote Materials Studio 7.0 (Accelrys, Inc.).

Os cálculos para a morfologia foram realizados usando o mesmo COMPASS e o algoritmo Q<sub>eq</sub>, sendo permitido uma distância interplanar mínima de  $d_{hkl}$  de 1,300 Å e um valor máximo para os três índices de Miller ( $hkl$ ) de 3,3,3, respectivamente. O número total das faces de crescimento limitou-se a 200. A busca por possíveis espaços vazios (*voids*) foi realizada usando o algoritmo VOID, assumindo um raio de 1,2 Å.

Existem duas principais contribuições para a energia de cristalização ( $E_{cr}$ , do inglês, *crystallization energy*): a energia de cada camada ( $E_{slice}$ , do inglês, *slice energy*), ou seja, a energia resultante da interação lateral de cada unidade da fórmula unitária dentro de uma camada; e a energia de ligação ( $E_{attachment}$ , do inglês, *attachment energy*), que está relacionada com a energia liberada como consequência da interação vertical da fórmula unitária com uma camada subjacente, conforme mostrado na equação 12:

$$E_{cr} = E_{slice} + E_{att} \quad (12)$$

Considerando a taxa de crescimento ( $G_r$ , do inglês, *growth rate*) proporcional à energia de ligação tem-se [81]:

$$G_r \propto E_{att} \quad (13)$$

Uma consequência interessante das equações 12 e 13 consiste em que quanto maior a  $E_{slice}$ , menor a  $E_{att}$ , e mais lenta é a taxa de crescimento ( $G_r$ ). O método GM (GM, do inglês, *growth morphology*), calcula a  $E_{att}$  como descrito na equação 12, e todos esses cálculos são efetuados a 0 K.

Uma descrição mais detalhada e completa do método pode ser encontrada nas seguintes referências [81-84], enquanto que a aplicação dos algoritmos para uma grande variedade de moléculas pode ser visto nas referências [84-90].



### 5.2.7- Dissolução intrínseca (DI)

Para a realização dos ensaios de DI utilizou-se o equipamento Sirius SDI 300 (Paraytec, York, UK) com Actipix™ Technology, usando como fonte de luz uma lâmpada de xenônio, um filtro de comprimento de onda de 254 nm para detecção e um torque de 60cN.m. Uma bomba de seringa foi utilizada para infusão do meio de dissolução a uma taxa de fluxo constante de 0,4 mL·min<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato (pH 6,8), a uma temperatura de 37 °C. O tampão básico fosfato foi escolhido por simular a absorção dos compostos no intestino.

Os cálculos foram realizados de acordo com a Farmacopeia Americana (USP 2009). Para o cálculo da VDI foi construído um gráfico da quantidade de fármaco dissolvida (mg) *versus* o tempo (minutos) e, através da regressão linear, obteve-se o valor da velocidade de dissolução (VD) do fármaco pela inclinação da reta em mg·min<sup>-1</sup>. Posteriormente, o resultado obtido de VD foi dividido pelo valor da área superficial de fármaco exposta na matriz, e então foram obtidos os valores de VDI para o LASSBio-1773 e para o LASSBio-1774. Os ensaios de DI foram realizados no *Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica* (DEINFAR), localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

## 6-Resultados e discussões

Nesta seção serão apresentados e discutidos alguns resultados referentes à caracterização físico-química dos candidatos a fármacos derivados sulfonilidrazônicos LASSBio-1773 e LASSBio-1774.

### 6.1-Candidatos a fármacos: LASSBio-1773 e LASSBio-1774

Como mencionado em seções anteriores, os compostos avaliados - LASSBio-1773 e LASSBio-1774 - diferem em sua estrutura química simplesmente pela adição do grupamento  $\text{CH}_3$  (metila) na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1773, conforme mostrado na Figura 8. A adição do grupamento  $\text{CH}_3$  na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1773 otimizou o efeito farmacológico do LASSBio-1774 e conferiu propriedades físico-químicas diferenciadas para os compostos.

O grupamento  $\text{CH}_3$  é muito importante para o reconhecimento molecular de compostos orgânicos endógenos e exógenos, por biorreceptores. Ainda que o grupo  $\text{CH}_3$  só participe nas interações de dispersão de London, ou seja, o tipo de interação intermolecular mais fraca quando comparada à interação de hidrogênio e a dipolo permanente, este apresenta efeitos estereoeletrônicos em micromoléculas e biomacromoléculas, levando assim a diversos efeitos biológicos, incluindo a seletividade entre biorreceptores, aumento de potência e proteção contra o metabolismo da enzima [91].

De acordo com Wermuth et al., [92] o grupo  $\text{CH}_3$ , tantas vezes considerado como quimicamente inerte, é capaz de alterar profundamente as propriedades farmacológicas de uma determinada molécula [92]. Por exemplo, pode alterar radicalmente a potência, duração e a natureza do efeito farmacológico [91].

Diante das inúmeras alterações nos efeitos biológicos e farmacológicos das substâncias, a inserção do grupo  $\text{CH}_3$  tem sido amplamente utilizada em estratégias de modificação molecular por inúmeros grupos de pesquisas dedicados à invenção de novos fármacos.

Segundo Barreiro et al., [91] o aumento da lipofilicidade devido à inserção do grupo  $\text{CH}_3$  pode alterar drasticamente a biodisponibilidade e, assim, a eficácia de uma molécula bioativa, bem como o seu modo de interação com biorreceptores. Diante desses benefícios, a

Química Medicinal tem usado o grupo  $\text{CH}_3$  para modificar aspectos relacionados à solubilidade, conformação, biodisponibilidade e a farmacocinética [91].

O LASSBio-1774 e o LASSBio-1735 são alguns exemplos de compostos planejados e sintetizados no LASSBio<sup>®</sup> que tiveram sua atividade farmacológica potencializada com a introdução do grupo  $\text{CH}_3$  em suas estruturas químicas. Por exemplo, a adição do grupo  $\text{CH}_3$  na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1773 otimizou a atividade farmacológica do LASSBio-1774. Ou seja, o LASSBio-1774 passou a apresentar, além da atividade hipoglicemiante, atividade anti-inflamatória [24]. Outro exemplo em relação à adição do grupo  $\text{CH}_3$  consiste na atividade citotóxica do LASSBio-1586 em relação ao LASSBio-1735. A inserção do grupo  $\text{CH}_3$  na estrutura do LASSBio-1735 otimizou a sua atividade citotóxica frente a linhagem tumoral HL-60 (leucemia humana) quando comparado ao efeito citotóxico do seu precursor LASSBio-1586 frente a esta mesma linhagem [93].

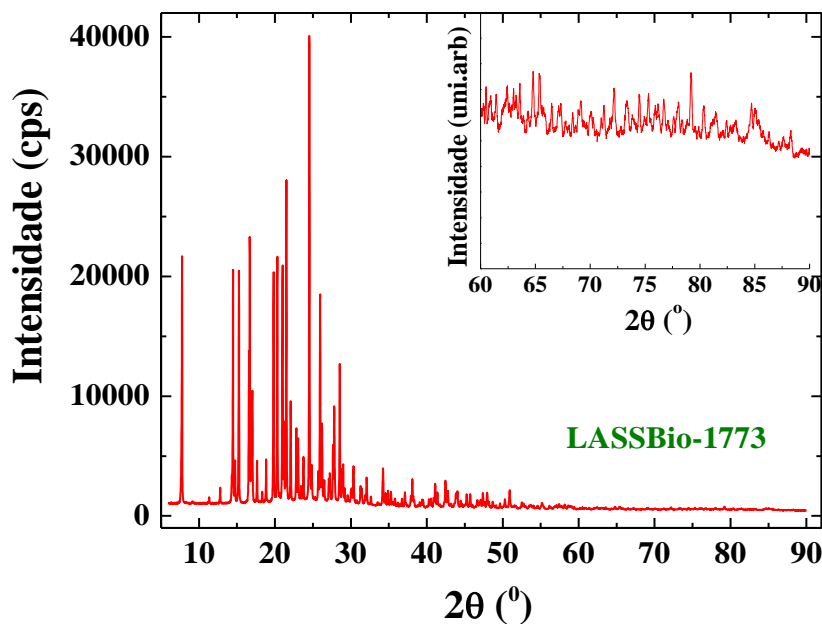
Além das diferenças na atividade farmacológica dos compostos, também serão comparado em seções subsequentes dados referentes ao arranjo estrutural, ponto de fusão, estabilidade térmica, morfologia e solubilidade dos compostos.

#### **6.1.1-Difração de raios X por policristais (DRXP)**

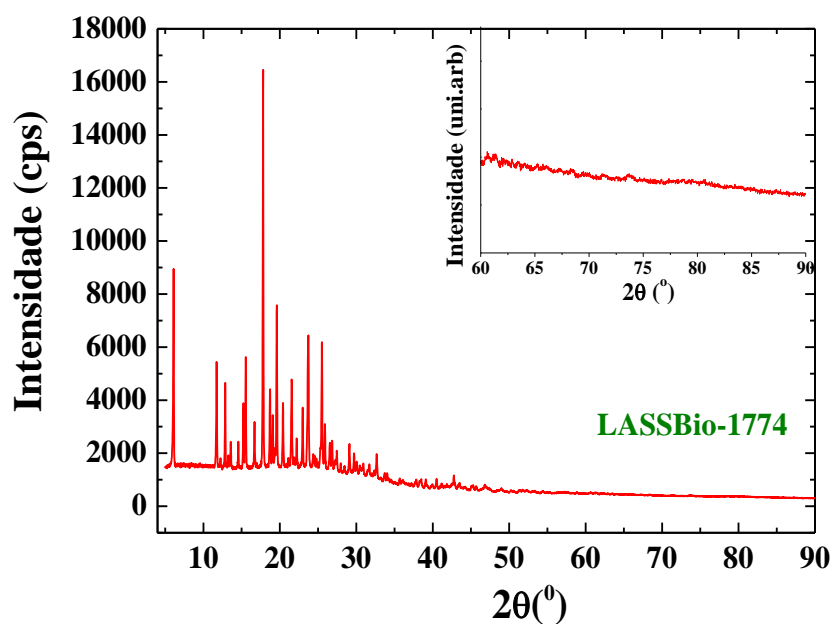
A técnica de DRXP foi imprescindível na etapa de caracterização estrutural, uma vez que o arranjo estrutural de um determinado fármaco está diretamente relacionado às suas propriedades farmacológicas. Dessa maneira, a obtenção de informações precisas da estrutura cristalina do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774 é muito importante, visto que as amostras estudadas são moléculas novas, cujas estruturas cristalinas ainda não foram determinadas. Na Figura 23 são apresentados os difratogramas de raios X do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b).

Figura 23: Difratogramas de raios X do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b). Para melhor efeito de visualização foi inserido uma região ampliada ( $5^\circ$  a  $30^\circ$  em  $2\theta$ ) em cada difratograma.

a)



b)



Os padrões de difração do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774 indicam estruturas cristalinas (em virtude de reflexões intensas e características de um composto cristalino), com grande presença de picos a baixos ângulos, indicativo de estruturas de baixa simetria.

Com os dados de DRXP de ambos os compostos conduziu-se ao procedimento de determinação estrutural com uso do programa *DASH* [40].

É válido enfatizar que por meio do programa *DASH* e do software *Topas-Academic v.5* algumas estruturas cristalinas já foram determinadas no *LCCEM* e publicadas, tais como, o polimorfo I da rifampicina anidra (antituberculostático) [94], o cloridrato de mefloquina (antimalárico) [95], o LASSBio-1289 (vasodilatador) [86], entre outras.

### 6.1.2- Determinação estrutural

Inicialmente foi selecionada uma região contendo ~ 22 reflexões do difratograma de raios X do LASSBio-1773 usando uma versão interna do programa DICVOL91 implementada no programa *DASH* para indexar o padrão de difração. No processo de indexação por meio das posições dos picos foram encontradas as seguintes informações para o LASSBio-1773: sistema cristalino ortorrômbico; parâmetros de cela unitária:  $a = 22,7442 \text{ \AA}$ ,  $b = 10,6818 \text{ \AA}$ ,  $c = 7,2502 \text{ \AA}$  e volume da cela unitária:  $V = 1761,41 \text{ \AA}^3$ .

Depois dos parâmetros de cela unitária terem sido devidamente avaliados, um processo de análise das ausências sistemáticas realizado por um ajuste de Pawley foi empregado, e assim, a melhor solução de grupo espacial foi obtida. Para o LASSBio-1773, a melhor solução de grupo espacial obtida foi  $P2_12_12_1$ .

Com o volume da cela unitária obtido no processo de indexação, pôde-se fazer uma comparação entre o volume calculado e o volume estimado na indexação. O volume calculado dos átomos foi estimado com base no volume médio dos átomos ( $\bar{v}_i$ ) à temperatura de 25 °C, conforme o método proposto por Hofmann [46]. Por exemplo, o volume médio de átomos como carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio equivalem -  $\bar{v}_i^C = 13,87 \text{ \AA}^3$ ,  $\bar{v}_i^H = 5,08 \text{ \AA}^3$ ,  $\bar{v}_i^N = 11,8 \text{ \AA}^3$ ,  $\bar{v}_i^S = 25,2 \text{ \AA}^3$  e  $\bar{v}_i^O = 11,39 \text{ \AA}^3$ , respectivamente [46]. Por meio desses cálculos foram sugeridas quatro fórmulas unitárias do LASSBio-1773 por cela unitária ( $Z = 4$ ). A combinação dessa informação com a melhor solução de grupo espacial permitiu estimar a existência de uma fórmula unitária do LASSBio-1773 na unidade assimétrica ( $Z' = 1$ ).

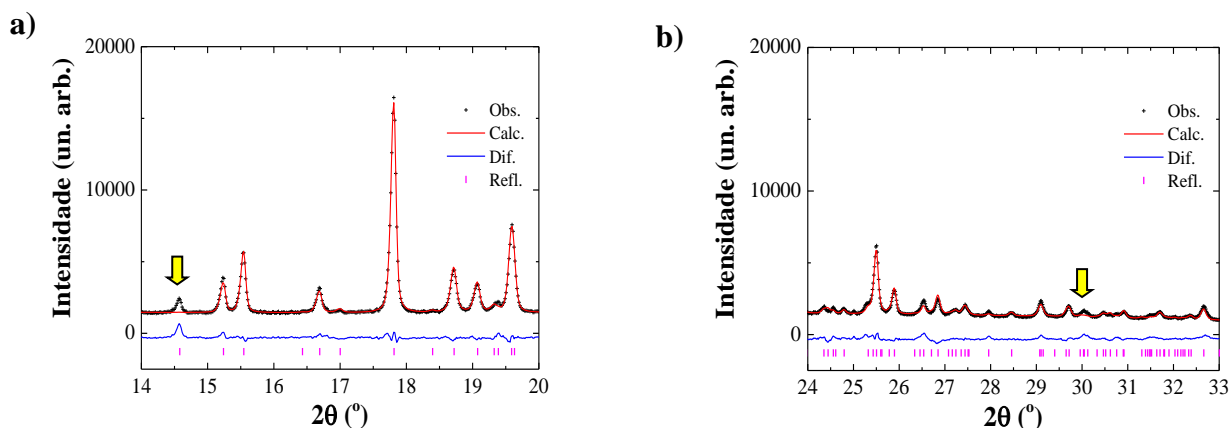
Após os valores dos parâmetros de cela unitária e da melhor solução de grupo espacial terem sido encontrados, a molécula do LASSBio-1773 foi construída em um modelo 3D no programa *Marvin Sketch version 16.4.25.0* e, então inserida no próprio *DASH* para iniciar o processo de solução da estrutura. O procedimento de solução da estrutura é realizado por meio de um algoritmo de otimização global, neste caso, o *simulated annealing*. No *simulated annealing*, uma sequência de estruturas é gerada para a consideração como potenciais soluções da estrutura. Cada estrutura é derivada da estrutura anterior por um pequeno

deslocamento aleatório da(s) molécula(s) dentro da cela unitária. No procedimento de *simulated annealing* é permitido variar parâmetros que descrevem as coordenadas fracionárias, orientação molecular e os ângulos de torção. Vale ressaltar que este procedimento é realizado repetidas vezes até que se encontre a melhor solução da estrutura.

Em posse da melhor solução da estrutura encontrada para o LASSBio-1773 no processo de *simulated annealing* [40], a mesma foi considerada no refinamento de Rietveld. O refinamento de Rietveld foi realizado pelo software *Topas-Academic v.5* [53] e a convergência do refinamento foi avaliada por meio dos fatores de qualidade do ajuste ( $R_{wp}$ ,  $R_{exp}$ ,  $\chi^2$  e  $R_{Bragg}$ ).

Da mesma maneira, procedeu-se à determinação estrutural do LASSBio-1774. Os dados encontrados foram: sistema cristalino ortorrômbico; parâmetros de cela unitária:  $a = 28,9078 \text{ \AA}$ ,  $b = 15,0376 \text{ \AA}$ ,  $c = 9,1493 \text{ \AA}$  e volume da cela unitária:  $V = 3977,24 \text{ \AA}^3$ . Porém, na etapa do refinamento foi observado que alguns picos não se ajustavam, principalmente os picos nas posições  $14,5^\circ$  e  $30,0^\circ$  (mostrado na Figura 24), evidenciando uma má resolução da estrutura.

**Figura 24:** a) Região ampliada ( $14^\circ$  a  $20^\circ$  em  $2\theta$ ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1774, em que o padrão observado está representado por cruzes pretas, o padrão calculado por uma linha vermelha, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições dos picos de Bragg pelas barras rosas; b) Região ampliada ( $24^\circ$  a  $33^\circ$  em  $2\theta$ ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1774. As setas amarelas evidenciam os picos nas posições  $14,5^\circ$  e  $30,0^\circ$  ( $2\theta$ ).

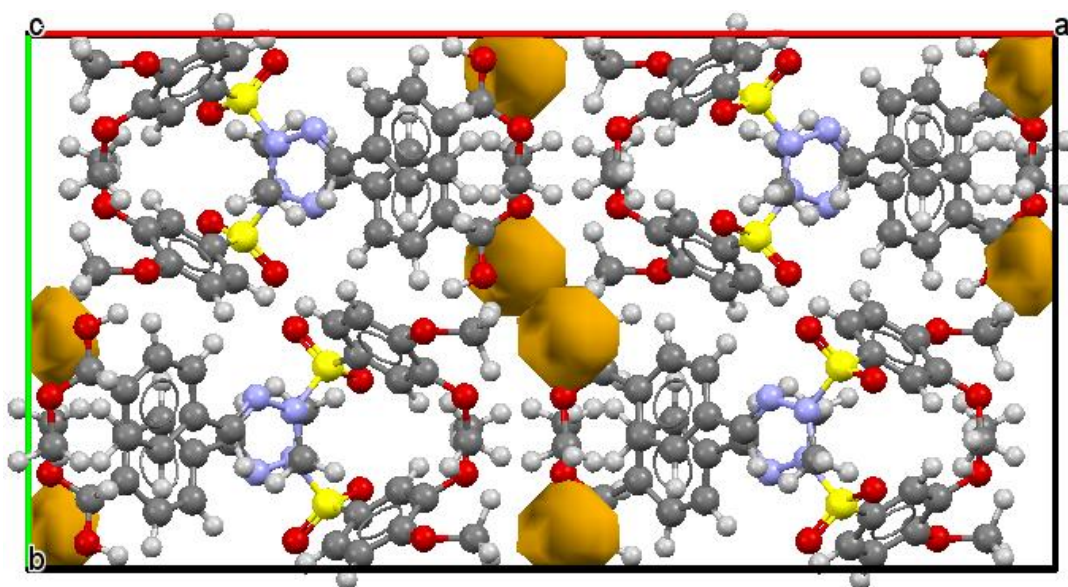


Empregando o software *Mercury*, que possibilita a visualização da estrutura cristalina em três dimensões foi verificado que a solução encontrada para descrever a estrutura cristalina do LASSBio-1774 apresentava espaços vazios. A presença de espaços vazios na cela unitária

indica que existe um ou mais solventes (hidrato ou solvato), o (s) qual (ais) não está (ão) sendo considerado (s) na resolução da estrutura.

Desse modo, a presença dos espaços vazios na cela unitária do LASSBio-1774 (Figura 25) justifica o porquê de alguns picos não terem sido ajustados no refinamento. A Figura 25 mostra claramente a presença de espaços vazios na cela unitária do LASSBio-1774.

**Figura 25:** Empacotamento da cela unitária do LASSBio-1774 ao longo do *eixo c*. Os átomos são indicados da seguinte forma: carbono (esferas cinzas), oxigênio (esferas vermelhas), nitrogênio (esferas azuis), hidrogênio (esferas cinzas claro) e os *voids* (canais amarelos).



Os espaços vazios foram calculados (software *Mercury*) usando a superfície acessível por solvente com um raio de 1,2 Å. Por meio desse cálculo, pôde-se verificar que os espaços vazios presentes na cela unitária do LASSBio-1774 ocupam aproximadamente 179,4 Å<sup>3</sup>. Considerando que o volume de uma molécula de água equivale ~ 21,55 Å<sup>3</sup> (H<sub>2</sub>O:  $\bar{v}_i^H = 5,08$  Å<sup>3</sup> e  $\bar{v}_i^O = 11,39$  Å<sup>3</sup>) e supondo que cada espaço vazio na cela unitária seja ocupado por uma molécula de água, ou seja, considerando a existência de 8 espaços vazios na cela unitária teríamos um volume de aproximadamente 172,4 Å<sup>3</sup>. Com base nessas aproximações, pôde-se estimar que os espaços vazios presentes na cela unitária do LASSBio-1774 poderiam acomodar moléculas de água.

Uma inspeção de possíveis espaços vazios na estrutura cristalina do LASSBio-1773 também foi realizada, no entanto, nenhum espaço vazio foi encontrado na cela unitária do

LASSBio-1773, o que indica que a estrutura cristalina do LASSBio-1773 foi descrita corretamente (mais detalhes sobre a estrutura cristalina determinada e o refinamento de Rietveld do LASSBio-1773 poderá ser visto nas seções 6.1.6 e 6.1.7, respectivamente).

Com o propósito de buscar mais informações sobre os possíveis solventes (hidrato ou solvato) os quais poderiam estar ocupando os espaços vazios na cela unitária do LASSBio-1774 foram empregadas as técnicas de DSC, TG e FTIR. Vale enfatizar que em conjunto as técnicas são capazes de fornecer informações sobre o estado de hidratação.

A presença de solvato ou hidrato pode dificultar e até mesmo inviabilizar um processo de determinação estrutural se os mesmos não forem levados em consideração na etapa de solução da estrutura. Além disso, a presença desses solventes pode influenciar na velocidade de dissolução intrínseca (VDI) e, conseqüentemente, na sua biodisponibilidade, por isso a importância em investigar a presença de possíveis solventes nos candidatos a fármacos LASSBio-1773 e LASSBio-1774.

As técnicas de DSC e TG também foram empregadas para ambos os compostos com a finalidade de averiguar ponto de fusão, pureza, estabilidade térmica e possíveis eventos de recristalização.

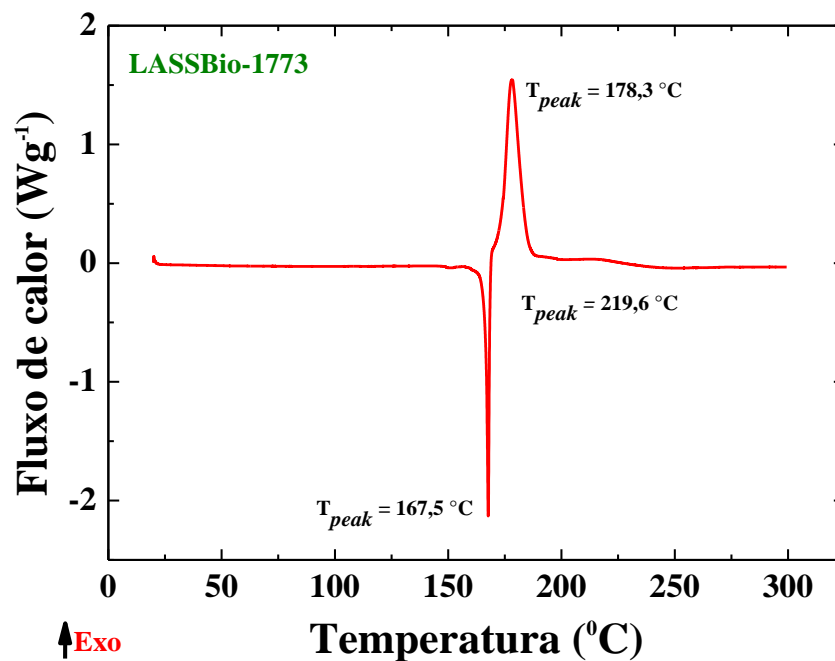
### **6.1.3- Análise térmica**

Para a avaliação das curvas de DSC e TG/DTG, as temperaturas iniciais e finais ( $T_{onset}$  e  $T_{endset}$ ) e a temperatura do pico ( $T_{peak}$ ) foram extraídas do software TA *Universal Analysis 2000*. Na Figura 26 estão mostradas as curvas de DSC dos candidatos a fármacos LASSBio-1773 (a) e LASSBio-1774 (b).

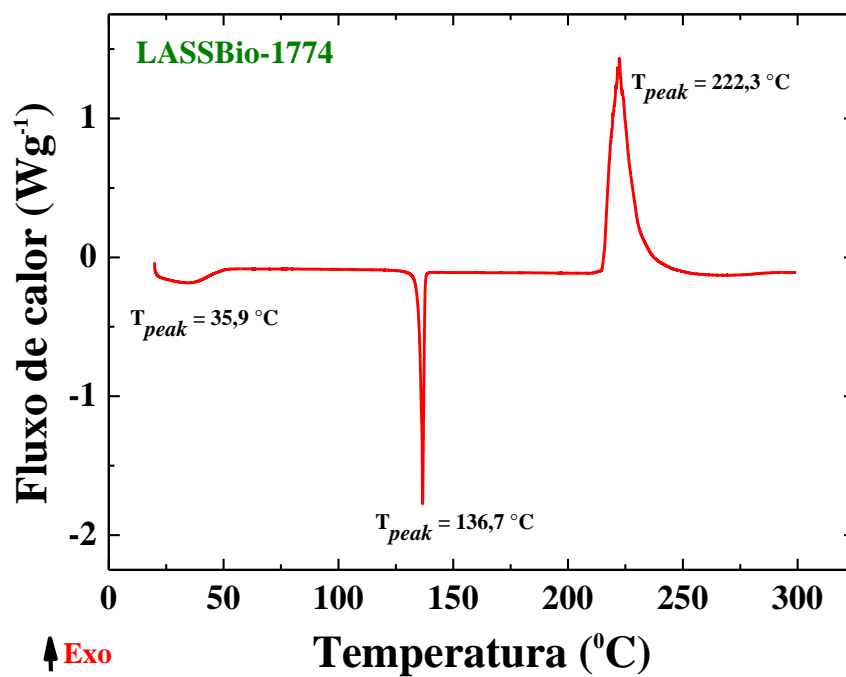


Figura 26: Curva de DSC do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b) obtida a  $2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  ( $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com massa da amostra  $3,0\text{ mg}$  para o LASSBio-1773 e de  $2,8\text{ mg}$  para o LASSBio-1774.

a)



b)



Na curva de DSC do LASSBio-1773 (Figura 26a) foram observados três eventos térmicos, sendo um pico endotérmico em 167,5 °C ( $T_{peak}$ ) referente à fusão, com entalpia de 105,3 J·g<sup>-1</sup> e, dois picos exotérmicos referentes à decomposição térmica. Pela curva de DSC foi observado que a decomposição do LASSBio-1773 ocorreu em duas etapas - a primeira em aproximadamente 178,3 °C ( $T_{peak}$ ) e a segunda em 219,6 °C ( $T_{peak}$ ). Ainda na curva de DSC foi verificado que abaixo de 150 °C não houve nenhum evento endotérmico, o que é indicativo da ausência de solventes no composto. Pela curva de DSC do LASSBio-1773 também foi possível averiguar que o composto é puro, uma vez que o intervalo apresentado pelo evento da fusão é bem estreito (1,6 °C). Em geral, a incidência de impurezas em uma dada amostra, mesmo que em quantidades pequenas, diminui a temperatura de fusão e alarga o intervalo do evento. Por exemplo, um intervalo maior que 5 °C normalmente, indica que a substância é impura [96, 97].

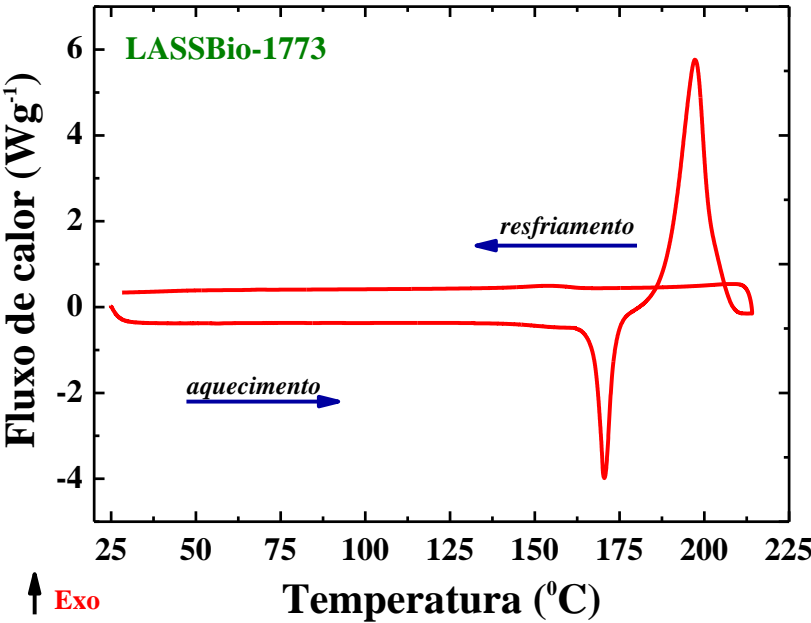
É válido ressaltar que a indicação da primeira exoterma (178,3 °C) na curva de DSC do LASSBio-1773 ser referente ao processo de decomposição e não a um processo de recristalização foi confirmado por meio de uma curva de aquecimento – resfriamento. A Figura 27 corresponde à curva de DSC com ciclo de aquecimento-resfriamento do LASSBio-1773. A amostra foi aquecida até 215 °C e posteriormente resfriada até 25 °C. Na Figura 27 ficou evidenciado que na etapa do resfriamento não houve o aparecimento de nenhum evento térmico, o que implica que o pico em 178,3 °C ( $T_{peak}$ ) seja característico de decomposição e não referente à etapa de recristalização. Porém, se houvesse o aparecimento de um evento exotérmico na curva de resfriamento após a fusão, o pico exotérmico em 178,3 °C ( $T_{peak}$ ) estaria associado a um evento de recristalização e não à decomposição.

Quando da análise da curva de DSC do composto metilado LASSBio-1774 (Figura 26b) foi possível observar diferenças entre as curvas de DSC dos candidatos a fármacos. Na curva de DSC do composto metilado – LASSBio-1774 foram observados três eventos térmicos, sendo um pico endotérmico em 35,9 °C ( $T_{peak}$ ) referente à desidratação; um outro pico endotérmico em 136,7 °C ( $T_{peak}$ ) referente à fusão e, em 222,3 °C ( $T_{peak}$ ) o aparecimento de um pico exotérmico referente à decomposição térmica. Pela curva de DSC do LASSBio-1774 também foi evidenciado que o composto avaliado é puro; tal afirmação consiste no fato do composto apresentar um intervalo estreito de fusão (3,4°C).

É importante enfatizar que nas curvas de DSC dos compostos não foram observados nenhum evento referente a etapa de recristalização. Na Tabela 6 estão mostradas as temperaturas iniciais ( $T_{onset}$ ) e finais ( $T_{endset}$ ) e a temperatura do pico ( $T_{peak}$ ) de cada evento

térmico verificado na curva de DSC do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774. Os eventos apresentados nas curvas de DSC dos candidatos a fármacos foram confirmados por suas respectivas curvas TG/DTG (Figura 28 a e b).

**Figura 27:** Curva de DSC do LASSBio-1773 com ciclo de *aquecimento-resfriamento* obtida a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  ( $40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com massa da amostra de aproximadamente 3,6 mg.



**Tabela 6:** Parâmetros térmicos\* obtidos da curva de DSC do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774.

LASSBio-1773			
Eventos de DSC	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>peak</sub> (°C)	T <sub>endset</sub> (°C)
1	166,7	167,5	168,3
2	173,3	178,3	194,2
3	204,5	219,6	239,7
LASSBio-1774			
1	20,8	35,9	53,2
2	136,0	136,7	139,4
3	215,4	222,3	254,8

\*software TA Universal Analysis

Outras informações importantes relacionadas às curvas de DSC dos candidatos a fármacos valem ser enfatizadas; por exemplo, as diferenças entre o ponto de fusão do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774 (composto metilado).

Como é sabido, o ponto de fusão é governado pelas interações intermoleculares envolvidas nas ligações. Sendo governado por interações intermoleculares, o tipo de ligação e a intensidade da força de ligação entre os átomos influenciarão diretamente no aumento ou na diminuição do ponto de fusão. Por exemplo, na passagem da substância de um estado físico para outro, como no caso da fusão, dependendo do tipo de interação intermolecular (interação de hidrogênio, dipolo - dipolo ou interações de dispersão de London), claramente serão observadas diferenças no ponto de fusão das substâncias. Ou seja, quanto mais forte for o tipo de interação, maior será a energia necessária para o rompimento das ligações e consequentemente, maior será a temperatura de fusão.

Analizando a estrutura química dos candidatos a fármacos (Figura 8), pode-se dizer que em decorrência do LASSBio-1773 apresentar interação de hidrogênio na subunidade sulfonilidrazona e o LASSBio-1774 interação de dispersão de London, isto é, o tipo de interação mais fraca entre as interações intermoleculares, o LASSBio-1773 apresentou ponto de fusão maior (PF = 167, 5 °C) quando comparado com a fusão do LASSBio-1774 (PF = 136,7 °C).

Desse modo, pode-se inferir que o tipo de interação existente na subunidade sulfonilidrazona dos compostos contribui para o aumento ou diminuição do ponto de fusão. As diferenças encontradas entre os valores da fusão dos compostos pode ser comprovada pelos valores encontrados na variação da entalpia ( $\Delta H_{\text{fusão}}$ ). O LASSBio-1773 apresentou  $\Delta H_{\text{fusão}} = 105,3 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ , enquanto o LASSBio-1774  $\Delta H_{\text{fusão}} = 82,9 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ , ou seja, a energia requerida para romper uma interação do tipo dispersão de London é menor quando comparada a energia necessária para romper uma interação de hidrogênio.

Nas curvas TG/DTG do LASSBio-1773 (Figura 28a) estão apresentados cinco eventos térmicos. O primeiro evento apresenta perda de massa de 0,9 % ( $\Delta_{\text{m1}}$ ) associada ao evento da fusão e, os demais eventos (segundo, terceiro, quarto e quinto) associados às etapas de decomposição. Ainda na curva TG/DTG pode-se verificar que o LASSBio-1773 é termicamente estável até aproximadamente 150 °C. Por apresentar estabilidade em uma temperatura relativamente alta e não ter apresentado perda de massa abaixo de 150 °C e ainda em associação a ausência de eventos endotérmicos abaixo de 150 °C na curva de DSC, é possível caracterizar o LASSBio-1773 como um composto anidro.

Geralmente, a presença de solventes orgânicos origina perdas de massa no início das curvas TG/DTG, ocasionando a baixa estabilidade térmica do composto. No entanto, tais observações não foram verificadas nas curvas TG/DTG do LASSBio-1773.

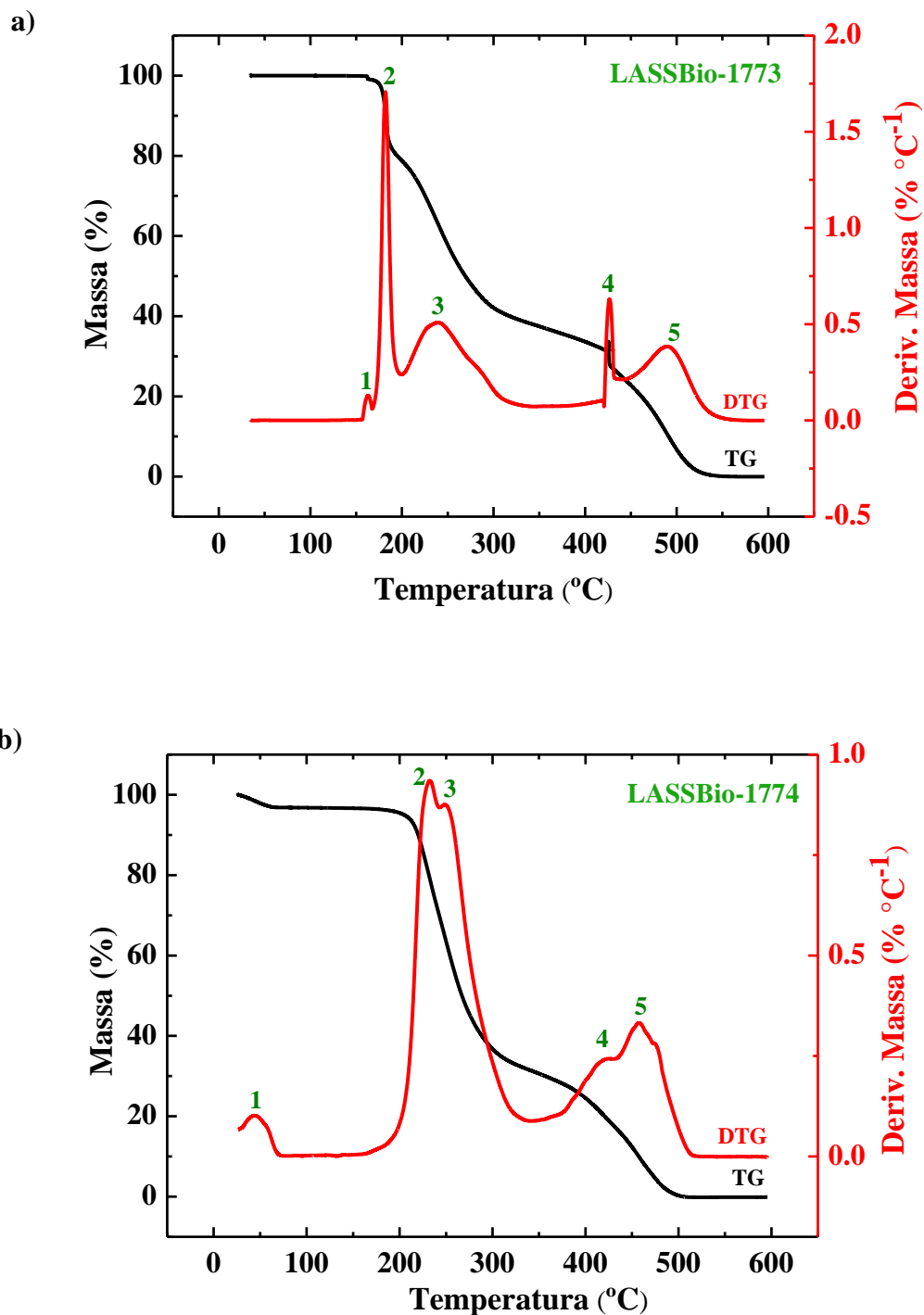
Quando da análise do composto metilado, algumas observações diferentes foram constatadas, por exemplo, na curva de DSC do LASSBio-1774 foi indicado a presença de água na estrutura do composto, sendo este evento também confirmado pelos resultados da TG/DTG. Nas curvas TG/DTG do LASSBio-1774 (Figura 28b) foram observados cinco eventos térmicos. O primeiro evento evidencia claramente uma perda de massa ( $\Delta_{m1} = 3,2\%$ ) associado à desidratação; o segundo evento associado à fusão e, os demais eventos (terceiro, quarto e quinto) associados às etapas de decomposição.

A presença de água na composição química da molécula foi verificada com base em cálculos estequiométricos realizados no primeiro evento da curva DTG - evento com a temperatura máxima do pico em  $50,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T_{peak\ DTG}$ ). Estequiometricamente, uma molécula de água na estrutura química do LASSBio-1774 apresentaria uma perda de massa de  $4,4\%$ . No entanto, na curva DTG do LASSBio-1774 foi observada uma perda de massa de  $3,2\%$  ( $\Delta_{m1}$ ). É válido ressaltar que a presença de água na estrutura química do composto pode alterar a solubilidade do mesmo, como também dificultar a determinação estrutural se a água não for considerada na etapa de solução da estrutura.

Como é sabido, fatores instrumentais e fatores ligados às características das amostras podem afetar diretamente as curvas TG [55, 56], o que justificaria a diferença entre o valor teórico ( $4,4\%$ ) e o valor obtido experimentalmente ( $3,2\%$ ) na primeira perda de massa.

Nas curvas TG/DTG do LASSBio-1774 também foi possível verificar que a estabilidade térmica do LASSBio-1774 é baixa, uma vez que a partir de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T_{onset}$ ) tornou-se evidente a primeira perda de massa. Na Tabela 7 estão exemplificados os parâmetros térmicos obtidos por meio da análise termogravimétrica do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774.

Figura 28: Curvas TG (preta) / DTG (vermelha) do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b) obtida a  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de  $\text{O}_2$  ( $60\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), com massa da amostra de 11,24 mg para o LASSBio-1773 e 7,30 mg para o LASSBio-1774.



**Tabela 7: Parâmetros térmicos\* obtidos das curvas TG/DTG do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774.**

<b>LASSBio-1773</b>			
<b>Eventos</b>	<b>T<sub>onset</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>peak</sub> (°C)</b>	<b>Δ<sub>perda de massa</sub> (%)</b>
<b>1</b>	152,8	161,7	0,9
<b>2</b>	167,0	182,0	19,7
<b>3</b>	198,2	243,0	47,2
<b>4</b>	416,6	426,3	5,7
<b>5</b>	433,0	496,2	26,5
<b>LASSBio-1774</b>			
<b>1</b>	30,1	50,0	3,2
<b>2</b>	130,7	230,8	24,6
<b>3</b>	243,7	250,9	40,6
<b>4</b>	387,9	411,5	14,5
<b>5</b>	436,1	460,2	17,1

*\*software TA Universal Analysis*

Com base nos resultados obtidos com o uso das técnicas de DSC e TG/DTG pôde-se verificar o estado de hidratação dos compostos, o LASSBio-1773, um composto anidro e o LASSBio-1774, um composto monohidratado. Além do estado de hidratação dos compostos, um outro parâmetro importante foi determinado - a estabilidade térmica. A estabilidade térmica é um parâmetro bastante interessante de se identificar, principalmente quando se refere a fármacos, uma vez que pode afetar a segurança dos mesmos. Assim, por meio da técnica TG/DTG ficou evidenciado que o LASSBio-1774 apresenta estabilidade térmica até aproximadamente 30 °C e o LASSBio-1773 até aproximadamente 150 °C. Tais dados são importantes para futuros estudos relacionados à temperatura.

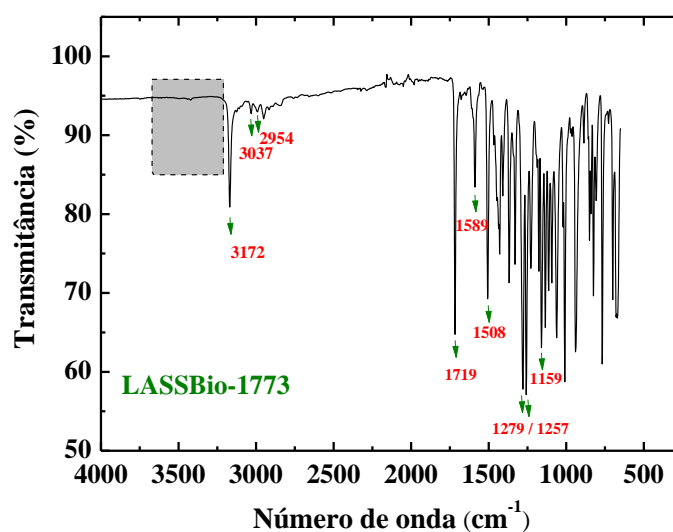
#### **6.1.4- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica bastante utilizada na caracterização de fármacos. Por ser útil em várias aplicações, esta foi empregada no presente estudo com o intuito de verificar o estado de hidratação dos compostos e assim corroborar com os resultados já então obtidos por meio das técnicas de DSC, TG e DRXP.

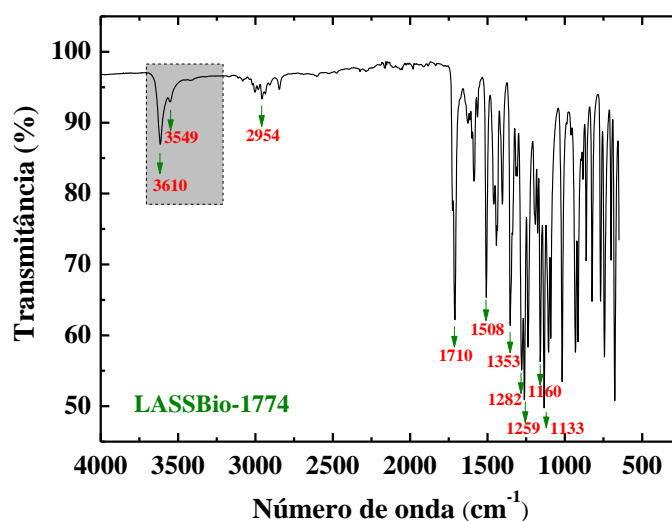
A principal região de interesse para o estudo dos compostos consiste na faixa de 3650 – 3200  $\text{cm}^{-1}$ , uma vez que nesta faixa encontram-se as bandas de estiramento O-H ( $\nu$  O-H) da água [98-101].

**Figura 29:** Espectro de FTIR do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b) obtido com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  na região de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , em que as bandas de absorção características do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774 estão destacadas por seus respectivos números de onda. A região de interesse engloba a faixa entre 3650-3200  $\text{cm}^{-1}$  (retângulo cinza).

a)



b)



Analisando os espectros de FTIR dos compostos foi possível extrair algumas informações importantes, como a ausência de bandas de estiramento O-H da água no espectro de FTIR do LASSBio-1773 e a identificação de duas bandas de absorção no espectro de FTIR do LASSBio-1774: uma em aproximadamente 3610  $\text{cm}^{-1}$  e outra, em aproximadamente 3549



cm<sup>-1</sup>, ambas referentes ao estiramento O-H da água ( $\nu$  O-H). Com base nessas observações, pode-se caracterizar o LASSBio-1773 como uma molécula na forma anidra e o LASSBio-1774 na forma hidratada. Esses resultados confirmam os dados obtidos na análise qualitativa das curvas de DSC e na análise quantitativa das curvas TG/DTG dos compostos, além dos resultados de DRXP.

Vale enfatizar que a avaliação do estado de hidratação dos compostos foi imprescindível, principalmente pelo fato de que a presença de solventes na estrutura química de um dado composto pode alterar sua velocidade de dissolução (ocasionando problemas de biodisponibilidade) e ainda dificultar o processo de determinação estrutural.

Após a identificação do estado de hidratação do LASSBio-1774 foi possível dar continuidade à redeterminação estrutural do composto, só que agora levando em consideração também a molécula de água no interior da cela unitária, conforme será mostrado na seção seguinte.

#### **6.1.5-Redeterminação estrutural do candidato a fármaco - LASSBio-1774**

A redeterminação estrutural do LASSBio-1774 seguiu o mesmo procedimento de determinação estrutural adotado para o LASSBio-1773 (seção 6.1.2). No entanto, para dar início ao processo de redeterminação estrutural foi considerada uma molécula de água juntamente com a molécula do LASSBio-1774.

As informações encontradas para o LASSBio-1774 foram sistema cristalino ortorrômbico; parâmetros de cela unitária:  $a = 28,9031 \text{ \AA}$ ,  $b = 15,0358 \text{ \AA}$ ,  $c = 9,1477 \text{ \AA}$  e volume da cela unitária:  $V = 3975,43 \text{ \AA}^3$ .

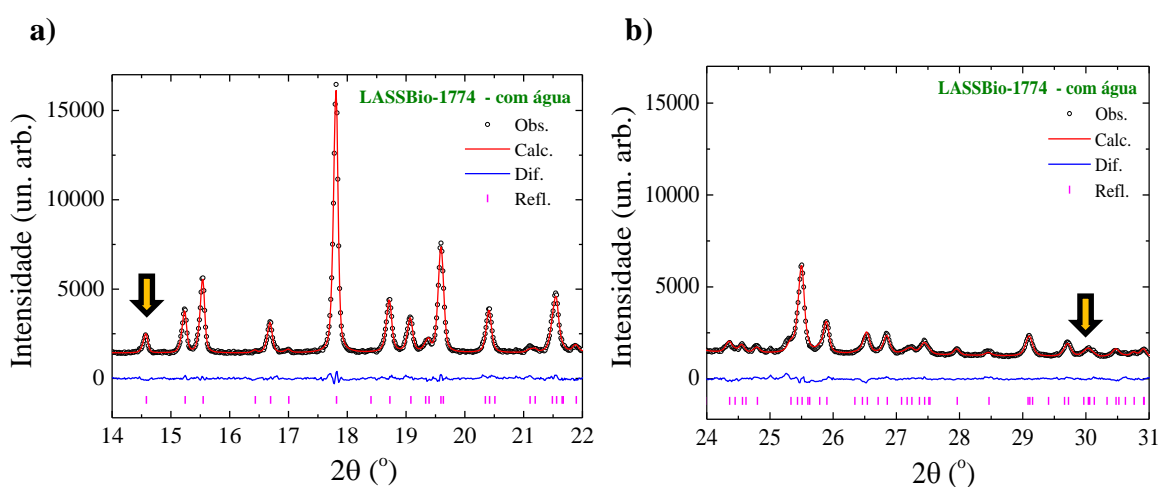
Depois que os parâmetros de cela unitária foram avaliados obteve-se a solução para o grupo espacial. A melhor solução encontrada para o LASSBio-1774 foi *Pbca*. Baseado no volume da cela unitária e no volume da molécula ( $V_{\text{cela}}/V_{\text{mol}} = 3975,43/ 489,95$ ) foi possível inferir oito fórmulas unitárias do LASSBio-1774 na cela unitária ( $Z = 8$ ). A combinação dessa informação com a melhor solução de grupo espacial permitiu estimar a existência de duas fórmulas unitária do LASSBio-1774 na unidade assimétrica ( $Z' = 2$ ).

Em posse da melhor solução da estrutura para o LASSBio-1774, a mesma foi considerada no refinamento de Rietveld [38].

No procedimento de refinamento da estrutura determinada foi observado que por toda a faixa angular os picos foram ajustados perfeitamente, o que inclui os picos nas posições

14,5° e 30,0° em  $2\theta$  (conforme mostrado na Figura 30), os quais não foram ajustados na primeira tentativa de determinação estrutural do LASSBio-1774 (sem considerar a molécula de H<sub>2</sub>O - Figura 24 ). O refinamento de Rietveld completo do LASSBio-1774 monohidratado será mostrado mais adiante, mais precisamente na Figura 37b.

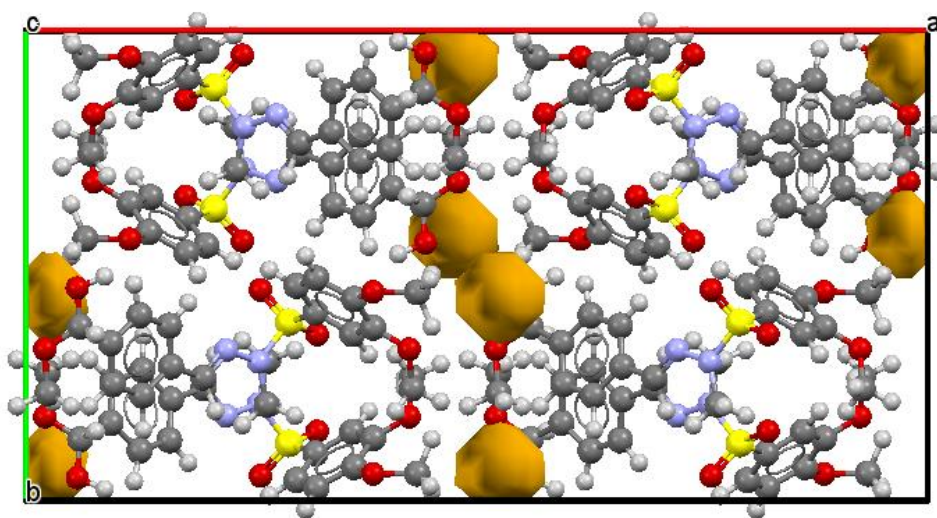
**Figura 30:** a) Região ampliada (14° a 22° em  $2\theta$ ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1774 em que o padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado por uma linha vermelha, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições dos picos de Bragg pelas barras rosas; b) Região ampliada (24° a 31° em  $2\theta$ ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1774. As setas amarelas evidenciam os picos nas posições 14,5° e 30,0° ( $2\theta$ ).



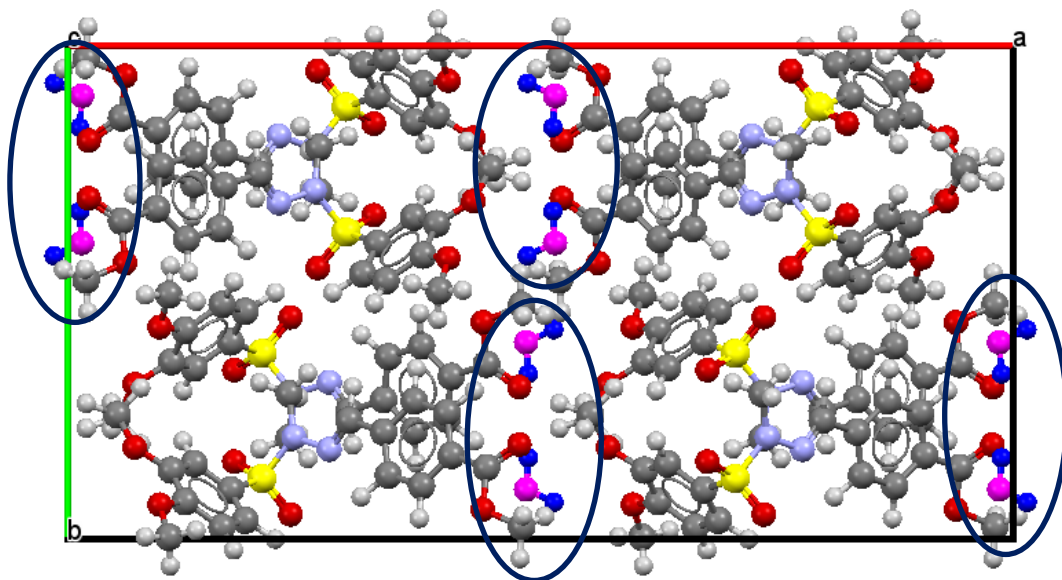
Vale enfatizar que somente com a inserção da molécula de água na cela unitária a estrutura cristalina do LASSBio-1774 foi determinada corretamente. Na Figura 31 (a e b) é possível visualizar as diferenças existentes na cela unitária do LASSBio-1774 ao considerar uma molécula de água e ao desconsiderar a molécula de água. Sem levar em consideração a molécula de água, é possível verificar a presença de espaços vazios (a), porém, ao ser considerada uma molécula de água na cela unitária do LASSBio-1774 (b) os espaços vazios são preenchidos pelas mesmas (ressaltadas por círculos azuis). Mais detalhes sobre a estrutura cristalina determinada do LASSBio-1774 encontra-se na próxima seção.

Figura 31: a) Cella unitária do LASSBio-1774 sem considerar a molécula de água. Os espaços vazios (*voids*) são evidenciados por canais amarelos. b) Cella unitária do LASSBio-1774 considerando a molécula de água no interior da cela unitária. Os átomos constituintes da molécula de água são indicados da seguinte forma: oxigênio (esferas rosas) e hidrogênio (esferas azuis).

a) Sem considerar a molécula de **água**.



b) Considerando a molécula de **água**.



### 6.1.6- Descrição das estruturas cristalinas

A estrutura cristalina do LASSBio-1773 consiste em quatro fórmulas unitárias do LASSBio-1773 por cela unitária, conforme mostrado na Figura 32a, acomodando uma fórmula unitária do LASSBio-1773 na unidade assimétrica. Dentro da cela unitária as moléculas são mantidas juntas por meio de interações de hidrogênio entre os átomos N(1)–H(27)···O(16). As interações de hidrogênio entre os átomos N(1)–H(27)···O(16) estão representadas pelas linhas tracejadas em azul, conforme mostrado na Figura 33a.

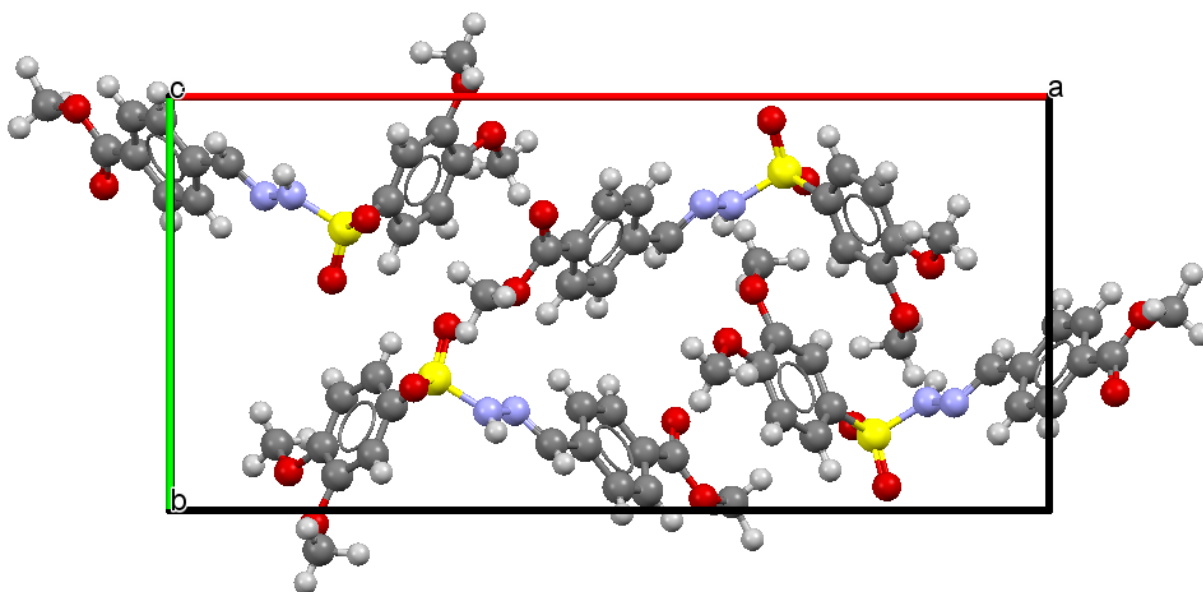
Com a finalidade de verificar a conformação da molécula foi analisado alguns ângulos de torção do LASSBio-1773. Os ângulos de torção entre os átomos da subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1773 adotam a conformação sinclinal e antiperiplanar. O ângulo de torção de  $64,0 (8)^\circ$  envolvendo os átomos N(3)–N(1)–S(2)–C(4) adota uma conformação (+) sinclinal, enquanto o ângulo de torção  $-52,4 (8)^\circ$  para os átomos N(3)–N(1)–S(2)–O(6) adota uma conformação (-) sinclinal. Os ângulos de torção de  $178,1 (7)^\circ$  e  $-168,0 (8)^\circ$  envolvendo os átomos N(3)–N(1)–S(2)–O(5) e S(2)–N(1)–N(3)–C(7) respectivamente, adotam a conformação antiperiplanar. A Figura 34a mostra de forma exemplificativa os átomos envolvidos nos ângulos de torção.

Como mencionado na seção 6.1.5 a estrutura cristalina do LASSBio-1774 monohidratado consiste em oito fórmulas unitárias do LASSBio-1774 por cela unitária, conforme mostrado na Figura 32b, acomodando duas fórmulas unitárias do LASSBio-1774 na unidade assimétrica. Dentro da cela unitária as moléculas são mantidas juntas por meio de interações de hidrogênio entre os átomos O(1)–H(3)···O(23) e O(1)–H(2)···O(28). As interações de hidrogênio envolvendo os átomos O(1)–H(3)···O(23) e O(1)–H(2)···O(28) estão representadas pelas linhas tracejadas em azul, conforme mostrado na Figura 33b. Na Tabela 8 estão apresentados os átomos envolvidos nas interações de hidrogênio, as distâncias entre os átomos e o ângulo medido para ambos os compostos.

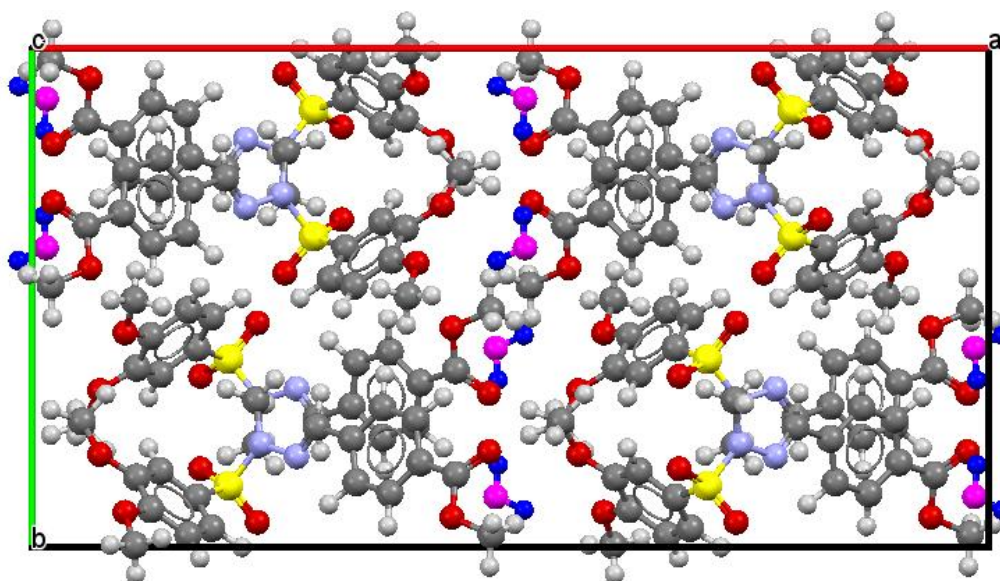
Os ângulos de torção envolvidos entre átomos constituintes da subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1774 monohidratado também adotam a conformação sinclinal e antiperiplanar. O ângulo de torção de  $-76 (3)^\circ$  envolvendo os átomos N(6)–N(4)–S(5)–C(8) adota uma conformação (-) sinclinal, enquanto o ângulo  $40 (3)^\circ$  entre os átomos N(6)–N(4)–S(5)–O(10) adota uma conformação (+) sinclinal. Os ângulos de torção de  $168 (2)^\circ$  e  $161 (3)^\circ$  envolvendo os átomos N(6)–N(4)–S(5)–O(9) e S(5)–N(4)–N(6)–C(11) respectivamente, adotam a conformação antiperiplanar. A Figura 34b mostra de forma exemplificativa os átomos envolvidos nos ângulos de torção.

Figura 32: Representação do empacotamento do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 monohidratado (b) na cela unitária ao longo do *eixo c*. Os átomos são indicados da seguinte forma: carbono (esferas cinzas), hidrogênio (esferas cinzas clara), oxigênio (esferas vermelhas), nitrogênio (esferas azuis) e enxofre (esferas amarelas). As moléculas de água são indicadas como: oxigênio (esferas rosas) e hidrogênio (esferas azuis escuro).

a) LASSBio-1773

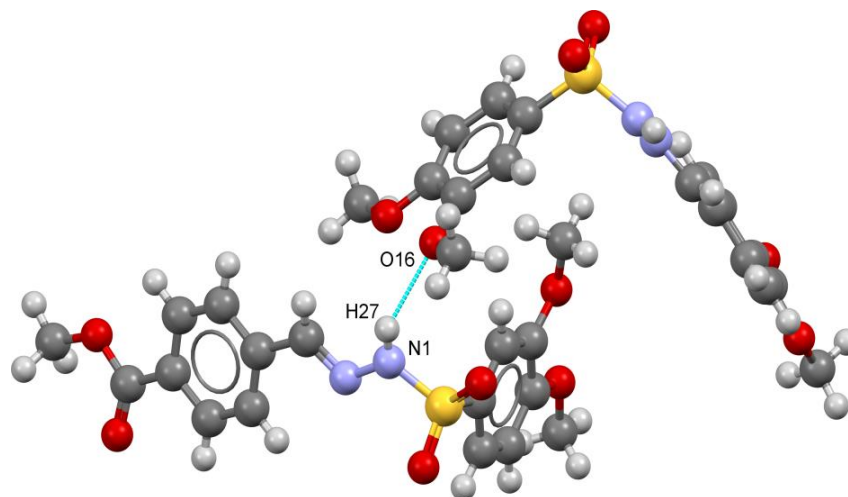


b) LASSBio-1774 monohidratado

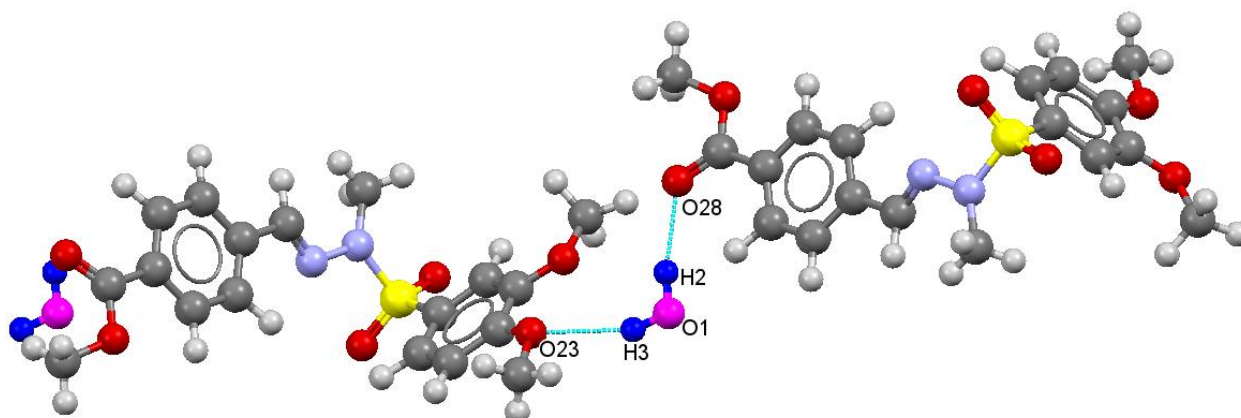


**Figura 33:** Representação das interações de hidrogênio (linha tracejada em azul) entre os átomos N(1)–H(27)···O(16) para o LASSBio-1773 (a) e entre os átomos O(1)–H(3)···O(23) e O(1)–H(2)···O(28) para o LASSBio-1774 monohidratado (b).

**a) LASSBio-1773**



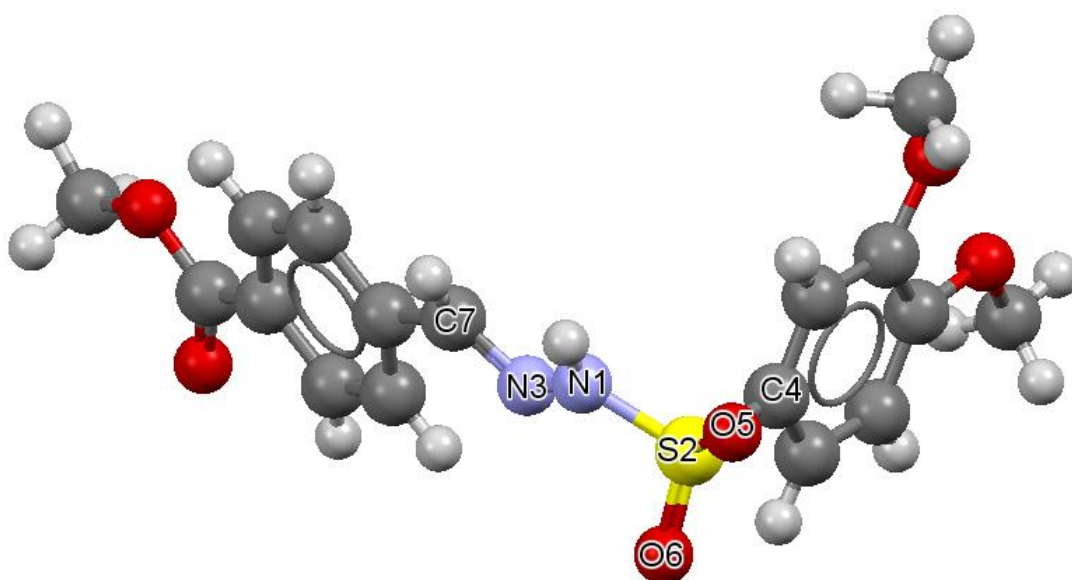
**b) LASSBio-1774 monohidratado**



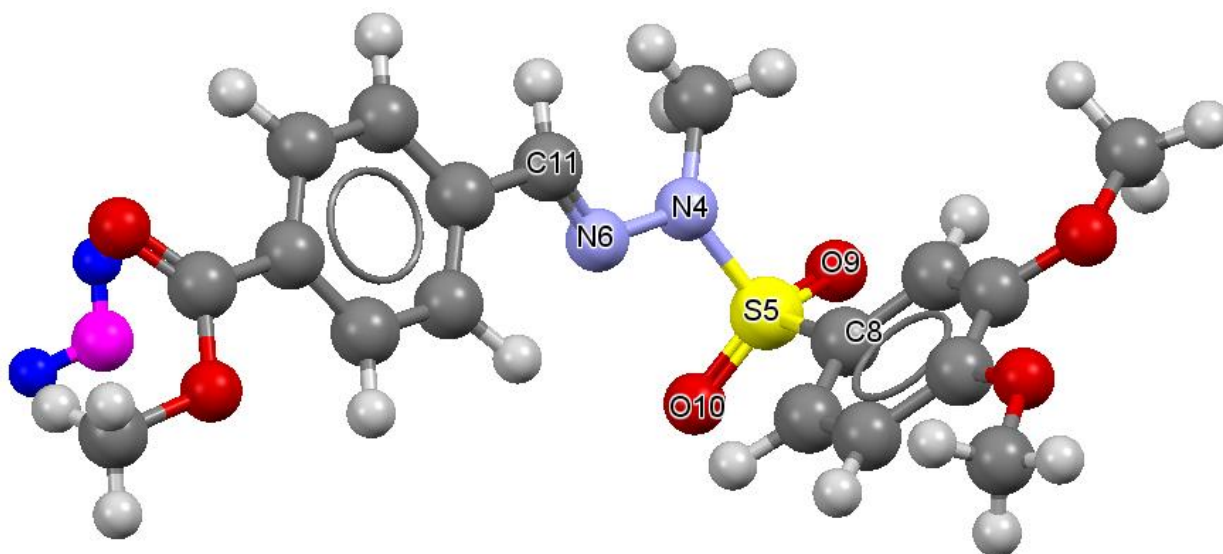


**Figura 34:** Estrutura molecular do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 (b). Os átomos envolvidos nos ângulos de torção estão destacados.

**a) LASSBio-1773**



**b) LASSBio- 1774 monohidratado**



**Tabela 8: Distâncias entre os átomos envolvidos nas interações de hidrogênio e o ângulo medido entre D, H e A. Sendo D o átomo doador e A o aceptor de ligação de H.**

<b>LASSBio-1773</b>				
<b>D–H ...A</b>	<b>D–H (Å)</b>	<b>H...A (Å)</b>	<b>D...A (Å)</b>	<b>D–H...A (°)</b>
N(1)–H(27)...O(16) <sup>a</sup>	0,87(2)	2,25(2)	2,97(2)	140(2)
<b>LASSBio-1774</b>				
O(1)–H(2)...O(28) <sup>b</sup>	1,0 (2)	2,2 (2)	3,13(4)	169(7)
O(1)–H(3)...O(23) <sup>c</sup>	0,9 (3)	2,4 (3)	3,29 (4)	155(1)

<sup>a</sup>Simetria: <sup>a</sup>1/2-x, -y, -1/2+z; <sup>b</sup>x, 1/2-y, 1/2+z; <sup>c</sup>-1/2x, y, 1/2-z

Outros dados importantes relacionados as estruturas cristalinas determinadas que merecem ser evidenciados são as coordenadas fracionárias – “x, y, z” (refere a posição de cada átomo na cela unitária) e os dados da geometria molecular. As coordenadas fracionárias – “x, y, z” – relacionadas às posições de cada átomo para os candidatos a fármacos LASSBio-1773 e LASSBio-1774 monohidratado estão representadas na seção 9 (anexos). Algumas informações importantes da geometria molecular, como distância entre os átomos, ângulos de ligação e ângulos de torção de alguns átomos característicos das estruturas cristalinas dos candidatos a fármacos também podem ser encontradas na seção 9.

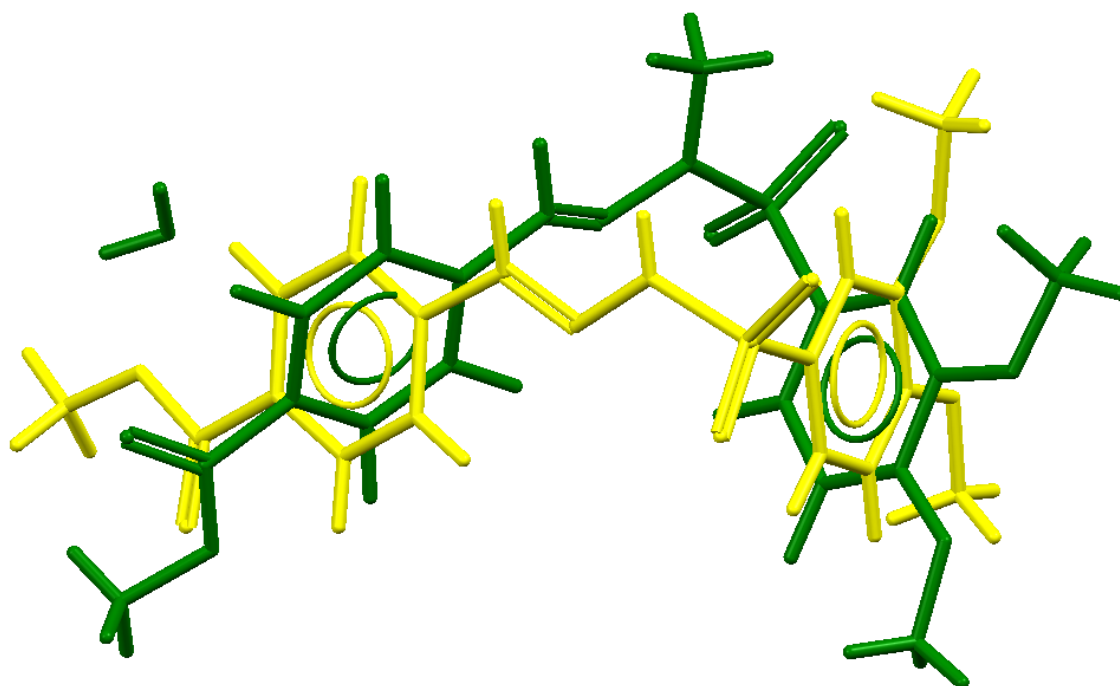
Por meio da determinação estrutural foi possível verificar a configuração relativa *E* da dupla ligação imínica C=N para ambos os candidatos a fármacos. O arranjo estrutural das moléculas do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774 em suas respectivas celas unitárias é em decorrência das interações de hidrogênio, bem como de eventuais interações dipolo-dipolo e  $\pi$ -stacking.

A presença de uma interação de hidrogênio mais forte na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1773 contribuiu para que a molécula assumisse a forma V dentro da cela unitária. No entanto, o mesmo não foi observado para o LASSBio-1774. Na molécula do LASSBio-1774 foi verificado uma interação de dispersão de London na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1774 e uma interação de hidrogênio mediada por uma molécula de água (entre os grupos dimetóxi-benzeno e benzoato de metila). Por se tratarem de interações mais fracas quando comparada a interação existente na subunidade sulfonilidrazona do LASSBio-1773, estas não permitiram que a molécula do LASSBio-1774 se rearranjasse na forma V, como a molécula do LASSBio-1773.



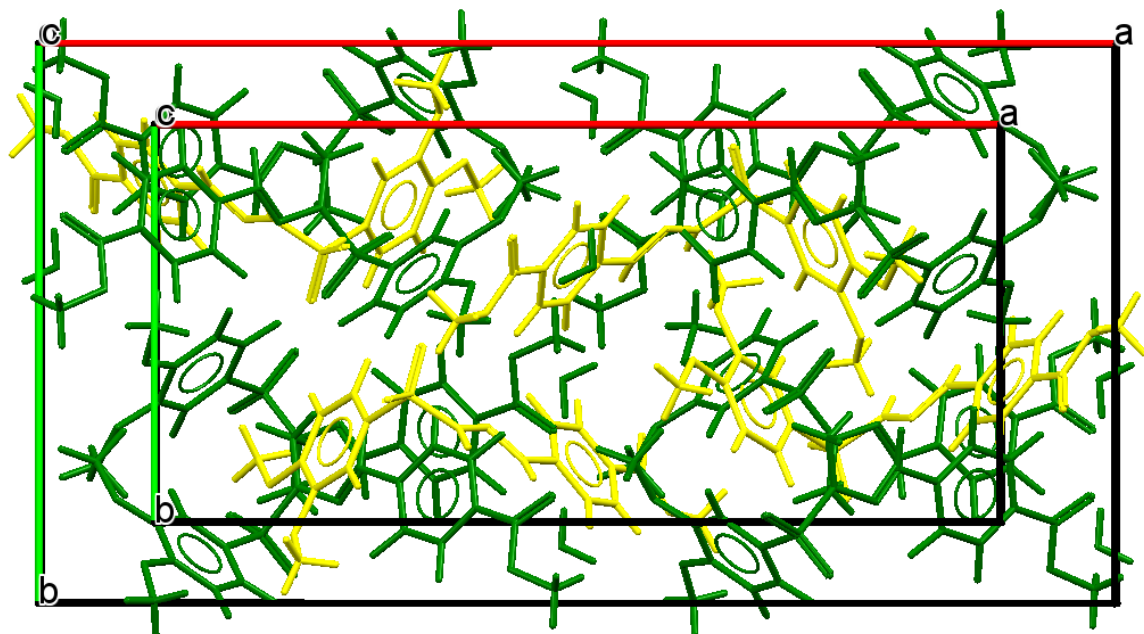
Vale enfatizar que as interações existentes em ambas as moléculas contribuem para que as mesmas adquiram conformações diferenciadas. As diferenças conformacionais ficam mais claras quando as moléculas são sobrepostas. A Figura 35 mostra a sobreposição das moléculas ao longo do *eixo c*.

**Figura 35:** Sobreposição da molécula LASSBio-1773 (em amarelo) e LASSBio-1774 monohidratado (em verde) ao longo do *eixo c*, mostrando diferenças conformacionais entre as moléculas.



Além das diferenças conformacionais também foi observado variações no volume da cela unitária dos compostos. A inserção do grupamento  $\text{CH}_3$ , mais a molécula de água na estrutura química do LASSBio-1774 causou um aumento de aproximadamente 2,3 vezes no volume da cela unitária do LASSBio-1774 quando comparado ao volume da cela unitária do LASSBio-1773. A Figura 36 mostra o empacotamento da cela unitária do LASSBio-1773 (em amarelo) e do LASSBio-1774 monohidratado (em verde) ao longo do *eixo c*, mostrando claramente alterações no volume da cela unitária do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774.

Figura 36: Empacotamento da cela unitária do LASSBio-1773 (em amarelo) e do LASSBio-1774 monohidratado (em verde) ao longo do *eixo c*. O volume da cela unitária do LASSBio-1773 é de 1761,41 Å<sup>3</sup> e do LASSBio-1774 é de 3975,43 Å<sup>3</sup>.



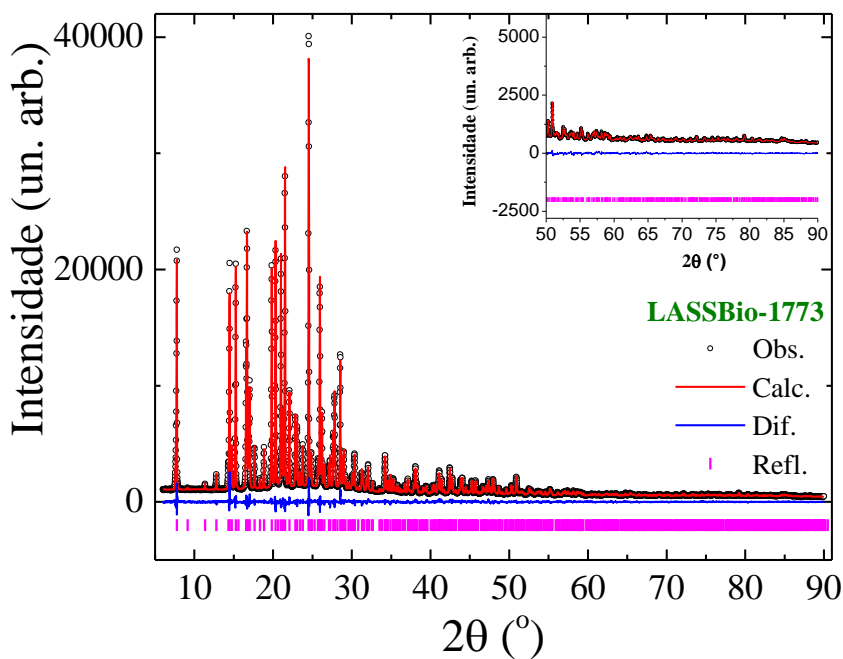
Após a correta determinação estrutural dos compostos - LASSBio-1773 e LASSBio-1774 monohidratado procedeu-se ao refinamento de Rietveld.

#### 6.1.7- Refinamentos de Rietveld

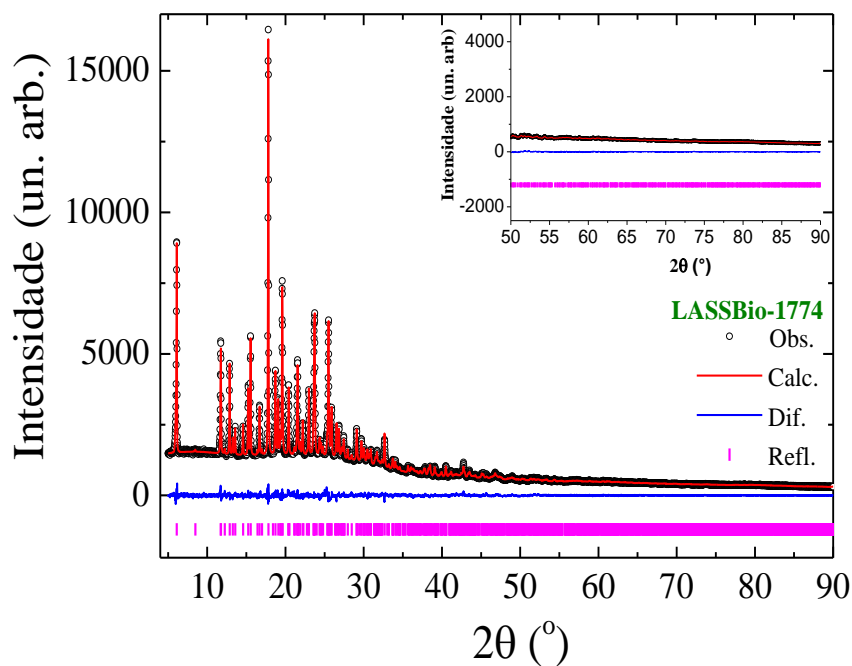
Como mencionado na seção 3.3, para empregar o método de Rietveld é necessário que se tenha um modelo estrutural de partida, ou seja, que a estrutura cristalina do seu material seja conhecida. Uma vez determinadas corretamente as estruturas cristalinas dos compostos sulfonilidrazônicos procedeu-se ao refinamento de Rietveld com o uso do software *Topas-Academic v.5* [53]. Na Figura 37 estão ilustrados os refinamentos de Rietveld dos compostos LASSBio-1773 (a) e LASSBio-1774 monohidratado (b).

Figura 37: Refinamento de Rietveld do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 monohidratado (b) em que o padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado pela linha vermelha, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições dos picos de Bragg pelas barras rosas. Para melhor efeito de visualização dos refinamentos de Rietveld foi inserido uma região ampliada (5° a 45° em  $2\theta$ ) em cada gráfico.

a) LASSBio-1773



b) LASSBio-1774 monohidratado



No refinamento de Rietveld do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774 monohidratado foram verificados que as moléculas cristalizaram no sistema ortorrômbico, porém, em grupos espaciais diferentes. O LASSBio-1773 no grupo espacial  $P2_12_12_1$  e o LASSBio-1774 monohidratado no  $Pbca$ . Os parâmetros de rede obtidos após o refinamento para o LASSBio-1773 foram  $a = 22,7370(6) \text{ \AA}$ ,  $b = 10,6880(4) \text{ \AA}$ ,  $c = 7,2519(2) \text{ \AA}$ ,  $V = 1762,32 (1) \text{ \AA}^3$  e a densidade calculada  $\rho_{\text{calc}} = 1,4261(7) \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  e, para o LASSBio-1774 monohidratado os parâmetros de rede obtidos foram  $a = 28,9030 (10) \text{ \AA}$ ,  $b = 15,0357 (3) \text{ \AA}$ ,  $c = 9,1476 (1) \text{ \AA}$ ,  $V = 3975,40 (8) \text{ \AA}^3$  e a densidade calculada:  $\rho_{\text{calc}} = 1,3715 (6) \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ .

Os parâmetros estatísticos, *fatores-R*, bem como o indicador que expressa a qualidade do ajuste,  $\chi^2$  foram os seguintes:  $R_{\text{exp}} = 2,73\%$ ,  $R_{\text{wp}} = 3,85\%$ ,  $R_{\text{Bragg}} = 1,53\%$  e  $\chi^2 = 1,41$  para o LASSBio-1773 e para o LASSBio-1774 monohidratado -  $R_{\text{exp}} = 3,20\%$ ,  $R_{\text{wp}} = 3,01\%$ ,  $R_{\text{Bragg}} = 1,12\%$  e  $\chi^2 = 0,94$ ; tais valores indicam um bom procedimento em ambos os refinamentos. Embora todos esses índices forneçam subsídios para julgar a qualidade do refinamento, o único índice que descreve a qualidade do modelo estrutural refinado é o  $R_{\text{Bragg}}$  [50] e, um valor de  $R_{\text{Bragg}}$  de 1,53% para o LASSBio-1773 e de 1,12% ( $R_{\text{Bragg}}$ ) para o LASSBio-1774 monohidratado, indica que as estruturas cristalinas dos candidatos a fármacos foram bem resolvidas. Dados do cristal e alguns detalhes dos refinamentos das estruturas cristalinas dos candidatos a fármacos - LASSBio-1773 e LASSBio-1774 monohidratado estão descritos na Tabela 9.

**Tabela 9: Dados do cristal e alguns detalhes dos parâmetros obtidos nos refinamentos das estruturas cristalinas dos candidatos a fármacos.**

	<b>LASSBio-1773</b>	<b>LASSBio-1774</b>
Fórmula	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S. H <sub>2</sub> O
Massa molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	378,4	410,4
Sistema cristalino	Ortorrômbico	Ortorrômbico
Grupo espacial	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i> (nr. 19)	<i>Pbca</i> (nr. 61)
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	22,7330(6); 10,6880(4); 7,2519(2)	28,9030 (10); 15,0357 (3); 9,1476 (1)
Volume (Å <sup>3</sup> )	1762,32 (1)	3975,40 (8)
<i>Z</i> , <i>Z'</i>	4,1	8,2
Densidade calculada (g.cm <sup>-3</sup> )	1,4261(7)	1,3715(6)
<b>Coleta de dados</b>		
Difratômetro	STADI-P, Stoe	STADI-P, Stoe
Monocromador	Ge(111)	Ge(111)
Geometria	transmissão	transmissão
Comprimento de onda (Å)	1,54056	1,54056
Faixa angular (2θ)	6-89,985	5-90,050
Passo angular (°)	0,015	0,015
Tempo por passo a cada 1,05° (s)	100 (6° – 25,950° (2θ)), 200 (25,950° - 45,900° (2θ)), 400 (45,900° - 65,850° (2θ)) e 800 (65,850° - 89,985° (2θ))	100 (5°- 26,000° (2θ)), 200 (26,000°- 45,950° (2θ)), 400 (45,950° - 65,900° (2θ)) e 800 (65,900°- 90,050° (2θ))
<b>Parâmetros dos refinamentos</b>		
R <sub>exp</sub> (%)	2,73	3,20
R <sub>wp</sub> (%)	3,85	3,01
R <sub>Bragg</sub> (%)	1,53	1,12
χ <sup>2</sup>	1,41	0,94

### 6.1.8 Avaliação da morfologia e da velocidade de dissolução intrínseca

A morfologia do cristal é controlada por condições externas de cristalização e fatores internos (estruturais) do cristal. Os fatores internos incluem estrutura molecular, composição, interações, empacotamento e defeitos, enquanto os fatores externos abrangem as condições empregadas na cristalização, como a supersaturação, temperatura, impurezas e solventes [102]. Vale ressaltar que todos esses fatores podem levar a mudanças na morfologia do cristal, ocasionando alterações em propriedades como solubilidade, velocidade de dissolução, ponto de fusão, estabilidade, compressibilidade, entre outras. Entre as condições externas de cristalização, merece destaque o uso de solventes adequados na etapa de cristalização, uma vez que estes tem-se tornado uma alternativa para otimizar a velocidade de dissolução de fármacos [103]. A dissolução é uma propriedade extremamente importante, uma vez que está relacionada com a biodisponibilidade do fármaco, ou seja, com a eficácia do mesmo. Dessa maneira, torna-se interessante avaliar a morfologia dos candidatos a fármacos e suas respectivas velocidades de dissolução intrínseca (VDI), já que as moléculas avaliadas são novas com potencial promissor no tratamento do diabetes mellitus.

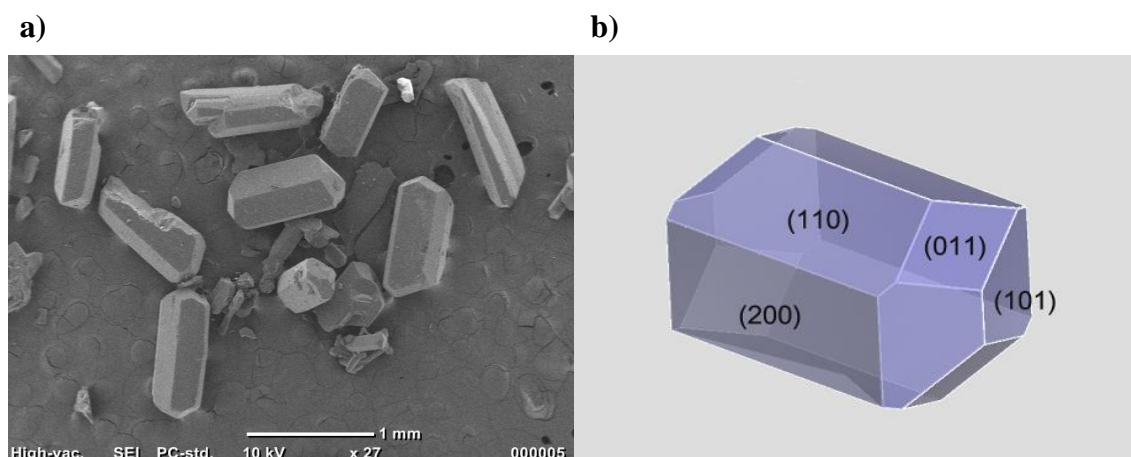
A morfologia dos candidatos a fármacos foi avaliada experimentalmente (MEV) e por simulação computacional (método GM), enquanto a solubilidade dos compostos pelos valores de VDI. A morfologia simulada é realizada a partir da estrutura cristalina do cristal, usando considerações estruturais e da energia de ligação ( $E_{att}$ ). Assim para estudos da predição da morfologia é imprescindível que a estrutura cristalina de um determinado composto já tenha sido determinada.

Como mencionado na seção 5.2.5, o método GM assume que a taxa de crescimento da face do cristal é proporcional à sua energia de ligação ( $E_{att}$ ), isto é, faces com menor  $E_{att}$  crescem mais lentamente e, por conseguinte, têm uma maior importância morfológica. Mais precisamente, o método GM prediz a morfologia dos cristais com base na  $E_{att}$ . A predição da morfologia dos candidatos a fármacos foi simulada levando em consideração possíveis interações dos cristais com os solventes de cristalização. Esses dados são importantes para que algumas hipóteses sobre a solubilidade dos cristais sejam lançadas.

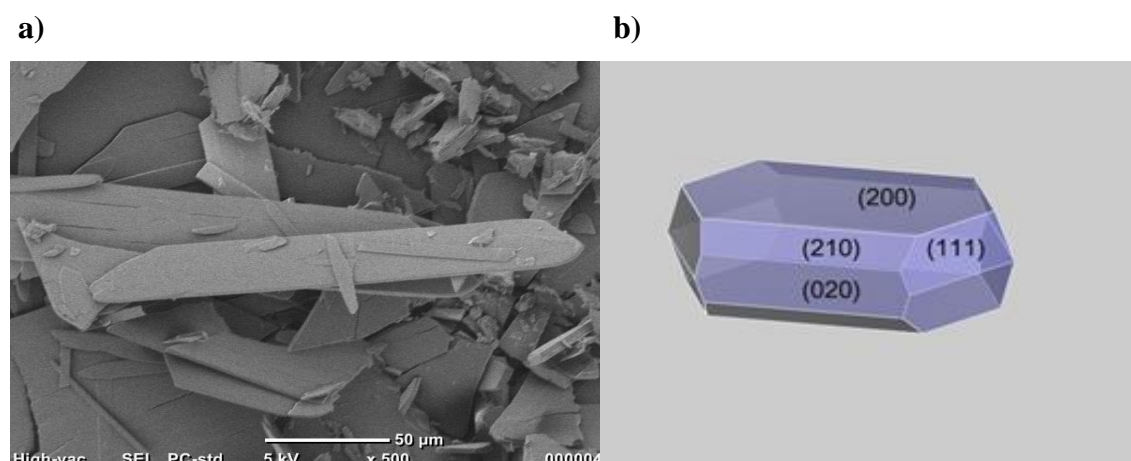
A Figura 38 e a Figura 39 mostram a morfologia do cristal do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774 obtida experimentalmente – (a) MEV e por simulação computacional – (b) método GM. Pode-se observar um bom acordo entre as morfologias dos cristais obtidas experimentalmente e as morfologias obtidas por simulação. Apesar do bom acordo entre as metodologias, é importante ter em mente que a predição *in silico* foi realizada no vácuo e

apenas por simples considerações de solubilização, por isso também foi necessário levar em consideração o efeito potencial dos solventes de cristalização no crescimento das faces. Em consequência disso foi realizada uma análise detalhada da função dos solventes de cristalização, em seguida, esses dados foram comparados com as análises de VDI. Para este propósito foram analisados os resultados da predição da morfologia dos compostos desenhando o plano ( $hkl$ ) correspondente às faces cristalinas morfologicamente importantes (MI) no hábito, conforme mostrado na Figura 40.

**Figura 38:** Comparação entre a morfologia obtida pela microscopia (MEV) e a simulada pelo método GM para o LASSBio-1773. a) Fotomicrografia do LASSBio-1773 exibindo cristais na forma prismática. A forma dos cristais obtida pela microscopia apresenta concordância com a morfologia sugerida pelo método GM; b) Predição da morfologia do LASSBio-1773. Os índices de Miller indicam as faces morfologicamente importantes dos cristais.



**Figura 39:** Comparação entre a morfologia obtida pela microscopia (MEV) e a simulada pelo método GM para o LASSBio-1774 monohidratado. a) Fotomicrografia do LASSBio-1774 monohidratado exibindo cristais na forma de lâminas prismáticas. A forma dos cristais obtida pela microscopia apresenta concordância com a morfologia sugerida pelo método GM; b) Predição da morfologia do LASSBio-1774 monohidratado. Os índices de Miller indicam as faces morfologicamente importantes dos cristais.



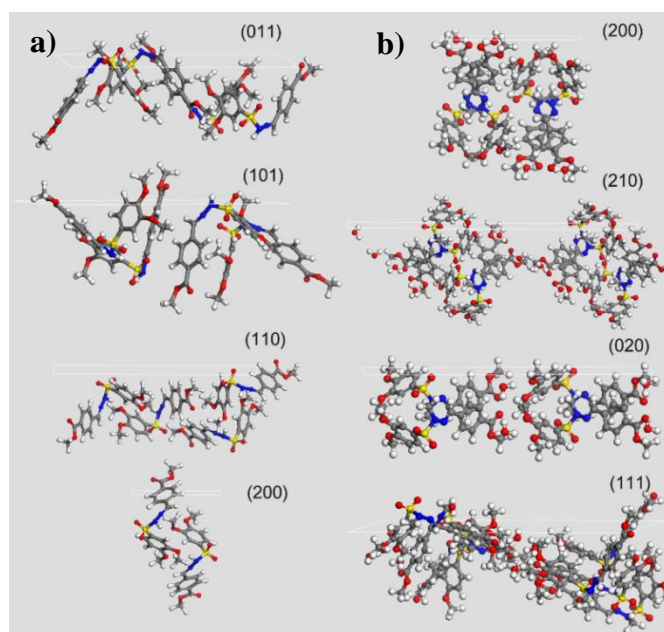
Com exceção da face (110), todas as outras faces MI relatadas (Figura 40a) evidenciam um ambiente apolar com grupos apolares característicos. O uso da água como solvente de cristalização foi justificado pela tendência muito pequena da maior parte das faces MI da superfície do cristal (quase 60%, conforme mostrado na Tabela 10) dar origem a interações energeticamente favorecida com solventes polares (água e tampão fosfato). A molécula do LASSBio-1773 (Figura 33a) mostra uma forma dobrada com uma parte apical polar e duas alas apolares. A fim de favorecer a solubilidade do LASSBio-1773, apenas o melhoramento do crescimento da face (110) deve ser considerado. Com a finalidade de obter esse resultado, uma possível estratégia poderia ser o uso de solventes menos polares, isto é, exceto a água - durante a cristalização do LASSBio1773. Esse procedimento irá impedir o crescimento das outras faces MI e favorecerá o desenvolvimento somente da face MI (110) - polar. Assim, o resultado final será uma solubilidade melhorada do LASSBio-1773 em solventes polares e também em tampões polares - tal como o fosfato utilizado nas análises de VDI do LASSBio-1773.

Por meio dos estudos da predição da morfologia do LASSBio-1774 monohidratado foi verificado que o papel da molécula de água cristalizada na cela unitária é importante para a avaliação da capacidade do LASSBio-1774 dissolver em solução e também para a análise da estabilidade térmica do composto. Uma análise cuidadosa dos grupos de átomos que afloram nas faces cristalinas MI (Figura 40b) evidenciou que uma região apolar foi transformada em polar em todas as faces cristalinas consideradas do LASSBio-1774. Dados referentes às faces MI do LASSBio-1774, bem como suas respectivas distâncias interplanares, multiplicidade, energia de ligação ( $E_{att}$ ) e a área total da face do cristal estão mostrados na Tabela 10. Pelos estudos da predição morfológica do LASSBio-1774 pôde-se verificar que há, naturalmente, entre as faces MI, um enfraquecimento da característica polar, ou seja, tem-se uma polaridade mais marcada em (111) e (210) e, uma ligeira diminuição da polaridade em (020) e (200), sendo que este último índice evidentemente obteve uma característica polar em decorrência da presença da água. Essa classificação polar das faces MI pode explicar o alongamento do cristal real quando comparado com a morfologia básica observada pela abordagem computacional. É importante ressaltar que o uso de uma mistura de água e etanol com característica ligeiramente menos polar que a água favoreceu o crescimento das faces menos polares, o que contribuiu para o formato dos cristais do LASSBio-1774 monohidratado na forma de lâminas prismática, assim como evidenciado pela análise de MEV. Tais observações mostram que a presença de água na estrutura do LASSBio-1774 monohidratado e a



característica bastante polar das suas faces MI garantem uma melhor capacidade do LASSBio-1774 monohidratado dissolver em solução quando comparado com o LASSBio-1773, tais resultados podem ser verificados nas análises de VDI.

**Figura 40:** Faces morfologicamente importantes (MI) do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 monohidratado (b). Os índices de Miller são mostrados juntamente com os respectivos arranjos das moléculas.



**Tabela 10:** Predição da morfologia do LASSBio-1773 e do LASSBio-1774 monohidratado por meio dos cálculos obtidos pelo método GM. A porcentagem da área da face total é calculada como  $100 \times (\text{área da face } hkl) / (\text{área superficial total})$ .

LASSBio-1773				
<i>hkl</i>	Multiplicidade	$d_{hkl}$ (Å)	$E_{att}(\text{Total})$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	Área da face total (%)
(110)	4	9,6624	-120,7005	43,74
(200)	2	11,3564	-126,2876	24,32
(101)	4	5,9917	-180,9218	18,57
(011)	4	6,8973	-177,3885	13,37
LASSBio-1774 monohidratado				
(200)	2	14,4516	-87,4231	44,39
(210)	4	10,4192	154,3096	17,12
(020)	2	7,5179	-178,4827	11,19
(111)	8	7,5441	-235,5099	27,30

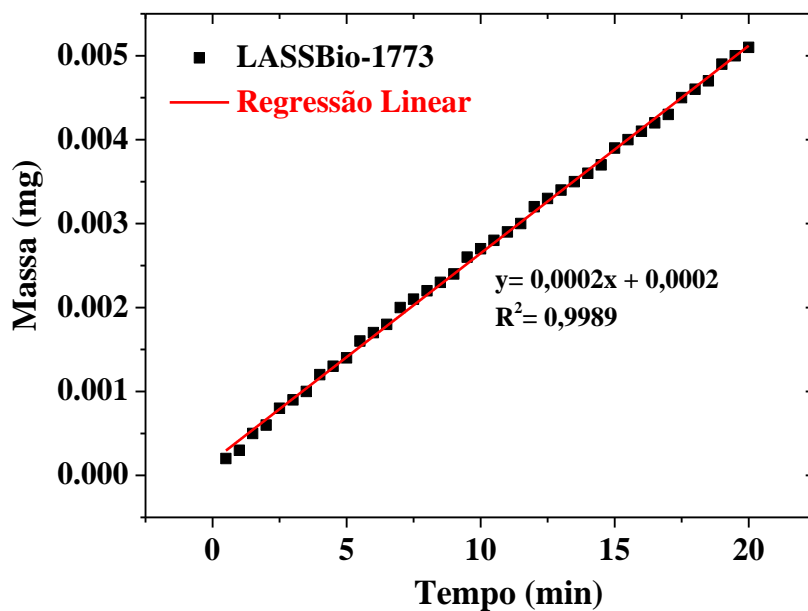
Como é sabido, a morfologia do cristal pode ter impacto direto na biodisponibilidade de fármacos. Assim, com base na morfologia obtida para o LASSBio-1773 (cristais na forma prismática) e para o LASSBio-1774 (cristais na forma de lâminas prismáticas) foi calculado a VDI com o intuito de prever a solubilidade dos mesmos.

Como mencionado na seção 3.7, a VDI é um parâmetro que tem sido empregado para classificar a solubilidade de fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).

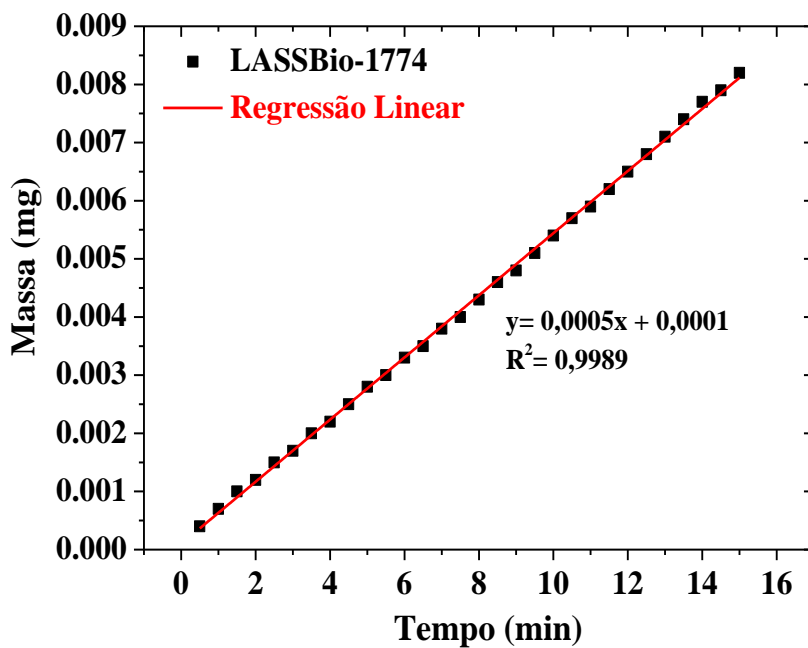
A Figura 41 mostra o perfil de dissolução do LASSBio-1773 (a) e do LASSBio-1774 monohidratado (b). O LASSBio-1773 apresentou valor de VDI de  $6,4(6) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  e o LASSBio-1774 monohidratado VDI de  $15,9(6) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os valores de VDI observados para os compostos mostram que o LASSBio-1774 monohidratado apresenta um valor de VDI 2,5 vezes maior que o valor apresentado para o LASSBio-1773. Provavelmente a diferença entre os valores seja em decorrência da presença da água na estrutura química do LASSBio-1774 e também pela inserção do grupo  $\text{CH}_3$  na subunidade sulfonilidrazona. A Figura 42 compara o perfil de dissolução do LASSBio-1773 com o perfil do LASSBio-1774 monohidratado. Analisando o perfil de dissolução dos compostos foi observado que o LASSBio-1774 dissolve em um período menor (15 minutos) quando comparado à dissolução do LASSBio-1773 (20 minutos), o que nos permite reiterar que a solubilidade do LASSBio-1774 é maior quando comparada à solubilidade do LASSBio-1773. É possível também observar na Figura 41 (a e b) que os valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos para ambos os candidatos a fármacos indicam boa linearidade entre os pontos.

Figura 41: Perfis de dissolução dos candidatos a fármacos LASSBio-1773 (a) e LASSBio-1774 monohidratado (b).

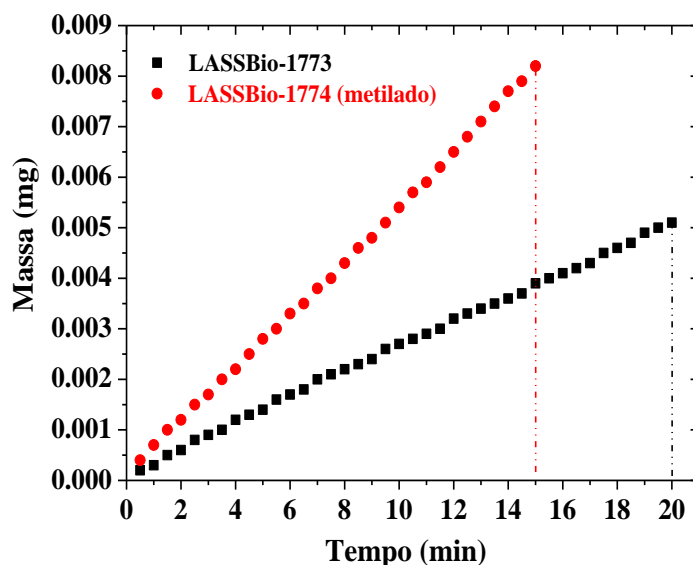
a) LASSBio-1773



b) LASSBio-1774 monohidratado



**Figura 42:** Comparação entre os perfis de dissolução do LASSBio-1773 (círculos vermelhos) e do LASSBio-1774 monohidratado (retângulos pretos).



De acordo com Yu et al., 2004 [75], valores de VDI abaixo de  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ ) indicam fármacos de baixa solubilidade. Assim, pelos valores de VDI apresentados para os candidatos a fármacos foi possível classificá-los como compostos de baixa solubilidade. A *N*-metilação na subunidade sulfonilidrazona e a presença de água na estrutura química conseguiu aumentar a VDI do LASSBio-1774 monohidratado, porém, não o suficiente para classificá-lo como um composto de alta solubilidade.

Uma alternativa objetivando melhorar solubilidade dos compostos seria a recristalização em solventes adequados, por exemplo, a recristalização do LASSBio-1773 em solventes com polaridade menor que da água, assim como foi estimado na predição da morfologia. Outra alternativa que também têm sido bastante relatada na literatura quando se trata de fármacos insolúveis (antineoplásicos, hipoglicemiantes e anti-inflamatórios), consiste no uso de sistema de liberação de fármacos (*drug delivery*) com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade.

## 7-Conclusão

Com o uso das técnicas de difração de raios X por policristais (DRXP) aliada ao método de Rietveld, termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), dissolução intrínseca (DI) e estudos da predição da morfologia foi possível realizar a caracterização físico-química dos candidatos a fármacos LASBio-1773 e LASBio-1774. Pelos dados de DRXP foram evidenciados que os compostos tratam-se de moléculas cristalinas. Após a indexação dos compostos ficou evidenciado que o LASSBio-1773 cristalizou-se em um sistema ortorrômbico e grupo espacial  $P2_12_12_1$ . Já o LASSBio-1774 monohidratado cristalizou-se em um sistema ortorrômbico e grupo espacial  $Pbca$ .

A técnica de TG/DTG foi imprescindível para estabelecer a estabilidade térmica dos compostos. O LASSBio-1773 apresenta estabilidade térmica até aproximadamente 150 °C, enquanto o LASSBio-1774 monohidratado até aproximadamente 30 °C.

Por meio da técnica de DSC, TG/DTG e FTIR foram determinados o estado de hidratação dos compostos. O LASSBio-1773 foi caracterizado como uma molécula anidra e o LASSBio-1774 como uma molécula monohidratada. Os resultados de DSC foram suficientes para estabelecer o ponto de fusão e a pureza dos compostos.

As fotomicrografias obtidas experimentalmente (MEV) evidenciaram claramente diferenças entre a morfologia dos cristais. O LASSBio-1773 apresentou cristais na forma prismática e o LASSBio-1774 monohidratado cristais na forma de lâminas prismáticas. Os resultados da predição da morfologia dos cristais são concordantes com a morfologia apresentada experimentalmente (MEV).

Pelos ensaios de DI foi possível classificar os candidatos a fármacos como substâncias de baixa solubilidade. O LASSBio-1773 apresentou um valor de VDI de  $6,4(6) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  e o LASSBio-1774 monohidratado uma VDI de  $15,9(6) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Com base nos dados obtidos nesta tese, pôde-se concluir que o uso das técnicas de DRXP aliada ao método de Rietveld, TG/DTG, DSC, FTIR, MEV, DI e os resultados da predição da morfologia foram cruciais para a caracterização físico-química dos candidatos a fármacos.

## 8-Referências Bibliográficas

- [1] Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: Complications and therapeutics. Medical Science Monitor;12:130-47 2006.
- [2] Federation. ID. Diabetes Atlas. 7 ed 2015.
- [3] Federation. ID. Diabetes Atlas. 6 ed 2013.
- [4] Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D. Diabetes and cancer: a consensus report. Diabetes Care;33:1674-85 2010.
- [5] Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus.: Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1999.
- [6] Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care;37 Suppl 1:S81-90 2014.
- [7] Paiva C. Novos critérios de diagnóstico e classificação da diabetes mellitus. Medicina Interna;7 2001.
- [8] Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, de Azevedo MJ. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia;46:16-26 2002.
- [9] Pasqualotto KR, Alberton D, Frigeri HR. Diabetes mellitus e Complicações. Journal of Biotechnology and Biodiversity;3:134-45 2012.
- [10] Fráguas R, Soares SMdSR, Bronstein MD. Depressão e diabetes mellitus. Revista de Psiquiatria Clínica;36:93-99 2009.
- [11] Weinert LS, Camargo EG, Silveiro SP. Tratamento medicamentoso da hiperglicemia no diabetes melito tipo 2. Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre 2010. p. 372-81.
- [12] Ho J, Leung AKC, Rabi D. Hypoglycemic Agents in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery;5:66-73 2011.
- [13] Joshi SK, Shrestha S. Diabetes mellitus: A review of its associations with different environmental factors. Kathmandu University Medical Journal;8:109-15 2010.
- [14] Brasil. Caderno de atenção básica diabetes mellitus. Ministério da Saúde 2006.
- [15] de Oliveira JEP, Milech A. Diabetes Mellitus,Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar. 2006.

- [16] Who. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications.:1-59 1999.
- [17] Corp MSD. Perdubações Hormonais-Diabetes Mellitus. Biblioteca Médica Online; 2009.
- [18] Tschiedel B. Complicações crônicas do diabetes. . JBM;102:6 2014.
- [19] Zapata-Sudo G, Lima LM, Pereira SL, Trachez MM, da Costa FP, Souza BJ, Monteiro CES, Romeiro NC, D'Andréa ED, Sudo RT, Barreiro EJ. Docking, Synthesis and Anti-Diabetic Activity of Novel Sulfonylhydrazone Derivatives Designed as PPAR-Gamma Agonists. . Current Topics in Medicinal Chemistry;12: 2037-48 2012.
- [20] Lima LM, Zapata-Sudo G, da Costa Nunes IK, Segundo Chaves de Araujo J, da Silva J, Manhães Trachez M, Fernandes da Silva T, P. da Costa F, Sudo R, Barreiro E. Synthesis, solubility, plasma stability, and pharmacological evaluation of novel sulfonylhydrazones designed as anti-diabetic agents. Drug Design, Development and Therapy;Volume 10:2869-79 2016.
- [21] Dor. EPs. <http://www.pessemdor.com.br/diabetes/>
- [22] Lorenzati B, Zucco C, Miglietta S, Lamberti F, Bruno G. Oral Hypoglycemic Drugs: Pathophysiological Basis of Their Mechanism of Action. Pharmaceuticals;3:3005-20 2010.
- [23] Diamant M, Heine RJ. Thiazolidinediones in Type 2 Diabetes Mellitus. Drugs;63:1373-406 2003.
- [24] da Costa FP. Novos candidatos a protótipos de fármacos hipoglicemiantes com atividade anti-inflamatória: LASSBio-1773 e LASSBio-1774.: Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado; 2013.
- [25] Alves WA. Química Supramolecular e Nanotecnologia. 1 ed. Brasil: Atheneu; 2014.
- [26] Shmueli U. Theories and Techniques of Crystal Structure Determination. 1ª ed. New York 2007.
- [27] Pecharsky VK, Zavalij PY. Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials. New York, USA: Springer Science Business Media, Inc. ; 2005.
- [28] Antonio SG. Aplicação do Método de Rietveld na caracterização estrutural e nanoestrutural do espinélio  $\text{Ni}_{1-\delta}\text{Co}_\delta\text{Fe}_2\text{O}_4$  preparado por Reação de Combustão. Araraquara,SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Dissertação de Mestrado.; 2006.

- [29] Bleicher L, Sasaki JM. Introdução à difração de raios X em cristais. Fortaleza/CE: Publicação da Universidade Federal do Ceará; 2000. p. 20.
- [30] Brum JA. A pesquisa em nanociência e nanotecnologia no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Nanociência & Nanotecnologia 2002.
- [31] Cullity BD. Elements of x-ray diffraction. . 2 ed. London: Addison-Wesley Publishing Company Inc 1978.
- [32] Hahn T. International Table for Crystallography. 5 ed: Springer; 2005.
- [33] Ferreira FF. Estrutura e Intercalação de íons em filmes de óxidos metálicos. São Paulo: Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado.; 1998.
- [34] Ibiapino AL. Caracterização estrutural das matérias-primas de isoniazida e rifampicina. Santo André-SP: Universidade Federal do ABC. Dissertação de Mestrado.; 2013.
- [35] Costa FN. Determinação estrutural de derivados N-Acildrazônicos, candidatos a protótipos de fármacos, através da difração de raios X por policristais. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado.; 2013.
- [36] Antonio SG. Aplicação da difração de raios X por policristais e do método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas no estudo de polimorfos cristalinos de fármacos. Araraquara-SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Tese de doutorado.; 2010.
- [37] Rietveld HM. Line profiles of neutron powder-diffraction peaks for structure refinement. Acta Crystallographica;22:151-52 1967.
- [38] Rietveld HM. A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures. Journal of Applied Crystallography;2:65-71 1969.
- [39] Dinnebier RE, Billinge SJL. Powder Diffraction Theory and Practice. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry; 2008.
- [40] David WIF, Shankland K, Van de Streek J, Pidcock E, Motherwell WDS, Cole JC. DASH: a program for crystal structure determination from powder diffraction data. Journal Applied Crystallography;39:910-15 2006.
- [41] Harris KD. Powder diffraction crystallography of molecular solids. . Top Curr Chem;315:133-77 2012.
- [42] Pawley GS. Unit-cell refinement from powder diffraction scans. J Appl Crystallogr;14:357-61 1981.
- [43] Le Bail A, Duroy H, Fourquet JL. Ab-initio structure determination of  $\text{LiSbWO}_6$  by X-ray powder diffraction. Materials Research Bulletin;23:447-52 1988.



- [44] Menden A. Crystal Structure Solution from Powder Diffraction Data – State of the Art and Perspectives. *Croatica Chemica Acta*;71:615-33 1998.
- [45] David WIF, Shankland K, Van de Streek J, Pidcock E, Motherwell WDS, Cole JC. DASH: a program for crystal structure determination from powder diffraction data. *Journal of Applied Crystallography*;39:910 2006.
- [46] Hofmann DWM. Fast estimation of crystal densities. *Acta Cryst* 57:489-93 2002.
- [47] Cerný R, Favre-Nicolin V. Direct space methods of structure determination from powder diffraction: principles, guidelines and perspectives. *Z Kristallogr*;222 2007.
- [48] Bruno IJ, Cole JC, M. K, Luo J, Motherwell WD, Purkis LH, Smith BR, Taylor R, Cooper RI, Harris SE, Orpen AG. Retrieval of crystallographically-derived molecular geometry information. *J Chem Inf Comp Sci*;44:2133–44. 2004.
- [49] Toby BH. R factors in Rietveld analysis: How good is good enough? *Powder Diffraction*;21:67-70 2006.
- [50] Paiva-Santos CO. Aplicações do Método de Rietveld e Potencialidades do Método de Scarlett- Madsen. 2009. p. 29-30.
- [51] Figueiredo LP. Análise de excipientes em comprimidos de fármacos comercializados. Santo André-SP: Universidade Federal do ABC. Dissertação de Mestrado.; 2012.
- [52] Larson AC, Von Dreele RB. General Structure Analysis System (GSAS). Los Alamos National Laboratory 224 2004.
- [53] Coelho AA, Evans J, Evans I, Kern A, Parsons S. The TOPAS symbolic computation system. *Powder Diffraction*;26:S22-S25 2011.
- [54] Mccusker LB, Von Dreele RB, Cox DE, Louer D, Scardi P. Rietveld refinement guidelines. *Journal of Applied Crystallography*;32:36-50 1999.
- [55] Ionashiro M. Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial. . Araraquara-SP 2004.
- [56] Giron D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. *Thermochimica Acta*;248:1-59 1995.
- [57] Clas S-D, Dalton CR, Hancock BC. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical science & technology today (PSTT)*;2:311-20 1999.
- [58] Gill P, Moghadam TT, Ranjbar B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques* 21:167–93 2010.

- [59] Bernal C, Couto AB, Breviglieri ST, Cavalheiro ÉTG. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. *Química Nova*;25:849-55 2002.
- [60] De Araujo GLB. Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona. São Paulo: Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado.; 2009.
- [61] John MJ, Sabu T. *Nature Polymers.*: Royal Society of Chemistry; 2012.
- [62] Lopes WA, Fascio M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*;27:670-73 2004.
- [63] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* John Wiley e Sons, Inc. ed. New York 2005.
- [64] Fiorini EdJ. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: Campinas. UEd, editor. 2000. p. 44.
- [65] Graham Solomons TW, Fryhle CB. *Química Orgânica 1.* 7ª ed. ed 2001.
- [66] Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica.* 8ª . ed 2005.
- [67] Ferrão MF. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. *Tecno-lógica*;5:63-85 2001.
- [68] Kalinkova GN. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*;187:1-15 1999.
- [69] Knoll M. Aufladepotential und Sekundarremission elektronenbestrahlter Körper. *Z Tech Phys* 16:467-75 1935.
- [70] Maliska AM. *Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise.* Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC 2003. p. 98.
- [71] Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. *Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.* Porto Alegre 2007.
- [72] Egerton RF. *Physical principles of electron microscopy : an introduction to TEM, SEM, and AEM.* Canada. 2005.
- [73] Prado LD, Rocha HVA. Solid State in the Pharmaceutical Industry: A Brief Review. *Revista Virtual de Química*;7:2080-112 2015.
- [74] Rosa MF, Vilhena RO. Dissolução intrínseca: conceito e aplicações na indústria farmacêutica. *Revista Eletrônica de Farmácia*;IX:49 – 61 2012.

- [75] Yu LX, Carlin AS, Amidon GL, Hussain AS. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*;270:221-27 2004.
- [76] Viegas TX, Curatella RU, Van Winkle LL, Brinker G. Measurement of intrinsic drug dissolution rates using two types of apparatus. *Pharmaceutical Technology* 44-53 2001.
- [77] Issa MG, Ferraz HG. Intrinsic Dissolution as a Tool for Evaluating Drug Solubility in Accordance with the Biopharmaceutics Classification System. *Dissolution Technologies*;18:6-13 2011.
- [78] Larsson J. Methods for measurement of solubility and dissolution rate of sparingly soluble drugs. Sweden.: Lunds Universitet.; 2009.
- [79] Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*;12:413-20 1995.
- [80] Hulse WL, Gray J, Forbes RT. A discriminatory intrinsic dissolution study using UV area imaging analysis to gain additional insights into the dissolution behaviour of active pharmaceutical ingredients. *International Journal of Pharmaceutics*;434:133-39 2012.
- [81] Hartman P, Perdock WG. On the relations between structure and morphology of crystals. *Acta Crystallogr*;8 1955.
- [82] Hartman P, Bennema P. The attachment energy as a habit controlling factor. I. Theoretical considerations. *J Cryst Growth* 49:145 1980.
- [83] Docherty R, Clydesdale G, Roberts kJ, P. B. *J Phys D: Appl Phys*;24:89 1991.
- [84] Punzo F. Space Groups Complexity versus Molecular Interactions in Quinoline Derivatives Crystal Morphology Prediction: A Throughput Evaluation of Different *in Silico* Approaches. *Cryst Growth & Des*;11:3512-21 2011.
- [85] Costa FN, da Silva TF, Barroso RCR, Braz D, Barreiro EJ, Lima LM, Punzo F, Ferreira FF, Silva EMB. Structural feature evolution – from fluids to the solid phase – and crystal morphology study of LASSBio 1601: a cyclohexyl-N-acylhydrazone derivative. *RSC Advances*;5:39889 – 98. 2015.
- [86] Sato JAP, Costa FN, Da Rocha MD, Barreira EJ, Fraga CAM, Punzo F, Ferreira FF. Structural characterization of LASSBio-1289: a new vasoactive N-methyl-N-acylhydrazone derivative. *CrystEngComm*;17:165-73 2015.
- [87] Lombardo GM, Chiacchio U, Rescifina A, Bacchi A, Punzo F. A top-down approach to crystal engineering of a racemic Delta2-isoxazoline. . *Acta Cryst B*70:172–80 2014.

- [88] Lazo Fraga AR, Ferreira FF, Lombardo GM, Punzo F. Experimental and theoretical characterization of N-(diethylcarbamothioyl)benzamide triclinic polymorph. *J Mol Struct* 1047:1-8 2013.
- [89] Li Destri G, Marrazzo A, Rescifina A, Punzo F. Crystal morphologies and polymorphs in tolbutamide microcrystalline powder. *J Pharm Sci*;102:73-83 2013.
- [90] Li Destri G, Marrazzo A, Rescifina A, Punzo F. How Molecular Interactions Affect Crystal Morphology: The Case of Haloperidol. *J Pharm Sci*;100:4896-906 2011.
- [91] Barreiro EJ, Kummerle AE, Fraga CA. The methylation effect in medicinal chemistry. *Chemical Reviews*;111:5215-46 2011.
- [92] Wermuth CG, Bazzini P. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3<sup>a</sup> ed. San Diego 2008.
- [93] Do Amaral DN. Planejamento, síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos da combretastatina A4 (CA-4). . Rio de Janeiro.: Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado.; 2012.
- [94] Ibiapino AL, Ferreira FF, Trindade AC, Seiceira RC, Pitaluga JR A. Structural characterization of form I of anhydrous rifampicin. *CrystEngComm*;16:8555-62 2014.
- [95] Do Prado VM, Seiceira RC, Pitaluga JR A, Andrade-Filho T, Alves WA, Rocha AR, Ferreira FF. Elucidating the crystal structure of the antimalarial drug (±)-mefloquine hydrochloride: a tetragonal hydrated species. *Journal of Applied Crystallography*;47:1380-86 2014.
- [96] Amrita U. *Melting Point of an Organic Compound*. 2013.
- [97] Hart H, Craine LE, Hart DJ, Vinod TK. *Organic Chemistry: A Short Course*. 13th. ed. Boston: Houghton-Mifflin.; 2012.
- [98] K.H. T. *Principles of Soil Chemistry*. 3rd. ed 1998.
- [99] Mitra S. *Fundamentals Of Optical, Spectroscopic And X-Ray Mineralogy*. 2 ed: New Age Internacional; 1996.
- [100] Chauhan BS. *Engineering Chemistry*. 1ed ed: University Science Press; 2013.
- [101] Stuart B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* 2004.
- [102] Hartman P, Chan H-K. Application of the Periodic bond Chain (PBC) Theory and Attachment Energy Consideration to Derive of Crystal Morphology of Hexamethylmelamine. *Pharmaceutical Research*;10:1052-58 1993.
- [103] Maghsoodi M. Role of solvents in improvement of dissolution rate of drugs: crystal habit and crystal agglomeration. *Adv Pharm Bull*;5:13-18 2015.

## 9-Anexos

**Molécula estudada:** LASSBio-1773

**Sistema cristalino:** Ortorrômbico **Tipo de rede:** P (Primitiva)

**Parâmetros de rede:**  $a = 22,7370$  (6) Å;  $b = 10,6880$  (4) Å;  $c = 7,2519$  (2) Å;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

**Radiação:** Cu **Comprimento de onda:** 1,54056 Å

**2 $\theta$  inicial:** 6° e **2 $\theta$  final:** 89,985°

**Tabela 11: Coordenadas fracionárias (x, y, z) de todos os átomos da estrutura cristalina do composto LASSBio-1773.**

Átomos	x	y	z
N1	0,13813 (3)	0,23726 (7)	0,50522 (11)
S2	0,19910 (2)	0,31826 (3)	0,50401 (5)
N3	0,10739 (4)	0,23978 (9)	0,66982 (11)
C4	0,24810 (5)	0,25273 (13)	0,66380 (17)
O5	0,22298 (3)	0,29597 (8)	0,32144 (9)
O6	0,18445 (3)	0,44267 (6)	0,56534 (9)
C7	0,06559 (5)	0,15976 (11)	0,68133 (15)
C8	0,26516 (5)	0,32144 (11)	0,81718 (14)
C9	0,26943 (4)	0,13426 (9)	0,63188 (16)
C10	0,02714 (5)	0,15619 (13)	0,84554 (18)
C11	0,30486 (5)	0,27251 (10)	0,94318 (14)
C12	0,30989 (6)	0,08430 (11)	0,75466 (18)
C13	-0,01060 (5)	0,05478 (11)	0,87461 (16)
C14	0,03183 (4)	0,24897 (10)	0,97904 (16)
C15	0,32681 (5)	0,15262 (12)	0,91212 (15)
O16	0,33604 (3)	-0,03311 (7)	0,73815 (9)
C17	-0,04286 (4)	0,04682 (9)	1,03475 (15)
C18	-0,00167 (5)	0,24030 (11)	1,14025 (16)
O19	0,36552 (3)	0,09351 (6)	1,02541 (10)
C20	0,33028 (3)	-0,09636 (7)	0,56416 (13)

<b>C21</b>	-0,03886 (6)	0,13914 (12)	1,16746 (18)
<b>C22</b>	0,37873 (4)	0,15981 (8)	1,19102 (11)
<b>C23</b>	-0,07213 (5)	0,12953 (10)	1,34202 (15)
<b>O24</b>	-0,07542 (3)	0,21482 (6)	1,45200 (9)
<b>O25</b>	-0,10692 (3)	0,02868 (7)	1,35545 (10)
<b>C26</b>	-0,14010 (3)	0,02023 (7)	1,51948 (13)
<b>H27</b>	0,1292 (3)	0,1893 (7)	0,4110 (11)
<b>H28</b>	0,0519 (5)	0,1124 (1)	0,5740 (15)
<b>H29</b>	0,2489 (5)	0,4032 (12)	0,8354 (15)
<b>H30</b>	0,2596 (4)	0,0903 (9)	0,5193 (16)
<b>H31</b>	0,3152 (4)	0,3167 (10)	1,0480 (15)
<b>H32</b>	-0,0142 (5)	-0,0095 (11)	0,7802 (16)
<b>H33</b>	0,0575 (4)	0,3156 (11)	0,9661 (17)
<b>H34</b>	-0,0708 (4)	-0,0248 (9)	1,0488 (15)
<b>H35</b>	0,0009 (4)	0,3008 (12)	1,2367 (17)
<b>H36</b>	0,3440 (3)	-0,0446 (7)	0,4577 (13)
<b>H37</b>	0,3461 (3)	-0,1754 (7)	0,5562 (13)
<b>H38</b>	0,2857 (3)	-0,1065 (7)	0,5292 (13)
<b>H39</b>	0,3436 (4)	0,1722 (8)	1,2633 (12)
<b>H40</b>	0,4056 (4)	0,1078 (8)	1,2651 (12)
<b>H41</b>	0,3969 (4)	0,2359 (8)	1,1629 (12)
<b>H42</b>	-0,1720 (3)	0,0753 (7)	1,5270 (13)
<b>H43</b>	-0,1628 (3)	-0,0702 (7)	1,5239 (13)
<b>H44</b>	-0,1190 (3)	0,0154 (7)	1,6339 (13)

**Tabela 12: Algumas distâncias de ligação selecionadas para o composto LASSBio-1773.**

Átomos	Comprimento (Å)
N(1)- S(2)	1,631(8)
N(1)-N(3)	1,38(1)
S(2)-C(4)	1,75(1)
S(2)-O(5)	1,448(8)
S(2)-O(6)	1,442(7)
N(3)-C(7)	1,28(1)
C(4)-C(8)	1,39(2)
C(4)-C(9)	1,37(2)
C(7)-C(10)	1,48(2)
C(8)-C(11)	1,39(2)
C(9)-C(12)	1,39(2)
C(10)-C(13)	1,40(2)
C(10)-C(14)	1,39(2)
C(11)-C(15)	1,39(2)
C(12)-C(15)	1,40(2)
C(12)-O(16)	1,39(1)
C(13)-C(17)	1,38(2)
C(14)-C(18)	1,40(2)
C(15)-O(19)	1,36(1)
O(16)-C(20)	1,44(1)
C(17)-C(21)	1,38(2)
C(18)-C(21)	1,38(2)
O(19)-C(22)	1,42(1)
C(21)-C(23)	1,48(2)
C(23)-O(24)	1,21(1)
C(23)-O(25)	1,34(1)
O(25)-C(26)	1,41(1)

**Tabela 13: Alguns ângulos de ligação selecionados para o composto LASSBio-1773.**

Átomos	Ângulos (°)
S(2)-N(1)-N(3)	115,3(6)
N(1)-S(2)-C(4)	108,7(5)
N(1)-S(2)-O(5)	103,7(4)
N(1)-S(2)-O(6)	106,6(4)
C(4)-S(2)-O(5)	107,5(5)
C(4)-S(2)-O(6)	108,2(5)
O(5)-S(2)-O(6)	121,6(5)
N(1)-N(3)-C(7)	114,8(9)
S(2)-C(4)-C(8)	119,7(9)
S(2)-C(4)-C(9)	118,9(9)
C(8)-C(4)-C(9)	121(1)
N(3)-C(7)-C(10)	121(1)
C(4)-C(8)-C(11)	121(1)
C(4)-C(9)-C(12)	119(1)
C(7)-C(10)-C(13)	120(1)
C(7)-C(10)-C(14)	120(1)
C(13)-C(10)-C(14)	119(1)
C(8)-C(11)-C(15)	118(1)
C(9)-C(12)-C(15)	120(1)
C(9)-C(12)-O(16)	125(1)
C(15)-C(12)-O(16)	115(1)
C(10)-C(13)-C(17)	120(1)
C(10)-C(14)-C(18)	120(1)
C(11)-C(15)-C(12)	120(1)
C(11)-C(15)-O(19)	124(1)
C(12)-C(15)-O(19)	115(1)
C(12)-O(16)-C(20)	117,2(8)
C(13)-C(17)-C(21)	121(1)



C(14)-C(18)-C(21)	120(1)
C(15)-O(19)-C(22)	114,5(8)
C(17)-C(21)-C(18)	120(1)
C(17)-C(21)-C(23)	121(1)
C(18)-C(21)-C(23)	119(1)
C(21)-C(23)-O(24)	123(1)
C(21)-C(23)-O(25)	115(1)
O(24)-C(23)-O(25)	121(1)
C(23)-O(25)-C(26)	115,1(8)

**Tabela 14: Alguns ângulos de torção selecionados para o composto LASSBio-1773.**

Átomos	Ângulos (°)
N(3)-N(1)-S(2)-C(4)	64,0(8)
N(3)-N(1)-S(2)-O(5)	178,1(7)
N(3)-N(1)-S(2)-O(6)	-52,4(8)
S(2)-N(1)-N(3)-C(7)	-168,0(8)
N(1)-S(2)-C(4)-C(8)	-115(1)
N(1)-S(2)-C(4)-C(9)	66(1)
O(5)-S(2)-C(4)-C(8)	133(1)
O(5)-S(2)-C(4)-C(9)	-46(1)
O(6)-S(2)-C(4)-C(8)	0(1)
O(6)-S(2)-C(4)-C(9)	-178,9(9)
N(1)-N(3)-C(7)-C(10)	-177(1)
S(2)-C(4)-C(8)-C(11)	-178,6(9)
C(9)-C(4)-C(8)-C(11)	0(2)
S(2)-C(4)-C(9)-C(12)	177,6(9)
C(8)-C(4)-C(9)-C(12)	-1(2)
N(3)-C(7)-C(10)-C(13)	-168(1)
N(3)-C(7)-C(10)-C(14)	7(2)

C(4)-C(8)-C(11)-C(15)	-0(2)
C(4)-C(9)-C(12)-C(15)	2(2)
C(4)-C(9)-C(12)-O(16)	-179(1)
C(7)-C(10)-C(13)-C(17)	175(1)
C(14)-C(10)-C(13)-C(17)	-0(2)
C(7)-C(10)-C(14)-C(18)	-175(1)
C(13)-C(10)-C(14)-C(18)	-0(2)
C(8)-C(11)-C(15)-C(12)	1(2)
C(8)-C(11)-C(15)-O(19)	-180(1)
C(9)-C(12)-C(15)-C(11)	-2(2)
C(9)-C(12)-C(15)-O(19)	178(1)
O(16)-C(12)-C(15)-C(11)	179(1)
O(16)-C(12)-C(15)-O(19)	-1(2)
C(9)-C(12)-O(16)-C(20)	14(2)
C(15)-C(12)-O(16)-C(20)	-167,2(9)
C(10)-C(13)-C(17)-C(21)	1(2)
C(10)-C(14)-C(18)-C(21)	0(2)
C(11)-C(15)-O(19)-C(22)	5(1)
C(12)-C(15)-O(19)-C(22)	-175,3(9)
C(13)-C(17)-C(21)-C(18)	-1(2)
C(13)-C(17)-C(21)-C(23)	-178(1)
C(14)-C(18)-C(21)-C(17)	0(2)
C(14)-C(18)-C(21)-C(23)	178(1)
C(17)-C(21)-C(23)-O(24)	-171(1)
C(17)-C(21)-C(23)-O(25)	-2(2)
C(18)-C(21)-C(23)-O(24)	11(2)
C(18)-C(21)-C(23)-O(25)	180(1)
C(21)-C(23)-O(25)-C(26)	-178,6(9)
O(24)-C(23)-O(25)-C(26)	-10(1)

**Molécula estudada:** LASSBio-1774 monohidratado.

**Sistema cristalino:** Ortorrômico **Tipo de rede:** P (Primitiva)

**Parâmetros de rede:**  $a = 28,9030 (10) \text{ \AA}$ ;  $b = 15,0357 (3) \text{ \AA}$ ;  $c = 9,1476(1) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

**Radiação:** Cu **Comprimento de onda:**  $1,54056 \text{ \AA}$

**2 $\theta$  inicial:**  $5^\circ$  e **2 $\theta$  final:**  $90,050^\circ$

**Tabela 15: Coordenadas fracionárias (x, y, z) de todos os átomos da estrutura cristalina do composto LASSBio-1774 monohidratado.**

Átomos	x	y	z
O1	0,0153(9)	0,3992(19)	0,453(3)
H2	0,013(11)	0,335(14)	0,45(2)
H3	-0,014(9)	0,425(17)	0,44(3)
N4	0,2607(13)	0,293(2)	0,533(4)
S5	0,2944(5)	0,3769(8)	0,5793(14)
N6	0,2233(12)	0,318(2)	0,444(3)
C7	0,2657(8)	0,2051(19)	0,599(3)
C8	0,3277(18)	0,400(3)	0,422(5)
O9	0,3237(8)	0,3429(14)	0,693(3)
O10	0,2643(10)	0,4500(17)	0,6090(19)
C11	0,2025(13)	0,259(2)	0,368(3)
C12	0,3660(14)	0,347(2)	0,390(4)
C13	0,3123(13)	0,462(2)	0,322(4)
C14	0,1657(15)	0,283(3)	0,265(4)
C15	0,3902(16)	0,360(3)	0,262(5)
C16	0,3366(16)	0,476(2)	0,191(4)
C17	0,1608(14)	0,370(3)	0,214(4)
C18	0,1335(15)	0,220(2)	0,214(4)
C19	0,3757(15)	0,424(3)	0,162(4)
O20	0,4289(10)	0,3142(15)	0,221(2)
C21	0,1258(14)	0,392(3)	0,117(4)
C22	0,0988(13)	0,243(2)	0,117(3)

<b>O23</b>	0,4025(10)	0,4300(14)	0,042(2)
<b>C24</b>	0,4474(10)	0,2476(18)	0,317(3)
<b>C25</b>	0,0943(15)	0,330(3)	0,067(4)
<b>C26</b>	0,3928(10)	0,4958(18)	-0,067(3)
<b>C27</b>	0,0572(15)	0,355(3)	-0,038(4)
<b>O28</b>	0,0225(10)	0,3084(17)	-0,061(2)
<b>O29</b>	0,0610(8)	0,4399(17)	-0,085(3)
<b>C30</b>	0,0199(11)	0,4746(17)	-0,153(2)
<b>H31</b>	0,2555(8)	0,2121(19)	0,698(3)
<b>H32</b>	0,2970(8)	0,1831(19)	0,599(3)
<b>H33</b>	0,2461(8)	0,1631(19)	0,550(3)
<b>H34</b>	0,1985(13)	0,191(2)	0,407(3)
<b>H35</b>	0,3779(14)	0,301(2)	0,474(4)
<b>H36</b>	0,2803(13)	0,500(2)	0,336(4)
<b>H37</b>	0,3243(16)	0,522(2)	0,108(4)
<b>H38</b>	0,1897(14)	0,414(3)	0,242(4)
<b>H39</b>	0,1314(15)	0,154(2)	0,262(4)
<b>H40</b>	0,1283(14)	0,458(3)	0,066(4)
<b>H41</b>	0,0700(13)	0,199(2)	0,088(3)
<b>H42</b>	0,4225(10)	0,1929(18)	0,323(3)
<b>H43</b>	0,4801(10)	0,2249(18)	0,268(3)
<b>H44</b>	0,4536(10)	0,2767(18)	0,425(3)
<b>H45</b>	0,3914(10)	0,5542(18)	-0,025(3)
<b>H46</b>	0,4177(10)	0,4953(18)	-0,136(3)
<b>H47</b>	0,3641(10)	0,4823(18)	-0,115(3)
<b>H48</b>	-0,0042(11)	0,4540(17)	-0,096(2)
<b>H49</b>	0,0217(11)	0,5396(17)	-0,158(2)
<b>H50</b>	0,0186(11)	0,4525(17)	-0,252(2)

**Tabela 16: Algumas distâncias de ligação selecionadas para o composto LASSBio-1774.**

Átomos	Comprimento (Å)
O(1)-H(2)	1,0(2)
O(1)-H(3)	0,9(3)
N(4)-S(5)	1,65(4)
N(4)-N(6)	1,40(5)
N(4)-C(7)	1,46(4)
S(5)-C(8)	1,77(5)
S(5)-O(9)	1,44(3)
S(5)-O(10)	1,43(3)
N(6)-C(11)	1,28(4)
C(7)-H(31)	0,96(4)
C(7)-H(32)	0,96(3)
C(7)-H(33)	0,96(4)
C(8)-C(12)	1,39(6)
C(8)-C(13)	1,38(6)
C(11)-C(14)	1,47(5)
C(11)-H(34)	1,09(4)
C(12)-C(15)	1,38(6)
C(12)-H(35)	1,09(5)
C(13)-C(16)	1,40(5)
C(13)-H(36)	1,09(5)
C(14)-C(17)	1,40(6)
C(14)-C(18)	1,41(6)
C(15)-C(19)	1,39(6)
C(15)-O(20)	1,37(5)
C(16)-C(19)	1,40(6)
C(16)-H(37)	1,09(5)
C(17)-C(21)	1,39(6)

C(17)-H(38)	1,10(6)
C(18)-C(22)	1,38(5)
C(18)-H(39)	1,09(4)
C(19)-O(23)	1,35(4)
O(20)-C(24)	1,44(4)
C(21)-C(25)	1,38(6)
C(21)-H(40)	1,10(6)
C(22)-C(25)	1,39(5)
C(22)-H(41)	1,10(5)
O(23)-C(26)	1,43(3)
C(24)-H(42)	1,09(4)
C(24)-H(43)	1,10(4)
C(24)-H(44)	1,10(4)
C(25)-C(27)	1,49(6)
C(26)-H(45)	0,96(4)
C(26)-H(46)	0,96(4)
C(26)-H(47)	0,96(4)
C(27)-O(28)	1,24(5)
C(27)-O(29)	1,35(5)
O(29)-C(30)	1,44(4)
C(30)-H(48)	0,92(4)
C(30)-H(49)	0,98(4)
C(30)-H(50)	0,97(3)

**Tabela 17: Alguns ângulos de ligação selecionados para o composto LASSBio-1774.**

Átomos	Ângulos (°)
H(2)-O(1)-H(3)	110(22)
S(5)-N(4)-N(6)	113(3)
S(5)-N(4)-C(7)	122(3)
N(6)-N(4)-C(7)	124(3)
N(4)-S(5)-C(8)	105(2)
N(4)-S(5)-O(9)	105(2)
N(4)-S(5)-O(10)	106(2)
C(8)-S(5)-O(9)	110(2)
C(8)-S(5)-O(10)	110(2)
O(9)-S(5)-O(10)	120(2)
N(4)-N(6)-C(11)	119(3)
N(4)-C(7)-H(31)	105(3)
N(4)-C(7)-H(32)	114(3)
N(4)-C(7)-H(33)	110(3)
H(31)-C(7)-H(32)	109(3)
H(31)-C(7)-H(33)	109(3)
H(32)-C(7)-H(33)	109(3)
S(5)-C(8)-C(12)	119(3)
S(5)-C(8)-C(13)	120(3)
C(12)-C(8)-C(13)	120(4)
N(6)-C(11)-C(14)	121(3)
N(6)-C(11)-H(34)	122(3)
C(14)-C(11)-H(34)	111(3)
C(8)-C(12)-C(15)	120(4)
C(8)-C(12)-H(35)	118(4)
C(15)-C(12)-H(35)	122(4)
C(8)-C(13)-C(16)	120(4)
C(8)-C(13)-H(36)	123(4)

C(16)-C(13)-H(36)	116(4)
C(11)-C(14)-C(17)	121(4)
C(11)-C(14)-C(18)	122(3)
C(17)-C(14)-C(18)	117(4)
C(12)-C(15)-C(19)	120(4)
C(12)-C(15)-O(20)	125(4)
C(19)-C(15)-O(20)	114(4)
C(13)-C(15)-C(19)	119(3)
C(13)-C(16)-H(37)	122(4)
C(19)-C(16)-H(37)	119(4)
C(14)-C(17)-C(21)	121(4)
C(14)-C(17)-H(38)	114(4)
C(21)-C(17)-H(38)	124(4)
C(14)-C(18)-C(22)	122(3)
C(14)-C(18)-H(39)	121(4)
C(22)-C(18)-H(39)	117(4)
C(15)-C(19)-C(16)	120(4)
C(15)-C(19)-O(23)	114(4)
C(16)-C(19)-O(23)	126(4)
C(15)-O(20)-C(24)	119(3)
C(17)-C(21)-C(25)	122(4)
C(17)-C(21)-H(40)	116(4)
C(25)-C(21)-H(40)	121(4)
C(18)-C(22)-C(25)	121(3)
C(18)-C(22)-H(41)	124(3)
C(25)-C(22)-H(41)	115(3)
C(19)-O(23)-C(26)	120(3)
O(20)-C(24)-H(42)	108(3)
O(20)-C(24)-H(43)	107(3)
O(20)-C(24)-H(44)	110(3)



H(42)-C(24)-H(43)	111(3)
H(42)-C(24)-H(44)	111(3)
H(43)-C(24)-H(44)	111(3)
C(21)-C(25)-C(22)	118(4)
C(21)-C(25)-C(27)	121(4)
C(22)-C(25)-C(27)	121(4)
O(23)-C(26)-H(45)	111(3)
O(23)-C(26)-H(46)	108(3)
O(23)-C(26)-H(47)	110(3)
H(45)-C(26)-H(46)	108(4)
H(45)-C(26)-H(47)	110(4)
H(46)-C(26)-H(47)	110(4)
C(25)-C(27)-O(28)	123(4)
C(25)-C(27)-O(29)	113(3)
O(28)-C(27)-O(29)	123(4)
C(27)-O(29)-C(30)	114(3)
O(29)-C(30)-H(48)	105(3)
O(29)-C(30)-H(49)	110(3)
O(29)-C(30)-H(50)	108(3)
H(48)-C(30)-H(49)	114(3)
H(48)-C(30)-H(50)	113(3)
H(49)-C(30)-H(50)	108(3)

**Tabela 18: Alguns ângulos de torção selecionados para o composto LASSBio-1774.**

Átomos	Ângulos (°)
N(6)-N(4)-S(8)-C(8)	-76(3)
N(6)-N(4)-S(5)-O(9)	168(2)
N(6)-N(4)-S(5)-O(10)	40(3)
C(7)-N(4)-S(5)-C(8)	113(3)

C(7)-N(4)-S(5)-O(9)	-3(3)
C(7)-N(4)-S(5)-O(10)	-131(3)
S(5)-N(4)-N(6)-C(11)	161(3)
C(7)-N(4)-N(6)-C(11)	-29(5)
S(5)-N(4)-C(7)-H(31)	70(4)
S(5)-N(4)-C(7)-H(32)	-49(4)
S(5)-N(4)-C(7)-H(33)	-172(3)
N(6)-N(4)-C(7)-(31)	-100(4)
N(6)-N(4)-C(7)-H(32)	141(4)
N(6)-N(4)-C(7)-H(33)	18(5)
N(4)-S(5)-C(8)-C(12)	-80(4)
N(4)-S(5)-C(8)-C(13)	92(4)
O(9)-S(5)-C(8)-C(12)	33(4)
O(9)-S(5)-C(8)-C(13)	-156(3)
O(10)-S(5)-C(8)-C(12)	167(3)
O(10)-S(5)-C(8)-C(13)	-22(4)
N(4)-N(6)-C(11)-C(14)	-175(3)
N(4)-N(6)-C(11)-H(34)	34(5)
S(5)-C(8)-C(12)-C(15)	175(3)
S(5)-C(8)-C(12)-H(35)	-11(6)
C(13)-C(8)-C(12)-C(15)	4(6)
C(13)-C(8)-C(12)-H(35)	177(4)
S(5)-C(8)-C(13)-C(16)	-175(3)
S(5)-C(8)-C(13)-H(36)	2(6)
C(12)-C(8)-C(13)-C(16)	-4(6)
C(12)-C(8)-C(13)-H(36)	173(4)
N(6)-C(11)-C(14)-C(17)	19(6)
N(6)-C(11)-C(14)-C(18)	-161(4)
H(34)-C(11)-C(14)-C(17)	173(4)
H(34)-C(11)-C(14)-C(18)	-7(5)

C(8)-C(12)-C(15)-C(19)	-2(6)
C(8)-C(12)-C(15)-O(20)	178(4)
H(35)-C(12)-C(15)-C(19)	-175(4)
H(35)-C(12)-C(15)-O(20)	5(7)
C(8)-C(13)-C(16)-C(19)	2(6)
C(8)-C(13)-C(16)-H(37)	177(4)
H(36)-C(13)-C(16)-C(19)	-175(4)
H(36)-C(13)-C(16)-H(37)	-0(6)
C(11)-C(14)-C(17)-C(21)	-180(4)
C(11)-C(14)-C(17)-H(38)	10(6)
C(18)-C(14)-C(17)-C(21)	-0(6)
C(18)-C(14)-C(17)-H(38)	-170(4)
C(11)-C(14)-C(18)-C(22)	180(3)
C(11)-C(14)-C(18)-H(39)	10(6)
C(17)-C(14)-C(18)-C(22)	0(6)
C(17)-C(14)-C(18)-H(39)	-170(4)
C(12)-C(15)-C(19)-C(16)	0(6)
C(12)-C(15)-C(19)-O(23)	180(4)
O(20)-C(15)-C(19)-C(16)	-180(4)
O(20)-C(15)-C(19)-O(23)	-0(5)
C(12)-C(15)-O(20)-C(24)	-1(6)
C(19)-C(15)-O(20)-C(24)	179(3)
C(13)-C(16)-C(19)-C(15)	-0(6)
C(13)-C(16)-C(19)-O(23)	-180(4)
H(37)-C(16)-C(19)-C(15)	-175(4)
H(37)-C(16)-C(19)-O(23)	5(7)
C(14)-C(17)-C(21)-C(15)	0(6)
C(14)-C(17)-C(21)-H(40)	-169(4)
H(38)-C(17)-C(21)-C(25)	169(5)
H(38)-C(17)-C(21)-H(40)	1(7)

C(14)-C(18)-C(22)-C(25)	-0(6)
C(14)-C(18)-C(22)-H(41)	-170(4)
H(39)-C(18)-C(22)-C(25)	170(4)
H(39)-C(18)-C(22)-H(41)	0(6)
C(15)-C(19)-O(23)-C(26)	-177(3)
C(16)-C(19)-O(23)-C(26)	2(5)
C(15)-O(20)-C(24)-H(42)	67(4)
C(15)-O(20)-C(24)-H(43)	-174(3)
C(15)-O(20)-C(24)-H(44)	-54(4)
C(17)-C(21)-C(25)-C(22)	-0(6)
C(17)-C(21)-C(25)-C(27)	-180(4)
H(40)-C(21)-C(25)-C(22)	168(4)
H(40)-C(21)-C(25)-C(27)	-11(7)
C(18)-C(22)-C(25)-C(21)	0(6)
C(18)-C(22)-C(25)-C(27)	180(4)
H(41)-C(22)-C(25)-C(21)	171(4)
H(41)-C(22)-C(25)-C(27)	-10(6)
C(19)-O(23)-C(26)-H(45)	54(4)
C(19)-O(23)-C(26)-H(46)	172(3)
C(19)-O(23)-C(26)-H(47)	-68(4)
C(21)-C(25)-C(27)-O(28)	-163(4)
C(21)-C(25)-C(27)-O(29)	5(6)
C(22)-C(25)-C(27)-O(28)	17(6)
C(22)-C(25)-C(27)-O(29)	-174(3)
C(25)-C(27)-O(29)-C(30)	-164(3)
O(28)-C(27)-O(29)-C(30)	5(5)
C(27)-O(29)-C(30)-H(48)	41(4)
C(27)-O(29)-C(30)-H(49)	163(3)
C(27)-O(29)-C(30)-H(50)	-79(4)