

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

*Laysa Pires de Figueiredo*

***Caracterização físico-química e estudos de citotoxicidade das formas  
anidra e hidratada do fármaco antineoplásico  
LASSBio-1735 – um análogo da combretastatina A4***

**Santo André - SP  
2016**

*Laysa Pires de Figueiredo*

***Caracterização físico-química e estudos de citotoxicidade das formas  
anidra e hidratada do fármaco antineoplásico  
LASSBio-1735 – um análogo da combretastatina A4***

**Tese 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:** Thayza Pires de Aguiar

**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 Laysa Pires de Figueiredo, realizada em 12 de dezembro de 2016:

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) **Mariselma Ferreira** (UFABC) – Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) **Daniele Ribeiro de Araujo** (UFABC) – Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) **Leandro Ramos Souza Barbosa** (USP) – Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) **Luiz Fernando Grespan Setz** (UFABC) – Membro Titular

\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) **Derval dos Santos Rosa** (UFABC) – Membro Suplente

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

\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) **Elizabete Campos de Lima** (UFABC) – Membro Suplente

\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) **Ana Melva Champi Farfán** (UFABC) – Membro Suplente



Universidade Federal do ABC

*“Dedico carinhosamente essa tese a todos aqueles que lutam contra o câncer e as suas famílias, que participam da batalha sem medir esforços. Sei muito bem a dor que estão sentindo! Dedico esse trabalho em especial ao meu pai, que de forma corajosa está vivendo essa luta. Juntos somos mais fortes!”*

## Agradecimentos

A realização desta tese de Doutorado contou com o apoio, o estímulo e o carinho de muitas pessoas. Cada um, ao seu modo, contribuiu para que eu pudesse encontrar a força necessária para a conclusão deste trabalho. Dessa forma, aqui vai meu sincero agradecimento a todos que me ajudaram, de alguma forma, na realização do meu sonho.

Ao meu **Deus** todo poderoso que me sustentou e que muitas vezes recorri no decorrer deste trabalho. Fui muito feliz na escolha do meu tema e isso me motivou a cada dia na realização deste sonho. Toda honra e toda glória seja dada a ti meu Pai! Muito obrigada pelo amor incondicional e fidelidade para comigo.

Agradeço principalmente as três pessoas mais importantes da minha vida, **minha mãe Nelita, meu pai Arenor e meu irmão Arenor Junior**, porque, sem o apoio e a torcida de vocês nada disto teria dado certo e nada valeria a pena. Este trabalho não é meu, é nosso! Muito obrigada por me apoiarem e entenderem a minha ausência física em momentos tão difíceis.

Às minhas tias **Gil, Nana, Tieta e Zê**, à minha avó **Cinira** e aos meus tios **Elmo e Beto** pelo carinho, apoio e por sempre estarem presentes na minha vida e, principalmente, na dos meus pais, seja em situações alegres ou difíceis. Amo vocês e realmente formamos uma família!

Às minhas tias **Aldaíses e Adenir**, pelo carinho e pelas orações.

À minha querida amiga **Amanda**, por construirmos a verdadeira amizade e pelos momentos divertidos e inesquecíveis! A vida me mostrou com quem posso contar e você sabe que a recíproca é verdadeira.

À minha amada afilhada **Sofia**, por me proporcionar os mais belos e sinceros sorrisos.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Fabio Furlan Ferreira** por compartilhar os seus conhecimentos durante os 6 anos em que trabalhamos juntos. Muito obrigada pelo apoio e compreensão quando mais precisei! Serei eternamente grata.

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, por cederem gentilmente as amostras avaliadas neste trabalho. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. **Tiago Rodrigues** e sua aluna de Mestrado **Leticia Silva Ferraz** do Laboratório de Prospecção e Caracterização de Bioativos da UFABC, por terem realizado os ensaios biológicos.

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

À **Central Experimental Multiusuário (CEM)** da UFBAC por ceder excelentes equipamentos para a realização das medidas de análise térmica (DSC e TG).

Ao programa de **Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados** pela infraestrutura fornecida, que foram cruciais para o desenvolvimento do meu projeto de Doutorado.

Muito obrigada à **CAPES** pela bolsa de Doutorado fornecida, à **FAPESP** e ao **CNPq** pelos recursos financeiros do projeto de pesquisa.

*“Quando as pessoas se unem, a fé aumenta, a dor diminui, a esperança aparece e o amor resplandece.”*

Autor desconhecido.



## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>xvi</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas.....</b>	<b>xvii</b>
<b>1 - Introdução.....</b>	<b>18</b>
<b>2 - Mas afinal, o que é o câncer?.....</b>	<b>19</b>
2.1 - Classificação das neoplasias .....	20
2.2 - Ações eficientes para o controle do câncer .....	21
2.2.1 - Principais causas de câncer.....	22
2.3 - Tratamentos convencionais: as principais formas de tratamento.....	24
2.4 - A combretastatina e o tratamento do câncer .....	27
2.4.1 - Fármaco antineoplásico LASSBio-1735 – um análogo da CA-4.....	32
<b>3 - Técnicas empregadas na caracterização do análogo da CA-4: LASSBio-1735.....</b>	<b>35</b>
3.1 - Introdução à Cristalografia & Difração de raios X.....	35
3.1.1 - A descoberta dos raios X.....	39
3.1.2 - Como os raios X são produzidos .....	40
3.1.3 - A difração de raios X por policristais (DRXP) e a Lei de Bragg .....	41
3.1.4 - O programa <i>DASH</i> como uma importante ferramenta para a determinação da estrutura cristalina a partir de dados de DRXP .....	43
3.2 - O método de Rietveld .....	47
3.2.1 - Aplicação do método de Rietveld para análise quantitativa de fases .....	50
3.3 - Análise Térmica .....	52
3.3.1 - Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	52
3.3.2 - Considerações gerais para interpretação dos parâmetros obtidos por DSC .....	54
3.3.3 - Termogravimetria (TG) .....	54
3.4 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho .....	55
3.4.1 - Modos vibracionais e o espectro de absorção .....	56
3.4.2 - Refletância Total Atenuada (ATR).....	59
3.5 - Velocidade de dissolução intrínseca .....	59
3.6 - Estudos de citotoxicidade.....	60
<b>4 - Objetivos .....</b>	<b>62</b>
4.1 - Objetivos gerais.....	62
4.2 - Objetivos específicos .....	62

<b>5 - Parte experimental.....</b>	<b>63</b>
5.1 - Materiais.....	63
5.2 - Condições experimentais das medidas.....	64
5.2.1 - Difração de raios X por policristais (DRXP) .....	64
5.2.2 – Análise Térmica .....	64
5.2.3 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	65
5.2.4 - Ensaio de dissolução intrínseca .....	65
5.3 - Ensaio biológico.....	65
5.3.1 – Cultura de células.....	65
5.3.2 - Determinação da atividade citotóxica .....	66
<b>6 - Resultados e Discussões.....</b>	<b>67</b>
6.1 - Fármaco antineoplásico: LASSBio-1735.....	67
6.1.1 – Análise térmica - LASSBio-1735.....	72
6.1.2 - Obtenção do espectro de infravermelho do LASSBio - 1735 .....	75
6.2 - Obtenção do espectro de infravermelho do LASSBio-1735 anidro .....	76
6.2.1 - DSC - LASSBio-1735 anidro .....	77
6.2.2 - Descrição da estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro.....	81
6.3 - Determinação estrutural do LASSBio-1735 di-hidratado.....	85
6.3.1 - Descrição da estrutura cristalina do LASSBio-1735 di-hidratado .....	87
6.4 - LASSBio-1735 – 2º lote .....	94
6.5 – Considerações acerca de algumas diferenças entre as moléculas LASSBio-1586, LASSBio-1735 di-hidratado e LASSBio-1735 anidro .....	97
6.5.1 – Avaliação da atividade citotóxica das diferentes formas do análogo da CA-4: LASSBio-1735 anidro e LASSBio-1735 di-hidratado .....	99
6.5.2 – Determinação da velocidade de dissolução intrínseca das diferentes formas do análogo da CA-4: LASSBio-1735 anidro e LASSBio-1735 di-hidratado .....	103
<b>7 - Conclusões.....</b>	<b>106</b>
<b>8 – Referências Bibliográficas .....</b>	<b>107</b>
<b>9 – Anexos.....</b>	<b>114</b>

## Resumo

Atualmente, o câncer é um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica. É bem sabido que a combretastatina A4 (CA-4), que é isolada a partir das cascas da árvore sul-africana, cujo nome científico é *Combretum caffrum*, é utilizada para inibir a angiogênese, que consiste no crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes. No entanto, dependendo da dose administrada ao paciente, a CA-4 pode causar alguns efeitos colaterais. Aqui, será apresentada a caracterização físico-química de um novo derivado *N*-acilidrazônico - LASSBio-1735 - um análogo da CA-4. O LASSBio-1735 foi avaliado quanto a seus efeitos citotóxicos, por ensaios de MTT, frente às linhagens tumorais HL-60 (leucemia humana), SF-295 (glioblastoma humano), MDA-MB435 (melanoma) e HCT-8 (carcinoma ileocecal – cólon), apresentando resultados promissores. Pudemos determinar com êxito as estruturas cristalinas - utilizando dados de difração de raios X por policristais e um procedimento de *simulated annealing* - das formas anidra e di-hidratada do composto sintetizado. Foi observado que os compostos cristalizaram em sistemas cristalinos ortorrômbicos, porém em distintos grupos espaciais. A forma anidra cristalizou no grupo espacial  $Pna2_1$  e a forma hidratada no grupo espacial  $P2_12_12_1$ . Os efeitos sobre a viabilidade celular das formas anidra e di-hidratada do LASSBio-1735 foram comparativamente avaliados em diferentes linhagens tumorais e a forma di-hidratada exibiu maior citotoxicidade frente a linhagem tumoral K562 (leucemia mieloide crônica). Os resultados de velocidade de dissolução intrínseca levaram-nos a classificar o LASSBio-1735 em suas diferentes formas como um fármaco de baixa solubilidade, tendo sido observado um ligeiro aumento da solubilidade da forma anidra quando comparada a forma di-hidratada.

**Palavras-chave:** combretastatina A4, câncer, difração de raios X por policristais, determinação estrutural, viabilidade celular, velocidade de dissolução intrínseca.

## Abstract

Currently, cancer is one of the most complex public health problems faced by the Brazilian health system, given its epidemiological, social and economic magnitudes. It is well known that combretastatin A4 (CA-4), which is isolated from *Combretum caffrum*, is used to inhibit angiogenesis, which is related to the growth of new blood vessels from the existing ones. However, depending on the dose administered to the patient, it can cause some side-effects. Herein, we present the physicochemical characterization of a novel *N*-acylhydrazone derivative – LASSBio-1735 – a CA-4 analogue. LASSBio-1735 was evaluated for its cytotoxic effects, using MTT assays, against HL-60 (human leukemia), SF-295 (human glioblastoma), MDA-MB435 (melanoma) and HCT-8 (ileocecal adenocarcinoma) tumor cells, showing promising results. We could successfully determine the crystal structures – by using X-ray powder diffraction data and a simulated annealing procedure – of the anhydrous and hydrated forms of the as-synthesized compound. Both compounds crystallized in orthorhombic crystal systems but under different space groups. The anhydrous form crystallized in the  $Pna2_1$  while the hydrated one in the  $P2_12_12_1$  space groups. The effects on cell viability of anhydrous and dihydrated forms of LASSBio-1735 were comparatively evaluated in different tumor cell lines, and the dihydrated form exhibited higher cytotoxicity against the K562 (human chronic myeloid leukemia) tumor cell line. The results of intrinsic dissolution rate lead us to classify LASSBio-1735 in its different forms as a pharmaceutical candidate with low solubility; however, a slight solubility increase of the anhydrous form when compared to the dihydrated one was found.

**Keywords:** combretastatin A4, cancer, X-ray powder diffraction, structure determination, cell viability, intrinsic dissolution rate.

## Lista de Figuras

<i>Figura 1 - Mapa do Brasil dividindo as cinco regiões em que são mostrados que para o ano de 2016 são estimados 596 mil casos novos de câncer em todo o país.</i>	18
<i>Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes por sexo, exceto pele não melanoma* [2].</i>	19
<i>Figura 3 – Representação esquemática de crescimento de massa tumoral.</i>	20
<i>Figura 4 – Diferenças entre tipos de tumores.</i>	21
<i>Figura 5 – Estatística sobre as principais causas de câncer.</i>	22
<i>Figura 6 – Esquema da atuação da combretastatina.</i>	28
<i>Figura 7 – Número de artigos publicados com a palavra-chave “combretastatin”.</i>	30
<i>Figura 8 – Subunidades que constituem a CA-4.</i>	31
<i>Figura 9 – Estrutura química do LASSBio-1586. Em destaque estão os anéis A (em azul) e B (em verde), isto é, evidenciando as subunidades que constituem a CA-4.</i>	32
<i>Figura 10 – Estrutura química do análogo obtido (derivado N-metilado - LASSBio-1735) a partir do LASSBio – 1586.</i>	33
<i>Figura 11 – Representação bidimensional (a) de uma rede cristalina, onde se observa uma distribuição ordenada de átomos; (b) de uma rede semicristalina contendo regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas e (c) de uma rede não cristalina (amorfa).</i>	35
<i>Figura 12 – Representação de uma cela unitária.</i>	36
<i>Figura 13 - Espectro de ondas eletromagnéticas destacando a região dos raios X em cinza.</i>	40
<i>Figura 14 - Produção de raios X a nível atômico.</i>	41
<i>Figura 15 – Lei de Bragg. A diferença de caminho do raio que passa pelo ponto P em relação ao que passa pelo ponto O deve ser igual a um número inteiro de comprimento de onda. A difração de raios X ocorre em uma estrutura cristalina quando a lei de Bragg é satisfeita.</i>	42
<i>Figura 16 – Difratoograma de raios X do LASSBio-1735 anidro extraído do software Topas Academic v.5 [47] mostrando a intensidade (contagens) versus posição (2 teta (graus)) dos picos de difração.</i>	44
<i>Figura 17 – Etapas para a determinação estrutural.</i>	44
<i>Figura 18 – Componentes do gráfico de Rietveld, com o difratograma calculado (linha contínua vermelha); observado (o em preto); radiação de fundo ou background (linha contínua verde); a diferença entre o observado e o calculado (linha contínua azul) e o pico de Bragg (barra vertical magenta).</i>	48
<i>Figura 19 - Refinamento de Rietveld da celulose microcristalina PH-102 com a adição do padrão interno (alumina). Nota-se claramente que a alumina foi escolhida como padrão interno, principalmente, pelo fato de não apresentar picos com sobreposições aos picos de maior intensidade do excipiente em estudo.</i>	51
<i>Figura 20 – Curva genérica para um experimento de DSC; I) mudança de linha de base sem pico; II e III) picos endotérmicos; IV) pico exotérmico.</i>	53
<i>Figura 21 – Curvas TG/DTG da lactose monohidratada, evidenciando quatro eventos de perda de massa.</i>	55
<i>Figura 22 – Espectro de FTIR da celulose microcristalina PH-101 (expresso em transmitância).</i>	57
<i>Figura 23 – Espectro de FTIR da celulose microcristalina PH-101 (expresso em absorbância).</i>	57
<i>Figura 24 – (A) Tipos de estiramento: (a) simétrico (b) assimétrico (B) Tipos de deformações angulares: (a) simétrica no plano, (b) assimétrica no plano, (c) simétrica fora do plano e (d) assimétrica fora do plano. Os sinais + e - indicam que o movimento é perpendicular ao plano da página.</i>	58
<i>Figura 25 – Difratoograma de raios X do LASSBio-1735, obtido na faixa angular de 3° a 60° (2θ), com passo angular de 0,015° e tempo de integração de 180 segundos a cada 1,05°. O fármaco foi acondicionado em capilar de vidro de 0,5 mm de diâmetro.</i>	68
<i>Figura 26 – Região ampliada (5 a 30° em 2θ) do refinamento de Rietveld obtido da primeira tentativa de determinação da estrutura cristalina do LASSBio-1735. O padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado por linhas vermelhas, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições do pico de Bragg pelas barras rosas. Nota-se a falta de concordância de algumas reflexões, entre os padrões observado e calculado, mostrando que não se obteve uma boa resolução da estrutura cristalina utilizando esses dados experimentais.</i>	70

Figura 27 – Empacotamento parcial da cela unitária do LASSBio-1735 ao longo do eixo c. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinza escuras), oxigênio (esferas vermelha), nitrogênio (esferas azul claras), hidrogênio (esferas cinza claras) e voids (canais azuis).	71
Figura 28 – Curva de DSC do LASSBio-1735, obtida a $2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de $\text{N}_2$ ( $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ).	73
Figura 29 - Curvas TG (linha preta)/DTG (linha vermelha) do LASSBio-1735, obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de $\text{O}_2$ ( $60\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), com massa do fármaco de aproximadamente 11 mg.	74
Figura 30 – Espectro de FTIR do LASSBio-1735, obtido com resolução de $4\text{ cm}^{-1}$ na região de $4000$ a $650\text{ cm}^{-1}$ , em que as principais bandas de absorção que caracterizam a molécula estão destacadas por suas respectivas frequências. A região enfatizada pelo retângulo indica a presença de bandas de interesse para a determinação estrutural da molécula.	75
Figura 31 – Espectros de FTIR do LASSBio-1735 e LASSBio-1735 anidro, obtidos com resolução de $4\text{ cm}^{-1}$ na região de $4000$ a $650\text{ cm}^{-1}$ .	77
Figura 32 - Curva de DSC do LASSBio-1735 anidro, obtida a $2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de $\text{N}_2$ ( $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ).	78
Figura 33 – Comparação entre os difratogramas de raios X normalizados do fármaco LASSBio-1735 (em preto) e do LASSBio-1735 anidro (em vermelho).	79
Figura 34 – Região ampliada ( $5$ a $30^{\circ}$ em $2\theta$ ) enfatizando as diferenças entre os difratogramas de raios X normalizados do fármaco LASSBio-1735 (em preto) e do LASSBio-1735 anidro (em vermelho).	79
Figura 35 – Estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro, com seus respectivos átomos, devidamente enumerados na posição em que os átomos estão dispostos na molécula. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinzas), hidrogênio (esferas cinza claras), oxigênio (esferas vermelhas) e nitrogênio (esferas azuis).	81
Figura 36 – Empacotamento da cela unitária ( $Z = 4$ ) do LASSBio-1735 anidro ao longo do eixo c. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinza escuras), hidrogênio (esferas cinza claras), oxigênio (esferas vermelhas) e nitrogênio (esferas azuis claras). Vale a pena mencionar a ausência de interações de hidrogênio entre as moléculas.	82
Figura 37 – Refinamento de Rietveld para o LASSBio-1735 anidro, em que o padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado por linhas vermelhas, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições do pico de Bragg pelas barras rosas.	83
Figura 38 – Comparação entre os volumes das celas unitárias (a) do LASSBio-1735 anidro e (b) do fármaco LASSBio-1735. É possível visualizar a diferença entre os volumes das celas unitárias, que é de aproximadamente $218\text{ \AA}^3$ , sendo este volume ocupado pelos voids.	85
Figura 39 – Estrutura cristalina do LASSBio-1735 di-hidratado, com seus respectivos átomos, devidamente enumerados na posição em que os átomos estão dispostos na molécula. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinza escuras), hidrogênio (esferas cinza claras), oxigênio (esferas vermelhas), nitrogênio (esferas azuis claras) e moléculas de água [hidrogênio (esferas cinza claras) e oxigênio (esferas vermelhas)].	87
Figura 40 – Empacotamento da cela unitária ( $Z = 4$ ) do LASSBio-1735 di-hidratado, ao longo do eixo c. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinza escuras), oxigênio (esferas vermelha), nitrogênio (esferas azul claras) e hidrogênio (esferas cinza escuras). Vale a pena mencionar a presença de interações de hidrogênio entre as moléculas.	88
Figura 41 – Empacotamento da cela unitária do LASSBio-1735 di-hidratado ao longo do eixo c (a) e ao longo do eixo b (b) mostrando os canais ao longo da estrutura, onde as moléculas de água estão acomodadas.	89
Figura 42 – Sobreposição das moléculas LASSBio-1735 anidro (em verde) e LASSBio-1735 di-hidratado (em amarelo) mostrando que além das moléculas se diferirem quanto à presença de duas moléculas de água, são também perceptíveis diferenças conformacionais entre ambas.	90
Figura 43 – Refinamento de Rietveld para o LASSBio-1735 di-hidratado, em que o padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado por linhas vermelhas, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições do pico de Bragg pelas barras rosas.	91
Figura 44 – Região ampliada ( $5$ a $35^{\circ}$ em $2\theta$ ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1735 (a) sem levar em conta as moléculas de água e (b) com as moléculas de água no interior da cela unitária. A falta de acordo em algumas reflexões é evidente quando não se considera as moléculas de água, no caso mostrado em (a). (c)	

<i>mostra o arranjo da estrutura cristalina evidenciando alguns espaços vazios (canais azuis) e (d) as interações de hidrogênio entre a água e a molécula do LASSBio-1735 na estrutura correta.</i>	93
<i>Figura 45 – Região ampliada (5 a 30° em 2θ) enfatizando as diferenças entre os difratogramas de raios X LASSBio-1735 di-hidratado (em preto), LASSBio-1735 – 2º lote (em vermelho) e do LASSBio-1735 anidro (em azul).</i>	94
<i>Figura 46 – Refinamento de Rietveld do LASSBio-1735 – 2º lote mostrando uma mistura de fases, sendo a fase majoritária a anidra.</i>	96
<i>Figura 47 – Obtenção do derivado N-metilado - LASSBio-1735.</i>	97
<i>Figura 48 - Citotoxicidade das formas anidra e di-hidratada do LASSBio-1735 frente a várias linhagens tumorais. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, considerando o controle (ausência de composto) como 100% de viabilidade. As curvas de concentração foram realizadas de 0,01 a 10 µM. Os dados são apresentados como (média ± desvio padrão) de três experiências independentes realizadas em duplicata.</i>	100
<i>Figura 49 - Citotoxicidade das formas anidra (mostrado em vermelho) e di-hidratada (mostrado em preto) do LASSBio-1735 frente a linhagem tumoral HL-60. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (gráfico A) e exclusão do azul de tripano (gráfico B), considerando o controle (ausência de composto) como 100% de viabilidade. Os dados são apresentados como (média ± desvio padrão) de três experiências independentes realizadas em duplicata.</i>	101
<i>Figura 50 - Citotoxicidade das formas anidra (mostrado em vermelho) e di-hidratada (mostrado em preto) do LASSBio-1735 frente a diversas linhagens tumorais. A concentração utilizada foi de 5 µM. Os dados são apresentados como (média ± desvio padrão) de três experiências independentes realizadas em duplicata.</i>	102
<i>Figura 51 - Citotoxicidade das formas anidra (mostrado em vermelho) e di-hidratada (mostrado em preto) do LASSBio-1735 frente a linhagem tumoral K562. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT e as curvas de concentração foram realizadas de 0,01 a 10 µM. Os dados são apresentados como (média ± desvio padrão) de três experiências independentes realizadas em duplicata.</i>	102
<i>Figura 52 - Regressão linear dos pontos da quantidade dissolvida (mg) pelo tempo de coleta (min) para obtenção da velocidade de dissolução do LASSBio-1735 di-hidratado.</i>	103
<i>Figura 53 - Regressão linear dos pontos da quantidade dissolvida (mg) pelo tempo de coleta (min) para obtenção da velocidade de dissolução do LASSBio-1735 anidro.</i>	104
<i>Figura 54 - Gráfico comparativo entre perfis de dissolução intrínseca das formas anidra (círculos vermelhos) e di-hidratada (retângulos pretos) do LASSBio-1735.</i>	105

## Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 – Comparativo das características dos sistemas cristalinos das redes de Bravais [32].</i>	37
<i>Tabela 2 – Representação dos setes sistemas cristalinos com seus respectivos números de grupos espaciais [35].</i>	38
<i>Tabela 3 – Principais características (fórmula molecular, composição percentual e massa molecular) do LASSBio-1735.</i>	63
<i>Tabela 4 – Parâmetros obtidos (software TA Universal Analysis) da curva de DSC para o LASSBio-1735.</i>	73
<i>Tabela 5 – Detalhes do refinamento de Rietveld da estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro.</i>	84
<i>Tabela 6 – Interações de hidrogênio para o LASSBio-1735 di-hidratado. “D” e “A” são, respectivamente, o átomo doador e receptor de ligação de hidrogênio.</i>	89
<i>Tabela 7 – Detalhes do refinamento de Rietveld das estruturas cristalinas do LASSBio-1735 di-hidratado e anidro.</i>	92
<i>Tabela 8 – Detalhes do refinamento de Rietveld do LASSBio-1735 – 2º lote.</i>	95
<i>Tabela 9 - Coordenadas fracionárias x y z de todos os átomos da estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro.</i>	114
<i>Tabela 10 – Algumas distâncias de ligação selecionadas para o LASSBio-1735 anidro.</i>	115
<i>Tabela 11 – Alguns ângulos de ligação selecionados para o LASSBio-1735 anidro.</i>	116
<i>Tabela 12 – Alguns ângulos de torção selecionados para o LASSBio-1735 anidro.</i>	117
<i>Tabela 13 - Coordenadas fracionárias (x y z) de todos os átomos da estrutura cristalina do LASSBio-1735 di-hidratado.</i>	119
<i>Tabela 14 – Algumas distâncias de ligação selecionadas para o LASSBio-1735 di-hidratado.</i>	120
<i>Tabela 15 – Alguns ângulos de ligação selecionados para o LASSBio-1735 di-hidratado.</i>	121
<i>Tabela 16 – Alguns ângulos de torção selecionados para o LASSBio-1735 di-hidratado.</i>	122



## Lista de abreviaturas e siglas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CA-4 – Combretastatina A4

CEM – Central Experimental Multiusuário

CIF – *Crystallographic Information Framework*

DRXP – Difração de raios X por policristais

DSC – *Differential Scanning Calorimetry*

DTG – Derivada primeira da curva de termogravimetria

FDA – *Food and Drug Administration*

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GSAS – *General Structure Analysis System*

HPV – Papilomavírus humano

ICTAC – *International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry*

IC<sub>50</sub> – Concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular

IUCr – *International Union of Crystallography*

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

LCCEM – Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

OMS – Organização Mundial da Saúde

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

TG – *Thermogravimetry*

UFABC – Universidade Federal do ABC

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

VDI – Velocidade de dissolução intrínseca

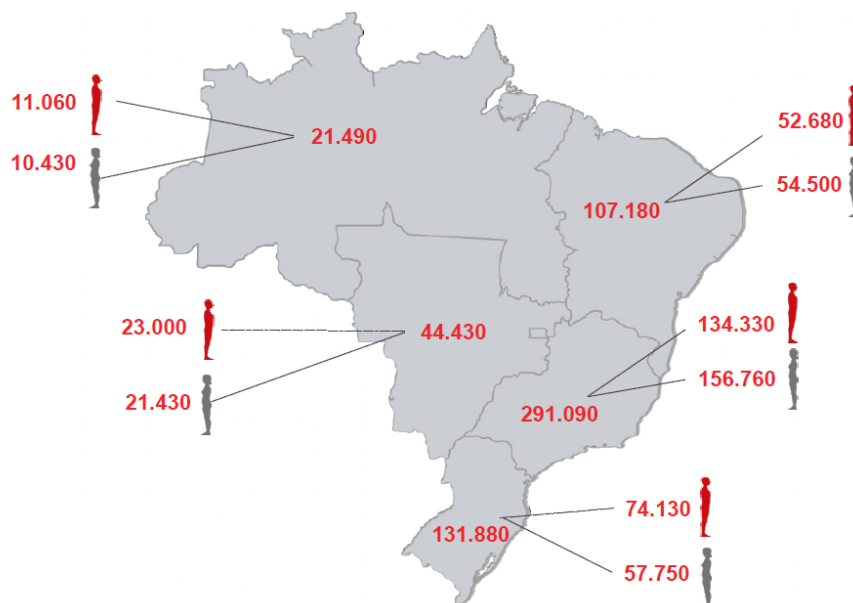
***\* As siglas em inglês foram mantidas nesse trabalho por serem usadas e reconhecidas internacionalmente.***

## 1 - Introdução

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Na verdade, o câncer não é uma doença nova. Conhecido há muitos séculos, foi amplamente considerado como uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem sofrendo modificações, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, em especial aqueles com poucos e médios recursos [1].

No Brasil, a estimativa para o ano de 2016, que será válida também para o ano de 2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 596 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país, como pode ser visto na Figura 1 [2].

**Figura 1 - Mapa do Brasil dividindo as cinco regiões em que são mostrados que para o ano de 2016 são estimados 596 mil casos novos de câncer em todo o país.**



Fonte: Extraído do endereço eletrônico: [\[http://www.inca.gov.br/dncc\]](http://www.inca.gov.br/dncc).

Dentre todos os tipos de câncer, estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (176 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos cânceres de próstata (61 mil), mama feminina (58 mil), entre outros, conforme mostrado na Figura 2.

**Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes por sexo, exceto pele não melanoma\* [2].**



\* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

**Fonte:** Ilustração elaborada pela autora.

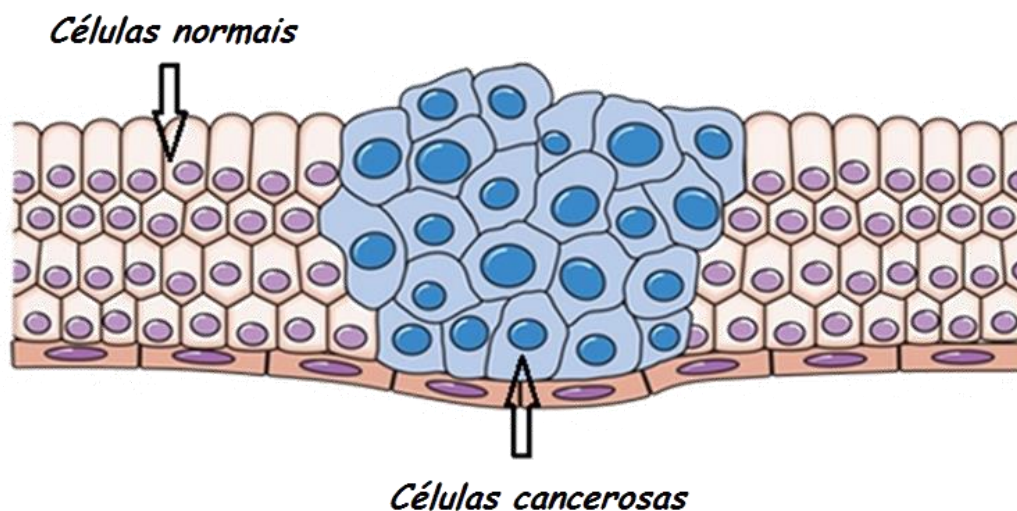
Diante de fatos tão alarmantes, é incontestável que o câncer é hoje, no Brasil, um problema de saúde pública, e o estudo de novos fármacos que possibilitem uma maior eficácia no tratamento dessa doença é de fundamental importância.

## **2 - Mas afinal, o que é o câncer?**

A palavra câncer vem do grego *karkínos*, cujo significado é caranguejo [3], uma alusão às patas do crustáceo e a sua capacidade de infiltrar-se e invadir várias áreas, o que é uma grande semelhança entre o câncer e o caranguejo. Essa palavra foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 a.C.

Atualmente, o termo câncer é empregado para designar mais de uma centena de diferentes doenças, que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células (Figura 3) que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos [4].

**Figura 3 – Representação esquemática de crescimento de massa tumoral.**



Fonte: Adaptado do endereço eletrônico: [<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>].

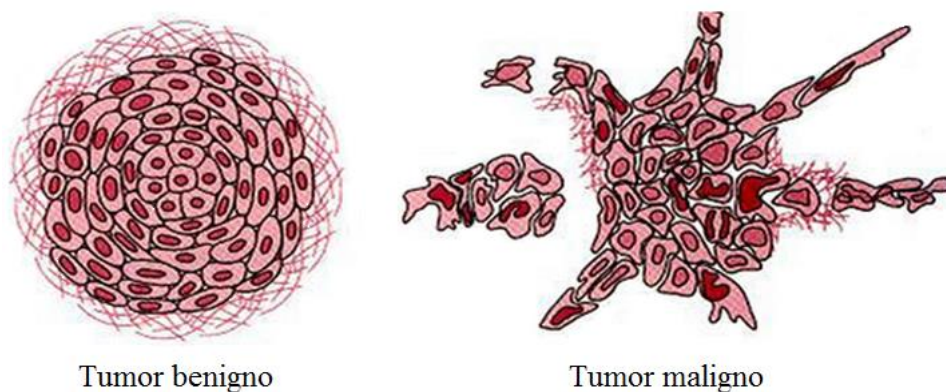
O crescimento das células cancerosas se difere do crescimento das células normais. Essas últimas, que formam os tecidos do corpo humano, são capazes de se multiplicar por meio de um processo contínuo, que é natural. A maioria das células normais cresce, multiplica-se e morre de maneira ordenada. Entretanto, nem todas as células normais são iguais: algumas nunca se dividem, como os neurônios; outras – as células do tecido epitelial – dividem-se de forma rápida e contínua. As células cancerosas, por outro lado, em vez de morrerem, continuam crescendo descontroladamente, formando outras novas células anormais. Diversos organismos vivos podem apresentar, em algum momento da vida, anormalidade no crescimento celular – as células se dividem de forma rápida, agressiva e incontrolável, espalhando-se para outras regiões do corpo – acarretando transtornos funcionais. O câncer é um desses transtornos [1].

## **2.1 - Classificação das neoplasias**

A neoplasia consiste em uma proliferação anormal do tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação, com efeitos

agressivos sobre o homem. De acordo com o comportamento biológico [5], as neoplasias são divididas em benignas e malignas (Figura 4). Uma das etapas mais importantes do estudo das neoplasias é estabelecer esta diferença, o que constitui um grande desafio para o tratamento de cânceres.

**Figura 4 – Diferenças entre tipos de tumores.**



**Fonte:** Adaptado da referência [1].

As neoplasias benignas ou tumores benignos têm seu crescimento de forma organizada, geralmente lento, expansivo e apresentam limites bem nítidos. Apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes. O lipoma (que tem origem no tecido gorduroso), o mioma (que tem origem no tecido muscular liso) e o adenoma (tumor benigno das glândulas) são exemplos de tumores benignos [5].

As neoplasias malignas ou tumores malignos manifestam um maior grau de autonomia e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases (quando o câncer se encontra num determinado órgão diferente daquele de onde se iniciou), podendo ser resistentes ao tratamento e causar a morte do hospedeiro. O câncer é classificado como uma neoplasia maligna [5].

## **2.2 - Ações eficientes para o controle do câncer**

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 40% das mortes por câncer poderiam ser evitadas, o que faz da prevenção um componente essencial de todos os planos de controle do câncer [1].

Uma vez que o câncer é uma doença cujo processo tem início com um dano a um gene ou a um grupo de genes de uma célula e progride quando os mecanismos do sistema imunológico de reparação ou destruição celular falham, a pergunta que cabe então é: quais fatores podem contribuir para o desenvolvimento do câncer?

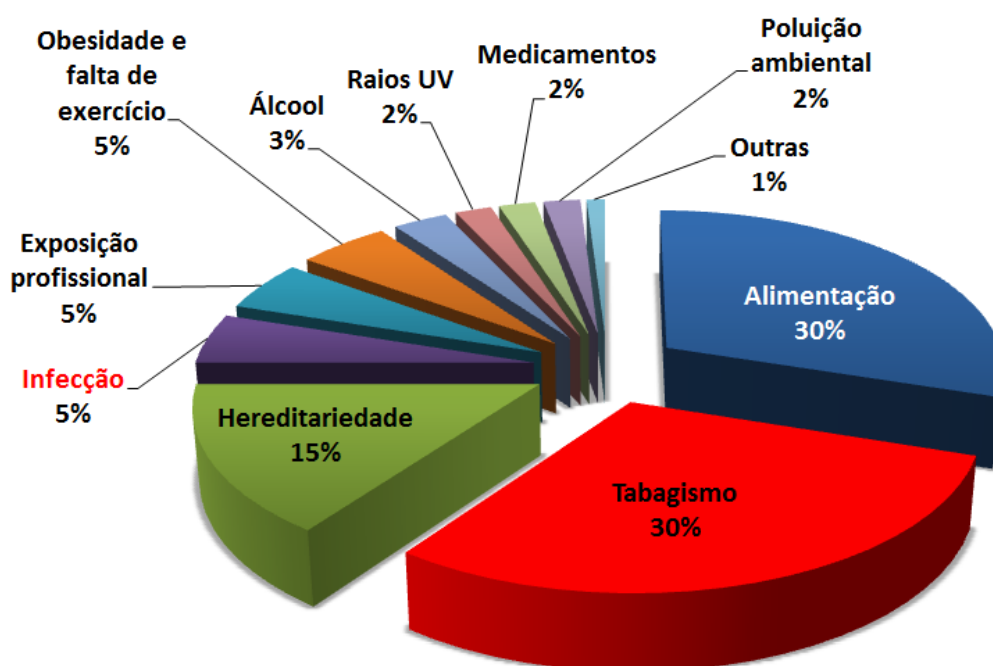
Dessa maneira, a prevenção do câncer, que será tratada a seguir, refere-se a um conjunto de medidas para reduzir ou evitar a exposição a fatores que aumentam a possibilidade de um indivíduo desenvolver uma determinada doença ou sofrer um determinado agravo, comumente chamados de fatores de risco [1].

Os fatores de risco do câncer podem ser encontrados no ambiente físico, ser herdados, ou representar comportamentos ou costumes próprios de um determinado ambiente social e cultural. A prevenção com ênfase nos fatores associados ao estilo de vida, em todas as idades, e com intervenções de combate a agentes ambientais e ocupacionais cancerígenos, pode trazer bons resultados na redução do câncer.

### 2.2.1 - Principais causas de câncer

A pesquisa realizada sobre fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de um câncer permitiu identificar, até o momento, um conjunto de fatores de natureza intrínseca e extrínseca, conforme mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Estatística sobre as principais causas de câncer.



Fonte: Adaptado da referência [1].

Como fatores de risco intrínsecos (fatores de risco não modificáveis), ou seja, que não dependem do comportamento, hábitos e práticas individuais ou coletivas, estão a idade, gênero, etnia/raça e herança genética ou hereditariedade. Entretanto, são raros os cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos, apesar do fator genético exercer um importante papel na oncogênese (processo de formação do câncer). Alguns tipos de câncer, como o de mama, estômago e cólon parecem ter um forte componente familiar, embora não possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum. Um exemplo são os indivíduos portadores de retinoblastoma (tumor maligno que se desenvolve na retina) que, em 10 % dos casos, apresentam história familiar deste tumor. Determinados grupos étnicos, por exemplo, parecem estar protegidos de certos tipos de câncer: a leucemia linfocítica é rara em orientais, enquanto o sarcoma de Ewing (uma forma de tumor ósseo) é muito raro em negros [1].

Pertencentes ao grupo de fatores de risco extrínsecos (fatores de risco modificáveis) responsáveis pela maioria dos casos – cerca de 80 % – já foram identificados o uso de tabaco e álcool, hábitos alimentares inadequados, inatividade física, agentes infecciosos, exposição a radiações, uso de determinados medicamentos, poluição ambiental, exposição profissional, obesidade, alimentos contaminados e situação socioeconômica [1]. Dentre os fatores de riscos supracitados, tomemos como exemplos as infecções e a alimentação inadequada.

Embora de pouco conhecimento por parte da população, as infecções estão entre as principais causas de câncer, e no mundo, estima-se que cerca de 18 % dos casos de câncer estejam associados a agentes infecciosos. O papilomavírus humano (HPV) é considerado o agente infeccioso mais importante no desenvolvimento do câncer [6]. A ele se atribuem 100 % dos casos de câncer do colo do útero e 5,2 % do total de casos de câncer no mundo para ambos os sexos. Visando mudar tais estatísticas, no Brasil, no ano de 2014, o Ministério da Saúde iniciou uma etapa de vacinação contra o HPV. Esta vacina protege contra a infecção pelo vírus e, conseqüentemente, previne o câncer do colo do útero e, nesta ocasião, foi aplicada em adolescentes do sexo feminino, com idades de 11 a 13 anos. Podemos citar, também, o papel do *Helicobacter pylori* no desenvolvimento do câncer de estômago. Desde 1994 a bactéria é classificada como carcinogênica, sendo associada ao desenvolvimento do carcinoma e do linfoma gástrico [7].

Outro fator de extrema importância, e que deve ser mencionado, é o hábito alimentar inadequado. Uma alimentação rica em gordura saturada e pobre em frutas, legumes e verduras aumenta o risco de desenvolvimento dos cânceres de mama, cólon, próstata e esôfago, daí a necessidade de termos uma dieta alimentar balanceada [1].

Convém enfatizar que é a interação entre os fatores modificáveis e os não modificáveis que vai determinar o risco individual de se desenvolver um câncer. A boa notícia é que parte desses fatores modificáveis depende do comportamento do indivíduo, que pode ser modificado, reduzindo o risco de se desenvolver um câncer. Algumas dessas mudanças dependem somente do indivíduo, enquanto outras requerem alterações em nível populacional e comunitário. Um exemplo de uma modificação em nível individual é a interrupção do uso do tabaco e, em nível comunitário, a introdução de uma vacina para o controle de um agente infeccioso associado com o desenvolvimento do câncer, como o vírus da hepatite B. É preciso lembrar sempre que um alto percentual de mortes por câncer pode ser evitado, mas para isso acontecer todos devem contribuir para modificar o risco de desenvolvimento do câncer [1].

### **2.3 - Tratamentos convencionais: as principais formas de tratamento**

Atualmente, existem três formas principais de tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia [8]. Elas podem ser usadas em conjunto, variando apenas quanto à suscetibilidade dos tumores a cada uma das modalidades terapêuticas e à melhor sequência de sua administração. Hoje em dia, poucas são as neoplasias malignas tratadas com apenas uma modalidade terapêutica [9].

Para determinados casos, o tratamento cirúrgico pode ser uma opção para controle ou cura do câncer. Entre seus riscos encontram-se os comuns aos diversos procedimentos cirúrgicos como complicações durante a operação, alterações fisiológicas e mutilações [10]. No caso do câncer de mama, por exemplo, as cirurgias consistem na remoção total ou parcial da mama e de nódulos linfáticos adjacentes. Esse procedimento pode causar efeitos colaterais como: diminuição da autoestima, fraqueza e incômodo no braço adjacente a cirurgia, entre outros.

Na radioterapia, variadas fontes de radiação ionizante são utilizadas visando extirpar ou impedir o crescimento tumoral em consequência da ocorrência de diversas reações químicas que restrinjam a multiplicação e/ou o funcionamento normal das células [1]. A radioterapia é sempre cuidadosamente planejada de modo a preservar o tecido saudável, tanto quanto possível. No entanto, essa impossibilidade de seletividade faz com que tecidos saudáveis circunvizinhos ao(s) tumor(es) sejam atingidos, causando indesejados efeitos colaterais.



A quimioterapia antineoplásica, por sua vez, tem o seu marco histórico apenas em meados do século XX, com a descoberta do gás mostarda e da mostarda nitrogenada, utilizados como armas químicas durante a Primeira e a Segunda Guerras Mundiais. Estudos revelaram que soldados expostos a essas substâncias apresentaram importante diminuição das células da medula óssea e dos órgãos linfoides [11]. Sendo assim, foi formulada a hipótese de que o gás mostarda poderia ser utilizado para o tratamento do câncer.

A partir daí a farmacologia se empenhou no tratamento de doenças neoplásicas com fármacos, observando a atividade química de algumas substâncias contra e a favor do câncer. Em 1950 foram identificados os primeiros antibióticos com atividade antineoplásica [12]. Essa descoberta encorajou outros cientistas ao rápido desenvolvimento da quimioterapia antineoplásica e, atualmente, um verdadeiro universo de substâncias são estudadas em laboratórios de todo o mundo.

A quimioterapia consiste na forma de tratamento sistêmico do câncer que usa medicamentos denominados quimioterápicos, ou antineoplásicos, administrados em intervalos regulares, que variam de acordo com os esquemas terapêuticos [13]. Ao contrário do que muitos pensam, a quimioterapia não é apenas feita pela via intravenosa, podendo também ser administrada por via oral, intramuscular, subcutânea e tópica. Os antineoplásicos se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes (neoplásicas) que estão formando o tumor e impedindo, também, que elas se espalhem pelo corpo [13].

Nos últimos anos, a quimioterapia tem conseguido êxitos notáveis na cura de algumas formas de cânceres disseminados, tais como a leucemia aguda infantil, distintos tipos de linfomas e alguns tipos de tumores sólidos, em especial os derivados de células germinais. Entretanto, a melhora no tratamento sistêmico de tumores sólidos mais frequentes em adultos (pulmão, mama, cólon e pâncreas) não sofreu grandes avanços, resultando em altos índices de mortalidade entre os pacientes, o que nos mostra que esta alternativa ainda é muito escassa, apesar dos grandes progressos nos últimos tempos no entendimento dessa doença [14].

Há, portanto, uma clara e urgente necessidade dos pesquisadores de identificar, avaliar e desenvolver novos e mais eficientes fármacos para o tratamento não apenas desses tipos de cânceres, que sejam de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais [15], uma vez que, até então, um dos grandes problemas na quimioterapia do câncer é a falta de seletividade, pois os antineoplásicos atuam indistintamente nas células neoplásicas e normais, lesando ambas as células, particularmente as de rápido crescimento. Em decorrência desta falta de seletividade, os agentes antineoplásicos apresentam inúmeros

efeitos colaterais, tais como leucopenia (redução no número de leucócitos no sangue), alopecia (redução parcial ou total de pelos ou cabelos em uma determinada área de pele), trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas no sangue), náuseas, vômitos, entre outros, o que diminui a qualidade de vida dos pacientes.

Entretanto, mesmo frente a essa necessidade, é conveniente enfatizar que a descoberta de novos fármacos com estrutura química completamente nova é altamente dispendiosa e envolve vários anos de pesquisa. Para que um novo fármaco possa ser lançado no mercado é necessário que este passe por diversas etapas de pesquisas e testes até sua aprovação por órgãos governamentais. No Brasil, o responsável pela regulamentação e autorização é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), enquanto que nos Estados Unidos fica ao encargo da Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA - do inglês, *Food and Drug Administration*). O processo de regulamentação de um fármaco é complexo, rigoroso e demanda altos investimentos para as indústrias farmacêuticas. Estima-se que os investimentos envolvidos no desenvolvimento de um fármaco de notável importância, ou seja, um “*blockbuster drug*” (termo em inglês usado para designar os fármacos com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão) podem estar próximos de US\$ 800 milhões, ou até mesmo acima de US\$ 1 bilhão. Tais variações podem ser encontradas nas despesas com os ensaios clínicos, que, além de influenciarem no montante financeiro, estão diretamente relacionadas com o tempo despendido no desenvolvimento de novas entidades químicas (NCE – do inglês, *new chemical entities*) e que podem perdurar por até 15 anos, desde o planejamento até a introdução do fármaco no mercado. Além disso, é estimado que se estude aproximadamente 10 mil compostos para que apenas um fármaco consiga ser comercializado [16].

Frente a esta realidade, o foco de pesquisadores e das indústrias farmacêuticas direciona-se para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de compostos-protótipos (*lead compounds*), e/ou para a exploração de novos usos para os fármacos já aprovados, utilizando estratégias de modificação estrutural, objetivando alterar suas propriedades farmacológicas. É com este intuito que o Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais (LCCEM) da Universidade Federal do ABC (UFABC), face à gravidade da situação do câncer como problema de saúde pública que atinge toda a população, em colaboração científica com o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), reconhecido internacionalmente como referência na Química Medicinal brasileira, se propõe a investigar as propriedades estruturais de um novo composto que é um

fármaco antineoplásico. É válido enfatizar que a Química Medicinal está intimamente relacionada ao processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos, e caracteriza-se por seu relevante caráter interdisciplinar, abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, biologia molecular e estrutural, entre outras [17, 18]. Tais fatos tornam o desenvolvimento desta tese de Doutorado um desafio estimulante, seja pelo seu caráter interdisciplinar – exigindo habilidades além de suas próprias especialidades; seja pelo seu significado estratégico na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos economicamente importantes e que trarão benefícios ao homem, auxiliando na tentativa de combate ao câncer, ou até mesmo que atuem melhorando a qualidade de vida dos pacientes, potencializando o tratamento e reduzindo os efeitos colaterais.

## **2.4 - A combretastatina e o tratamento do câncer**

Existem duas estratégias promissoras no estudo de agentes antineoplásicos: os denominados VTA's (do inglês – *Vascular Targeting Agents*) que são agentes que impedem a formação de novos vasos sanguíneos sem, no entanto, afetar os vasos consolidados, que já alimentam tumores existentes; e os VDA's (do inglês – *Vascular Disrupting Agents*), que são agentes capazes de interromper a vascularização tumoral já consolidada, causando a obstrução ou destruição seletiva de vasos sanguíneos preexistentes que permeiam os tumores, interrompendo o fluxo de oxigênio e nutrientes [19, 20].

Os VTA's fazem parte dos tratamentos quimioterápicos mais aceitos e representam um largo grupo de estruturas. Isto é, em parte, devido ao fato de ser uma classe já estabelecida como agente antineoplásico, assim como pelos inúmeros alvos biológicos que podem afetar uma resposta. Dentre os VTA's mais conhecidos estão os fármacos Taxol<sup>®</sup> (paclitaxel), Ixempra<sup>®</sup> (ixabepilona), Gleevec<sup>®</sup> (mesilato de imatinibe), entre outros [21].

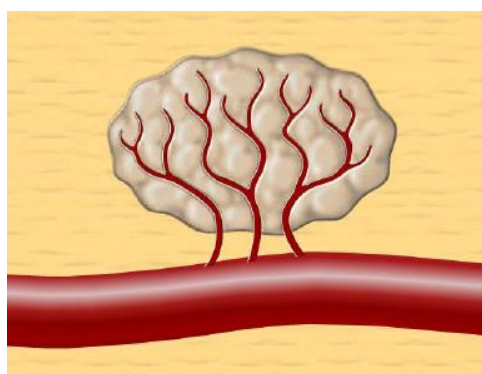
Os VDA's representam uma classe muito menos estabelecida de fármacos antineoplásicos, porém são promissores devido aos seus efeitos antivasculares. Dentre os VDA's, os que vêm se destacando mais acentuadamente são os análogos da combretastatina A4 (CA-4).

A combretastatina é uma pequena molécula orgânica, encontrada e isolada das cascas da árvore sul-africana, cujo nome científico é *Combretum caffrum* [22]. Ela foi identificada em 1982 pelo pesquisador George R. Pettit, diretor do Instituto de Pesquisa do Câncer, da Universidade Estadual do Arizona, EUA [23]. Entretanto, as propriedades terapêuticas de plantas do gênero *Combretum* já eram conhecidas e empregadas por tribos africanas e em

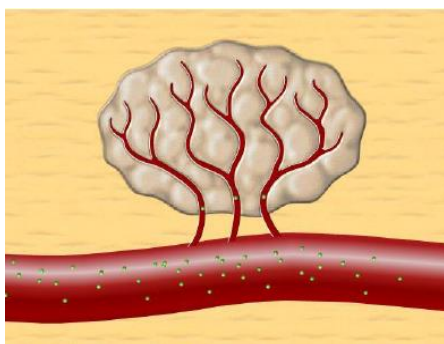
povoados indianos no tratamento de distintas enfermidades, e os pesquisadores do Instituto mencionado não só isolaram a combretastatina em quantidades suficientes para realizar testes clínicos, como também fizeram sua síntese total e produziram derivados fosfatados solúveis em água.

O grande interesse nessa molécula está na sua dupla função antineoplásica, isto é, por ela apresentar ação citotóxica (que combate as células neoplásicas) e antivascular. Esta última – a ação antivascular – pode ser dividida em dois mecanismos primários: o primeiro seria impedir a formação de novos vasos que alimentem o tumor e o segundo, a atuação em vasos já estabelecidos. A combretastatina se destaca pela eficiência na interrupção do fluxo sanguíneo que alimenta o tumor. Ao atingir as células endoteliais da vasculatura tumoral, ela atua sobre a tubulina, despolimerizando os microtúbulos. Consequentemente, as células endoteliais perdem sua forma, bloqueando o fluxo de sangue até o tumor [24]. Sem alimento e oxigênio, o tumor acaba morrendo. Um esquema dessa atuação é ilustrado na Figura 6.

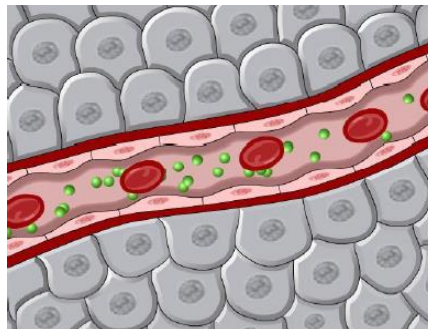
**Figura 6 – Esquema da atuação da combretastatina.**



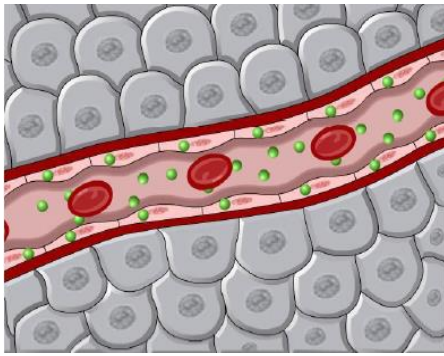
*a) Vasos sanguíneos que alimentam o tumor.*



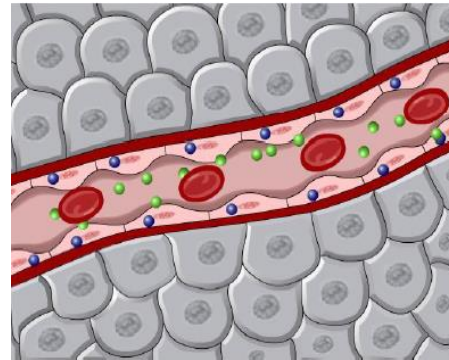
*b) A combretastatina atinge a vasculatura tumoral.*



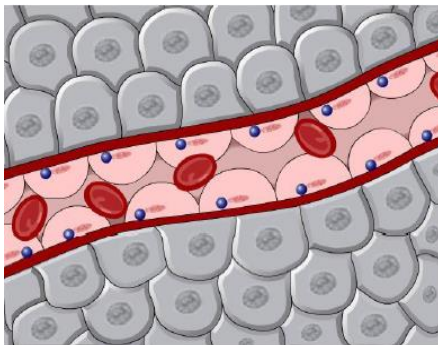
*c) A combretastatina dentro dos vasos sanguíneos irrigam o tumor.*



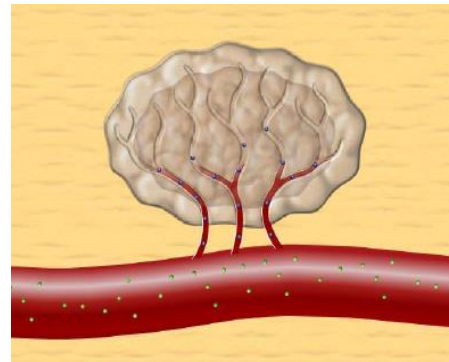
*d) Ela penetra nas células endoteliais.*



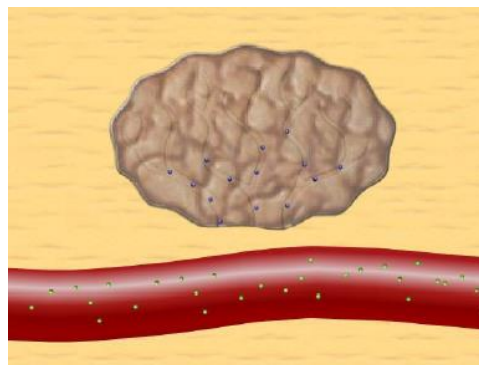
*e) Ligando-se à tubulina.*



*f) As células endoteliais perdem sua forma.*



*g) Aos poucos, o fluxo sanguíneo diminui.*

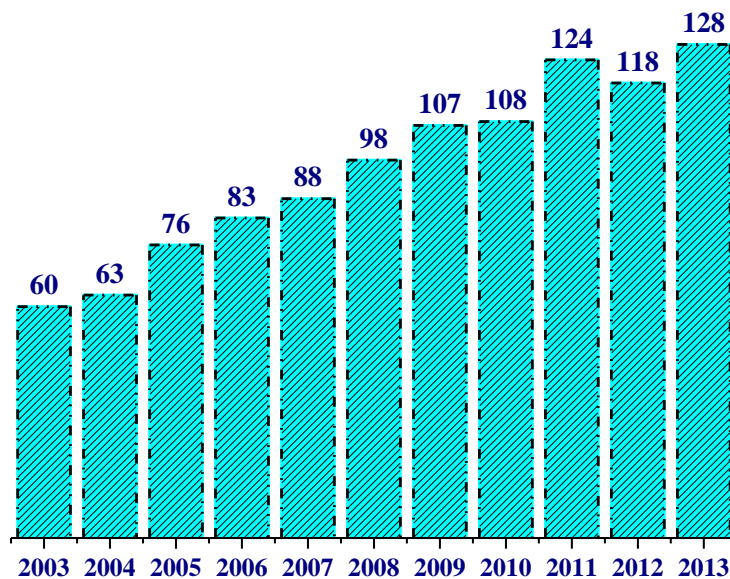


*h) Dessa forma, o tumor fica sem alimento e morre.*

Fonte: Adaptado do endereço eletrônico: [\[http://www.oxigene.com\]](http://www.oxigene.com).

Fica evidente, portanto, a importância da combretastatina no que diz respeito à tentativa de combate ao câncer, e com base nisso, há um grande interesse da comunidade científica em estudar essa molécula. Um exemplo de tal afirmação pode ser vista no gráfico da Figura 7, que mostra o número de artigos publicados no período de 2003-2013 com a palavra-chave “*combretastatin*”. Estes dados foram compilados usando a base de dados do *SciFinder*.

**Figura 7 – Número de artigos publicados com a palavra-chave “*combretastatin*”.**

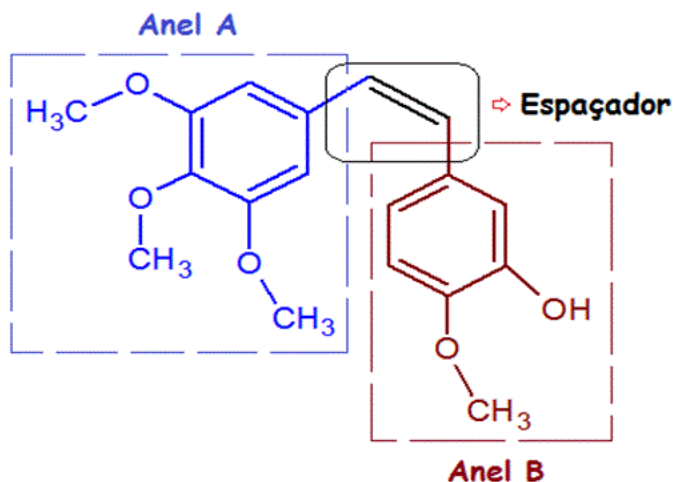


**Fonte:** Adaptado da referência [25].

De acordo com a Figura 7, é possível perceber que o número de publicações relacionadas à combretastatina duplicou nos últimos anos (2003-2013) impulsionado, principalmente, pelo segmento farmacêutico, que tem empenhado grande esforço para o estudo das propriedades farmacológicas desta substância. Dentre esses números, foram encontradas oitenta patentes envolvendo principalmente a síntese de análogos mais solúveis e ativos, tais como derivados fosfatados [25].

Dentre as combretastatinas existentes, a combretastatina A4 (CA-4) se destaca por apresentar potente atividade citotóxica frente a diversas linhagens tumorais normais e em linhagens que apresentam resistência aos fármacos disponíveis na terapêutica [26]. Na Figura 8 são mostradas as subunidades que constituem a CA-4. Pode-se verificar que se trata de um composto de estrutura química simples, mas que é capaz de exercer potente atividade citotóxica.

**Figura 8 – Subunidades que constituem a CA-4.**

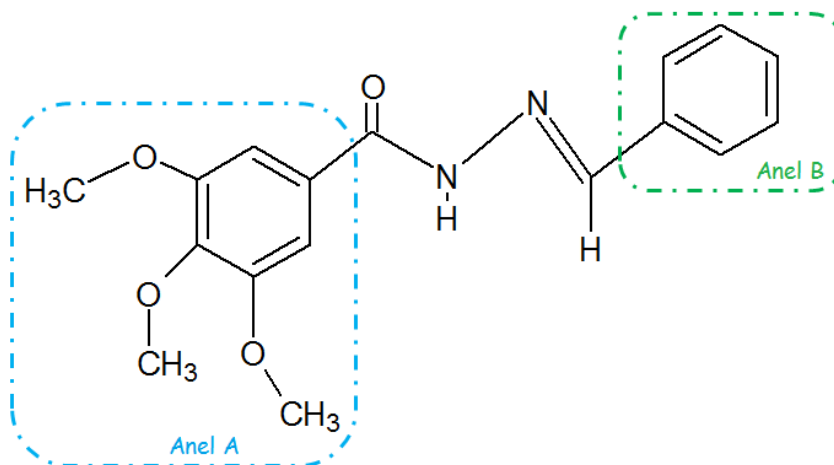


**Fonte:** Ilustração elaborada pela autora.

Apesar da destacada atividade antineoplásica, o seu uso clínico é limitado por alguns fatores, dentre eles, a baixa biodisponibilidade, o que impulsionou a comunidade científica – especialmente os químicos medicinais – a propor modificações químicas na estrutura deste produto natural com o intuito de contornar algumas limitações e obter compostos terapeuticamente relevantes. Com base nisso, recentemente, no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), uma série de novos análogos da CA-4 foi sintetizada utilizando como espaçador das subunidades aromáticas a estrutura privilegiada *N*-acilidrazona (NAH - é considerada estrutura privilegiada por estar presente em distintos compostos bioativos, com diferentes propriedades farmacológicas, sendo amplamente estudada no LASSBio<sup>®</sup>), tendo sido obtidos compostos com maior estabilidade química quando comparados à CA-4 [27].

O LASSBio<sup>®</sup> foi criado em 1994, na UFRJ, visando a descoberta de novas substâncias bioativas candidatas a fármacos. Muitos candidatos a fármacos foram descobertos desde então, e dentre estes, o LASSBio-1586 (Figura 9) destacou-se por sua potência e seletividade citotóxica. LASSBio-1586 foi avaliado quanto a seus efeitos citotóxicos frente às linhagens tumorais HL-60 (leucemia humana; IC<sub>50</sub> = 0,29 µM), SF-295 (glioblastoma humano; IC<sub>50</sub> = 0,26 µM), MDA-MB435 (melanoma; IC<sub>50</sub> = 0,064 µM) e HCT-8 (carcinoma ileocecal – cólon; IC<sub>50</sub> = 0,45 µM), apresentando resultados promissores [12, 27, 28].

**Figura 9 – Estrutura química do LASSBio-1586. Em destaque estão os anéis A (em azul) e B (em verde), isto é, evidenciando as subunidades que constituem a CA-4.**



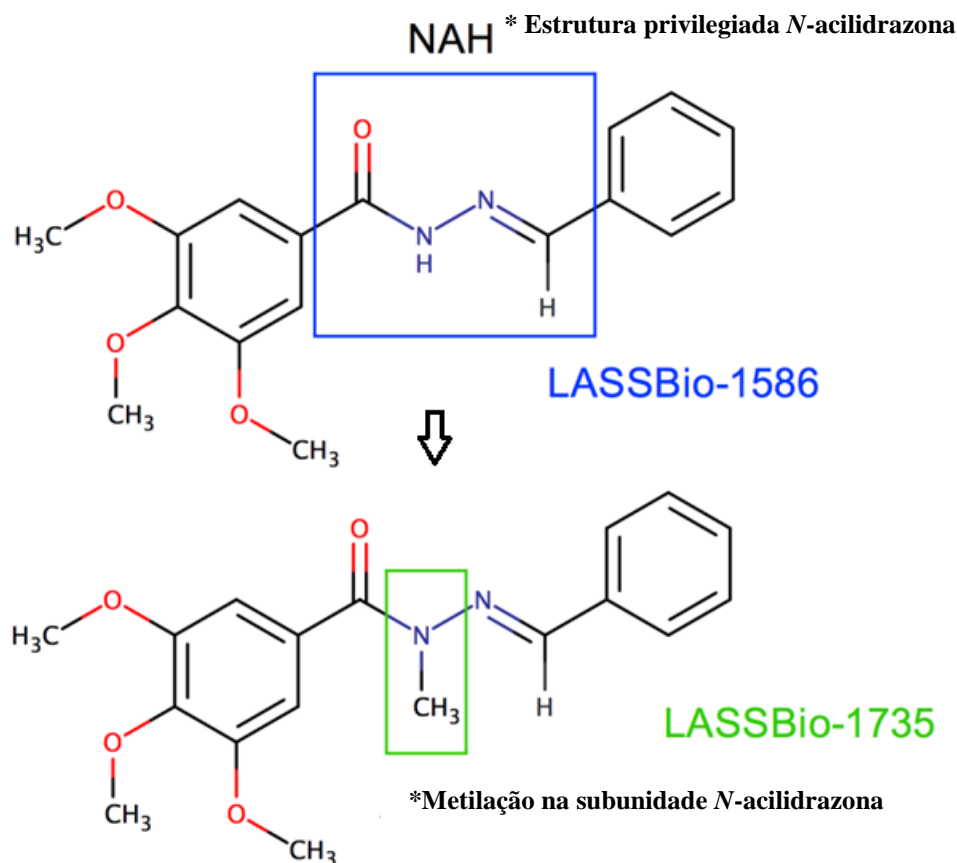
Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

#### **2.4.1 - Fármaco antineoplásico LASSBio-1735 – um análogo da CA-4**

Após a identificação do LASSBio-1586 como potente composto citotóxico, com índice de seletividade adequado, foi planejado um análogo do referido composto empregando uma importante estratégia de modificação molecular característica da Química Medicinal, a qual é denominada de *N*-metilação. O procedimento citado foi realizado com o intuito de compreender melhor a relação entre a estrutura química deste composto *N*-acilidrazônico e a atividade citotóxica. O análogo obtido está identificado na Figura 10 como LASSBio-1735, sendo este o fármaco antineoplásico que foi investigado no presente estudo.



**Figura 10** – Estrutura química do análogo obtido (derivado N-metilado - LASSBio-1735) a partir do LASSBio – 1586.



**Fonte:** Ilustração elaborada pela autora.

Neste sentido, levando em consideração que pouco se sabe até o momento sobre as suas principais características – comportamento térmico, arranjo estrutural e solubilidade –, o presente trabalho descreve a caracterização estrutural realizada por difração de raios X por policristais (DRXP) aliada ao método de Rietveld, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de um análogo sintético da combretastatina A4, denominado LASSBio-1735. É importante enfatizar que por esta molécula ser inédita, ainda não há relatos na literatura sobre a estrutura cristalina da mesma, o que torna o principal objetivo deste estudo, uma vez que o uso da DRXP se constitui em uma etapa importante, tanto no planejamento de novas substâncias, como no desenvolvimento de novos procedimentos para a síntese de compostos já conhecidos. Sendo assim, no presente estudo se buscou as condições experimentais necessárias para a caracterização estrutural deste composto com o uso da DRXP aliada ao

método de Rietveld, tendo em vista que a aplicação de tal ferramenta é capaz de fornecer informações precisas sobre a estrutura cristalina do fármaco em questão. Também será descrita a caracterização estrutural da forma anidra do LASSBio-1735, que foi obtida após a forma di-hidratada ter sido submetida a aquecimento. Após isso, ambos os compostos – nas formas anidra e hidratada – tiveram suas respectivas atividades citotóxicas e velocidades de dissolução intrínseca avaliadas, com o intuito de averiguar eventuais diferenças entre os compostos de diferentes graus de hidratação.

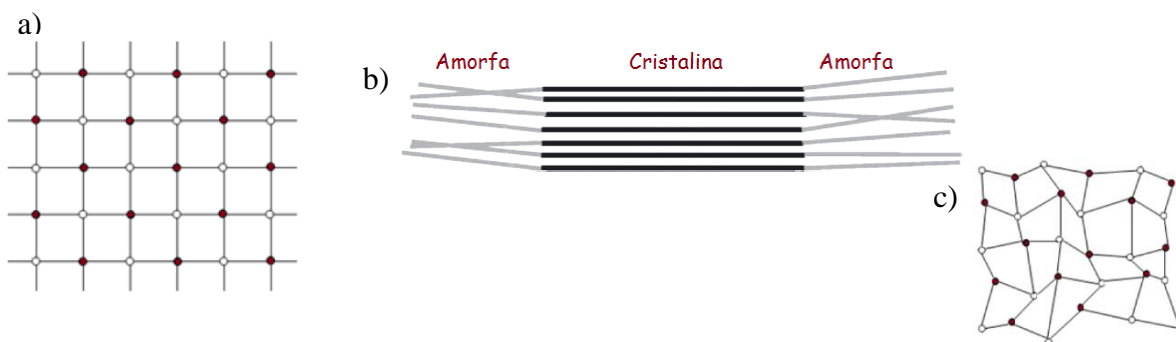
### 3 - Técnicas empregadas na caracterização do análogo da CA-4: LASSBio-1735

Nesta seção será realizada uma breve descrição das técnicas experimentais empregadas na caracterização físico-química e nos estudos de citotoxicidade do análogo da CA-4 – LASSBio-1735.

#### 3.1 - Introdução à Cristalografia & Difração de raios X

A estrutura dos materiais sólidos é resultado da natureza de suas ligações químicas, a qual define a distribuição espacial de seus átomos, íons ou moléculas. Os materiais sólidos classificam-se em cristalinos, semicristalinos ou amorfos, sendo que a maioria dos materiais comumente utilizados como fármacos exibe um arranjo geométrico de seus átomos bem definido, constituindo assim uma estrutura cristalina [29]. Os sólidos cristalinos, independente do tipo de ligação encontrada nos mesmos, são aqueles que apresentam estrutura atômica tridimensional periódica de longo alcance. Já os sólidos semicristalinos têm uma estrutura com comportamento periódico apenas em uma ou duas direções. Os sólidos amorfos por sua vez, não têm ao longo de sua estrutura uma ordem ou periodicidade estrutural de longo alcance, como é o caso do vidro e alguns polímeros. Na Figura 11 observa-se um esquema para os três tipos de rede citadas: (a) cristalina, (b) semicristalina e (c) amorfa.

**Figura 11 – Representação bidimensional (a) de uma rede cristalina, onde se observa uma distribuição ordenada de átomos; (b) de uma rede semicristalina contendo regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas e (c) de uma rede não cristalina (amorfa).**

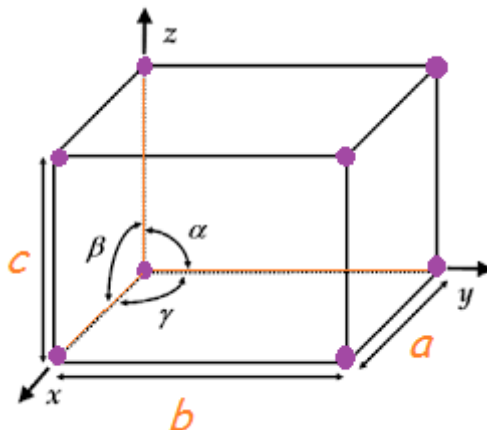


Fonte: Adaptado das referências [30, 31].

A partir do conceito de estrutura cristalina, que é formada por uma unidade que se repete ao longo de toda a estrutura, surge o conceito de cela unitária. Esta unidade é definida como a menor porção do cristal que contém toda a informação estrutural do mesmo, isto é,

um cristal é formado por diversas celas unitárias arranjadas tridimensionalmente. O tamanho e o formato da cela unitária são caracterizados por três vetores  $a$ ,  $b$  e  $c$  (que indicam os comprimentos dos três eixos) e os ângulos existentes nos vértices da cela  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que são os chamados parâmetros de rede [29]. O que diferencia as celas unitárias é justamente a relação entre seus parâmetros de rede. A representação de uma cela unitária é mostrada na Figura 12.

**Figura 12 – Representação de uma cela unitária.**

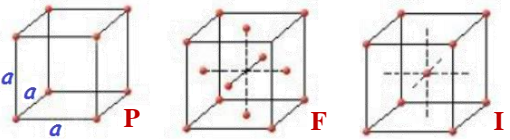
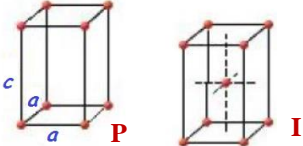
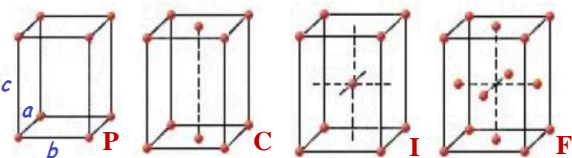
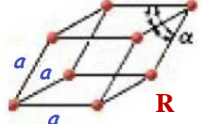
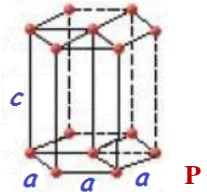
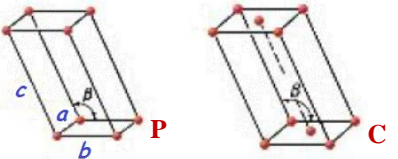
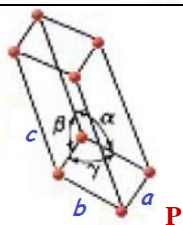


Fonte: Adaptado do endereço eletrônico:

[[http://lqes.igmm.unicamp.br/images/vivencia\\_lqes\\_index\\_distancias\\_interplanares.pdf](http://lqes.igmm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_index_distancias_interplanares.pdf)].

Em 1848, o cientista francês Auguste Bravais propôs sete sistemas cristalinos básicos para o estudo das estruturas cristalinas, sendo estes conhecidos como: cúbico, tetragonal, ortorrômbico, trigonal, hexagonal, monoclínico e triclínico. Partindo desses sete sistemas cristalinos seria possível descrever 14 celas unitárias, as quais englobariam qualquer tipo de estrutura cristalina conhecida. Na Tabela 1 são apresentadas as principais características desses arranjos no tocante aos parâmetros de rede e às ilustrações das celas unitárias dos arranjos cristalinos das redes de Bravais [32].

Tabela 1 – Comparativo das características dos sistemas cristalinos das redes de Bravais [32].

Sistema	Parâmetros de rede	Geometria da cela unitária
Cúbico	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Tetragonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Ortorrômbico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Trigonal	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma < 120^\circ, \neq 90^\circ$	
Hexagonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$	
Monoclínico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$	
Triclínico	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$	

Como vimos na tabela anterior, existem cinco arranjos básicos para os pontos na rede na cela unitária (identificados como **P**, **F**, **C**, **I** e **R**), sendo que cada arranjo é identificado por uma letra de Hermann-Mauguin, que é o tipo de nomenclatura mais conhecida. A letra **P** descreve a rede primitiva simples com os pontos localizados nos vértices da cela; **F** é a rede de face centrada, com os pontos da rede situados em todas as faces; **C** descreve a rede de base centrada, com os pontos centrados nas faces C ou nas extremidades do cristal; **I** é a rede de

corpo centrado com os pontos da rede situados no centro do volume da cela unitária; **R** é a rede romboédrica, também primitiva (trigonal) [29, 33].

A combinação das 14 redes de Bravais com o estudo dos padrões de simetria espacial conduz às possíveis estruturas tridimensionais observadas na natureza, denominadas de grupos espaciais. A importância dos grupos espaciais foi revelada pelo trabalho de William Henry Bragg e William Lawrence Bragg em 1912, que iniciaram o estudo de estruturas cristalinas mediante a utilização de raios X [34]. Por meio das 14 redes de Bravais são definidos os 32 grupos pontuais, e a partir da combinação desses 32 grupos pontuais surgem os 230 grupos espaciais, que descrevem, de maneira unívoca, todo arranjo de objetos idênticos, dispostos numa rede periódica infinita. Uma descrição completa e detalhada a respeito dos 230 grupos espaciais pode ser encontrada nas Tabelas Internacionais de Cristalografia (*International Tables for Crystallography*), Volume A [35].

Segundo a União Internacional de Cristalografia (IUCr - do inglês, *International Union of Crystallography*), o símbolo de um grupo espacial tem a forma  $Yxxx$ , onde a letra maiúscula  $Y$  indica o tipo de rede e as minúsculas  $xxx$ , referem-se aos elementos geradores de simetria segundo as três direções não equivalentes correspondentes ao sistema cristalino em questão [36, 37]. Na Tabela 2 está representada a frequência de como os 230 grupos espaciais distribuem-se nos sete sistemas cristalinos.

**Tabela 2 – Representação dos setes sistemas cristalinos com seus respectivos números de grupos espaciais [35].**

Sistemas cristalinos	Número de grupos espaciais
Cúbico	36
Tetragonal	68
Ortorrômbico	59
Trigonal	25
Hexagonal	27
Monoclínico	13
Triclínico	2

### 3.1.1 - A descoberta dos raios X

Os raios X foram descobertos em 1895 pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen no laboratório do Instituto de Física da Universidade Julius Maximilians, de Würzburg, na Bavária [38-40].

Röntgen, em um dos seus ensaios, trabalhava com um tubo de Crookes coberto por uma blindagem de papelão preto e, ao passar corrente por este tubo, notou uma linha preta em um papel de platinocianeto de bário que estava em sua mesa [38, 41].

Investigando, ele chegou à conclusão de que o efeito só poderia ser produzido pela passagem de uma luz, mas no caso deste ensaio, esta luz não poderia provir do tubo, tendo em vista que este estava envolto pela blindagem opaca a qualquer luz conhecida até então. Mesmo assim, Röntgen assumiu que o efeito viria do tubo, pois, através de outros ensaios, tudo indicava que esta não poderia vir de outro lugar [41].

Com isso, o efeito originado pelo tubo, tinha como característica luminescer o papel. Porém, a observação mais interessante foi a linha preta que aparecia neste papel pois, aparentemente, era causada pela sombra de um fio metálico que estava entre o tubo e o papel.

Dando continuidade aos ensaios, Röntgen observou que o efeito se repetia até uma distância de dois metros, e que a luz, viajando em linha reta, era absorvida por metais, causando assim uma sombra no papel. Com isso descobriu o que parecia ser um novo tipo de luz invisível, desconhecida até então por todos. Röntgen denominou esses misteriosos raios, de raios X [38-41].

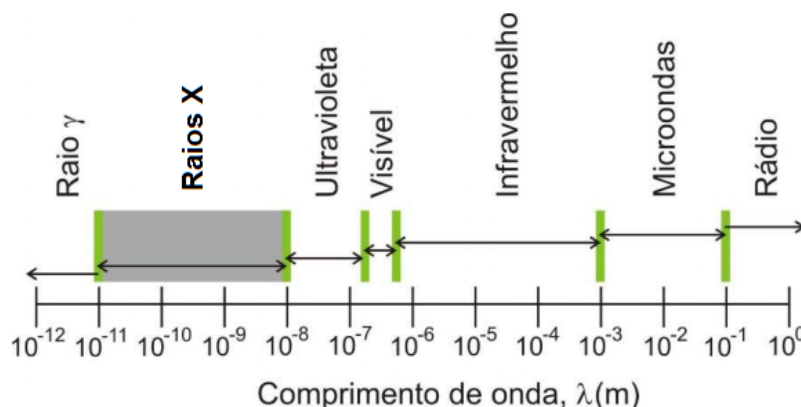
Em seguida, o físico demonstrou que os raios X têm mais facilidade em atravessar a carne do que os ossos, mostrando uma radiografia da mão de sua esposa. Röntgen também mostrou que os raios X podiam ser produzidos com mais eficiência se os raios catódicos forem conduzidos para atingir um alvo de metal no lugar de um tubo de vidro [39, 40]. As novas descobertas de Röntgen rapidamente se espalharam na comunidade científica, e logo em seguida, aplicações para os raios X foram surgindo – a primeira foi a radiografia, utilizada na medicina e mais tarde, por indústrias [42].

Röntgen deu continuidade às suas pesquisas e descobriu que um ânodo feito de um elemento pesado, como a platina, emite raios X mais intensamente do que se for feito de um metal leve, como o alumínio. Além disso, descobriu que os raios X sensibilizavam filmes fotográficos e ionizavam um gás se o atravessasse, que a penetrabilidade dos raios X aumenta com o aumento da voltagem no tubo, entre outras coisas. Por suas descobertas, Röntgen recebeu em 1901 o primeiro prêmio Nobel em Física [38, 41].

### 3.1.2 - Como os raios X são produzidos

Os raios X têm comprimento de onda entre  $10^{-11}$  e  $10^{-8}$  m (0,1 e 100 Å), os quais se localizam entre os raios  $\gamma$  e o ultravioleta [29], assim como apresentado na Figura 13.

Figura 13 - Espectro de ondas eletromagnéticas destacando a região dos raios X em cinza.



Fonte: Adaptado da referência [41].

Eles são produzidos em laboratório basicamente de duas maneiras distintas [40-42]. Uma com a utilização de tubos de raios X (conhecida como fonte convencional) e outra, por um acelerador síncrotron. No desenvolvimento deste trabalho foi utilizado um difratômetro que opera por fonte convencional e, por isso, mais detalhes serão fornecidos sobre esta fonte.

Quando produzidos por um tubo de raios X, podem ser observados dois espectros distintos de raios X que se sobrepõem: o espectro contínuo e o espectro de linhas características [42].

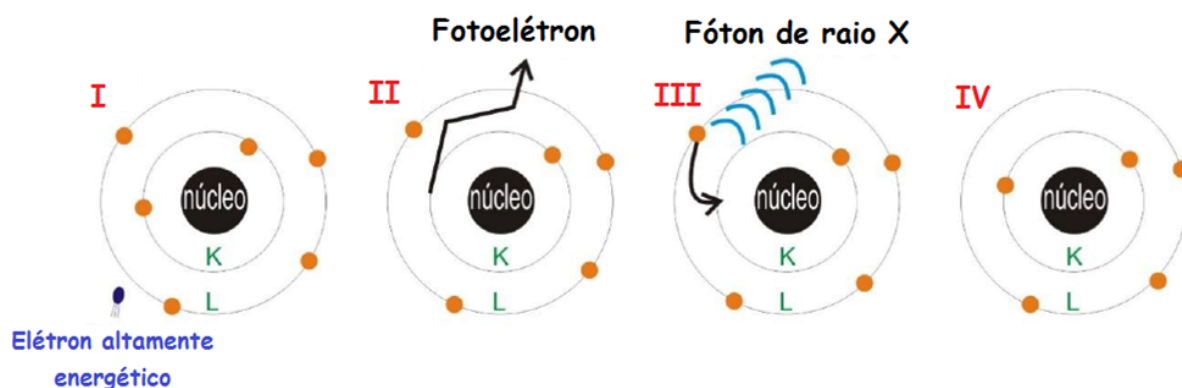
O espectro contínuo é produzido pela desaceleração dos elétrons de alta energia (velocidade), gerados no filamento do tubo de raios X, ao atingirem o alvo (ânodo). Como qualquer carga acelerada emite radiação, os elétrons interagem com o campo elétrico do átomo, acelerando-os centripetamente, de tal maneira que parte da energia cinética dos elétrons é reemitida como raios X. Esta radiação policromática, também denominada *bremsstrahlung*, ou radiação “branca”, é a que produz o espectro contínuo [33].

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 do tubo catódico) colida com um alvo metálico (ânodo) [43]. Na Figura 14 é mostrada a descrição desse fenômeno a nível atômico.

**Figura 14 - Produção de raios X a nível atômico.**



Fonte: Adaptado da referência [41].

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, outro elétron de uma camada mais externa passa à camada K (**III**), liberando energia na forma de um fóton de raios X (**IV**). A energia desse fóton corresponde à diferença de energia entre as duas camadas e é característico de cada elemento químico [40, 43].

Essa é a mais simples e comum fonte de geração de raios X, que pode ser encontrada em laboratórios de vários tamanhos, também conhecida como fonte convencional.

Outra forma de gerar raios X é em aceleradores síncrotron, como o que existe em Campinas-SP, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), no qual um feixe de elétrons é acelerado a grandes velocidades, próximas à da luz, por campos eletromagnéticos e, ao serem desviados num dipolo magnético do anel de armazenamento de elétrons, produzem raios X em vários comprimentos de onda (radiação branca) [43].

### **3.1.3 - A difração de raios X por policristais (DRXP) e a Lei de Bragg**

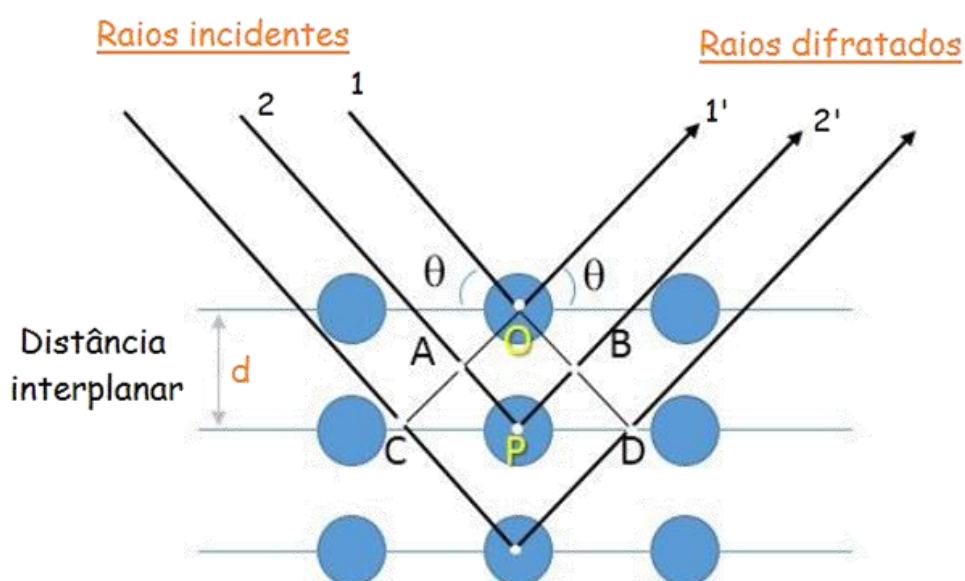
A DRXP é uma das técnicas mais comumente usadas na indústria farmacêutica para a análise de sólidos [44], o que a torna atraente é o fato de ser uma técnica não destrutiva e que não requer grandes quantidades de amostra (especialmente quando se opera no modo de

transmissão). O fato de não ser necessário grandes quantidades de amostra é potencialmente vantajoso nas etapas iniciais do desenvolvimento de novos fármacos.

A teoria que define o estudo de materiais cristalinos por difração de raios X baseia-se no fato de que as distribuições espaciais dos átomos no material definem diferentes planos atômicos (imaginários) que espalham os raios X, causando interferências construtivas e destrutivas, as quais se manifestam no padrão de difração de raios X como máximos e mínimos [42]. Para que ocorra a difração de raios X é necessário que haja interferência construtiva. No entanto, para ocorrer interferência construtiva, é preciso que a diferença entre os caminhos percorridos pelos feixes de raios X difratados por dois planos sucessivos seja igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda.

Da Figura 15 temos que as linhas horizontais representam os planos cristalinos ( $hkl$ ), e as setas representam os raios X incidentes e difratados no cristal. O segmento APB é a diferença de caminho seguida pelo raio 1 e 2. Logo, o segmento APB 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. Sendo assim, temos que  $AP = PB = d \sin \theta$ . Portanto,  $APB = 2 d \sin \theta$ . Quando essa condição é obedecida, tem-se um pico de difração [41].

**Figura 15 – Lei de Bragg.** A diferença de caminho do raio que passa pelo ponto P em relação ao que passa pelo ponto O deve ser igual a um número inteiro de comprimento de onda. A difração de raios X ocorre em uma estrutura cristalina quando a lei de Bragg é satisfeita.



Fonte: Adaptado da referência [41].

Por meio de relações geométricas entre o feixe incidente e o feixe difratado pelos planos, W. H. Bragg e seu filho W.L. Bragg formularam uma equação conhecida como Lei de Bragg. Esta equação é definida por:

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

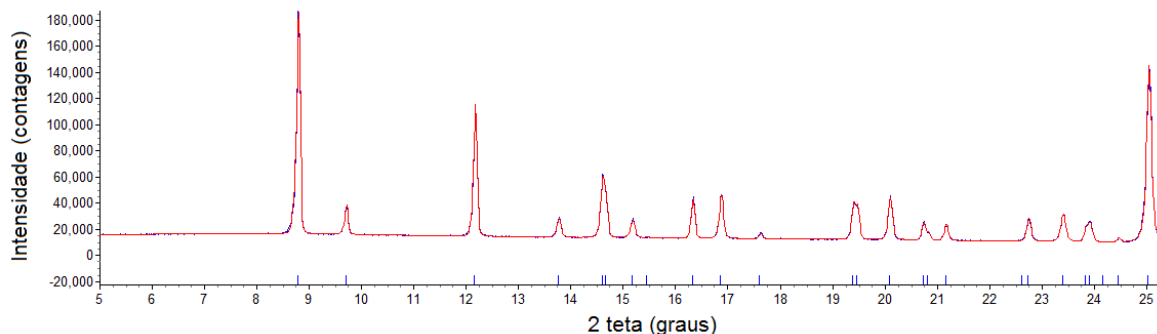
Através da mesma, é possível obter o espaçamento entre os planos, sabendo-se o ângulo de incidência e o comprimento de onda do feixe incidente [45]. Da equação 1, temos que  $\theta$  corresponde ao ângulo entre o feixe de raios X incidente e a família de planos cristalinos correspondente,  $d$  é a distância interplanar dessa mesma família de planos, definida pelos índices de Miller ( $hkl$ ) e  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios X incidentes.

Levando em consideração que muitas atividades de pesquisa nos últimos anos têm se dedicado ao desenvolvimento e aplicação de novas técnicas para a realização da determinação de estruturas cristalinas diretamente a partir de dados de DRXP, a seguir serão abordados alguns aspectos relacionados à determinação estrutural com o uso do programa *DASH* [46].

### **3.1.4 - O programa *DASH* como uma importante ferramenta para a determinação da estrutura cristalina a partir de dados de DRXP**

Muitas substâncias estão constantemente sendo sintetizadas e as estruturas de algumas substâncias antigas ainda são desconhecidas. As estruturas cristalinas variam amplamente em termos de complexidade, isto é, estruturas consideradas mais simples podem ser resolvidas em poucos dias, enquanto as complexas podem exigir meses ou mesmo anos para a sua solução completa. O *DASH* [46] é um programa que resolve estruturas cristalinas a partir de dados de difração de raios X por policristais de boa qualidade, sendo destinado principalmente à determinação da estrutura de materiais orgânicos e organometálicos. Os dados, isto é, os difratogramas de raios X, são normalmente obtidos em função das intensidades relativas (contagens) *versus*  $2\theta$  (graus), como pode ser visto na Figura 16.

**Figura 16 – Difratoograma de raios X do LASSBio-1735 anidro extraído do software *Topas Academic v.5* [47] mostrando a intensidade (contagens) versus posição (2 teta (graus)) dos picos de difração.**

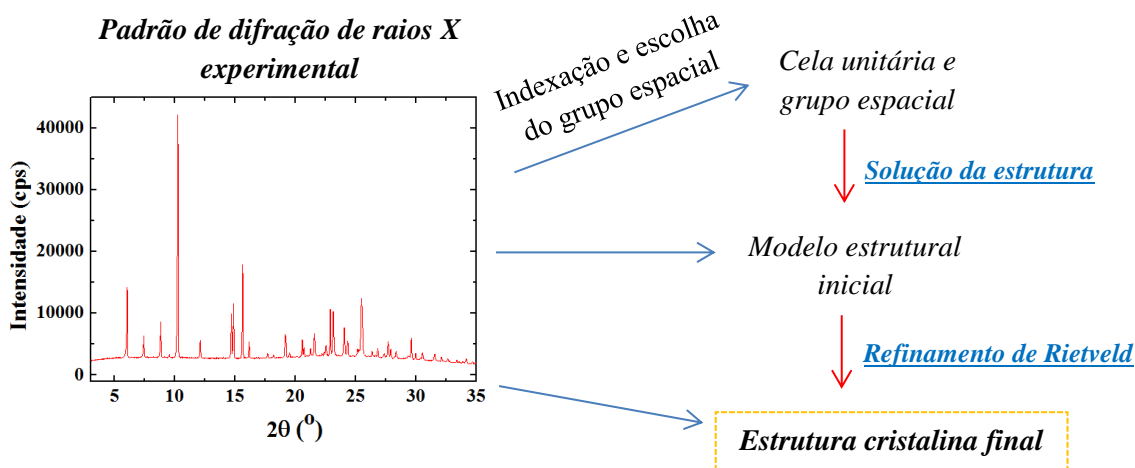


Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

Note que o difratograma de raios X, que compreende as posições e intensidades dos picos de difração, é uma característica fundamental da substância servindo não somente para identificá-la rapidamente, como também, para uma completa elucidação de sua estrutura. Assim, pode-se dizer que este padrão é semelhante a uma impressão digital da substância [29].

Uma vez obtido o difratograma de raios X de boa qualidade, os passos básicos envolvidos na solução da estrutura consistem basicamente em: a) indexação (determinação da cela unitária); b) determinação da simetria (obtenção do grupo espacial); c) solução da estrutura e d) refinamento da estrutura cristalina. É interessante notar, que de maneira genérica, as etapas mencionadas são feitas de uma maneira sequencial condicional, conforme ilustrado pela Figura 17.

**Figura 17 – Etapas para a determinação estrutural.**



Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

Uma vez obtidos bons padrões de difração, isto é, dados de boa qualidade por DRXP, o primeiro procedimento a ser realizado consiste na chamada indexação do padrão de difração, ou seja, na determinação dos parâmetros de cela unitária a partir das posições dos picos e sistema cristalino. Nesta etapa, pelo menos as 20 primeiras reflexões do padrão de difração são individualmente ajustadas e usadas no procedimento de indexação por meio da rotina *DICVOL91* [48] implementada no programa *DASH*. Quando o processo de indexação é realizado, tornam-se conhecidos o sistema cristalino, os parâmetros de rede ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e o volume da cela unitária (em  $\text{\AA}^3$ ). A indexação pode ser feita com programas que utilizam duas abordagens fundamentalmente diferentes para a indexação *ab initio* (nenhum modelo ou dados disponíveis, apenas leis físicas): métodos de espaço direto e métodos de espaço recíproco [49]. A indexação no espaço direto emprega tanto o chamado método de busca de rede – quando as dimensões da célula unitária variam com um determinado incremento, dentro de certos limites – ou uma busca aleatória do método de Monte Carlo para os parâmetros da cela unitária. Ambos têm um único objetivo: conseguir a melhor descrição do padrão de difração da medida [29, 50]. Por outro lado, a indexação no espaço recíproco utiliza apenas picos de Bragg a baixos ângulos que são escolhidos como um conjunto de base e, em seguida, é realizada uma exaustiva permutação baseada na atribuição de várias combinações dos índices  $hkl$  para cada pico do conjunto de base [29, 51, 52]. Algoritmos de permutação de índices são mais complexos do que o algoritmo de busca de rede.

Convém ressaltar que o referido procedimento requer muito cuidado, e que a indexação apenas é possível quando se possui um padrão de difração com excelente precisão angular, isto é, para uma substância que possui uma cela unitária grande e baixa simetria do sistema cristalino, como é o caso de muitos materiais orgânicos, entre eles os fármacos, é necessária uma medida de alta resolução para distinguir os picos em sobreposição a baixos ângulos, para que seja facilitado o procedimento de determinação estrutural.

A segunda etapa (determinação da simetria) consiste na análise das ausências sistemáticas que é realizada por um ajuste de Pawley (o procedimento consiste em um refinamento da cela unitária, no qual o conhecimento da estrutura cristalina não é necessário) [53], para que se obtenha a melhor solução para o grupo espacial. Convém enfatizar que nesta etapa são sugeridas as opções de grupos espaciais pertencentes ao sistema cristalino previamente encontrado na etapa 1 (indexação) e deve-se fazer uma avaliação criteriosa dentre as várias opções, para então escolher o grupo espacial mais coerente, sempre levando em consideração os índices que descrevem a qualidade do ajuste ( $R_{exp}$ ,  $R_{wp}$  e  $\chi^2$ ) [46]. A título de exemplo, se estamos trabalhando com um composto que se cristaliza em um sistema

cristalino ortorrômico, deverão ser avaliados os 59 tipos de grupos espaciais pertencentes a este sistema cristalino. A descrição dos 230 grupos espaciais existentes encontra-se na histórica coleção das Tabelas Internacionais de Cristalografia (*International Tables for Crystallography*) [35].

Após os parâmetros serem devidamente avaliados, conhecendo-se o volume da cela unitária, obtido após o processo de indexação e a estrutura química do composto a ser estudado, é possível fazer uma comparação entre o volume calculado (levando em consideração os volumes individuais médios dos átomos [54]) e o volume estimado na indexação. Tal comparação nos sugere quantas fórmulas unitárias do composto estão dispostas na cela unitária, ou seja, o número de fórmulas unitárias por cela unitária ( $Z$ ). Além disso, a junção destas informações com o grupo espacial encontrado na etapa 2, nos permite inferir quantas fórmulas unitárias fazem parte da unidade assimétrica ( $Z'$ ) do composto.

A terceira etapa consiste na solução da estrutura por *simulated annealing*, este método é usado para explorar mínimos locais rapidamente, gerando vários modelos experimentais, ou seja, é um método de otimização global, utilizado para determinar a estrutura cristalina que melhor coincide com os dados experimentais, permitindo variar parâmetros que descrevem as coordenadas fracionárias, orientação molecular e os ângulos de torção. Nesta etapa, os dados que já são conhecidos – os quais foram obtidos nas etapas 1 e 2, tais como os parâmetros de rede, volume da cela unitária e a melhor solução de grupo espacial – são usados em conjunto com a estrutura química do composto que é construída em um modelo 3D (tridimensional), para dar início ao processo de determinação estrutural.

Por fim, a melhor solução encontrada no processo de *simulated annealing* é considerada como modelo inicial no refinamento de Rietveld [55], isto é, considerando que se obteve uma solução de estrutura suficientemente boa, logo uma estrutura de alta qualidade pode então ser obtida por meio de um refinamento do modelo estrutural na fase de refinamento da estrutura. O refinamento de Rietveld representa a última etapa do procedimento e a convergência do refinamento é avaliada com base nos fatores de qualidade do ajuste, conhecidos como:  $R_{exp}$ ,  $R_{wp}$ ,  $R_{Bragg}$  e  $\chi^2$  [56], além da análise visual do gráfico de Rietveld. Mais detalhes a respeito desses fatores de qualidade serão apresentados na seção 3.2 (o método de Rietveld).

Convém enfatizar que a solução de uma estrutura cristalina não é um processo trivial e, portanto, necessita ser feita com muito critério, além de requerer muito tempo. Além disso, é de fundamental importância a familiaridade com as características cristalográficas, bem

como o conhecimento químico do composto em questão, pois a utilização de tais informações é necessária para que se chegue à correta solução da estrutura cristalina.

### 3.2 - O método de Rietveld

O método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas [36, 40, 42] tem mostrado um grande potencial para a identificação e quantificação de compostos orgânicos. Este método realiza um ajuste do modelo teórico ao padrão observado, refinando os fatores instrumentais e os parâmetros estruturais característicos da amostra que se deseja analisar. Entretanto, o método é limitado aos casos onde a estrutura cristalina é conhecida. 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 refinamento. Com o uso do método de Rietveld também é possível realizar a análise quantitativa de fases, e utilizando o método do padrão interno em conjunto com o método de Rietveld, pode-se determinar a fração de amorfo de um dado composto. Resultados recentes obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram a aplicabilidade do método de Rietveld como ferramenta para quantificar a fração de amorfo da celulose microcristalina [31], que é um excipiente amplamente utilizado pela indústria farmacêutica.

Uma das vantagens do método de Rietveld é a obtenção de um padrão de difração por modelos matemáticos, eliminando a necessidade de preparação de amostras padrão para comparação das intensidades dos picos. Sendo assim, os dados de difração são usados da maneira que saíram do difratômetro, sem necessidade de qualquer tratamento, ou seja, os dados observados não sofrem qualquer alteração, o que segue o critério científico de que as observações não devem ser modificadas para serem analisadas. O principal argumento para o uso do método de Rietveld na área de fármacos é a qualidade de informações que se obtém com sua aplicação [57]. Convém enfatizar, ainda, que uma grande quantidade de cálculos está envolvida no método, portanto, são necessários programas computacionais bem descritos para isso [40]. O GSAS (*General Structure Analysis System*<sup>®</sup>) [58] e o *Topas-Academic* [47] são exemplos de programas empregados para tal finalidade.

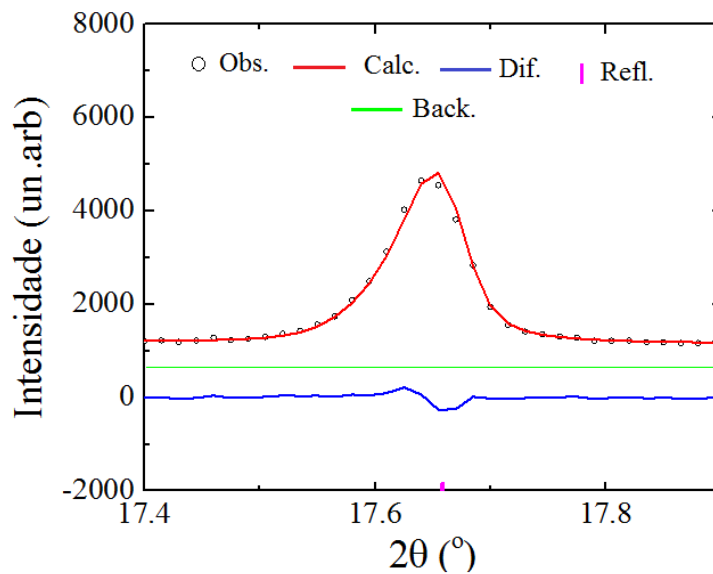
Os refinamentos pelo método de Rietveld são realizados pelo método de mínimos quadrados, ou seja, a soma do quadrado da diferença para todos os pontos do difratograma deve ser minimizada para o conjunto de parâmetros utilizados na simulação, em que a quantidade a ser minimizada é dada pela equação 2, chamada função minimização ( $S$ ).

$$S = \sum_i W_i (y_i - y_{ic})^2 \quad (2)$$

em que  $S$  é a somatória da diferença entre  $y_i$  (intensidade medida no  $i$ -ésimo passo) e  $y_{ic}$  (intensidade calculada para a mesma posição) multiplicada pelo fator de peso  $w_i = 1/y_i$ . Essa soma se estende por todos os pontos do difratograma.

Um refinamento é considerado satisfatório (Figura 18) quando a linha que representa o difratograma calculado (linha contínua vermelha) se sobrepõe à linha que representa o difratograma observado (círculos em preto), e a linha de diferença (linha contínua azul) equivale a uma reta.

**Figura 18** – Componentes do gráfico de Rietveld, com o difratograma calculado (linha contínua vermelha); observado (o em preto); radiação de fundo ou *background* (linha contínua verde); a diferença entre o observado e o calculado (linha contínua azul) e o pico de Bragg (barra vertical magenta).



Fonte: Ilustração elaborada pela pesquisadora Amanda L. Ibiapino.

É válido mencionar que para a análise dos resultados obtidos com os refinamentos de Rietveld, não basta apenas a observação gráfica mostrada anteriormente, como também deve-se avaliar, principalmente, alguns índices que descrevem a qualidade do refinamento [56]. Sendo assim, os índices mais comumente usados, os quais descrevem a qualidade do refinamento são:

$R_{wp}$  – fator de  $R$ -perfil ponderado (equação 3).



$$R_{wp} = 100 \frac{\sum_i w_i (y_{i(obs)} - y_{i(calc)})^2}{\sum_i w_i y_i^2} \quad (3)$$

Se durante o refinamento  $R_{wp}$  está diminuindo, então o refinamento está sendo bem sucedido. Ao final do refinamento ele não deve estar mais variando, significando que o mínimo já foi atingido. Se  $R_{wp}$  está aumentando, então algum(s) parâmetro(s) está(ão) divergindo do valor real e o refinamento deve ser interrompido para uma análise mais detalhada dos parâmetros que estão sendo refinados [57].

$R_{exp}$  – valor estatisticamente esperado para  $R_{wp}$ , exemplificado pela equação 4.

$$R_{exp} = 100 \left[ \frac{(N-P)}{\sum w_i y_{i(obs)}^2} \right]^{1/2} \quad (4)$$

Na equação acima,  $P$  é o número de parâmetros refinados e  $N$  é o número de pontos observados.

$\chi^2$  – é o fator de qualidade do ajuste (“*goodness of fit*”): compara o valor de  $R_{wp}$  obtido com o esperado  $R_{exp}$ , sendo definido pela equação 5:

$$\chi^2 = \frac{R_{wp}}{R_{exp}} \quad (5)$$

O índice  $\chi^2$  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 [56].

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 [59]. O único índice que descreve a qualidade do modelo estrutural refinado é o  $R_{Bragg}$  (*fator de Bragg*) [42].

O  $R_{Bragg}$  é descrito como uma função das intensidades integradas dos picos como pode ser visto na equação 6.

$$R_{\text{Bragg}} = \frac{\sum |I_{k(\text{*obs*})} - I_{k(\text{calc})}|}{\sum I_{k(\text{*obs*})}} \quad (6)$$

em que  $I_k$  é a intensidade integrada da reflexão de Bragg de índice  $k = (hkl)$  ao final dos ciclos de refinamento. Como a intensidade integrada está relacionada com a estrutura cristalina (tipos de átomos, posições e deslocamentos atômicos), esse é o índice a ser considerado ao avaliar a qualidade do modelo refinado da estrutura cristalina [59]. Um  $R_{\text{Bragg}}$  inferior ou igual a 5 % sugere uma boa concordância entre o modelo estrutural refinado e o modelo real [56].

### 3.2.1 - Aplicação do método de Rietveld para análise quantitativa de fases

O método de Rietveld tem se firmado como uma ferramenta para a análise quantitativa de fases [59], isto por ser um método confiável utilizado para determinar as quantidades de componentes amorfo [31] e cristalinos em misturas multifásicas.

A análise quantitativa de fases pelo método de Rietveld baseia-se em duas considerações. A primeira fundamenta-se no fato de que as intensidades dos picos de uma fase dependem da sua concentração (massa) na amostra. Ou seja, em uma mistura de duas fases (fase A e fase B), quanto maior a concentração da fase A, maior a intensidade relativa de todos os picos dessa fase com relação aos picos da fase B. Já a segunda consideração é baseada no fato do fator de escala de cada fase analisada ser proporcional à sua massa. Desta maneira, se a quantidade de amorfo é desprezível, é possível determinar a fração em massa de cada fase com o uso da equação de Hill e Howard [60]:

$$W_p = \frac{S_p (ZMV)_p}{\sum_{i=1}^n S_i (ZMV)_i}$$

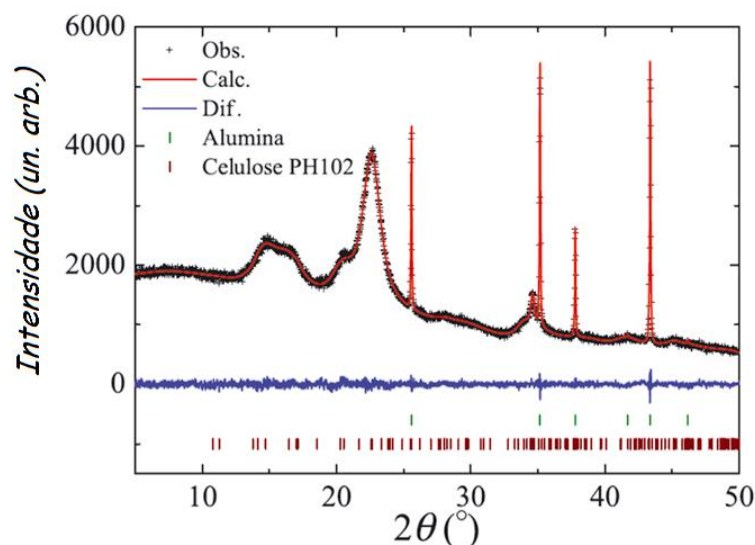
em que  $W$  é a fração relativa em massa da fase  $p$  em uma mistura de  $n$  fases;  $S$ ,  $Z$ ,  $M$  e  $V$ , são respectivamente, o fator de escala, o número de fórmula unitária por cela unitária, a massa da fórmula unitária (em unidade de massa atômica) e o volume da cela unitária (em  $\text{\AA}^3$ ).

Por outro lado, há casos em que a quantificação da fração de amorfo é desejável. Para tanto, se utiliza um padrão interno, o qual deve ser refinado como mais uma fase

cristalina [31, 40, 59]. Uma vez que o padrão interno é introduzido em uma quantidade conhecida, os cálculos são realizados de forma a fornecer essa mesma quantidade ao final de cada ciclo do refinamento. Ou seja, após cada ciclo a proporção é determinada e multiplicada por um fator de escala a fim de fornecer a mesma quantidade adicionada. As demais fases são corrigidas pelo mesmo fator de escala. Dessa maneira, a soma de todas as fases refinadas, incluindo o padrão interno, deverá ser menor do que 100 %. A diferença para 100 % é a proporção de amorfo. Quando se utiliza o programa *GSAS* [58] os cálculos para se determinar a fração de amorfo devem ser feitos à mão. Já o software *Topas-Academic* [47] fornece a fração de amorfo ao final do refinamento. Abaixo será mostrado, a título de exemplo, como tal ferramenta vem sendo utilizada pela comunidade científica.

Neste trabalho, o software empregado foi o *Topas-Academic* v.5 (citado anteriormente) e foi adicionado como padrão interno a alumina (SRM 676a). O padrão interno utilizado é um *Standard Reference Material* comercializado pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST - do inglês, *National Institute of Standards and Technology*) dos Estados Unidos. Após a desconvolução da quantidade conhecida de alumina que havia sido acrescentada (12,56 % em massa), a quantificação da fração de amorfo resultou em 51,0(11) % em massa para a celulose microcristalina PH-102 [31]. A Figura 19 mostra o refinamento de Rietveld da celulose microcristalina PH-102 com a adição do padrão interno (alumina).

**Figura 19 - Refinamento de Rietveld da celulose microcristalina PH-102 com a adição do padrão interno (alumina). Nota-se claramente que a alumina foi escolhida como padrão interno, principalmente, pelo fato de não apresentar picos com sobreposições aos picos de maior intensidade do excipiente em estudo.**



Fonte: Adaptado da referência [31].

É de grande relevância enfatizar que em muitos casos há sobreposições de picos de difração, porém, mesmo nestes casos, o referido método permite a definição das posições e intensidades das reflexões de Bragg, de modo que as intensidades das reflexões de cada fase podem ser avaliadas com boa precisão. Desta maneira, o método de Rietveld não se restringe apenas a uma determinada faixa do padrão de difração, e sim a todo o padrão de difração, o que possibilita uma maior precisão nos resultados de análise quantitativa quando comparado aos métodos tradicionais que utilizam reflexões isoladas. Entretanto, é desejável que todo cuidado seja tomado para que haja uma correta preparação das amostras, ou seja, todo o esforço deve ser feito a fim de evitar a orientação preferencial dos cristalitos [31], pois esta afeta inadequadamente as intensidades dos picos, influenciando nos resultados quantitativos.

### **3.3 - Análise Térmica**

A definição aceita de análise térmica, como dada por Mackenzie [61] e a Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC) é: “Um grupo de técnicas nas 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”.

Embora exista um número grande de técnicas de análise térmica, a calorimetria exploratória diferencial (DSC - do inglês, *Differential Scanning Calorimetry*) e a termogravimetria (TG - do inglês, *Thermogravimetry*) destacam-se na área farmacêutica, sendo utilizadas pelos farmacêuticos e pesquisadores há mais de 30 anos [62]. A seguir serão apresentadas algumas peculiaridades das referidas técnicas.

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

DSC é uma técnica de análise térmica que tem sido utilizada por várias décadas e é aplicada para uma variedade de materiais como produtos farmacêuticos, polímeros, alimentos e substâncias inorgânicas [40].

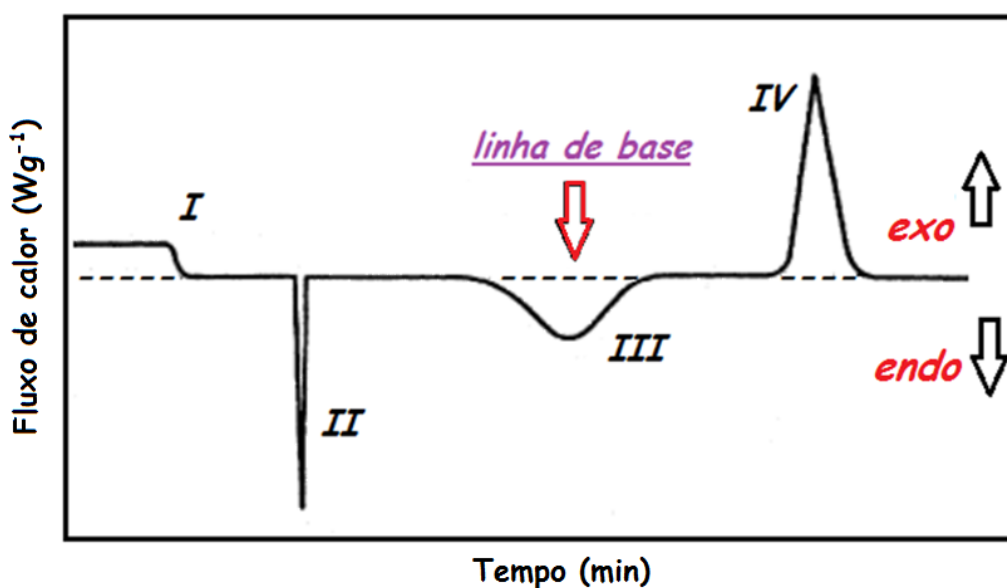
Existem dois tipos de instrumentos que realizam as medidas: DSC com compensação de potência, no qual a amostra e a referência são aquecidas em compartimentos separados, ou seja, individualmente; e outro é o DSC com fluxo de calor, sendo que este último foi utilizado neste trabalho.

Nas medidas de DSC com fluxo de calor, a amostra e a referência são colocadas sobre um disco termoeletrico e aquecidas por uma única fonte de calor. Neste sistema, o calor é transferido através do disco termoeletrico para a amostra e a referência, e o fluxo de calor diferencial entre ambas é monitorado por termopares [63].

Os registros das curvas de DSC 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  $\text{cal}\cdot\text{g}^{-1}$  [64]. Os eventos térmicos observados podem possuir características endotérmicas ou exotérmicas, portanto, a fim de distinguir tais eventos, é importante verificar a orientação dos registros que sempre é disposta no termograma [40].

Uma curva típica resultante de um experimento de DSC para uma dada amostra é representada na Figura 20, onde são representados estes eventos.

Figura 20 – Curva genérica para um experimento de DSC; I) mudança de linha de base sem pico; II e III) picos endotérmicos; IV) pico exotérmico.



Fonte: Adaptado da referência [65].

Desta maneira, com o uso da técnica de DSC, é possível acompanhar os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como: fusão, sublimação, vaporização, dessolvatação (que geralmente são eventos endotérmicos); e a cristalização, oxidação e algumas reações de decomposição (normalmente processos exotérmicos). Nestes

experimentos, a forma, posição e número de picos são úteis para análise qualitativa, enquanto a área sob os mesmos é de interesse quantitativo [65]. Desse modo, torna-se importante conhecer como fatores externos podem afetar estas características para análise adequada dos resultados e sua reprodutibilidade. Compreende ainda mencionar, que a técnica de DSC tem como principais vantagens a versatilidade e a necessidade de pequenas quantidades de amostra para ser desenvolvida, o que torna o seu uso ainda mais atraente no presente trabalho.

### 3.3.2 - Considerações gerais para interpretação dos parâmetros obtidos por DSC

Para facilitar o entendimento dos dados obtidos por DSC, algumas definições se fazem necessárias, pois estes termos foram utilizados nas discussões que serão apresentadas para o fármaco em estudo.

- Temperatura *onset* ( $T_{onset}$ ): é a temperatura onde a transição começa a desviar-se da linha de base. A endoterma de fusão pode ser descrita e caracterizada pela  $T_{onset}$ .

- Temperatura do pico ( $T_{peak}$ ): é a distância máxima da linha de base à temperatura medida no ápice do evento (pico), endotérmico ou exotérmico.

- Temperatura *endset* ( $T_{endset}$ ): é conhecida como a temperatura final extrapolada.

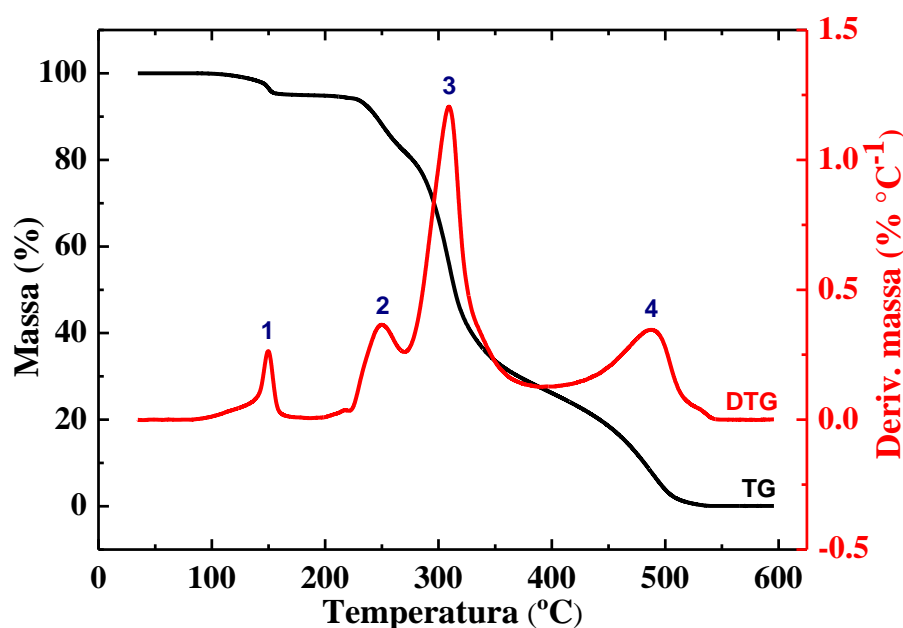
Nesta tese, tais temperaturas foram extraídas do programa *TA Universal Analysis*, uma vez que as mesmas expressam alto grau de confiabilidade para o início e o fim de cada evento térmico.

### 3.3.3 - Termogravimetria (TG)

A TG pode ser definida como a técnica de análise térmica em que a variação de massa da amostra, seja ela perda ou ganho, é determinada como uma função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura [66]. Diferentemente dos resultados obtidos por DSC, as curvas de TG só apresentam eventos térmicos cuja variação de massa ( $\Delta m$ ) está envolvida e a avaliação dos resultados permite determinar a estabilidade térmica do material, a composição e a estabilidade térmica dos compostos intermediários e final. As determinações quantitativas por TG podem ser obtidas diretamente a partir dos degraus de perda de massa em função da temperatura (T) ou do tempo (t), evidenciados nas curvas. A fim de facilitar tais determinações e aumentar a exatidão e precisão da medida, e ainda melhorar a visualização do início e final dos eventos térmicos, pode-se trabalhar com a derivada primeira da curva de termogravimetria (DTG). A DTG nada mais é do que um arranjo matemático, no qual a derivada da variação de massa em

função da temperatura ou do tempo pode ser obtida. Estas curvas, por permitirem a melhor visualização de eventos térmicos correspondentes à variação de massa quando comparadas com as curvas de TG, facilitam, por exemplo, a diferenciação de eventos térmicos sobrepostos. A Figura 21 mostra uma curva de TG obtida experimentalmente e sua respectiva curva DTG.

**Figura 21 – Curvas TG/DTG da lactose monohidratada, evidenciando quatro eventos de perda de massa.**



Fonte: Adaptado da referência [40].

Pode-se dizer que o equipamento da análise termogravimétrica é composto basicamente pela termobalança. O equipamento pode mudar de configuração de um fabricante para outro, mas os fundamentos de todos eles são os mesmos. A termobalança é um instrumento que permite a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura ou tempo, ou seja, à medida que ela é aquecida ou resfriada [67].

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

A espectroscopia no infravermelho é certamente uma das mais importantes técnicas analíticas à disposição dos cientistas atuais. Essa técnica tem sido amplamente utilizada no

controle de qualidade dos processos industriais, tais como indústria farmacêutica, alimentar, têxtil, dentre outras. Esse crescimento é justificado por ser uma técnica com análise não destrutiva, podendo ser feita sem tratamento prévio da amostra, pela rapidez e facilidade da execução e seletividade do método [68].

A referida técnica vem sendo utilizada desde o final de 1950 para fins qualitativos, que juntamente com a espectroscopia de ressonância magnética nuclear revolucionou o modo como os químicos passaram a identificar espécies orgânicas, inorgânicas e biológicas. Naquela época, com o uso de instrumentação dispersiva, os resultados quantitativos de infravermelho eram de qualidade inferior aos obtidos com espectroscopia de ultravioleta-visível. Em delineamentos atuais, empregando o tratamento do espectro por transformada de Fourier, houve melhora considerável nos resultados [40]. Embora a computação da transformada de Fourier seja algo complexo, ela é facilmente processada pelos computadores pessoais modernos de alta velocidade e baixo custo.

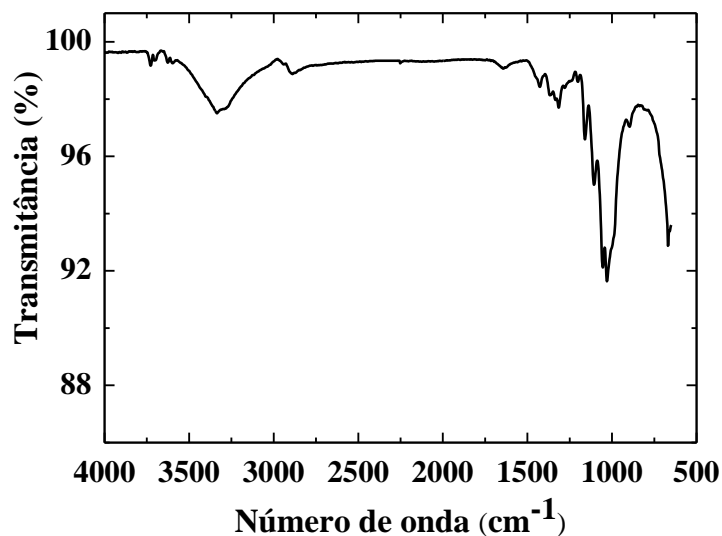
A região espectral que corresponde ao infravermelho compreende à radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a  $10\text{ cm}^{-1}$ . Do ponto de vista da aplicação, como dos instrumentos empregados, o espectro de infravermelho é dividido em três regiões distintas, sendo o infravermelho 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  $10\text{ cm}^{-1}$  [40, 42]. Entretanto, a região do infravermelho médio (MID) é a mais utilizada pelos químicos orgânicos, pois nessa região ocorrem essencialmente transições fundamentais e existe uma faixa espectral conhecida como região de “impressão digital”.

### 3.4.1 - Modos vibracionais e o espectro de absorção

As vibrações que as moléculas sofrem, resultantes da interação da radiação infravermelha com a amostra, correspondem à energia de fótons no infravermelho, ou seja, há a absorção dos fótons pela molécula originando o espectro de absorção no infravermelho. O espectro é um gráfico em que as posições das bandas estão no eixo das abscissas (horizontal), apresentadas em número de onda, cuja unidade é o centímetro inverso ( $\text{cm}^{-1}$ ) e no eixo das ordenadas (vertical) temos as intensidades das bandas que podem ser expressas como transmitância (Figura 22) ou absorbância (Figura 23). A transmitância é conceituada como a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide; e a absorbância é o logaritmo decimal do inverso da transmitância.

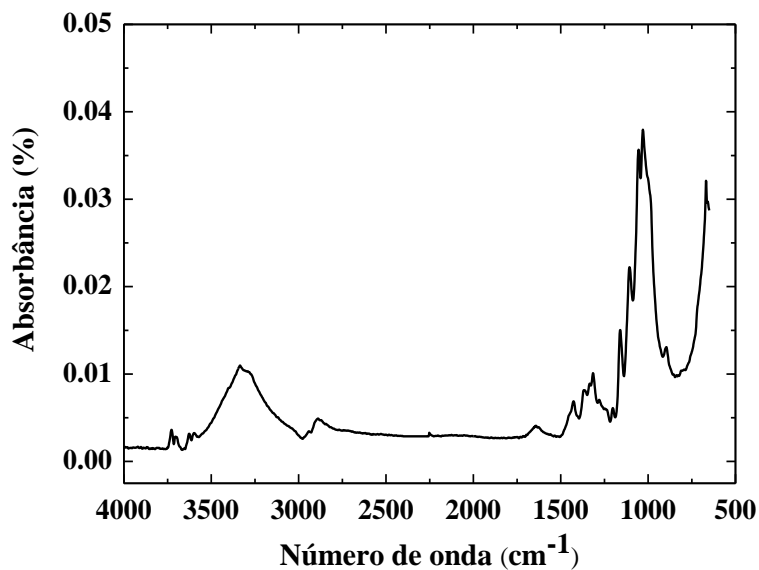


Figura 22 – Espectro de FTIR da celulose microcristalina PH-101 (expresso em transmitância).



Fonte: Adaptado da referência [31].

Figura 23 – Espectro de FTIR da celulose microcristalina PH-101 (expresso em absorbância).



Fonte: Adaptado da referência [31].

É válido mencionar que para a interpretação de um espectro de infravermelho não existem regras específicas [69], devendo-se levar em conta certos requisitos antes de tentar a interpretação, tais como:

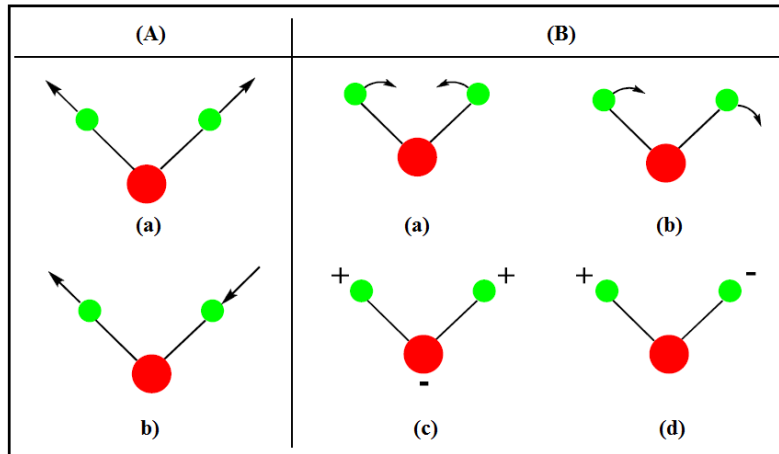
- O espectro deve ter resolução adequada e intensidade razoável;

- O espectrômetro deve ser calibrado com padrões (varia um pouco dependendo do modelo do aparelho), de forma que as bandas sejam observadas nas frequências ou comprimentos de ondas corretos;

- O método de manipulação da amostra deve ser especificado, assim como a mesma deve ser razoavelmente pura.

Em geral, os espectros são interpretados a partir de comparações empíricas com outros espectros e da extrapolação de resultados obtidos com moléculas mais simples [69]. Além disso, é importante que se saiba que essas vibrações citadas podem ser deformações axiais (estiramento) e angulares, sendo que a primeira delas advém da variação na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. O segundo caso se relaciona à variação no ângulo entre duas ligações e pode ser ainda do tipo simétrica no plano, assimétrica no plano, simétrica fora do plano e assimétrica fora do plano. A Figura 24 ilustra, a título de conhecimento, os tipos de deformações que dão origem ao espectro vibracional.

**Figura 24 – (A) Tipos de estiramento: (a) simétrico (b) assimétrico (B) Tipos de deformações angulares: (a) simétrica no plano, (b) assimétrica no plano, (c) simétrica fora do plano e (d) assimétrica fora do plano. Os sinais + e - indicam que o movimento é perpendicular ao plano da página.**



Fonte: Adaptado da referência [70].

Segundo a maioria dos autores [71], 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), sendo este último utilizado neste trabalho. A seguir será realizada uma descrição sucinta do método por ATR.

### 3.4.2 - Refletância Total Atenuada (ATR)

O modo de refletância total atenuada (ATR - do inglês, *Attenuated Total Reflectance*) foi desenvolvido simultaneamente e independentemente por N. J. Harrick e Jacques Fahrenfort [72]. Caracteriza-se, basicamente, como 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, tais como sólidos pouco solúveis, pós, pastas, entre outras. É também adequado para caracterização de materiais que sejam demasiado finos ou que absorvam demasiadamente quando analisados por espectroscopia de transmissão. 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).

A dificuldade em se obter uma boa reprodutibilidade no contato da amostra com o elemento de ATR é um fator de limitação dessa técnica. Isto é observado na variação da intensidade das bandas com a pressão aplicada. Conforme se emprega a pressão, aumenta-se a eficiência de contato e, por conseguinte, as intensidades das bandas. Outro fator que influencia na intensidade das bandas para uma boa reprodutibilidade é a área de contato entre o cristal e a amostra. Para aferirem-se as medidas quantitativas deve-se colocar toda a área do cristal em contato com a amostra [40].

### 3.5 - Velocidade de dissolução intrínseca

Os pesquisadores Skinner e Kanfer [73] sugeriram que os principais aspectos físico-químicos pertinentes para absorção de um fármaco seriam a velocidade de dissolução intrínseca e a solubilidade.

A solubilidade é um conceito estático, que se refere a um estado de equilíbrio termodinâmico, enquanto que a velocidade de dissolução é um conceito dinâmico, representando a quantidade ou concentração de fármaco que se dissolve por unidade de tempo. Dessa maneira, uma vez que variações na dissolução podem alterar a eficácia terapêutica de um medicamento durante a avaliação da influência do estado sólido no desenvolvimento farmacotécnico e no controle de qualidade, pode-se esperar uma melhor correlação *in vivo* estudando-se a velocidade de dissolução ao invés da solubilidade [74]. Outro aspecto bastante vantajoso e de extrema importância no desenvolvimento de fármacos é que para os ensaios de dissolução intrínseca, a quantidade requerida do fármaco é bem inferior em relação ao ensaio de solubilidade, e como a velocidade de dissolução intrínseca é

determinada por meio da correlação entre os resultados de massa dissolvida por unidade de área e os tempos de coleta, é possível realizar um monitoramento durante o ensaio em que interferências nos resultados por fatores como transição de forma cristalina (solvatos, hidratos e polimorfos) ou formação de sal, podem ser verificadas pela presença de curvatura nos gráficos obtidos (presença de curvatura positiva ou negativa) [75].

Por dissolução intrínseca entende-se o comportamento de dissolução de uma substância ativa pura, e a determinação da sua velocidade pode ser de grande importância durante os estágios iniciais de desenvolvimento de novas moléculas, nos quais o fármaco encontra-se disponível em quantidade limitada, como é o nosso caso. Dessa maneira, a velocidade de dissolução intrínseca (VDI) é definida como a velocidade de dissolução de uma substância ativa pura, quando são mantidas constantes as condições de área superficial da substância, a temperatura, a velocidade de agitação e o pH do meio [76, 77]. Para o cálculo da VDI é necessário correlacionar-se a quantidade de fármaco dissolvido pelo tempo, obtendo-se, assim, através da regressão linear, a equação da reta. O resultado da VDI será a inclinação da reta, expresso em  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ , ou em alguns casos específicos em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  [74, 76].

É importante mencionar que a VDI tem sido utilizada para caracterizar fármacos em estado sólido, além de permitir a prevenção de problemas com a biodisponibilidade [78], o que nos motiva a utilizá-la nesse trabalho. A título de exemplo, Carini e colaboradores, em 2009 [79], demonstraram que as diferentes formas polimórficas da talidomida apresentam diferentes perfis de dissolução intrínseca que poderiam impactar na biodisponibilidade e, conseqüentemente, na ação farmacológica do fármaco. Diversos estudos de dissolução intrínseca descritos na literatura relatam trabalhos de caracterização que utilizaram a técnica da dissolução intrínseca [80-82].

### **3.6 - Estudos de citotoxicidade**

O questionamento quanto ao uso de animais de laboratório na avaliação de risco dos produtos de uso humano resultou em vários estudos a partir da década de 60, direcionados a metodologias que utilizam células que podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto de animal, com o intuito de avaliar o potencial de citotoxicidade [83]. A citotoxicidade nada mais é do que a capacidade intrínseca de um material – no nosso caso um fármaco – em promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular [84].

O parâmetro mais utilizado para tal avaliação é a verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais [83] e dentre os mais citados na literatura encontramos o MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - descrito por Mosmann [85], em 1983. O ensaio de MTT é baseado em absorção óptica e análise da diminuição da função celular, detectável por produtos de enzimas específicas que determinam atividades vitais. O sal solúvel de MTT, de coloração amarela, é reduzido ao formazan, um precipitado insolúvel púrpura, liberado no meio de cultura. A sua formação é diretamente proporcional ao número de células viáveis (vivas) na placa, ou seja, somente células viáveis conseguem converter o sal amarelo MTT em cristais de formazan, de cor púrpura.

É válido enfatizar que testes *in vitro* vêm substituindo os ensaios *in vivo*, principalmente pelo seu custo reduzido, alta reprodutibilidade e facilidade de realização [83]. Além do fato de colaborar com o princípio dos 3 R's (*reduction, refinement e replacement*) que consiste na redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos [86] .

## 4 - Objetivos

### 4.1 - Objetivos gerais

O principal objetivo deste trabalho consiste em realizar a determinação estrutural do fármaco antineoplásico LASSBio-1735 planejado e sintetizado no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>), utilizando dados de difração de raios X por policristais (DRXP) e um procedimento de *simulated annealing*. Para que se alcance tal objetivo, serão estabelecidas condições para medidas adequadas de DRXP. Além disso, serão utilizadas técnicas complementares, tais como a calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), a fim de fornecer informações que auxiliem na caracterização estrutural do fármaco.

### 4.2 - Objetivos específicos

Determinar a estrutura cristalina do LASSBio-1735 por meio de um procedimento de *simulated annealing* – implementado no programa DASH – utilizando dados de difração de raios X por policristais coletados em geometria de transmissão.

Utilizar técnicas complementares tais como, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier para melhor caracterizar a estrutura do fármaco.

Averiguar a velocidade de dissolução intrínseca do LASSBio-1735.

Avaliar o perfil biológico do LASSBio-1735 visando estabelecer a relação entre estrutura cristalográfica e atividade citotóxica. Para tal, serão realizados os ensaios citotóxicos para detectar a viabilidade de células provenientes de algumas linhagens tumorais selecionadas, as quais ainda não haviam sido testadas, tais como: K562 (leucemia mieloide crônica humana), B16-F10 (melanoma de rato), HepG2 (carcinoma hepatocelular de fígado humano) e Neuro-2A (neuroblastoma de rato).

## 5 - Parte experimental

### 5.1 - Materiais

O fármaco antineoplásico intitulado como “LASSBio-1735” apresenta atividade citotóxica frente às linhagens tumorais HL-60 (leucemia humana), SF-295 (glioblastoma humano), MDA-MB435 (melanoma) e HCT-8 (carcinoma ileocecal – cólon) [12], e foi planejado através de uma importante estratégia – *N*-metilação – de modificação molecular da Química Medicinal, a partir da estrutura do LASSBio-1586. O composto foi planejado e sintetizado no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), da seguinte maneira [12]. Em um balão de 25 mL foram dissolvidos 0,4 g (1,27 mmoles) de LASSBio-1586 em 7 mL de acetona e adicionados 3,82 mmoles de carbonato de potássio. A suspensão resultante foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente por 50 minutos. Após esse intervalo de tempo foram adicionados 0,48 mL (7,63 mmoles) de iodeto de metila e a mistura reacional refluxada em temperatura constante de 40 °C até a conversão total do reagente no produto correspondente, evidenciado por Cromatografia de Camada Delgada (eluente: n-hexano/acetato de etila 50 %). O isolamento foi realizado com a redução do volume de solvente e ressuspensão do sólido obtido em 2 mL de etanol, sendo o mesmo filtrado a vácuo e lavado com éter de petróleo (2,10 mL). O produto foi purificado por recristalização em mistura etanol/água e obtido em rendimento médio de (93,5 ± 5,2) % (n = 2) [12] como um sólido cristalino branco com aspecto de algodão.

Na Tabela 3 são apresentadas algumas características do LASSBio-1735 fornecidas pelo LASSBio<sup>®</sup>, tais como fórmula molecular, composição percentual e massa molecular.

**Tabela 3 – Principais características (fórmula molecular, composição percentual e massa molecular) do LASSBio-1735.**

Fórmula molecular	Composição percentual	Massa molecular
C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	C(65,84 %) H(6,14 %) N(8,53 %) O(19,49 %)	328,36 g·mol <sup>-1</sup>

O LASSBio-1735 foi então submetido a medidas de DRXP, e posteriormente a medidas de DSC, TG e FTIR. Além disso, foram realizados experimentos para avaliar a atividade citotóxica e a velocidade de dissolução intrínseca.

## 5.2 - Condições experimentais das medidas

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

As medidas do análogo da CA-4 foram realizadas em um difratômetro de raios X por policristais STADI-P, da marca Stoe, localizado no Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais (LCCEM) da 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*, modelo Mythen 1K, da Dectris.

As varreduras para o LASSBio-1735 foram realizadas na faixa angular de 3° a 60° (2 $\theta$ ), com passo de 0,015° e tempo de integração de 180 segundos a cada 1,05°. A geometria utilizada foi a de transmissão, com o fármaco acondicionado em capilar de vidro especial n° 14 de 0,5 mm de diâmetro da marca *Hilgenberg*® (Malsfeld, Germany), que foi mantido em rotação durante a coleta de dados.

### 5.2.2 – Análise Térmica

Os estudos termoanalíticos para o fármaco foram realizados na Central Experimental Multiusuário (CEM) da UFABC, com base na calorimetria exploratória diferencial (DSC) e na termogravimetria (TG).

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>. O fármaco foi acondicionado em panela de alumínio hermética, com massas aproximadas de 3-4 mg. A faixa de temperatura na qual foram obtidos os dados de DSC inicia da temperatura de 20 °C até 300 °C.

A curva de TG foi obtida 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 cadinho de platina (Pt) e o intervalo da massa esteve entre 10 e 11 mg. A faixa de temperatura na qual foram obtidos os dados de TG inicia da temperatura ambiente (25 °C) até 600 °C.



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

Os dados espectrais foram adquiridos na faixa de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , em um espectrômetro por transformada de Fourier da marca *PerkinElmer Frontier*, modelo *100 FT-IR*, equipado com um acessório de refletância total atenuada (ATR), com cristal de ZnSe, à temperatura ambiente. O cristal foi limpo entre as leituras das amostras com papel absorvente. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopias Eletrônica e Óptica localizado na UFABC.

### **5.2.4 - Ensaios de dissolução intrínseca**

Os dados de dissolução intrínseca foram obtidos utilizando um equipamento Sirius SDI 300 (*Paraytec, York, UK*), usando como fonte de luz uma lâmpada de xenônio e um filtro de comprimento de onda de 254 nm para detecção. Aproximadamente 10 mg do fármaco foram compactados, usando um torque de 60 cN·m durante 1 minuto, para criar uma superfície plana para a análise. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato pH 6,8 – escolhido por simular o pH do fluido intestinal – e à temperatura de 37 °C, no Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica (DEINFAR), localizado na Universidade de São Paulo (USP).

## **5.3 - Ensaios biológicos**

### **5.3.1 – Cultura de células**

A avaliação da atividade citotóxica do LASSBio-1735 em sua forma anidra e hidratada foi realizada no Laboratório de Prospecção e Caracterização de Bioativos da UFABC em colaboração com o Prof. Dr. Tiago Rodrigues. Os compostos foram avaliados quanto a seus efeitos citotóxicos frente à linhagem tumoral HL-60 (leucemia humana), bem como frente às linhagens tumorais que ainda não haviam sido estudadas, tais como: K562 (leucemia mieloide crônica humana), B16-F10 (melanoma de rato), HepG2 (carcinoma hepatocelular de fígado humano) e Neuro-2A (neuroblastoma de rato), com o intuito de averiguar a relação entre a estrutura cristalográfica e a atividade citotóxica do LASSBio-1735 em suas diferentes formas.

As linhagens tumorais aderentes (B16-F10, HepG2, e Neuro-2A) foram cultivadas em DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco) com elevado teor de glicose, e as células não aderentes (HL-60 e K562) foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 U·mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg·mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, a uma temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Panasonic MCO-19M incubator, Panasonic Healthcare Co., Ltd.). Para os experimentos, as linhagens aderentes foram lavadas duas vezes com solução salina fosfato-tamponada livre de cálcio e magnésio (CMF-BSS) de pH 7,4, desagregadas dos frascos com tripsina/EDTA e suspensas em meio suplementado para serem distribuídas em placas multi-poços.

### 5.3.2 - Determinação da atividade citotóxica

No primeiro momento, a avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método colorimétrico de redução do MTT. Foi realizada a distribuição das células tumorais aderentes ( $6,25 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>) em placas de 96 poços e mantidas a uma temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para adesão, enquanto as células tumorais não aderentes ( $1 \times 10^5$  células·mL<sup>-1</sup>) foram apenas distribuídas em placas multi-poços. O LASSBio-1735 hidratado e LASSBio-1735 anidro foram adicionados a cada poço contendo as células em diferentes concentrações (variando de 1 pM até 10 µM) seguido por incubação durante 24 horas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação foi adicionado a solução de MTT (0,25 mg·mL<sup>-1</sup>) e as amostras foram incubadas por mais 4 horas em estufa. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 % (preparado em 10 mM de HCl) e incubou-se durante a noite para dissolver os cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada no leitor de placa (*BiochromAsys Expert Plus Microplate Reader*, Biochrom Ltd., UK) com comprimento de onda de 570 nm, com 620 nm como referência. O controle foi analisado na ausência do composto LASSBio-1735 e considerado como 100 % de viabilidade.

Além disso, também foi realizado o teste de exclusão do azul de tripano a fim de avaliar a citotoxicidade dos compostos, porém, utilizou-se apenas duas concentrações das formas anidra e hidratada do LASSBio-1735 em células HL-60. As células incubadas com LASSBio-1735 foram centrifugadas a 500 x g durante 6 minutos e ressuspensas em 0,2 mL de RPMI suplementado com FBS a 10 % e 20 µL desta suspensão de células foram adicionados a um volume igual da solução de azul de tripano a 0,016 %. As células foram contadas em

uma câmara de Neubauer, sendo consideradas células não viáveis as que incorporaram o corante, e as viáveis, as células que excluíram o corante azul de tripano.

## **6 - Resultados e Discussões**

Esta seção compreenderá alguns resultados referentes à caracterização físico-química do análogo da CA-4 – LASSBio-1735. Tal estudo foi realizado pelo emprego das técnicas de difração de raios X por policristais (DRXP) aliada ao método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas, calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e velocidade de dissolução intrínseca (VDI). Também serão mostrados nesta seção os ensaios de citotoxicidade.

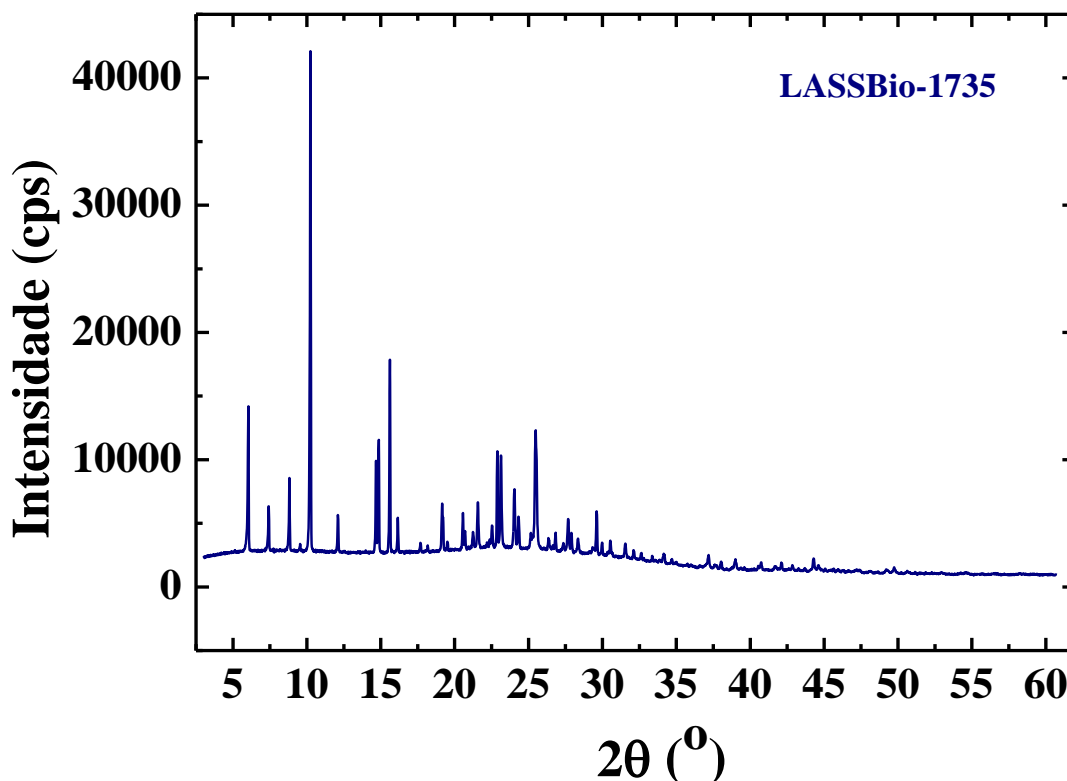
### **6.1 - Fármaco antineoplásico: LASSBio-1735**

O padrão de difração de uma amostra cristalina revela detalhes da estrutura do material pela análise de três tipos principais de informação, que contém: posição angular, intensidade e perfil do pico. Dessa maneira, fatores relacionados à preparação de amostras são considerados a maior fonte de erro na obtenção destas três principais informações de cada reflexão [40, 87]. A orientação preferencial é um bom exemplo disso, e este efeito pode interferir nos resultados do ponto de vista estrutural e influenciar nos resultados quantitativos por afetar inadequadamente a intensidade dos picos. Sendo assim, o efeito de orientação preferencial deve ser evitado ao máximo, principalmente, quando se deseja obter dados de boa qualidade para serem utilizados posteriormente na determinação estrutural.

Tendo em vista tais conhecimentos e sabendo-se que a solução de uma estrutura cristalina não é um processo trivial e, portanto, necessita ser feita com muito critério, optou-se por adotar as melhores condições experimentais para a obtenção dos dados referentes ao fármaco em estudo. O LASSBio-1735 foi acondicionado em capilar de vidro especial n° 14, de 0,5 mm de diâmetro, visando reduzir o efeito de orientação preferencial. Entretanto, convém mencionar que a maioria dos equipamentos convencionais não conta com esta alternativa de porta-amostras, ou seja, não possui a opção de acondicionamento da amostra em capilar de vidro. Além disso, o porta-amostras foi mantido em rotação durante toda a

aquisição de dados, de modo que uma maior quantidade de cristalitos fosse banhada pelo feixe de raios X. Sendo assim, na Figura 25 é mostrado o difratograma de raios X do LASSBio-1735 obtido nessas condições experimentais.

**Figura 25 – Difratograma de raios X do LASSBio-1735, obtido na faixa angular de 3° a 60° (2 $\theta$ ), com passo angular de 0,015° e tempo de integração de 180 segundos a cada 1,05°. O fármaco foi acondicionado em capilar de vidro de 0,5 mm de diâmetro.**



Verificou-se por meio do difratograma de raios X que o LASSBio-1735 apresenta reflexões intensas e características de um composto cristalino. Além disso, verificou-se que os dados experimentais obtidos com a amostra acondicionada em capilar de vidro e com um tempo de integração relativamente alto (180 segundos a cada 1,05°) mostraram-se adequados, demonstrando que foi conveniente a utilização de um difratômetro de alta resolução com a geometria de transmissão, que além de diminuir as sobreposições dos picos, tem a vantagem de fazer com que a forma como as amostras são preparadas no porta-amostras para a aquisição de dados, seja capaz de minimizar o efeito de orientação preferencial (como é o caso do capilar de vidro), visto que uma distribuição aleatória das partículas pode ser obtida em função do modo de preparo dessas amostras.

Uma vez obtido o difratograma de raios X do referido fármaco, proceder-se-á à caracterização estrutural do mesmo. É válido enfatizar que para que se realize a caracterização estrutural é imprescindível que se utilize o método de Rietveld [55]. Entretanto, para proceder-se com um refinamento de Rietveld é necessário que se conheça a estrutura cristalina do material. Tendo em vista que o LASSBio-1735 é uma molécula inédita, cuja estrutura cristalina ainda não foi reportada, proceder-se com a determinação estrutural utilizando os dados obtidos por DRXP foi de grande necessidade e importância. Compreende ainda mencionar, que este método já se mostrou bastante viável, visto os resultados recentes obtidos em nosso grupo de pesquisa (LCCEM) quando da determinação estrutural de diferentes fármacos, por exemplo, o polimorfo I da rifampicina anidra (antituberculostático) [88] e o cloridrato de mefloquina (antimalárico) [89], entre outros.

Dessa maneira, para a primeira tentativa de resolução da estrutura cristalina do LASSBio-1735 foi considerada apenas a molécula do fármaco no interior da cela unitária, sem levar em conta a presença de qualquer hidrato ou moléculas de solvato (água ou etanol, que foram utilizados no procedimento de recristalização do composto). O programa *DASH* [46] foi usado para indexar o padrão de DRXP, ou seja, para determinar as dimensões da cela unitária pelas posições dos picos e do grupo espacial, bem como para a determinação da estrutura cristalina do LASSBio-1735, uma vez que este resolve estruturas cristalinas tendo como partida dados de difração de raios X de boa qualidade.

As 20 primeiras reflexões foram individualmente ajustadas e usadas no procedimento de indexação por meio da rotina *DICVOL91* [48], também implementada no *DASH*, obtendo-se os seguintes valores para uma cela unitária ortorrômbica:  $a = 18,5263 \text{ \AA}$ ,  $b = 23,8284 \text{ \AA}$ ,  $c = 4,2848 \text{ \AA}$  e volume da cela unitária:  $V = 1891,47 \text{ \AA}^3$ .

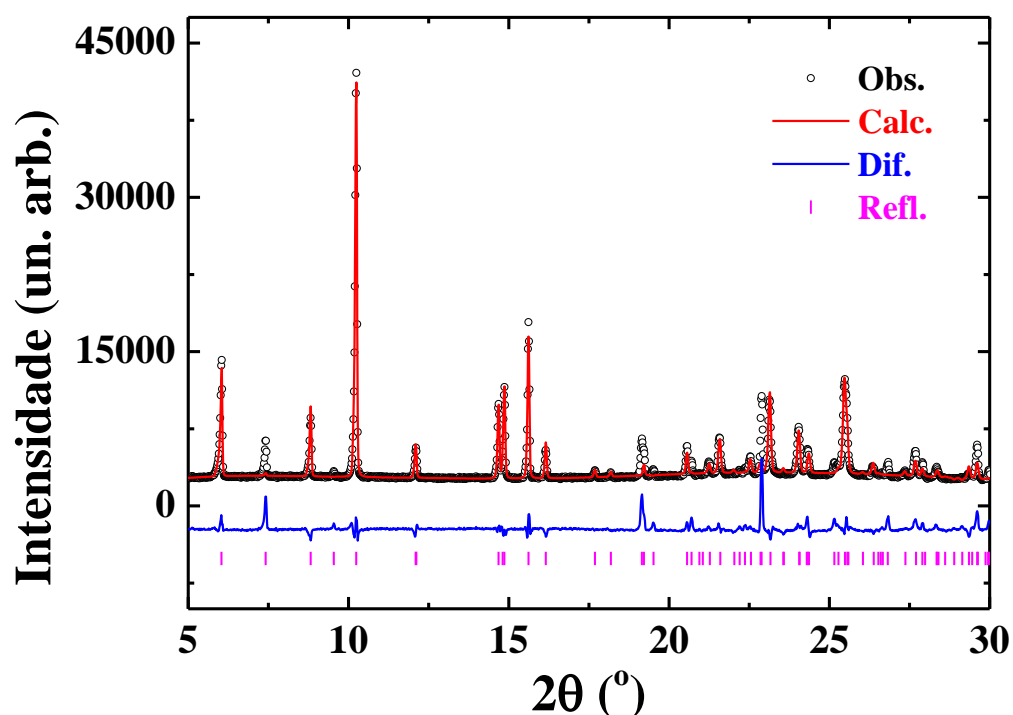
Depois que os parâmetros de cela unitária foram avaliados, prosseguiu-se para o processo de análise das ausências sistemáticas, ou seja, para a obtenção do grupo espacial, por meio de um ajuste de Pawley [53]. Dessa maneira, o grupo espacial foi determinado como sendo  $P2_12_12_1$ .

Com o volume da cela unitária obtido no processo de indexação foi possível fazer uma comparação entre o volume calculado (levando em consideração os volumes individuais médios dos átomos [54]) e o volume estimado na indexação. Por meio desses cálculos, foram sugeridas quatro fórmulas unitárias do LASSBio-1735 por cela unitária ( $Z = 4$ ). A combinação desta informação com a melhor solução de grupo espacial permitiu estimar a existência de uma fórmula unitária do LASSBio-1735 na unidade assimétrica ( $Z' = 1$ ).

Após os valores das dimensões da cela unitária e da melhor solução de grupo espacial terem sido obtidos, partiu-se para a construção da molécula do LASSBio-1735 em um modelo tridimensional (3D) com o auxílio do programa *MarvinSketch version 16.4.25.0* (2016 – <http://chemaxon.com>), e então a molécula do LASSBio-1735, em conjunto com os resultados já obtidos, foram inseridos no programa *DASH* para iniciar o processo de determinação estrutural. Através de um algoritmo de otimização global – *simulated annealing* – foi possível variar parâmetros que descrevessem as coordenadas de posição, orientação molecular e os ângulos de torção (3 graus de liberdade para as posições moleculares, 4, dos quais 3 são independentes para orientações, bem como 8 ângulos de torção flexíveis). Foram realizadas 15 corridas, num total de  $3,0 \times 10^8$  movimentos de otimização global e, em seguida, a melhor solução encontrada no processo de *simulated annealing* foi considerada no refinamento de Rietveld usando o software *Topas Academic v.5* [47].

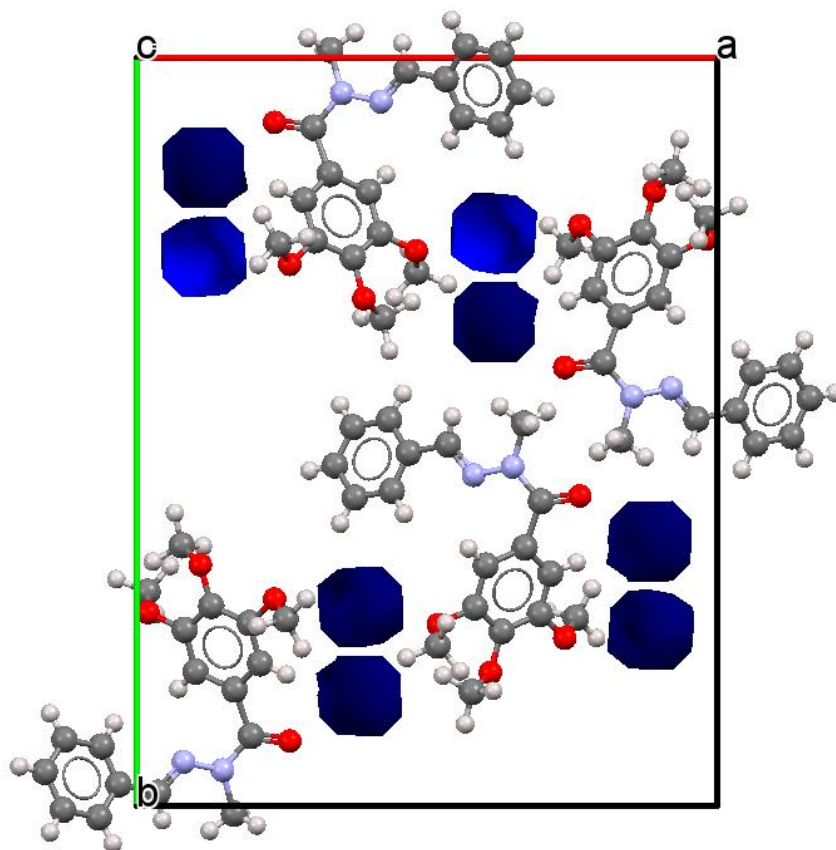
Todavia, como pode ser visualizado pelo refinamento de Rietveld mostrado na Figura 26, não se obteve um bom ajuste dos picos, o que mostra que a estrutura cristalina não está bem resolvida.

**Figura 26** – Região ampliada (5 a 30° em 2 $\theta$ ) do refinamento de Rietveld obtido da primeira tentativa de determinação da estrutura cristalina do LASSBio-1735. O padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado por linhas vermelhas, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições do pico de Bragg pelas barras rosas. Nota-se a falta de concordância de algumas reflexões, entre os padrões observado e calculado, mostrando que não se obteve uma boa resolução da estrutura cristalina utilizando esses dados experimentais.



Com o uso do software *Mercury* [90], que possibilita a visualização da estrutura cristalina em três dimensões, com grande variedade de cores e estilos, foi possível verificar que a solução encontrada para descrever a estrutura cristalina indica claramente a presença de espaços vazios ou “voids” na cela unitária (canais azuis na Figura 27) do LASSBio-1735. Ou seja, como pode ser visto, a estrutura cristalina do LASSBio-1735 não está bem resolvida, o que justifica a discrepância representada pelo ajuste visual após o refinamento de Rietveld (Figura 26). Alternativamente, ao se levar em conta o método proposto por Hofmann [54], ao considerar os diferentes volumes médios ( $\bar{v}_i$ ) de elementos à temperatura de 298 K, o volume calculado para uma molécula de LASSBio-1735 ( $C_{18}H_{20}N_2O_4$ ;  $\bar{v}_i^C = 13,87 \text{ \AA}^3$ ,  $\bar{v}_i^H = 5,08 \text{ \AA}^3$ ,  $\bar{v}_i^N = 11,8 \text{ \AA}^3$  e  $\bar{v}_i^O = 11,39 \text{ \AA}^3$ ) na unidade assimétrica seria  $V_{mol.} = 420,42 \text{ \AA}^3$ . Dessa forma, por meio dessa aproximação ( $V_{cela} / V_{mol.} = 1891,47 / 420,42 = 4,5$ ) é possível verificar que a cela unitária é muito grande para acomodar apenas a molécula do LASSBio-1735 em seu interior.

**Figura 27 – Empacotamento parcial da cela unitária do LASSBio-1735 ao longo do eixo *c*. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinza escuras), oxigênio (esferas vermelha), nitrogênio (esferas azul claras), hidrogênio (esferas cinza claras) e voids (canais azuis).**



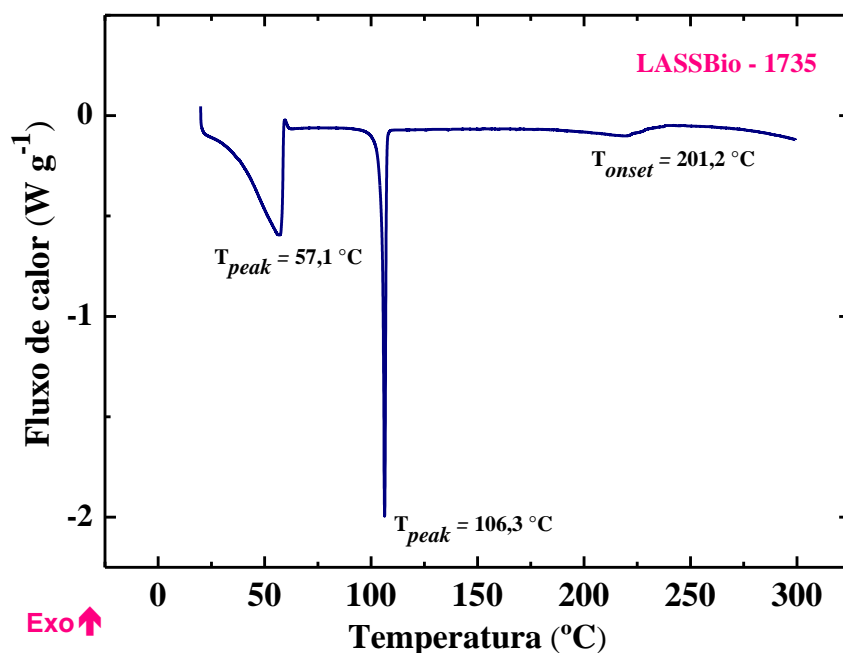
Levando em consideração que para se obter bons padrões de difração, ou seja, dados de boa qualidade de DRXP, devem ser tomados alguns cuidados, tais como a orientação das partículas do pó, que devem ser o mais randômica possível para preservar as intensidades relativas [40], e este cuidado já foi tomado e exemplificado; um segundo procedimento que deve ser realizado é verificar se o difratograma de raios X não contém linhas pertencentes a outras fases. Isto é, determinar se a amostra é constituída de uma única substância ou se contém outras substâncias, pois um dos problemas mais frequentes que impedem a indexação de um dado composto é a presença de impurezas. Portanto, a realização deste segundo procedimento é de grande relevância no presente estudo, uma vez que tal resultado pode nos trazer importantes informações sobre os espaços vazios presentes na estrutura cristalina do LASSBio-1735. Dessa maneira, considerando que pouco se sabe até o momento sobre o comportamento do LASSBio-1735 com o aumento da temperatura, foi dado seguimento à análise dos resultados obtidos com o uso das técnicas de DSC e TG.

#### **6.1.1 – Análise térmica - LASSBio-1735**

Na curva de DSC do LASSBio-1735 (Figura 28) foi observado um evento endotérmico largo em 57,1 °C ( $T_{peak}$ ) que está relacionado ao processo de desidratação, uma vez que as curvas TG/DTG (Figura 29) são acompanhadas por uma pequena perda de massa na mesma região. Posteriormente, foi observado um evento endotérmico bem definido em 106,3 °C ( $T_{peak}$ ) com entalpia de 103,5 J·g<sup>-1</sup>, referente à fusão do LASSBio-1735, que também nos permite inferir que o LASSBio-1735 é um composto cristalino, pois uma estrutura amorfa não apresenta ponto de fusão, uma vez que não existe retículo cristalino. Em seguida inicia-se, a partir de 201,2 °C ( $T_{onset}$ ), um evento exotérmico referente ao processo de decomposição térmica do fármaco.



**Figura 28** – Curva de DSC do LASSBio-1735, obtida a  $2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  ( $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ).



Na Tabela 4 estão indicadas as temperaturas iniciais ( $T_{onset}$ ) e finais ( $T_{endset}$ ) de cada evento térmico observado na curva de DSC.

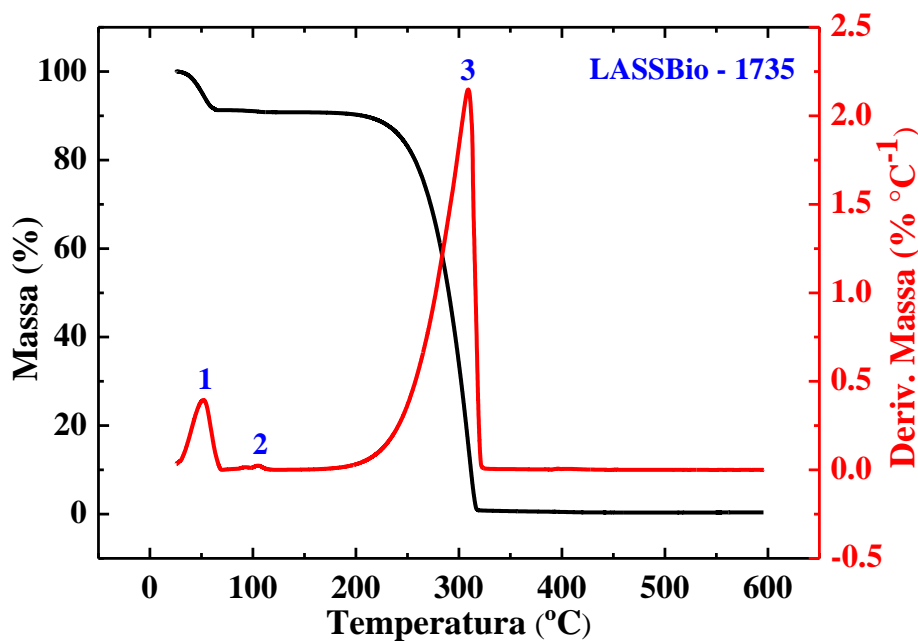
**Tabela 4** – Parâmetros obtidos (software *TA Universal Analysis*) da curva de DSC para o LASSBio-1735.

Eventos (DSC)	$T_{onset}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{peak}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{endset}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
1	33,2	57,1	59,5
2	105,6	106,3	110,9
3	201,2	220,7	239,6

Como mencionado, o primeiro evento endotérmico está relacionado ao processo de eliminação de água, que também foi verificado nas curvas TG/DTG (Figura 29). Este evento causou uma perda de massa ( $\Delta m_1 = 8,9\%$ ) no intervalo de temperatura próximo de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T_{peak} = 51,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) o que nos permite inferir que este fármaco é di-hidratado, o qual apresenta estequiometricamente  $9,8\%$  de água. Acima destas temperaturas, outros dois eventos são observados nas curvas TG/DTG - o primeiro em  $T_{peak} = 105,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  apresentou uma perda de massa de  $0,3\%$  ( $\Delta m_2$ ) e o segundo em  $T_{peak} = 309,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  com uma perda de massa de  $90,4\%$

( $\Delta m_3$ ) com a amostra sendo completamente degradada. Apenas um resíduo de 0,4 % foi observado ao final do experimento.

Figura 29 - Curvas TG (linha preta)/DTG (linha vermelha) do LASSBio-1735, obtidas a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de  $\text{O}_2$  ( $60\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), com massa do fármaco de aproximadamente 11 mg.



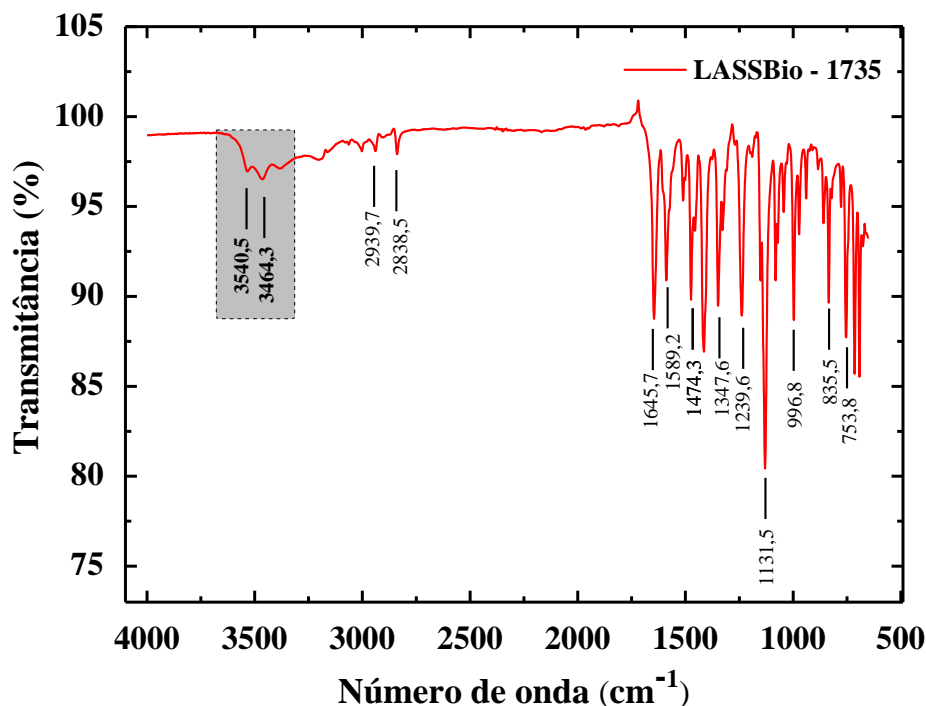
Com base nos resultados obtidos com o uso das técnicas de DSC e TG pôde-se verificar que o LASSBio-1735 é um composto di-hidratado. Além disso, os estudos por DSC e TG ressaltam a importância de se conhecer o comportamento do fármaco com a variação da temperatura, uma vez que a estabilidade térmica do mesmo deve ser avaliada, no que diz respeito às condições ambientais e de armazenamento às quais o fármaco poderá eventualmente ser exposto. Sendo assim, conhecer o maior número de características possíveis da molécula estudada tem um papel crucial no desenvolvimento do fármaco em questão, e o objetivo final sempre é selecionar aqueles que tenham as melhores características para o uso pretendido.

De posse de tais conhecimentos, antes de ser tomada a decisão sobre qual procedimento seria realizado e antes de dar continuidade às novas tentativas de determinação estrutural do LASSBio-1735, optou-se por realizar medidas de FTIR.

### 6.1.2 - Obtenção do espectro de infravermelho do LASSBio - 1735

Para um exame preliminar dos espectros, as duas áreas mais importantes são as regiões de 4000 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  e de 900 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . Entretanto, como a caracterização estrutural já havia sido realizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono e por FTIR, pelo pesquisador Amaral [12], buscou-se identificar bandas que pudessem auxiliar na determinação estrutural do LASSBio-1735. A Figura 30 ilustra o espectro de FTIR obtido para o LASSBio-1735 representando as principais bandas de absorção.

**Figura 30** – Espectro de FTIR do LASSBio-1735, obtido com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  na região de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , em que as principais bandas de absorção que caracterizam a molécula estão destacadas por suas respectivas frequências. A região enfatizada pelo retângulo indica a presença de bandas de interesse para a determinação estrutural da molécula.



A principal região analisada foi a de 4000 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  que é composta de bandas de baixa intensidade, porém de extrema importância no estudo deste fármaco. Notam-se duas bandas em torno de 3540,5 e 3464,3  $\text{cm}^{-1}$  que se referem à região de estiramento O–H ( $\nu_{\text{O-H}}$ ) da água [68, 91, 92], as quais estão enfatizadas pelo retângulo na figura anterior.

Dessa maneira, através da interpretação do espectro de FTIR do LASSBio-1735, pôde-se, principalmente, obter a informação de que o composto apresenta bandas características de estiramento O–H ( $\nu_{\text{O-H}}$ ) da água. Tal resultado confirma o apresentado pelas técnicas de DSC e TG, ou seja, a presença de água por meio de um pico endotérmico em

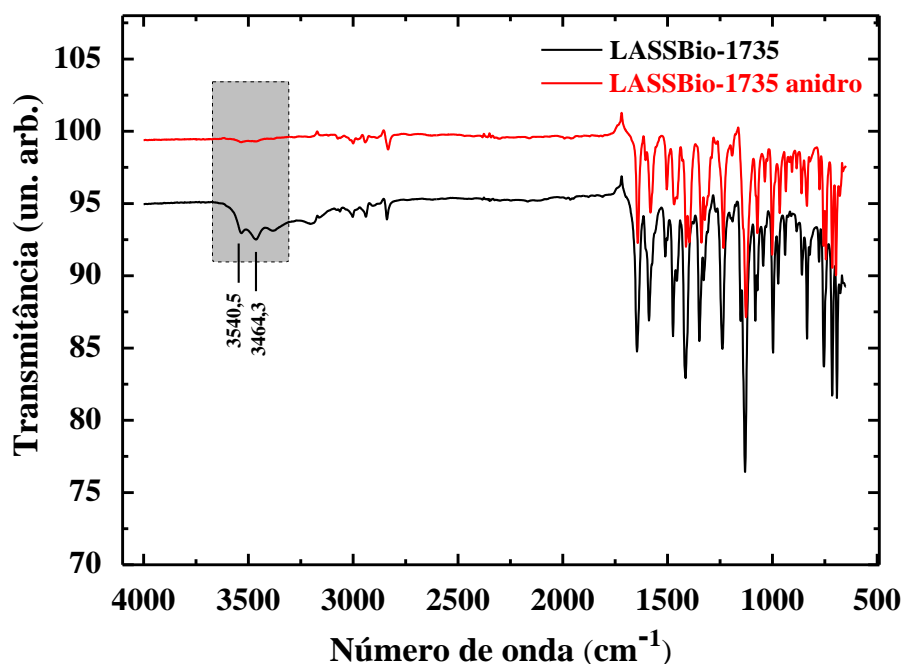
57,1 °C ( $T_{peak}$ ) com pequena perda de massa na mesma região. É válido enfatizar que já foram realizados estudos no *LCCEM* nos quais alguns excipientes farmacêuticos, tais como a celulose microcristalina, croscarmellose sódica e a povidona, apresentaram este mesmo comportamento térmico [40], isto é, apresentaram em suas curvas de DSC um pico endotérmico largo próximo a 50 °C, que é característico de água.

Após verificar a existência de um evento endotérmico em 57,1 °C ( $T_{peak}$ ) mediante a análise da curva de DSC, sabendo-se o ponto de fusão da molécula (106,3 °C ( $T_{peak}$ )) e também com os dados obtidos pelo espectro de FTIR evidenciando bandas características de estiramento O–H ( $\nu_{O-H}$ ) da água, procedeu-se ao tratamento térmico da molécula. Tendo como base tais resultados, foi estabelecido o aquecimento do LASSBio-1735 a temperatura de 50 °C durante o tempo de 1 hora (50 °C/1h) a fim de verificar se seria possível eliminar as moléculas de água, e assim, obter o LASSBio-1735 anidro.

## **6.2 - Obtenção do espectro de infravermelho do LASSBio-1735 anidro**

Após o tratamento térmico, uma nova medida de FTIR foi realizada, e o espectro obtido após tratamento térmico (denominado como LASSBio-1735 anidro) quando comparado ao espectro original exibiu diferenças significativas, como esperado. Houve uma mudança na região de estiramento O–H ( $\nu_{O-H}$ ) da água (3600-3200  $\text{cm}^{-1}$  [68, 91, 92]), ou seja, após o LASSBio-1735 ser submetido a tratamento térmico a 50 °C/1h foi possível constatar o desaparecimento das bandas em 3540,5  $\text{cm}^{-1}$  e 3464,3  $\text{cm}^{-1}$  (características de estiramento O–H ( $\nu_{O-H}$ ) da água), indicando diferenças entre os dois estados de hidratação. Tais diferenças podem ser visualizadas nos espectros de FTIR mostrados na Figura 31. Ademais, os espectros de FTIR mostraram-se sobreponíveis.

Figura 31 – Espectros de FTIR do LASSBio-1735 e LASSBio-1735 anidro, obtidos com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  na região de  $4000$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ .

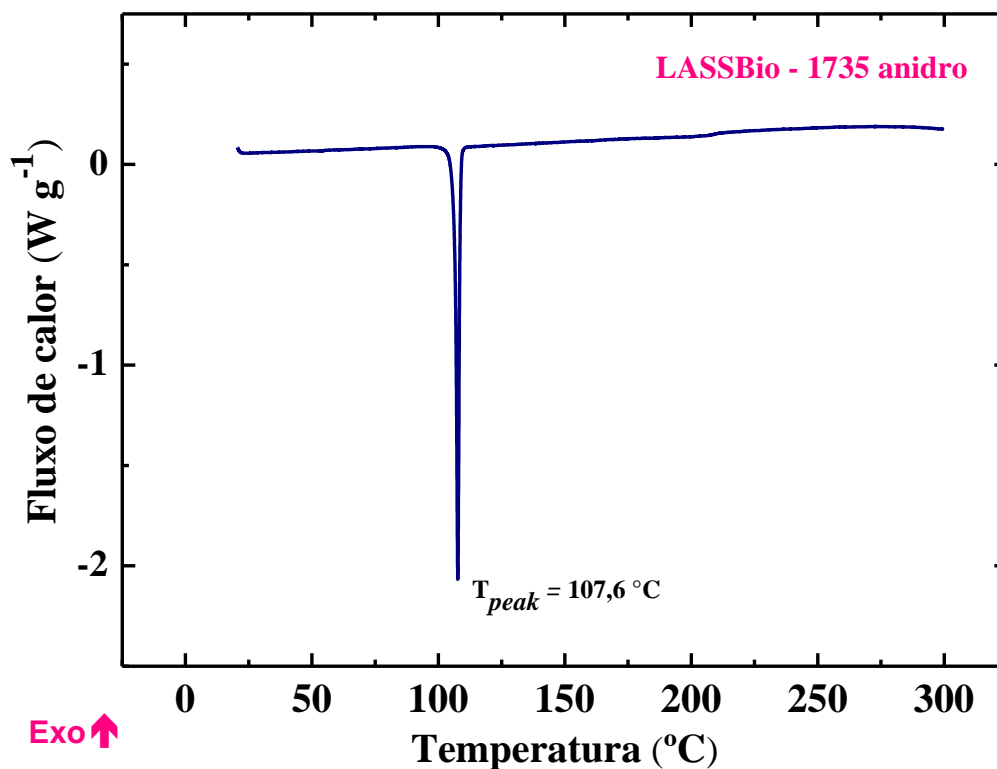


Com o intuito de melhor caracterizar o LASSBio-1735 anidro também foi estudado o comportamento térmico deste composto por meio de sua curva de DSC.

#### 6.2.1 - DSC - LASSBio-1735 anidro

Obteve-se uma curva de DSC do LASSBio-1735 anidro (Figura 32) em que foi observado apenas um evento endotérmico bem definido em  $107,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T_{peak}$ ) com entalpia de  $89,9\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ , referente à fusão do LASSBio-1735 anidro, sendo que tal evento indica que após o aquecimento o composto manteve-se cristalino. Além disso, convém salientar que era esperado apenas este evento após a eliminação da água presente no composto LASSBio-1735, isto é, não era esperado que houvesse o evento endotérmico em  $57,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T_{peak}$ ) – referente à molécula de água, como apresentado na curva de DSC do LASSBio-1735 (Figura 28), por este último se tratar de uma molécula hidratada. Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos por DSC, foi verificado que há diferença entre os estados de hidratação do LASSBio-1735 como mostrado também pelos estudos de FTIR.

Figura 32 - Curva de DSC do LASSBio-1735 anidro, obtida a  $2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  ( $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ).



Após ser realizada a caracterização pelas técnicas de FTIR e DSC do LASSBio-1735 anidro, realizou-se uma nova medida de DRXP com o pó obtido após o tratamento térmico da amostra LASSBio-1735 (forma anidra). Os difratogramas de raios X do LASSBio-1735 anidro e do LASSBio-1735 são mostrados na Figura 33, bem como a região ampliada (5 a  $30^{\circ}$  em  $2\theta$ ) pode ser visualizada na Figura 34. Como pode ser observado, as intensidades dos picos foram normalizadas, a fim de se obter dados que pudessem ser melhores visualizados.

Figura 33 – Comparação entre os difratogramas de raios X normalizados do fármaco LASSBio-1735 (em preto) e do LASSBio-1735 anidro (em vermelho).

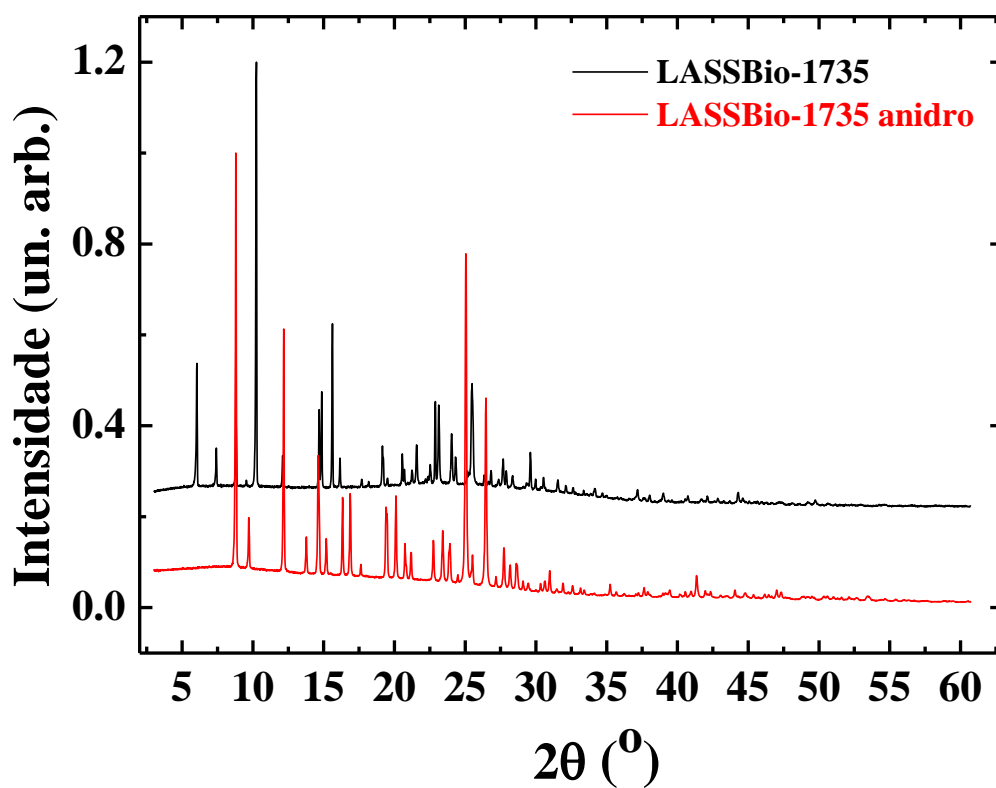
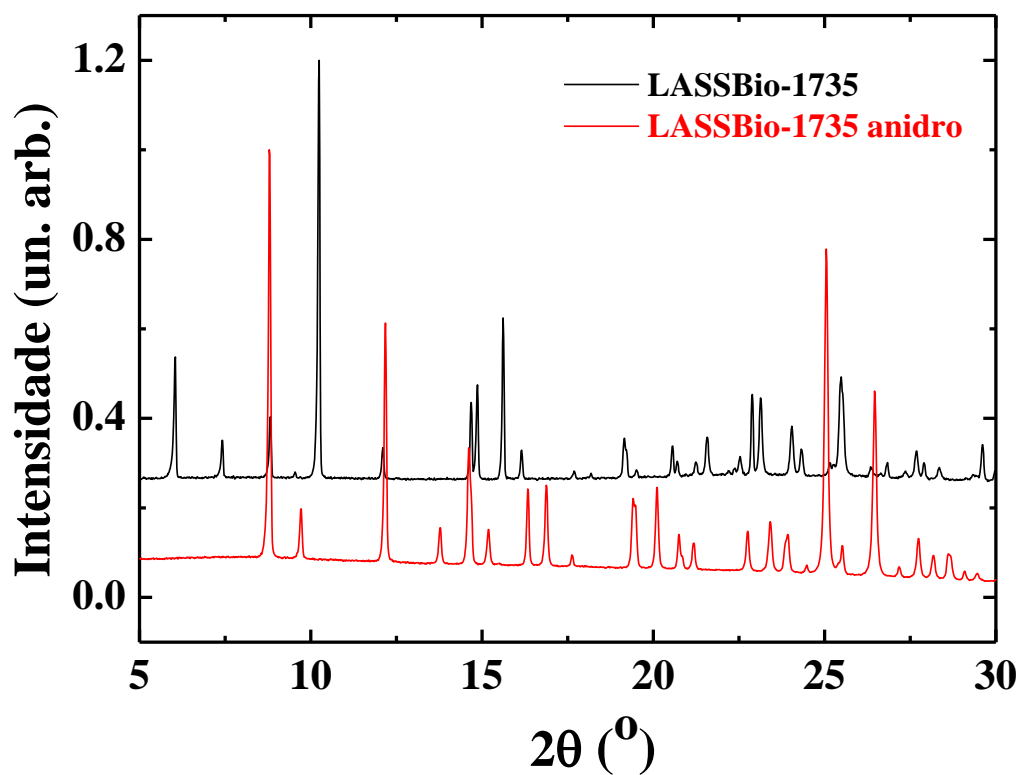


Figura 34 – Região ampliada (5 a 30° em 2θ) enfatizando as diferenças entre os difratogramas de raios X normalizados do fármaco LASSBio-1735 (em preto) e do LASSBio-1735 anidro (em vermelho).



Com base nos resultados apresentados nas Figuras 33 e 34 ficou evidente a mudança na estrutura cristalina do composto aquecido (LASSBio-1735 anidro) quando comparado ao composto LASSBio-1735 (sem tratamento térmico), isto é, a técnica de DRXP foi importante na identificação de alterações nos padrões de raios X, mostrando que a desidratação causa alteração na estrutura cristalina. Além disso, com o uso da técnica, ficou exemplificado que cada material produz um padrão de difração único, como uma impressão digital.

Sendo assim, em posse desses novos resultados de DRXP procedeu-se à tentativa de determinação da estrutura cristalina da molécula LASSBio-1735 anidra, e então desta vez foram obtidos resultados satisfatórios para tal procedimento, conforme será descrito a seguir. Convém enfatizar que a identificação desta nova molécula é de fundamental importância, tendo em vista que é sabido pela literatura que para uma grande parcela de fármacos as suas formas anidras normalmente apresentam maior solubilidade quando comparadas às suas formas hidratadas [93]. Poole e colaboradores realizaram estudos nos quais mostraram que no caso da ampicilina anidra e da ampicilina tri-hidratada, a 37 °C, a solubilidade da forma anidra em água é 20 % maior que a da forma tri-hidratada (10 e 8 mg·mL<sup>-1</sup> para as formas anidra e tri-hidratada, respectivamente). Estudos *in vitro* e *in vivo*, evidenciaram a maior absorção da forma anidra quando comparada a forma tri-hidratada [94]. Neste sentido, a caracterização físico-química do LASSBio-1735 anidro também se torna um objetivo do presente estudo, pois trata-se de uma molécula que ainda não foi relatada e sua descrição servirá para nortear o LASSBio® em futuros estudos envolvendo tanto o LASSBio-1735 hidratado quanto o LASSBio-1735 na sua forma anidra.

Para o procedimento de determinação estrutural foi utilizado novamente o programa *DASH*. Conforme mencionado na seção 3.1.4, a primeira etapa consiste na determinação dos parâmetros da cela unitária. Foram obtidos os seguintes valores para uma cela unitária ortorrômbica:  $a = 18,2297 \text{ \AA}$ ,  $b = 12,0733 \text{ \AA}$ ,  $c = 7,5998 \text{ \AA}$  e volume da cela unitária:  $V = 1672,66 \text{ \AA}^3$ . A melhor solução de grupo espacial obtida foi  $Pna2_1$ . Foram sugeridas quatro fórmulas unitárias do composto LASSBio-1735 anidro por cela unitária ( $Z = 4$ ), acomodando uma fórmula unitária na unidade assimétrica ( $Z' = 1$ ).

Em seguida à obtenção dos valores das dimensões da cela unitária e do melhor grupo espacial, a molécula do LASSBio-1735 anidro foi inserida no programa *DASH* para iniciar o processo de determinação estrutural. Por meio de um algoritmo de otimização global, foi possível ajustar a estrutura da molécula até que a mesma concordasse com os dados observados. Por fim, a melhor solução encontrada no processo de *simulated annealing* foi considerada no refinamento de Rietveld, usando o software *Topas Academic v.5*, e a

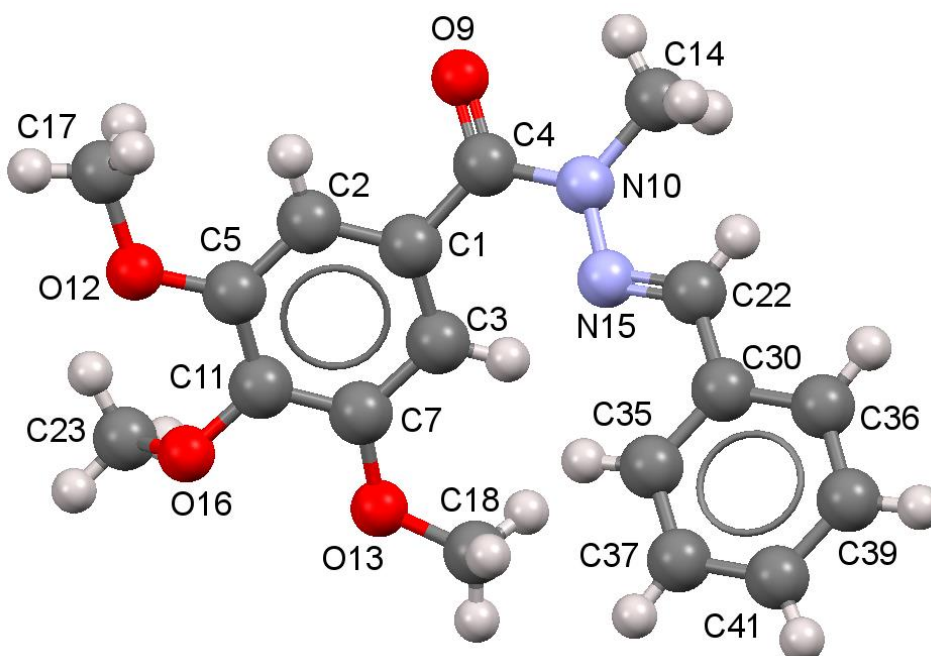


convergência do refinamento foi avaliada através dos fatores de qualidade do ajuste, conhecidos como:  $R_{exp}$ ,  $R_{wp}$ ,  $R_{Bragg}$  e  $\chi^2$  [56].

### 6.2.2 - Descrição da estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro

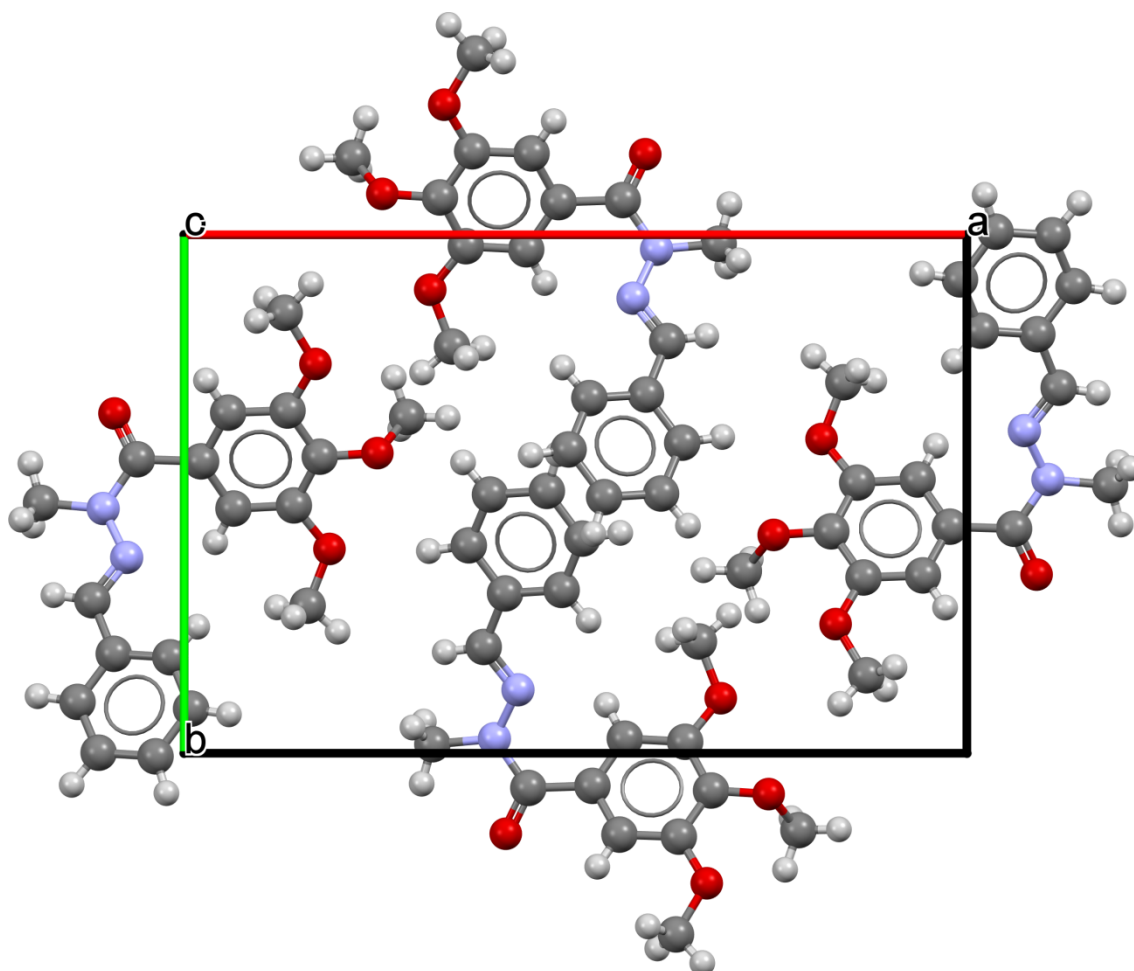
A estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro está representada na Figura 35.

**Figura 35** – Estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro, com seus respectivos átomos, devidamente enumerados na posição em que os átomos estão dispostos na molécula. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinzas), hidrogênio (esferas cinza claras), oxigênio (esferas vermelhas) e nitrogênio (esferas azuis).



É possível visualizar na Figura 36 que a estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro consiste em quatro fórmulas unitárias por cela unitária ( $Z = 4$ ), acomodando uma fórmula unitária ( $Z' = 1$ ) na unidade assimétrica. Por meio da Figura 36 verifica-se também que o efeito da metilação – na subunidade *N*-acilidrazona – levou à perda de um doador de ligação de hidrogênio. Assim, não se observou qualquer interação de hidrogênio na forma anidra do LASSBio-1735. Além disso, por meio da determinação estrutural foi possível verificar a configuração relativa *E* da dupla ligação C=N.

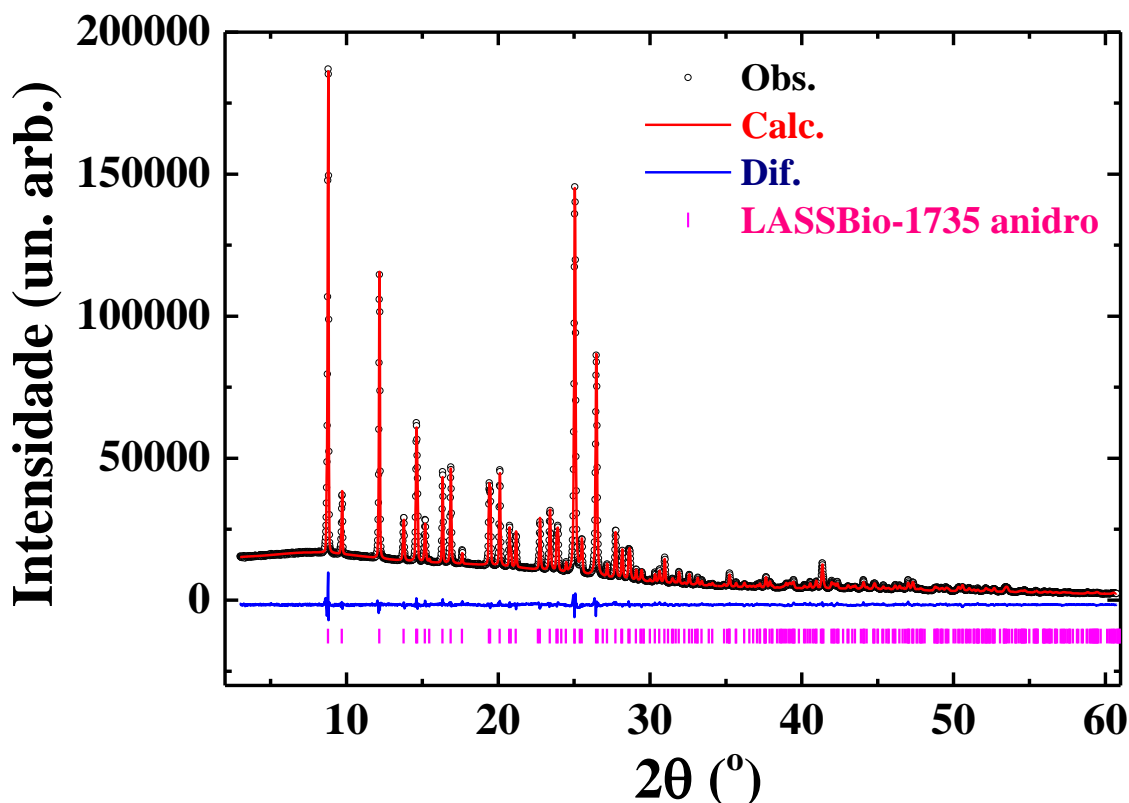
**Figura 36** – Empacotamento da cela unitária ( $Z = 4$ ) do LASSBio-1735 anidro ao longo do *eixo c*. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinza escuras), hidrogênio (esferas cinza claras), oxigênio (esferas vermelhas) e nitrogênio (esferas azuis claras). Vale a pena mencionar a ausência de interações de hidrogênio entre as moléculas.



As coordenadas fracionárias “ $x$ ,  $y$  e  $z$ ” relacionadas à posição de cada átomo estão representadas na seção 9 (anexos), assim como também estão exemplificados na referida seção, algumas distâncias de ligações, ângulos de ligações e torção da molécula LASSBio-1735 anidro. Com relação aos ângulos de torção da molécula e as conformações que ela adota, pode-se destacar que os ângulos de torção envolvendo os átomos C(1)-C(4)-N(10)-N(15) e C(14)-N(10)-N(15)-C(22) foram, respectivamente,  $-23(1)^\circ$  e  $-1(4)^\circ$  e sob estas condições, a molécula está em uma conformação sinperiplanar (*sp*). Por outro lado, os ângulos de torção envolvendo os átomos C(4)-N(10)-N(15)-C(22) e N(10)-N(15)-C(22)-C(30) foram, respectivamente,  $-166(3)^\circ$  e  $-179(6)^\circ$ , e neste caso, a molécula adota uma conformação antiperiplanar (*ap*).

Após a estrutura cristalina ter sido descrita, procedeu-se ao refinamento de Rietveld por meio do software *Topas Academic v.5*. O ajuste visual obtido após o refinamento de Rietveld para o LASSBio-1735 anidro pode ser observado na Figura 37.

**Figura 37** – Refinamento de Rietveld para o LASSBio-1735 anidro, em que o padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado por linhas vermelhas, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições do pico de Bragg pelas barras rosas.



Dessa maneira, verificou-se que o LASSBio-1735 anidro cristalizou-se no sistema ortorrômbico, com grupo espacial  $Pna2_1$  (n° 33). Os valores finais para os parâmetros de rede da cela unitária após o refinamento de Rietveld foram:  $a = 18,2306(3) \text{ \AA}$ ,  $b = 12,0735(3) \text{ \AA}$ ,  $c = 7,6002(1) \text{ \AA}$  e o volume da cela unitária:  $V = 1672,86(5) \text{ \AA}^3$ .

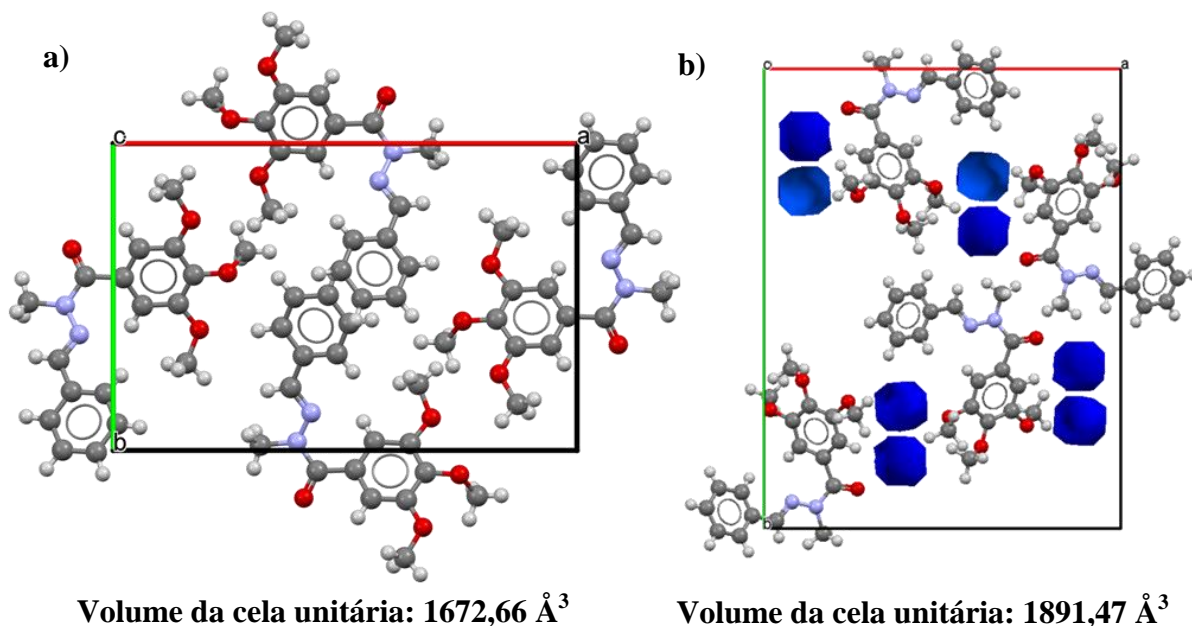
Os índices que expressam a qualidade do ajuste, bem como os detalhes da estrutura cristalina obtidos após o refinamento de Rietveld, podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Detalhes do refinamento de Rietveld da estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro.

<i>Estrutura cristalina</i>	
<b>Fórmula química</b>	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
<b>Massa molecular (g·mol<sup>-1</sup>)</b>	328,36
<b>Sistema cristalino</b>	Ortorrômbico
<b>Grupo espacial</b>	<i>Pna</i> 2 <sub>1</sub> (n° 33)
<i>a</i> (Å)	18,2306(3)
<i>b</i> (Å)	12,0735(3)
<i>c</i> (Å)	7,6002(1)
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90
<b>Volume (Å<sup>3</sup>)</b>	1672,86(5)
<b>Z; Z'</b>	4;1
$\rho_{\text{calc}}$ (g·cm <sup>-3</sup> )	1,3037(4)
<i>Refinamento de Rietveld</i>	
<b><i>R</i><sub>exp</sub> (%)</b>	1,17
<b><i>R</i><sub>wp</sub> (%)</b>	2,67
<b><i>R</i><sub>Bragg</sub> (%)</b>	1,76
<b><math>\chi^2</math></b>	2,27

Com isso, verificou-se que havia uma diferença de aproximadamente 218 Å<sup>3</sup> no volume das celas unitárias do LASSBio-1735 em comparação com o mesmo após o tratamento térmico (LASSBio-1735 anidro). Tal informação pode ser vista na Figura 38.

**Figura 38 – Comparação entre os volumes das celas unitárias (a) do LASSBio-1735 anidro e (b) do fármaco LASSBio-1735. É possível visualizar a diferença entre os volumes das celas unitárias, que é de aproximadamente  $218 \text{ \AA}^3$ , sendo este volume ocupado pelos *voids*.**



Com base em tal resultado, e analisando os espaços vazios mostrados na figura acima, chegou-se à conclusão de que teríamos 8 espaços na cela unitária para acomodar um solvente, o qual ocupa o volume supracitado. Sendo assim, levando em consideração a existência de moléculas de água, verificou-se matematicamente que seria possível acomodá-las na estrutura cristalina do LASSBio-1735, ou seja, considerando o método proposto por Hofmann [54], ao se calcular o volume ocupado por duas moléculas de água ( $2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\bar{v}_i^H = 5,08 \text{ \AA}^3$  e  $\bar{v}_i^O = 11,39 \text{ \AA}^3$ ), foi possível encontrar um valor muito próximo ( $\sim 172,4 \text{ \AA}^3$ ) do que foi obtido para a diferença entre os volumes das celas unitárias. Assim, em posse de tais informações, procedeu-se à determinação da estrutura cristalina do LASSBio-1735 levando em conta a presença de duas moléculas de água e uma molécula de LASSBio-1735 na unidade assimétrica.

### 6.3 - Determinação estrutural do LASSBio-1735 di-hidratado

Adotou-se o mesmo procedimento descrito para a forma anidra (seção 6.2.2) para a determinação da estrutura cristalina do LASSBio-1735 di-hidratado.

O programa *DASH* foi usado para indexar o padrão de DRXP, em que as 20 primeiras reflexões foram individualmente ajustadas e usadas no procedimento de indexação

com o uso da rotina *DICVOL91*, implementada no *DASH*. Foram obtidos os seguintes valores para uma cela unitária ortorrômbica:  $a = 18,5258 \text{ \AA}$ ,  $b = 23,8257 \text{ \AA}$ ,  $c = 4,2839 \text{ \AA}$  e volume da cela unitária:  $V = 1890,90 \text{ \AA}^3$ .

Depois que os parâmetros de cela unitária foram avaliados, obteve-se a solução para o grupo espacial. Para o LASSBio-1735 a melhor solução para o grupo espacial foi a  $P2_12_12_1$ .

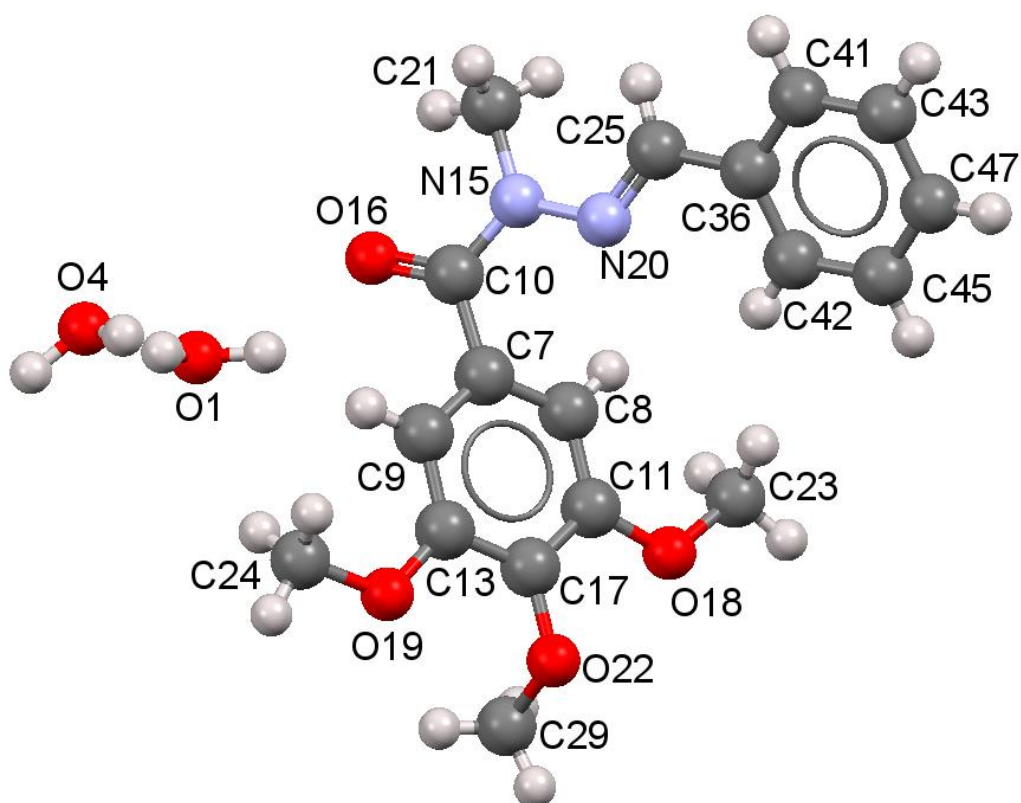
Com o volume da cela unitária obtido no processo de indexação foi possível fazer uma comparação entre o volume calculado (levando em consideração os volumes individuais médios dos átomos [54]) e o volume estimado na indexação. Pelos cálculos foram sugeridas quatro fórmulas unitárias por cela unitária ( $Z = 4$ ). A combinação desta informação com a melhor solução de grupo espacial permitiu estimar a existência de uma fórmula unitária na unidade assimétrica ( $Z' = 1$ ).

Após os valores das dimensões da cela unitária e da melhor solução de grupo espacial terem sido obtidos, a molécula do LASSBio-1735 com duas moléculas de água (construídas em um modelo 3D), em conjunto com os resultados já obtidos, foram inseridas no próprio programa *DASH* para iniciar o processo de *simulated annealing* (determinação estrutural). Em seguida, a melhor solução encontrada foi considerada no refinamento de Rietveld.

### 6.3.1 - Descrição da estrutura cristalina do LASSBio-1735 di-hidratado

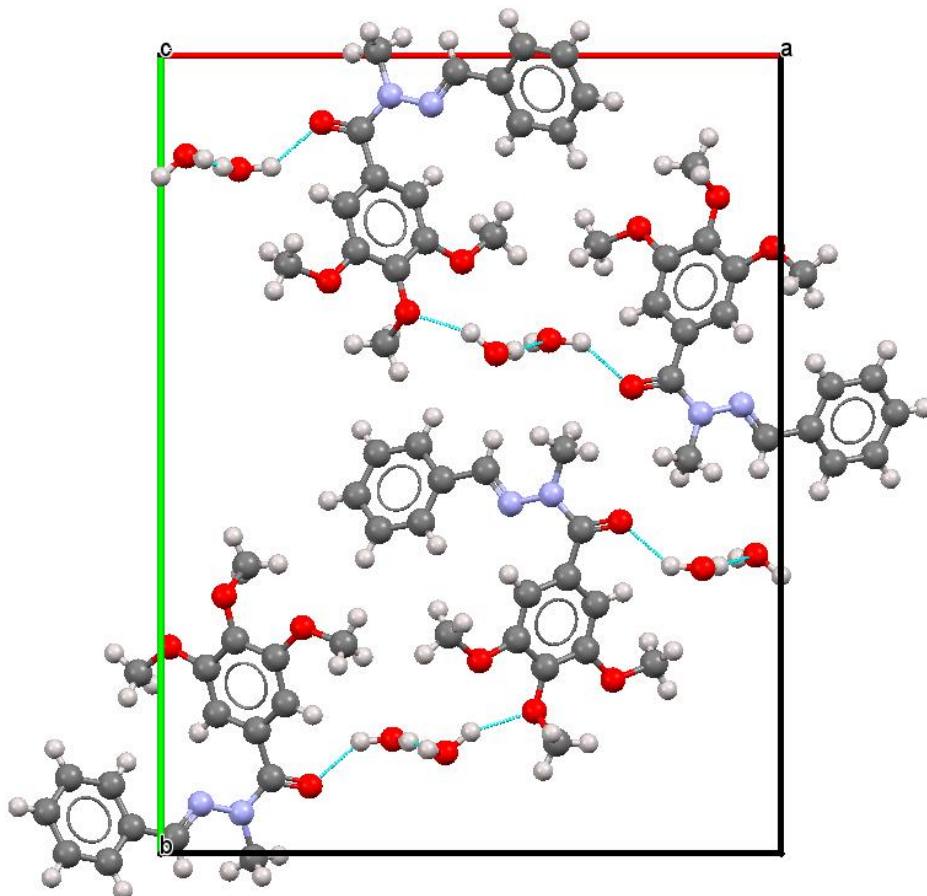
A estrutura cristalina do fármaco LASSBio-1735 di-hidratado está representada na Figura 39.

**Figura 39** – Estrutura cristalina do LASSBio-1735 di-hidratado, com seus respectivos átomos, devidamente enumerados na posição em que os átomos estão dispostos na molécula. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinza escuras), hidrogênio (esferas cinza claras), oxigênio (esferas vermelhas), nitrogênio (esferas azuis claras) e moléculas de água [hidrogênio (esferas cinza claras) e oxigênio (esferas vermelhas)].



A determinação estrutural do LASSBio-1735 di-hidratado, com o uso da DRXP, permitiu evidenciar aspectos estruturais do composto em fase sólida, nos permitindo caracterizar inequivocamente a configuração relativa *E* da dupla ligação C=N (Figura 39). A estrutura cristalina do LASSBio-1735 di-hidratado é composta por quatro fórmulas unitárias por cela unitária ( $Z = 4$ ), conforme pode ser observado na Figura 40, acomodando uma fórmula unitária na unidade assimétrica ( $Z' = 1$ ).

**Figura 40 – Empacotamento da cela unitária ( $Z = 4$ ) do LASSBio-1735 di-hidratado, ao longo do *eixo c*. Os átomos são indicados como segue: carbono (esferas cinza escuras), oxigênio (esferas vermelha), nitrogênio (esferas azul claras) e hidrogênio (esferas cinza claras). Vale a pena mencionar a presença de interações de hidrogênio entre as moléculas.**



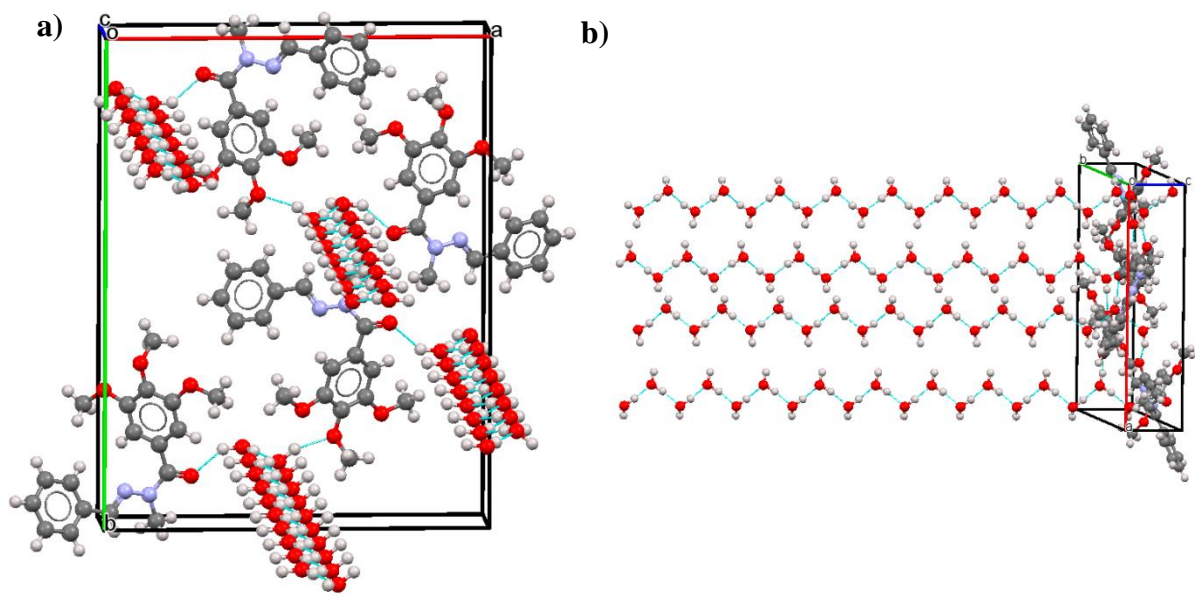
As coordenadas fracionárias “ $x$ ,  $y$  e  $z$ ” relacionadas à posição de cada átomo estão representadas na seção 9 (anexos), bem como algumas distâncias de ligações, ângulos de ligações e torção do composto LASSBio-1735 di-hidratado. Com relação aos ângulos de torção da molécula e as conformações que ela adota, pode-se destacar que os ângulos de torção envolvendo os átomos C(7)-C(10)-N(15)-N(20) e C(21)-N(15)-N(20)-C(25) foram, respectivamente,  $-10(8)^\circ$  e  $12(7)^\circ$ , e sob estas condições, a molécula está em uma conformação sinperiplanar (*sp*). Já os ângulos de torção envolvendo os átomos C(10)-N(15)-N(20)-C(25) e os átomos N(15)-N(20)-C(25)-C(36) foram, respectivamente,  $-167(5)^\circ$  e  $-178(5)^\circ$ , e neste caso, a molécula adota uma conformação antiperiplanar (*ap*).

A formação do agregado cristalino, ou seja, organização mínima das moléculas do LASSBio-1735 di-hidratado é mostrada na Figura 41 onde estão evidenciadas as interações de hidrogênio intermoleculares pelas linhas tracejadas em azul. Por meio da Figura 41 pode-se



também verificar a presença de canais ao longo da estrutura, sendo nestes canais acomodadas as moléculas de águas.

**Figura 41 – Empacotamento da cela unitária do LASSBio-1735 di-hidratado ao longo do eixo *c* (a) e ao longo do eixo *b* (b) mostrando os canais ao longo da estrutura, onde as moléculas de água estão acomodadas.**



Conforme mencionado, as moléculas são mantidas unidas por meio de interações de hidrogênio entre os átomos descritos na Tabela 6.

**Tabela 6 – Interações de hidrogênio para o LASSBio-1735 di-hidratado. “D” e “A” são, respectivamente, o átomo doador e receptor de ligação de hidrogênio.**

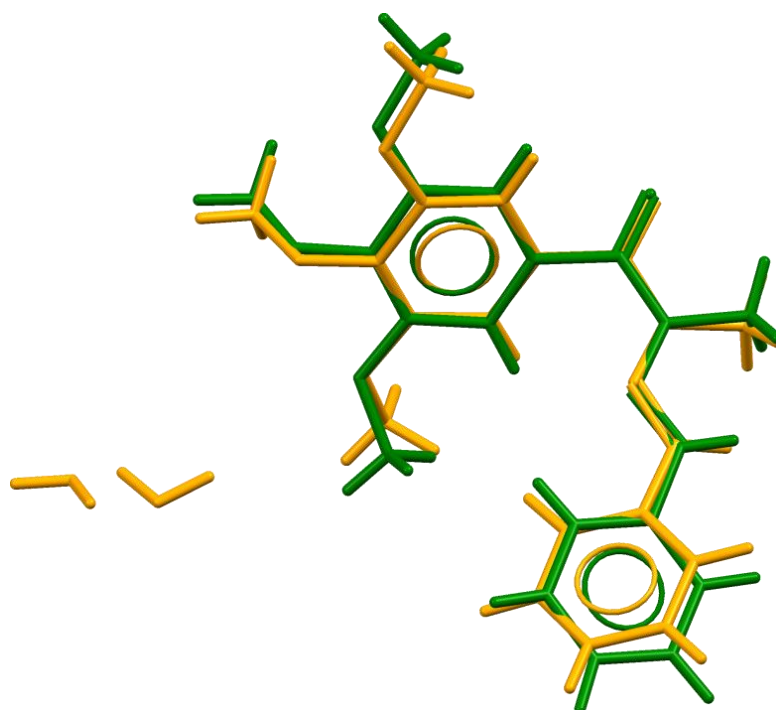
D–H···A	D–H (Å)	H···A (Å)	D···A (Å)	D–H···A (°)
O(1)–H(2) ... O(16) <sup>a</sup>	1,0(3)	2,0(3)	2,84(5)	140(1)
O(1)–H(3) ... O(4) <sup>b</sup>	1,0(3)	1,7(7)	2,71(9)	167(1)
O(4)–H(5) ... O(22) <sup>c</sup>	1,0(4)	2,0(3)	2,94(5)	159(1)
O(4)–H(6) ... O(1) <sup>a</sup>	1,0(6)	1,7(7)	2,67(9)	174(1)

\* *Simetria*: (a) *x*, *y*, *z*; (b) *x*, *y*, -1+*z*; (c) 1/2-*x*, -*y*, -1/2+*z*.

Vale a pena mencionar que a inclusão de moléculas de água na célula unitária promoveu uma alteração no grupo espacial, no volume da célula unitária, e, consequentemente, nos ângulos de torção, que implicam em alterações conformacionais nas moléculas. Em outras palavras, após a desidratação, são observadas alterações

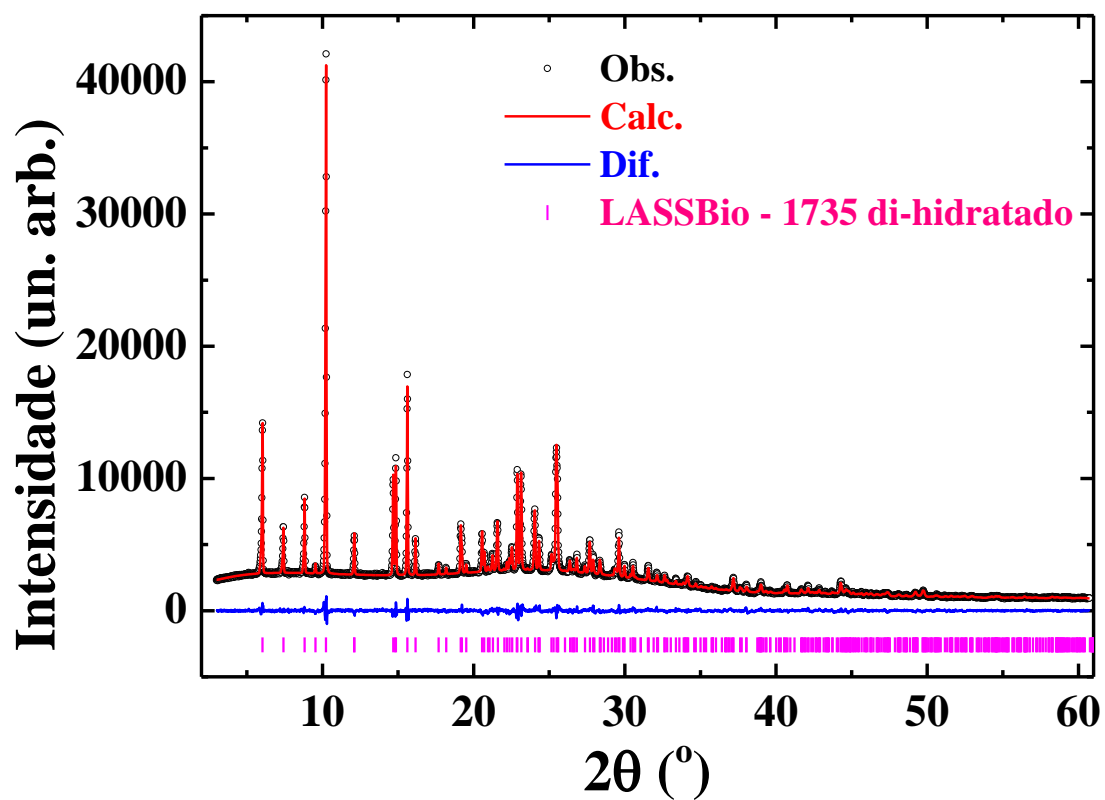
conformacionais entre ambas as moléculas. Por meio da Figura 42 que mostra a sobreposição das moléculas do LASSBio-1735 em suas diferentes formas (anidra e di-hidratada) pode-se visualizar claramente essas alterações conformacionais.

**Figura 42** – Sobreposição das moléculas LASSBio-1735 anidro (em verde) e LASSBio-1735 di-hidratado (em amarelo) mostrando que além das moléculas se diferenciarem quanto à presença de duas moléculas de água, são também perceptíveis diferenças conformacionais entre ambas.



Os valores finais para os parâmetros da célula unitária obtidos após o refinamento de Rietveld (Figura 43) usando o software *Topas Academic v.5* [47], foram:  $a = 18,5263(9) \text{ \AA}$ ,  $b = 23,8255(8) \text{ \AA}$ ,  $c = 4,2838(1) \text{ \AA}$  e volume da cela unitária:  $V = 1890,85(12) \text{ \AA}^3$ .

Figura 43 – Refinamento de Rietveld para o LASSBio-1735 di-hidratado, em que o padrão observado está representado por círculos pretos, o padrão calculado por linhas vermelhas, a diferença entre os padrões (calculado e observado) pela linha azul e as posições do pico de Bragg pelas barras rosas.



Os detalhes da estrutura cristalina obtidos após o refinamento de Rietveld, bem como os índices que expressam a qualidade do ajuste podem ser visualizados na Tabela 7.

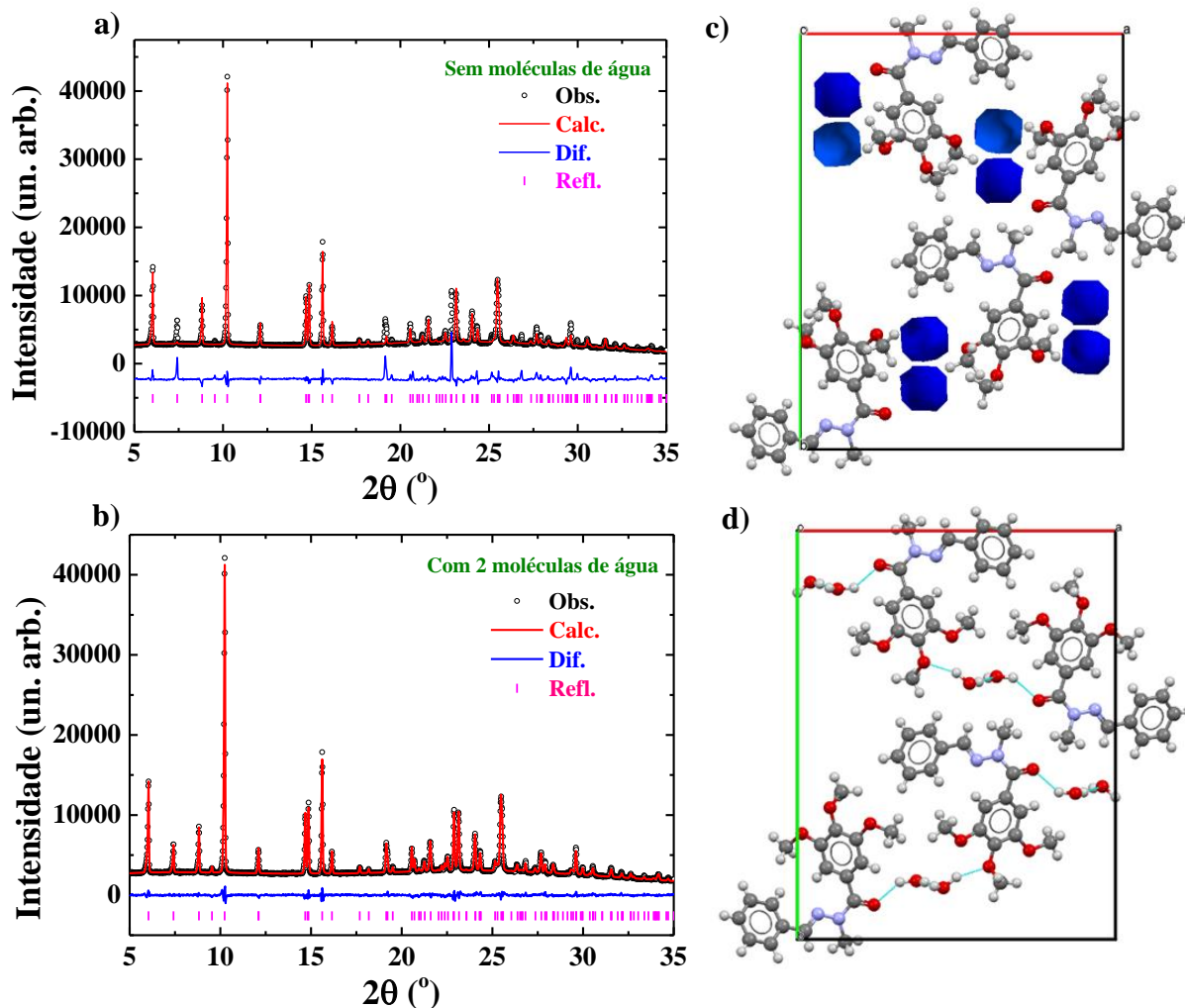
Tabela 7 – Detalhes do refinamento de Rietveld das estruturas cristalinas do LASSBio-1735 di-hidratado e anidro.

<i>Estruturas cristalinas do LASSBio-1735 di-hidratado e anidro</i>		
<b>Fórmula química</b>	$C_{18}H_{20}N_2O_4 \cdot 2H_2O$	$C_{18}H_{20}N_2O_4$
<b>Massa molecular (<math>g \cdot mol^{-1}</math>)</b>	364,39	328,36
<b>Sistema cristalino</b>	Ortorrômbico	Ortorrômbico
<b>Grupo espacial</b>	$P2_12_12_1$ (n° 19)	$Pna2_1$ (n° 33)
<b><math>a</math> (Å)</b>	18,5263(9)	18,2306(3)
<b><math>b</math> (Å)</b>	23,8255(8)	12,0735(3)
<b><math>c</math> (Å)</b>	4,2838(1)	7,6002(1)
<b><math>\alpha = \beta = \gamma</math> (°)</b>	90	90
<b>Volume (Å<sup>3</sup>)</b>	1890, 85(12)	1672, 86(5)
<b>Z; Z'</b>	4;1	4;1
<b><math>\rho_{calc}</math> (<math>g \cdot cm^{-3}</math>)</b>	1,2800(1)	1,3037(4)
<i>Refinamento de Rietveld</i>		
<b><math>R_{exp}</math> (%)</b>	2,03	1,17
<b><math>R_{wp}</math> (%)</b>	3,17	2,67
<b><math>R_{Bragg}</math> (%)</b>	0,94	1,76
<b><math>\chi^2</math></b>	1,56	2,27

Para a análise do resultado final do refinamento de Rietveld são utilizados alguns parâmetros, tais como  $R_{exp}$ ,  $R_{wp}$ ,  $R_{Bragg}$  e  $\chi^2$  [56], bem como a análise gráfica do ajuste deve ser considerada. Conforme apresentado na tabela acima, os parâmetros que expressam a qualidade do ajuste foram:  $R_{exp} = 2,03\%$ ;  $R_{wp} = 3,17\%$ ;  $R_{Bragg} = 0,94\%$  e  $\chi^2 = 1,56$ , o que sugere um bom procedimento no refinamento da estrutura cristalina da forma di-hidratada do LASSBio-1735.

A Figura 44 mostra uma pequena região do difratograma de raios X considerando os dados do LASSBio-1735 com as duas moléculas de água na unidade assimétrica, que é a estrutura cristalina descrita corretamente, e sem considerar tais moléculas na estrutura.

**Figura 44** – Região ampliada (5 a 35° em 2 $\theta$ ) do refinamento de Rietveld do LASSBio-1735 (a) sem levar em conta as moléculas de água e (b) com as moléculas de água no interior da cela unitária. A falta de acordo em algumas reflexões é evidente quando não se considera as moléculas de água, no caso mostrado em (a). (c) mostra o arranjo da estrutura cristalina evidenciando alguns espaços vazios (canais azuis) e (d) as interações de hidrogênio entre a água e a molécula do LASSBio-1735 na estrutura correta.

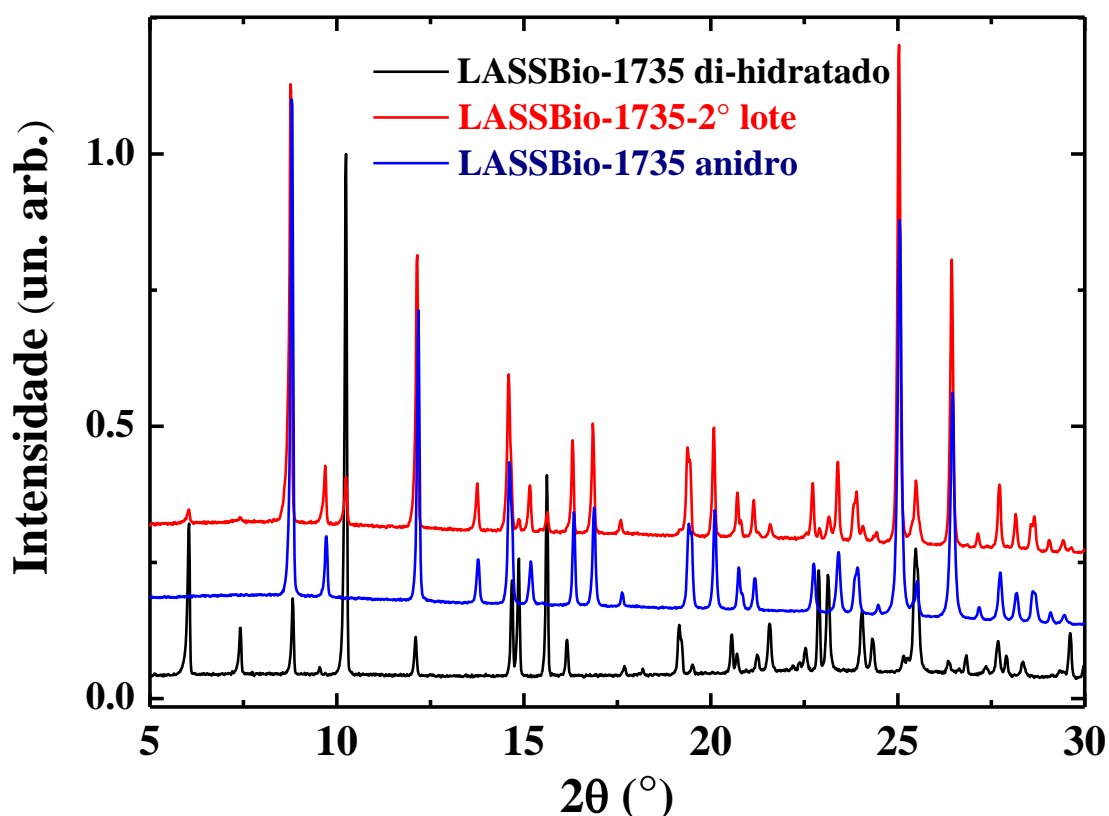


Pode-se ver claramente que ao se considerar as moléculas de água, todos os picos dentro dessa região podem ser totalmente ajustados. Em outras palavras, é indiscutível que a inclusão de moléculas de água melhorou claramente o refinamento de Rietveld. Vale enfatizar que tal resultado não é evidenciado apenas pela melhora no ajuste visual do refinamento de Rietveld, como também pela coerência entre os parâmetros de qualidade do refinamento apresentados na Tabela 7.

#### 6.4 - LASSBio-1735 – 2º lote

Em continuação aos estudos com o referido fármaco, um novo lote de LASSBio-1735, o qual será denominado no presente estudo como LASSBio-1735 – 2º lote, foi produzido no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) na UFRJ, com o intuito de avaliar a reprodutibilidade no procedimento de síntese. Este composto nos foi fornecido e ao se realizar uma medida de DRXP, notou-se diferenças entre os difratogramas de raios X, como pode ser visualizado pela região ampliada mostrada na Figura 45.

Figura 45 – Região ampliada (5 a 30° em 2 $\theta$ ) enfatizando as diferenças entre os difratogramas de raios X LASSBio-1735 di-hidratado (em preto), LASSBio-1735 – 2º lote (em vermelho) e do LASSBio-1735 anidro (em azul).



Após a obtenção das estruturas cristalinas das formas anidra e di-hidratada do LASSBio-1735, procedeu-se ao refinamento de Rietveld do LASSBio-1735 – 2º lote. Como mostrado na Figura 45, o padrão de difração do 2º lote foi diferente do 1º lote (forma di-hidratada) e também são observadas diferenças quando comparado ao LASSBio-1735 anidro, mostrando que poderíamos ter uma mistura de fases, uma vez que os difratogramas de raios X

não mostraram similaridade. Considerando as duas estruturas cristalinas foi realizada uma análise quantitativa de fases pelo método de Rietveld do composto LASSBio-1735 – 2º lote. Pela análise quantitativa de fases foi possível observar que o LASSBio-1735 – 2º lote é composto por uma mistura de fases, sendo uma delas, o LASSBio-1735 anidro ( $C_{18}H_{20}N_2O_4$ ) – 90,0(13) % em massa, pertencente ao sistema cristalino ortorrômbico e grupo espacial  $Pna2_1$ , e em menor proporção o LASSBio-1735 di-hidratado ( $C_{18}H_{20}N_2O_4 \cdot 2H_2O$ ) – 10,0(13) % em massa, também pertencente ao sistema cristalino ortorrômbico, e com grupo espacial  $P2_12_12_1$ .

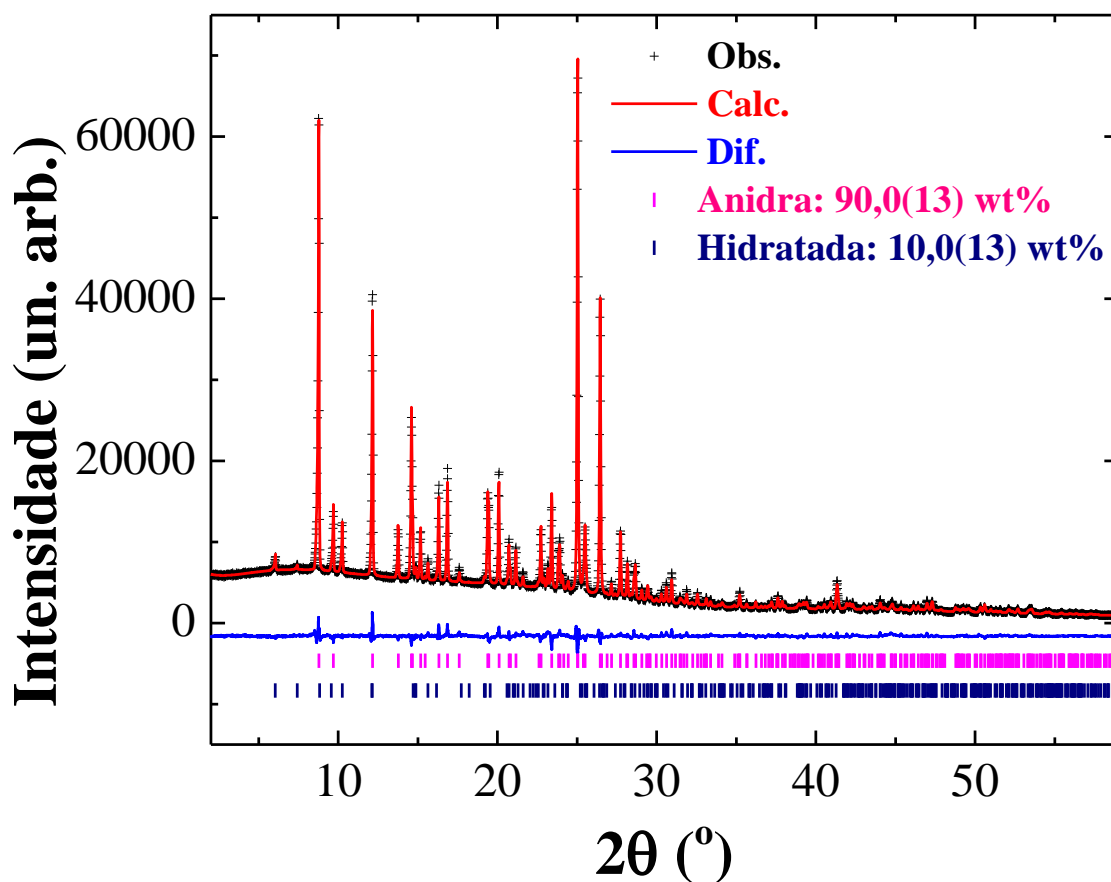
Os parâmetros de qualidade do ajuste podem ser visualizados na Tabela 8.

**Tabela 8 – Detalhes do refinamento de Rietveld do LASSBio-1735 – 2º lote.**

<i>Refinamento de Rietveld</i>		
<i>Fase</i>	<b>Di-hidratada</b>	<b>Anidra</b>
$R_{exp}$ (%)	1,55	
$R_{wp}$ (%)	3,63	
$R_{Bragg}$ (%)	2,22	2,52
$\chi^2$	2,34	
<i>% em massa</i>	10,0(13)	90,0(13)

O ajuste visual obtido após o refinamento de Rietveld pode ser visualizado na Figura 46.

Figura 46 – Refinamento de Rietveld do LASSBio-1735 – 2º lote mostrando uma mistura de fases, sendo a fase majoritária a anidra.



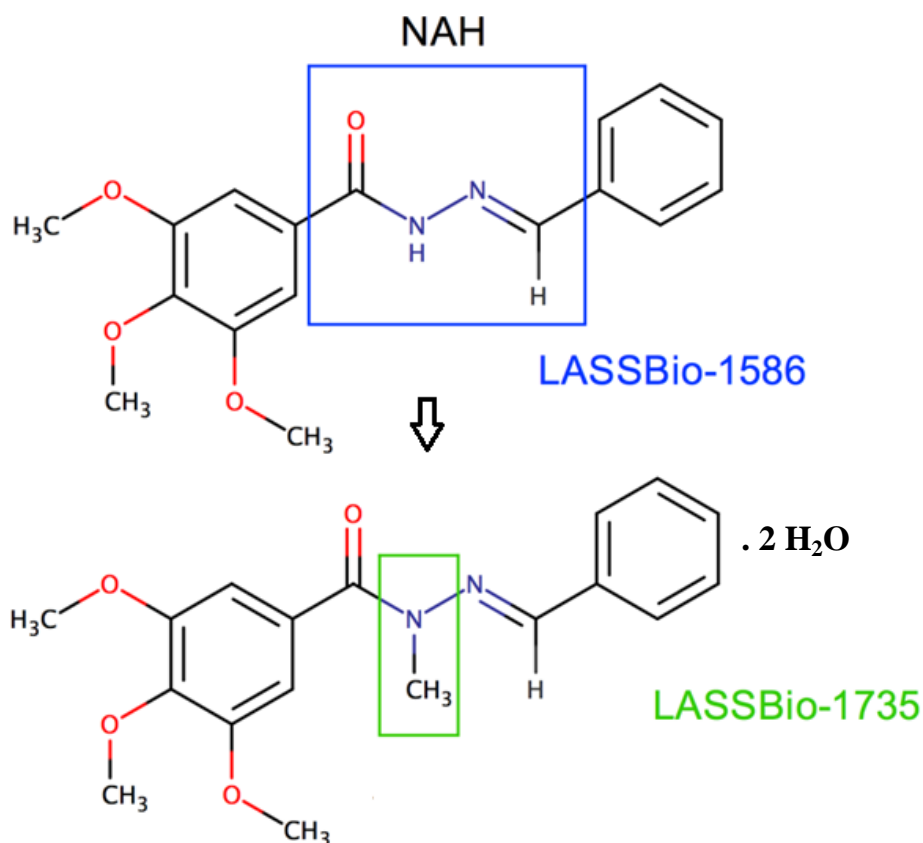
Pela análise da Figura 46 foi possível observar que o ajuste está compatível com os dados experimentais e que o LASSBio-1735 – 2º lote é constituído por uma mistura de fases, sendo a fase majoritária a anidra. Tal fato mostra que o método de Rietveld é uma excelente ferramenta para a obtenção de dados confiáveis quando da análise quantitativa de fases. Além disso, é conveniente enfatizar que se tomou cuidado no modo de preparo das amostras de forma a evitar orientação preferencial, pois esta altera inadequadamente a intensidade dos picos e, conseqüentemente, prejudica os cálculos da quantificação das fases cristalinas [31].



### 6.5 – Considerações acerca de algumas diferenças entre as moléculas LASSBio-1586, LASSBio-1735 di-hidratado e LASSBio-1735 anidro

Como demonstrado no decorrer deste trabalho, visando a otimização dos resultados farmacológicos do LASSBio-1586, foi planejado o composto LASSBio-1735 (derivado *N*-metilado) [12], conforme a modificação estrutural exemplificada na Figura 47.

Figura 47 – Obtenção do derivado *N*-metilado - LASSBio-1735.



De acordo com a Figura 47, o LASSBio-1735 foi obtido pela reação de *N*-metilação do composto LASSBio-1586 e o que chama a atenção quando se compara os compostos são as diferenças entre as faixas de fusão. O derivado *N*-metilado (LASSBio-1735) possui baixo ponto de fusão quando comparado ao seu precursor não *N*-metilado (LASSBio-1586). Enquanto que para o LASSBio-1735 a temperatura de fusão foi determinada como 106,3 °C, o valor estimado pelo pesquisador Amaral [12] para o LASSBio-1586 foi 131 °C. Vale enfatizar que a diminuição do ponto de fusão do LASSBio-1735 está relacionada com a substituição do hidrogênio amídico pela metila (CH<sub>3</sub>), uma vez que tal fato pode contribuir

para a diminuição da intensidade das interações intermoleculares que são responsáveis por propriedades físicas dos materiais. Portanto, pode-se esperar que o ponto de fusão, por exemplo, seja menor para aquelas substâncias que possuam interações intermoleculares mais fracas, pois menor será a energia necessária para romper estas interações [95]. Ciente da importância do grupamento metila no reconhecimento molecular, Wermuth [96] afirma: “O grupamento metila, tantas vezes considerado como quimicamente inerte, é capaz de alterar profundamente as propriedades farmacológicas de uma molécula.” Um exemplo de tal afirmação foi constatada para as chalconas análogas a CA-4, em que a simples introdução da metila foi capaz de aumentar em 20 vezes a atividade citotóxica frente à linhagem tumoral K562 (leucemia mieloide crônica humana) [97].

Neste sentido, segundo os estudos realizados por Amaral, para avaliar a atividade citotóxica de ambos os compostos (LASSBio-1735 e LASSBio-1586), verificou-se que o derivado *N*-metilado (LASSBio-1735) manteve a atividade citotóxica frente às quatro linhagens celulares avaliadas (melanoma, carcinoma ileocecal – cólon, glioblastoma humano e leucemia humana) [12]. Entretanto, observou-se que o LASSBio-1735 apresenta menor atividade citotóxica que o LASSBio-1586 sobre linhagens de tumores sólidos (melanoma, carcinoma ileocecal – cólon e glioblastoma humano), enquanto apresenta maior atividade citotóxica frente à linhagem de câncer hematológico (leucemia humana). Assim, fica evidenciada a importância de se realizar, no presente estudo, uma investigação quanto à estrutura do composto *N*-metilado - LASSBio-1735, pois a introdução da metila foi capaz de modificar a atividade citotóxica do composto quando comparado ao seu precursor (LASSBio-1586).

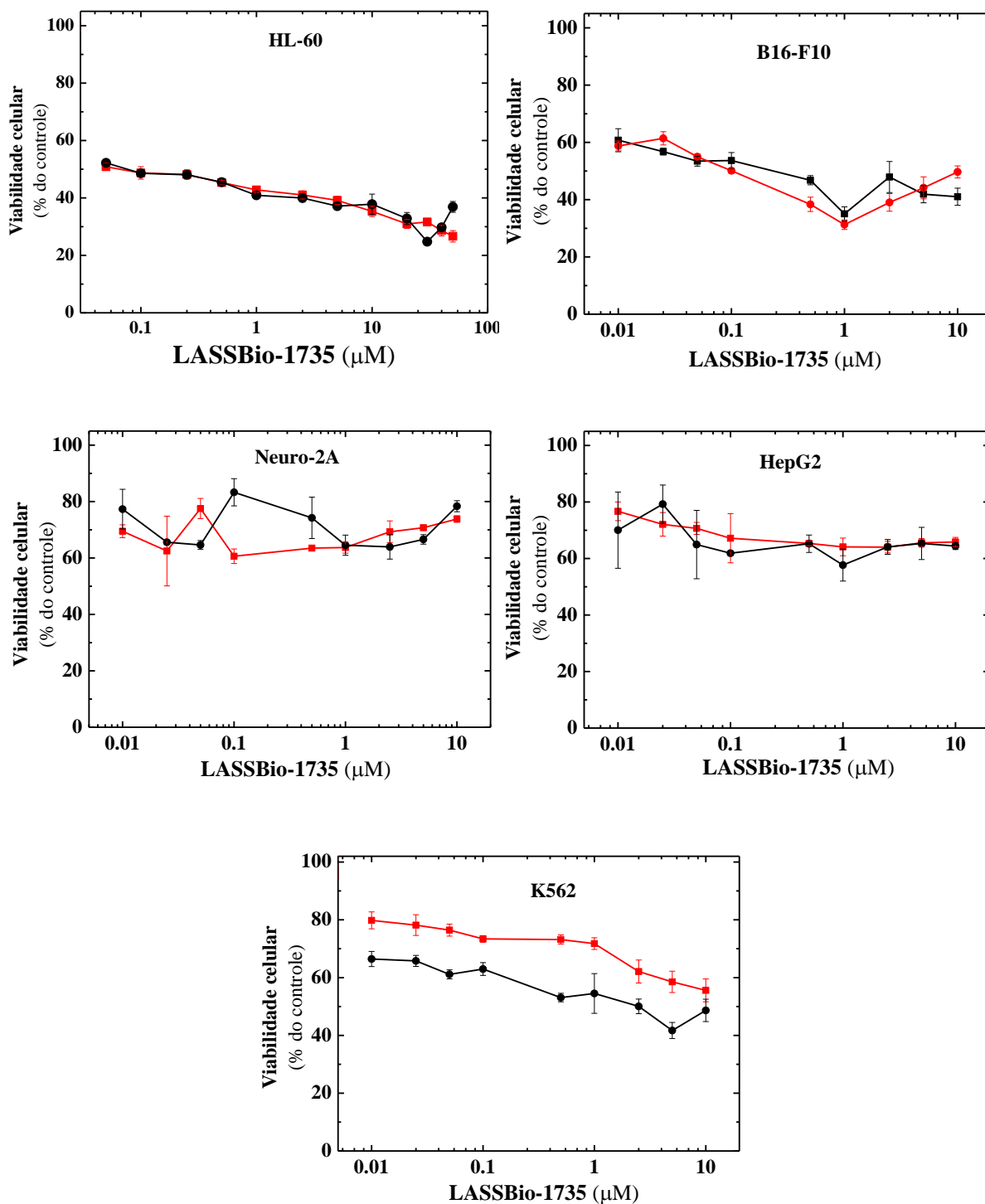
Em prosseguimento ao trabalho, tendo em vista as diferenças estruturais identificadas pelos resultados de DRXP, DSC e FTIR foram realizados estudos no intuito de compreender melhor a relação entre a estrutura química deste composto *N*-acilidrazônico de diferentes estados de hidratação (LASSBio-1735 anidro e di-hidratado) e suas respectivas atividades citotóxicas, e também suas velocidades de dissolução intrínsecas. O estabelecimento dessas relações nortearia a busca por um padrão molecular novo que permitiria, futuramente, a identificação e escolha do composto citotóxico que possui as melhores características para exercer o papel a que se propõe, sendo tal fato de extrema relevância quando tratamos do assunto fármacos antineoplásicos.

### **6.5.1 – Avaliação da atividade citotóxica das diferentes formas do análogo da CA-4: LASSBio-1735 anidro e LASSBio-1735 di-hidratado**

Após a caracterização das estruturas cristalinas das formas anidra e di-hidratada do LASSBio-1735 foi realizado um rastreio biológico sobre o seu efeito citotóxico frente a algumas células tumorais. Diversas linhagens tumorais de origem não relacionada, isto é, de diferentes tipos de tumores, foram selecionadas, tais como: HL-60 (leucemia humana), K562 (leucemia mieloide crônica humana), B16-F10 (melanoma de rato), HepG2 (carcinoma hepatocelular de fígado humano) e Neuro-2A (neuroblastoma de rato). Até o presente momento apenas a atividade citotóxica do LASSBio-1735 di-hidratado frente à linhagem tumoral HL-60 (leucemia humana) havia sido relatada por Amaral [12, 27], sendo os efeitos citotóxicos frente às demais linhagens desconhecidos até o início deste estudo.

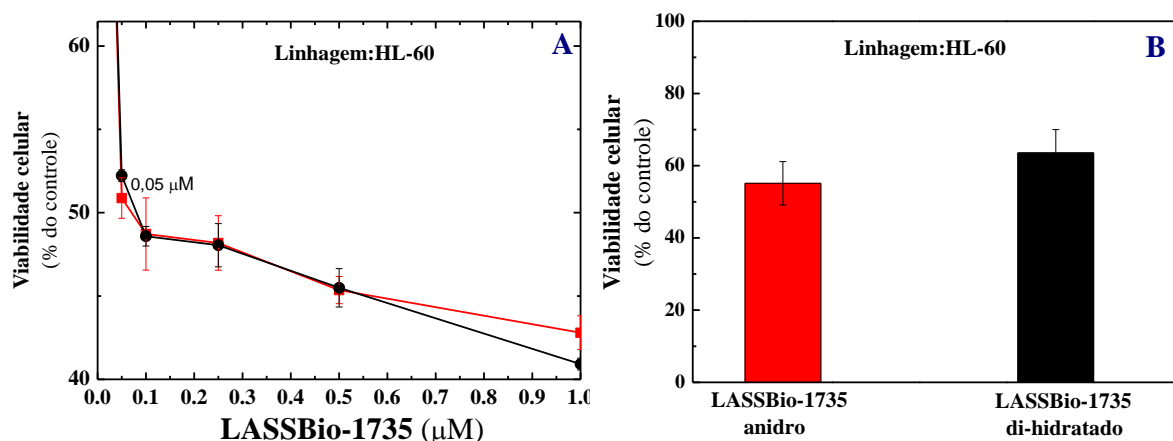
Como pode ser visto na Figura 48, em todas as linhagens celulares, LASSBio-1735 em ambas as formas – di-hidratada (exibido em preto) e anidra (exibido em vermelho) – promoveu uma diminuição da viabilidade celular (porcentagem de células vivas em relação ao total de células). Entretanto, apenas frente às linhagens celulares HL-60 e K562 ocorreu a diminuição da viabilidade celular de uma forma dependente da concentração. Convém salientar que os dados de concentração foram representados em escala logarítmica para que fosse melhor analisada a distribuição dos resultados.

**Figura 48 - Citotoxicidade das formas anidra e di-hidratada do LASSBio-1735 frente a várias linhagens tumorais. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, considerando o controle (ausência de composto) como 100% de viabilidade. As curvas de concentração foram realizadas de 0,01 a 10  $\mu$ M. Os dados são apresentados como (média  $\pm$  desvio padrão) de três experiências independentes realizadas em duplicata.**



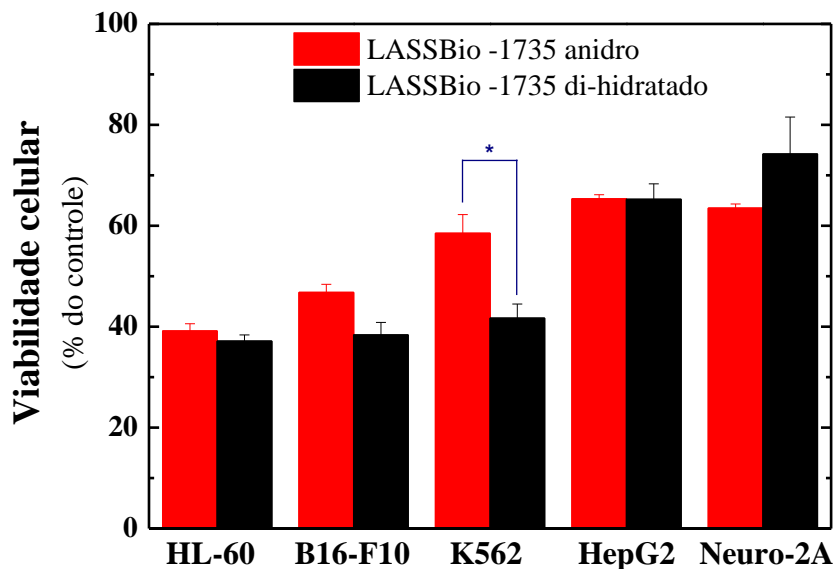
Tendo em vista que há relatos na literatura descrevendo que determinados compostos podem causar interferências no ensaio de MTT [98], optou-se por utilizar o teste de exclusão do azul de tripano como ensaio alternativo/complementar. O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis (vivas) são impermeáveis ao referido corante que é atóxico, ou seja, as células viáveis permanecem intactas, ao passo que as células não viáveis (mortas) permitem a penetração do corante e assim essas células exibem coloração azul após tratamento com o azul de tripano. Considerando as limitações deste ensaio para investigar todas as amostras, ao mesmo tempo, tal como ocorre em placas de multi-poços no ensaio de MTT, foi testada apenas uma concentração e uma linhagem celular para verificar a possível interferência na redução do LASSBio-1735 com MTT. Como observado na Figura 49, os efeitos da concentração de 0,05  $\mu\text{M}$  de LASSBio-1735 sobre a viabilidade celular frente a linhagem HL-60 utilizando o teste de exclusão do azul de tripano corroborou os resultados obtidos no ensaio de MTT.

**Figura 49 - Citotoxicidade das formas anidra (mostrado em vermelho) e di-hidratada (mostrado em preto) do LASSBio-1735 frente a linhagem tumoral HL-60. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (gráfico A) e exclusão do azul de tripano (gráfico B), considerando o controle (ausência de composto) como 100% de viabilidade. Os dados são apresentados como (média  $\pm$  desvio padrão) de três experiências independentes realizadas em duplicata.**



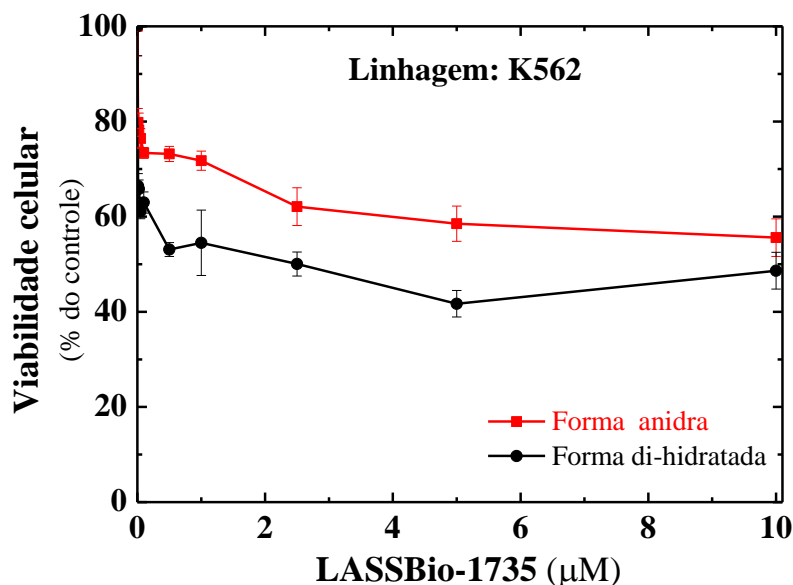
A Figura 50 proporciona uma comparação direta entre todas as linhagens celulares a uma concentração fixa de LASSBio-1735 (5  $\mu\text{M}$ ) em que é possível verificar que não há diferenças significativas na citotoxicidade das diferentes formas do LASSBio-1735, exceto frente a linhagem tumoral K562 (leucemia mieloide crônica humana).

**Figura 50 - Citotoxicidade das formas anidra (mostrado em vermelho) e di-hidratada (mostrado em preto) do LASSBio-1735 frente a diversas linhagens tumorais. A concentração utilizada foi de 5  $\mu$ M. Os dados são apresentados como (média  $\pm$  desvio padrão) de três experiências independentes realizadas em duplicata.**



Por fim, a análise comparativa entre os efeitos das formas anidra e di-hidratada do LASSBio-1735 mostrou que a forma di-hidratada apresentou um aumento significativo na citotoxicidade quando comparada à forma anidra apenas frente a linhagem tumoral K562 (leucemia mieloide crônica humana), conforme mostrado na Figura 51.

**Figura 51 - Citotoxicidade das formas anidra (mostrado em vermelho) e di-hidratada (mostrado em preto) do LASSBio-1735 frente a linhagem tumoral K562. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT e as curvas de concentração foram realizadas de 0,01 a 10  $\mu$ M. Os dados são apresentados como (média  $\pm$  desvio padrão) de três experiências independentes realizadas em duplicata.**



### 6.5.2 – Determinação da velocidade de dissolução intrínseca das diferentes formas do análogo da CA-4: LASSBio-1735 anidro e LASSBio-1735 di-hidratado

A velocidade de dissolução intrínseca foi calculada pela quantidade de fármaco dissolvido no período de 26 minutos para o LASSBio-1735 di-hidratado e 21 minutos para o LASSBio-1735 anidro. Os valores obtidos foram representados em um gráfico de quantidade do LASSBio-1735 dissolvido (mg) *versus* tempo (minutos) e, por regressão linear dos pontos, obteve-se os valores da velocidade de dissolução mediante a inclinação da reta em  $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$ , conforme mostrado na Figura 52 (LASSBio-1735 di-hidratado) e Figura 53 (LASSBio-1735 anidro).

Figura 52 - Regressão linear dos pontos da quantidade dissolvida (mg) pelo tempo de coleta (min) para obtenção da velocidade de dissolução do LASSBio-1735 di-hidratado.

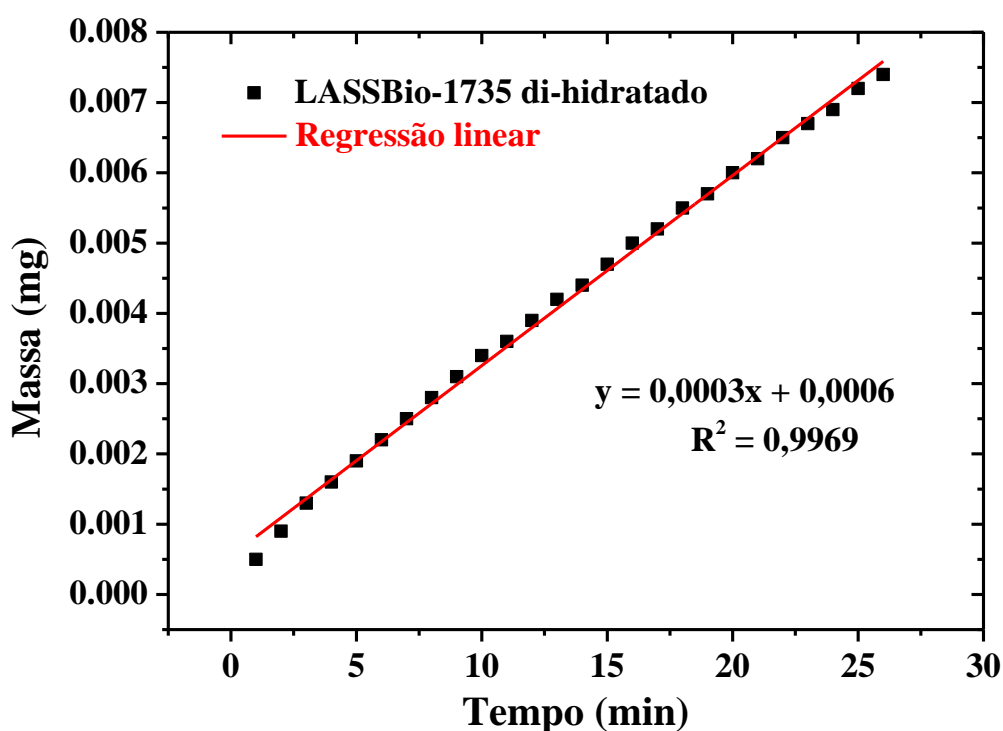
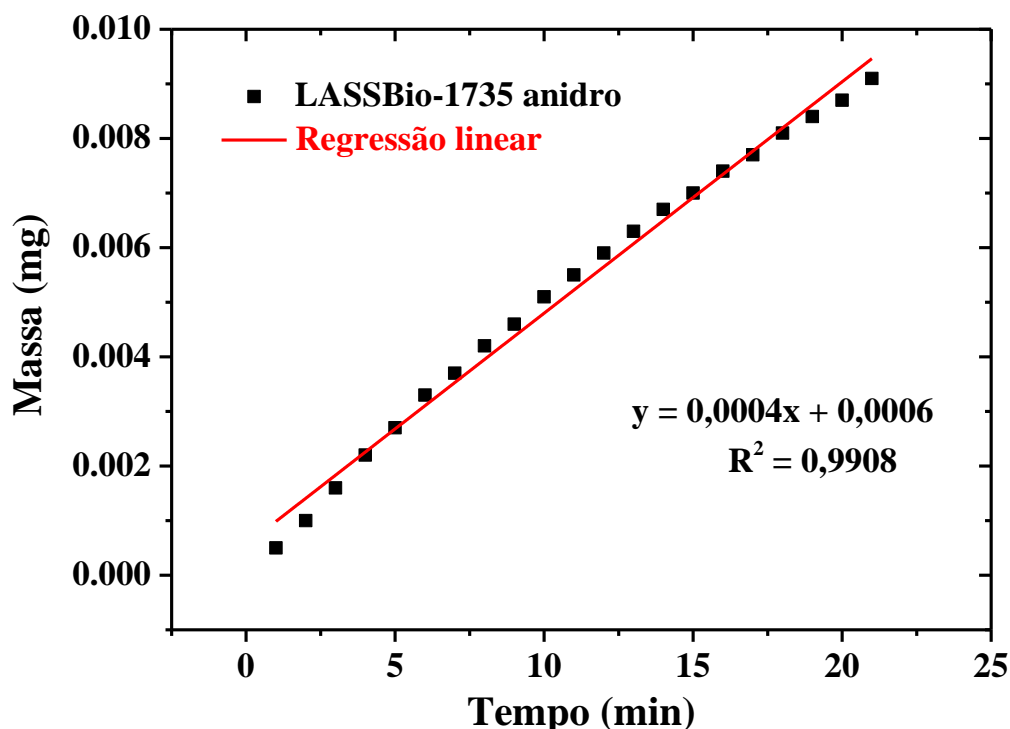


Figura 53 - Regressão linear dos pontos da quantidade dissolvida (mg) pelo tempo de coleta (min) para obtenção da velocidade de dissolução do LASSBio-1735 anidro.



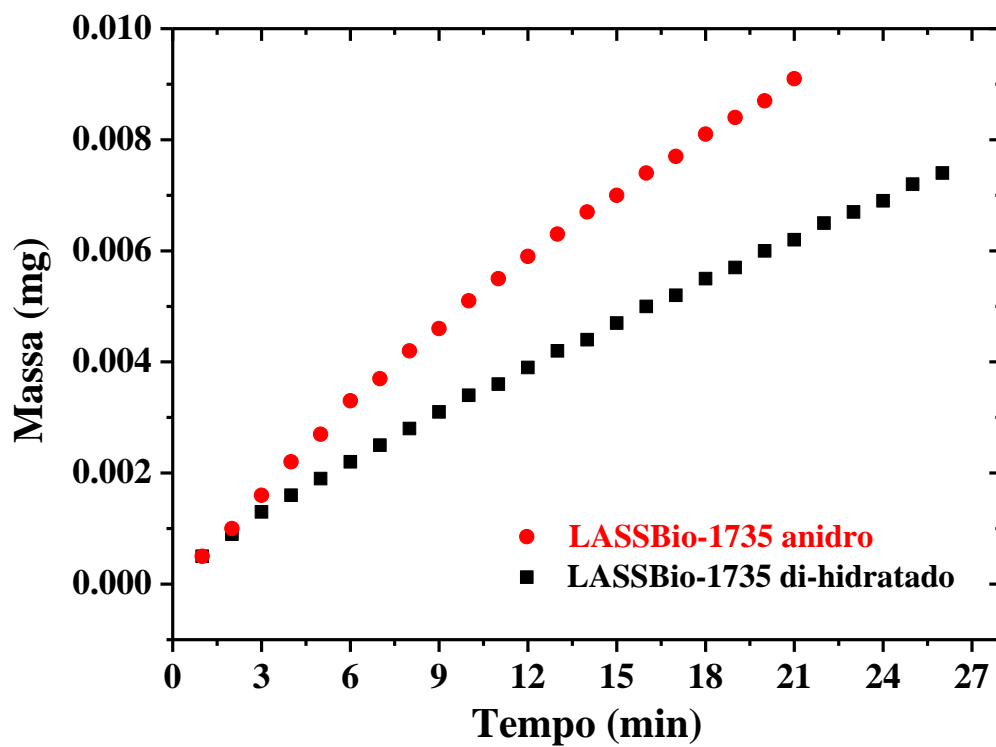
Posteriormente, esses valores foram divididos pela área superficial do fármaco exposto na matriz ( $0,0314 \text{ cm}^2$ ), obtendo-se assim os valores de velocidades de dissolução intrínseca (VDI) do LASSBio-1735 di-hidratado e anidro em  $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ . Tendo em vista que os valores de VDI obtidos foram muito baixos, houve a necessidade de expressá-los em  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ . Neste caso, o valor de VDI calculado para o LASSBio-1735 di-hidratado foi de  $9,6(6) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ , enquanto para o LASSBio-1735 anidro o valor foi de  $12,7(11) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ . Também pelos gráficos foi possível verificar que os valores de coeficiente de correlação ( $R^2$ ) indicaram boa linearidade em ambos os experimentos.

Segundo Yu e colaboradores [75], fármacos que apresentam valores de VDI abaixo de  $100 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$  são considerados de baixa solubilidade. Considerando que tanto o LASSBio-1735 em sua forma di-hidratada, quanto em sua forma anidra, apresentaram valores de VDI abaixo desse valor, pode-se concluir que o LASSBio-1735 em suas diferentes formas é classificado como um fármaco de baixa solubilidade. Além disso, por meio da análise do gráfico comparativo mostrado na Figura 54 verifica-se que foi necessário um menor tempo (21 minutos) para que a forma anidra do LASSBio-1735 fosse dissolvida, quando comparada



à forma di-hidratada (26 minutos), o que nos permite concluir que houve um ligeiro aumento de solubilidade da forma anidra em relação a forma di-hidratada.

**Figura 54** - Gráfico comparativo entre perfis de dissolução intrínseca das formas anidra (círculos vermelhos) e di-hidratada (retângulos pretos) do LASSBio-1735.



## 7 - Conclusões

Com o uso das técnicas de DRXP, DSC, TG e FTIR foi possível caracterizar a estrutura cristalina da forma di-hidratada, bem como da forma anidra do composto LASSBio-1735, mostrando que neste trabalho foi possível realizar a determinação estrutural de ambas as amostras com dados provenientes da DRXP aliada ao método de Rietveld. A amostra anidra foi obtida após o fármaco, como recebido, ter sido submetido a uma temperatura de 50 °C durante o tempo de uma hora. Ambas as amostras se cristalizaram em um sistema cristalino ortorrômbico, entretanto com distintos grupos espaciais. A remoção da água promoveu uma contração no volume da célula unitária da forma anidra, de aproximadamente 218 Å<sup>3</sup>, promovendo, assim, mudanças conformacionais nas moléculas. Essas alterações podem ter influenciado a atividade biológica do LASSBio-1735. Os resultados de velocidade de dissolução intrínseca evidenciaram que o LASSBio-1735, em suas diferentes formas, é um fármaco de baixa solubilidade, porém, observou-se que a solubilidade da forma anidra é ligeiramente maior do que a forma di-hidratada.

## 8 – Referências Bibliográficas

- [1] INCA. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2 ed. Rio de Janeiro 2012.
- [2] INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015.
- [3] BRASIL. Mensagem aos médicos. Câncer Fundamentos. Brasília 1971. p. 7-47.
- [4] Silva, V.C.E. O impacto da revelação do diagnóstico de câncer na percepção do paciente. Ribeirão Preto: USP; 2005.
- [5] INCA. TNM: classificação de tumores malignos. 6 ed. Rio de Janeiro 2004.
- [6] Nakagawa, J.T.T., Schirmer J., Barbieri M. Human Papillomavirus (HPV) and uterine cervical cancer. Revista Brasileira de Enfermagem;63:307-11 2010.
- [7] Ladeira, M.S.P., Salvadori D.M.F., Rodrigues M.A.M. Biopatologia do Helicobacter pylori. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial;39:335-42 2003.
- [8] Murad, A.M., Katz A. Oncologia: bases clínicas do tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara 1996.
- [9] BRASIL. Manual de bases técnicas da oncologia - SIA/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais. 17 ed. Brasília 2014. p. 120.
- [10] INCA. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 3 ed 2008.
- [11] BRASIL. Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2 ed. rev. atual. ed: Rio de Janeiro: Pro-Onco; 1993.
- [12] Amaral, D.N. Planejamento, síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos da combretastatina A4 (CA-4). Rio de Janeiro: UFRJ; 2012.
- [13] BRASIL. Manual de bases técnicas da oncologia - SIA/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais. 2011. p. 110.
- [14] Lens, H.J. Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumour. Cancer Treat Rev;29:41-48 2003.
- [15] Kingston, D.G.I., Cragg G.M., Newman D.J. Anticancer Agents from Natural Products. CRC Press 2005.
- [16] Zottis, A. Planejamento Racional de Novos Agentes Quimioterápicos: Identificação e Estudos Cinéticos de Novos Inibidores da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase Glicossomal de Trypanosoma cruzi: Universidade de São Paulo; 2009.

- [17] Lima, L.M. Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira. Química Nova;30:1456-68 2007.
- [18] Barreiro, E.J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. Revista Virtual de Química;1:26-34 2009.
- [19] Lippert, J.W. Vascular disrupting agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry;15:605-15 2007.
- [20] Pilat, M.J., Lorusso P.M. Vascular disrupting agents. Journal of Cellular Biochemistry;99:1021-39 2006.
- [21] Sebahar, P.R., Willardsen J.A., Anderson M.B. Anticancer Agents: VTA or VDA. Current Bioactive Compounds;5:79-97 2009.
- [22] Fürst, R., Zupkó I., Berényi Á., Ecker G.F., Rinner U. Synthesis and antitumor-evaluation of cyclopropyl-containing combretastatin analogs. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters;19:6948–51 2009.
- [23] Fraga, A.G.M. Combretastatinas e seus análogos: a natureza como fonte alternativa para a terapia do câncer. Revista Virtual de Química;7:765-90 2015.
- [24] Marchiori, M.A. Estudo estrutura-atividade da combretastatina e derivados. Campinas: Unicamp; 2007.
- [25] Silva, S.P.d. Hidrogenação de alcinos em meio bifásico: sistemas recicláveis para aplicação industrial. Porto Alegre: UFRGS; 2014.
- [26] Pettit, G.R., Singh S.B., Boyd M.R., Hamel E., Pettit R.K., Schmidt J.M., Hogan F. Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5, and A-6(1a). Journal of Medicinal Chemistry;38:1666-72 1995.
- [27] Amaral, D.N., Cavalcanti B.C., Bezerra D.P., Ferreira P.M.P., Castro R.d.P., Sabino J.R., Machado C.M.L., Chammas R., Pessoa C., Sant'Anna C.M.R., Barreiro E.J., Lima L.M. Docking, Synthesis and Antiproliferative Activity of N-Acylhydrazone Derivatives Designed as Combretastatin A4 Analogues. PloS one;9:e85380 2014.
- [28] Costa, F.N., Ibiapino A.L., Figueiredo L.P., Barreiro E.J., Lima L.M., Amaral D.N., Castro C.E., Giacomelli F.C., Ferreira F.F. Preliminary evaluation of the encapsulation of new antidiabetic sulphonylhydrazone and antitumor N-acylhydrazone derivatives using PLGA nanoparticles. Journal of Physics: Conference Series;617:012015 2015.
- [29] Pecharsky, V.K., Zavalij P.Y. Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials. New York: Springer; 2009.
- [30] Erdócia, F.A.B. Difração de raios X em minerais de bauxita e análise através de refinamento pelo método de Rietveld. Belém-Pará: UFPA; 2011.

- [31] Figueiredo, L.P., Ferreira F.F. The Rietveld Method as a Tool to Quantify the Amorphous Amount of Microcrystalline Cellulose. *Journal of Pharmaceutical Sciences*;103:1394–99 2014.
- [32] Azároff, L.V. *Elements of X-Ray Crystallography*: McGraw-Hill; 1978.
- [33] Cullity, B.D. *Elements of X-Ray Diffraction*. 2nd ed. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company Inc.; 2001.
- [34] Teixeira, C.E. *Sobre a teoria da difração de raios X em estruturas tridimensionais*. Belo Horizonte: UFMG; 2014.
- [35] Hahn, T. *International Tables for Crystallography. Space-Group Symmetry*. 5 ed: Springer; 2005.
- [36] Costa, F.N. *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; 2013.
- [37] Maia, D.F.S. *Estudos Estruturais de Pequenas e Médias Moléculas por Difração de Raios X em Monocristais*. Minas Gerais: UFMG; 2003.
- [38] Martins, R.d.A. A Descoberta dos Raios X: O Primeiro Comunicado de Röntgen. *Revista Brasileira de Ensino de Física*;20:373-91 1998.
- [39] Batista, A.C. *Caracterização química e estrutural de quartzo*. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso; 2008.
- [40] Figueiredo, L.P. *Análise de excipientes em comprimidos de fármacos comercializados*. Santo André: UFABC; 2012. p. 171.
- [41] Tita, D.L. *Caracterização de polimorfos em comprimidos distribuídos pela Secretaria de Saúde de Araraquara por difração de raios X*. Araraquara: Unesp; 2014.
- [42] Ibiapino, A.L. *Caracterização estrutural das matérias-primas de isoniazida e rifampicina*. Santo André: UFABC; 2013. p. 124.
- [43] Antonio, S.G. *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: UNESP; 2006.
- [44] Junior, L.V.A. *Introdução à Farmácia de Remington*: Artmed Editora; 2015.
- [45] Ferreira, F.F. *Estrutura e intercalação de íons em filmes de óxidos metálicos*. São Paulo: USP; 1998.
- [46] David, W.I.F., Shankland K., Streek J.v.d., Pidcock E., Motherwell W.D.S., Cole J.C. DASH: a program for crystal structure determination from powder diffraction data. *Journal of Applied Crystallography*;39:910-195 2006.

- [47] Coelho, A.A., Evans J., Evans I., Kern A., Parsons S. The TOPAS symbolic computation system. *Powder Diffraction*;26:S22-S25 2011.
- [48] Boulton, A., Louër D. Indexing of powder diffraction patterns for low-symmetry lattices by the successive dichotomy method. *Journal of Applied Crystallography*;24:987-93 1991.
- [49] Černý, R., Favre-Nicolin V. Direct space methods of structure determination from powder diffraction: principles, guidelines and perspectives. *Zeitschrift für Kristallographie*;222:105-13 2007.
- [50] Coelho, A.A. Indexing of powder diffraction patterns by iterative use of singular value decomposition. *Journal of Applied Crystallography*;36:86-95 2003.
- [51] Visser, J.W. A fully automatic program for finding the unit cell from powder data. *Journal of Applied Crystallography*;2:89-95 1969.
- [52] Werner, P.E., Eriksson L., Westdahl M. TREOR, a semi-exhaustive trial-and-error powder indexing program for all symmetries. *Journal of Applied Crystallography*;18:367-70 1985.
- [53] Pawley, G.S. Unit-cell refinement from powder diffraction scans. *Journal of Applied Crystallography*;14:357-61 1981.
- [54] Hofmann, D.W.M. Fast estimation of crystal densities. *Acta Crystallographica*;B57:489-93 2002.
- [55] Rietveld, H.M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *Journal of Applied Crystallography*;2:65-71 1969.
- [56] Toby, B.H. R factors in Rietveld analysis: How good is good enough? *Powder Diffraction*;21:67-70 2006.
- [57] Beatriz, A., Alves W.A. Caracterização estrutural de fármacos com o uso da difração de raios X por policristais e do método de Rietveld. *Química Supramolecular e Nanotecnologia: Atheneu*; 2014. p. 592.
- [58] Larson, A.C., Dreele R.B.V. General Structure Analysis System (GSAS). Los Alamos National Laboratory;224 2004.
- [59] Paiva-Santos, C.O. Aplicações do Método de Rietveld e Potencialidades do Método de Scarlett-Madsen. 2009. p. 2-39.
- [60] Hill, R.J., Howard C.J. Quantitative phase analysis from neutron powder diffraction data using the Rietveld method. *Journal of Applied Crystallography*;20:467-74 1987.
- [61] Mackenzie, R.C. Nomenclature in thermal analysis, part IV. *Thermochimica Acta*;28:1-6 1979.

- [62] Giron, D. Applications of thermal analysis in the pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*;4:755-70 1986.
- [63] Clas, S.-D., Dalton C.R., Hancock B.C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*;2:311-20 1999.
- [64] Souza, K.C.D.d. Preparação e Caracterização de estruturas polimórficas da Tolbutamida e Nifedipina. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2005. p. 93.
- [65] Bernal, C., Couto A.B., Breviglieri S.T., Cavalheiro É.T.G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de Análises Calorimétricas Diferenciais – DSC. *Química Nova*;25:849-55 2002.
- [66] Ionashiro, M., Giolito I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. *Cerâmica*;26:17-24 1980.
- [67] Instruments, M. Zetasizer Nano series: User manual.: England: Malvern Instruments; 2004.
- [68] Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. England: John Wiley & Sons Ltd; 2004.
- [69] Silverstein, R.M., Webster F.X., Kiemle D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC; 2005.
- [70] Miyazaki, C.M. Estudo de Filmes Automontados de Látex de Borracha Natural, Carboximetil-Quitosana e Nanopartículas Magnéticas. Santo André: UFABC; 2010. p. 102.
- [71] Barbosa, L.C.d.A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de Compostos Orgânicos. Viçosa: UFV; 2007.
- [72] Medeiros, A.R.B.d. Uso de ATR/FTIR e FTNIR associado a técnicas quimiométricas para quantificação de aditivos em gasolina automotiva. Brasília: UnB; 2009.
- [73] Skinner, M., Kanfer I. Intrinsic dissolution rate and solubility studies on josamycin, a macrolide antibiotic. *International Journal of Pharmaceutics*;88:151-58 1992.
- [74] Rosa, M.F., Vilhena R.O. Dissolução Intrínseca: conceito e aplicações na indústria farmacêutica. *Revista Eletrônica de Farmácia*;9:49-61 2012.
- [75] Yu, L.X., Carlin A.S., Amidon G.L., Hussain A.S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*;270:221-27 2004.
- [76] Issa, M.G. Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca de metronidazol. São Paulo: USP; 2011.

- [77] Ayres, C., Burke W., Dickinson P., Kirk G., Pugh R., Sharma-Singh G., Kittlety R. Intrinsic dissolution rate determinations in early development and relevance to in vivo performance. *American Pharmaceutical Review*;10:74-78.
- [78] Amidon, G.E., Higuchi W.I., Ho N.F. Theoretical and experimental studies of transport of micelle-solubilized solutes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*;71:77-84 1982.
- [79] Carini, J.P., Pavei C., Silva A.P.C., Machado G., Mexias A.S., Pereira V.P., Fialho S.L., Mayorga P. Solid state evaluation of some thalidomide raw materials. *International Journal of Pharmaceutics*;372:17-23 2009.
- [80] Park, H.J., Kim M.S., Kim J.S., Cho W., Park J., Cha K.H., Kang Y.S., Hwang S.J. Solid-state carbon NMR characterization and investigation of intrinsic dissolution behavior of fluconazole polymorphs, anhydrate forms I and II. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*;58:1243-47 2010.
- [81] Shete, G., Puri V., Kumar L., Bansal A.K. Solid state characterization of comercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. *AAPS PharmSciTech*;11:598-609 2010.
- [82] Tsutsumi, S., Iida M., Tada N., Kojima T., Ikeda Y., Moriwaki T., Higashi K., Moribe K., Yamamoto K. Characterization and evaluation of miconazole salts and cocrystals for improved physicochemical properties. *International Journal of Pharmaceutics*;421:230-36 2011.
- [83] Rogero, S.O., Lugão A.B., Ikeda T.I., Cruz Á.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*;6:317-20 2003.
- [84] Chamberlain, M., Parish W.E. Hazard and risk based on in vitro test data. *Toxicology in Vitro*;4:694-97 1990.
- [85] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and Cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*;65:55-63 1983.
- [86] Cazarin, K.C.C., Corrêa C.L., Zambrone F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*;40:289-99 2004.
- [87] Carvalho, F.M.d.S. Refinamento da estrutura cristalina de quartzo, coríndon e criptomelana utilizando o método de Rietveld. São Paulo: USP; 1996.
- [88] Ibiapino, A.L., Seiceira R.C., Junior A.P., Trindade A.C., Ferreira F.F. Structural characterization of form I of anhydrous rifampicin. *CrystEngComm*;16:8555-62 2014.
- [89] Prado, V.M.d., Seiceira R.C., Junior A.P., Andrade-Filho T., Alves W.A., Rocha A.R., Ferreira F.F. Elucidating the crystal structure of the antimalarial drug ( $\pm$ ) - mefloquine hydrochloride: a tetragonal hydrated species. *Journal of Applied Crystallography*;47:1380-86 2014.



- [90] Macrae, C.F., Edgington P.R., McCabe P., Pidcock E., Shields G.P., Taylor R., Towler M., Streek J.v.d. Mercury: visualization and analysis of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*;39:453-57 2006.
- [91] Mitra, S. *Fundamentals of Optical, Spectroscopic and X-ray Mineralogy*. 2 ed. New Delhi: New Age International; 1996.
- [92] Chauhan, B.S. *Engineering Chemistry*. 1 ed. New Delhi: University Science Press; 2013.
- [93] Storpirtis, S., Marcolongo R., Gasparotto F.S., Vilanova C.M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. *Infarma*;16:51-56 2004.
- [94] Poole, J.W., Owen G., Silverio J., Freyhof J.N., Rosenman S.B. Physiochemical factors influencing the absorption of the anhydrous and trihydrate forms of ampicillin. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*;10:292 1968.
- [95] Vlack, L.H.V. *Princípios de Ciência dos Materiais*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda; 1970.
- [96] Wermuth, C.G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. New York: Academic Press; 2008.
- [97] Ducki, S., Forrest R., Hadfield J.A., Kendall A., Lawrence N.J., McGown A.T., Rennison D. Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*;8:1051-56 1998.
- [98] Maioli, E., Torricelli C., Fortino V., Carlucci F., Tommassini V., Pacini A. Critical Appraisal of the MTT Assay in the Presence of Rottlerin and Uncouplers. *Biological Procedures Online*;11:227-40 2009.

## 9 – Anexos

**Molécula estudada:** LASSBio-1735 anidro

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

**Parâmetros de rede:**  $a = 18,2306(3) \text{ \AA}$ ;  $b = 12,0735(3) \text{ \AA}$ ;  $c = 7,6002(1) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

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

**2 $\theta$  inicial:**  $3^\circ$  e **2 $\theta$  final:**  $60^\circ$

**Tabela 9 - Coordenadas fracionárias (x y z) de todos os átomos da estrutura cristalina do LASSBio-1735 anidro.**

Átomos	x	y	Z
C(1)	0,4784(18)	-0,063(2)	0,4259
C(2)	0,4438(18)	-0,157(2)	0,361(5)
C(3)	0,4370(16)	0,028(2)	0,481(5)
C(4)	0,5603(18)	-0,067(2)	0,434(6)
C(5)	0,368(2)	-0,161(2)	0,349(5)
H(6)	0,4722(18)	-0,219(2)	0,322(5)
C(7)	0,3599(19)	0,022(2)	0,468(5)
H(8)	0,4604(16)	0,093(2)	0,525(5)
O(9)	0,5891(9)	-0,1554(12)	0,462(4)
N(10)	0,6036(12)	0,0280(18)	0,435(4)
C(11)	0,3268(14)	-0,072(3)	0,403(6)
O(12)	0,3323(9)	-0,2509(12)	0,286(4)
O(13)	0,3144(8)	0,1060(13)	0,518(4)
C(14)	0,6829(9)	0,0172(14)	0,468(5)
N(15)	0,5735(12)	0,1223(17)	0,366(5)
O(16)	0,2532(9)	-0,0789(10)	0,391(4)
C(17)	0,3716(11)	-0,3496(15)	0,245(5)
C(18)	0,3423(8)	0,2155(16)	0,525(5)
H(19)	0,6938(9)	0,0611(14)	0,570(5)
H(20)	0,7083(9)	0,0495(14)	0,370(5)
H(21)	0,6966(9)	-0,0589(14)	0,485(5)
C(22)	0,6173(12)	0,205(2)	0,333(5)
C(23)	0,2151(9)	-0,1485(14)	0,509(5)
H(24)	0,3955(11)	-0,3766(15)	0,349(5)
H(25)	0,3380(11)	-0,4048(15)	0,202(5)
H(26)	0,4075(11)	-0,3341(15)	0,156(5)
H(27)	0,3602(8)	0,2376(16)	0,409(5)
H(28)	0,3040(8)	0,2656(16)	0,559(5)

H(29)	0,3817(8)	0,2186(16)	0,607(5)
C(30)	0,590(2)	0,3082(19)	0,261(5)
H(31)	0,6671(12)	0,195(2)	0,356(5)
H(32)	0,2240(9)	-0,1255(14)	0,624(5)
H(33)	0,1634(9)	-0,1470(14)	0,482(5)
H(34)	0,2322(9)	-0,2248(14)	0,492(5)
C(35)	0,5177(13)	0,315(2)	0,202(5)
C(36)	0,6363(15)	0,401(3)	0,248(5)
C(37)	0,4912(15)	0,414(2)	0,134(5)
H(38)	0,4833(13)	0,256(2)	0,213(5)
C(39)	0,6093(13)	0,499(2)	0,175(5)
H(40)	0,6874(15)	0,390(3)	0,285(5)
C(41)	0,5366(14)	0,506(2)	0,120(5)
H(42)	0,4428(15)	0,425(2)	0,091(5)
H(43)	0,6437(13)	0,561(2)	0,176(5)
H(44)	0,5227(14)	0,577(2)	0,073(5)

**Tabela 10 – Algumas distâncias de ligação selecionadas para o LASSBio-1735 anidro.**

<b>Ligações</b>	<b>Comprimentos (Å)</b>
C(1)-C(2)	1,39(5)
C(1)-C(3)	1,40(5)
C(1)-C(4)	1,50(5)
C(2)-C(5)	1,39(5)
C(3)-C(7)	1,41(5)
C(4)-O(9)	1,21(3)
C(4)-N(10)	1,39(3)
C(5)-C(11)	1,37(5)
C(5)-O(12)	1,35(3)
C(7)-C(11)	1,38(5)
C(7)-O(13)	1,36(3)
N(10)-C(14)	1,47(3)
N(10)-N(15)	1,37(3)
C(11)-O(16)	1,35(3)
O(12)-C(17)	1,42(3)
O(13)-C(18)	1,42(2)
N(15)-C(22)	1,30(3)
O(16)-C(23)	1,41(4)
C(22)-C(30)	1,45(4)
C(30)-C(35)	1,39(4)

C(30)-C(36)	1,41(4)
C(35)-C(37)	1,39(4)
C(36)-C(39)	1,40(4)
C(37)-C(41)	1,39(4)
C(39)-C(41)	1,39(4)

**Tabela 11 – Alguns ângulos de ligação selecionados para o LASSBio-1735 anidro.**

<b>Ligações</b>	<b>Ângulos (°)</b>
C(2)-C(1)-C(3)	120
C(2)-C(1)-C(4)	116
C(3)-C(1)-C(4)	124
C(1)-C(2)-C(5)	120
C(1)-C(3)-C(7)	118
C(1)-C(4)-O(9)	118
C(1)-C(4)-N(10)	123
O(9)-C(4)-N(10)	119(3)
C(2)-C(5)-C(11)	120(3)
C(2)-C(5)-O(12)	122(3)
C(11)-C(5)-O(12)	118(3)
C(3)-C(7)-C(11)	120(3)
C(3)-C(7)-O(13)	123(3)
C(11)-C(7)-O(13)	117(3)
C(4)-N(10)-C(14)	119(2)
C(4)-N(10)-N(15)	117(3)
C(14)-N(10)-N(15)	122(2)
C(5)-C(11)-C(7)	121(3)
C(5)-C(11)-O(16)	118(3)
C(7)-C(11)-O(16)	121(3)
C(5)-O(12)-C(17)	120(2)
C(7)-O(13)-C(18)	119(2)
N(10)-N(15)-C(22)	118(3)
C(11)-O(16)-C(23)	119(2)
N(15)-C(22)-C(30)	121(3)
C(22)-C(30)-C(35)	120(3)
C(22)-C(30)-C(36)	120(3)
C(35)-C(30)-C(36)	120(3)
C(30)-C(35)-C(37)	120(3)
C(30)-C(36)-C(39)	119(3)
C(35)-C(37)-C(41)	121(3)

C(36)-C(39)-C(41)	120(3)
C(37)-C(41)-C(39)	120(3)

**Tabela 12 – Alguns ângulos de torção selecionados para o LASSBio-1735 anidro.**

Ligações	Ângulos (°)
C(3)-C(1)-C(2)-C(5)	1
C(4)-C(1)-C(2)-C(5)	180
C(2)-C(1)-C(3)-C(7)	-0
C(4)-C(1)-C(3)-C(7)	-180
C(2)-C(1)-C(4)-O(9)	-32
C(2)-C(1)-C(4)-N(10)	157
C(3)-C(1)-C(4)-O(9)	147
C(3)-C(1)-C(4)-N(10)	-24
C(1)-C(2)-C(5)-C(11)	-1
C(1)-C(2)-C(5)-O(12)	180
C(1)-C(3)-C(7)-C(11)	0
C(1)-C(3)-C(7)-O(13)	-180
C(1)-C(4)-N(10)-C(14)	172
C(1)-C(4)-N(10)-N(15)	-23
O(9)-C(4)-N(10)-C(14)	1(4)
O(9)-C(4)-N(10)-N(15)	166(3)
C(2)-C(5)-C(11)-C(7)	1(5)
C(2)-C(5)-C(11)-O(16)	-179(3)
O(12)-C(5)-C(11)-C(7)	-180(3)
O(12)-C(5)-C(11)-O(16)	0(5)
C(2)-C(5)-O(12)-C(17)	6(4)
C(11)-C(5)-O(12)-C(17)	-174(3)
C(3)-C(7)-C(11)-C(5)	-0(5)
C(3)-C(7)-C(11)-O(16)	180(3)
O(13)-C(7)-C(11)-C(5)	180(3)
O(13)-C(7)-C(11)-O(16)	-0(5)
C(3)-C(7)-O(13)-C(18)	23(4)
C(11)-C(7)-O(13)-C(18)	-157(3)
C(4)-N(10)-N(15)-C(22)	-166(3)
C(14)-N(10)-N(15)-C(22)	-1(4)
C(5)-C(11)-O(16)-C(23)	72(4)
C(7)-C(11)-O(16)-C(23)	-108(3)
N(10)-N(15)-C(22)-C(30)	-180(3)
N(15)-C(22)-C(30)-C(35)	-9(5)

N(15)-C(22)-C(30)-C(36)	172(3)
C(22)-C(30)-C(35)-C(37)	180(3)
C(36)-C(30)-C(35)-C(37)	-1(5)
C(22)-C(30)-C(36)-C(39)	179(3)
C(35)-C(30)-C(36)-C(39)	-0(5)
C(30)-C(35)-C(37)-C(41)	2(4)
C(30)-C(36)-C(39)-C(41)	2(5)
C(35)-C(37)-C(41)-C(39)	-0(4)
C(36)-C(39)-C(41)-C(37)	-2(4)

**Molécula estudada:** LASSBio-1735 di-hidratado

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

**Parâmetros de rede:**  $a = 18,5258(1) \text{ \AA}$ ;  $b = 23,8257(2) \text{ \AA}$ ;  $c = 4,2839(1) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

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

**2 $\theta$  inicial:**  $3^\circ$  e **2 $\theta$  final:**  $60^\circ$

**Tabela 13 - Coordenadas fracionárias (x y z) de todos os átomos da estrutura cristalina do LASSBio-1735 di-hidratado.**

Átomos	x	y	z
O(1)	0,123(2)	0,1433(14)	0,420(12)
H(2)	0,170(15)	0,125(13)	0,42(12)
H(3)	0,09(3)	0,122(15)	0,57(14)
O(4)	0,0435(19)	0,1274(16)	0,953(12)
H(5)	-0,009(16)	0,130(12)	0,94(14)
H(6)	0,06(2)	0,144(16)	0,76(14)
C(7)	0,340(3)	0,1529(17)	0,265(16)
C(8)	0,404(3)	0,175(2)	0,39(2)
C(9)	0,296(2)	0,187(2)	0,081(19)
C(10)	0,319(3)	0,093(2)	0,319(16)
C(11)	0,421(3)	0,231(3)	0,35(2)
C(13)	0,315(3)	0,242(3)	0,036(17)
N(15)	0,371(2)	0,0519(14)	0,291(13)
O(16)	0,2618(19)	0,0818(12)	0,452(11)
C(17)	0,378(4)	0,264(2)	0,167(18)
O(18)	0,4828(17)	0,2553(12)	0,456(11)
O(19)	0,2760(15)	0,2788(11)	-0,135(11)
N(20)	0,4310(19)	0,0641(13)	0,121(14)
C(21)	0,3554(18)	-0,0045(12)	0,40(2)
O(22)	0,3939(16)	0,3195(11)	0,130(10)
C(23)	0,520(3)	0,2315(13)	0,714(14)
C(24)	0,206(2)	0,2619(10)	-0,238(15)
C(25)	0,478(2)	0,0248(17)	0,080(13)
C(29)	0,3623(16)	0,3582(9)	0,339(14)
C(36)	0,547(3)	0,036(2)	-0,080(19)
C(41)	0,580(3)	-0,0081(17)	-0,243(16)
C(42)	0,580(2)	0,0867(18)	-0,067(17)
C(43)	0,645(3)	0,0010(19)	-0,393(16)
C(45)	0,645(3)	0,0948(16)	-0,218(17)

C(47)	0,678(3)	0,052(2)	-0,372(17)
H(12)	0,433(3)	0,152(2)	0,53(2)
H(14)	0,252(2)	0,173(2)	-0,005(19)
H(26)	0,3907(18)	-0,0129(12)	0,56(2)
H(27)	0,3634(18)	-0,0296(12)	0,23(2)
H(28)	0,3072(18)	-0,0077(12)	0,48(2)
H(30)	0,535(3)	0,1923(13)	0,661(14)
H(31)	0,563(3)	0,2519(13)	0,761(14)
H(32)	0,489(3)	0,2292(13)	0,889(14)
H(33)	0,176(2)	0,2549(10)	-0,041(15)
H(34)	0,183(2)	0,2925(10)	-0,339(15)
H(35)	0,207(2)	0,2294(10)	-0,349(15)
H(37)	0,470(2)	-0,0116(17)	0,173(13)
H(38)	0,3778(16)	0,3493(9)	0,548(14)
H(39)	0,3776(16)	0,3954(9)	0,287(14)
H(40)	0,3104(16)	0,3562(9)	0,330(14)
H(44)	0,556(3)	-0,0434(17)	-0,264(16)
H(46)	0,559(2)	0,1181(18)	0,046(17)
H(48)	0,666(3)	-0,0291(19)	-0,504(16)
H(49)	0,670(3)	0,1298(16)	-0,199(17)
H(50)	0,721(3)	0,058(2)	-0,490(17)

**Tabela 14 – Algumas distâncias de ligação selecionadas para o LASSBio-1735 di-hidratado.**

Ligações	Comprimentos (Å)
C(7)-C(8)	1,41(8)
C(7)-C(9)	1,38(8)
C(7)-C(10)	1,50(7)
C(8)-C(11)	1,4(1)
C(9)-C(13)	1,40(9)
C(10)-N(15)	1,38(6)
C(10)-O(16)	1,25(7)
C(11)-C(17)	1,4(1)
C(11)-O(18)	1,37(7)
C(13)-C(17)	1,41(9)
C(13)-O(19)	1,36(8)
N(15)-N(20)	1,38(6)
N(15)-C(21)	1,46(6)
C(17)-O(22)	1,37(6)
O(18)-C(23)	1,43(6)



O(19)-C(24)	1,44(6)
N(20)-C(25)	1,30(6)
O(22)-C(29)	1,45(6)
C(25)-C(36)	1,46(8)
C(36)-C(41)	1,41(9)
C(36)-C(42)	1,41(8)
C(41)-C(43)	1,38(8)
C(42)-C(45)	1,40(8)
C(43)-C(47)	1,41(7)
C(45)-C(47)	1,40(8)

**Tabela 15 – Alguns ângulos de ligação selecionados para o LASSBio-1735 di-hidratado.**

<b>Ligações</b>	<b>Ângulos (°)</b>
C(9)-C(7)-C(10)	119(5)
C(7)-C(8)-C(11)	121(5)
C(7)-C(9)-C(13)	119(5)
C(7)-C(10)-N(15)	121(6)
C(7)-C(10)-O(16)	119(5)
N(15)-C(10)-O(16)	119(5)
C(8)-C(11)-C(17)	120(5)
C(8)-C(11)-O(18)	119(5)
C(17)-C(11)-O(18)	120(6)
C(9)-C(13)-C(17)	124(6)
C(9)-C(13)-O(19)	116(6)
C(17)-C(13)-O(19)	121(6)
C(10)-N(15)-N(20)	124(6)
C(10)-N(15)-C(21)	115(6)
N(20)-N(15)-C(21)	118(4)
C(11)-C(17)-C(13)	119(4)
C(11)-C(17)-O(22)	122(4)
C(13)-C(17)-O(22)	120(6)
C(11)-O(18)-C(23)	120(6)
C(13)-O(19)-C(24)	120(6)
N(15)-N(20)-C(25)	120(4)
C(17)-O(22)-C(29)	118(4)
N(20)-C(25)-C(36)	118(4)
C(25)-C(36)-C(41)	118(4)
C(25)-C(36)-C(42)	121(4)
C(41)-C(36)-C(42)	118(5)

C(36)-C(41)-C(43)	122(5)
C(36)-C(42)-C(45)	119(5)
C(41)-C(43)-C(47)	120(5)
C(42)-C(45)-C(47)	120(5)
C(43)-C(47)-C(45)	120(5)
C(9)-C(7)-C(10)	121(5)
C(7)-C(8)-C(11)	120(5)

**Tabela 16 – Alguns ângulos de torção selecionados para o LASSBio-1735 di-hidratado.**

Ligações	Ângulos (°)
C(9)-C(7)-C(8)-C(11)	0(9)
C(10)-C(7)-C(8)-C(11)	-176(6)
C(8)-C(7)-C(9)-C(13)	-0(9)
C(10)-C(7)-C(9)-C(13)	176(6)
C(8)-C(7)-C(10)-N(15)	-48(9)
C(8)-C(7)-C(10)-O(16)	128(6)
C(9)-C(7)-C(10)-N(15)	136(6)
C(9)-C(7)-C(10)-O(16)	-49(8)
C(7)-C(8)-C(11)-C(17)	-2(10)
C(7)-C(8)-C(11)-O(18)	180(6)
C(7)-C(9)-C(13)-C(17)	2(9)
C(7)-C(9)-C(13)-O(19)	-176(6)
C(7)-C(10)-N(15)-N(20)	-10(8)
C(7)-C(10)-N(15)-C(21)	170(5)
O(16)-C(10)-N(15)-N(20)	174(5)
O(16)-C(10)-N(15)-C(21)	-5(8)
C(8)-C(11)-C(17)-C(13)	4(10)
C(8)-C(11)-C(17)-O(22)	-178(6)
O(18)-C(11)-C(17)-C(13)	-178(6)
O(18)-C(11)-C(17)-O(22)	0(9)
C(8)-C(11)-O(18)-C(23)	-0(9)
C(17)-C(11)-O(18)-C(23)	-179(5)
C(9)-C(13)-C(17)-C(11)	-4(10)
C(9)-C(13)-C(17)-O(22)	178(5)
O(19)-C(13)-C(17)-C(11)	174(6)
O(19)-C(13)-C(17)-O(22)	-4(9)
C(9)-C(13)-O(19)-C(24)	-4(9)
C(17)-C(13)-O(19)-C(24)	178(5)
C(10)-N(15)-N(20)-C(25)	-167(5)

C(21)-N(15)-N(20)-C(25)	12(7)
C(11)-C(17)-O(22)-C(29)	-98(6)
C(13)-C(17)-O(22)-C(29)	80(7)
N(15)-N(20)-C(25)-C(36)	-178(5)
N(20)-C(25)-C(36)-C(41)	-166(6)
N(20)-C(25)-C(36)-C(42)	14(9)
C(25)-C(36)-C(41)-C(43)	-180(5)
C(42)-C(36)-C(41)-C(43)	0(9)
C(25)-C(36)-C(42)-C(45)	180(6)
C(41)-C(36)-C(42)-C(45)	-0(9)
C(36)-C(41)-C(43)-C(47)	0(9)
C(36)-C(42)-C(45)-C(47)	-0(9)
C(41)-C(43)-C(47)-C(45)	-0(9)
C(42)-C(45)-C(47)-C(43)	0(9)