



DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS,
CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS, COM O USO DA DIFRAÇÃO
DE RAIOS X POR POLICRISTAIS.

Fanny Nascimento Costa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cély Rodrigues Barroso

Rio de Janeiro

Junho de 2013

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS,
CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS, COM O USO DA DIFRAÇÃO
DE RAIOS X POR POLICRISTAIS.

Fanny Nascimento Costa

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof. Delson Braz, D.Sc.

Prof. Regina Cély Rodrigues Barroso, D.Sc.

Prof. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro, D.Sc.

Prof. Fabio Furlan Ferreira, D.Sc.

Prof. Pedro Jorge von Ranke Perlingeiro, D.Sc.

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JUNHO DE 2013

Costa, Fanny Nascimento

Determinação estrutural de derivados *N*-
acilidrazônicos, candidatos a protótipo de fármacos,
com o uso da difração de raios X por policristais/
Fanny Nascimento Costa. – Rio de Janeiro:
UFRJ/COPPE, 2013.

XIX, 153 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cély Rodrigues Barroso

Tese (doutorado) – UFRJ / COPPE / Programa de
Engenharia Nuclear, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 134-150

1. Difração de raios X por Policristais. 2.
Determinação estrutural. 3. Luz Síncrotron. 4. *N*-
acilidrazonas. I. Braz, Delson *et al.* II. Universidade
Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de
Engenharia Nuclear. III. Título.

“A maior necessidade do mundo é a de homens - homens que não se comprem nem se vendam; homens que no íntimo da alma sejam verdadeiros e honestos; [...] homens, cuja consciência seja tão fiel ao dever como a bússola o é ao pólo; homens que permaneçam firmes pelo que é reto, ainda que aconteça tudo errado.”

E. G. White

Este trabalho é dedicado ao meu Deus pelo dom da vida. À minha amada mãe, Aidê, que tem dedicado sua vida para me ver feliz e realizada, que sempre me amou e me apoiou incondicionalmente, apesar das adversidades. Aos meus queridos irmãos Anna Karolina e Samuel que são parte de tudo que sou. A Vinicius (o Lindinho) pela compreensão, companheirismo, carinho e cuidado que me fazem mais feliz todos os dias. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Regina Cély Rodrigues Barroso, pela orientação, carinho, amizade sincera e incentivo que fizeram a diferença durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Delson Braz pela orientação e pela confiança na realização do trabalho.

Ao Prof. Eliezer J. Barreiro pela colaboração, por acreditar no trabalho e me inserir no LASSBio. O aprendizado que me foi proporcionado neste laboratório foi fundamental para o meu crescimento científico e acadêmico.

Ao Prof. Fabio Furlan Ferreira pela colaboração, suporte técnico nas medidas de DRXP, pela disponibilidade e acessibilidade com que me auxiliou nas análises dos dados. Sua competência, apoio e paciência foram essenciais e indispensáveis neste trabalho.

Ao Programa de Usuários do Laboratório de Nacional de Luz Síncrotron – LNLS/CNPEM pelo suporte técnico e financeiro (projeto XPD-12474) na realização das medidas de DRXP e ao Dr. Fabiano Yokaichiya, coordenador da linha XPD.

Ao CNPq pelo suporte financeiro concedido através da bolsa.

Ao aluno de doutorado Tiago Fernandes da Silva pela síntese das amostras, auxílio nas medidas no LNLS, pelas discussões, que tanto contribuíram com este trabalho e pela amizade firmada.

Às alunas Marina Amaral Alves (doutorado) e Juliana Vilachã (iniciação científica) pelas análises de pureza.

À Letícia Kuplich e Marcos Vinícius Colaço pelo apoio nas medidas realizadas no LNLS, pelo convívio e amizade.

A todos os demais integrantes do Laboratório de Física Aplicada da UERJ pelo companheirismo, agradável convívio no ambiente de trabalho e momentos de descontração.

A todos os integrantes do LASSBio/UFRJ.

A toda minha família: minha mãe querida, irmãos, primos, tios e vovó, por terem me dado todo incentivo e apoio para que eu chegasse até aqui e que certamente me apoiarão em todos os momentos da minha vida. Vocês são minha base!

Ao meu pai, Wilton, que na minha infância, e apesar da atual distância, sempre me incentivou a crescer intelectualmente.

Aos queridos José Luis Ponche, Maria Gisselda Pelissari e Vinicius Pelissari Jantorno que são mais que especiais na minha vida e que não pouparam esforços para me apoiar neste período.

A todos os meus amigos que sempre vibraram comigo nas minhas conquistas e que estiveram ao meu lado nos momentos difíceis. A vida me mostrou com quem posso contar e vocês sabem que a recíproca é verdadeira.

Aos que passaram pela minha vida e em algum momento me ajudaram e contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

A Deus, que sempre me sustentou, minha eterna gratidão!

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS,
CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS, COM O USO DA DIFRAÇÃO
DE RAIOS X POR POLICRISTAIS

Fanny Nascimento Costa

Junho/ 2013

Orientadores: Delson Braz

Regina Cély Rodrigues Barroso

Programa: Engenharia Nuclear

O uso da difração de raios X para a determinação de arranjos atômicos tridimensionais de estruturas cristalinas de compostos orgânicos e inorgânicos é uma etapa importante, tanto no planejamento de novas substâncias como no desenvolvimento de novos procedimentos para a síntese de compostos já conhecidos. O objetivo deste trabalho é realizar a determinação estrutural de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH), sintetizados no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), usando a técnica de difração de raios X por policristais (DRXP). O grupamento NAH constitui um grupo farmacofórico devido sua relação com uma série de atividades biológicas e neste contexto a subunidade NAH consiste em uma vertente proeminente como ponto de partida para o planejamento racional de fármacos. Ademais, tão importante quanto o planejamento e síntese de novos fármacos é o conhecimento da relação que a estrutura pode ter com o perfil farmacodinâmico e propriedades físico-químicas destes compostos e que pode ser melhor compreendida a partir da determinação da estrutura cristalina dos mesmos. Os programas utilizados nesta tarefa foram o *Topas Academic* e o *DASH* e o método de Rietveld foi utilizado para refinar as estruturas cristalinas. Nesta tese cinco compostos, derivados NAH, foram submetidos a medidas de DRXP e os resultados demonstraram que esta técnica é uma ferramenta poderosa e eficaz para a determinação de estruturas cristalinas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

STRUCTURE DETERMINATION OF *N*-ACYLHYDRAZONES, LEAD-COMPOUNDS CANDIDATES OF DRUGS, USING X-RAY POWDER DIFFRACTION

Fanny Nascimento Costa

June/ 2013

Advisors: Delson Braz

Regina Cély Rodrigues Barroso

Department: Nuclear Engineering

The use of X-rays for determination of three-dimensional atomic arrangements in crystal structures of organic and inorganic compounds is an important stage both in the design of new substances as well as in the development of the new procedures for the synthesis of the already known compounds. The aim of this work is to carry out the structure determination of *N*-acylhydrazones (NAH) derivatives, synthesized in the Laboratory of Synthesis and Evaluation of Bioactive Substances (LASSBio) of the Federal University do Rio de Janeiro using X-ray powder diffraction. The NAH moiety constitutes a pharmacophoric group due to its relation to several biological activities. In this context the NAH subunit consists of a prominent part as a starting point for the rational planning of pharmaceutical compounds. So, as important as the rational planning and synthesis of new drugs is the understanding of both the pharmacodynamics profile and physicochemical properties of these compounds. This knowledge can be obtained by means of crystal structure determination. *Topas Academic* and *DASH* software were used to accomplish this task. The Rietveld method was employed to refine the crystal structures. In this thesis, five compounds, *N*-acylhydrazone derivatives, were submitted for crystal structure determination using X ray powder diffraction data. The results have shown that X-ray powder diffraction is a powerfull and effective tool for the crystal structure determination.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
I INTRODUÇÃO.....	1
<i>I.1 – Aspectos Gerais.....</i>	<i>1</i>
<i>I.2 – Objetivos</i>	<i>7</i>
CAPÍTULO II.....	9
II FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
<i>II.1 - A Química Medicinal.....</i>	<i>9</i>
II.1.1 – A Abordagem Fisiológica no Planejamento de Novos Fármacos	11
II.1.1.1 – Simplificação Molecular	13
II.1.1.2 – Hibridação Molecular	13
II.1.1.3 – A Restrição Conformacional.....	14
II.1.1.4 – A Homologação	14
II.1.1.5 – Bioisosterismo	15
II.1.2 – Otimização de um Composto-Protótipo	17
II.1.3 – Estruturas Privilegiadas	17
II.1.3.1 – As <i>N</i> -acilidrazonas Bioativas.....	18
<i>II.2 – Difração de Raios X.....</i>	<i>19</i>
II.2.1 – A Produção de Raios X.....	22
II.2.1.1 – O Tubo de Raios X	22
II.2.1.2 – Radiação Síncrotron.....	25
II.2.2 – Estruturas Cristalinas	26
II.2.2.1 – Índices de Miller	28
II.2.2.2 – A Rede Recíproca	30
II.2.2.3 – Simetria Cristalina	33
II.2.2.4 – Sistemas Cristalinos e Redes de Bravais	33
II.2.2.5 – Grupos Espaciais.....	35
II.2.3 – Difração de Raios X por Policristais.....	36
II.2.4 – Fatores Importantes na Determinação de Estruturas Cristalinas	41
II.2.4.1 – Fator de Espalhamento Atômico.....	43
II.2.4.2 – Fator de Estrutura.....	44

II.2.4.3 – Fator de Multiplicidade.....	47
II.2.4.4 – Fator de Lorentz e de Polarização.....	48
II.2.5 – Determinação de uma Estrutura Cristalina Desconhecida a partir de Dados de DRXP	48
II.2.5.1 – Indexação	48
II.2.5.2 – Preparação dos dados para a solução da estrutura – Decomposição do Perfil/Ajuste do Perfil.....	50
II.2.5.3 – Solução da Estrutura Cristalina.....	52
II.2.5.4 – Refinamento de Estrutura através do Método de Rietveld	56
II.2.5.4.1 – Fator de Escala.....	58
II.2.5.4.2 – Rugosidade Superficial	59
II.2.5.4.3 – Funções de Perfil	59
II.2.5.4.4 – Orientação Preferencial.....	62
II.2.5.4.5 – Radiação de Fundo ou “ <i>Background</i> ”	63
II.2.5.4.6 – Sobre a Convergência	64
CAPÍTULO III	67
III MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
III.1 – Amostras Estudadas	67
III.1.1 – Caracterização das Amostras.....	71
III.2 – DRXP: Procedimentos Experimentais	76
III.2.1 – Medidas experimentais realizadas no CBPF	77
III.2.2 – Medidas experimentais realizadas no LCCEM/UFABC.....	77
III.2.3 – Medidas experimentais realizadas no LNLS	78
III.2.3.1 – A Linha de Luz D10B-XPD do LNLS	79
III.3 – Metodologia Utilizada no Processo de Determinação das Estruturas Cristalinas	83
CAPÍTULO IV.....	86
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
IV.1 – LASSBio-294.....	86
IV.1.2 - Descrição da Estrutura Cristalina.....	87
IV.2 – LASSBio-129.....	94
IV.2.1 – Descrição da Estrutura Cristalina.....	94

<i>IV.3 – Compostos Ciclohexil-N-Acildrazônicos</i>	102
IV.3.1 – LASSBio-1515	102
IV.3.1.1 – Descrição da Estrutura Cristalina	104
IV.3.2 – LASSBio-1601	111
IV.3.2.1 – Descrição da Estrutura Cristalina	114
IV.3.3 – LASSBio-1733	119
IV.3.3.1 – Descrição da Estrutura Cristalina	122
CAPÍTULO V	132
V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
APÊNDICE A	151
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	151

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura I.1 – Períodos das descobertas de fármacos (Adaptado de RAVINA, 2011).</i>	3
<i>Figura I.2 – Cronografia da descoberta de novos compostos-protótipos no LASSBio, UFRJ (BARREIRO, 2009).</i>	5
<i>Figure II.1 – Diversas disciplinas envolvidas na Química Medicinal evidenciando seu caráter interdisciplinar.</i>	9
<i>Figura II.2 - Estratégias empregadas na identificação de um novo composto-protótipo com base na abordagem fisiológica (BARREIRO, 2009).</i>	12
<i>Figura II.3 - Representação da hidridação como estratégia de modificação molecular. O híbrido A/B é obtido através da ligação dos dois fármacos com ou sem agentes espaçadores (Adaptado de BOSQUESI et al., 2011).</i>	14
<i>Figura II.4 – Planejamento estrutural usando homologação (SANTOS, 2009).</i>	15
<i>Figura II.5 - Modificação estrutural de LASSBio-129 utilizando as estratégias de hibridação, simplificação molecular e restrição conformacional (COSTA, 2008).</i>	16
<i>Figura II.6 – Perfis de Bioatividade de derivados N-acilidrazônicos.</i>	19
<i>Figura II.7 – Diagrama da Lei de Bragg - Interferência em nível planar.</i>	21
<i>Figura II.8 – Tubo de Raios X - Os raios X são produzidos quando elétrons em alta velocidade, provenientes do filamento aquecido, chocam-se com o alvo (anodo) produzindo radiação. (adaptado de SHMUELI, 2007).</i>	23
<i>Figura II.9 – (a) Espectro de raios X de freamento com raios X característicos para voltagem de pico de 60, 90 e 120 kV. (b) Transições eletrônicas (TAUHATA, 2003).</i>	24
<i>Figura II.10 – Representação de uma instalação Síncrotron (adaptado do website: http://www.fotonblog.com/2011/01/via-agencia-fapesp-dezenove.html).</i>	25
<i>Figura II.11 – Estrutura de um sólido cristalino (ALS-NIELSEN e MCMARROW, 2010).</i>	27
<i>Figura II.12 – Unidade espacial básica - cela unitária (CALISTER, 1994).</i>	28
<i>Figura II.13 – Planos da rede e índices de Miller para uma rede bidimensional mostrando os planos (10) e (21). Em ambos os casos a distância interplanar “d” está indicada (ALS-NIELSEN e MCMORROW, 2011).</i>	29

<i>Figura II.14 – Vetor H_{hkl} da rede recíproca, perpendicular aos planos (hkl) (Adaptado de ALS-NIELSEN e MCMORROW, 2011).</i>	30
<i>Figura II.15 – Exemplo de construção da rede recíproca em uma, duas e três dimensões (ALS-NIELSEN e MCMORROW, 2011). Neste caso, $a_1 = a$, $a_2 = b$ e $a_3 = c$ e ainda $a \cdot a^* = 2\pi$.</i>	32
<i>Figura II.16 - As 14 Redes de Bravais em 3D (adaptado de website: http://www.cimm.com.br/portal/material_didatico)</i>	35
<i>Figura II.17 – Para cada conjunto de planos paralelos à superfície da amostra, haverá cristalitos adequadamente orientados para difratar. (Adaptado de MORALES, 2010).</i>	38
<i>Figura II.18 – Perfil de difração de raios X de pó de uma amostra de NaCl.</i>	38
<i>Figure II.19 – Esquema geral dos passos necessários à determinação de uma estrutura cristalina (PECHARSKY e ZAVALIJ, 2005).</i>	55
<i>Figura II.20 – Exemplo de gráfico Rietveld (ANTONIO, 2010)</i>	58
<i>Figura III.1 – Simplificação molecular e o desenvolvimento do LASSBio-294 (SILVA, 2012).</i>	68
<i>Figura III.2 – Planejamento estrutural dos compostos N-acilidrazônicos derivados de LASSBio-294 (SILVA, 2012).</i>	69
<i>Figura III.3 – Fórmula química dos compostos ciclohexil-N-acilidrazônicos planejados a partir de LASSBio-294. A função NAH está destacada em azul, a cicloexila ligada à região amídica em verde e a arila, ligadas à região imínica, em rosa. ..</i>	69
<i>Figura III.4 – Modificação estrutural de LASSBio-1515 através do efeito da metila no planejamento de LASSBio-1733. A função NAH está destacada em azul, a cicloexila ligada à região amídica em verde e a tiofenila, ligada à região imínica, em rosa. A metila encontra-se destacada em vermelho.</i>	70
<i>Figura III.5 – Fórmula química do LASSBio-129 – derivado NAH sintetizado como isómero de LASSBio-294. A função NAH está destacada em azul, a benzodioxola ligada à região amídica em verde e o anel furânico, ligado à região imínica, em rosa.</i>	71
<i>Figura III.6 – Espectro de RMN 1H do LASSBio-1601 (200 MHz, DMSO- d_6/TMS). Duplicação dos sinais referentes aos hidrogênios amídico (A), imínico (B) e ao hidrogênio do carbono terciário da cadeia cicloexila (E) (SILVA, 2012).</i>	73

<i>Figura III.7 - Espectro de RMN de ^{13}C do LASSBio-1601 (75 MHz, DMSO- d_6/TMS). Carbonos monossustituídos e trissustituídos em fase negativa (SILVA, 2012)..</i>	74
<i>Figura III.8 – Possíveis hipóteses para a duplicação de sinais observada em RMN de LASSBio-1601 (SILVA, 2012).....</i>	75
<i>Figura III.9 – Amostra sendo preparada em gral e pistilo de pedra ágata e acomodada em um endorfe.....</i>	76
<i>Figura III.10 – Difratorômetro X’Pert Pro (Panalytical) do Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios X do CBPF e exemplos de fendas e máscaras usadas no alinhamento do feixe.....</i>	77
<i>Figura III.11 – (a) Difratorômetro da marca STOE, modelo STADI P, em geometria de transmissão; (b) destaque para o porta-amostra que é mantido em rotação durante a aquisição dos dados e; (c) amostra acondicionada entre duas folhas de celulose-acetato.....</i>	78
<i>Figura III.12 – Acomodação das amostras em capilar de 0,7mm. Este procedimento ajuda a reduzir possíveis efeitos de orientação preferencial.....</i>	79
<i>Figura III.13 – (a) Anel de armazenamento de elétrons do LNLS e (b) esquema da disposição das linhas de luz ao longo do anel. Em destaque está a linha XPD (adaptado do website www.lnls.br/beamlines/).....</i>	80
<i>Figura III.14 – Setup experimental da linha D10B-XPD (FERREIRA, 2009).....</i>	81
<i>Figura III.15 – Visão geral dos equipamentos utilizados na linha XPD do LNLS.</i>	82
<i>Figura IV.1 – LASSBio-294 – NAH derivada do Safrol</i>	87
<i>Figura IV.2 – Ajuste Rietveld para o LASSBio-294 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho). Este composto cristalizou-se num sistema monoclinico ($P2_1/c$).....</i>	88
<i>Figura IV.3 – Estrutura cristalina do LASSBio-294 evidenciando a configuração relativa E da dupla ligação imínica e indicando que o enxofre, S(22), do anel tiofênico e o oxigênio carbonílico, O(4), estão orientados na mesma direção.....</i>	89
<i>Figura IV.4 – (a) Representação da cela unitária de LASSBio-294 ao longo do eixo b, exibindo algumas ligações de H (em azul), formando assim uma rede de agregados moleculares em ao longo do eixo c. (b) Possíveis interações do tipo “π-stacking” (linhas magenta) entre os átomos de C(13)-C(21) e C(13)-O(17), bem como suas distâncias em Å.....</i>	90
<i>Figura IV.5 – Visão paralela e frontal da estrutura cristalina de LASSBio-294 (a) determinada a partir de dados de DRX por monocristal (KÜMMERLE et al., 2009)</i>	

<i>e (b) determinada a partir de dados de DRX por policristais evidenciando a equivalência entre as estruturas.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura IV.6 – Estrutura cristalina do LASSBio-129 evidenciando o caráter não planar da molécula e a configuração relativa E da dupla ligação C=N.</i>	<i>96</i>
<i>Figura IV.7 – Ajuste Rietveld para o LASSBio-129 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho). Este composto cristalizou-se no sistema ortorrômbico com grupo espacial $P2_12_12_1$.</i>	<i>97</i>
<i>Figura IV.8 – (a) Empacotamento ao longo do eixo b; (b) Interações de hidrogênio (em azul) formando o agregado cristalino ao longo da rede; (c) interações complementares (verde) com as medidas das distâncias em Å.</i>	<i>98</i>
<i>Figura IV.9 – (a) Comparação entre os perfis de difração de LASSBio-294 e LASSBio-129 mostrando que embora estas moléculas se diferenciem por apenas um átomo, o caráter único de cada PD é preservado; (b) Comparação entre as estruturas cristalinas evidenciando a diferença entre o caráter planar de LASSBio-294 e a não planaridade da molécula de LASSBio-129.</i>	<i>101</i>
<i>Figura IV.10 – Emprego da estratégia de simplificação molecular no planejamento racional do LASSBio-1515 substituindo o grupamento benzodioxola, da subunidade acila da função NAH, por um grupo cicloexila.</i>	<i>103</i>
<i>Figura IV.11 - Estrutura cristalina do LASSBio-1515 evidenciando a configuração relativa E da ligação C=N, o enxofre do anel tiofênico e o oxigênio carbonílico orientados na mesma direção e a conformação do tipo cadeira para a cicloexila com substituição na posição equatorial.</i>	<i>105</i>
<i>Figura IV.12 - Ajuste Rietveld para o LASSBio-1515 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho). Cristalizou-se no sistema monoclinico com grupo espacial $P21/c$.</i>	<i>106</i>
<i>Figura IV.13 – (a) Empacotamento da cela unitária (Z = 4) de LASSBio-1515 ao longo do eixo c; (b) formação do agregado cristalino ao longo da rede evidenciando as interações de hidrogênio intermoleculares entre a carbonila, O(12), e nitrogênio amídico, N(13), da função NAH.</i>	<i>110</i>
<i>Figura IV.14 – Agregado cristalino de LASSBio-1515 com destaque para possíveis interações do tipo “π-stacking” entre anéis tiofênicos (C(26)-H(29) = 2,77(2) Å).</i>	<i>111</i>
<i>Figura IV.15 - Ajuste Rietveld para o LASSBio-1601 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho) apesar do alto</i>	

“background” devido a condições experimentais. Este composto cristalizou-se em um sistema triclinico com grupo espacial $P\bar{1}$	113
Figura IV.16 - Estrutura cristalina do LASSBio-1601. A configuração relativa E da dupla ligação imínica e a a conformação cadeira da cicloexila, com substituição na posição equatorial, além da conformação s-trans da função amida da NAH.	116
Figura IV.17 – Cella unitária de LASSBio-1601 (a) evidenciando as interações de hidrogênio (em azul) importantes para a organização das moléculas ao longo da rede cristalina.....	118
Figura IV.18 – Prováveis interações do tipo π -stacking entre a fenila e a função NAH com distâncias medidas em Å [$C(28)-N(8) = 3,639(5)$; $C(26)-N(94) = 3,664(4)$].	119
Figura IV.19 – Espectro de RMN de 1H de LASSBio-1733 [300Mhz, DMSO-d6/TMS] (SILVA,2012).	121
Figura IV.20 – Efeito indutivo da metila e aumento do caráter s da ligação amídica de LASSBio-1733 (SILVA, 2012).....	122
Figura IV.21 - Ajuste Rietveld para o LASSBio-1733 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho).....	123
Figura IV.22 - Estrutura cristalina do LASSBio-1733. A configuração relativa E da dupla ligação imínica e a conformação cadeira da cicloexila, com substituição na posição equatorial e conformação dobrada, característica de compostos N-metilados.....	124
Figura IV.23 – (a) Cella unitária de LASSBio-1733 (b) evidenciando as interações intermoleculares de caráter mais fraco (em vermelho), com distâncias menores que a soma do raio de van der Waals. Pode-se sugerir que estas interações contribuem para a organização das moléculas ao longo da rede cristalina.	128
Figura IV.24 – Destaque para provável interação do tipo π -stacking envolvendo a função NAH e a tiofenila, com o comprimento das ligações $N(3)-S(30) = 3,76(2)$ Å e $N(8)-S(30) = 3,80(2)$ Å.	129
Figure IV.25 – Quanto aos aspectos estruturais, em fase sólida, a N-metilação de LASSBio-1515 levou a um dobramento na conformação de LASSBio-1733.	131
Figura V.1 - Representantes das classes ciclopentil-N-acilidrazônicos, ciclobutil-N-acilidrazônicos, ciclopropil-N-acilidrazônicos que poderão ser elucidados em trabalhos futuros.	133

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela II.1 – Informações a respeito da estrutura cristalina, propriedades da amostra e os parâmetros instrumentais relacionados com as componentes de um perfil de DRXP (PECHARSKY e ZAVALIJ, 2005).</i>	39
<i>Tabela II.2 – Relação entre as distâncias interplanares e os parâmetros de rede da cela unitária, para cada sistemas cristalinos</i>	42
<i>Tabela II.3 – Condições de não-extinção de reflexões associadas aos tipos de estrutura cristalina e aos elementos de simetria (adaptado de (BORGES, 1996).</i>	46
<i>Tabela II.4 - O fator de multiplicidade em função dos sistemas cristalinos.</i>	47
<i>Tabela III.1 – Dados da calibração do Monocromador.</i>	83
<i>Tabela IV.1 - Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-294.</i>	91
<i>Table IV.2 – Coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($U_{iso} = B_{iso}/8\pi^2$) de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-294.</i>	92
<i>Tabela IV.3 – Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-129.</i>	99
<i>Table IV.4 – Coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($U_{iso} = B_{iso}/8\pi^2$) de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-129.</i>	100
<i>Tabela IV.5 – Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-1515.</i>	107
<i>Table IV.6 – Coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($U_{iso} = B_{iso}/8\pi^2$) de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-1515.</i>	108
<i>Tabela IV.7 – Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-1601.</i>	115
<i>Table IV.8 – Coordenadas de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-1601.</i>	117

<i>Tabela IV.9 – Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-1733.....</i>	<i>125</i>
<i>Table IV.10 – Coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($U_{iso} = B_{iso}/8\pi^2$) de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-1733.....</i>	<i>127</i>

CAPÍTULO I

I INTRODUÇÃO

I.1 – Aspectos Gerais

O conhecimento popular primitivo e não-científico para encontrar alívio para seus males sempre foi utilizado. Basicamente, os recursos terapêuticos utilizados pelos povos mais antigos concentravam-se nos recursos da natureza, notadamente nas plantas, animais e minerais. Até os dias de hoje, com os fármacos contemporâneos desenvolvidos com o uso das tecnologias mais avançadas, a busca por tratamento e pela cura das doenças que afligem a humanidade moderna continua instigando a comunidade leiga e incentivando a comunidade científica (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Antes do século XVIII, a farmácia permanecia como uma ciência empírica, guiada apenas por uma medicina herdada dos antigos, que lançavam mão do uso de plantas, minerais e produtos animais e que gerou muitas informações acerca do potencial terapêutico de determinadas plantas e outras fontes naturais (WERMUTH, 2008 e SNEADER, 2005). É a partir do século XVIII que a química adquire definitivamente as características de uma ciência experimental pelo desenvolvimento de metodologia científica de alta precisão, tornando-se uma ciência dita exata e há um afastamento das práticas terapêuticas e médicas, ocorrendo certa estagnação nos estudos e descobertas de fármacos (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Foi somente no século XIX que começaram as buscas pelos princípios ativos existentes nas plantas medicinais. Assim, os primeiros medicamentos com as características que conhecemos atualmente, foram criados. Em 1806, Friedrich Sertürner, isolou o alcaloide morfina da papoula (*Papaver somniferum*), fato que marcou uma busca constante por outros medicamentos a partir de plantas.

O desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial foi marcado pela descoberta da salicina em 1829 a partir da planta *Salix alba*. A primeira modificação estrutural foi feita a partir da salicina, dando origem ao ácido salicílico em 1839 e a partir do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou o ácido acetil salicílico, em 1897, utilizado até os dias hoje (WERMUTH, 2008).

Loius Pasteur também deu importantes contribuições para a ciência. Suas descobertas tiveram grande impacto na medicina, dando início ao que atualmente chamamos de microbiologia. O jovem químico com apenas 26 anos de idade realizou seu primeiro trabalho que já revolucionou o que hoje conhecemos por estereoquímica, ao estabelecer relações entre a cristalografia, a química e a óptica falando sobre assimetria molecular. Entre 1877 e 1887 ao pesquisar doenças infecciosas Pasteur descobriu três bactérias responsáveis por doenças nos homens: estafilococos, estreptococos e pneumococos. Outra contribuição muito importante dada por Pasteur, foi a descoberta do agente transmissor da raiva. Em março de 1886, Pasteur apresentou os resultados para o tratamento da raiva na Academia de Ciências Francesa e foi então convidado a criar um centro para produção de vacina antirrábica.

Dentre os brilhantes pioneiros da ciência, considerado o pai da Química Orgânica, Hermann Emil Fischer recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1902. Fischer desenvolveu um modelo pioneiro conhecido como “chave-fechadura” (*lock-key*), definindo que as moléculas dos compostos ativos no organismo como, por exemplo, os fármacos, seriam as “chaves” e os bioreceptores as “fechaduras”. Da interação chave-fechadura se obteria a resposta farmacológica da substância (WERMUTH, 2008).

Contemporâneo a Fischer, Paul Ehrlich recebeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1908. Ehrlich criou a expressão “bala mágica” (*magic bullets*) dando origem ao conceito de “receptores específicos” em biologia. Segundo a sua teoria, cada doença estaria atrelada a um alvo molecular (bioreceptor). Para curá-las seria necessário encontrar fármacos que se ligassem a esses alvos como “balas mágicas”. Ao serem administradas, atingiriam apenas o alvo da doença, deixando intactas as outras células do organismo (BARREIRO, 2011). O conceito que Paul Ehrlich estabeleceu acerca do mecanismo de ação dos medicamentos, foi fundamental para a criação dos medicamentos sintéticos: “*Corpora Non Agunt Nisi Fixate*” – Uma substância química não funcionará a menos que ela seja capaz de se ligar em um sítio específico. O reconhecimento do receptor por parte do fármaco e o planejamento racional deste fármaco são dois importantes aspectos que formam as bases da atual Química Medicinal (YUNES *et al.*, 2001; KING, 1994).

Nos anos subsequentes, surgiu o conceito relativo aos receptores farmacológicos, que propiciou o desenvolvimento da grande maioria das drogas modernas disponíveis no mercado. A enorme contribuição de Paul Ehrlich para o desenvolvimento da

terapêutica moderna, não ficou restrita a esse conceito fundamental. Em 1906, trabalhando com corantes e em parceria com a Hoechst, Ehrlich decidiu fazer modificações estruturais nos compostos chamados arsenobenzenos. Após sintetizar 606 compostos, descobriu a arsfenamina, denominada posteriormente como Salvarsan, utilizada para o tratamento da sífilis (CALIXTO e SIQUEIRA JR., 2008).

Nas primeiras décadas do século XX, surgem, ainda, outras descobertas importantes de alguns medicamentos que marcaram a história da humanidade. Entre outras, pode ser mencionada a descoberta da sulfonamida, e mais tarde da penicilina por Alexander Fleming, em 1928. Assim, na segunda metade do século XX, o processo de planejamento de análogos tornou-se altamente sofisticado (SNEADER, 2005).

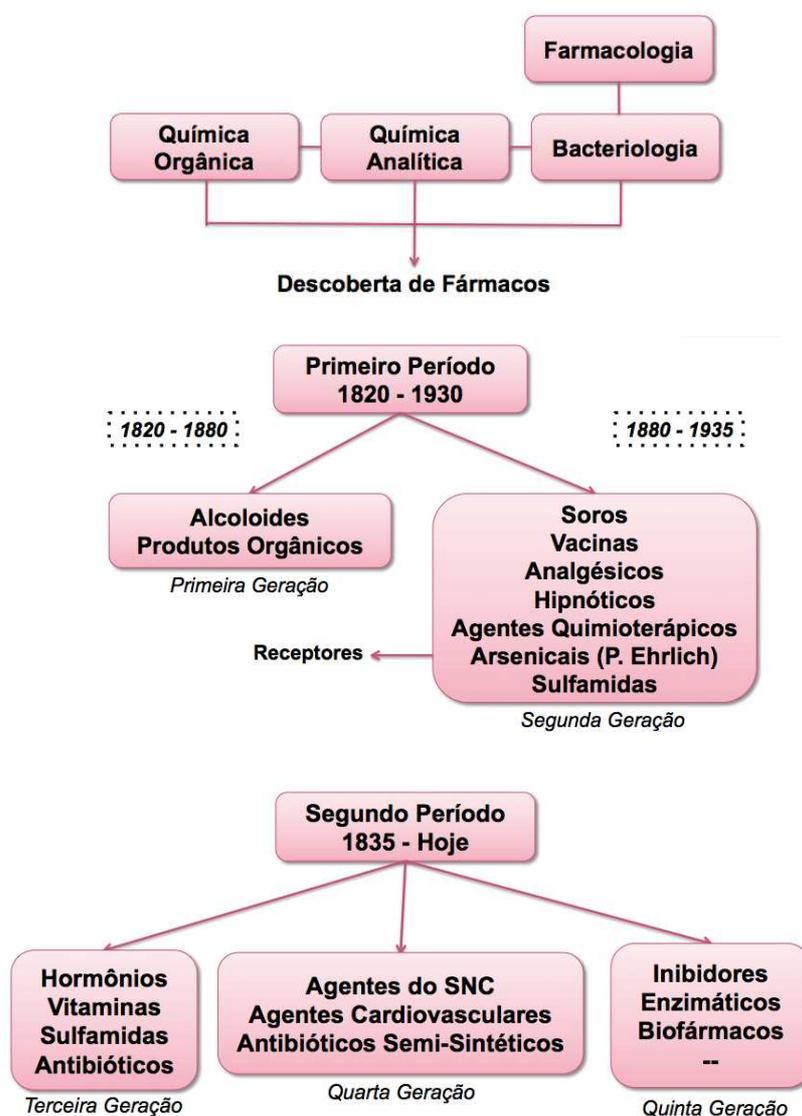


Figura 1.1 – Períodos das descobertas de fármacos (Adaptado de RAVINA, 2011).

A Figura I.1 apresenta uma visão geral da evolução da descoberta de fármacos dividida em cinco períodos. Foi necessário que os químicos, que trabalhavam no desenvolvimento desses fármacos, fossem adquirindo conhecimento em outras áreas, em paralelo ao conhecimento da química, para que as pesquisas lograssem êxito até os dias atuais (DREWS, 2000).

O conceito de Química Medicinal reflete, claramente, esta visão interdisciplinar que era necessária aos químicos que pretendiam trabalhar no desenvolvimento de novos fármacos. Ela é uma ciência interdisciplinar que tem um amplo domínio. Estuda as razões moleculares da ação dos fármacos de maneira a descrever a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica, hierarquizando as diferentes contribuições funcionais. Atua na interface da química orgânica com ciências da vida, englobando, bioquímica, farmacologia, biologia molecular, genética, imunologia, farmacocinética e toxicologia. Envolve também disciplinas como a físico-química, cristalografia, espectroscopia e ainda técnicas computacionais de simulação, análise de dados e visualização de dados. Os objetivos da Química Medicinal são: encontrar, desenvolver e melhorar as substâncias que podem curar ou aliviar doenças e entender os fatores causativos que acompanham o processo químico. Aqui deve ser incluído o planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de representar novas entidades químicas, candidatas a protótipos de novos fármacos de uso seguro. Esta complexa tarefa envolve múltiplos fatores, responsáveis pela resposta terapêutica desejada e decorrentes da complexidade dos sistemas biológicos, abrangendo diversos conceitos de diferentes disciplinas, não podendo ser cumprida aleatoriamente (WERMUTH *et al.*, 1998; WERMUTH, 2008; BARREIRO *et al.*, 2002).

Dentre os fatores que envolvem a elucidação de todas as etapas necessárias para descrever a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica de um protótipo, candidato a novo fármaco, pode-se incluir o estudo estrutural em nível atômico deste. O uso dos raios X para a determinação do arranjo tridimensional em estruturas cristalinas de compostos orgânicos e inorgânicos é um importante estágio tanto no desenho de novas substâncias como no desenvolvimento de novos procedimentos para a síntese de compostos já conhecidos (CHERNYCHEV, 2001).

Em 1995, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, foi criado o LASSBio, *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas*, com o objetivo de realizar

trabalhos de pesquisa visando a descoberta de novas substâncias bioativas, candidatos a protótipos de novos fármacos (BARREIRO, 2013). Ao longo dos anos, vários protótipos de novos fármacos foram descobertos, como o LASSBio-294, protótipo cardioativo que foi a primeira patente obtida pelo LASSBio, em 2006 (SILVA, *et al.*, 2005; SILVA, *et al.*, 2002; SUDO, *et al.*, 2001; GONZALEZ-SERRATOS, *et al.*, 2001 e SUDO, *et al.*, 2006). A comparação estrutural de alguns protótipos descobertos no LASSBio, ilustrados na Figura I.2, indica certas características comuns, como a presença da função *N*-acilidrazona e do bióforo benzodioxila, originário do safrol, que é um importante alil-benzeno natural isolado do óleo de sassafrás (obtido da canela branca, *Ocotea pretiosa*) (BARREIRO, 2009).

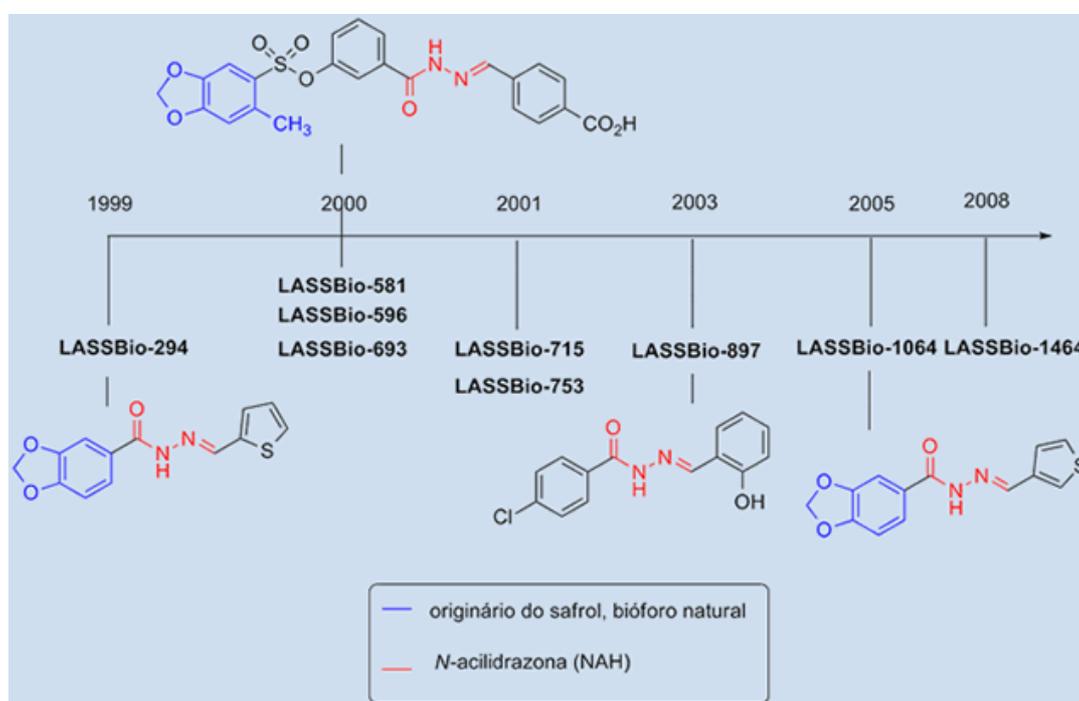


Figura I.2 – Cronografia da descoberta de novos compostos-protótipos no LASSBio, UFRJ (BARREIRO, 2009).

Como os fármacos são tipicamente compostos orgânicos que existem em várias formas e que se caracterizam por diferentes propriedades físicas e químicas, têm-se aí uma oportunidade para o cientista que está interessado em entender a estrutura e/ou propriedades relacionadas aos sólidos orgânicos (ANTONIO, 2010). A eficácia terapêutica de um fármaco, bem como de um composto-protótipo, está diretamente relacionada com as propriedades físico-químicas deste composto, tais como solubilidade, taxas de dissolução, estabilidade química, cor, ponto de fusão e também, ao hábito cristalino e ao tamanho da partícula (SNIDER *et al.*, 2004). Essas

propriedades podem ser bem compreendidas através da caracterização e/ou determinação estrutural por difração de raios X (DRX).

A difração de raios X é uma das ferramentas mais antigas usadas no estudo da estrutura da matéria. Em 1912, Laue, Knipping e Friedrich demonstraram que os cristais se comportam como uma rede de difração e que os raios X possuem natureza ondulatória. Em 1913, William Henry Bragg e seu filho William Lawrence Bragg propuseram uma maneira simples de compreender e prever o fenômeno da difração de raios X que ocorre em um cristal: a lei de Bragg. Desde então, a difração de raios X tornou-se uma ferramenta básica (e a mais amplamente utilizada) na caracterização de um grande número de materiais (ANDRADE, 2003).

A caracterização de materiais por DRX pode ser feita utilizando-se monocristais ou policristais. Embora a DRX por monocristal seja a técnica mais poderosa e rotineiramente aplicada para determinar estruturas cristalinas, uma intrínseca limitação dessa técnica é a preparação de um monocristal de tamanho suficiente, qualidade e estabilidade. Se o monocristal desejado não puder ser obtido, é necessário lançar mão da determinação da estrutura utilizando dados de difração por policristais. Além disso, os pós e materiais prensados são mais fáceis de serem obtidos, são mais práticos e mais baratos; assim, a DRX por policristais torna-se uma boa alternativa na solução de muitos problemas. Porém, devido à alta sobreposição de picos a altos ângulos de difração, até meados da década de 60 a difração de raios X pelo método do pó (por policristais) era comumente utilizada apenas na análise qualitativa de fases. A partir dos trabalhos de Rietveld (1967, 1969) e com os avanços sobre este método (melhores modelos matemáticos e computadores cada vez mais rápidos e baratos), tornou-se possível um grande número de análises usando todo o perfil de difração de pó, tais como a identificação e quantificação das fases presentes num sistema policristalino multifásico, análise de tamanho de cristalito e microdeformação da rede cristalina, análise da ocupação de sítios cristalográficos por dopantes adicionados aos materiais (estequiometria), análise de posições atômicas, distâncias interatômicas, ângulos de ligação, além da determinação da estrutura. (ANDRADE, 2003; YOUNG, 1993; BYRN, *et al.*, 1995; GIRON, *et al.*, 1990 ; STEPHENSON, *et al.*, 2001 e BOTEZ, *et al.*, 2003).

Recentemente, despertou-se um considerável interesse nesta área, e progressos consideráveis tanto no desenvolvimento de novas técnicas como na aplicação destas

para lidar com uma ampla gama de problemas estruturais estão sendo feitos (HARRIS, 2002). Melhora significativa tem sido feita nos dispositivos de geração de raios X (ânodo rotatório, luz síncrotron), detecção de raios X (detectores de estado sólido, sensíveis à posição, múltiplos detectores) e resolução (luz síncrotron, monocromadores sagitais, espelhos de focalização e outros). Tudo isso resulta em maior sofisticação na caracterização de materiais, inclusive fármacos, possibilitando obter uma maior quantidade de informações do perfil de difração do que se tinha até então (ANTONIO, 2010 e STEPHENSON, 2005).

- A determinação da estrutura de um cristal a partir de dados de difração (monocristal ou pó), de modo geral, compreende as seguintes fases:
- Determinação da cela unitária (indexação) e determinação da simetria (atribuição do grupo espacial);
- Solução da estrutura;
- Refinamento da estrutura.

Este procedimento é muito mais complicado do que possa parecer e pode envolver um grande número de estágios internos quando os resultados de uma determinada fase não forem satisfatórios e houver necessidade de retornar para uma das etapas anteriores, em vez de prosseguir para a próxima fase (HARRIS, 2002). A descrição completa da técnica de difração de raios X de pó e de cada uma dessas fases necessárias à determinação de uma estrutura cristalina serão apresentadas no capítulo II.

1.2 – Objetivos

Este trabalho foi desenvolvido com a colaboração do *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas*, o LASSBio, da UFRJ e tem como objetivo o estudo estrutural, em nível atômico, de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH). Estes derivados são bastante conhecidos por apresentarem atividade biológica em diferentes alvos farmacológicos e por este motivo se tornam um interessante alvo de pesquisa (FRAGA e BARREIRO, 2006; ROLLAS e KÜÇÜKGÜZEL, 2007; RODRIGUES, 2008).

Pode-se dizer que um dos fatores que definem as propriedades farmacológicas que cada fármaco terá é o arranjo estrutural que ele apresenta. Assim, tão importante quanto

a síntese de novos fármacos é a sua caracterização estrutural, já que sua estrutura (conformação) pode estar diretamente relacionada com a ação terapêutica pretendida. A partir desse conhecimento torna-se necessário que características como: distâncias interatômicas, ângulos de ligação, ângulos de torção, configuração relativa da molécula, entre outros aspectos importantes da geometria molecular, sejam revelados e analisados. Dessa forma, a necessidade de novas pesquisas para a elucidação de estruturas cristalinas se torna imprescindível.

A DRX vem ao encontro dessa necessidade, pois é adequada para a análise de sólidos cristalinos. Porém, muitas vezes, no LASSBio tem-se enfrentado a dificuldade de produzir monocristais de tamanho, qualidade e estabilidades suficientes para que estes sejam avaliados através DRX por monocristal. Neste contexto, a DRX por policristais tem se mostrado uma ferramenta poderosa e efetiva para a análise de fármacos e também para determinar estruturas desconhecidas (FLORENCE *et al.*, 2005).

Nesta tese, usando a técnica de *Difração de Raios X por Policristais*, cinco derivados *N*-acilidrazônicos foram avaliados e tiveram suas estruturas cristalinas determinadas. Estas informações darão subsídio para uma melhor compreensão do perfil farmacodinâmico e das propriedades físico-químicas destes compostos.

CAPÍTULO II

II FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica dos aspectos envolvidos na síntese de novos compostos-protótipos, sob o ponto de vista da Química Medicinal. Aspectos sobre a teoria de difração de raios X e aspectos envolvidos na determinação de estruturas cristalinas também serão apresentados.

II.1 - A Química Medicinal

A descoberta de fármacos é um processo complexo, custoso e orquestrado, que exige trabalho em equipe e especialistas de várias áreas do conhecimento. Trata-se de atividade multidisciplinar (Figura II.1) que desde seu princípio tem a Química Medicinal como eixo central do processo.

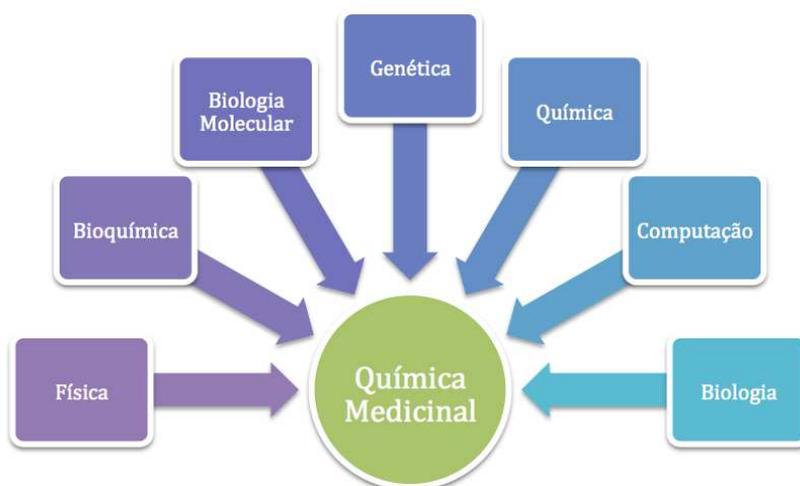


Figure II.1 – Diversas disciplinas envolvidas na Química Medicinal evidenciando seu caráter interdisciplinar.

Segundo a definição da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), a Química Medicinal é uma disciplina baseada na química, que envolve as ciências biológica, médica e farmacêutica, entre outras, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação em nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (IUPAC, 1997).

Um projeto de Química Medicinal compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo (WERMUTH, 2003). A descoberta é a etapa que se destina à eleição do alvo terapêutico, útil para o tratamento de uma determinada fisiopatologia, a aplicação de estratégias de planejamento molecular para desenho de ligantes do alvo selecionado utilizando as estratégias de modificação molecular clássicas da Química Medicinal, tais como bioisosterismo, homologação, simplificação e hibridação molecular, ou pelo emprego de técnicas computacionais como a modelagem molecular e estudos da *Relação Estrutura-Atividade* (REA) (BARREIRO e MANSSOUR, 2001; BARREIRO, 2002; LIMA e BARREIRO, 2005), método de correlação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica, onde a variação de atividade pode ser quantitativamente correlacionada com as variações das propriedades físico-químicas e características estruturais de uma série de moléculas (SANT`ANNA, 2002; ZHOU e MADURA, 2004). Compreende, ainda, realizar a determinação das atividades farmacológicas do ligante, que uma vez ativo *in vivo*, preferencialmente por via oral, passa a ser denominado protótipo (LIMA, 2007).

A etapa de otimização compreende o melhoramento da estrutura do protótipo, através de modificações planejadas com auxílio de técnicas definidas, que podem identificar os diferentes níveis de contribuição farmacofórica, fornecer informações sobre a conformação bioativa e antecipar o índice de reconhecimento molecular pelo alvo selecionado, visando o aumento da potência, seletividade, diminuição da toxicidade, adequação do perfil farmacocinético e estabelecimento da relação estrutura-atividade, a partir da síntese e avaliação farmacológica, *in vitro* e *in vivo*, de séries congêneres ao protótipo identificado originalmente (LIMA, 2007; BARREIRO e MANSSOUR, 2001).

A etapa de desenvolvimento do protótipo objetiva a otimização de suas propriedades “ADMET” (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) e farmacêuticas (solubilidade, odor, sabor), de modo a viabilizar seu uso clínico, através da preparação eventual de pró-fármacos, complexos de inclusão, micro emulsões, formulações de liberação lenta, entérica etc. (LIMA, 2007).

Diversas estratégias da Química Medicinal podem ser empregadas no desenho molecular de novos candidatos a protótipos de fármacos. Além disso, estas estratégias são cruciais na etapa de modificação molecular necessária à sua otimização, diminuindo

efeitos colaterais e aumentando sua potência, por exemplo, (BARREIRO, 2009). A seguir apresentaremos algumas dessas estratégias.

II.1.1 – A Abordagem Fisiológica no Planejamento de Novos Fármacos

Este processo inicia-se pela escolha correta do alvo-terapêutico relacionado à patologia que se pretende tratar. Posteriormente, passa por validação terapêutica e pela identificação ou descoberta de novos padrões moleculares de substâncias novas e inovadoras, capazes de serem reconhecidas de forma eficiente, ou seja, com níveis adequados de seletividade, pelos alvos-terapêuticos eleitos, promovendo resposta biológica, de preferência por administração oral e com o menor índice de toxicidade possível (BARREIRO E FRAGA, 2005).

A eleição do alvo-terapêutico é a etapa crítica no sucesso desta estratégia e depende estreitamente dos conhecimentos bioquímicos sobre a fisiopatologia da doença em estudo e seus mecanismos farmacológicos. Desta forma, identifica-se a localização celular e biológica do alvo-terapêutico (BARREIRO E FRAGA, 2005). A estrutura molecular do alvo-terapêutico, enzima ou receptor, pode ser conhecida ou não. Em ambos os casos, o planejamento molecular do novo protótipo pode ser realizado introduzindo-se modificações moleculares, baseadas nas relações estrutura-atividade desejadas ou através de técnicas computacionais, para estudar os índices de complementaridade molecular entre bioligante-receptor e os diferentes tipos de interações envolvidas (MURCKO, CARON e CHARIFSON, 1999; BARREIRO et al., 1997).

Uma vez identificado um análogo-ativo e comprovada a atividade farmacológica pretendida, através de protocolos farmacológicos *in vivo*, tem-se então um novo composto-protótipo, candidato a novo fármaco. Outras modificações moleculares podem ser realizadas no novo composto-protótipo, para otimizar sua potência e eficácia. Estas modificações devem ser planejadas de modo a aprimorar as propriedades farmacocinéticas e adequar eventual perfil de toxicidade identificado nos bioensaios *in vivo* (RODRIGUES, 2008).

A Figura II.2 apresenta o esquema das etapas envolvidas neste processo e evidencia o grau de complexidade e interdisciplinaridade que o caracteriza.

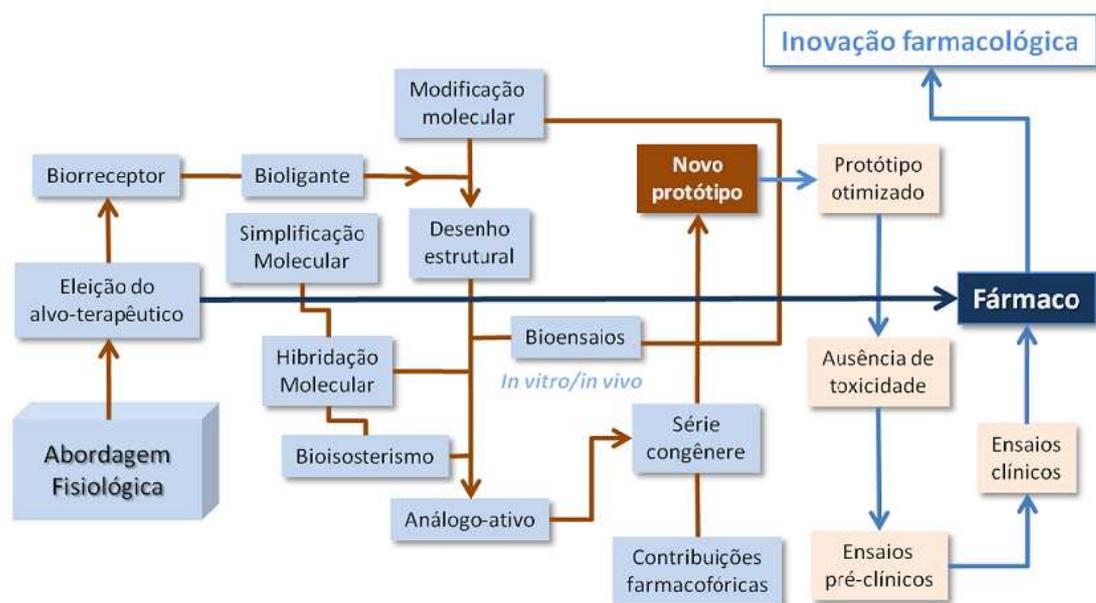


Figura II.2 - Estratégias empregadas na identificação de um novo composto-protótipo com base na abordagem fisiológica (BARREIRO, 2009).

A integração do conhecimento científico próprio de diversas disciplinas é que contribui para a correta identificação do melhor alvo-terapêutico a ser eleito para tratamento, prevenção ou cura de uma fisiopatologia determinada, o que caracteriza a abordagem fisiológica (BARREIRO e MANSSOUR, 2001 e LINDSAY, 2003).

A escolha da estratégia de planejamento estrutural a ser adotada para o desenho molecular do novo ligante dependerá do nível de conhecimento estrutural do alvo terapêutico eleito. Caso seja conhecida a estrutura tridimensional do alvo-eleito e, principalmente, aquela do sítio de reconhecimento molecular, o planejamento molecular de ligante seletivo pode apelar para estratégias baseadas na química computacional.

Alternativamente, quando a estrutura do alvo terapêutico não é conhecida, o desenho molecular de novos padrões estruturais do candidato a composto-protótipo desejado pode ser conduzido a partir do emprego de estratégias de planejamento estrutural da Química Medicinal, isto é, identificação de novos análogos ativos do substrato natural do receptor ou do agonista da enzima eventualmente eleita como alvo-terapêutico. O planejamento molecular racional destes análogos-ativos pode se dar pelo emprego do bioisosterismo, da simplificação molecular, da hibridação molecular, entre outras metodologias de planejamento molecular da Química Medicinal.

Independente da estratégia adotada para planejamento molecular dos novos padrões estruturais dos candidatos a compostos-protótipos, deve-se, obrigatoriamente, levar em conta todas as possíveis contribuições toxicofóricas das subunidades moleculares presentes na série congênere de compostos planejados, especialmente quanto ao potencial tóxico relacionado ao sistema (BARREIRO E FRAGA, 2005).

II.1.1.1 – Simplificação Molecular

A simplificação molecular foi inicialmente empregada na obtenção de compostos estruturalmente mais simples, a partir de protótipos naturais ativos, estruturalmente complexos. Esta estratégia de planejamento molecular de novos fármacos foi empregada em seus primórdios, empiricamente, sem o prévio conhecimento das diferentes contribuições farmacofóricas das distintas subunidades estruturais do protótipo, geralmente, mas não exclusivamente, de origem natural. Atualmente, os avanços observados no estudo da relação entre a estrutura química e a atividade (SAAR) permitiram que esta estratégia passasse a ser empregada de forma racional, preservando as subunidades farmacofóricas, previamente identificadas no composto-protótipo eleito, natural ou sintético (SETTI e MICETICH, 1996 e BARREIRO,2002).

II.1.1.2 – Hibridação Molecular

A estratégia de hibridação molecular representa uma ferramenta útil no planejamento molecular de um composto-protótipo e é baseada na combinação de determinadas características estruturais de diferentes substâncias bioativas para produzir um novo composto híbrido que tenha melhor afinidade e eficácia, quando comparado com seus precursores. Esta estratégia pode resultar ainda, em um composto que apresente perfil de seletividade modificado, diferentes e/ou duais modos de ação e diminuição de efeitos colaterais indesejados (VIEGAS-JÚNIOR et al., 2007).

Compostos híbridos podem ser construídos ligando subunidades farmacofóricas diretamente ou com agentes espaçadores. O composto formado pela simples associação de dois princípios ativos distintos também pode ser considerada um composto híbrido (BOSQUESI et al., 2011). A Figura II.3 ajuda a entender a estratégia de hibridação molecular.

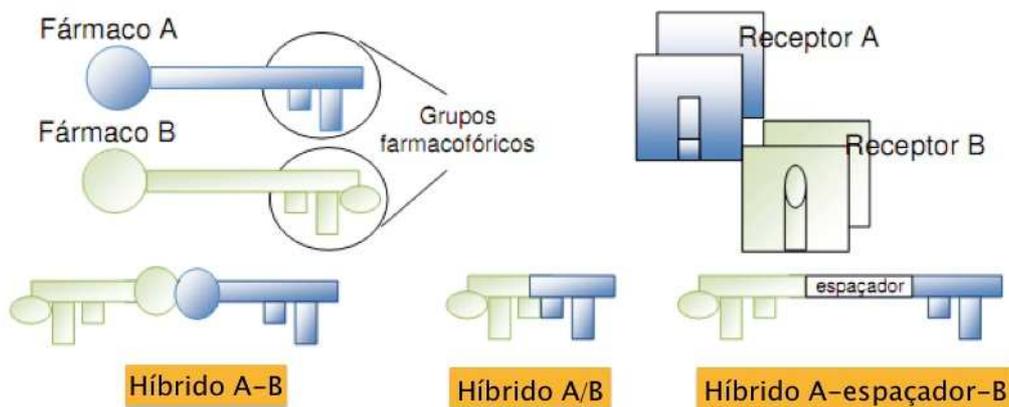


Figura II.3 - Representação da hidridação como estratégia de modificação molecular. O híbrido A/B é obtido através da ligação dos dois fármacos com ou sem agentes espaçadores (Adaptado de BOSQUESI et al., 2011).

II.1.1.3 – A Restrição Conformacional

Dentre as estratégias de modificação molecular de um composto-protótipo visando à sua otimização, a restrição conformacional tem sido empregada com sucesso no aumento da afinidade e seletividade de um ligante pelo biorreceptor alvo, sendo, por esta razão, muito explorada na busca de ligantes antagonistas/agonistas de um determinado subtipo de receptor ou isoforma enzimática. Em alguns casos o protótipo com alto grau de flexibilidade conformacional possui como conformação bioativa uma conformação de elevada energia. A restrição conformacional possibilita planejar compostos que apresentem esta conformação desejada, porém com menor energia, favorecendo a interação ligante-receptor (MAIA, R. C., 2008).

II.1.1.4 – A Homologação

O processo de homologação molecular consiste em uma importante estratégia de modificação estrutural resultante da inserção de determinados grupos funcionais, como: um benzeno, uma ligação vinílica ou grupamento(s) metileno (WERMUTH, 2008).

As variações em séries homólogas podem resultar em compostos com elementos de simetria, com melhor lipofilicidade. No caso de homólogos polimetilênicos ou polivinílicos, o aumento de uma cadeia lateral pode favorecer interações com resíduos de aminoácidos de receptores ou enzimas que antes não eram acessíveis ao composto

não-homologado, resultando em eventual aumento da potência relativa (WERMUTH, 1996). Veja um exemplo da utilização desta estratégia na Figura II.4.

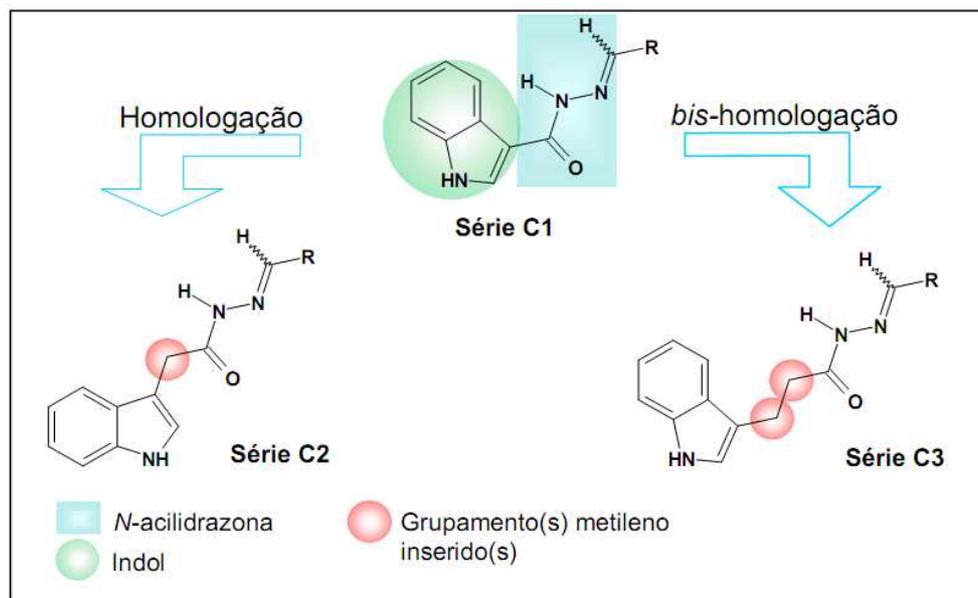


Figura II.4 – Planejamento estrutural usando homologação (SANTOS, 2009).

II.1.1.5 – Bioisosterismo

O Bioisosterismo é uma estratégia da Química Medicinal usada para a modificação racional de um composto-protótipo (THORNER, 1957; BURGER, 1983). O seu conceito está baseado em uma modificação que cause uma variação em alguma característica físico-química ou estrutural do protótipo, mas mantenha o seu efeito biológico e o reconhecimento do fármaco pelo biorreceptor alvo (LIMA e BARREIRO, 2005 e RODRIGUES, 2008).

As modificações obtidas através de uma troca bioisostérica visam alterar o perfil do protótipo nos seguintes aspectos: melhorar a afinidade, a eficácia e especificidade, diminuindo, se possível, a toxicidade e os efeitos adversos; variar as propriedades físico-químicas, tais como solubilidade e estabilidade química; e melhorar as qualidades farmacocinéticas, tais como biodisponibilidade, estabilidade metabólica, distribuição, duração da ação, etc (PATANI, 1996).

O sucesso desta estratégia no desenvolvimento de novas substâncias tem crescido em classes terapêuticas distintas. Esta estratégia está sendo amplamente utilizada pela indústria farmacêutica para descobrir novos análogos comercialmente atraentes (*me-too*)

e também como uma ferramenta útil para a modificação molecular (LIMA e BARREIRO, 2005).

Em 1970, Burger classificou e subdividiu os bioisósteros em clássicos e não-clássicos. Os bioisósteros clássicos são átomos, moléculas ou grupos funcionais de mesmo número de elétrons de valência e os não-clássicos são aqueles grupos que mimetizam o arranjo espacial, as propriedades eletrônicas, ou alguma outra propriedade físico-química de uma molécula ou grupo funcional que é crítico na retenção da atividade biológica (BURGER, 1983).

A Figura II.5 mostra, como exemplo, como foram empregadas várias das estratégias apresentadas anteriormente, no planejamento molecular do composto LASSBio-129.

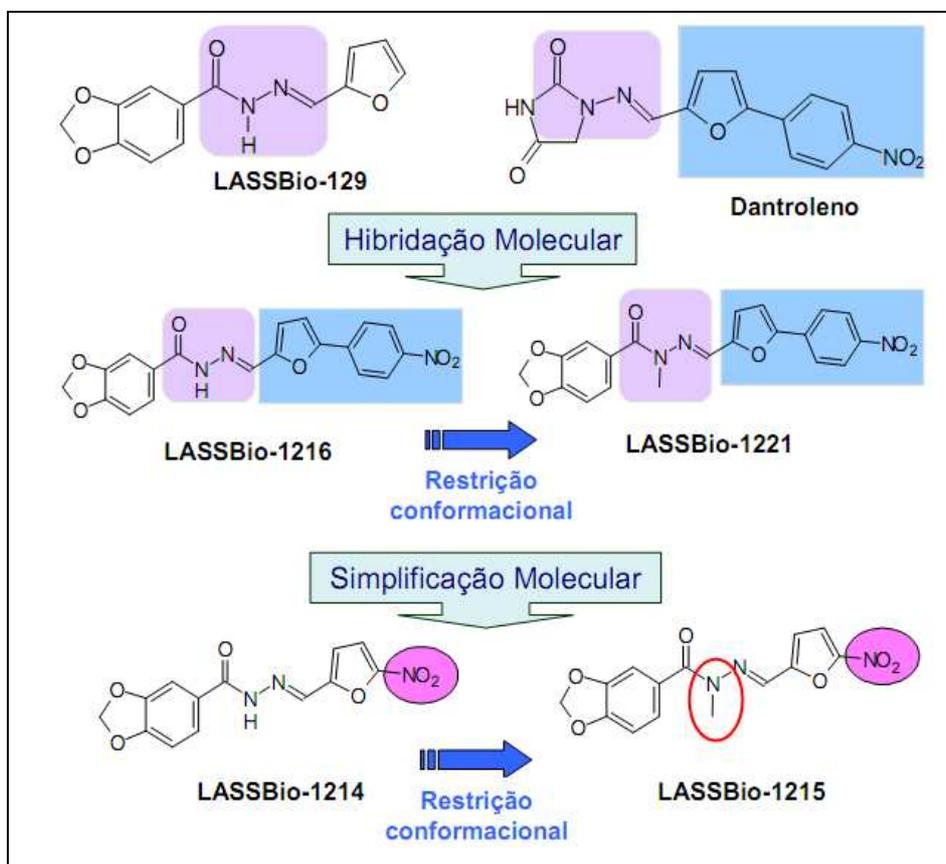


Figura II.5 - Modificação estrutural de LASSBio-129 utilizando as estratégias de hibridação, simplificação molecular e restrição conformacional (COSTA, 2008).

II.1.2 – Otimização de um Composto-Protótipo

Uma vez descoberto o novo composto-protótipo, a etapa seguinte na cadeia de inovação em fármacos é sua otimização. Nesta etapa, devem ser identificadas as distintas contribuições farmacofóricas de todas as subunidades estruturais, de maneira a orientar as modificações moleculares a serem introduzidas na estrutura do composto-protótipo ampliando a diversidade estrutural deste padrão molecular, o que é significativamente relevante para elaboração de pedidos de proteção intelectual desta descoberta (BARREIRO E FRAGA, 2005).

A otimização de um composto-protótipo depende do estabelecimento e análise da Relação Estrutura-Atividade, para propor modificações na estrutura do protótipo com o propósito de melhorar sua potência, seletividade e diminuir a sua toxicidade (WERMUTH, 2003). Nesta etapa, o emprego de técnicas de química computacional aplicadas ao desenho de fármacos são particularmente úteis. A construção de modelos topográficos 3D do sítio de reconhecimento molecular do biorreceptor orienta, ao menos teoricamente, as modificações moleculares necessárias à otimização das propriedades farmacodinâmicas do protótipo (GANELLIN, 1990).

II.1.3 – Estruturas Privilegiadas

O reconhecimento molecular de uma droga na biofase é resultado de interações moleculares com biomacromoléculas envolvendo forças eletrostáticas, dispersão e interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e covalentes. O arranjo espacial das subunidades estruturais da micromolécula responsável por essas interações com os sítios complementares do biorreceptor, inclui os requisitos farmacofóricos para este reconhecimento e define qualitativamente o grau de afinidade e seletividade da droga – complexo biorreceptor (BARREIRO E MANSSOUR, 2001 e DUARTE et al., 2007).

Na literatura, observa-se o crescimento do interesse na identificação de estruturas moleculares chamadas “privilegiadas”. Essas estruturas correspondem a uma subunidade estrutural mínima capaz de fornecer pontos ligantes para mais de um tipo de biorreceptor, cuja seletividade pode ser modulada pela adequada introdução de subunidades farmacofóricas auxiliares. Este conceito foi formulado pela primeira vez por Evans et al. (1988) e mais tarde aperfeiçoado por Patchett e Nargund (2000), que

identificaram propriedades nestas subestruturas que tornam a interação delas com biomacromoléculas, mais fácil e ocasionalmente distintas daquelas que envolvem os respectivos ligantes endógenos (DUARTE et al., 2007).

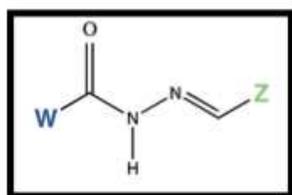
Uma das estratégias que vem sendo empregada por alguns grupos de pesquisa consiste em se preparar coleções combinatórias dessas estruturas chamadas "privilegiadas". Esta classificação foi direcionada a algumas classes de compostos que apresentam amplo espectro de atividades biológicas, além de propriedades farmacológicas apropriadas para uso terapêutico (DIAS e CORRÊA, 2001).

II.1.3.1 – As *N*-acilidrazonas Bioativas

A caracterização da subunidade *N*-acilidrazona (NAH) como uma estrutura privilegiada fundamenta-se na ocorrência deste fragmento molecular em compostos que apresentam atividades em distintos alvos terapêuticos (DUARTE et al., 2007) e esse caráter foi evidenciado nos diversos trabalhos desenvolvidos no LASSBio e que foram compilados na revisão de FRAGA e BARREIRO (2006).

Vários padrões de atividade farmacológica podem ser observados para os derivados *N*-acilidrazônicos, tais como antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica, antiagregante plaquetária, anti-inflamatória, antidepressiva, vasodilatadora, dentre outras. Esses padrões são devidos à variação racional das subunidades estruturais da região amídica (W) e imínica (Z) destes compostos, como pode-se observar na Figura II.6 (FRAGA e BARREIRO, 2006; ROLLAS e KÜÇÜKGÜZEL, 2007), utilizando-se de estratégias da Química Medicinal de modificação molecular, como a hibridação molecular, o bioisosterismo, a simplificação molecular, a homologação e a restrição conformacional, já descritos anteriormente (WERMUTH, 1996; LIMA e BARREIRO, 2005, RODRIGUES, 2008).

Vale ainda ressaltar que o padrão NAH caracteriza-se por possuir diferentes pontos de possível diversidade estrutural, importantes na construção de distintas famílias de compostos-protótipos, candidatos a fármacos (DUARTE, 2006). Neste contexto a subunidade NAH consiste em uma vertente promissora como ponto de partida para o planejamento racional de fármacos (MORPHY et al., 2004).



Subunidade *N*-acilidrazônica (NAH)

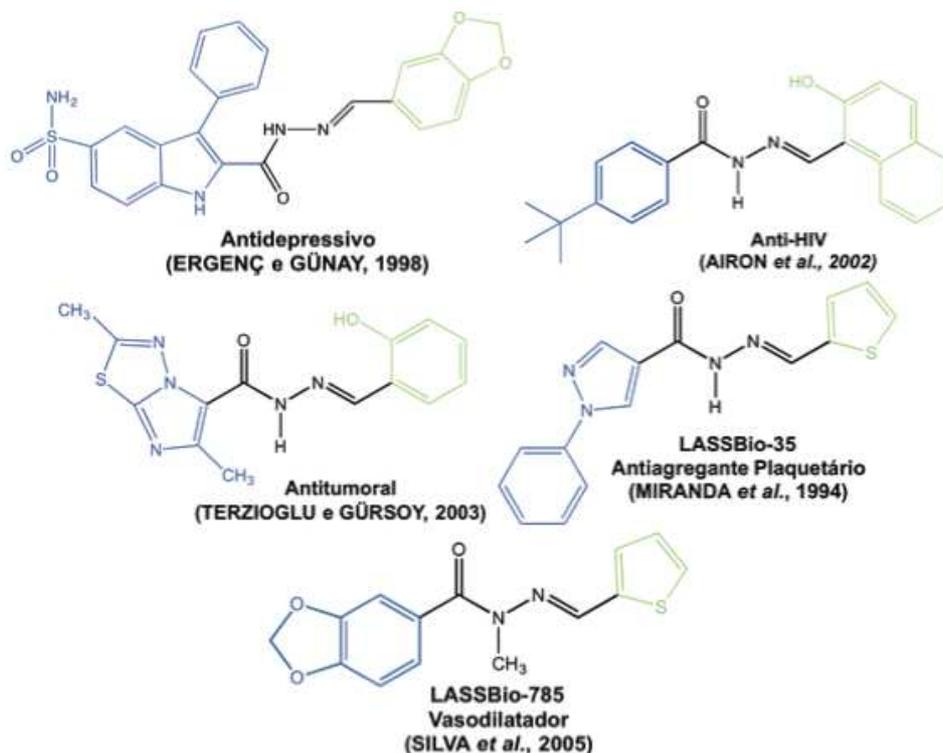


Figura II.6 – Perfis de Bioatividade de derivados *N*-acilidrazônicos.

II.2 – Difração de Raios X

A difração de raios X tem sido, sem dúvida, a técnica experimental de maior importância na tarefa de revelar a estrutura de cristais.

Esta técnica foi inicialmente usada para estabelecer o arranjo tridimensional de átomos em um cristal por William Lawrence Bragg em 1913, logo após Wilhelm Conrad Röntgen ter descoberto raios X, em 1895 e Max von Laue mostrar, em 1912, que estes raios poderiam ser difratados por cristais. Bragg encontrou, a partir dos estudos de difração de raios X, que em cristais de cloreto de sódio (NaCl), cada átomo de sódio está rodeado por seis átomos equidistantes de cloro e cada cloro por seis átomos de cloro, também equidistantes. Nenhuma molécula discreta de NaCl foi encontrado e, portanto, Bragg supôs que o cristal consistia de íons de sódio e íons

cloreto, em vez de átomos individuais (sem carga); este fato havia sido previsto anteriormente por William Barlow e Jackson William Pope em 1907, mas não tinha, antes da pesquisa dos Bragg, sido demonstrado experimentalmente. Uma década e meia mais tarde, em 1928, Kathleen Lonsdale utilizou a difração de raios X para mostrar que o anel de benzeno é um hexágono regular plano, em que todas as ligações carbono-carbono são iguais em comprimento (LONSDALE, 1928). Seu resultado experimental foi confirmado posteriormente por estudos espectroscópicos (STOICHEFF, 1954) e foi de grande importância para a química. Desde então, a difração de raios X e a difração de nêutrons têm sido usadas para estabelecer características detalhadas da estrutura molecular de todos os tipos de substâncias químicas cristalinas, das mais simples até as mais complexas (GLUSKER e TRUEBLOOD, 2010).

Laue descrevia os cristais em termos de uma rede tridimensional de linhas de átomos, e com base na sua análise veio a noção de que os cristais se comportam, de fato, como uma rede de difração tridimensional. Por outro lado, os Bragg encaravam os cristais em termos de camadas ou planos de átomos que se comportavam como planos refletivos. Essa abordagem é correta em sentido geométrico e nos fornece, de maneira simples, uma expressão para a análise de estruturas cristalinas: a Lei de Bragg (HAMMOND, 2009).

Os raios X são um tipo de radiação eletromagnética da mesma natureza da luz visível, mas de comprimento de onda muito menor, no intervalo de 10^{-1} a 10^2Å . Os raios X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia, pelos elétrons de um átomo. O fóton de raios X após a colisão com o elétron, muda sua trajetória mantendo a mesma fase e energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física ondulatória, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida; cada elétron atua, portanto, como centro de emissão de raios X. Quando os átomos estão regularmente espaçados em uma rede cristalina e a radiação incidente tem comprimento de onda da ordem deste espaçamento, ocorrerá interferência construtiva em certas direções e interferência destrutiva em outras. A interferência construtiva dos raios X espalhados, proveniente de vários átomos, caracteriza a difração. No caso de um cristal, a sequência periódica de átomos pode ser visualizada como um conjunto de planos cristalográficos, indexados através dos índices de Miller, *hkl*, que serão apresentados na seção II.2.2.1.

O espalhamento coerente dos raios X (mesma energia da radiação incidente) por um conjunto de planos cristalinos (hkl) ocorre em um ângulo bem definido, denominado ângulo de Bragg. Para que as ondas difratadas interfiram construtivamente é necessário que a diferença de caminho entre os raios, incidente e difratado, seja um múltiplo inteiro do comprimento de onda λ da radiação incidente, satisfazendo a condição de Bragg :

$$n\lambda = 2d_{hkl}\text{sen}\theta \quad (\text{II.1})$$

onde n corresponde a um número inteiro (ordem de difração), d corresponde à distância interplanar para o conjunto de planos hkl da estrutura cristalina e θ ao ângulo de incidência dos raios X, medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos, também chamado de ângulo de Bragg (Figura II.7). Esta equação ficou conhecida como Lei de Bragg (HAMMOND, 2009). A lei de Bragg é, portanto, uma consequência direta da periodicidade da rede cristalina.

A intensidade difratada, dentre outros fatores, é dependente do número de elétrons no átomo. Sendo assim, temos que átomos com Z alto produzem intensidades difratadas mais altas. Porém, vale lembrar, que a passagem dos raios X através da matéria também pode ser acompanhada por uma progressiva diminuição da sua intensidade. Esse processo, conhecido como absorção, depende essencialmente dos elementos presentes no material. Adicionalmente, os átomos são distribuídos no espaço, de tal forma que os vários planos de uma estrutura cristalina possuem diferentes densidades de átomos ou elétrons, fazendo com que as intensidades difratadas sejam, por consequência, distintas para os diversos planos cristalinos.

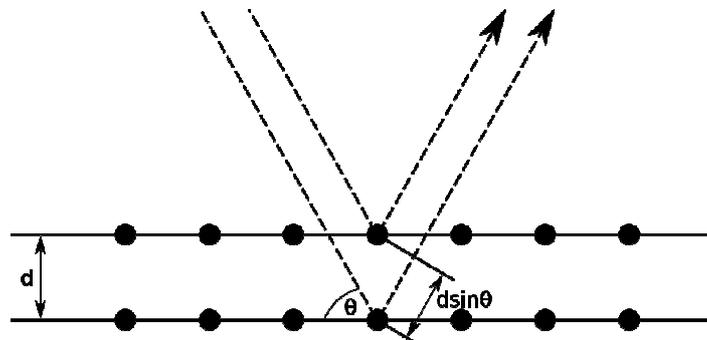


Figura II.7 – Diagrama da Lei de Bragg - Interferência em nível planar.

A partir da análise do feixe difratado (ver equação II.1), obtém-se informação sobre o arranjo atômico do cristal, ou seja, simetria e distâncias interatômicas que

determinam a chamada cela unitária. Esta análise requer o conhecimento das simetrias envolvidas no empacotamento dos átomos que formam o material, ou seja, de sua estrutura cristalina. Uma breve descrição dessas informações será apresentada na seção II.2.2.

II.2.1 – A Produção de Raios X

Os raios X foram descobertos em 1895 por Wilhelm Conrad Roentgen e foram assim denominados por desconhecer inicialmente sua natureza. No final de 1895, Roentgen publicou a primeira descrição dos raios X, na qual apresentou uma caracterização experimental qualitativa da nova radiação (ROENTGEN, 1895).

Os raios X são produzidos basicamente de duas maneiras: utilizando um tubo de raios X ou em um síncrotron.

II.2.1.1 – O Tubo de Raios X

O método tradicional de produção é por meio de um tubo de raios X (Figura II.2.2). Este dispositivo, originalmente conhecido como Tubo de Crookes, inventado por volta de 1886, e aprimorado tecnicamente durante o século seguinte, ainda é largamente utilizado.

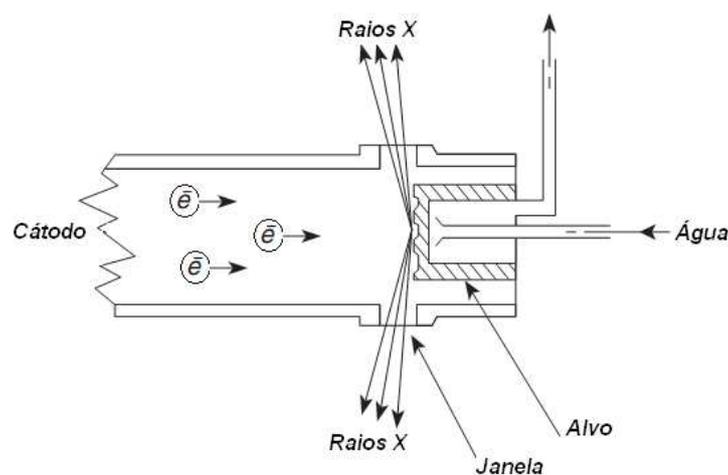


Figura II.8 – Tubo de Raios X - Os raios X são produzidos quando elétrons em alta velocidade, provenientes do filamento aquecido, chocam-se com o alvo (anodo) produzindo radiação. (adaptado de SHMUELI, 2007).

O método mais utilizado para produzir raios X é fazendo com que um elétron de alta energia (gerado no cátodo do tubo) colida com um alvo metálico. Se a energia do elétron acelerado for suficientemente grande, um dos elétrons de uma órbita interna do átomo do alvo pode ser expulso desse átomo. Este torna-se, portanto, instável e a lacuna deixada por este elétron será preenchida por um elétron de uma órbita mais externa. Neste processo, a radiação X será emitida (SHMUELI, 2007).

O espectro de radiação obtido a partir do tubo de raios X não é monocromático, apresentando tanto a radiação característica do material empregado como anodo ($K\alpha$, $K\beta$, etc), como também o espectro contínuo (Figura II.9a).

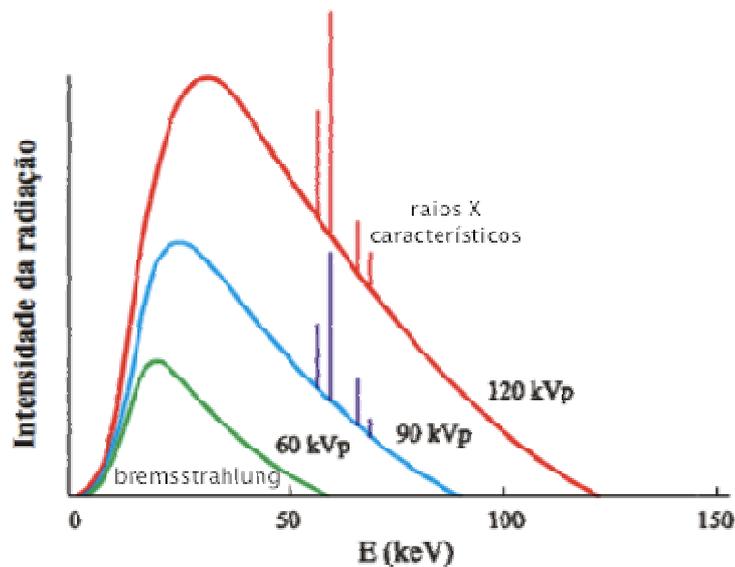
Quando partículas carregadas, principalmente elétrons, interagem com o campo elétrico de núcleos de número atômico elevado ou com a eletrosfera, elas reduzem a energia cinética, mudam de direção e emitem a diferença de energia sob a forma de ondas eletromagnéticas, denominadas de raios X de freamento ou “*bremsstrahlung*”. A energia dos raios X de freamento depende fundamentalmente da energia da partícula incidente. Como o processo depende da energia e da intensidade de interação da partícula incidente com o núcleo e de seu ângulo de saída”, a energia da radiação produzida pode variar de zero a um valor máximo, sendo contínuo seu espectro em energia (TAUHATA, 2003).

Na Figura II.9a, nota-se que para voltagens mais altas, são produzidos certos comprimentos de onda em intensidades bem mais altas que as demais. É a chamada radiação característica do alvo. Os demais comprimentos de onda são chamados de radiação branca, pois assim como a luz branca e o ruído branco, são formados por vários comprimentos de onda. Quanto mais se aumenta a diferença de potencial, mais a radiação característica se destaca em relação à radiação contínua, possibilitando a utilização de um comprimento de onda pré-determinado.

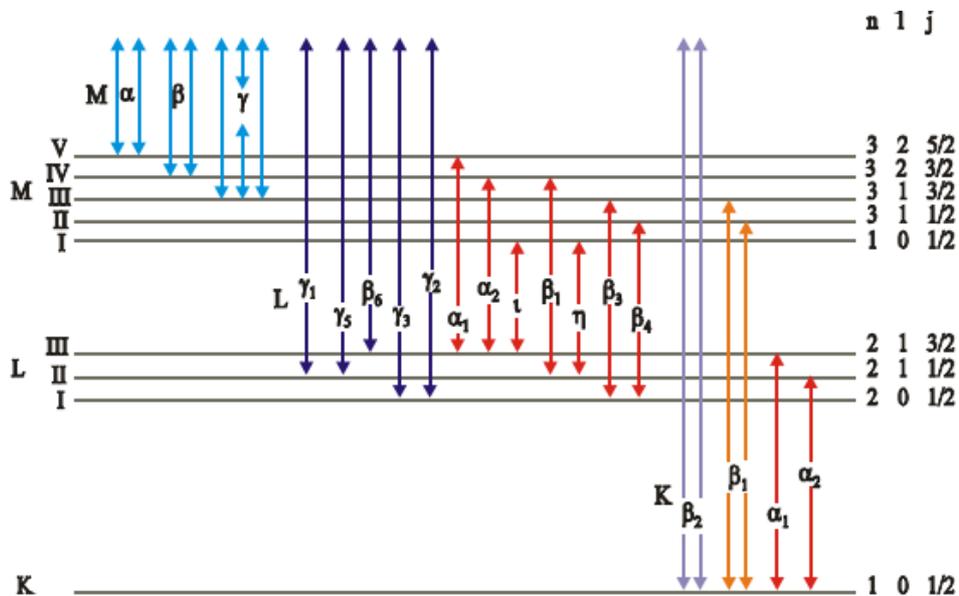
A maneira como se comporta o espectro de raios X é explicada através das transições de níveis atômicos de energia. Para cada diferente transição de níveis de energia, um comprimento de onda diferente é emitido. A radiação $K\alpha_1$ é produzida

quando um elétron transita da camada L_{III} para a camada K , enquanto que a radiação $K\beta_1$ é gerada quando o elétron transita da camada M_{III} para K (Figura II.9b).

A energia do fóton emitido equivale à diferença de energia entre os orbitais. Para a radiação $K\alpha_1$, por exemplo, $E_{fóton} = \phi_K - \phi_{LIII}$. Com essa energia, pode-se obter o comprimento de onda através da equação $\lambda = hc / (\phi_K - \phi_{LIII})$. Como a energia para cada nível varia com o elemento atômico (alvo), cada tipo de alvo produz radiações características em diferentes comprimentos de onda (BLEICHER e SASAKI, 2000).



(a)



(b)

Figura II.9 – (a) Espectro de raios X de freamento com raios X característicos para voltagem de pico de 60, 90 e 120 kV. (b) Transições eletrônicas (TAUHATA, 2003).

II.2.1.2 – Radiação Síncrotron

Outra forma de gerar raios X é em laboratórios síncrotron, como o que existe no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas – SP.

O princípio físico da radiação síncrotron remete à eletrodinâmica clássica: uma carga acelerada em movimento emite um espectro eletromagnético de energia, e se a magnitude da velocidade do seu movimento é comparável à velocidade da luz, efeitos muito significativos são observados. A teoria da radiação síncrotron e a sua aplicação na cristalografia têm sido amplamente discutidas na literatura (KOCH, 1983; COPPENS, 1992).

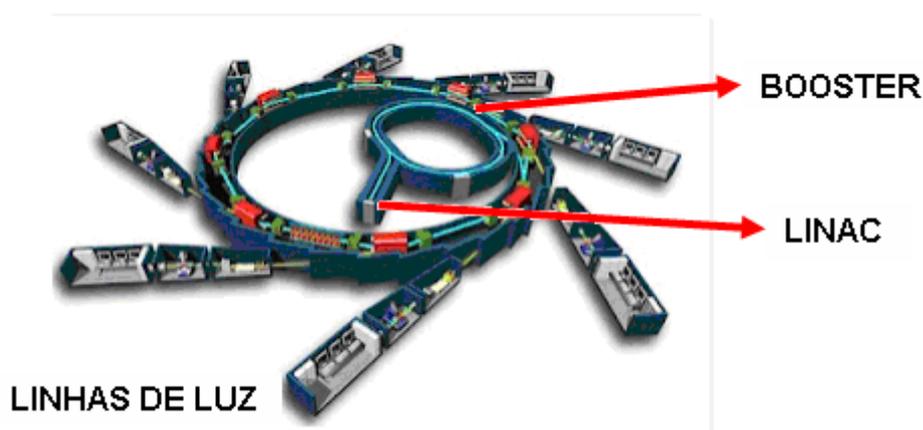


Figura II.10 – Representação de uma instalação Síncrotron (adaptado do website: <http://www.fotonblog.com/2011/01/via-agencia-fapesp-dezenove.html>).

Na Figura II.10, uma visão esquemática de uma instalação de síncrotron é apresentada. Nessas instalações, elétrons são injetados por um canhão de elétrons em um acelerador linear (LINAC). Ali esses elétrons vão atingir uma energia de várias centenas de milhões de elétron-volts (MeV). Estes elétrons energéticos são injetados em um BOOSTER, onde eles circulam rapidamente, para conseguir aumentar a energia em cada revolução. Isto continua até que os elétrons atinjam uma energia de vários bilhões de elétron-volts (GeV). Neste ponto, a velocidade dos elétrons é muito próxima à velocidade da luz. Estes elétrons altamente energéticos são, então, enviados para o anel de armazenamento, onde o seu movimento é mantido.

O anel de armazenamento é um polígono que em cada vértice dispõe de um eletroímã responsável pelo alinhamento da trajetória do elétron. À medida que o elétron

passa através de cada eletroímã, sua trajetória é corrigida e neste processo o feixe de elétrons sofre uma deflexão e perde energia sob a forma de uma luz de alto brilho e intensidade, denominada luz síncrotron. A luz síncrotron abrange uma ampla faixa do espectro eletromagnético: Raios X, Luz Ultravioleta e Infravermelha, além da Luz Visível (SHMUELI, 2007). Um monocromador permite selecionar a energia desejada para o uso em experimentos de difração de raios X.

Denomina-se linha de luz a instrumentação que é acoplada ao anel de armazenamento de elétrons. Em cada linha de luz chegam os feixes de fótons (luz síncrotron), gerados pelos elétrons que circulam no anel de armazenamento. É na linha de luz que os feixes são "preparados" para ter utilidade nas estações experimentais utilizadas pelos cientistas. Cada linha de luz tem características próprias e nela se faz determinado tipo de trabalho.

Uma estação experimental é instalada em cada linha de luz. Essa estação é formada por equipamentos e instrumentação que permitem ao cientista realizar a aquisição dos dados que serão usados em suas pesquisas (LNLS, 2013).

A alta resolução, alta intensidade e o ajuste de energia são algumas das vantagens importantes da utilização da luz síncrotron em um experimento de difração de raios X, em relação aos equipamentos convencionais. A alta resolução angular da linha permite a melhor visualização das linhas de Bragg, uma vez que a sobreposição de picos vizinhos é minimizada, reduzindo a perda de informações estruturais.

O ajuste de energia permite o estudo de difração ressonante. Se necessário, podem ser utilizados diferentes comprimentos de onda, necessários para provocar um contraste entre elementos químicos próximos entre si na tabela periódica (SANTOS, 2011).

Todos esses fatores fazem da radiação síncrotron uma excelente ferramenta para a aquisição de dados experimentais de qualidade.

II.2.2 – Estruturas Cristalinas

De um modo geral podemos classificar os sólidos em amorfos, semicristalinos e cristalinos.

Apesar de não serem cristalinos, os materiais amorfos sempre apresentam uma certa regularidade estrutural média de curto alcance ao redor de qualquer átomo. Esta

regularidade leva a efeitos de difração que permitem deduzir a natureza da ordem a curto alcance, principalmente quanto às distâncias médias existentes ao redor de um átomo. Os materiais semicristalinos apresentam um ordenamento parcial, em geral apenas em uma ou duas dimensões.

Sólidos cristalinos possuem uma propriedade que está ausente nos líquidos, amorfos e gases. Seus blocos de construção fundamentais são organizados, com uma boa aproximação, em uma matriz triplamente periódica (SHMUELI, 2007). Podemos classificá-los, de forma geral, como:

- Monocristalinos

Um monocristal (ou cristal único) é o resultado de um sólido cristalino com arranjo periódico e repetido de átomos perfeitamente estendidos ao longo da totalidade da amostra. Usualmente, os monocristais são de crescimento difícil, pois o ambiente de crescimento deve ser bem controlado;

- Policristalinos

Policristais são constituídos por pequeníssimos monocristais, cujo efeito de difração corresponde à superposição dos efeitos de difração de cada um dos microcristais que constituem a amostra.

Pode-se definir um cristal como sendo uma rede de pontos regularmente espaçados. Aos pontos dessa rede são adicionados conjuntos de elementos reais denominados base. Assim, a estrutura cristalina é uma rede de pontos que se prolonga infinitamente nas três direções do espaço (longo alcance).

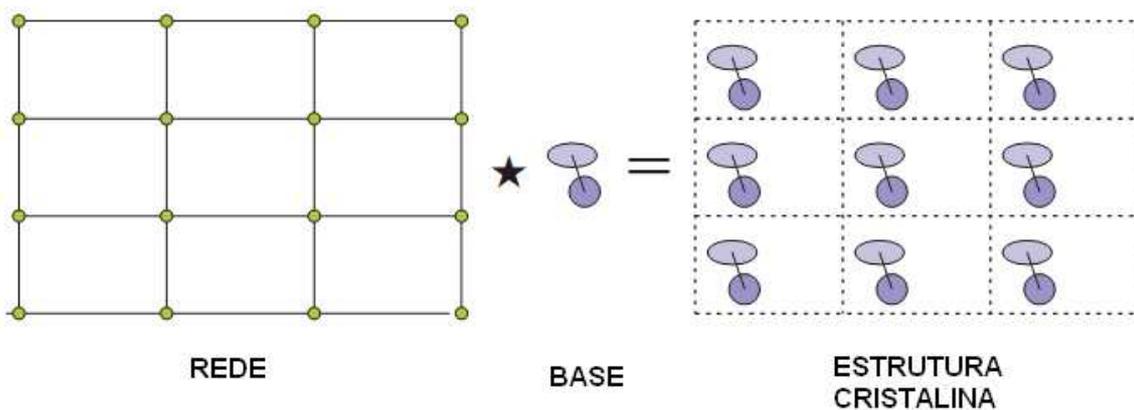


Figura II.11 – Estrutura de um sólido cristalino (ALS-NIELSEN e MCMARROW, 2010).

Uma vez que a base foi identificada, deve-se descrever as posições relativas dos átomos, dentro da base, e descrever como a base se repete no espaço (rede cristalina). A geometria da rede espacial pode ser caracterizada pela cela unitária, usando os parâmetros, a , b , c e α , β , γ , conhecidos como parâmetros de rede (Figura II.12).

Dentro da cela unitária pode haver vários objetos que são equivalentes por simetria, ou seja, a cela unitária pode ser gerada a partir de uma porção menor. Esta parte menor, presente dentro da cela unitária, é chamada unidade assimétrica.

Materiais cristalinos, portanto, são aqueles que possuem uma distribuição característica e regular dos seus átomos e devido a esta regularidade, a estrutura cristalina de um material não precisa ser representada por todos os seus átomos, mas por apenas um conjunto de átomos que possam definir a sua distribuição no espaço. Um cristal também pode ser imaginado como uma coleção de celas unitárias sobrepostas e preenchendo todo o espaço disponível (CALISTER, 1994).

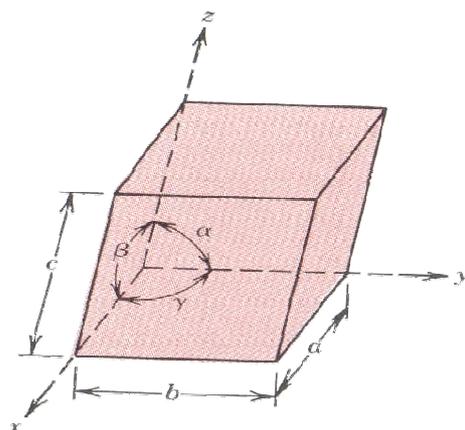


Figura II.12 – Unidade espacial básica - cela unitária (CALISTER, 1994).

Se o material for composto por átomos, moléculas ou íons que não apresentam uma ordenação de longo alcance, em nível atômico, então ele não pode ser considerado um material cristalino, sendo chamado de amorfo.

II.2.2.1 – Índices de Miller

A difração de raios X de um material cristalino refere-se ao espalhamento a partir de átomos que podem ser considerados como estando dentro de famílias de planos. Por isso, é desejável dispor de algum modo para especificar estas famílias de planos dentro

de um cristal. Os índices de Miller são a forma mais conveniente para conseguir isto. A notação utilizada para identificar direções e planos cristalinos são os índices h , k e l , conhecidos com Índices de Miller. As direções cristalinas são assim descritas: $[hkl]$ ou $\langle hkl \rangle$ e os planos: (hkl) ou $\{hkl\}$.

Para uma dada família de planos, os índices de Miller (h , k e l) são definidos de tal modo que o plano mais próximo da origem (mas não incluindo a origem) tem seus interceptos (\mathbf{a}_1/h , \mathbf{a}_2/k , \mathbf{a}_3/l) nos eixos (\mathbf{a}_1 , \mathbf{a}_2 , \mathbf{a}_3).

Na Figura II.13 podemos observar uma rede retangular bidimensional. Este exemplo serve para ilustrar duas características importantes dos planos especificados pelos seus índices de Miller. A primeira é que a densidade de pontos da rede, de uma dada família de planos, é o mesmo, e que todos os pontos da rede estão contidos dentro de cada família. A segunda é que, novamente para uma dada família, os planos são igualmente espaçados, de modo que seja possível definir uma distância interplanar d_{hkl} .

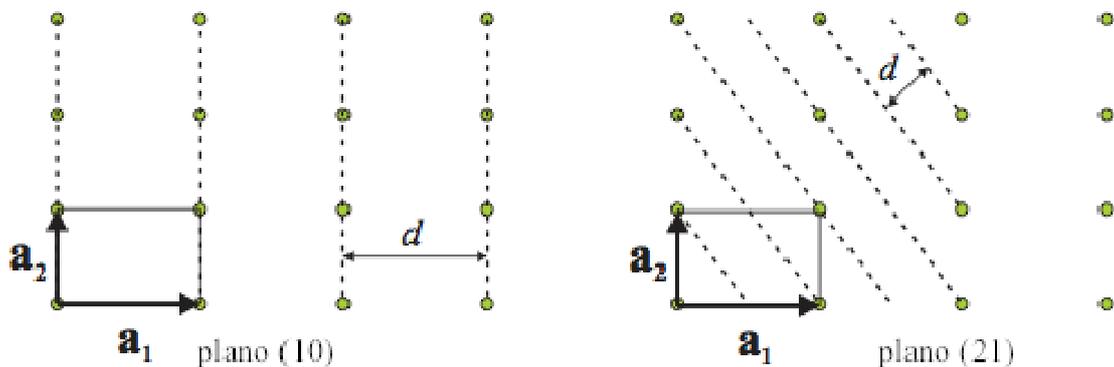


Figura II.13 – Planos da rede e índices de Miller para uma rede bidimensional mostrando os planos (10) e (21). Em ambos os casos a distância interplanar “ d ” está indicada (ALS-NIELSEN e MCMORROW, 2011).

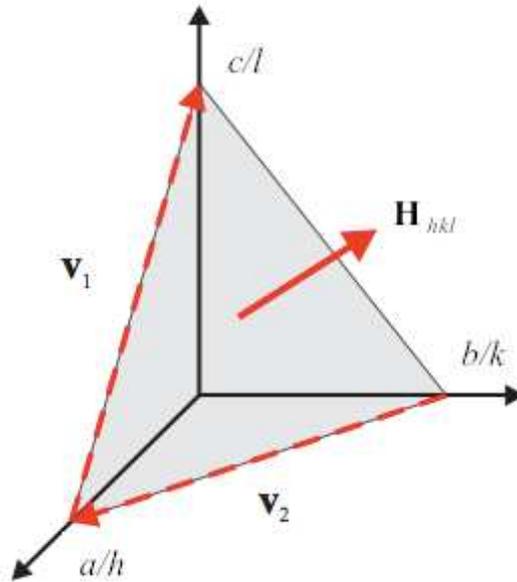


Figura II.14 – Vetor \mathbf{H}_{hkl} da rede recíproca, perpendicular aos planos (hkl) (Adaptado de ALS-NIELSEN e MCMORROW, 2011).

II.2.2.2 – A Rede Recíproca

Além da rede associada à estrutura cristalina no espaço real, há uma segunda rede, relacionada com a primeira, importante em experiências de difração e em muitos outros aspectos da física do estado sólido. Esta é a rede recíproca. Ela foi inventada como uma representação física simples e conveniente sendo uma ferramenta extremamente útil para descrever todos os tipos de fenômenos de difração, ocorrendo na difração de pó. Sua importância reside na facilidade de se visualizar os planos cristalinos, suas inclinações e espaçamentos.

Imagine que além da rede direta com os parâmetros de rede $a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$ e o volume V da cela unitária, exista uma segunda rede com parâmetros $a^*, b^*, c^*, \alpha^*, \beta^*, \gamma^*$ e volume V^* e com a mesma origem, tal que:

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot \mathbf{b}^* = \mathbf{a} \cdot \mathbf{c}^* = \mathbf{b} \cdot \mathbf{c}^* = \mathbf{a}^* \cdot \mathbf{b} = \mathbf{a}^* \cdot \mathbf{c} = \mathbf{b}^* \cdot \mathbf{c} = 0 \quad \dagger \\ \mathbf{a} \cdot \mathbf{a}^* = \mathbf{b} \cdot \mathbf{b}^* = \mathbf{c} \cdot \mathbf{c}^* = 1 \end{aligned} \quad (\text{II.2})$$

[†] Os vetores estão denotados pelas letras em negrito.

O comprimento dos vetores recíprocos é definido de acordo com a equação:

$$\mathbf{a}^* = \frac{1}{V}(\mathbf{b} \times \mathbf{c}); \mathbf{b}^* = \frac{1}{V}(\mathbf{c} \times \mathbf{a}); \mathbf{c}^* = \frac{1}{V}(\mathbf{a} \times \mathbf{b})^\dagger \quad (\text{II.3})$$

sendo:

$$\cos\alpha = \frac{\cos\beta^* \cos\gamma^* - \cos\alpha^*}{\sin\beta^* \sin\gamma^*}$$

$$\cos\beta = \frac{\cos\gamma^* \cos\alpha^* - \cos\beta^*}{\sin\gamma^* \sin\alpha^*} \quad (\text{II.4})$$

$$\cos\gamma = \frac{\cos\alpha^* \cos\beta^* - \cos\gamma^*}{\sin\alpha^* \sin\beta^*}$$

Esta é conhecida como rede recíproca, que existe no chamado espaço recíproco. Como veremos, verifica-se que os pontos na rede recíproca estão relacionadas com os vetores que definem os planos cristalinos. Existe um ponto na rede recíproca para cada plano cristalino (hkl).

Dado um ponto de origem O, qualquer ponto do espaço recíproco é unicamente definido pelo vetorⁱ:

$$\mathbf{H} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^* \quad (\text{II.5})$$

onde h, k e l são os índices de Miller.

Cada vetor $\mathbf{H}(hkl)$ (Figura II.14) representa a normal a um plano cristalográfico que intercepta os vetores da base \mathbf{a}, \mathbf{b} e \mathbf{c} em $\frac{1}{h}, \frac{1}{k}$ e $\frac{1}{l}$, respectivamente, e a distância deste plano à origem do sistema cristalográfico é $d_{hkl} = \frac{1}{|\mathbf{H}|}$

Vale notar que o espaço direto pode ser re-obtido aplicando as equações II.3 e II.4 aos vetores do espaço recíproco (DINNEBIER e BILLINGE, 2008).

[†] Os vetores estão denotados pelas letras em negrito.

ⁱ A rede recíproca é uma construção comumente usada na física do estado sólido, mas com uma normalização diferente: $\mathbf{a} \cdot \mathbf{a}^* = 2\pi$.

As relações entre a estrutura do cristal e da rede recíproca não são difíceis de serem visualizadas geometricamente; um exemplo é dado na Figura II.15. A importância fundamental da rede recíproca em difração de cristais resulta do fato de que, se uma estrutura está disposta sobre uma dada rede, então o seu perfil de difração está necessariamente disposto sobre a rede que é recíproca a esta dada rede cristalina (GLUSKER e TRUEBLOOD 2010). De maneira geral pode-se dizer que a rede recíproca nada mais é do que a transformada de Fourier da rede direta.

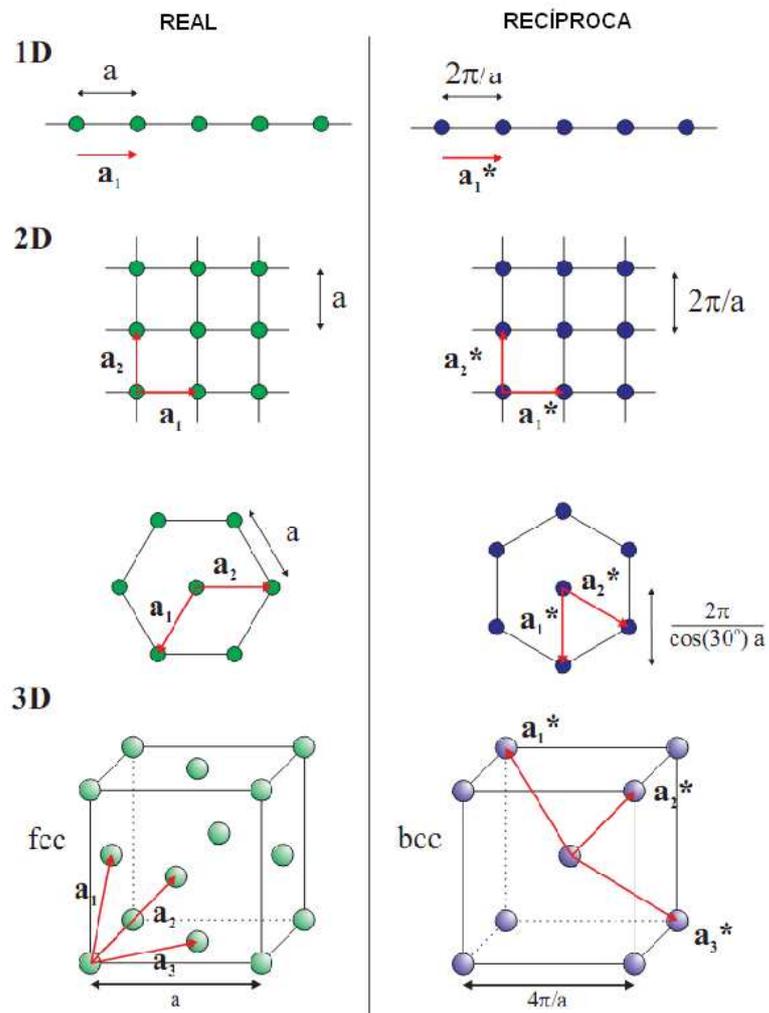


Figura II.15 – Exemplo de construção da rede recíproca em uma, duas e três dimensões (ALS-NIELSEN e MCMORROW, 2011). Neste caso, $a_1 = a$, $a_2 = b$ e $a_3 = c$ e ainda $a \cdot a^* = 2\pi$.

II.2.2.3 – Simetria Cristalina

Um objeto é dito simétrico se, depois de algum movimento real, ou imaginário, este permanece com aparência e outras propriedades perceptíveis, do mesmo jeito que era inicialmente. O movimento, que pode ser, por exemplo, uma rotação em torno de algum eixo fixo ou uma reflexão através de algum plano ou ainda uma translação do objeto numa dada direção, é chamado de operação de simetria. A entidade geométrica em relação a qual a operação de simetria é realizada, um eixo ou um plano, é chamada elemento de simetria (SHMUELI, 2007).

Celas unitárias e estruturas cristalinas são classificadas de acordo com sua simetria de rotação. Se um objeto é rotacionado em 180° e, em seguida, parece ser idêntico ao começo da estrutura, o objeto é dito ter um eixo de rotação *2-fold* (o eixo sobre o qual a rotação ocorreu). A presença de um eixo de rotação *n-fold*, onde *n* é um número inteiro qualquer, significa que, quando a cela unitária é girada em $(360^\circ/n)$ sobre este eixo, a rede cristalina obtida é indistinguível da original antes da rotação. O cristal pode ser examinado com relação aos seus eixos de rotação e o resultado desta averiguação é a determinação do grupo pontual do cristal, isto é, um grupo de operações de simetria, tal como um eixo de rotação, que deixe pelo menos um ponto inalterado dentro do cristal. Existem 32 grupos pontuais (GLUSKER e TRUEBLOOD, 2010).

II.2.2.4 – Sistemas Cristalinos e Redes de Bravais

Existem sete sistemas cristalinos definidos pela simetria mínima da cela unitária. As diversas escolhas dos vetores de base podem levar a estes sete tipos diferentes de sistemas cristalinos:

1. Triclínico - $a \neq b \neq c$ e $\alpha \neq \beta \neq \gamma$;
2. Monoclínico - $a \neq b \neq c$ e $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$;
3. Ortorrômbico - $a \neq b \neq c$ e $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$;
4. Tetragonal - $a = b \neq c$ e $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$;
5. Trigonal/Romboédrico - $a = b = c$ e $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$;
6. Hexagonal - $a = b \neq c$ e $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$;

7. Cúbico - $a = b = c$ e $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

O conjunto destes sete sistemas associados às possibilidades de cela centrada dá origem às quatorze redes de Bravais (Figura II.16). A notação referente às possibilidades de cela unitária são:

P – cela primitiva;

A – face b x c centrada;

B – face a x c centrada;

C – face a x b centrada;

F – todas as faces centradas;

I – centragem no centro da cela;

R – centragem no sistema hexagonal.

A estrutura é uma construção simétrica, cujo motivo de repetição é um átomo, ou um grupo de átomos e, cuja lei que rege esta distribuição é um dos 14 modos de Bravais de acordo com um dos 230 grupos espaciais (SHMUELI, 2007).

Assim, a simetria de um cristal corresponde à simetria resultante da correlação entre a simetria do motivo ou base (átomo, molécula, íon) da estrutura e a simetria da rede de Bravais que repete aquela base.

A seguir, são fornecidas duas definições equivalentes de uma rede de Bravais:

1. Uma rede de Bravais é uma rede infinita de pontos discretos, com arranjo e orientação idênticos, seja qual for o ponto espacial de onde a rede é observada.

2. Uma rede de Bravais tridimensional consiste em todos os pontos com vetores de posição \vec{R} na forma:

$$\mathbf{R} = n_1\mathbf{a}_1 + n_2\mathbf{a}_2 + n_3\mathbf{a}_3 \quad \dagger \quad (\text{II.6})$$

onde \mathbf{a}_1 , \mathbf{a}_2 e \mathbf{a}_3 são quaisquer vetores, não todos no mesmo plano, e n_1 , n_2 e n_3 são três números inteiros quaisquer. Os vetores \mathbf{a}_i , $i = 1; 2; 3$, são denominados vetores primitivos e a combinação linear, dada na equação II.6, é dita geradora ou varredora da rede cristalina.

[†] Os vetores estão denotados pelas letras em negrito.

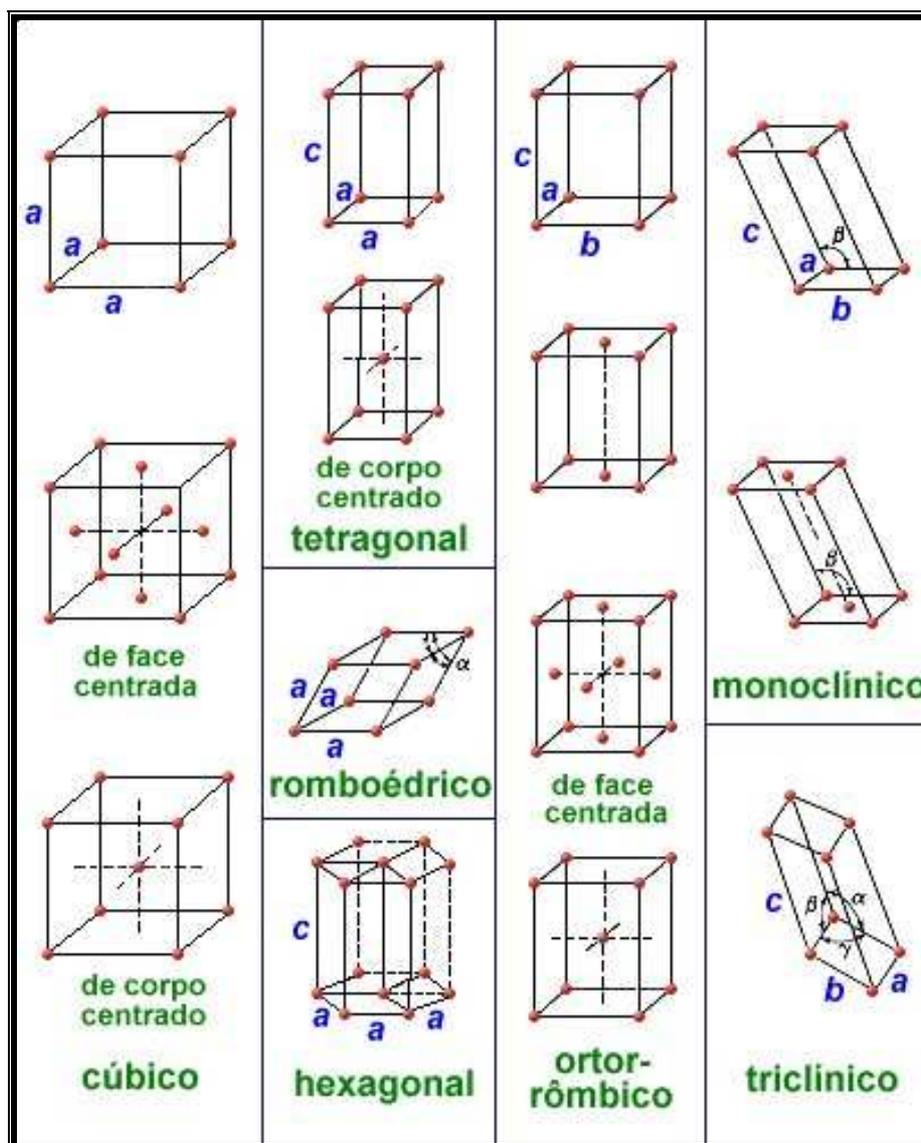


Figura II.16 - As 14 Redes de Bravais em 3D (adaptado de website: http://www.cimm.com.br/portal/material_didatico)

II.2.2.5 – Grupos Espaciais

Uma vez que as operações de simetria de cada um dos 32 grupos pontais são aplicadas às 14 redes de Bravais, resultam em 230 grupos espaciais que descrevem, de maneira unívoca, todo arranjo de objetos idênticos, dispostos numa rede periódica infinita. Pode-se considerar que os 230 grupos espaciais são gerados pela adição de dois novos tipos de operações de simetria, àquelas encontradas nos grupos pontuais cujos elementos de simetria complementares são: os eixos helicoidais e os planos de

deslizamento. Na notação internacional, definida pela União Internacional de Cristalografia (IUCr), o símbolo de um grupo espacial tem a forma $Y\ xxx$, onde Y indica o tipo de rede (P, A, B, C, I, F ou R) e xxx são os elementos geradores de simetria segundo as três direções não equivalentes correspondentes ao sistema cristalino em questão. Por exemplo: os eixos de rotação por 60° , 90° , 120° ou 180° são denotados por 6, 4, 3 e 2, respectivamente. Os eixos parafusos (realizam translação e rotação simultaneamente) são denotados por $6_1, 6_2, 6_3, 6_4, 6_5; 4_1, 4_2, 4_3; 3_1, 3_2$ e 2_1 . Os símbolos a, b, c, n e d correspondem aos planos de deslizamento (translação e reflexão), sendo os vetores de base \mathbf{a}, \mathbf{b} e \mathbf{c} ; \mathbf{d} é o vetor diagonal ($\mathbf{d}=\mathbf{a}+\mathbf{b}, \mathbf{d}=\mathbf{a}-\mathbf{b}, \mathbf{d}=\mathbf{a}+\mathbf{b}+\mathbf{c}$, etc).

Uma descrição completa e detalhada a respeito dos 230 grupos espaciais é encontrada nas *International Tables for Crystallography* (ITC, 2003 e ITC, 2004).

II.2.3 – Difração de Raios X por Policristais

O método do pó foi criado independentemente em 1916 pelos cientistas P. Debye e P. Scherrer na Alemanha e em 1917 por A. Hull nos Estados Unidos para se estudar a estrutura de cristais (BORGES, 1996). Até a década de 60 a técnica de difração de raios X de pó (DRXP) foi muito pouco usada como ferramenta estrutural. Por outro lado, algumas hipóteses estruturais podiam facilmente ser verificadas em compostos iônicos simples com base em dados de DRXP. Esses dados foram colecionados em sua maioria através da técnica de Debye-Scherrer-Hull. Neste caso, usavam-se traços de DRXP como impressões digitais em análises qualitativas de materiais cristalinos de diferentes origens. Assim, por mais de 50 anos esta técnica foi um método analítico muito difundido para a caracterização de solos, minérios, rochas, metais, ligas e outros artigos.

Os métodos experimentais seguiram esta evolução, permitindo registrar perfis de alta resolução, com razões sinal-ruído melhores. Além disso, foram desenvolvidas geometrias de difração mais simples e acessórios úteis (monocromadores, detectores, filtros, fendas, fornos, porta-amostras, etc). Neste contexto, também foram desenvolvidos os difratômetros de Bragg-Bretano-Parrish, junto com outros como: Guinier, Transmissão, Seeman-Bohlin etc., que foram depois aperfeiçoados por óticas melhores, filtros beta, monocromadores e detectores. Enquanto isso, já em 1957 havia sido coletado e publicado um grande número de dados de difração confiáveis, na forma ASTM (American Society for Testing and Materials) ou cartões de JCPDS-PDF (Joint

Committee on Powder Diffraction Standards – Powder Diffraction File), para análise qualitativa rápida, usando procuras manuais.

Até o início da década de 80 muitos dos difratômetros de pó não eram automatizados e forneciam apenas registros em papel dos perfis de difração. Aliando-se a esse fato, muitos instrumentos não tinham motores de passo nem fontes de alta intensidade (>1,0 kW). Foi apenas com o desenvolvimento de fontes de alta intensidade, geradores de 2-3kW, anodo giratório, luz síncrotron, óticas melhores, monocromadores baratos e sistemas computadorizados, que permitem o controle do difratômetro e da aquisição de dados digitalizados simultaneamente, que aqueles métodos de DRXP experimentaram uma nova era. Vários grupos de pesquisas ao redor do mundo se puseram a desenvolver programas específicos e algoritmos numéricos capazes de resgatar toda a informação possível a partir de um perfil de difração de uma fase cristalina complexa, ou de uma mistura de fases. Reconheceu-se então que, se fossem inventados dispositivos eletrônicos e técnicas numéricas adequadas, seria possível desenredar a estrutura cristalina tridimensional da projeção unidimensional de sua rede recíproca, através do diagrama de DRXP, conhecido como perfil de difração (MASCIOCCHI, 1997 e KUPLICH, 2004).

Como citado anteriormente, a repetição uniforme de celas unitárias, define o cristal, ou monocristal. O que se conhece por cristalito também é um monocristal, porém não tem tamanho suficiente para ser usado para determinação de estruturas pelo método de monocristal. Muitos cristalitos juntos, espalhados de maneira aleatória, formam o policristal ou apenas pó. A difração de raios X a partir de amostras policristalinas ocorre quando vários cristalitos são irradiados simultaneamente por um feixe incidente. Na difração de pó, em consequência da distribuição estatística das diferentes orientações assumidas por um dado plano cristalino, apenas uma parte dos cristalitos está corretamente orientada para difratar, ou seja, somente essa parte estará orientada de modo a satisfazer a condição imposta pela lei de Bragg (Figura II.17) (BORGES, 1996; KLUG e ALEXANDER, 1974).

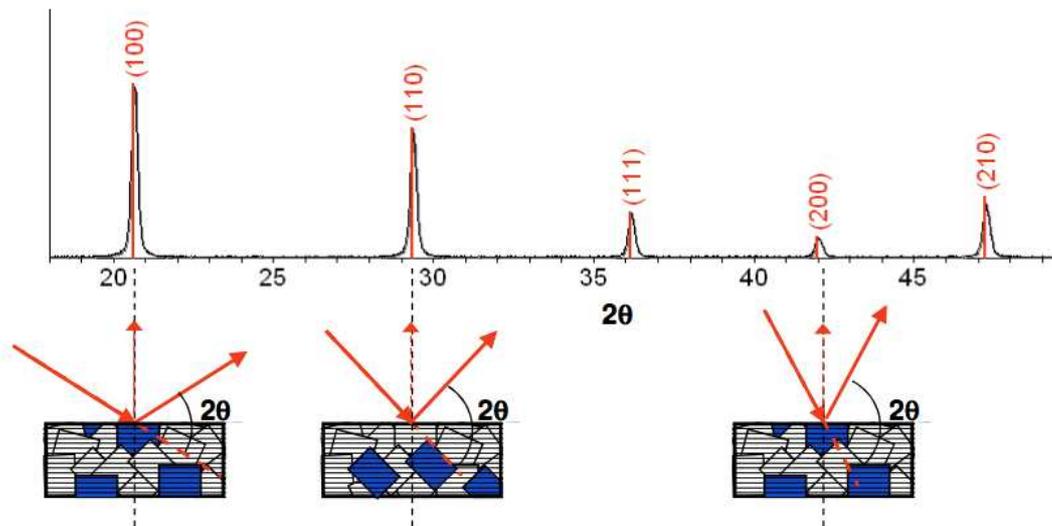


Figura II.17 – Para cada conjunto de planos paralelos à superfície da amostra, haverá cristallitos adequadamente orientados para difratar. (Adaptado de MORALES, 2010).

Os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de elétrons ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância cristalina, da mesma forma que o perfil difratométrico por ela gerado. Assim, pode-se dizer que esse perfil é semelhante a uma impressão digital da substância, servindo não somente para identificá-la rapidamente mas também para uma completa elucidação de sua estrutura. Um exemplo de perfil difratométrico é apresentado na Figura II.18.

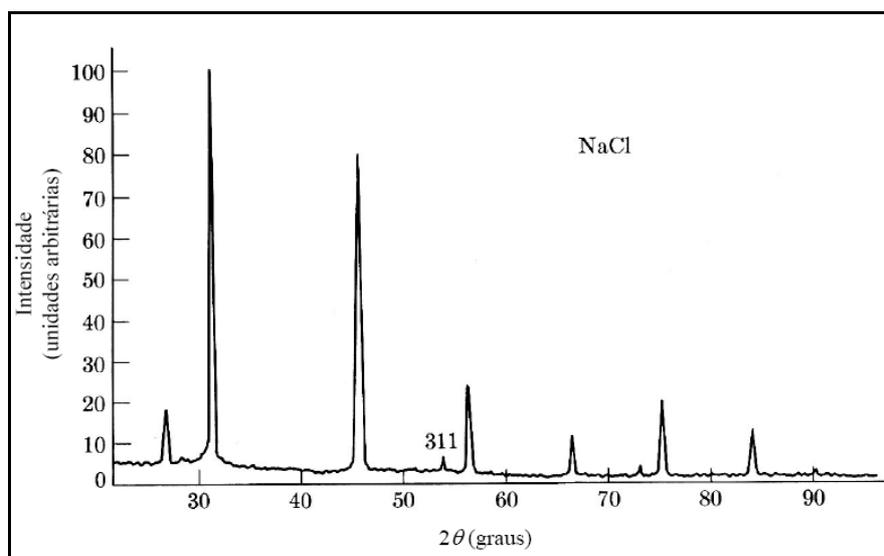


Figura II.18 – Perfil de difração de raios X de pó de uma amostra de NaCl.

Uma coletânea muito útil dos perfis de difração de pó é o que chamamos de fichas PDF (Power Diffraction File) que é mantida pelo *International Center for Diffraction Data* (ICDD), uma base de dados internacional. Estes arquivos contêm as distâncias interplanares d_{hkl} (relacionadas ao ângulo de difração) e as intensidades relativas dos picos de difração observados. Uma comparação dos perfis de difração de pó obtidos experimentalmente com estas fichas, muitas vezes revela a composição química daquela amostra policristalina. Assim, este método é de grande importância na ciência forense e nas reivindicações de patentes (HAMMOND, 2009).

A estrutura cristalina de uma substância determina seu perfil de difração. O tipo e o tamanho da cela unitária determinam as posições angulares 2θ enquanto o arranjo dos átomos na cela unitária (posição atômica) determina as intensidades relativas das linhas de difração. Alguns destes parâmetros têm papel essencial na definição de um componente particular do perfil de difração de pó, enquanto os outros podem definir distorções, como também indicado na Tabela II.1.

Tabela II.1 – Informações a respeito da estrutura cristalina, propriedades da amostra e os parâmetros instrumentais relacionados com as componentes de um perfil de DRXP (PECHARSKY e ZAVALIJ, 2005).

Componentes do Perfil de Difração	Estrutura Cristalina	Propriedade da Amostra	Parâmetro Instrumental
Posição do Pico	Parâmetros de Rede (<i>a, b, c, α, β e γ</i>)	<i>Absorção</i> <i>Rugosidade Superficial</i>	Radiação (Comprimento de Onda) <i>Instrumento/Alinhamento da amostra</i> Divergência axial do feixe
Intensidade do Pico	Parâmetros Atômicos (<i>x, y, z, B^1</i>)	<i>Orientação Preferencial</i> <i>Absorção</i> <i>Rugosidade Superficial</i>	Geometria e configuração Radiação (Polarização - Lorentz)
Forma do Pico	<i>Cristalinidade</i> Desordem Defeitos	<i>Tamanho de Cristalito</i> <i>Tensão</i> <i>Stress</i>	Radiação (Pureza Espectral) Geometria Condicionamento do Feixe

Obs: Parâmetros fundamentais são exibidos em negrito. Parâmetros que podem ter uma influência significativa, na componente do perfil de DRXP, são mostrado em itálico. Mais detalhes a respeito dos parâmetros contidos nesta tabela podem ser encontrados seção II.2.4.

¹ Parâmetro de deslocamento atômico – relacionado aos efeitos vibracionais.

Assim, para que se obtenha bons perfis de difração, devem ser tomados alguns cuidados:

- A amostra policristalina ideal (pó) deve conter dezenas de milhares de cristalitos aleatoriamente orientados, pois cada pico de difração é o produto da dispersão dos raios X em um número igual de cristalitos e para esse tipo de amostra apenas uma pequena fração dos cristalitos realmente contribui para o perfil de difração medido.
 - Mesmo que as amostras consistam em dezenas de milhares de cristalitos, estes podem não estar orientados aleatoriamente devido a algum fenômeno que tenha ocorrido durante a cristalização, transformação ou preparação das amostras. Nestes casos, algum tipo de orientação preferencial pode ter sido induzida;
- Na DRXP irradiar o maior volume possível de material pode ajudar a garantir que um número de cristalitos, estatisticamente relevante, contribua para o perfil de difração. É necessário ter cuidado com a deposição do material no porta-amostra;
- Uma alternativa para aumentar o número de cristalitos que contribuem para o perfil medido é fazer com que a amostra permaneça em rotação durante a realização da medida experimental;
- Como apenas uma pequena fração dos raios X difratados são observados pelo detector, a escolha do mais adequado à medida também é uma tarefa importante.

Além disso, o difratograma não deve conter linhas pertencentes a outras fases. Verificar a pureza das amostras e a necessidade de proceder uma cuidadosa moagem e/ou peneiramento também são alguns dos procedimentos importantes para que se obtenha dados de qualidade. A moagem excessiva, por exemplo, pode levar a alteração das dimensões cristalográficas dos cristais, influenciando no alargamento de picos e, conseqüentemente nos valores de 2θ , além de eventual formação de fases amorfas.

A DRXP, como ferramenta para estudos estruturais, conta com métodos sofisticados, disponíveis hoje em dia e originalmente introduzidos por Hugo Rietveld em 1967, para dar o melhor ajuste de um perfil de difração experimental de pó

(RIETVELD, 1967 e 1969; YOUNG, 1993; JENKINS e SNYDER, 1996). A técnica de DRXP também pode ser utilizada, atualmente, no processo de determinação estrutural e pode fornecer dimensões precisas da cela unitária, coordenadas atômicas e fatores de temperatura, entre outras coisas, da mesma maneira que os estudos de difração por monocristal. O método de Rietveld é, naturalmente, de grande valor nesse processo. Ele usa uma abordagem pelo método dos mínimos quadrados para obter um acordo entre um perfil teórico e o perfil de difração medido. A introdução deste método foi um passo significativo na análise de difração de amostras policristalinas, pois foi capaz de lidar de forma confiável com forte sobreposição de reflexões (GLUSKER e TRUEBLOOD, 2010).

Maiores detalhes a respeito do método de Rietveld serão descritos em seções posteriores.

II.2.4 – Fatores Importantes na Determinação de Estruturas Cristalinas

De modo geral, diz-se que o sistema cristalino e o grupo espacial são obtidos a partir da indexação do perfil de difração, no qual um índice de Miller é atribuído a cada linha de difração. O tamanho da cela unitária é deduzido através das posições angulares, 2θ , das linhas de difração. O número de átomos por cela unitária é calculado através do tamanho da cela unitária, composição química e densidade e ainda, as posições dos átomos na cela unitária são deduzidas das intensidades relativas. Assim, faz-se necessário o conhecimento de cada um desses pontos.

A solução da estrutura começa a partir do conhecimento do arranjo de átomos ou moléculas no interior da cela unitária. Se uma solução de estrutura suficientemente boa é obtida, uma estrutura de alta qualidade pode então ser obtida por meio de um refinamento do modelo estrutural na fase de refinamento da estrutura.

Os perfis de difração são normalmente obtidos em termos das intensidades versus 2θ (graus). A DRX e a Cristalografia nos mostram que as posições dos picos de difração estão relacionadas aos parâmetros da cela unitária. Se a posição dos picos de difração é conhecida, o processo de indexação a partir da lei de Bragg, das equações das distâncias interplanares (d_{hkl}), Tabela II.2, e das regras de extinção (ver Tabela II.3), permite a

determinação do sistema cristalino, do grupo espacial, de seus parâmetros de rede e de seu volume (CULLITY, 2001).

Tabela II.2 – Relação entre as distâncias interplanares e os parâmetros de rede da cela unitária, para cada sistemas cristalinos.

Sistema Cristalino	Distâncias Interplanares	
Cúbico	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2}$	V = volume da cela unitária. $S_{11} = b^2 c^2 \text{sen}^2 \alpha$
Tetragonal	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2}$	$S_{22} = a^2 c^2 \text{sen}^2 \beta$ $S_{33} = a^2 b^2 \text{sen}^2 \gamma$
Ortorrômico	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{k^2}{a^2} + \frac{l^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$	$S_{12} = abc^2 (\cos \alpha \cos \beta - \cos \gamma)$ $S_{23} = a^2 bc (\cos \beta \cos \gamma - \cos \alpha)$
Hexagonal	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + h \cdot k + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2}$	$S_{13} = ab^2 c (\cos \gamma \cos \alpha - \cos \beta)$
Monoclínico	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{1}{\text{sen}^2 \beta} \left(\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2 \text{sen}^2 \beta}{b^2} + \frac{l^2}{c^2} - \frac{2hl \cos \beta}{ac} \right)$	
Triclínico	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{1}{V^2} \left(S_{11} h^2 + S_{22} k^2 + S_{33} l^2 + \right.$ $\left. - 2S_{12} hk + 2S_{23} kl + 2S_{13} hl \right)$	

A Lei de Bragg define as condições necessárias para que ocorra a difração, mas nada estabelece quanto às intensidades relativas que podem ser utilizadas na determinação das posições atômicas e na análise quantitativa de fases.

As intensidades dos picos de difração são influenciadas por vários fatores, sendo que de maneira simplificada, temos:

$$I = |F|^2 \cdot p \cdot \left\{ \frac{1 + \cos^2 2\theta}{\text{sen}^2 \theta \cos^2 \theta} \right\} \cdot e^{-2B} \quad (\text{II.7})$$

onde, I é a intensidade, F o fator de estrutura, p o fator de multiplicidade, o termo dentro dos parênteses é o fator de Lorentz e de polarização (LP), e o termo exponencial é o fator de deslocamento atômico (CULLITY, 2001). A seguir esses fatores serão brevemente descritos.

II.2.4.1 – Fator de Espalhamento Atômico

Quando um feixe de raios X encontra um átomo, cada elétron espalha parte da radiação de forma coerente. O fator de espalhamento atômico indica o poder de espalhamento do átomo, onde há uma clara correlação com o número de elétrons do átomo que estão expostos aos raios X, ou seja, quanto maior o número de elétrons maior o fator de espalhamento atômico. Dessa forma, um átomo com número atômico Z , espalha uma onda a uma amplitude Z vezes a amplitude de um único elétron. Uma vez que os elétrons em um átomo estão situados em diferentes pontos do espaço, isso introduz diferenças de fases entre as ondas espalhadas por diferentes elétrons. O resultado é a redução no valor do espalhamento atômico (f) com o aumento do ângulo de espalhamento (CULLITY, 2001). O espalhamento atômico é influenciado também pelo comprimento de onda da radiação incidente. Para um mesmo valor de θ , o valor de f_0 será maior para valores de comprimentos de onda menores. Normalmente os valores de f_0 são descritos em termos de $\text{sen}(2\theta/\lambda)$ (JENKINS, 1996 e SANTOS, 2011).

O fator de espalhamento f_0 é calculado admitindo-se que cada elétron do átomo se comporta como um elétron livre. Entretanto, o seu poder de espalhamento pode ser maior ou menor que o de um elétron livre e a fase da onda espalhada pode ser diferente da onda incidente. Tendo em conta esses efeitos é necessário introduzir correções: uma real (f'), que leva em consideração a modificação do poder dispersivo; e a outra, imaginária (if''), que leva em consideração a mudança da fase espalhada em relação à onda incidente.

$$f = f_0 + f' + if'' \quad (\text{II.8})$$

Esse é o caso do espalhamento ressonante, quando o estudo envolve dois átomos vizinhos na tabela periódica ou íons do mesmo elemento químico, por exemplo. Seus fatores de espalhamento atômico terão valores semelhantes dependendo do comprimento de onda utilizado. Para esses casos, a utilização de radiações de diferentes comprimentos de onda permite diferenciar nos planos dos difratogramas, as contribuições dos diferentes átomos que compõem a amostra. Isto porque, quando o comprimento de onda da radiação incidente tem valor próximo ao da borda de absorção de um dos átomos do material estudado, ocorre uma interação (ressonância) com a frequência de vibração dos elétrons desse átomo, resultando em uma acentuada modificação da fase da amplitude da radiação por ele espalhada. Salvo estes casos, a

variação desses termos de correção em função de $\sin(2\theta/\lambda)$ são menores que a variação sofrida por f_0 , e pelo fato de seus efeitos tenderem a ser anulados, quando considerada a totalidade dos átomos, normalmente essas correções são desprezadas (BORGES, 1996).

Pode-se considerar, ainda, os efeitos vibracionais representados pelo fator B , também conhecido como parâmetro de deslocamento atômico, que considera o aumento da energia cinética dos átomos e de sua vibração com o aumento da temperatura. Essa alteração produz o aumento das celas unitárias, dos espaçamentos entre planos atômicos e dos ângulos de Bragg para o material. Acarreta também a diminuição na intensidade dos picos de difração e aumento da radiação de fundo (background) (GALVÃO, 2011).

Este fator exponencial é dependente do ângulo, e pode ser relacionado ao parâmetro de deslocamento atômico médio $\langle U \rangle$ observado na equação descrita a seguir.

$$B = 8\pi^2 \langle U \rangle^2 \quad (\text{II.9})$$

Para efeitos práticos, o cálculo do fator de espalhamento atômico considerando os efeitos de espalhamento (SHMUELI, 2007), absorção e vibração térmica pode ser descrito da seguinte forma:

$$f = f_0 \cdot e^{-B \cdot (\sin\theta/\lambda)^2} \quad (\text{II.10})$$

II.2.4.2 – Fator de Estrutura

Para o cálculo da intensidade de um feixe difratado, o espalhamento coerente precisa ser considerado não na forma de átomos isolados, mas considerando todos os átomos do cristal. O fator de estrutura leva em conta todos os átomos presentes no cristal, bem como suas posições dentro da cela unitária (CULLITY, 2001). Para a determinação do fator de estrutura, deve-se assumir que a lei de Bragg seja satisfeita. Essa é uma condição necessária para a existência de picos de difração, mas não suficiente para que uma reflexão ocorra, pois em certas estruturas cristalinas é possível que algumas linhas de difração estejam ausentes devido às condições de extinções sistemáticas, que são reflexões que não ocorrem, independentemente da natureza dos átomos presentes na amostra, traduzindo o cancelamento das ondas espalhadas pelos diversos átomos da base em virtude da distribuição espacial deles.

Salvo a rede primitiva (P), onde não ocorrem extinções sistemáticas, cada tipo de rede cristalina é caracterizada por um tipo de extinção (ver Tabela II.3). Assim, o reconhecimento de extinções sistemáticas, nos perfis de difração de uma dada substância, possibilita determinar o modo estrutural dessa substância (BORGES, 1996). Além das extinções sistemáticas decorrentes da estrutura cristalina, ocorrem outras extinções também em resultado da presença de operadores de simetria com uma componente de translação.

As posições atômicas dentro da cela unitária são fundamentais para o fator de estrutura, pois cada um deles será um centro espalhador (BORGES, 1996; SANTOS, 2011). As posições dos átomos na cela unitária influenciam na intensidade da radiação difratada, pois o cristal é uma repetição dessas celas. A amplitude da onda resultante espalhada pelos átomos da cela unitária é chamada de fator de estrutura (F), pois descreve como o arranjo dos átomos afeta a intensidade. Para obter esse fator é feita a soma das ondas espalhadas por todos os átomos da cela (GALVÃO, 2011).

Para uma cela unitária de n átomos, cujas coordenadas fracionais são u_i , v_i e w_i ($i = 1, 2, \dots, n$) e fatores de espalhamento f_1, f_2, \dots, f_n , o fator de estrutura para uma dada reflexão (hkl) será:

$$F = \sum_{n=1}^n f_i \cdot e^{2\pi i(hu_n + kv_n + lw_n)} \quad (\text{II.11})$$

O fator de estrutura F expressa, na forma de um número complexo, a amplitude e a fase da onda resultante. Seu valor absoluto $|F|$ é definido como uma razão de amplitudes:

$$|F| = \frac{\text{Amplitude da onda espalhada por todos os átomos da célula}}{\text{Amplitude da onda espalhada por um elétron}} \quad (\text{II.12})$$

A intensidade do feixe difratado por todos os átomos da cela unitária, em uma direção determinada pela lei de Bragg, é proporcional a $|F|^2$. O fator de estrutura independe da forma e do tamanho da cela unitária, depende somente da disposição relativa dos n átomos na cela unitária, e de seus respectivos fatores de espalhamento f_n . Esse fato nos permite relacionar a rede de Bravais de uma substância com seu perfil de difração (JENKINS, 1986).

Tabela II.3 – Condições de não-extinção de reflexões associadas aos tipos de estrutura cristalina e aos elementos de simetria (adaptado de (BORGES, 1996).

Tipo de Reflexão	Condição de Ocorrência ($n = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$)	Interpretação Estrutural	
		Tipo de Rede *	Simetria Espacial Símbolo *
<i>h k l</i>	$h+k+l=2n$	I	
	$h+k=2n$	C	
	$h+l=2n$	B	
	$k+l=2n$	A	
	$k+k, h+l, k+l=2n$	F	
	$-h+k+l=3n$	R	
	$h+k+l=3n$	H	
	nenhuma	P	
<i>0 k l</i>	$k=2n$	P, B, C	<i>b</i>
	$l=2n$	P, I, C	<i>c</i>
	$k+l=2n$	P	<i>n</i>
	$k+l=4n$	F	<i>d</i>
<i>h 0 l</i>	$h=2n$	P, I, A	<i>a</i>
	$l=2n$	P, A, C	<i>c</i>
	$h+l=2n$	P	<i>n</i>
	$h+l=4n$	F, B	<i>d</i>
<i>h k 0</i>	$h=2n$	P, I, B	<i>a</i>
	$k=2n$	P, A, B	<i>b</i>
	$h+k=2n$	P	<i>n</i>
	$h+k=4n$	F	<i>d</i>
<i>h h l</i>	$l=2n$	P, F, C	<i>c</i>
	$h=2n$	C	<i>b</i>
	$h+l=2n$	C	<i>n</i>
	$2h+l=4n$	I	<i>d</i>
<i>h 0 0</i>	$h=2n$		$2_1, 4_2$
	$h=4n$		$4_1, 4_3$
<i>0 k 0</i>	$k=2n$		$2_1, 4_2$
	$k=4n$		$4_1, 4_3$
<i>0 0 l</i>	$l=2n$		$2_1, 4_2, 6_3$
	$l=3n$		$3_1, 3_2, 6_2, 6_4$
	$l=4n$		$4_1, 4_2$
	$l=6n$		$6_1, 6_5$
<i>h h 0</i>	$h=2n$		2_1

* Os símbolos dos tipos de rede, os eixos parafusos ($6_1, 6_2, 6_3, 6_4, 6_5; 4_1, 4_2, 4_3; 3_1, 3_2$ e 2_1) e os símbolos *a, b, c, n e d* correspondentes aos planos de deslizamento foram apresentados nas seções II.2.2.4 e II.2.2.5. Mais detalhes também podem ser encontrados nas ITC (ITC, 2003 e ITC, 2004).

II.2.4.3 – Fator de Multiplicidade

O fator de multiplicidade considera a proporção relativa dos planos cristalinos que contribuem para uma determinada reflexão. Pode ser definido como o número de planos que tem a mesma distância interplanar (d_{hkl}) em relação ao total de planos refletores. Planos caracterizados por diferentes índices de Miller e paralelos, tais como (100) e ($\bar{1}00$) contribuem separadamente para esse fator. Esse é o caso de, por exemplo, planos (100), (010) e (001) em uma cela cúbica. Uma vez que estes planos têm seus correspondentes negativos, temos um total de seis planos que contribuem para a dada reflexão. Desse modo temos que a multiplicidade desta reflexão é 6.

O sistema cristalino pode determinar o fator de multiplicidade. No caso do sistema tetragonal, por exemplo, os mesmos planos (100) e (001) tem espaçamentos diferentes, reduzindo o fator de multiplicidade de 6 para 4, no caso do plano (100) e de 6 para 2, no caso do plano (001).

A Tabela II.4 apresenta os fatores de multiplicidade, para o método do pó, de acordo com o sistema cristalino e seus índices de Miller (hkl) (CULLITY, 2001). Essa é uma consideração importante a ser realizada no cálculo das intensidades (SANTOS, 2011).

Tabela II.4 - O fator de multiplicidade em função dos sistemas cristalinos.

Sistema Cristalino	Fator de Multiplicidade						
	$hkl/48$	$hhl/24$	$0kl/24$	$0kk/12$	$hhh/8$	$00l/6$	
Cúbico	$hkl/48$	$hhl/24$	$0kl/24$	$0kk/12$	$hhh/8$	$00l/6$	
Hexagonal	$hkl/25$	$hhl/12$	$0kl/12$	$hk0/12$	$hh0/6$	$0k0/6$	$00l/2$
Romboédrico	$hkl/25$	$hhl/12$	$0kl/12$	$hk0/12$	$hh0/6$	$0k0/6$	$00l/2$
Tetragonal	$hkl/16$	$hhl/8$	$0kl/8$	$hk0/8$	$hh0/4$	$0k0/4$	$00l/2$
Ortorrômico	$hkl/8$	$0kl/4$	$h0l/4$	$hk0/4$	$h00/2$	$0k0/2$	$00l/2$
Monoclínico	$hkl/4$	$h0l/2$	$0k0/2$				
Triclínico	$hkl/2$						

II.2.4.4 – Fator de Lorentz e de Polarização

São dois fatores distintos, que dependem apenas do ângulo de incidência, e que fazem diminuir a intensidade dos picos de difração que ocorrem para valores intermediários de ângulos de Bragg. No desenvolvimento de Thomson o fator de polarização é consequência do espalhamento da radiação não polarizada $\{[1+\cos^2(2\theta)]/2\}$. Já os fatores trigonométricos $[1/(4\sin^2\theta \cdot \cos\theta)]$ determinam o chamado fator de Lorentz (JENKINS, 1996). O resultado desses fatores é representado por “LP” e é dado pela seguinte equação:

$$LP = \left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{\sin^2 \theta \cdot \cos \theta} \right) \quad (\text{II.13})$$

II.2.5 – Determinação de uma Estrutura Cristalina Desconhecida a partir de Dados de DRXP

A determinação da estrutura de um cristal a partir de dados de difração, de modo geral, compreende as seguintes fases:

- Determinação da cela unitária (indexação);
- Determinação da simetria (atribuição do grupo espacial);
- Solução da estrutura;
- Refinamento da estrutura.
- Cada um dos itens acima será brevemente discutido a seguir.

II.2.5.1 – Indexação

Na indexação, o sistema cristalino e o grupo espacial são obtidos a partir do perfil de difração medido. Quando, tanto a simetria da rede quanto as dimensões da cela unitária são desconhecidas, a indexação *ab initio* dos dados de difração de pó muitas vezes torna-se um processo de tentativa e erro no intuito de encontrar a cela unitária correta e este processo pode ser um desafio. Isto ocorre porque a atribuição dos índices *hkl* a cada pico de Bragg observado é feito sem o conhecimento prévio dos parâmetros da cela unitária (*a*, *b*, *c*, α , β e γ , no caso mais geral). Esta tarefa é equivalente a

encontrar as direções de todos os vetores recíprocos observados com base apenas em seus comprimentos, isto é, restaurar uma imagem tridimensional a partir de uma única projeção unidimensional. O problema da indexação a partir dos dados de difração de pó é complexo, mas possível, devido à presença de um conjunto de regras que podem ser usadas para a reconstrução da rede recíproca, já apresentadas nas seções anteriores (PECHARSKY e ZAVALIJ, 2005).

Em geral, a complexidade da indexação dos dados de difração de pó sem prévio conhecimento da simetria e/ou das dimensões da cela unitária é inversamente proporcional à simetria da rede, ou seja, quanto maior a simetria, mais simples será o processo de indexação. Por muitos anos foram empregados conhecimentos matemáticos fundamentais para encontrar soluções de problemas de indexação "manualmente". Hoje em dia, esse processo quase nunca é realizado sem o emprego de um ou vários programas computacionais disponíveis (TREOR, DICVOL e ITO, por exemplo). Todos os três códigos de computador mencionados anteriormente foram amplamente testado por centenas de pesquisadores (WERNER, 1985; BOUTLIF, 1991 e VISSER, 1969). Eles foram submetidos a múltiplas revisões tanto por seus desenvolvedores originais quanto por cristalógrafos experientes, e, portanto, são bastante confiáveis, se os dados de DRXP fornecidos forem de boa qualidade (PECHARSKY e ZAVALIJ, 2005).

A indexação de um perfil de DRXP, está baseada nos seguintes pilares:

- **A ocorrência de picos de Bragg em ângulos mais baixos** - Estes picos são extremamente importantes porque têm os índices mais simples (geralmente $-2 \leq h \leq 2$, $-2 \leq k \leq 2$ e $-2 \leq l \leq 2$), o que limita consideravelmente as possibilidades de localizar os vetores correspondentes na rede recíproca e, portanto, simplifica todo o processo de restaurar as direções dos vetores recíprocos a partir de seus comprimentos.
- **Ausência de um grande número de picos de Bragg extintos, especialmente a baixos ângulos** - Por exemplo, se devido a uma variedade de razões todos os picos de difração, considerados durante a indexação, tiverem um dos índices divisíveis por dois, então a dimensão da cela unitária resultante será metade do verdadeiro valor.

- **Garantia da ausência de quaisquer tipos de erros sistemáticos que possam afetar os ângulos de Bragg medidos** - A presença de um erro sistemático, mesmo que pequeno (por exemplo, deslocamento de amostras e/ou erros de deslocamento do zero do difratômetro) pode afetar consideravelmente o resultado da indexação. Isto porque, geralmente, esse tipo de erro tem maior influência sobre os picos de menores ângulos de Bragg, que são críticos no sucesso da indexação. Assim, erros sistemáticos devem ser minimizados realizando sempre um alinhamento adequado do instrumento e o uso de padrões certificados para a calibração do mesmo.
- **Garantia da ausência de picos de difração, devido a impurezas, nos dados experimentais** - Se este requisito não for cumprido e um ou mais picos de impurezas estiverem incluídos na tentativa de indexação, é quase sempre verdade que os vetores recíprocos correspondentes à fase da impureza não se encaixarão dentro da rede recíproca correta, isto é, da fase cristalina principal. Se a cela unitária, ainda assim, puder ser definida, sua descrição não estará correta.

Obedecendo a esses pilares, a probabilidade de sucesso na indexação do perfil de difração será maior.

II.2.5.2 – Preparação dos dados para a solução da estrutura – Decomposição do Perfil/Ajuste do Perfil.

Depois que a cela unitária foi determinada, a partir do perfil de difração, o próximo passo é preparar os dados das intensidades para a determinação do grupo especial usando uma técnica apropriada de “decomposição do perfil” ou “ajuste de perfil”. As duas técnicas mais comumente utilizadas para este propósito são as que foram desenvolvidas por Pawley (PAWLEY, 1981) e Le Bail (LE BAIL, *et al.*, 1988).

O objetivo destas técnicas é ajustar completamente o perfil de difração experimental por meio do refinamento das variáveis que descrevam: (a) as posições dos picos (parâmetros de rede, deslocamento do zero, deslocamento da amostra), (b) a distribuição das intensidades do *background*, (c) a largura dos picos, (d) a forma dos picos, e (e) as intensidades dos picos. Com relação a (a), os parâmetros de cela unitária

obtidos no processo de indexação são usados como valores iniciais, embora os valores refinados no procedimento de decomposição do perfil/ajuste de perfil representem um conjunto mais preciso de parâmetros de cela unitária.

Este processo não é realizado objetivando determinar a estrutura mas sim para obter valores confiáveis das variáveis que descrevem as diferentes características do perfil de difração de pó como preparação para as fases subsequentes do processo de determinação de estrutura. É importante ressaltar que as diferentes abordagens para a solução de estrutura (ou seja, as abordagens “tradicional” e “espaço-direto” que serão apresentadas adiante) fazem uso de diferentes combinações das variáveis (a) – (e) como informações de entrada.

A solução de uma estrutura cristalina não é um processo trivial e, portanto, necessita ser feita com muito critério. Familiaridade com as características cristalográficas, juntamente com o conhecimento químico e as propriedades físicas do material em questão, é altamente desejável e, em alguns casos, pode ser necessário para completar a solução. O processo de solução da estrutura cristalina geralmente começa com a análise das ausências sistemáticas (ausência de reflexões com determinados índices) para encontrar o grupo espacial. A determinação do grupo espacial baseia-se nas regras de extinção para a reflexão. Um grande problema é a sobreposição de picos nas posições de reflexão em ângulos maiores, o que impede descobrir quais reflexões estão ausentes. Geralmente, só se pode ter certeza sobre a ausência de um número muito limitado de reflexões individuais em ângulos baixos. Assim, uma situação muito comum quando se trata de dados de um perfil de difração de pó é encontrar vários grupos espaciais possíveis. Isso porque existem grupos espaciais que obedecem às mesmas regras de extinção (MENDEN, 1998). É importante lembrar que esse processo de escolha do grupo espacial deve ser feito com muita parcimônia. Deve-se lembrar, também, que no caso de materiais moleculares orgânicos, ajuda consideravelmente ter o conhecimento que a distribuição de frequência dos grupos espaciais nos quais esses materiais estão inseridos é de cerca de 80% de compostos que se cristalizam em um dos seguintes grupos: $P2_1/c$, $P\bar{1}$, $P2_12_12_1$, $P2_1$ e $C2/c$ (DAVID e SHANKLAND, 2008).

O próximo passo requer a determinação do conteúdo da cela unitária, isto é, deve-se estabelecer ou estimar quantos átomos de cada tipo, moléculas ou grupos de átomos espera-se que estejam presentes em uma cela unitária (PECHARSKY e ZAVALIJ, 2005).

II.2.5.3 – Solução da Estrutura Cristalina

Existem duas estratégias gerais para solução de estrutura a partir de dados de DRXP: a abordagem "tradicional" e a abordagem do "espaço-direto".

Na abordagem tradicional, o objetivo é extrair as intensidades $I(hkl)$ das reflexões individuais diretamente dos dados obtidos no perfil de difração de pó e, em seguida usar esses dados nos cálculos da solução da estrutura que têm sido desenvolvidos para difração de monocristal. No entanto, por causa da sobreposição dos picos no perfil de DRXP, é muitas vezes difícil a obtenção de valores de intensidades $I(hkl)$ que sejam confiáveis. Desta forma, muito trabalho sobre o desenvolvimento da abordagem tradicional tem sido dedicado à melhoria da confiabilidade dos procedimentos de extração de pico.

Na abordagem do “espaço-direto”, estruturas de teste são geradas no espaço real, independentemente dos dados experimentais de difração de pó, e a adequação da estrutura de prova é avaliada comparando o perfil de difração de pó calculado para a estrutura de prova com o perfil experimental de difração de pó. Esta comparação é quantificada usando um fator apropriado chamado fator ‘ R ’. Esta estratégia para solução estrutural tem como objetivo encontrar a estrutura de um cristal de prova que tenha o mais baixo valor “possível” do fator ‘ R ’. Essa abordagem é equivalente a explorar uma hipersuperfície $R(\Gamma)$ para encontrar o mínimo global desta, onde Γ representa o conjunto de variáveis que definem a estrutura (HARRIS, 2002).

A maior parte dos relatos de determinação de estrutura cristalina de sólidos moleculares orgânicos, a partir de dados de difração de pó, tem usado a estratégia de “espaço-direto”, embora também existam relatos de determinação de estrutura bem sucedidas, de tais materiais, usando a abordagem “tradicional”. Uma característica da abordagem “espaço-direto” é que ela explora o uso das informações, já conhecidas, sobre a geometria molecular, independentemente dos dados de difração de pó, antes de iniciar o cálculo da solução de estrutura. Assim, é comum corrigir, durante o processo de solução da estrutura, os comprimentos de ligação, ângulos com valores padronizados e também corrigir unidades que possuam geometrias estruturais bem conhecidas (como anéis fenila, por exemplo). Em geral, os únicos aspectos de geometria intramolecular

que não são previamente conhecidos e corrigidos são os valores dos ângulos de torção que definem a conformação molecular.

Nestas circunstâncias, cada estrutura experimental em um cálculo de solução de estrutura pela abordagem de “espaço-direto” é definida por um conjunto (Γ) de variáveis estruturais que representam, para cada molécula na unidade assimétrica, a posição da molécula na cela unitária (definida pelas coordenadas $\{x, y, z\}$, do centro de massa ou de um átomo selecionado), a orientação da molécula na célula unidade (definida pelos ângulos de rotação $\{\theta, \phi, \psi\}$) e os ângulos de torção desconhecido $\{\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n\}$. Assim, em geral, existem $6 + n$ variáveis, $\Gamma = \{x, y, z, \theta, \phi, \psi, \tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n\}$, para cada molécula na unidade assimétrica.

Para a solução de uma estrutura pela abordagem de “espaço-direto”, a complexidade do problema é ditada, em grande parte, pelo número total de variáveis estruturais a se determinar e, portanto, o maior desafio surge quando o número de variáveis estruturais é grande. Esta situação ocorre quando há uma considerável flexibilidade molecular (isto é, quando a molécula tem um grande número de ângulos de torção variáveis) e/ou quando há várias moléculas independentes na unidade assimétrica.

Como discutido acima, a base da estratégia do “espaço-direto” para a solução de estrutura é encontrar a estrutura cristalina de teste que corresponda ao melhor acordo (ou seja, mais baixo fator R) entre perfis de difração de pó calculado e experimental e isto é equivalente a explorar uma hipersuperfície $R(\Gamma)$ para encontrar o mínimo global. Em princípio, qualquer técnica de otimização global (por exemplo, Monte Carlo, *simulated annealing*, algoritmos genéticos, etc) pode ser utilizada para localizar o ponto mais baixo da hipersuperfície $R(\Gamma)$, e uma grande variedade de diferentes estratégias de otimização global tem sido empregada neste sentido (HARRIS e CHEUNG, 2004).

Na técnica de *simulated annealing*, uma sequência de estruturas (denotada por Γ_i para $i = 1, 2, \dots, N$) é gerada para a consideração como potenciais soluções de estrutura. Cada estrutura é derivada da estrutura anterior por um pequeno deslocamento aleatório da(s) molécula(s) dentro da cela unitária. O procedimento para gerar a estrutura Γ_{j+1} a partir da estrutura Γ_j é resumido a seguir.

A partir da estrutura Γ_j , é gerada uma estrutura de teste $\Gamma_{j,\text{teste}}$ fazendo pequenos deslocamentos aleatórios para cada uma das variáveis estruturais no Γ_j . O acordo entre o

perfil de difração de pó para a estrutura de teste e o perfil de difração de pó experimental é então avaliado calculando-se uma adequada figura-de-mérito, como R_{wp} . A estrutura experimental é então aceita ou rejeitada considerando-se a diferença [$Z = R(\Gamma_{j, teste}) - R(\Gamma_j)$] entre os valores do fator R para estruturas $\Gamma_{j, teste}$ e Γ_j e invocando o Algoritmo de Metrópolis (METROPOLIS *et al.*, 1953) de amostragem por importância. Assim, se $Z \leq 0$, a estrutura de teste é automaticamente aceita, entretanto se $Z > 0$, a estrutura de teste é aceita com probabilidade $\exp(-Z/S)$ e rejeitada com probabilidade [$1 - \exp(-Z/S)$], onde S é um fator de escala apropriado. Se a estrutura de teste é aceita, então a estrutura Γ_{j+1} é considerada como sendo $\Gamma_{j, teste}$. Se a estrutura de teste é rejeitada, estrutura Γ_{j+1} é considerada como sendo Γ_j .

Este procedimento é repetido para gerar um grande número de estruturas, sendo cada uma derivada da estrutura anterior, por meio de pequenos deslocamentos aleatórios nos valores das variáveis no conjunto Γ . Vale ressaltar que na técnica de otimização global *simulated annealing*, o fator de escala S diminui sistematicamente de maneira bem definida.

Depois que for gerado um número suficiente de estruturas, que representam uma amostragem suficientemente extensa da hipersuperfície $R(\Gamma)$, a melhor solução (correspondente ao mais baixo R -factor) é identificada e é considerada como o modelo inicial para refinamento de estrutura (HARRIS e CHEUNG, 2004).

Existe uma série de artigos que versam sobre a determinação de estruturas cristalinas a partir de dados de DRXP. Alguns deles tratam o assunto de forma bastante abrangente, englobando praticamente todos os aspectos envolvidos no processo e que estão ilustrados na Figura II.19 (HARRIS, 2001; HARRIS, 2002; CHERNYSHEV, 2001; TORAYA, 2001; DAVID e SHANKLAND, 2008; POROB e ROW, 2001).

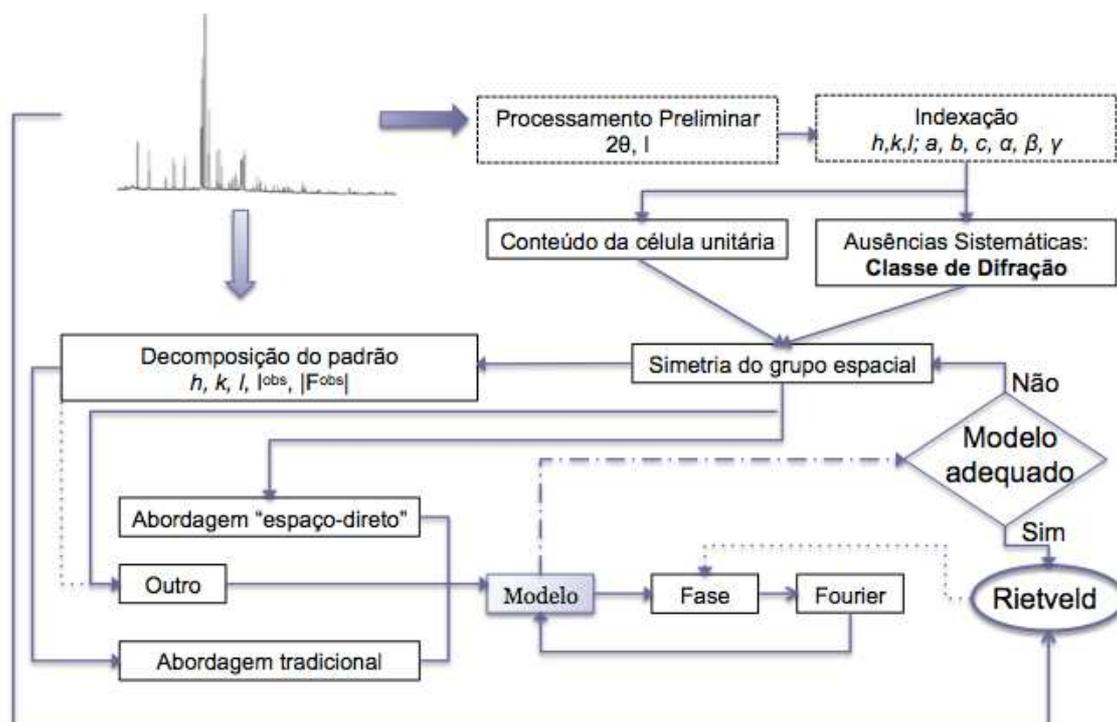


Figure II.19 – Esquema geral dos passos necessários à determinação de uma estrutura cristalina (PECHARSKY e ZAVALIJ, 2005).

Independentemente da forma como o modelo foi criado ele deve ser validado e/ou completado para confirmar o posicionamento dos átomos conhecidos e localizar átomos que faltam, se for o caso, na cela unitária. A solução de uma estrutura cristalina não termina com o desenvolvimento de um modelo plausível. Depois que o modelo foi construído completamente, múltiplos parâmetros devem ser refinados para se obter o melhor acordo possível entre os perfis de difração observados e calculados, ou em outras palavras, entre a estrutura do cristal e da imagem observada no espaço recíproco. Ao mesmo tempo, a estrutura do cristal deve ser razoável do ponto de vista tanto químico (estados de oxidação, o equilíbrio de carga, de valência, de coordenação, etc) quanto físico (distâncias interatômicas, valência e ângulos de torção, etc). O Método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas utilizando dados de difração de pó, é um passo importante para a validação e conclusão do modelo (PECHARSKI e ZAVALIJ, 2007).

II.2.5.4 – Refinamento de Estrutura através do Método de Rietveld

A técnica de refinamento, mais comumente utilizada hoje em dia, é baseada na ideia sugerida por Hugo Rietveld em meados da década de 1960 (RIETVELD, 1967; RIETVELD, 1969). O método surgiu como uma alternativa ao refinamento de estruturas cristalinas com dados de difração por policristais, onde os picos de difração apresentam muita sobreposição.

Em poucas palavras podemos defini-lo como um método de refinamento de estruturas cristalinas, que usa dados de difração de raios X ou nêutrons, por policristais. A estrutura cristalina é refinada, de forma a fazer com que o difratograma calculado com base na estrutura cristalina, se aproxime o melhor possível do difratograma observado (PAIVA-SANTOS, 2009). O método de Rietveld realiza um ajuste do perfil de difração, refinando simultaneamente os parâmetros instrumentais (divergência axial, radiação de fundo, comprimento de onda), estruturais (parâmetros de rede, posições atômicas, deslocamentos atômicos, ocupação atômica) e os relacionados com as características físicas da amostra analisada (tamanho de cristalito, microdeformação). O método permite refinar a estrutura cristalina a partir de um modelo estrutural (grupo espacial, cela unitária e posições atômicas).

A função minimizada no refinamento é o resíduo, M , resultado da comparação entre o difratograma experimental e o difratograma simulado baseado num modelo estrutural.

$$M = \sum_i w_i (y_i(obs) - y_i(calc))^2, \text{ onde } w_i = 1/y_i \quad (\text{II.14})$$

Aqui, $y_i(obs)$ e $y_i(calc)$ são, respectivamente, as intensidades observada (experimentalmente) e calculada no i -ésimo passo do difratograma.

O valor da intensidade calculada em cada ponto é dado por:

$$y_{ic} = \phi_{rsi} \sum_{\phi} S_{\phi} \sum_{\mathbf{h}} J_{\mathbf{h}\phi} LP_{\mathbf{h}\phi} |F_{\mathbf{h}\phi}|^2 G_{\mathbf{h}\phi} a_{\mathbf{h}\phi} P_{\mathbf{h}\phi} + y_{bi} \quad (\text{II.15})$$

onde:

- \mathbf{h} são os índices de Miller da reflexão (hkl);

- ϕ_{rsi} é uma função para corrigir a rugosidade superficial que ocorre normalmente para materiais com alto coeficiente de absorção;
- S é o fator de escala;
- J_h é a multiplicidade da reflexão;
- LP_h é a equação para corrigir os efeitos de Lorentz e de polarização;
- F_h é o fator de estrutura;
- G_h é chamada, função de perfil, que descreve a forma de cada pico de Bragg;
- a_h é a função para corrigir a assimetria do pico;
- P_h é a função para corrigir as intensidades pelos efeitos de orientação preferencial;
- y_b é a função para corrigir o *background* (radiação de fundo) do perfil de difração.

O somatório em ϕ se dá para todas as fases cristalinas e o somatório em h se dá para todas as reflexões que possuem um pico de difração h contribuindo para o i -ésimo ponto.

O modelo estrutural de partida deve estar suficientemente próximo do real para que a intensidade calculada seja suficientemente próxima da observada a fim de que o procedimento de mínimos quadrados, no qual o método é baseado, possa convergir.

A Figura II.20 apresenta um exemplo de um gráfico de Rietveld. Esse gráfico consiste da sobreposição do perfil observado (marcados com x) e o perfil calculado (linha contínua vermelha), tracinhos verticais que mostram as posições dos picos de Bragg, e mais abaixo está a diferença entre o perfil observado e o calculado (em azul) (ANTONIO, 2010).

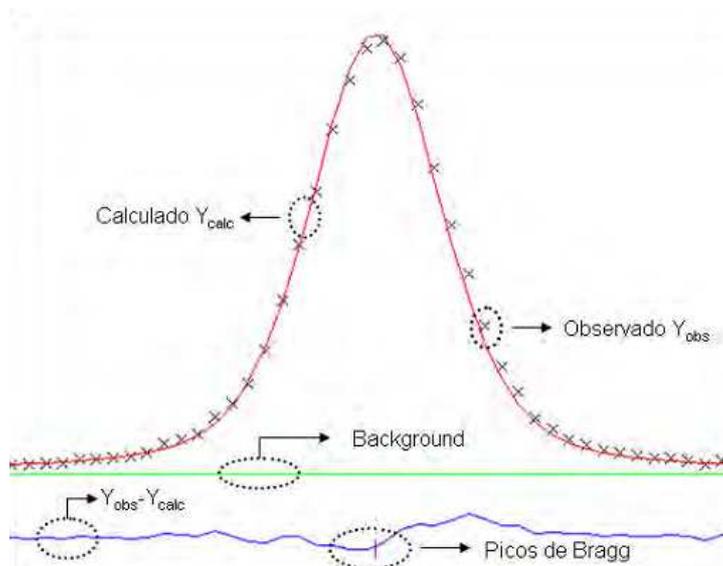


Figura II.20 – Exemplo de gráfico Rietveld (ANTONIO, 2010)

Na seção II.2.4 foram apresentadas algumas das funções que compõem a intensidade calculada y_{ic} (multiplicidade, fator de Lorentz e de polarização e fator de estrutura). Os outros termos que constituem a intensidade calculada serão discutidos a seguir.

II.2.5.4.1 – Fator de Escala

O fator de escala é dado por:

$$S = C \frac{\rho' N_c^2 v}{\rho} \quad (\text{II.16})$$

Onde C é uma constante que depende apenas das condições experimentais e permanece constante durante todo o experimento, ρ' e ρ são respectivamente as densidades real e teórica da amostra, v é o volume da amostra “banhado” pelos raios X e N_c é o número de celas unitárias por unidade de volume (PAIVA-SANTOS, 2009).

O fator de escala S é a constante que ajusta a intensidade em relação à altura dos picos. A aproximação correta do fator de escala é fundamental para análise quantitativa de fase, uma vez que mais de uma fase pode estar presente e ser refinada.

II.2.5.4.2 – Rugosidade Superficial

Para a minimização dos efeitos de rugosidade superficial, a superfície da amostra na análise deve ser a mais plana possível. Durante o refinamento observa-se o efeito da rugosidade superficial quando a diferença entre os dados experimentais e os dados calculados, a baixos ângulos é negativa, e altos ângulos é positiva. A rugosidade superficial apresenta uma forte correlação com o parâmetro de deslocamento atômico. Para evitar que esse possa convergir para valores negativos, são utilizadas funções de correção de absorção, como a função de Suortti, dada pela equação a seguir, onde p e q são fatores refináveis (SUORTTI, 1972).

$$SR = 1 - p \cdot e^{(1-q)} - p \cdot e^{\left(\frac{-q}{\sin\theta}\right)} \quad (\text{II.17})$$

II.2.5.4.3 – Funções de Perfil

Naturalmente, uma descrição exata da forma dos picos em um perfil de difração de pó é fundamental para o sucesso de um refinamento Rietveld. Se os picos são mal descritos, o refinamento não será satisfatório. As formas dos picos observados são função tanto da amostra (por exemplo, tamanho do domínio, stress/tensão, defeitos) como do instrumento (fonte de radiação, geometria, tamanhos de fenda), e elas variam em função de 2θ . Em certos casos, elas também podem variar em função dos índices hkl . Acomodar todos estes aspectos em uma única descrição de forma de pico não é trivial (MCCUSKER, *et al.*, 1999).

A função G_h , conhecida como função de perfil, é uma função na qual o Método de Rietveld se baseia para ajustar a forma do pico de difração e segundo o pesquisador Carlos Paiva Santos (PAIVA-SANTOS, 2009) é aqui que está a fonte de maiores desenvolvimentos futuros do método.

O perfil de um pico não pode ser modelado por apenas uma função, uma vez que a sua forma é definida por vários efeitos, sendo que cada um é descrito por uma função distinta. Assim, deve-se ter uma função para a forma geral, outra para as características físicas das amostras, outra(s) para a anisotropia dessas mesmas características físicas, outra para descrever o alargamento instrumental, etc.

Khattak e Cox (KHATTAK e COX, 1977) mostraram problemas fundamentais para a representação das linhas de difração de raios X por funções Gaussianas ou

Lorentziana. Várias funções foram propostas para ajustar o perfil dos picos de difração. Uma delas é a função Voigt (V), que resulta de uma convolução analítica de uma função Gaussiana e uma Lorentziana. Esta função varia de uma Lorentziana pura para uma do tipo Gaussiana e depende da proporção das larguras componentes.

A função normalizada tem a forma $V = L(x, \Gamma_L) * G(x, \Gamma_G)$, onde L é a função Lorentziana com largura a meia altura (FWHM) de Γ_L , G é a função Gaussiana com FWHM de Γ_G , e $x = \Delta 2\theta$.

A função pseudo-Voigt permite o refinamento de uma combinação de parâmetros, que determinam a fração de componentes Lorentziana e Gaussiana necessários para ajustar um perfil observado. A pseudo-Voigt, embora simétrica, permite uma variação flexível dos dois perfis mais comuns variando desde a larga Γ Gaussiana à estreita Γ Lorentziana.

A seguir serão descritas apenas duas funções pseudo-Voigt que têm sido usadas com sucesso em muitos refinamentos. Uma delas, pseudo-Voigt (p-V), não tem qualquer relação com o tamanho de cristalito, mas apenas permite identificar a presença de uma larga distribuição (ou distribuição bimodal) de tamanho de cristalito. A segunda, pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings modificada por Young (pV-TCHZ), permite a determinação de tamanho de cristalito e microdeformação isotrópicos (YOUNG e DESAI, 1989; PAIVA-SANTOS, 2009).

A função **pseudo-Voigt (p-V)** é descrita pela seguinte equação:

$$(p-V) = \eta L + (1 - \eta)G \quad (II.18)$$

onde η , é dado por:

$$\eta = NA + NB * 2\theta \quad (II.19)$$

sendo NA e NB são parâmetros refináveis e que devem ser positivos. Isso descreve satisfatoriamente o aumento do aspecto lorentziano na forma do pico a altos ângulos. L e G são respectivamente a fração lorentziana e gaussiana, definidas a seguir.

A função Lorentziana, que é parte da (p-V), pode ser escrita da seguinte forma:

$$L = \frac{\sqrt{C_1}}{\pi \cdot H_h} \left(1 + \frac{C_1 (2\Delta\theta_{ih})^2}{H_h^2} \right)^{-1} \quad (II.20)$$

onde:

- H_h é a largura total à meia altura do pico $h = (hkl)$;
- C_1 é a constante de normalização (= 4),
- $2\Delta\theta_{ih}$ é a distância em graus (2θ) da posição do pico de Bragg até o i -ésimo ponto onde a intensidade está sendo calculada, e pode ser negativa ou positiva se o ponto i está do lado do mais baixo ou mais alto ângulo respectivamente.

A porção Gaussiana da função (p-V) é descrita como:

$$G = \sqrt{\frac{C_0}{\pi \cdot H_h^2}} \cdot \exp\left(\frac{-C_0(2\Delta\theta_{ih})^2}{H_h^2}\right) \quad (\text{II.21})$$

onde C_0 é a constante de normalização (= $4 \ln 2$) e os outros termos são os mesmos envolvidos na função Lorentziana (citados acima).

A largura total à meia altura (H_h) varia com 2θ devido tanto às condições experimentais quanto às características físicas das amostras (tamanho de cristalito, microdeformação da rede e falhas de empilhamento). Nessa função (p-V) esse alargamento é descrito pela equação II.22 (PAIVA-SANTOS, 2009).

$$H^2 = (U \cdot \text{tg}^2\theta + V \cdot \text{tg}\theta + W) \quad (\text{II.22})$$

Não se pode obter informações físicas quantitativas dos parâmetros (U, V, W, η) envolvidos nessa função. Entretanto, Young e Sakthivel mostraram que quando η é maior que 1,0 (um), ou seja, quando a função tem a forma de uma super lorentziana, é provável a existência de distribuição bimodal de tamanho de cristalito (YOUNG e SAKTHIVEL, 1988). Embora não se pode quantificar essa distribuição, essa informação permite que o usuário introduza, nos refinamentos, uma outra fase do mesmo composto mas com diferentes parâmetros de largura total a meia altura, ou seja, duas fases com H_h diferentes, representando diferentes tamanhos de cristalito. Essa estratégia é muito interessante e permite, em alguns casos, se observar diferentes estequiometrias para os diferentes cristalitos.

A função *pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings modificada* (pV-TCHZ) basicamente é a mesma função anterior, exceto que a gaussiana possui uma função para H_G diferente da lorentziana H_L , e a fração lorentziana, η , é descrita em função de H_G e H_L . Isso permite relacionar os alargamentos com as características físicas de cada fase sendo refinada.

$$\text{pV-TCHZ} = \eta L + (1 - \eta)G \quad (\text{II.23})$$

onde:

$$\eta = 1.36603 q - 4.7719 q^2 + 0.1116 q^3 \quad (\text{II.24})$$

e

$$q = \frac{H_L}{H} \quad (\text{II.25})$$

$$H = \left(H_G^5 + A H_G^4 H_L + B H_G^3 H_L^2 + C H_G^2 H_L^3 + D H_G H_L^4 + H_L^5 \right)^{1/5} \quad (\text{II.26})$$

$A = 2,69269$, $B = 2,42843$, $C = 4,47163$, $D = 0,07842$ são constantes de normalização, e as componentes de Gauss H_G (modificada por YOUNG e DESAI, 1989) e de Lorentz (H_L) da largura total à meia altura (FWHM) são:

$$\Gamma_G = \left(U \operatorname{tg}^2 \theta + V \operatorname{tg} \theta + W + Z / \cos^2 \theta \right)^{1/2} \quad (\text{II.27})$$

$$\Gamma_L = X \operatorname{tg} \theta + Y / \cos \theta \quad (\text{II.28})$$

A modificação na equação II.27 consiste na adição do parâmetro Z (YOUNG e DESAI, 1989). Os parâmetros Z e Y , que variam com $(1/\cos\theta)$, podem ser relacionados com o tamanho de cristalito através da equação de Scherrer (KLUG e ALEXANDER, 1974), e os parâmetros U e X , que variam com $\operatorname{tg}\theta$, podem ser relacionados com a microdeformação da rede (PAIVA-SANTOS, 2009).

II.2.5.4.4 – Orientação Preferencial

Ocorre quando os cristalitos presentes em uma amostra tendem a se orientar preferencialmente em uma direção (ou conjunto de direções) do que em outras.

Efeitos de orientação preferencial podem ser difíceis de eliminar, e estes também podem levar a medidas de intensidade incorretas. Se as intensidades mostram uma forte

dependência hkl (por exemplo, todas as reflexões $00l$ são fortes e todas $hk0$ fracas), deve-se suspeitar de uma possível orientação preferencial dos cristalitos. Altomare *et al.* (1996) e Peschar *et al.* (1995) desenvolveram métodos para análise de dados de difração de pó com efeitos de orientação preferencial. Embora muitos programas de refinamento Rietveld permitam refinar um parâmetro de orientação preferencial, no que diz respeito a uma eliminação de um vetor cristalográfico específico, com base no modelo de March-Dollase (DOLLASE, 1986), isso é apenas uma aproximação da realidade, por isso deve-se dar preferência à eliminação, ou minimização do problema, tomando-se cuidados experimentais. Correções mais sofisticadas usando harmônicos esféricos (JAERVINEN, 1993; VON DREELE, 1998) foram introduzidas em alguns programas. Rotação de um porta-amostra capilar, montado horizontalmente (comum em síncrotrons) pode, praticamente, eliminar efeitos de orientação preferencial.

Se grandes cristalitos são usados, há menos cristalitos na amostra e eles estarão distribuídos de forma menos randômica, ou seja, nem todas as orientações dos cristalitos são igualmente representadas e isso pode se tornar um problema. Isso pode causar imprecisões, prejudicando as intensidades relativas que, ao contrário dos efeitos de orientação preferencial, não podem ser corrigidas no refinamento. Rotacionar a amostra irá melhorar as estatísticas de partícula e é altamente recomendável.

Uma das funções clássicas para descrever a orientação preferencial é a de March-Dollase (1986). Sua principal vantagem é compensar corretamente o aumento da intensidade de uma reflexão com a redução das outras intensidades.

$$P_k = \left[r_1 \cos^2 \alpha_k + (1/r_1) \sin^2 \alpha_k \right]^{-1/2} \quad (\text{II.29})$$

Onde, α_k é o ângulo entre o plano (hkl) e o vetor de orientação preferencial e ; r_1 é o parâmetro de refinamento (McCUSKER *et al.*, 1999).

II.2.5.4.5 – Radiação de Fundo ou “*Background*”

A radiação de fundo ou *background* é consequência de vários fatores, como fluorescência da amostra, ruído do detector, espalhamento por difusão térmica na amostra, fases amorfas na amostra, espalhamento incoerente, espalhamento dos raios X no ar, fendas do difratômetro e espalhamento no porta-amostra. Um dos métodos para se estimar a radiação de fundo é selecionar vários pontos no perfil que estejam fora dos

picos de Bragg e modelar a radiação de fundo por interpolação linear entre estes pontos. Este método é adequado quando o perfil é relativamente simples. Para perfis mais complexos, os coeficientes da radiação de fundo devem ser incluídos como variáveis no refinamento. A forma pela qual a radiação de fundo é incluída no refinamento depende do intervalo angular da região investigada.

Em seu trabalho original Rietveld removeu a radiação de fundo (RF) das intensidades obtidas experimentalmente, antes de serem usadas nos refinamentos. Entretanto, o peso w_i atribuído à função minimização (equação II.14) foi calculado com base na intensidade realmente medida. Wiles e Young em 1981 introduziram um polinômio (eq. II.30) para ajustar a RF durante os refinamentos, o que tornou mais fácil a aplicação do método, já que eliminou a necessidade de um tratamento prévio e a interferência humana no tratamento dos dados. Dessa forma, as intensidades usadas no cálculo do índice R_{wp} (eq. II.31) também passaram a incluir as regiões contendo apenas a radiação de fundo.

$$y_{bi} = \sum_{m=0}^5 B_m \left[\left(\frac{2\theta_i}{BKPOS} \right) - 1 \right]^m \quad (\text{II.30})$$

Nesse polinômio os coeficientes B_m são refináveis e BKPOS deve ser especificado pelo usuário (PAIVA-SANTOS, 2009).

O uso de funções empíricas, como polinômios de alta ordem, para ajustar a radiação de fundo foi uma contribuição importantíssima para o método de Rietveld. Uma outra forte motivação para se implementar uma função, foi a potencialidade de que ela pudesse descrever, também, as irregularidades causadas pelo material amorfo (McCUSKER *et al*, 1999).

Ajustes de radiação de fundo distorcida por material amorfo são adequadamente ajustadas pela primeira função implementada no programa GSAS para esse fim (*Shifted Chebyshev*) e no TOPAS Academic (COELHO, 2003). Praticamente todos os tipos de radiação de fundo podem ser modelados por essa função.

II.2.5.4.6 – Sobre a Convergência

Um refinamento chegou ao seu final quando os parâmetros não variam mais e a função minimização atingiu o valor mínimo. Entretanto, a convergência deve ser

acompanhada através de alguns índices que são calculados ao final de cada ciclo de refinamento, e que fornecem um subsídio ao usuário para tomar decisões sobre dar prosseguimento, parar ou finalizar o refinamento (TOBY, 2006).

Os índices que descrevem a qualidade do refinamento são descritos a seguir.

O índice R_{wp} pode ser expresso da seguinte maneira:

$$R_{wp} = 100. \left(\frac{\sum_i w_i (y_{io} - y_{ic})^2}{\sum_i w_i (y_{io})^2} \right) \quad (\text{II.31})$$

onde:

$I_{\mathbf{h}}$ é a intensidade integrada da reflexão de Bragg de índice $\mathbf{h} = (hkl)$ ao final dos ciclos de refinamento. Os termos y_i se referem às intensidades dos pontos. Os índices o e c se referem às intensidades observadas e calculadas respectivamente. O peso w_i da equação II.31 é dado pelo inverso da variância de cada respectiva observação ($= 1/y_i$). O numerador na equação II.31 é a função minimização M (equação II.14).

Esse é o índice que deve ser analisado para verificar se o refinamento está convergindo. Se R_{wp} está diminuindo, então o refinamento está sendo bem sucedido. No final do refinamento ele não deve estar mais variando, significando que o mínimo já foi atingido. Se R_{wp} está aumentando, então algum(s) parâmetro(s) está(ão) divergindo do valor real, ou seja, estão se afastando do valor que fornece o mínimo de M (equação II.14) e o refinamento deve ser interrompido para uma análise mais detalhada, pelo usuário, dos parâmetros sendo refinados (PAIVA-SANTOS, 2009).

Outro parâmetro a se levar em conta é a qualidade do ajuste, χ^2 :

$$GOF = \chi^2 = \left[\frac{M}{(N-P)} \right] = \frac{R_{wp}}{R_{exp}} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_o - y_c)^2}{N-P}} \quad (\text{II.32})$$

sendo,

$$R_{exp} = 100. \left[\frac{(N-P)}{\sum_i w_i (y_{io})^2} \right] \quad (\text{II.33})$$

N é o número de pontos medidos e P é o número de parâmetros refinados. Se χ^2 for igual a 1,0 significa que o R_{wp} atingiu o valor estatisticamente esperado (R_{exp}) para aqueles dados (ANTONIO, 2010).

Todos esses índices fornecem subsídios ao usuário para julgar a qualidade do refinamento. Entretanto, nenhum deles está relacionado com a estrutura cristalina e sim apenas com o perfil do difratograma. Para avaliar a qualidade do modelo estrutural refinado, deve-se calcular o R_{Bragg} , que é descrito como uma função das intensidades integradas dos picos.

$$R_{Bragg} \text{ ou } R_B = 100. \left(\frac{\sum_h |I_{ho} - I_{hc}|}{\sum_h I_{ho}} \right) \quad (\text{II.34})$$

Como a intensidade integrada está relacionada com a estrutura cristalina (tipos de átomos, posições e deslocamentos atômicos), esse índice deve ser considerado ao avaliar a qualidade do modelo refinado da estrutura cristalina.

CAPÍTULO III

III MATERIAIS E MÉTODOS

Com base em toda teoria já discutida, neste capítulo serão apresentadas as amostras estudadas, o relato dos procedimentos experimentais a que foram submetidas essas amostras e os métodos de análise utilizados para alcançar o objetivo pretendido nesta tese.

III.1 – Amostras Estudadas

Para a presente tese, cinco amostras de compostos, candidatos a protótipos de novos fármacos, derivados *N*-acilidrazônicos, foram submetidas a medidas de DRX. São eles: LASSBio-294, LASSBio-129, LASSBio-1515, LASSBio-1601 e LASSBio-1733. Estes compostos foram sintetizados no LASSBio (SILVA, 2012) e foram planejados a partir do LASSBio-294 (SUDO *et al.*, 2006).

O LASSBio-294 é um composto bioativo da classe das *N*-acilidrazonas, que foi sintetizado a partir do safrol (Figura III.1), um produto natural brasileiro abundante, obtido a partir do óleo de sassafrás (*Ocotea pretiosa*). Este derivado NAH, descoberto pelo emprego da estratégia de simplificação molecular e sintetizado, em elevado rendimento global, acumula ações vasodilatadoras (SILVA *et al.*, 2002) e potentes propriedades inotrópicas positivas, que o credenciaram como autêntico composto-protótipo de novo fármaco cardiotônico para o tratamento da insuficiência cardíaca e/ou muscular (distrofia ou fadiga muscular), desprovido dos típicos efeitos deletérios dos glicosídeos cardíacos, particularmente útil a pacientes de terceira idade. (BARREIRO, 2002; ALBUQUERQUE *et al.*, 2000; GONZALEZ-SERRATOS *et al.*, 2001; SUDO *et al.*, 2001). Além disso, o LASSBio-294 também se mostrou eficaz em promover ação analgésica e inibição da agregação plaquetária (MIRANDA *et al.*, 2002).

Frente às suas importantes propriedades farmacológicas, o LASSBio-294 foi objeto de depósito de patente (SUDO *et al.*, 2006).

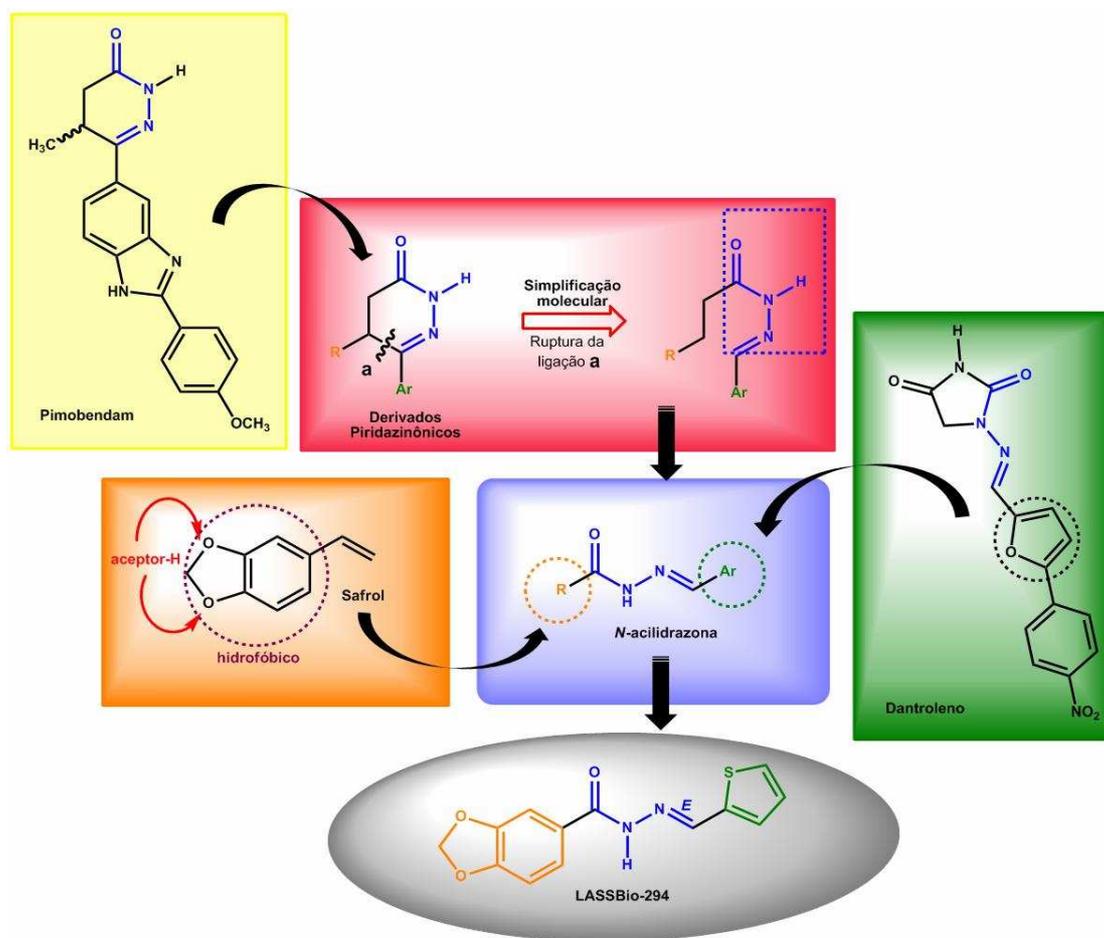


Figura III.1 – Simplificação molecular e o desenvolvimento do LASSBio-294 (SILVA, 2012).

Foi com o objetivo de ajudar a elucidar os aspectos estruturais, como propriedades físico-químicas oriundas das modificações moleculares, comuns na química medicinal e realizadas a fim de compreender a relação estrutura-atividade, que os compostos apresentados nesta tese foram submetidos a medidas de difração de raios X de pó e posterior determinação da estrutura cristalina dos mesmos.

Para a síntese dos compostos, citados no início da seção III.1, algumas das estratégias de Química Medicinal, brevemente discutidas no capítulo II, foram empregadas e estão resumidas na Figura III.2.

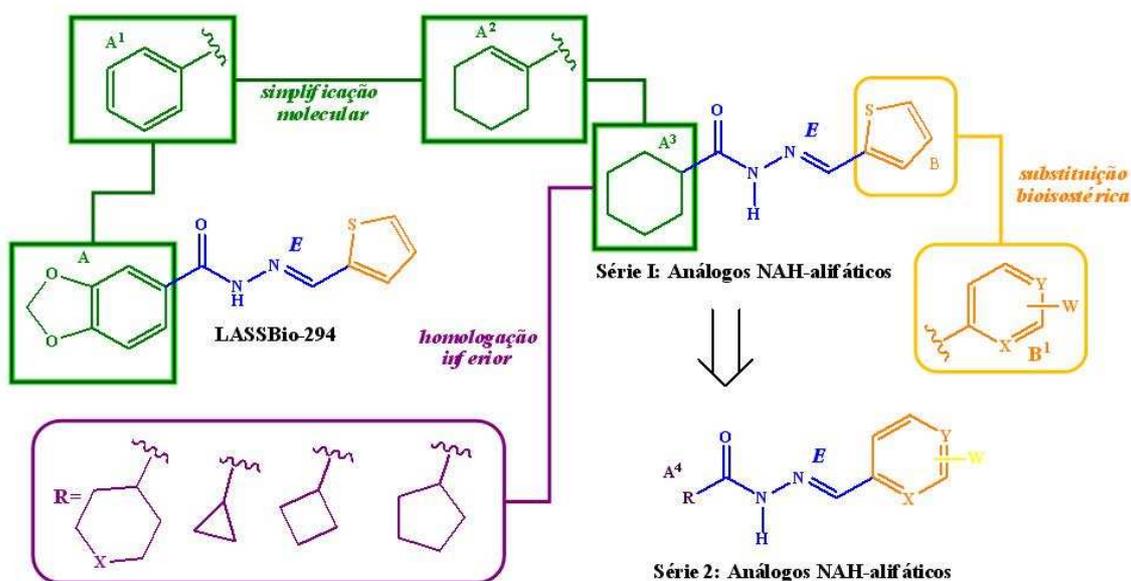


Figura III.2 – Planejamento estrutural dos compostos *N*-acilidrazônicos derivados de LASSBio-294 (SILVA, 2012).

Os compostos da série I são compostos ciclohexil-*N*-acilidrazônicos e diferem entre si pela subunidade aromática ligada à região imínica da função NAH, onde os grupos aromáticos ou heretoaromáticos foram escolhidos para formar uma grande variedade estrutural. Esta diversidade pode implicar numa melhor compreensão das contribuições para a atividade pretendida. Desta série foram selecionados os compostos LASSBio-1515 e LASSBio-1601 (Figura III.3).

O LASSBio-1515 é análogo direto do LASSBio-294. Já o LASSBio-1601 consiste no composto mais simples, ideal para realização de correlações estruturais. As demais séries, possuem compostos análogos de LASSBio-294, homólogos inferiores de LASSBio-1515.

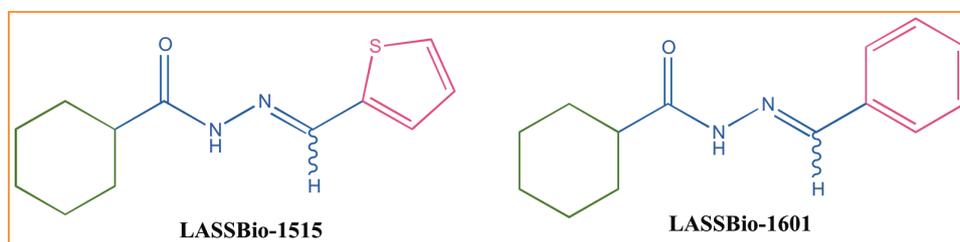


Figura III.3 – Fórmula química dos compostos ciclohexil-*N*-acilidrazônicos planejados a partir de LASSBio-294. A função NAH está destacada em azul, a cicloexila ligada à região amídica em verde e a arila, ligadas à região imínica, em rosa.

A partir da estrutura de LASSBio-1515, derivado ciclohexil-NAH diretamente relacionado com LASSBio-294, foi desenhado o composto metilado LASSBio-1733, apresentado na Figura III.4. Esta nova modificação estrutural pode, segundo dados da literatura (BARREIRO *et al.*, 2011a; KÜMMERLE *et al.*, 2009), vir a ser determinante na otimização das atividades farmacológicas dos compostos e, sobretudo, fornecer aspectos conformacionais importantes para a compreensão dos perfis farmacológicos da série de compostos estudados.

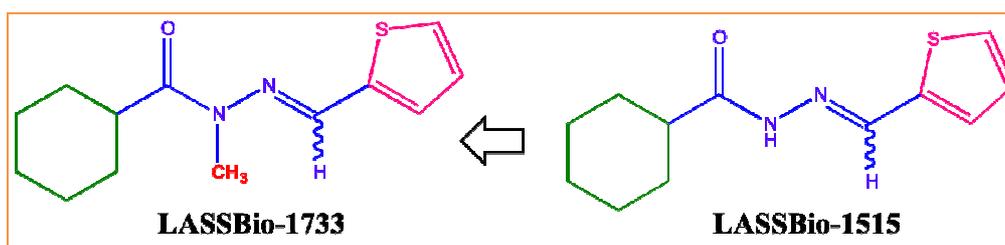


Figura III.4 – Modificação estrutural de LASSBio-1515 através do efeito da metila no planejamento de LASSBio-1733. A função NAH está destacada em azul, a cicloexila ligada à região amídica em verde e a tiofenila, ligada à região imínica, em rosa. A metila encontra-se destacada em vermelho.

O grupamento metila é muito importante para o reconhecimento molecular de compostos orgânicos endógenos e exógenos, por bioreceptores. Embora ele só participe nas interações de dispersão de London, que é o tipo mais fraco de todas as interações intermoleculares, o grupamento metila apresenta efeitos estereoeletrônicos em micromoléculas e biomacromoléculas, levando assim a diversos efeitos biológicos, incluindo a seletividade entre bioreceptores, aumento de potência e proteção contra o metabolismo da enzima (BARREIRO *et al.*, 2011a). Ciente da importância do grupamento metila no reconhecimento molecular, Wermuth (WERMUTH, 2008) afirma:

"O grupamento metila, tantas vezes considerado como quimicamente inerte, é capaz de alterar profundamente as propriedades farmacológicas de uma molécula."

Assim, fica evidenciada a importância de se realizar uma investigação quanto à estrutura tridimensional de compostos metilados como o LASSBio-1733.

LASSBio-129, apresentado na Figura III.5, é um protótipo anti-agregante plaquetário, com atividade significativa (ORMELLI, 1999), que foi selecionado para o presente estudo por se tratar de um isómero de LASSBio-294, tendo um anel furânico em lugar do anel tiofênico de LASSBio-294. Pretende-se avaliar desta forma a contribuição, em nível estrutural, do isosterismo.



Figura III.5 – Fórmula química do LASSBio-129 – derivado NAH sintetizado como isómero de LASSBio-294. A função NAH está destacada em azul, a benzodioxola ligada à região amídica em verde e o anel furânico, ligado à região imínica, em rosa.

Desta forma, espera-se que informações estruturais relevantes, no que tange aos aspectos conformacionais destes compostos NAH, sejam agregadas e contribuam para uma melhor compreensão da relação estrutura-propriedades.

III.1.1 – Caracterização das Amostras

O primeiro passo de qualquer análise consiste em determinar a pureza da amostra, isto é, determinar se a amostra é constituída de uma única substância ou se contém outras substâncias.

O grau de pureza das amostras selecionadas para o presente estudo foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou análise elementar².

LASSBio-294: Pureza: 97,71% [CLAE; T.R. = 4,25 min; CH₃CN:H₂O 6:4].

LASSBio-129: Pureza: 99,81% [CLAE; T.R. = 3,73 min; CH₃CN:H₂O 6:4].

² Avaliação realizada pelas alunas do LASSBio Marina Amaral Alves e Juliana Vilachã e apresentada por Tiago Fernandes da Silva, em sua dissertação de mestrado (SILVA, 2012).

LASSBio-1515: Análise Elementar Calculada: C: 60,26; H: 6,90; N: 25,55.
Determinada: C: 59,92; H: 7,37; N: 25,27.

LASSBio-1601: Análise Elementar Calculada: C: 63,92; H: 6,56; N: 8,28.
Determinada: C: 63,44; H: 6,37; N: 8,28.

LASSBio-1733: Pureza: 99,75% [CLAE; T.R. = 12,43 min; CH₃CN:H₂O 7:3].

Estes parâmetros atestam que as amostras avaliadas encontram-se com pureza considerada adequada.

Mesmo tendo apresentado pureza adequada, na avaliação feita por análise elementar ou CLAE, foram observadas duplicações de sinais nos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)³ de ¹H e ¹³C dos derivados NAH sintetizados. A fim de compreender e exemplificar este fenômeno foi selecionado o derivado LASSBio-1601, que apresenta a fenila na subunidade imínica da função NAH, para ser avaliado. Este composto foi escolhido por sua simplicidade estrutural.

A duplicação dos sinais pôde ser evidenciada no espectro de RMN ¹H utilizando como solvente o dimetilsulfóxido-deuterado [DMSO-d₆]. Os sinais referentes aos hidrogênios amídico [HNC=O], imínico [HC=N] e do hidrogênio do carbono terciário da cadeia cicloexila aparecem com duplicações, bastante evidentes, como mostrado na Figura III.6. Observou-se a duplicação de todos os sinais do carbono de LASSBio-1601 nos espectros de RMN de ¹³C, destacado no experimento de APT (*Attached Proton Test*) (Figura III.7), que diferencia os sinais referentes aos carbonos em fase negativa e positiva segundo números ímpares ou pares de hidrogênios ligados (YONEDA, 2007).

Neste sentido, a duplicação de sinais observada em espectro de RMN pode ser decorrente da existência de mistura de diastereoisômeros [*E* e *Z*], ou da existência de equilíbrio conformacional devido à natureza cicloalquila da subunidade acila da função NAH, ou ainda devido ao equilíbrio conformacional do grupamento amídico *s-cis* e *s-trans* em solução, conforme esquematizado na Figura III.8 (SILVA, 2012).

³ Pode ser indicativo da presença de algum tipo de mistura.

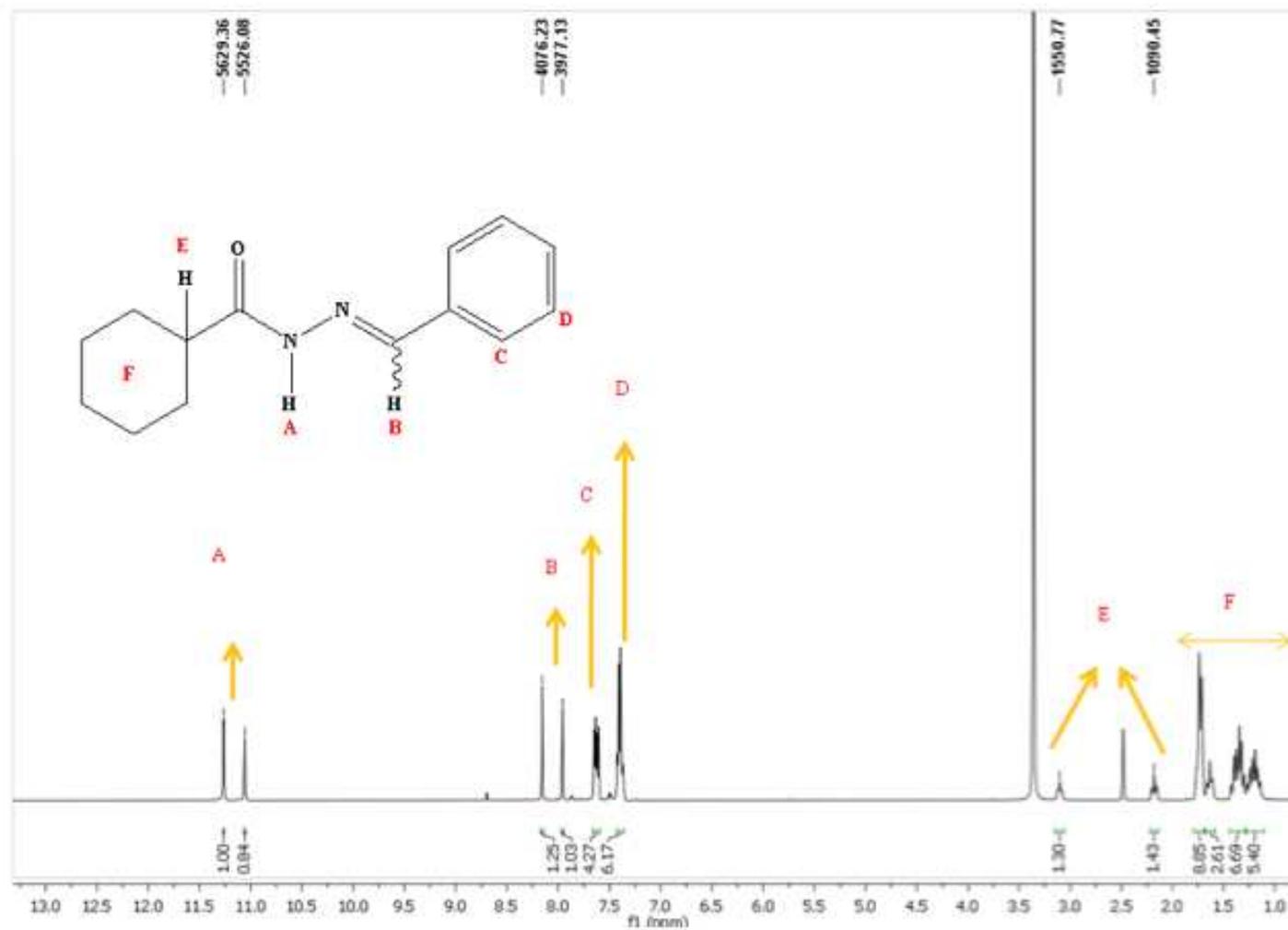


Figura III.6 – Espectro de RMN ¹H do LASSBio-1601 (200 MHz, DMSO- d₆/TMS). Duplicação dos sinais referentes aos hidrogênios amídico (A), imínico (B) e ao hidrogênio do carbono terciário da cadeia cicloexila (E) (SILVA, 2012).

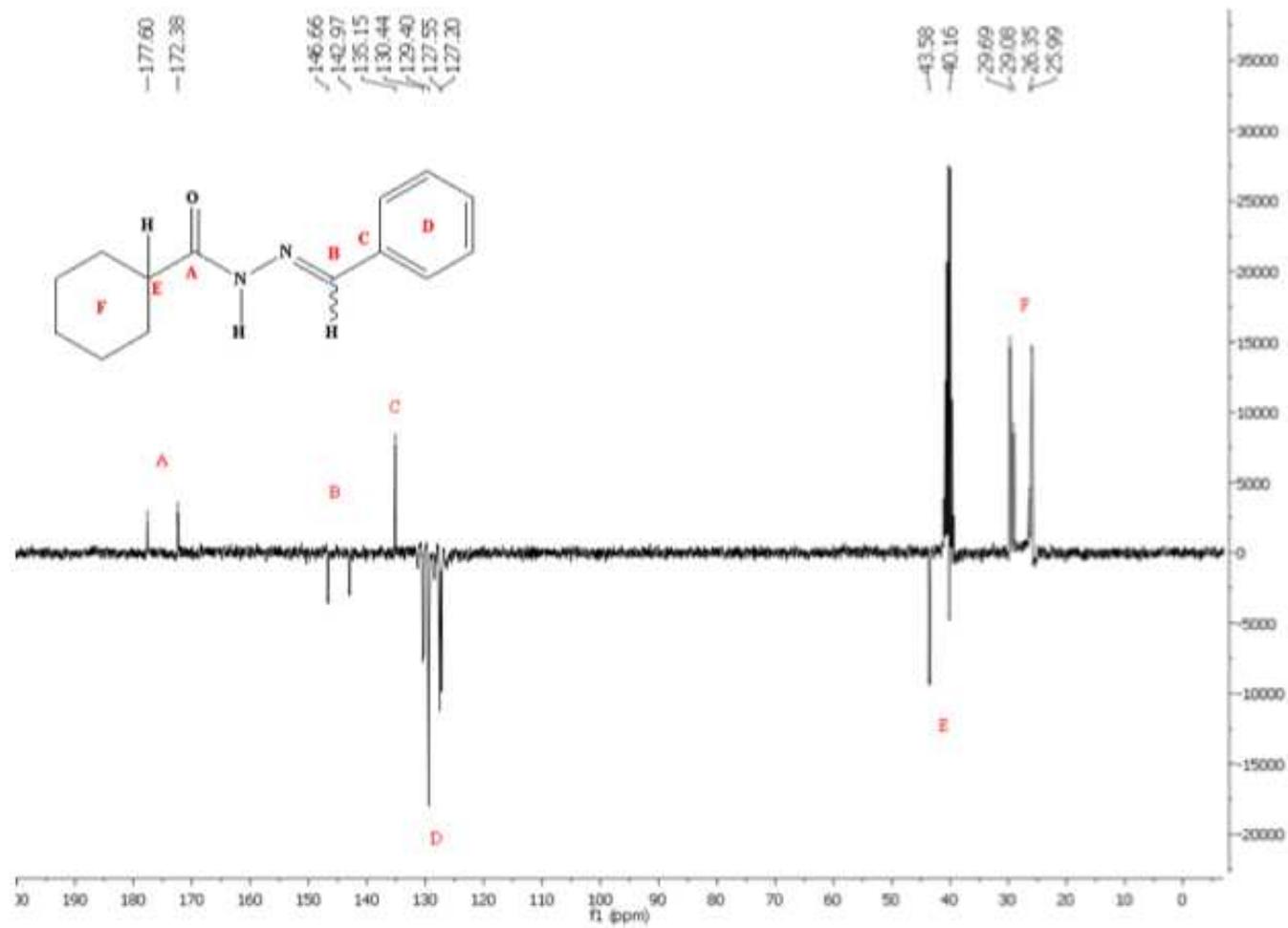


Figura III.7 - Espectro de RMN de ^{13}C do LASSBio-1601 (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6/\text{TMS}$). Carbonos monossustituídos e trissustituídos em fase negativa (SILVA, 2012).

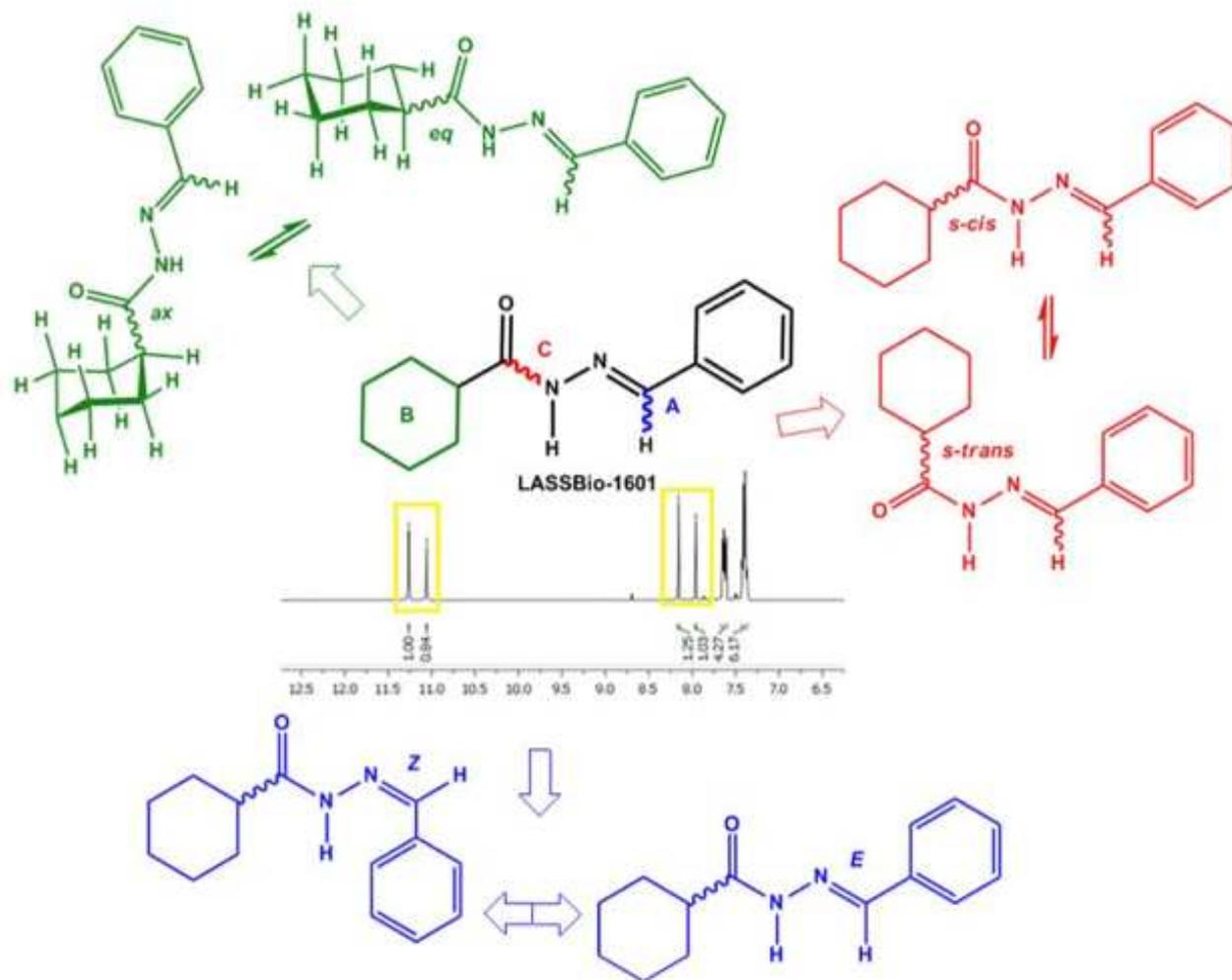


Figura III.8 – Possíveis hipóteses para a duplicação de sinais observada em RMN de LASSBio-1601 (SILVA, 2012).

A partir das hipóteses apresentadas recorreu-se à *Difração de Raios X por Policristais* (DRXP) para determinar de maneira inequívoca a configuração relativa de LASSBio-1601, bem como das outras amostras apresentadas nesta tese, que de semelhante modo apresentaram duplicação de sinais em seus espectros de RMN, caracterizando assim a possibilidade da existência de mistura diastereoisomérica. Deste modo, com o uso da técnica de DRXP, estes (e outros) aspectos estruturais dos compostos (em fase sólida) que serão avaliados poderão ser esclarecidos.

III.2 – DRXP: Procedimentos Experimentais

A preparação da amostra é uma etapa fundamental em qualquer técnica experimental. No caso da DRXP, esta etapa pode influenciar na qualidade das medidas e conseqüentemente nos resultados que serão obtidos a partir da análise dos dados. Uma má preparação da amostra pode promover no perfil de difração, por exemplo, deslocamento dos picos, variação nas intensidades, entre outros.

Cada amostra foi cuidadosamente avaliada quanto a necessidade de ser triturada. Algumas amostras foram preparadas através de uma cuidadosa moagem manual (Figura II.9). Para isso utilizamos gral e pistilo de pedra ágata e uma peneira granulométrica de ~200 mesh. Em alguns casos a medida de DRXP foi realizada sem moagem prévia.



Figura III.9 – Amostra sendo preparada em gral e pistilo de pedra ágata e acomodada em um ependorfe.

As medidas experimentais foram realizadas nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios X – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF);
- Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais (LCCEM) – Universidade Federal do ABC;

- Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

III.2.1 – Medidas experimentais realizadas no CBPF

As medidas experimentais de DRXP realizadas no CBPF, no Rio de Janeiro, foram efetuadas usando o modo de reflexão num difratômetro comercial X'Pert Pro Panalytical, com tensão de 40 kV e corrente elétrica de 40 mA. As medidas foram realizadas com a radiação Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e o perfil de difração foi coletado varrendo a região de 2θ de 4° a 50° , com passo angular de $0,01^\circ$ e tempo de contagem de 40s/passos. Na ótica incidente o módulo usado foi o *Fixed Divergence Slit* (FDS) com máscara de 10mm, fendas soller de 0,04 rad e fenda de divergência de 1° . Além disso, foram usados um monocromador de grafite e uma fenda anti-dispersão de 1° . Os dados foram registrados por um detector de estado sólido, X'Celerator. As fendas são usadas para ajustar a largura do feixe, enquanto a máscara ajusta a altura.

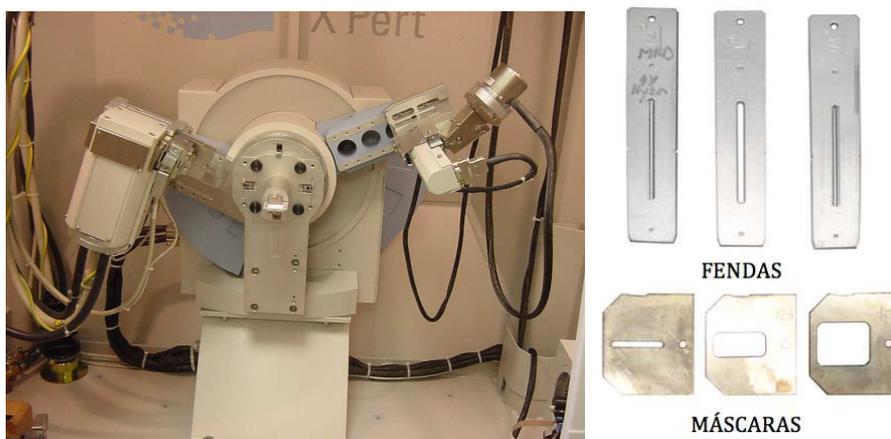


Figura III.10 – Difratômetro X'Pert Pro (Panalytical) do Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios X do CBPF e exemplos de fendas e máscaras usadas no alinhamento do feixe.

III.2.2 – Medidas experimentais realizadas no LCCEM/UFABC

O Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materias da UFABC conta com um equipamento de difração de raios X da marca STOE, modelo STADI P que trabalha em modo de alta resolução.

Dados de difração de raios X por policristais foram coletados utilizando radiação $\text{CuK}\alpha_1$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), filtrada por um monocromador curvo de Ge(111) no feixe primário, tensão de 40 kV e corrente de 40 mA. O difratômetro possui um raio primário de 260 mm e um raio secundário de 191 mm. A geometria utilizada foi a de transmissão (Figura III.11), com as amostras acondicionadas entre duas folhas de celulose-acetato (diacetato), comercialmente conhecidas como "Ultraplan", com espessura de 0,014 mm e densidade de $1,3 \text{ g/cm}^3$. O porta-amostras, com um orifício de diâmetro de 3 mm, foi mantido em rotação durante a aquisição dos dados, de modo a provar um maior número de cristalitos banhados pelo feixe de raios X. Um detector unidimensional "silicon strip", modelo Mythen 1K, da marca DECTRIS, foi utilizado na coleta dos dados. Os dados foram coletados em passos de $0,015^\circ$, de 2° a 60° , com tempo de integração de 50 s a cada $1,05^\circ$.



Figura III.11 – (a) Difratômetro da marca STOE, modelo STADI P, em geometria de transmissão; (b) destaque para o porta-amostra que é mantido em rotação durante a aquisição dos dados e; (c) amostra acondicionada entre duas folhas de celulose-acetato.

III.2.3 – Medidas experimentais realizadas no LNLS

As medidas de DRXP realizadas na linha D10B-XPD (FERREIRA, *et al.*, 2006) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas/SP, foram efetuadas após aprovação da proposta de pesquisa XPD-12474. Isso foi necessário devido à

quantidade muito pequena de amostra disponível para cada composto, o que inviabilizou as medidas por reflexão que, geralmente, necessitam de porta-amostras relativamente grandes. Para as medidas no LNLS, com radiação síncrotron, as amostras foram acondicionadas em capilares de vidro de 0,7mm (Figura III.12), o que também ajuda a reduzir o efeito de orientação preferencial dos cristalitos, efeito que deve ser minimizado no processo de determinação estrutural.

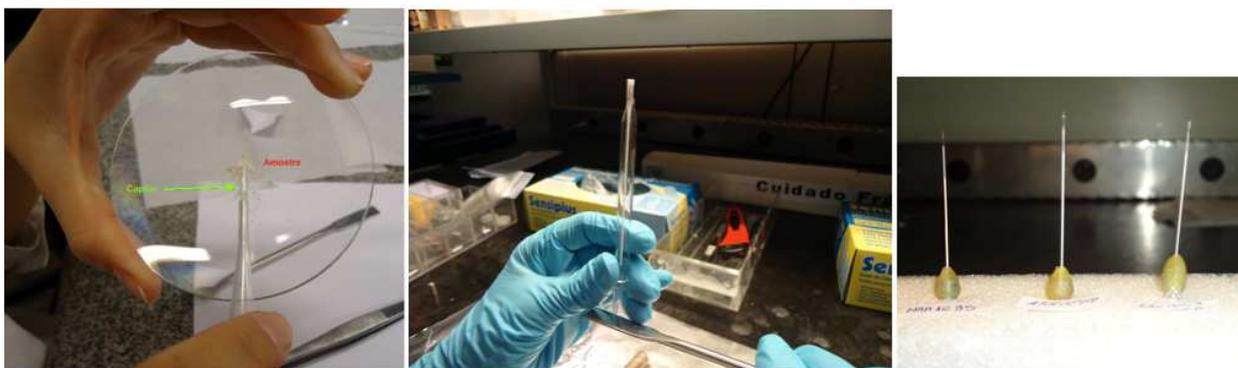


Figura III.12 – Acomodação das amostras em capilar de 0,7mm. Este procedimento ajuda a reduzir possíveis efeitos de orientação preferencial.

III.2.3.1 – A Linha de Luz D10B-XPD do LNLS

Denomina-se Linha de Luz a instrumentação que é acoplada ao anel de armazenamento de elétrons (Figura III.13). A estação experimental é instalada em cada linha de luz. Uma estação experimental inclui o difratômetro, no qual é colocada a amostra do material que se quer analisar, aparelho goniométrico, que permite posicionar a amostra para receber adequadamente a incidência da luz síncrotron e detectores de feixes de fótons espalhados ou transmitidos.

A linha D10B-XPD, está instalada no LNLS desde 2004. Essa linha opera na faixa dos Raios X com energia entre 4,5 – 15 keV. Utilizada em estudos de física do estado sólido, química e biologia, ela é dedicada a medidas de difração de pó de alta resolução/média intensidade ou alta intensidade/média resolução. No modo de alta resolução, cristais analisadores podem ser empregados, sendo este modo apropriado para solução e/ou refinamento de estruturas cristalinas onde é desejada mínima sobreposição entre picos de Bragg. No modo de alta intensidade não se emprega cristal analisador, ou alternativamente usa-se um analisador de Grafite (002). Este modo é normalmente utilizado em amostras com menor grau de perfeição cristalina, onde a

resolução instrumental não é um fator limitante nas larguras dos picos de Bragg (FERREIRA *et al.*, 2006).

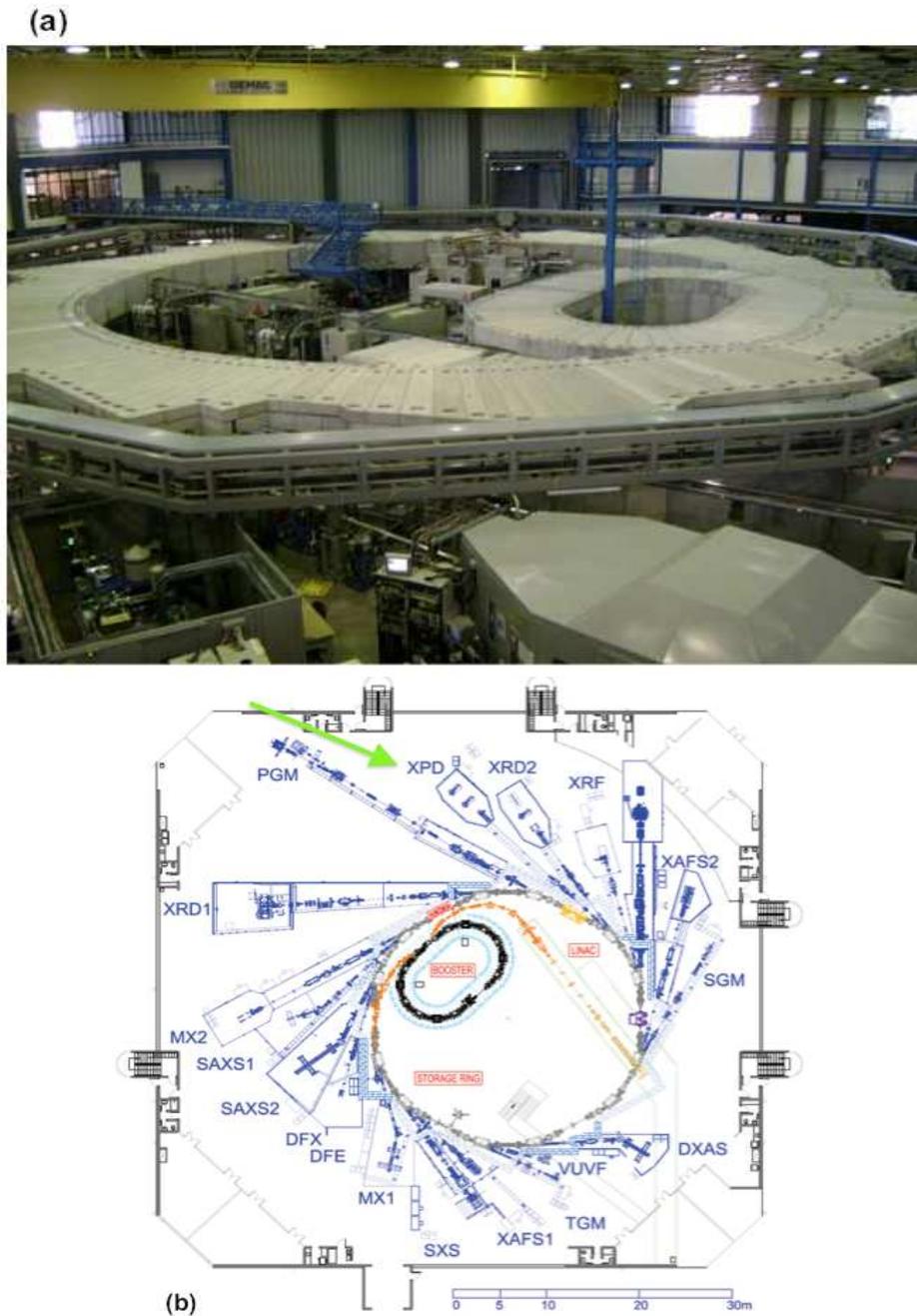


Figura III.13 – (a) Anel de armazenamento de elétrons do LNS e (b) esquema da disposição das linhas de luz ao longo do anel. Em destaque está a linha XPD (adaptado do website www.lnls.br/beamlines/).

Para que os fótons cheguem até a estação experimental, a linha possui uma série de dispositivos para a melhor utilização do feixe, e que estão apresentados na Figura III.14.

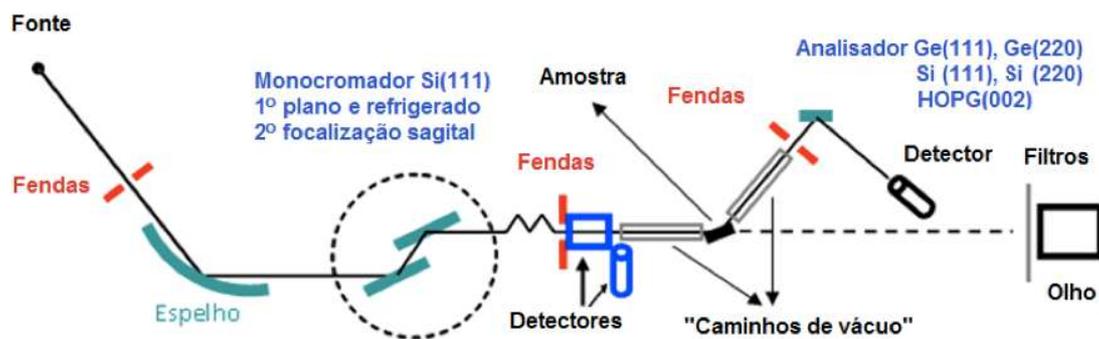


Figura III.14 – Setup experimental da linha D10B-XPD (FERREIRA, 2009)

Um espelho de vidro ULE (Ultra-Low Expansion) recoberto com ródio é usado para filtrar fótons de alta energia e focalizar/colimar o feixe. O ângulo de incidência entre o feixe e o espelho é de 4,5 mrad, o qual determina a energia de corte dos fótons (≈ 14 keV). O espelho está montado em uma câmara desenvolvida no próprio laboratório, e opera a uma pressão da ordem de 10^{-9} mbar, separado por duas janelas de Berílio entre o front-end e o monocromador.

O monocromador é do tipo duplo cristal de Si(111) com focalização sagital. O primeiro cristal é plano e refrigerado e recebe o feixe proveniente do espelho. O segundo cristal possui a focalização perpendicular ao plano de espalhamento, e serve para garantir o maior fluxo de fótons na posição da amostra. Esse sistema está montado junto ao goniômetro comercial da Huber. O primeiro conjunto de fendas instalado antes do espelho é chamado de fendas brancas, e sua função é limitar o tamanho do feixe incidente no espelho. O segundo conjunto de fendas está localizado após o monocromador, e sua função é determinar o tamanho do feixe na posição da amostra.

O Difratorômetro Huber é o principal elemento da linha, está instalado na cabana experimental (Figura III.15) e foi desenvolvido para operar em dois modos:

1. alta resolução, com cristais analisadores quase perfeitos;
2. alta intensidade e média resolução, sem cristais analisadores, ou com analisador de grafite pirolítico (002).

Seu braço pode operar em condições normais até um valor de 2θ de 150° . No modo de alta resolução normalmente são utilizados cristais analisadores de Ge(111), Ge(220) ou Si(111). Este é particularmente o modo utilizado para o refinamento de estruturas cristalinas, onde possa existir a sobreposição de picos de Bragg.

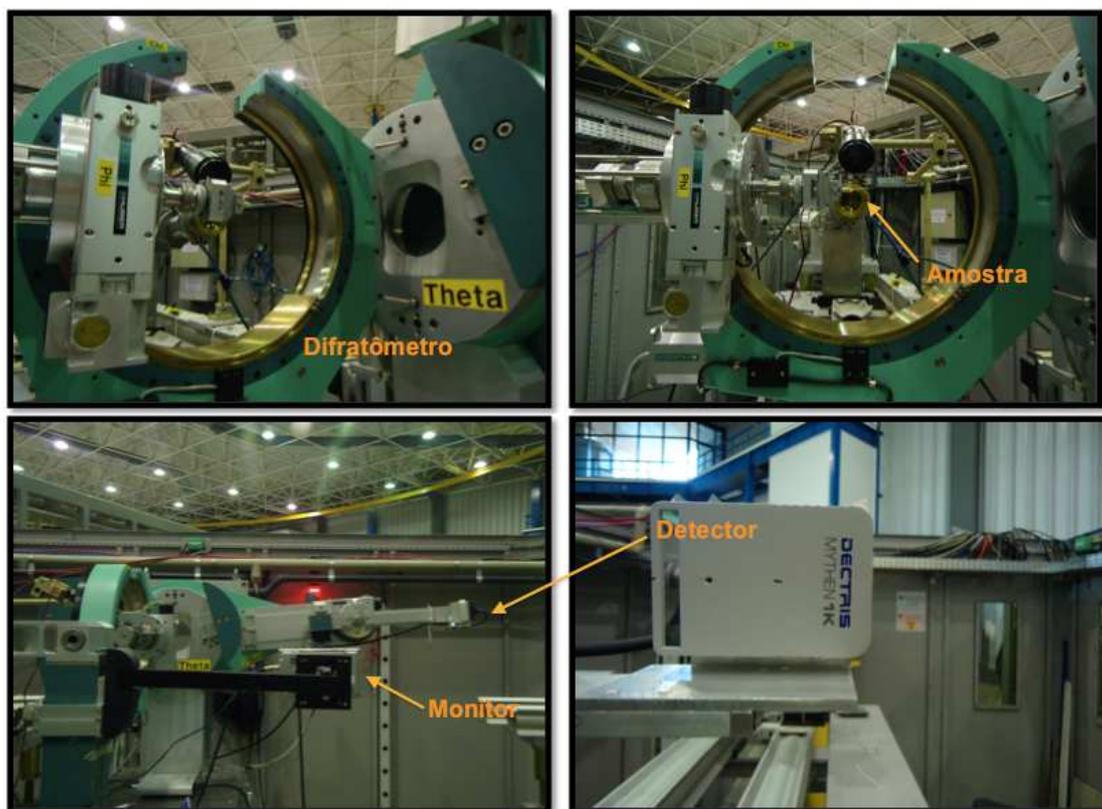


Figura III.15 – Visão geral dos equipamentos utilizados na linha XPD do LNLs.

Os detectores de radiação são monitores utilizados na contagem da radiação incidente. Nas medidas realizadas no LNLs, foi usado o Mythen 1K, da Dectris, que é um detector linear. A vantagem deste sistema de detecção é que se pode obter excelentes estatísticas de contagem, qualidade e rapidez na aquisição dos dados e operação simples.

O “olho mágico” é composto por uma câmera de vídeo CCD de alta sensibilidade aos raios X, que permite visualizar o feixe em tempo real. Sua função é auxiliar no ajuste do monocromador e também auxiliar no alinhamento da amostra antes de cada medida (FERREIRA, 2009).

A Tabela III.1 mostra as especificações usadas, na calibração da energia do monocromador da linha XPD.

Os dados foram coletados varrendo a região de 2θ de 5° a 80° , com passo angular de $0,005^\circ$ e tempo de contagem de 30s/passos. É importante destacar que o tempo de contagem foi ajustado de acordo com o fluxo de fótons ao longo do dia.

Tabela III.1 – Dados da calibração do Monocromador.

Calibração da Energia do Monocromador – Linha XPD		
Cristal: Si(111)		$d_{111} = 3,1355 \text{ \AA}$
Reflexão Usada: Si		
Reflexão	θ medido ($^\circ$)	FWHM ($^\circ$)
111	14,31506	0,03181
333	47,88166	0,04358
$E = 7,99625 \text{ keV}$	$\lambda = 1,55054 \text{ \AA}$	
$\Delta E/E = 0,058\%$	$\Delta E = 4,653 \text{ eV}$	$\Delta\theta = 573,757 \text{ \mu rad}$
Obs: Sem analisador e sem fendas verticais após a amostra.		
Usando o detector Mythen.		

III.3 – Metodologia Utilizada no Processo de Determinação das Estruturas Cristalinas

A tarefa de determinar a estrutura cristalina dos cinco compostos avaliados neste trabalho foi cumprida seguindo as seguintes etapas:

- **Indexação e Determinação Estrutural**

O programa DASH (DAVID e SHANKLAND, 2006) foi usado para indexar os perfis de DRXP, bem como para a determinação das estruturas cristalinas de todos os compostos. Um filtro “*Bayesian high-pass*”, implementado no DASH (DAVID e SIVIA, 2001), foi utilizado para estimar o background. As 20 primeiras reflexões foram individualmente ajustadas e usadas no procedimento de indexação por meio da rotina DICVOL91 (BOULTIF e LOUË, 1991), também implementada no DASH. É nesta etapa que o sistema cristalino e os valores iniciais dos parâmetros de rede são definidos.

Depois que os parâmetros de cela unitária são avaliados, aproximadamente, realiza-se um ajuste de Pawley (PAWLEY, 1981) e o grupo espacial é determinado. Uma comparação entre o volume calculado da cela unitária (levando em consideração os volumes individuais médios dos átomos) e o volume estimado na indexação (HOFMANN, 2002), sugere a quantidade de moléculas por cela unitária e na unidade assimétrica (essas quantidades são denotadas pelas letras Z e Z', respectivamente). As intensidades integradas bem como suas correlações são extraídas por meio do

refinamento Pawley. A convergência deste refinamento é avaliada por meio do valor de χ^2 .

Todas as informações encontradas através do programa DASH são então utilizadas em conjunto com a estrutura química (do composto em questão) no processo de determinação da estrutura cristalina, por meio de um algoritmo de otimização global, neste caso, o “*simulated-annealing*”⁴ (AARTS e KORST, 1991; VAN LAARHOVEN e AARTS, 1992). Durante esse o processo é permitido variar parâmetros que descrevam as coordenadas de posição, orientação molecular e os ângulos de torção. Em seguida a melhor solução encontrada no processo de “*simulated-annealing*” é considerada no refinamento pelo Método de Rietveld (RIETVELD, 1967; RIETVELD, 1969).

- **Refinamento da Estrutura através do Método de Rietveld**

O processo de refinamento foi realizado usando o programa *Topas Acadêmic v.4.1 e v.5* (COELHO, 2007 e 2012). O “*background*” é ajustado com cerca de 20 termos do polinômio de Chebyshev e a assimetria dos picos é ajustada com o auxílio do modelo de Cheary e Coelho (CHEARY e COELHO, 1998a, 1998b) para divergência axial. A forma dos picos é modeladas por meio da abordagem “*Double-Voigt*” (COELHO, 2007; BALZAR, 1993) com a forma anisotrópica dos picos sendo ajustada usando harmônicos esféricos (JÄRVINEN, 1993), assim como o efeito de orientação preferencial dos cristalitos.

O comprimento das ligações, ângulos e a planaridade dos anéis são restringidos usando os valores médios obtidos a partir do *MOGUL Cambridge Structure Databank System* (BRUNO *et al.*, 2004), uma biblioteca de geometrias intramoleculares. Todas as distâncias de ligação e ângulos devem estar em conformidade com os valores encontrados no banco de dados *Cambridge Structural Database* (CSD) (ALLEN, 2002). Deslocamentos atômicos isotrópicos (B_{iso}) são restringidos para ter o mesmo valor para todos os átomos de não-hidrogenóides. Para os átomos de hidrogênio, os valores de B_{iso} são limitados em 1,2 vezes maiores do que os valores de B_{iso} dos

⁴ Baseia-se em simulações da evolução do equilíbrio térmico de materiais, proposto por Metropolis e colaboradores em 1953 (METROPOLIS *et al.*, 1953); Utiliza o Método de Monte Carlo para gerar sequências de estados do material caracterizados pelas posições de suas partículas.

respectivos átomos aos quais eles se ligam. Suas coordenadas fracionárias são refinadas restringindo as distâncias entre eles e os átomos que estão ligados de acordo com os valores encontrados na literatura para dados de difração de raios X que, em seguida, são modificados no programa Mercury (MACRAE *et al.*, 2008) conforme os valores: C–H = 0,96 Å, N–H = 0,87 Å e O–H = 0,99 Å.

A convergência do refinamento é avaliada através dos valores do indicador de qualidade do ajuste (χ^2) e dos fatores R (R_{Bragg} , R_{wp} e R_{exp}).

Vale lembrar que, a fim de verificar a consistência dos resultados obtidos para a escolha do grupo espacial, parâmetros de cela unitária, distâncias de ligação, ângulos e torções, é utilizado o programa PLATON (SPEK, 2003).

CAPÍTULO IV

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitas vezes, tem-se enfrentado no LASSBio a dificuldade de se produzir monocristais de tamanho, qualidade e estabilidade suficientes para que esses sejam avaliados com o uso da DRX por monocristal. Diante desta dificuldade a DRX por policristais tem se mostrado uma poderosa e adequada ferramenta para a análise de compostos bioativos, candidatos a novos fármacos e também para determinar as estruturas desconhecidas.

Neste capítulo, serão apresentados os resultados que evidenciarão que a técnica de DRXP é de grande utilidade para a análise estrutural de compostos candidatos a protótipo de novos fármacos, com a grande vantagem de ser realizável independentemente de se ter um monocristal, bastando apenas que a amostra seja cristalina. A metodologia apresentada na seção III.3 foi executada no processo de determinação estrutural dos cinco compostos selecionados para este trabalho e os resultados obtidos serão apresentados e discutidos a partir de agora.

IV.1 – LASSBio-294

O LASSBio-294 é um composto bioativo, sintetizado a partir do produto natural safrol (Figura IV.1), já bem conhecido e amplamente estudado no LASSBio e fez parte do contexto desta tese com o objetivo de evidenciar a utilidade da DRXP no estudo estrutural de novos compostos sintetizados no LASSBio, visto que este composto já tinha sua estrutura determinada por difração de raios X de monocristal (KÜMMERLE *et al.*, 2009). Sendo assim, a determinação da estrutura cristalina deste composto por meio da DRX por policristais poderia validar, perante o LASSBio, adequadamente esta técnica.

Os dados de DRXP de LASSBio-294 foram coletadas no CBPF, num difratômetro convencional, conforme descrito na seção III.2.1 e com a colaboração do Professor Fabio Furlan Ferreira, da UFABC, a determinação da estrutura deste composto foi

possível. A partir desta determinação estrutural ficou evidenciada a possibilidade de se aplicar o mesmo procedimento para a análise dos outros compostos.

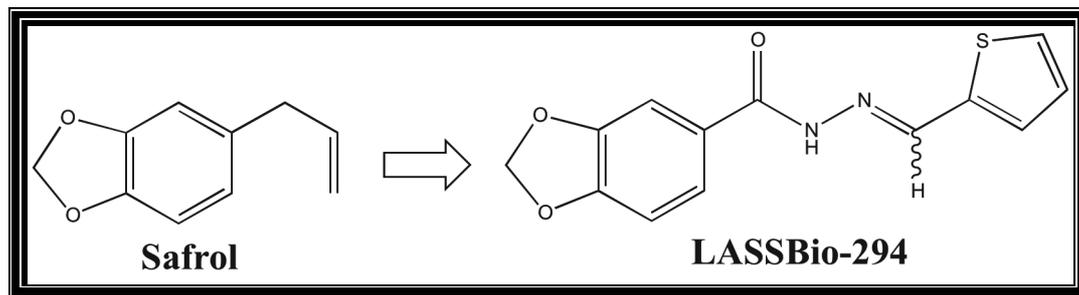


Figura IV.1 – LASSBio-294 – NAH derivada do Safrol .

IV.1.2 - Descrição da Estrutura Cristalina

LASSBio-294 (Figura IV.3) cristalizou-se num sistema monoclinico ($P2_1/c$). Sua estrutura cristalina é composta por quatro fórmulas unitárias por cela unitária ($Z=4$), acomodando uma molécula na unidade assimétrica ($Z'=1$), conforme pode ser observado na Figura IV.3. Dentro da cela unitária as moléculas são mantidas juntas por meio de interações de hidrogênio entre átomos $N(3)-H(8)\cdots O(4)^5$ ($D-H = 0,871(6)$ Å, $H\cdots A = 2,072(7)$ Å, $D\cdots A = 2,860(7)$ Å e $D-H\cdots A = 150,2(6)^\circ$; onde “D” e “A” são, respectivamente, o átomo doador e receptor de ligação hidrogênio), que estão representadas pelas linhas tracejadas (em azul) na Figura IV.4 (a), formando, assim, uma rede de agregados moleculares ao longo do eixo c .

Possíveis interações complementares do tipo “ π -stacking” entre a função NAH e o anel tiofênico ($C(13) - C(21) = 3,534$ Å) e também entre a função NAH e benzodioxola ($C(13) - O(17) = 3,386$ Å) podem ser visualizadas na Figura IV.4(b) e parece que estas interações também contribuem para o arranjo espacial tridimensional da cela unitária.

Os valores finais para os parâmetros de rede da cela unitária após o refinamento, o indicador de qualidade do ajuste (χ^2) e os fatores R ($R_{\text{Bragg}}/R_{\text{wp}}/R_{\text{exp}}$) estão mostrados na Tabela IV.1. O gráfico Rietveld, mostrando o bom acordo entre os dados experimentais e o perfil calculado pode ser observado na Figura IV.2. Os parâmetros estruturais atômicos obtidos a partir do refinamento Rietveld e que descrevem a posição de cada átomo dentro da cela unitária podem ser observados na Tabela IV.2.

⁵ Simetria: $-x, -y, -1-z$

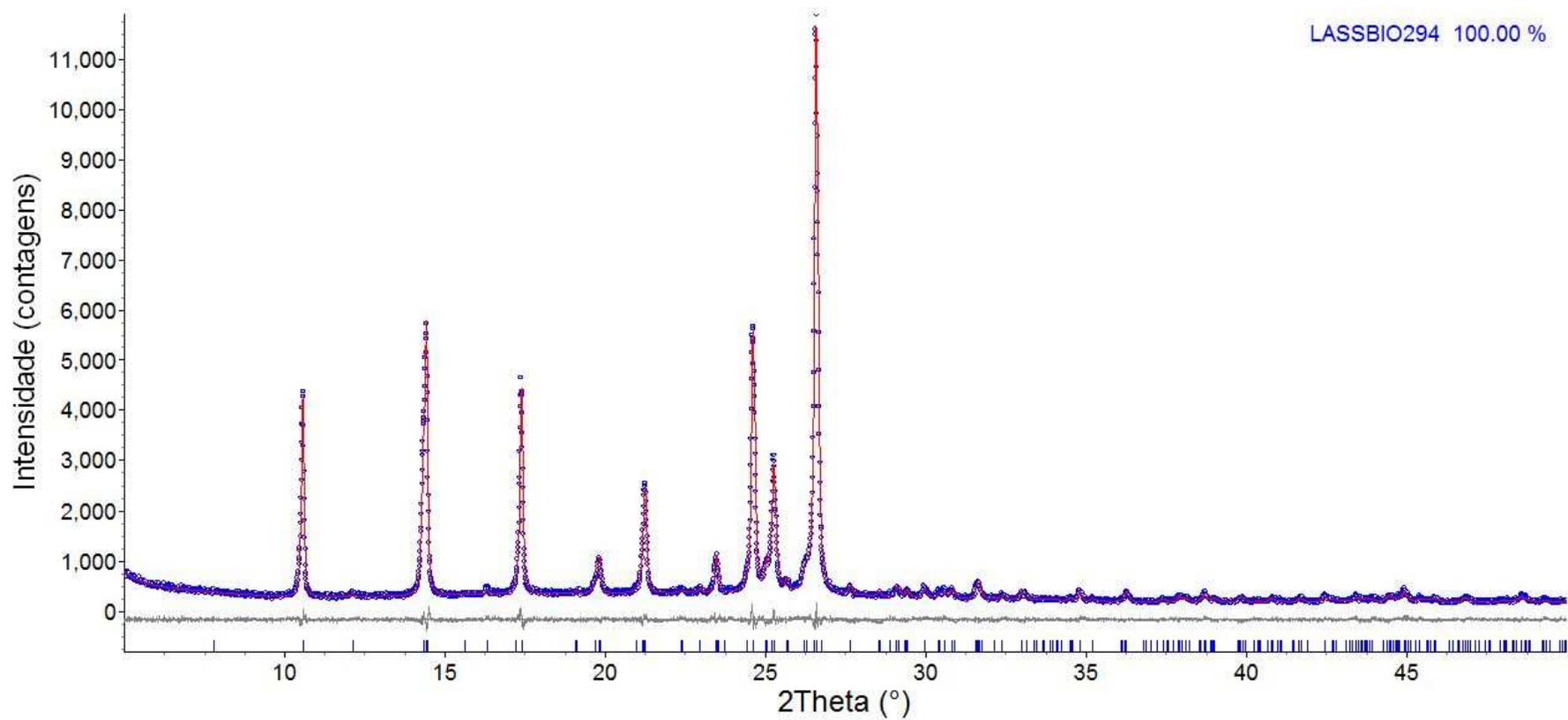


Figura IV.2 – Ajuste Rietveld para o LASSBio-294 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho). Este composto cristalizou-se num sistema monoclinico ($P2_1/c$).

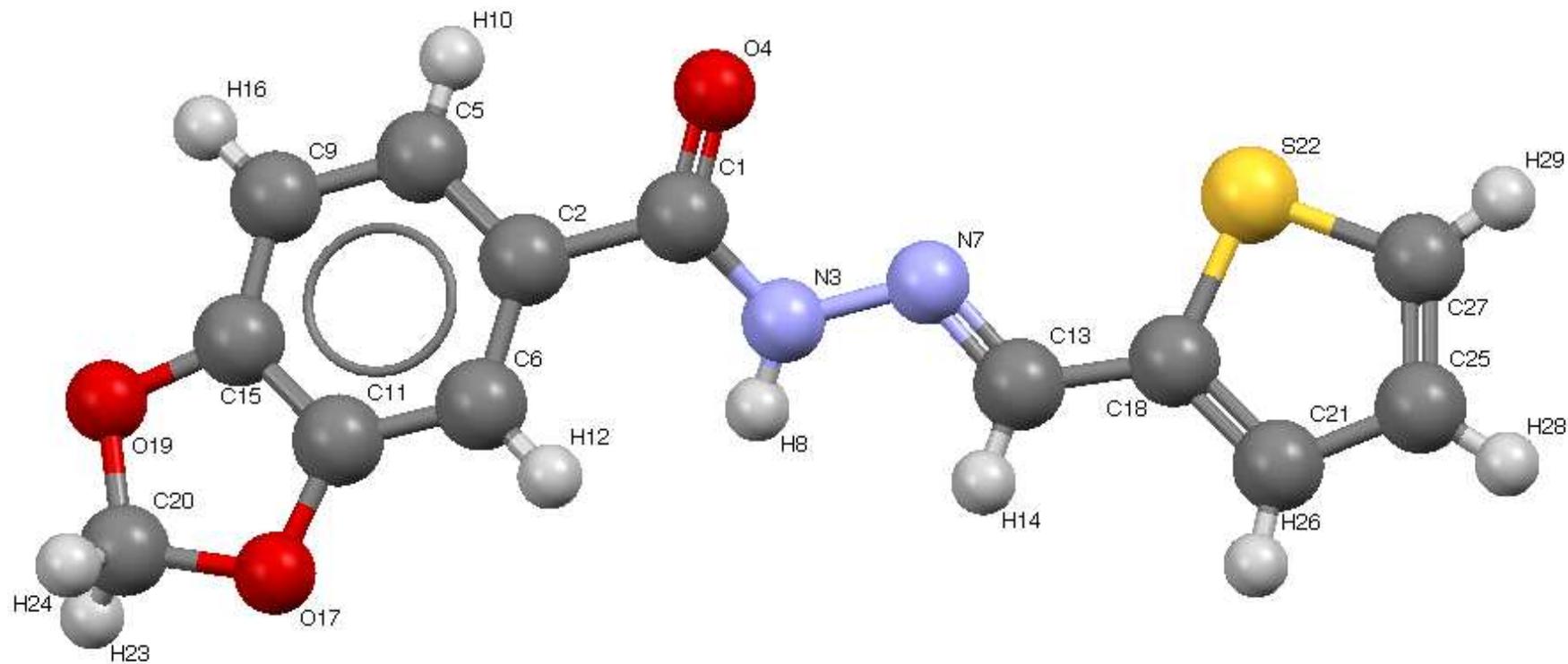


Figura IV.3 – Estrutura cristalina do LASSBio-294 evidenciando a configuração relativa *E* da dupla ligação imínica e indicando que o enxofre, S(22), do anel tiofênico e o oxigênio carbonílico, O(4), estão orientados na mesma direção.

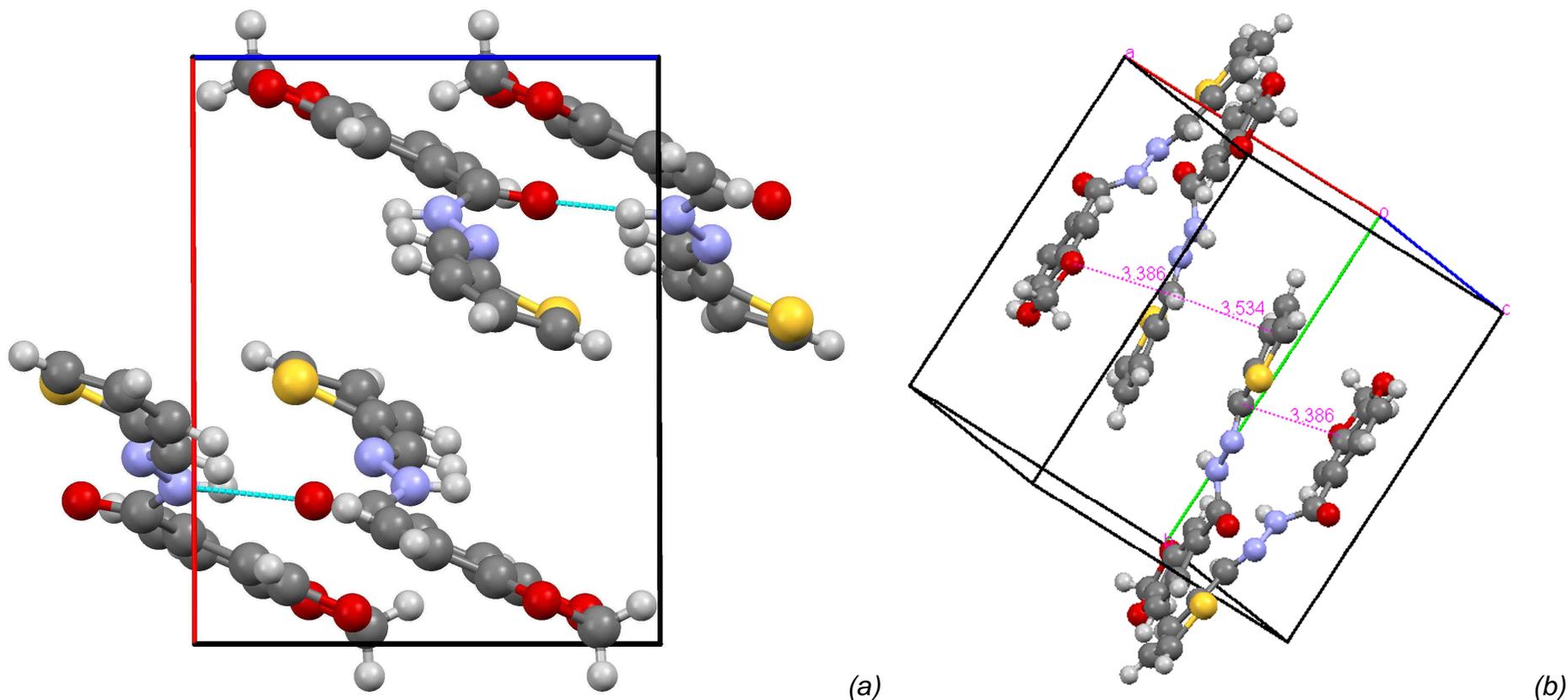


Figura IV.4 – (a) Representação da cela unitária de LASSBio-294 ao longo do eixo *b*, exibindo algumas ligações de H (em azul), formando assim uma rede de agregados moleculares em ao longo do eixo *c*. (b) Possíveis interações do tipo “ π -stacking” (linhas magenta) entre os átomos de C(13)-C(21) e C(13)-O(17), bem como suas distâncias em Å.

Tabela IV.1 - Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-294.

<i>Estrutura Cristalina</i>	
Nome do composto	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(tiofen-2-il-metileno) benzo[<i>d</i>][1,3]dioxola-5-carbohidrazida
Fórmula química	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₃ S
Peso molecular (g mol ⁻¹)	274,30
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i> (No. 14)
<i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	11,3413(3); 12,3573(4); 9,0158(3)
β (°)	89,821(2)
Volume (Å ³)	1263,55(7)
Z; Z'	4; 1
ρ _{calc} (g cm ⁻³)	1,4419(1)
μ (mm ⁻¹)	2,344
T (K)	298
<i>Coleta dos Dados</i>	
Difratômetro	X'Celerator Pro CuKα (tubo selado)
Monocromador	grafite
Comprimento de onda (Å)	1,54178
2θ faixa (°)	4 – 50
Passo angular (°)	0,01
Tempo por passo (s)	40
<i>Refinamento</i>	
R _{exp} (%)	4,646
R _{wp} (%)	5,590
R _{Bragg} (%)	0,697
χ ²	1,203
<i>d</i> -DW	1,507

Table IV.2 – Coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($U_{iso} = B_{iso}/8\pi^2$) de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-294.

Átomo	x/a	y/b	z/c	B_{iso} (Å ²)
S(22)	0,5533(4)	-0,0214(3)	-0,2819(5)	0,0879(2)
O(4)	0,7561(8)	0,3409(5)	-0,2424(6)	0,0879(2)
O(17)	0,9471(4)	0,5005(4)	0,3390(5)	0,0879(2)
O(19)	0,9261(4)	0,6756(4)	0,2463(5)	0,0879(2)
N(3)	0,7310(7)	0,2444(4)	-0,0355(5)	0,0879(2)
N(7)	0,6817(7)	0,1600(4)	-0,1132(6)	0,0879(2)
C(1)	0,7749(4)	0,3304(3)	-0,1122(4)	0,0879(2)
C(2)	0,8144(3)	0,4273(3)	-0,0209(4)	0,0879(2)
C(5)	0,8021(3)	0,5333(4)	-0,0757(4)	0,0879(2)
C(6)	0,8638(2)	0,4104(4)	0,1205(4)	0,0879(2)
C(9)	0,8385(2)	0,6231(4)	0,0094(5)	0,0879(2)
C(11)	0,8982(2)	0,4994(3)	0,2008(5)	0,0879(2)
C(13)	0,6730(8)	0,0699(4)	-0,0466(6)	0,0879(2)
C(15)	0,8861(3)	0,6020(3)	0,1473(5)	0,0879(2)
C(18)	0,6203(6)	-0,0247(3)	-0,1133(5)	0,0879(2)
C(20)	0,9713(9)	0,6126(4)	0,3686(7)	0,0879(2)
C(21)	0,6217(6)	-0,1285(4)	-0,0534(6)	0,0879(2)
C(25)	0,5687(7)	-0,2058(4)	-0,1485(6)	0,0879(2)
C(27)	0,5372(10)	-0,1601(4)	-0,2818(6)	0,0879(2)
H(8)	0,7337(7)	0,2433(4)	0,0610(5)	0,1055(3)
H(10)	0,7685(3)	0,5447(4)	-0,1721(4)	0,1055(3)
H(12)	0,8719(2)	0,3387(4)	0,1602(4)	0,1055(3)
H(14)	0,7020(8)	0,0648(4)	0,0531(6)	0,1055(3)
H(16)	0,8298(2)	0,6957(4)	-0,0267(5)	0,1055(3)
H(23)	0,9347(9)	0,6343(4)	0,4601(7)	0,1055(3)
H(24)	1,0549(9)	0,6231(4)	0,3753(7)	0,1055(3)
H(26)	0,6552(6)	-0,1459(4)	0,0413(6)	0,1055(3)
H(28)	0,5561(7)	-0,2803(4)	-0,1231(6)	0,1055(3)
H(29)	0,5092(10)	-0,2008(4)	-0,3652(6)	0,1055(3)

O ângulo de torção envolvendo os átomos de N(3)-C(1)-C(2)-C(5) foi -146,4 (5)°, sendo limitado entre -120° e -180°. Sob esta condição, a molécula está em uma conformação anticlinal(ac). Os ângulos de torção que envolvem os átomos C(1)-N(3)-N(7)-C(13), os átomos N(7)-C(13)-C(18)-C(21) e os átomos N(7)-N(3)-C(1)-C(2) foram, respectivamente, 160,2 (7)°, 171,4 (8)° e 172,7 ° (6)°, todos eles sendo limitados entre 150° e 180°. Neste caso, a molécula adota uma conformação + antiperiplanar (ap) para todos os ângulos de torção.

Desta forma, pode-se dizer que a técnica de DRXP foi imprescindível para caracterizar inequivocamente a configuração relativa *E* (Figura IV.3), da dupla ligação

C=N. O empacotamento da cela unitária (Figura IV.4) foi observado como resultado de interações intermoleculares de hidrogênio envolvendo a ligação peptídica da função *N*-acilidrazona dispostas alternadamente, bem como de eventuais interações dipolo-dipolo e π -stacking complementares.

A alta restrição conformacional ou planaridade do composto foi também exemplificada pelos ângulos diedros. Finalmente, heteroátomos da função *N*-acilidrazona e o enxofre do anel tiofênico orientados na mesma direção fornecem regiões de alta densidade de elétrons permitindo interações com outras entidades.

Todos os dados referentes à determinação da estrutura cristalina de LASSBio-294 foram depositados no “*Cambridge Crystallography Data Centre*”, o CCDC, sob o número de identificação 907702.

Levando em conta o objetivo de validar a técnica, frente ao LASSBio, a Figura IV.5 evidencia que a estrutura cristalina de LASSBio-294 apresenta as mesmas características estruturais, tanto quando foi determinada por meio da técnica de DRX por monocristal, quanto pela técnica de DRX por policristais. Assim, os resultados das duas técnicas foram confrontados e ficou evidente a viabilidade do uso da técnica de DRXP para estudos estruturais de compostos *N*-acilidrazônicos sintetizados no LASSBio.

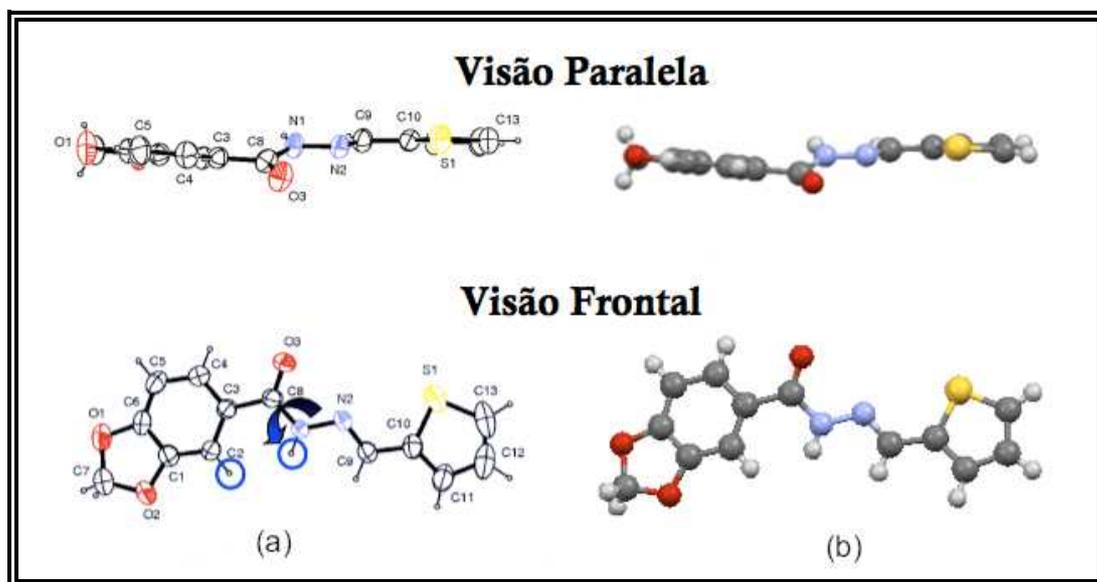


Figura IV.5 – Visão paralela e frontal da estrutura cristalina de LASSBio-294 (a) determinada a partir de dados de DRX por monocristal (KÜMMERLE et al., 2009) e (b) determinada a partir de dados de DRX por policristais evidenciando a equivalência entre as estruturas.

IV.2 – LASSBio-129

Ormelli (1999), em sua dissertação de mestrado, demonstrou que o composto LASSBio-129 apresenta uma potente atividade antiagregante plaquetária (ORMELLI, 1999). O composto LASSBio-129 na concentração de 100 μ M, foi capaz de inibir significativamente (72,1%) a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (200 μ M) em plasma rico em plaquetas citratado de coelho (COSTA, 2008). Este composto é um isómero de LASSBio-294 e eles diferem entre si apenas por um anel furânico em lugar do anel tiofênico.

Com o intuito de ajudar a avaliar a contribuição do isosterismo, quanto aos aspectos conformacionais, para as atividades destes compostos é que dados de difração de raios X de pó, de LASSBio-129, foram utilizados para a determinação da estrutura cristalina do mesmo.

Os dados de DRXP deste composto foram coletados no Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais da Universidade Federal do ABC, em Santo André – SP, utilizando um difratômetro convencional da marca STOE, modelo STADI-P em alta resolução, conforme descrito na seção III.2.2.

IV.2.1 – Descrição da Estrutura Cristalina

LASSBio-129 (Figura IV.6) cristalizou-se no sistema ortorrômbico com grupo espacial $P2_12_12_1$. Os valores finais para os parâmetros de rede da cela unitária após o refinamento Rietveld foram: $a = 24,5603(11)$ Å, $b = 9,28285(27)$ Å, $c = 5,06822(16)$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ e $V = 1155,502(70)$ Å³. O gráfico Rietveld pode ser observado na Figura IV.7 e mostra o bom acordo entre os dados experimentais e o perfil calculado.

A estrutura cristalina de LASSBio-129 é composta por quatro fórmulas unitárias por cela unitária ($Z=4$), acomodando uma molécula na unidade assimétrica ($Z'=1$), conforme pode ser observado na Figura IV.8a.

Dentro da cela unitária as moléculas são mantidas juntas por meio de interações de hidrogênio entre átomos N(4)–H(20)···O(1)⁶ (D–H = 0,909(7) Å, H···A = 2,087(6) Å, D···A = 2,927(7) Å e D–H···A = 153,1(6)°; onde “D” e “A” são, respectivamente, o átomo doador e receptor de ligação hidrogênio), que estão representadas pelas linhas tracejadas (em azul) na Figura IV.8b, formando, assim, uma rede de agregados moleculares ao longo do eixo *c*. Eventuais interações intermoleculares de caráter complementar também podem estar contribuindo para o empacotamento da cela unitária, como mostra a Figura IV.8c.

Os valores finais para os parâmetros de rede da cela unitária após o refinamento, o indicador de qualidade do ajuste (χ^2) e os fatores R_{Bragg} , R_{wp} e R_{exp} (TOBY, 2006) estão listados na Tabela IV.3. Os parâmetros atômicos estruturais obtidos a partir do refinamento Rietveld e que descrevem a posição de cada átomo dentro da cela unitária podem ser observados na Tabela IV.4.

Os ângulos de torção envolvendo os átomos de N(7)–C(10)–C(13)–C(16), os átomos C(2)–N(4)–N(7)–C(10), os átomos N(4)–C(2)–C(3)–C(6) e os os átomos N(4)–N(7)–C(10)–C(13) foram, respectivamente, 165,9(6)°, 171,1(5)°, 150,9(5)° e -177,6(5)°, todos eles sendo limitados entre $\pm 150^\circ$ e 180° . Neste caso, a molécula adota uma conformação antiperiplanar (ap) para todos os ângulos de torção.

⁶ Simetria: *x*, *y*, -1+*z*

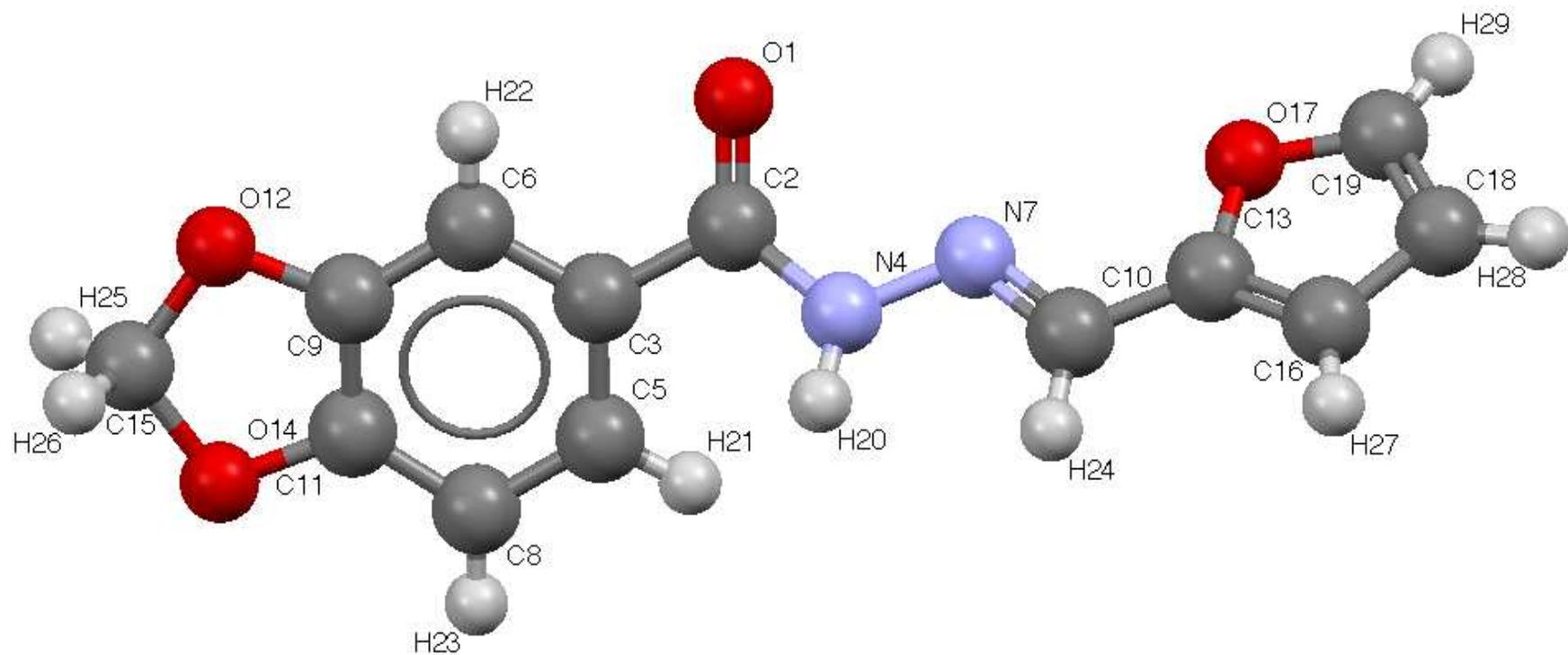


Figura IV.6 – Estrutura cristalina do LASSBio-129 evidenciando o caráter não planar da molécula e a configuração relativa *E* da dupla ligação C=N.

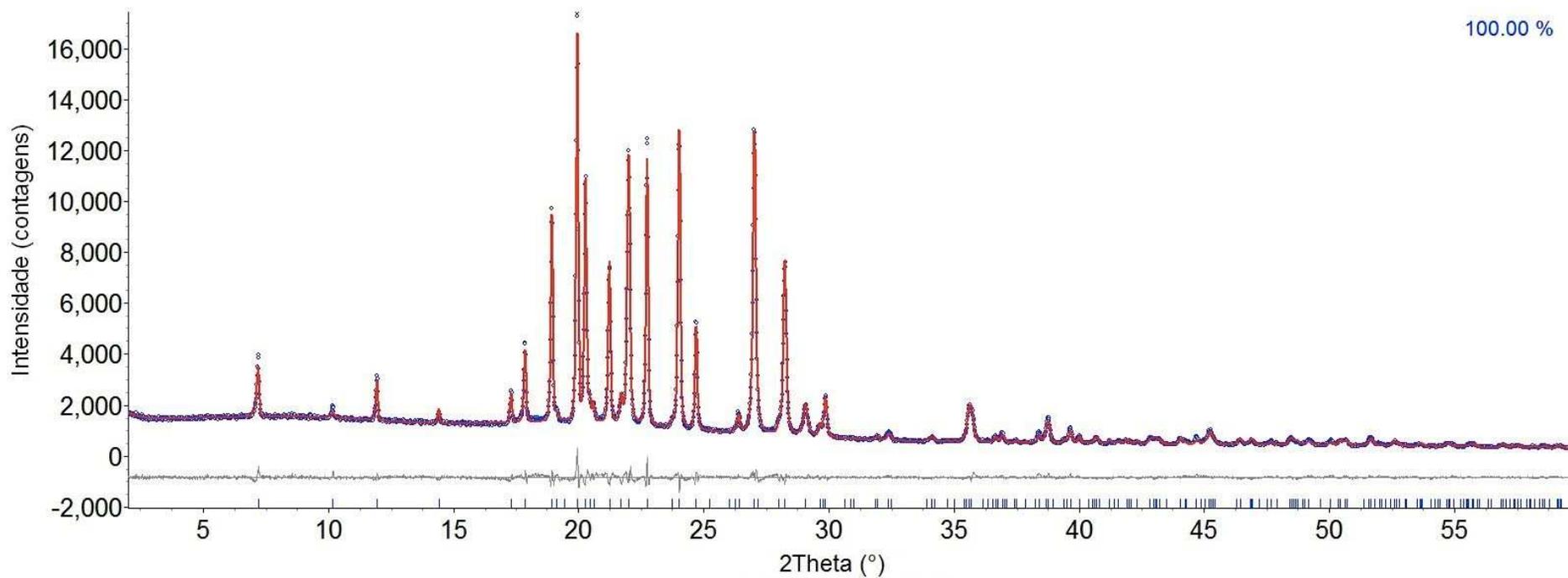


Figura IV.7 – Ajuste Rietveld para o LASSBio-129 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho). Este composto cristalizou-se no sistema ortorrômbico com grupo espacial $P2_12_12_1$.

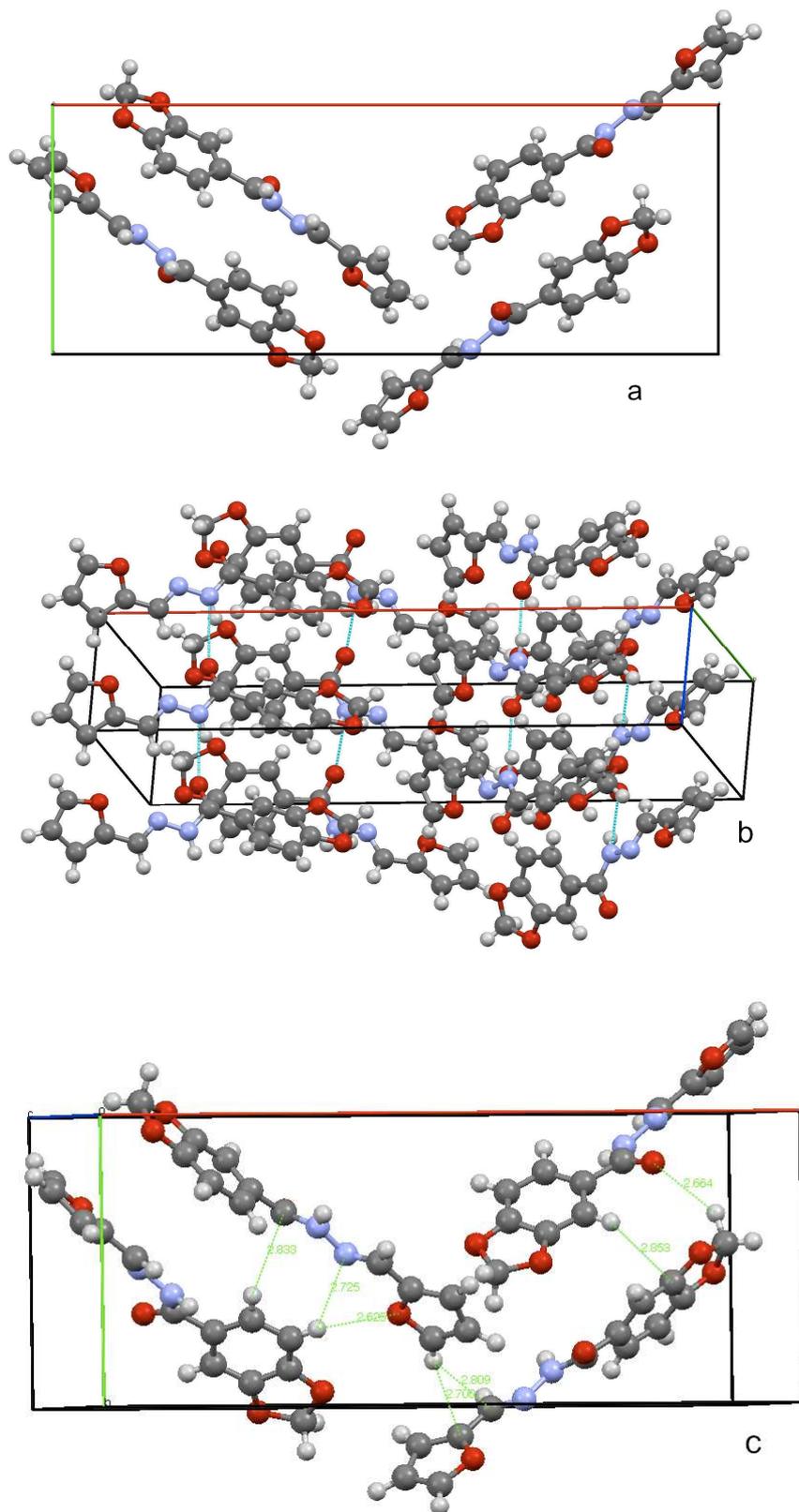


Figura IV.8 – (a) Empacotamento ao longo do eixo *b*; (b) Interações de hidrogênio (em azul) formando o agregado cristalino ao longo da rede; (c) interações complementares (verde) com as medidas das distâncias em Å.

Tabela IV.3 – Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-129.

<i>Estrutura Cristalina</i>	
Nome do composto	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(furan-2-il-metileno) benzo[<i>d</i>][1,3]dioxola-5-carbohidrazida
Fórmula química	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₄
Peso molecular (g mol ⁻¹)	258,23
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (No. 19)
<i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	24,5603(11); 9,28285(27); 5,06822(16)
α , β , γ (°)	90
Volume (Å ³)	1154,0(3)
<i>Z</i> ; <i>Z'</i>	4; 1
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1,4863(4)
μ (mm ⁻¹)	0,9490(2)
T (K)	298
<i>Coleta dos Dados</i>	
Difratômetro	STOE STADI-P CuK α ₁
Monocromador	Ge(111)
Comprimento de onda (Å)	1,54056
2 θ faixa (°)	2 – 60
Passo angular (°)	0,015
Tempo de integração (s/1,05°)	50
<i>Refinamento</i>	
R _{exp} (%)	2,872
R _{wp} (%)	5,308
R _{Bragg} (%)	1,381
χ^2	1,848
<i>d</i> -DW	0,428

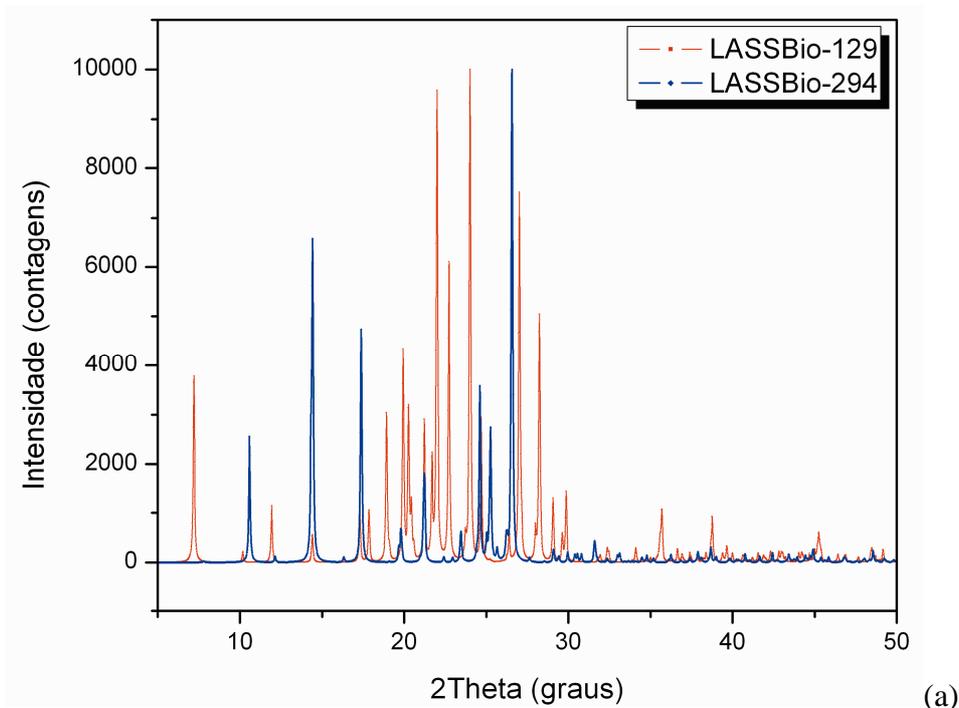
Table IV.4 – Coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($U_{iso} = B_{iso}/8\pi^2$) de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-129.

Átomo	x/a	y/b	z/c	U_{iso}
O1	0,32643(27)	0,32677(92)	0,63643(92)	0,0542(3)
C2	0,30412(16)	0,33563(63)	0,42528(68)	0,0542(3)
C3	0,25188(16)	0,26001(52)	0,38439(80)	0,0542(3)
N4	0,32966(21)	0,38670(67)	0,20311(86)	0,0542(3)
C5	0,21887(19)	0,30081(60)	0,1713(10)	0,0542(3)
C6	0,23540(19)	0,15266(58)	0,55872(98)	0,0542(3)
N7	0,37218(22)	0,48074(72)	0,23130(88)	0,0542(3)
C8	0,16905(19)	0,23423(66)	0,1263(11)	0,0542(3)
C9	0,18630(15)	0,08762(50)	0,51023(85)	0,0542(3)
C10	0,39946(21)	0,51163(64)	0,02745(87)	0,0542(3)
C11	0,15226(16)	0,13445(49)	0,31217(81)	0,0542(3)
O12	0,16121(20)	-0,01224(61)	0,66311(96)	0,0542(3)
C13	0,44576(17)	0,60542(55)	0,04942(76)	0,0542(3)
O14	0,10606(21)	0,05328(53)	0,30252(93)	0,0542(3)
C15	0,11136(21)	-0,04424(59)	0,5229(10)	0,0542(3)
C16	0,48784(22)	0,63530(61)	-0,12146(91)	0,0542(3)
O17	0,45071(21)	0,68582(57)	0,26995(83)	0,0542(3)
C18	0,51966(26)	0,74492(72)	-0,00413(91)	0,0542(3)
C19	0,49470(22)	0,77253(61)	0,23461(99)	0,0542(3)
H20	0,32086(21)	0,34584(67)	0,04586(86)	0,0650(3)
H21	0,22936(19)	0,38207(60)	0,0608(10)	0,0650(3)
H22	0,25796(19)	0,12286(58)	0,70175(98)	0,0650(3)
H23	0,14540(19)	0,26273(66)	-0,0153(11)	0,0650(3)
H24	0,39087(21)	0,46967(64)	-0,14783(87)	0,0650(3)
H25	0,08176(21)	-0,04872(59)	0,6346(10)	0,0650(3)
H26	0,11496(21)	-0,14772(59)	0,4424(10)	0,0650(3)
H27	0,49435(22)	0,59445(61)	-0,29993(91)	0,0650(3)
H28	0,55306(26)	0,79040(72)	-0,08320(91)	0,0650(3)
H29	0,50789(22)	0,84795(61)	0,34885(99)	0,0650(3)

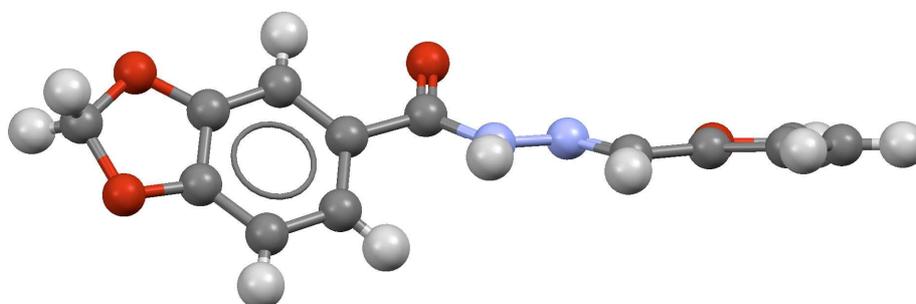
A Figura IV.9a mostra a comparação entre os perfis de difração de LASSBio-129 e LASSBio-294. Apesar de serem isómeros, e diferirem entre si apenas por um átomo, percebemos que eles possuem perfis de difração bastante distintos. A substituição do anel tiofênico por um anel furânico é suficiente para mudar as posições e as intensidades das reflexões presentes no perfil de difração (PD) de LASSBio-129 reforçando o fato de que cada PD tem caráter único (*fingerprint*) para cada composto.

Para a molécula de LASSBio-129 foi observada a configuração relativa *E* da dupla ligação imínica, da mesma forma que para LASSBio-294. Porém, ficou evidenciado o caráter não planar deste composto, diferente do que é observado para seu

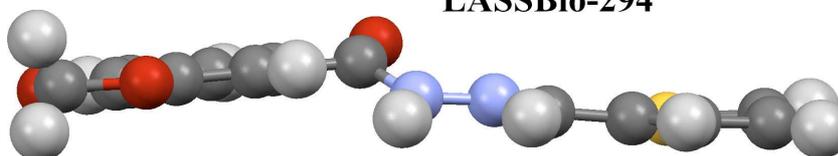
isómero (Figura IV.9b). Todas essas informações podem trazer uma maior compreensão a respeito da relação existente entre a estrutura e as propriedades das moléculas avaliadas visto que LASSBio-294 e LASSBio-129 são substâncias bioativas que possuem perfis farmacológicos distintos, apesar de serem isómeros.



LASSBio-129



LASSBio-294



(b)

Figura IV.9 – (a) Comparação entre os perfis de difração de LASSBio-294 e LASSBio-129 mostrando que embora estas moléculas se diferenciem por apenas um átomo, o caráter único de cada PD é preservado; (b) Comparação entre as estruturas cristalinas evidenciando a diferença entre o caráter planar de LASSBio-294 e a não planaridade da molécula de LASSBio-129.

IV.3 – Compostos Ciclohexil-N-Acilidrazônicos

Os compostos LASSBio-1515 e LASSBio-1601 foram planejados a partir de LASSBio-294, protótipo cardioativo com modestas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, pela simplificação molecular do grupamento benzodioxola. Este fragmento molecular, apesar de farmacofórico para atividade frente o sistema cardíaco (SUDO et al., 2006), configura-se como um dos prováveis sítios de metabolização de fase I (reações de fase I podem causar tanto a ativação quanto inativação do fármaco) devido à reatividade da ponte dioxola (FRAGA, 2010). Sabe-se que o equilíbrio resultante da interação fármaco-receptor é estabilizado por componentes entálpicos e/ou componentes entrópicos, sendo a estabilização entálpica oriunda de ligações de H e interações de van der Waals, enquanto que a estabilização entrópica é caracterizada pelo deslocamento de moléculas de água organizadas para formação de novas interações hidrofóbicas fármaco-receptor (HITZEMANN, 1988).

Após a compreensão destas informações, sugere-se que a substituição do grupamento benzodioxola, apesar da perda de sítios aceptores de ligação de H importantes quanto a componentes entálpicos, permite o acréscimo da liberdade conformacional do sistema, o que pode resultar no aumento de componentes entrópicos favoráveis para sua interação com macromoléculas. Neste contexto, a substituição molecular do fragmento benzodioxola, da subunidade acila da função NAH, por ciclos alifáticos, pode fornecer informações quanto aos aspectos termodinâmicos da interação fármaco-receptor, onde as modificações podem manter os atributos necessários para interação fármaco-receptor dos compostos planejados (SILVA, 2012), sobretudo pela preservação da função NAH, estrutura considerada privilegiada (FRAGA & BARREIRO, 2006; DUARTE et al., 2007a).

IV.3.1 – LASSBio-1515

Os compostos inicialmente desenhados, por Silva (2012), foram planejados pela simplificação molecular da benzodioxola com subsequente homologação inferior, com objetivo de avaliar as contribuições dos ciclos alifáticos, quanto aos aspectos conformacionais, para as atividades pretendidas (SILVA, 2012). Para o composto

LASSBio-1515 foi mantida a subunidade tiofênica ligada à região imínica da função NAH, como ilustra a Figura IV.9. Vale ressaltar que LASSBio-1515 apresentou resultados promissores frente às atividades antinociceptiva⁷ e anti-inflamatória (SILVA, 2012) em ensaios de nocicepção induzida por ácido acético ($87,9 \pm 3,4$ % de inibição) e peritonite induzida por carragenina ($79,2 \pm 2,7$ % de inibição).

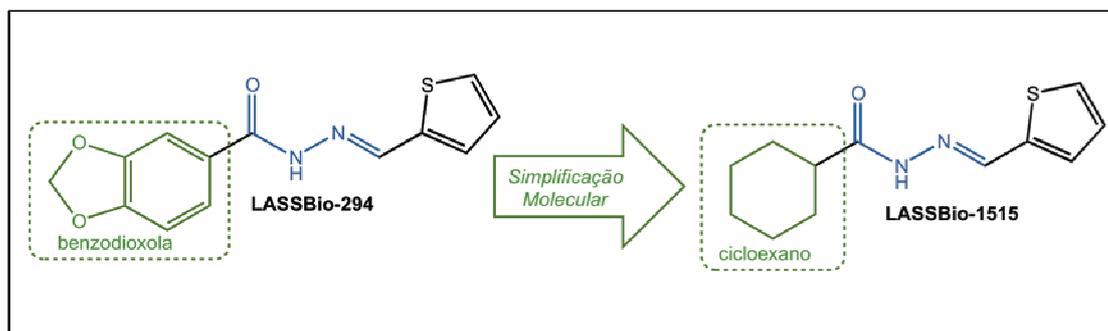


Figura IV.10 – Emprego da estratégia de simplificação molecular no planejamento racional do LASSBio-1515 substituindo o grupamento benzodioxola, da subunidade acila da função NAH, por um grupo cicloexila.

Para a determinação estrutural de LASSBio-1515 foram usados dados de DRXP de LASSBio-1515 coletados no LCCEM na Universidade Federal do ABC, em Santo André – SP, em um difratômetro convencional da marca STOE, modelo STADI-P em alta resolução, utilizando um alvo de cobre ($\lambda=1,54056\text{\AA}$). As medidas foram coletadas varrendo a região de 2θ de 2° a 60° , com passo angular de $0,015^\circ$.

O programa *Topas Academic v.4.1* (COELHO, 2007) foi usado nos processos de indexação e decomposição do perfil de difração de LASSBio-1515. O “background” foi estimado usando 6 termos do polinômio de Chebyshev. Dados até 32° foram usados no procedimento de indexação por meio do método iterativo descrito por Coelho (COELHO, 2003). Então, um ajuste de Pawley retornou os seguintes valores para uma cela monoclinica: $a = 11,2619(4) \text{\AA}$, $b = 12,5909(4) \text{\AA}$, $c = 8,8447(3) \text{\AA}$, $\beta = 90,606(1)^\circ$ e $V = 1254,08(8) \text{\AA}^3$. O volume encontrado no procedimento de indexação sugeriu quatro fórmulas unitárias por cela unitária ($Z=4$) e uma molécula na unidade assimétrica ($Z'=1$). As intensidades integradas bem como suas correlações foram extraídas por meio do refinamento Pawley, que convergiu para um valor de $\chi^2 = 1,74$.

⁷ Na experimentação animal, sugere-se a substituição dos termos dor e analgesia por nocicepção e antinocicepção, respectivamente.

As etapas de determinação da estrutura cristalina e refinamento pelo Método de Rietveld, de LASSBio-1515, foram realizadas conforme descritas na seção III.3.

IV.3.1.1 – Descrição da Estrutura Cristalina

LASSBio-1515, apresentado na Figura IV.11, cristalizou-se no sistema monoclinico com grupo espacial $P2_1/c$ com valores finais para os parâmetros de rede da cela unitária após o refinamento Rietveld: $a = 11,2580(4) \text{ \AA}$, $b = 12,5878(3) \text{ \AA}$, $c = 8,8460(2) \text{ \AA}$, $\beta = 90,607(2)^\circ$, $V = 1253,52(6) \text{ \AA}^3$. Estes valores e outros detalhes do refinamento Rietveld estão apresentados na Tabela IV.5.

Coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-1515 podem ser observados na Tabela IV.6. O gráfico Rietveld, mostrando o bom acordo entre os perfis observado e calculado, está apresentado na Figura IV.12

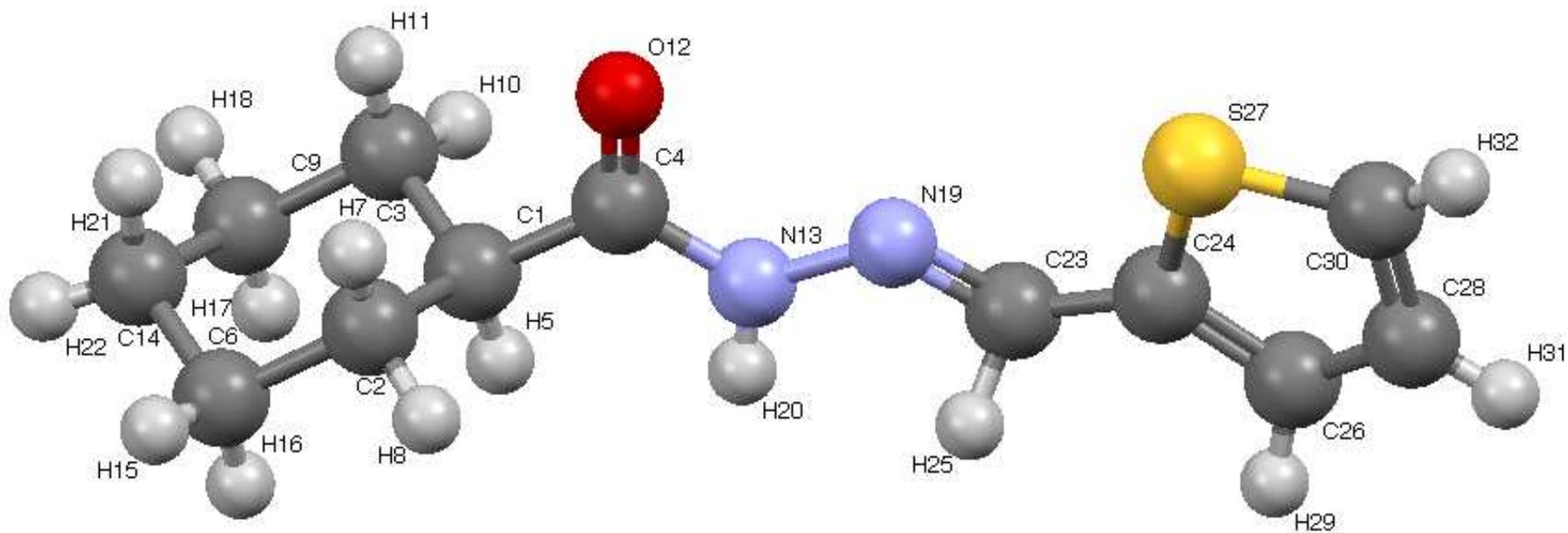


Figura IV.11 - Estrutura cristalina do LASSBio-1515 evidenciando a configuração relativa E da ligação C=N, o enxofre do anel tiofênico e o oxigênio carbonílico orientados na mesma direção e a conformação do tipo cadeira para a cicloexila com substituição na posição equatorial.

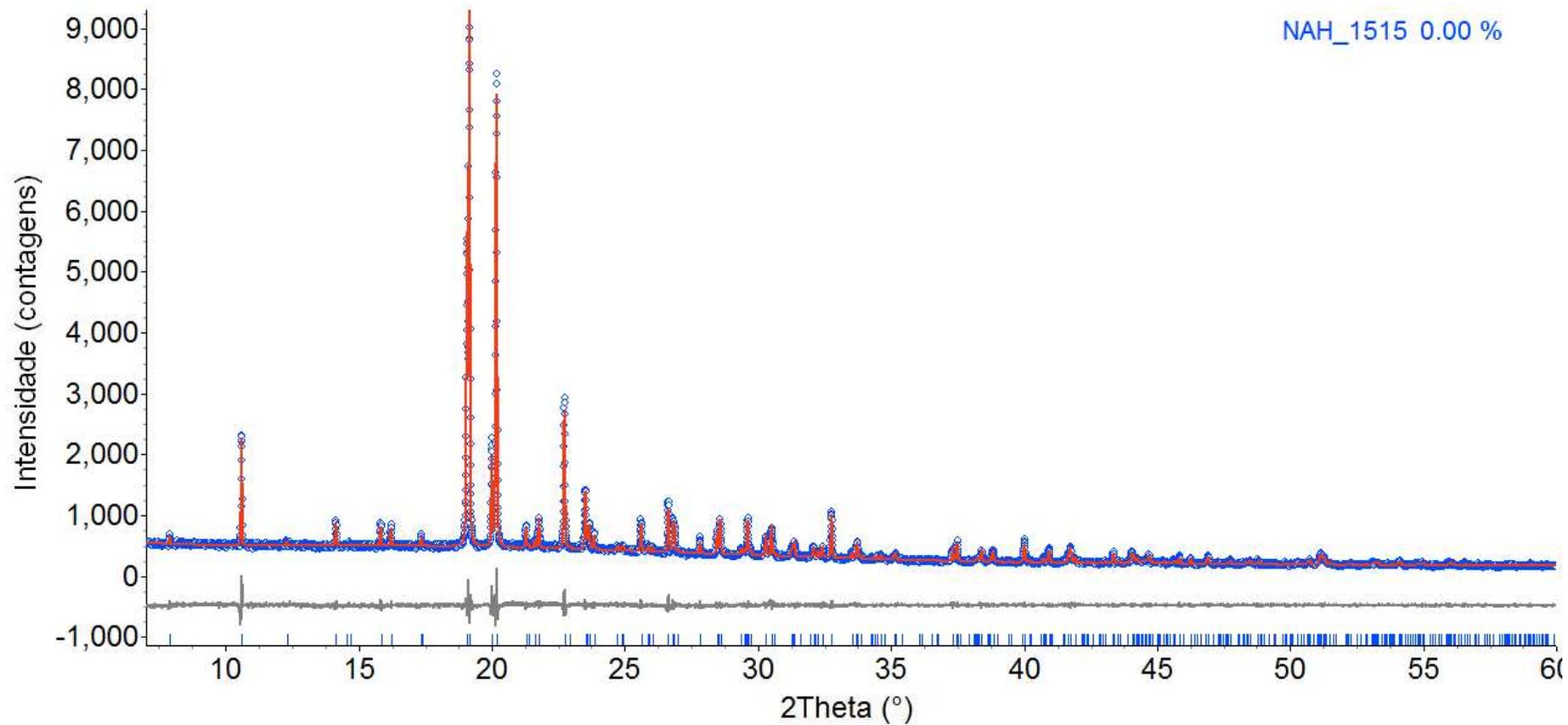


Figura IV.12 - Ajuste Rietveld para o LASSBio-1515 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho). Cristalizou-se no sistema monoclinico com grupo espacial P21/c.

Tabela IV.5 – Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-1515.

<i>Estrutura Cristalina</i>	
Nome do composto	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(tiofen-2-il-metileno) ciclohexano-1-carbohidrazida
Fórmula química	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O S
Peso molecular (g mol ⁻¹)	236,34
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i> (No. 14)
<i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	11,2548(13); 12,5918(7); 8,8487(4)
β (°)	90,607(2)
Volume (Å ³)	1253,9(2)
<i>Z</i> ; <i>Z'</i>	4; 1
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1,2519(1)
μ (mm ⁻¹)	2,1351(3)
T (K)	298
<i>Coleta dos Dados</i>	
Difratômetro	STOE STADI-P CuK α_1
Monocromador	Ge(111)
Comprimento de onda (Å)	1,54056
2 θ faixa (°)	2 – 60
Passo angular (°)	0,015
Tempo de integração (s/1,05°)	50
<i>Refinamento</i>	
R _{exp} (%)	3,883
R _{wp} (%)	6,172
R _{Bragg} (%)	2,404
χ^2	1,590
<i>d</i> -DW	0,545

Table IV.6 – Coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($U_{iso} = B_{iso}/8\pi^2$) de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-1515.

Átomo	x/a	y/b	z/c	U_{iso}
C1	0,4933(16)	0,1454(13)	0,2194(17)	0,067(2)
C2	0,5945(12)	0,2158(11)	0,2763(17)	0,067(2)
C3	0,5172(13)	0,0287(11)	0,2546(16)	0,067(2)
C4	0,3784(16)	0,1804(13)	0,2879(23)	0,067(2)
C6	0,7109(11)	0,1811(10)	0,2025(17)	0,067(2)
C9	0,6329(11)	-0,0048(10)	0,1792(17)	0,067(2)
O12	0,36478(85)	0,18140(89)	0,4241(12)	0,067(2)
N13	0,2944(12)	0,2193(11)	0,1912(16)	0,067(2)
C14	0,7349(13)	0,0641(11)	0,2391(15)	0,067(2)
N19	0,1913(13)	0,26712(99)	0,2460(13)	0,067(2)
C23	0,1114(13)	0,2910(12)	0,1466(19)	0,067(2)
C24	0,0086(17)	0,3544(13)	0,1886(21)	0,067(2)
C26	-0,0723(15)	0,3992(12)	0,0897(15)	0,067(2)
S27	-0,02697(52)	0,38531(38)	0,37155(56)	0,067(2)
C28	-0,1560(16)	0,4607(12)	0,1698(17)	0,067(2)
C30	-0,1474(16)	0,4488(13)	0,3258(18)	0,067(2)
H5	0,4848(16)	0,1533(13)	0,1111(17)	0,081(2)
H7	0,5994(12)	0,2198(11)	0,3758(17)	0,081(2)
H8	0,5775(12)	0,2865(11)	0,2279(17)	0,081(2)
H10	0,4517(13)	-0,0129(11)	0,2114(16)	0,081(2)
H11	0,5191(13)	0,0190(11)	0,3616(16)	0,081(2)
H15	0,7751(11)	0,2214(10)	0,2373(17)	0,081(2)
H16	0,7072(11)	0,1818(10)	0,0906(17)	0,081(2)
H17	0,6266(11)	0,0016(10)	0,0784(17)	0,081(2)
H18	0,6471(11)	-0,0794(10)	0,2118(17)	0,081(2)
H20	0,3160(12)	0,2332(11)	0,1048(16)	0,081(2)
H21	0,7299(13)	0,0612(11)	0,3547(15)	0,081(2)
H22	0,8063(13)	0,0404(11)	0,2093(15)	0,081(2)
H25	0,1673(13)	0,3270(12)	0,0666(19)	0,081(2)
H29	-0,0422(15)	0,4141(12)	-0,0114(15)	0,081(2)
H31	-0,2134(16)	0,4980(12)	0,1124(17)	0,081(2)
H32	-0,2039(16)	0,4900(13)	0,3791(18)	0,081(2)

A estrutura cristalina de LASSBio-1515 é composta por quatro fórmulas unitárias por cela unitária ($Z=4$), acomodando uma molécula na unidade assimétrica ($Z'=1$), conforme pode ser observado na Figura IV.13a. Dentro da cela unitária as moléculas são mantidas juntas por meio de interações de hidrogênio entre átomos N(13)–H(20)⋯O(12)⁸ (D–H = 0,82(2) Å, H⋯A = 2,01(2) Å, D⋯A = 2.80(2) Å e D–H⋯A =

⁸ Simetria: $x, \frac{1}{2}-y, -\frac{1}{2}+z$

160,0(2)°; onde “D” e “A” são, respectivamente, o átomo doador e receptor de ligação hidrogênio), que estão representadas pelas linhas tracejadas (em azul) na Figura IV.13b, formando, assim, uma rede de agregados moleculares ao longo do eixo *c*. Possíveis interações intermoleculares de caráter complementar, como as do tipo π -stacking, entre os anéis tiofênicos, com distância característica de C(26)-H(29) = 2,77(2) Å, também podem estar contribuindo para a formação da rede, como mostra a Figura IV.14.

A estrutura cristalina (Figura IV.11) permitiu evidenciar aspectos estruturais do composto em fase sólida como a conformação cadeira da cicloexila com substituição na posição equatorial. A diastereoisomeria da ligação C=N foi confirmada (configuração relativa *E*) e ainda pode-se observar o enxofre do anel tiofênico orientado na mesma direção do oxigênio carbonílico.

Com relação aos ângulos de torção da molécula e as conformações que ela adota, pode-se destacar que o ângulo de torção envolvendo os átomos C(3)-C(1)-C(4)-N(13) foi de -122(2)° e sob esta condição, a molécula está em uma conformação anticlinal (ac). Os ângulos de torção envolvendo os átomos N(19)-C(23)-C(24)-C(26), os átomos C(1)-C(4)-N(13)-N(19) e os átomos C(4)-N(13)-N(19)-C(23) foram, respectivamente, 169(2)°, -171(1)° e -173(2)°, e neste caso, a molécula adota uma conformação antiperiplanar (ap) (ver Figura IV.11).

Todos os dados referentes à determinação da estrutura cristalina de LASSBio-1515 foram depositados no “Cambridge Crystallography Data Centre”, o CCDC, sob o número de identificação 929463.

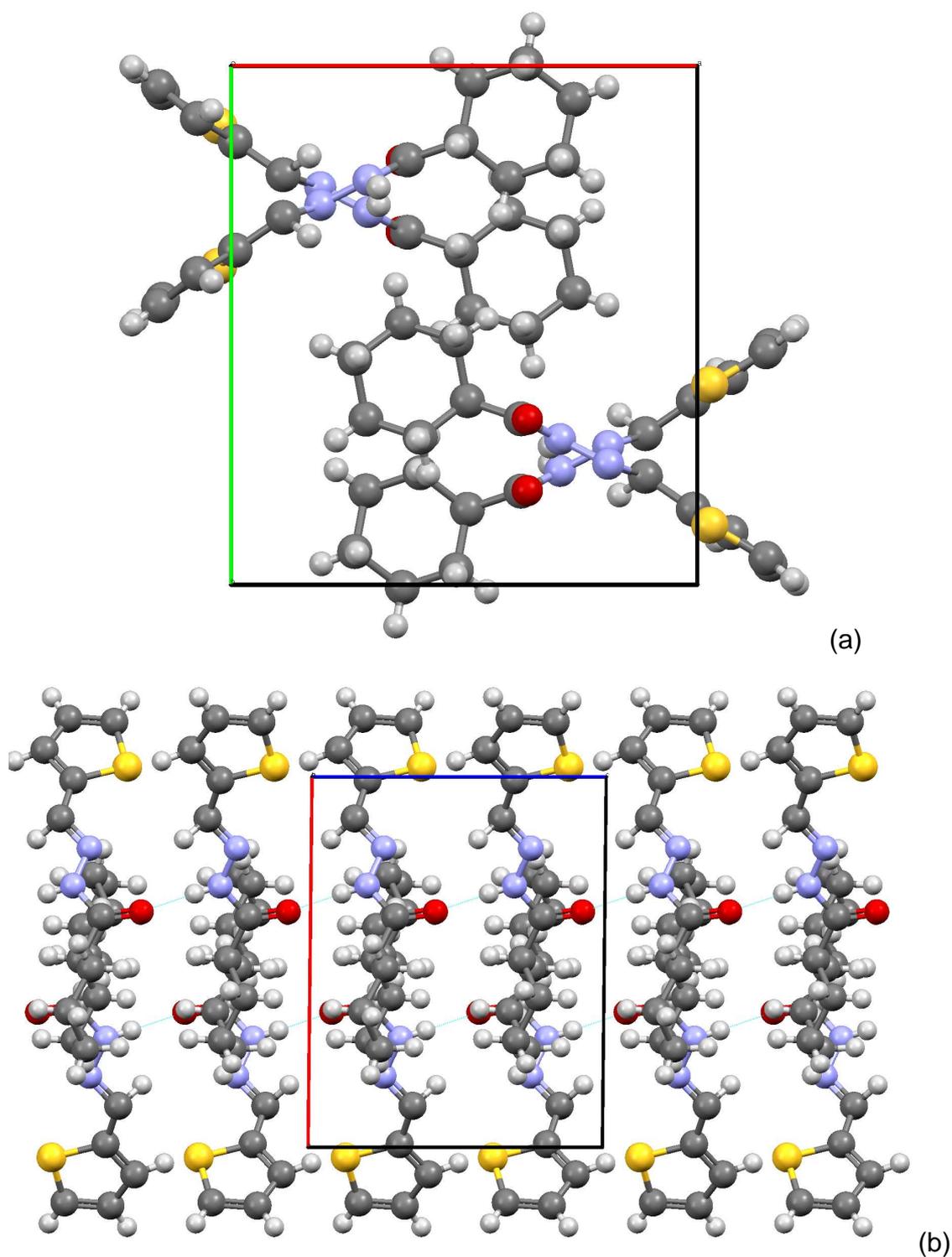


Figura IV.13 – (a) Empacotamento da cela unitária ($Z = 4$) de LASSBio-1515 ao longo do eixo c ; (b) formação do agregado cristalino ao longo da rede evidenciando as interações de hidrogênio intermoleculares entre a carbonila, O(12), e nitrogênio amídico, N(13), da função NAH.

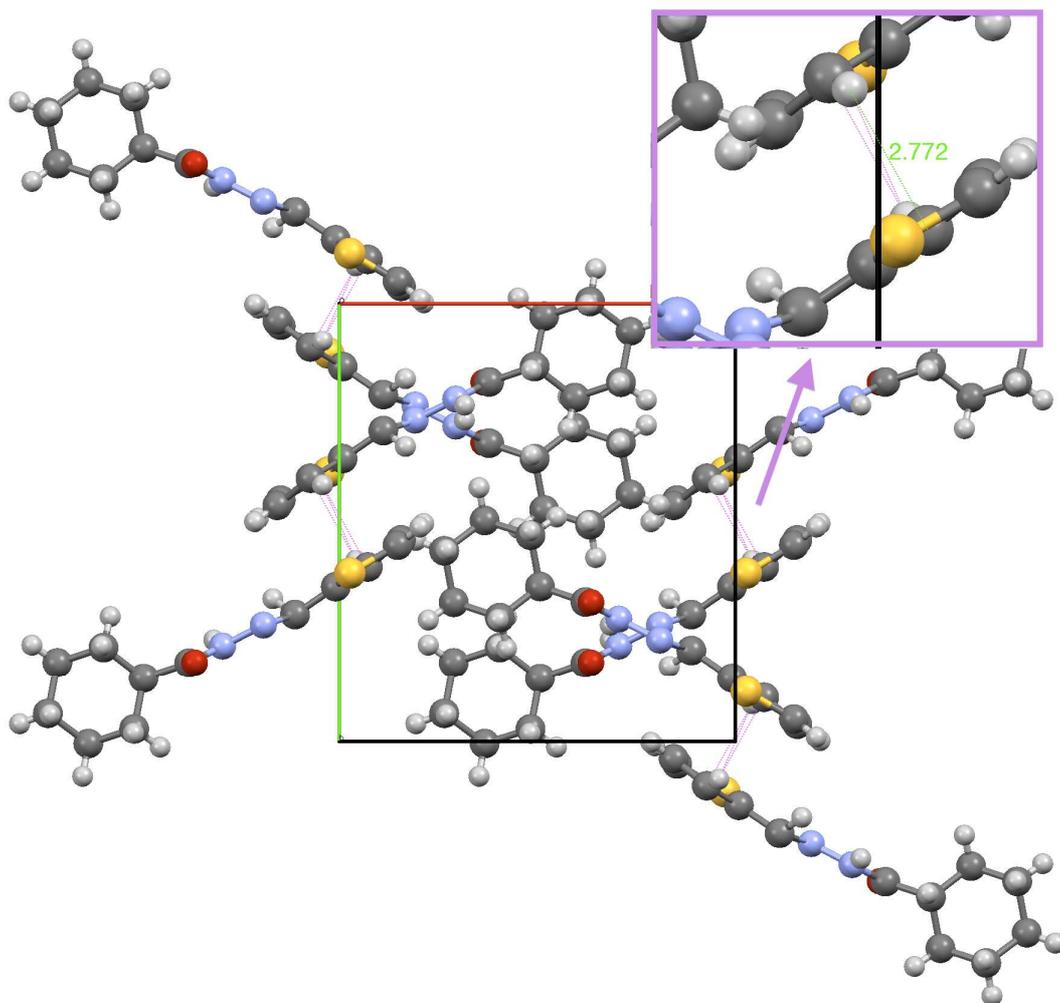


Figura IV.14 – Agregado cristalino de LASSBio-1515 com destaque para possíveis interações do tipo “ π -stacking” entre anéis tiofênicos (C(26)-H(29) = 2,77(2) Å).

IV.3.2 – LASSBio-1601

Devido aos promissores resultados de LASSBio-1515 frente as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, os compostos da série I (Figura III.2) sofreram modificações na região imínica da função NAH pela introdução de diversos anéis aromáticos e heteroaromáticos (SILVA, 2012). O LASSBio-1601 consiste no composto mais simples desta série (por isso foi selecionado) apresentando a fenila na subunidade imínica da função NAH, ideal para realização de correlações estruturais.

Em sua dissertação de mestrado, Silva (2012) relata a dificuldade na elucidação da diastereoisomeria de LASSBio-1601. Parte desta tentativa foi brevemente mencionada

na seção III.1.1. Com o objetivo de verificar de forma inequívoca a configuração relativa, este composto foi submetido à medida de DRXP que permitiu evidenciar aspectos estruturais do composto em fase sólida.

A aquisição de dados de DRXP de LASSBio-1601 foi realizada na linha de luz D10B-XPD do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP. Esta linha de luz é totalmente dedicada a experiências de difração de raios X de pó, conforme já apresentado na seção III.2.3. A energia utilizada foi de $E = 7,99625$ keV ($\lambda = 1,55054$ Å). O perfil de difração foi coletado na região de 2θ variando de 5° a 60° , com passo angular de 0.005° e tempo de 30 s/passos.

Os procedimentos de indexação e decomposição do perfil de difração de LASSBio-1601 foram realizados usando o programa *Topas Academic v.4.1* (COELHO, 2007). O ajuste de Pawley retornou os seguintes valores para uma cela triclinica: $a = 4,7909(14)$ Å, $b = 10,8631(20)$ Å, $c = 15,8312(23)$ Å, $\alpha = 52,281(11)^\circ$, $\beta = 99,338(12)^\circ$, $\gamma = 99,611(18)$ e $V = 640,68(1)$ Å³. O volume encontrado no procedimento de indexação sugeriu duas moléculas por cela unitária ($Z=2$) e uma molécula na unidade assimétrica ($Z'=1$).

O processo de determinação da estrutura cristalina de LASSBio-1601 assim como o processo de refinamento pelo método de Rietveld foram realizados conforme os procedimentos descritos na seção III.3.

O ajuste visual obtido após o refinamento pode ser visualizado na Figura IV.15 onde pode ser observado o bom acordo entre os dados experimentais e o perfil calculado. O alto “background” que pode ser observado para o perfil de difração de LASSBio-1601 é devido a condições experimentais. Neste caso, provavelmente, por espalhamento de raios X pelo ar.

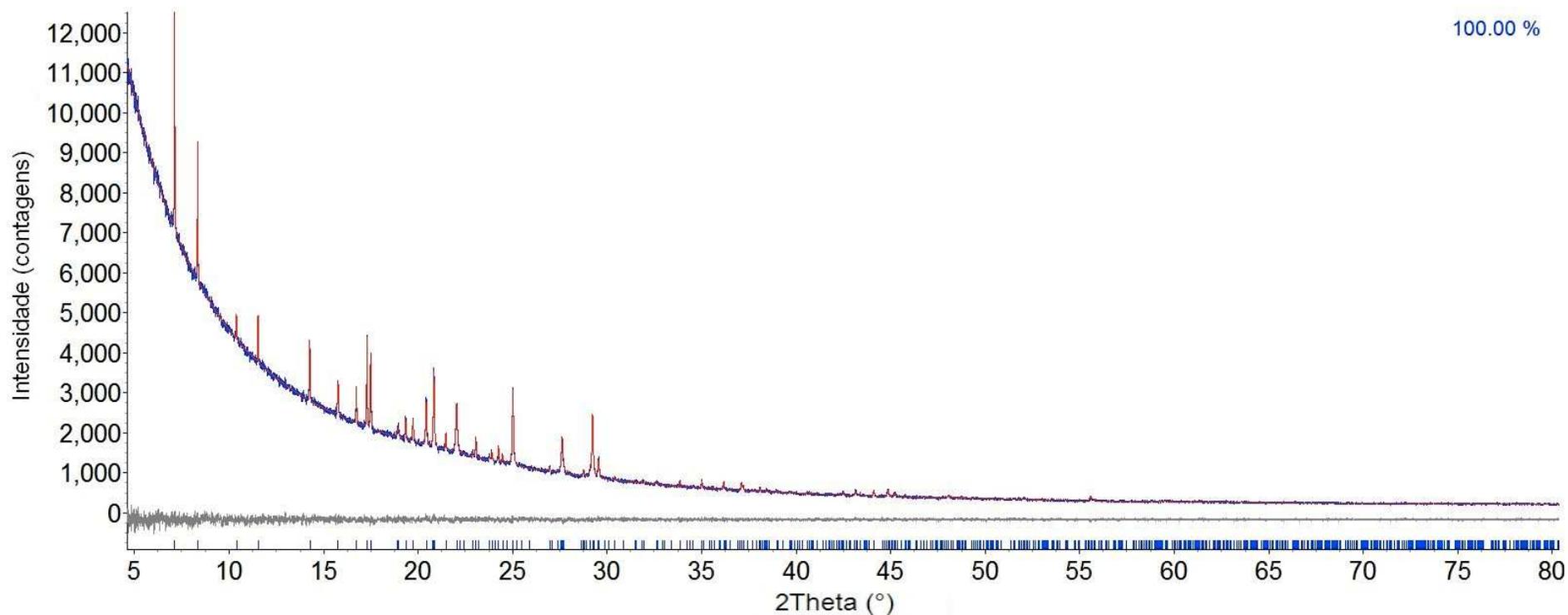


Figura IV.15 - Ajuste Rietveld para o LASSBio-1601 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho) apesar do alto “background” devido a condições experimentais. Este composto cristalizou-se em um sistema triclinico com grupo espacial $P\bar{1}$.

IV.3.2.1 – Descrição da Estrutura Cristalina

LASSBio-1601 cristalizou-se em um sistema triclinico com grupo espacial $P\bar{1}$. Os valores finais para os parâmetros de rede da cela unitária, após o refinamento Rietveld foram: $a = 4,7912(3) \text{ \AA}$, $b = 10,8640(6) \text{ \AA}$, $c = 15,8300(8) \text{ \AA}$, $\alpha = 52,2773(9)^\circ$, $\beta = 99,333(1)^\circ$, $\gamma = 99,609(1)^\circ$, $V = 640,70(6) \text{ \AA}^3$, com duas moléculas compondo a cela unitária ($Z=2$) e uma fórmula na unidade assimétrica ($Z'=1$). Na Figura IV.16 pode ser vista a molécula de LASSBio-1601 e dados do cristal, valores finais para os parâmetros de rede da cela unitária após o refinamento, o indicador de qualidade do ajuste (χ^2) e os fatores R ($R_{\text{Bragg}}/R_{\text{wp}}/R_{\text{exp}}$) podem se visualizados na Tabela IV.7. As coordenadas fracionárias, que localizam os átomos da estrutura cristalina, estão listadas na Tabela IV.8.

A organização mínima das moléculas de LASSBio-1601 em fase sólida, pode ser observada na Figura IV.17. Esta figura apresenta a organização da cela unitária (a) e a expansão da rede (b) evidenciando que as moléculas são mantidas juntas por meio de interações de hidrogênio entre a carbonila e o nitrogênio amídico da função NAH. Os átomos envolvidos são: $\text{N}(4)\text{--H}(9)\cdots\text{O}(3)^9$ ($\text{D--H} = 0,887(5) \text{ \AA}$, $\text{H}\cdots\text{A} = 2,163(7) \text{ \AA}$, $\text{D}\cdots\text{A} = 3,024(7) \text{ \AA}$ e $\text{D--H}\cdots\text{A} = 163,3(5)^\circ$; onde “D” e “A” são, respectivamente, o átomo doador e receptor de ligação hidrogênio), que estão representadas pelas linhas tracejadas (em azul) na Figura IV.17b. Neste contexto, é possível observar a sobreposição, provavelmente devido às interações do tipo π -stacking, entre a fenila e a função NAH. Estas interações também podem estar contribuindo para a formação da rede, como mostra a Figura IV.18.

A estrutura cristalina (Figura IV.16) permitiu evidenciar aspectos estruturais do composto em fase sólida como a conformação cadeira da cicloexila com substituição na posição equatorial, preferencial devido aos efeitos estéricos. A diastereoisomeria da ligação C=N foi confirmada (configuração relativa *E*) e ainda pode-se observar o enxofre do anel tiofênico orientado na mesma direção do oxigênio carbonílico. Também percebe-se a conformação *s-trans* da função amida da NAH do composto, resultado este diferente de compostos aril-NAH da literatura, como LASSBio-294, cuja conformação preferencial é *s-cis*.

⁹ Simetria: 2-x, 1-y, 1-z

Tabela IV.7 – Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-1601.

<i>Estrutura Cristalina</i>	
Nome do composto	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(benzilideno) ciclohexano-1-carbohidrazida
Fórmula química	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O
Peso molecular (g mol ⁻¹)	230,31
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	<i>P</i> $\bar{1}$ (No. 2)
<i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	4,7912(3); 10,8640(6); 15,8300(8)
α , β , γ (°)	52,2772 (9), 99.333(1), 99.610(1)
Volume (Å ³)	640,70(6)
<i>Z</i> ; <i>Z'</i>	2; 1
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1,1938(1)
μ (cm ⁻¹)	6,092(9)
T (K)	298
<i>Coleta dos Dados</i>	
Difratômetro	Huber (radiação síncrotron)
Monocromador	Si(111)
Comprimento de onda (Å)	1,55051
2 θ faixa (°)	4 – 80
Passo angular (°)	0,005
Tempo por passo (s)	30
<i>Refinamento</i>	
R _{exp} (%)	2,408
R _{wp} (%)	2,005
R _{Bragg} (%)	0,666
χ^2	0,832
<i>d</i> -DW	1,529

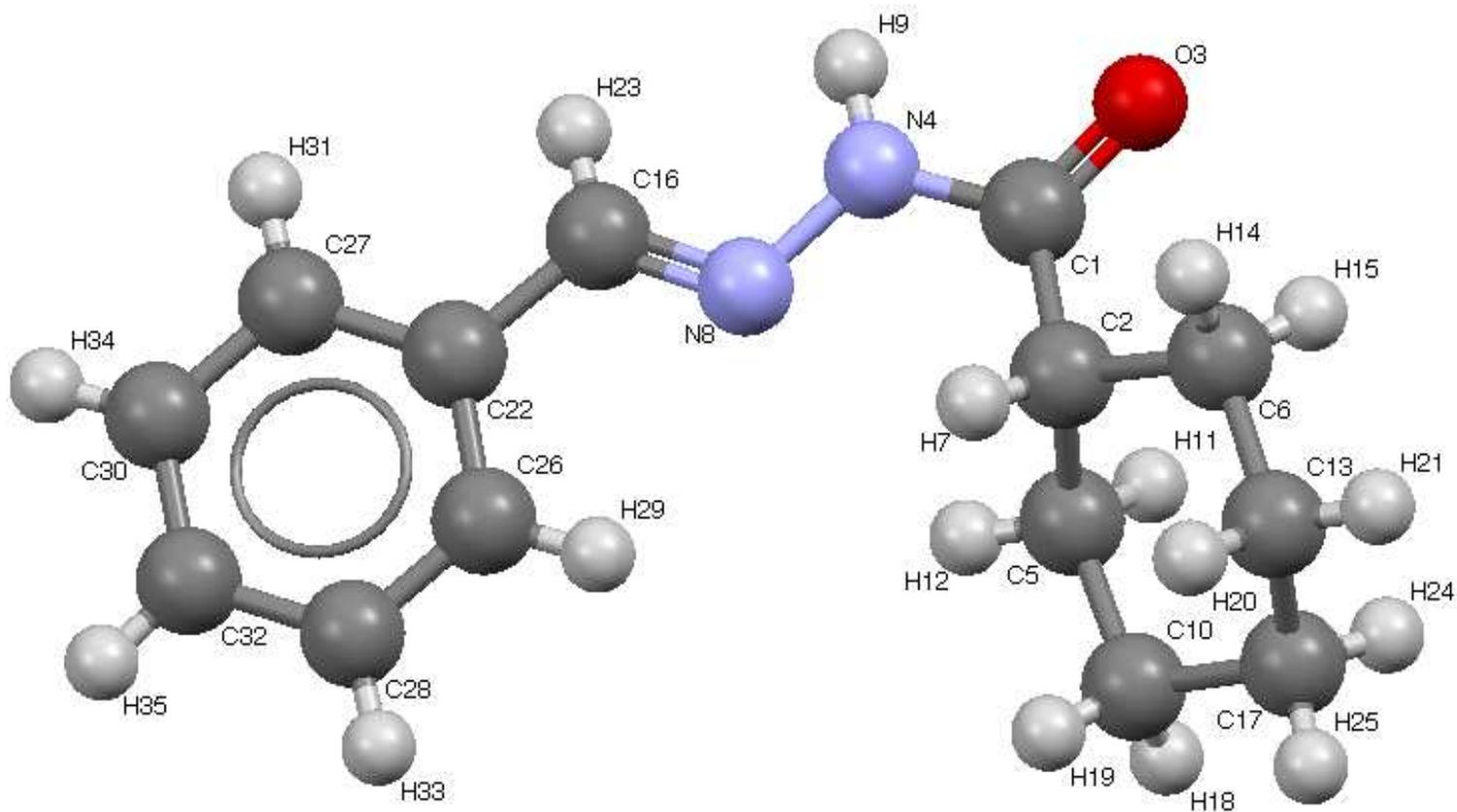
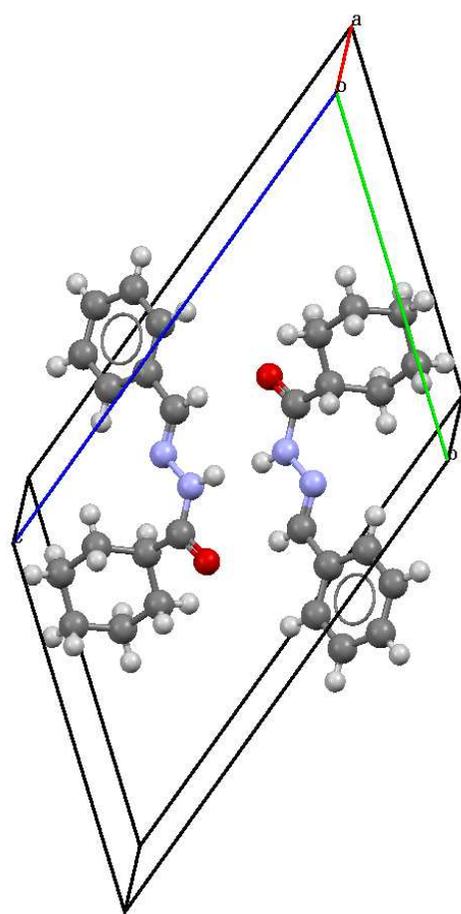


Figura IV.16 - Estrutura cristalina do LASSBio-1601. A configuração relativa *E* da dupla ligação imínica e a a conformação cadeira da cicloexila, com substituição na posição equatorial, além da conformação *s-trans* da função amida da NAH.

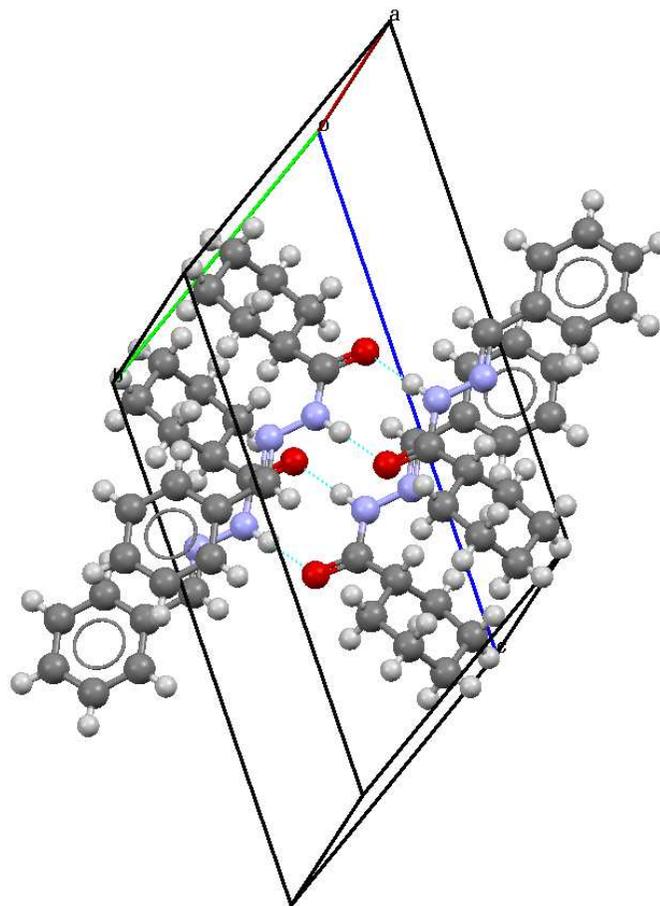
O ângulo de torção envolvendo os átomos N(4)-C(1)-C(2)-C(6) foi $-148,7(4)^\circ$. Neste caso a molécula adota uma conformação anticlinal (ac). O ângulo de torção envolvendo os átomos C(2)-C(1)-N(4)-N(8) foi $-15,6(6)^\circ$ e sob esta condição, a molécula está em uma conformação sinperiplanar (sp). Os ângulos de torção envolvendo os átomos C(1)-N(4)-N(8)-C(16) e os átomos N(4)-N(8)-C(16)-C(22) foram, respectivamente, $-176,7(4)^\circ$ e $-178,5(4)^\circ$, adotando, neste caso, uma conformação antiperiplanar (ap).

Table IV.8 – Coordenadas de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-1601.

Átomo	x/a	y/b	z/c
C1	0,78431(91)	0,55417(29)	0,35324(20)
C2	0,60439(91)	0,59383(33)	0,25349(23)
O3	0,9269(14)	0,44331(44)	0,40338(31)
N4	0,7172(10)	0,61228(40)	0,40181(24)
C5	0,7258(11)	0,74771(48)	0,15793(27)
C6	0,5885(12)	0,46009(40)	0,24487(27)
N8	0,5430(12)	0,73099(40)	0,35040(23)
C10	0,5918(13)	0,78350(38)	0,05128(28)
C13	0,4442(11)	0,49919(51)	0,13833(29)
C16	0,50342(82)	0,78294(37)	0,40160(23)
C17	0,5825(12)	0,64693(38)	0,04530(27)
C22	0,31168(62)	0,90867(27)	0,35209(19)
C26	0,18579(59)	0,97179(31)	0,24854(22)
C27	0,25539(59)	0,96470(31)	0,40743(23)
C28	0,00679(60)	1,08932(31)	0,20043(24)
C30	0,07437(57)	1,08355(29)	0,35870(23)
C32	-0,04916(61)	1,14541(30)	0,25548(25)
H7	0,42100(91)	0,61204(33)	0,25270(23)
H9	0,7999(10)	0,57719(40)	0,46627(24)
H11	0,9285(11)	0,73870(48)	0,16445(27)
H12	0,6918(11)	0,82440(48)	0,16225(27)
H14	0,4703(12)	0,37263(40)	0,30175(27)
H15	0,7688(12)	0,42733(40)	0,25545(27)
H18	0,7273(13)	0,86617(38)	-0,00071(28)
H19	0,4203(13)	0,81807(38)	0,03809(28)
H20	0,2445(11)	0,51190(51)	0,13375(29)
H21	0,4563(11)	0,41470(51)	0,13555(29)
H23	0,59953(82)	0,75412(37)	0,46666(23)
H24	0,7648(12)	0,62396(38)	0,04586(27)
H25	0,4672(12)	0,67206(38)	-0,01754(27)
H29	0,22792(59)	0,93174(31)	0,21175(22)
H31	0,33606(59)	0,92524(31)	0,47745(23)
H33	-0,07636(60)	1,12921(31)	0,12863(24)
H34	0,02964(57)	1,12328(29)	0,39278(23)
H35	-0,17503(61)	1,22564(30)	0,21954(25)



(a)



(b)

Figura IV.17 – Cella unitária de LASSBio-1601 (a) evidenciando as interações de hidrogênio (em azul) importantes para a organização das moléculas ao longo da rede cristalina.

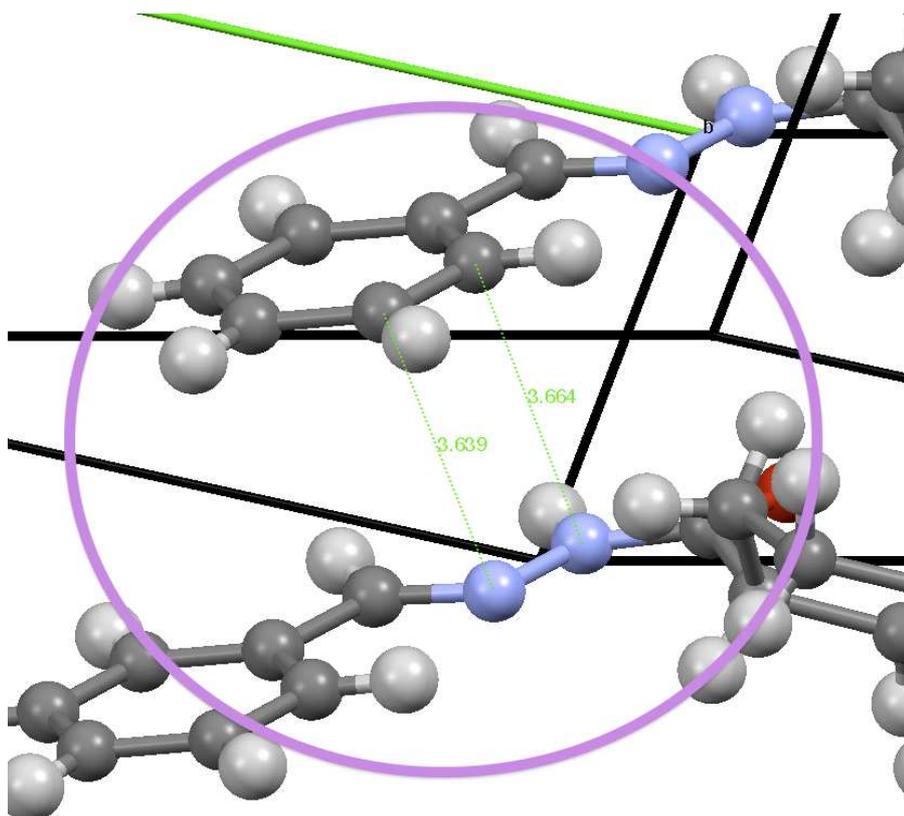


Figura IV.18 – Prováveis interações do tipo π -stacking entre a fenila e a função NAH com distâncias medidas em Å [C(28)-N(8) = 3,639(5); C(26)-N(94) = 3,664(4)].

IV.3.3 – LASSBio-1733

Visando a otimização dos resultados farmacológicos de LASSBio-1515 (seção IV.3.1), LASSBio-1733 foi planejado devido ao efeito metila evidenciado para derivados NAH citados anteriormente e baseado em alguns exemplos da literatura (KÜMMERLE *et al.*, 2009; BARREIRO *et al.*, 2011a), sobretudo quanto aos aspectos conformacionais, bem como aos diferentes perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos.

Deve ser destacada a ausência de duplicação dos sinais referentes ao hidrogênio imínico de LASSBio-1733 na análise de RMN ^1H (Figura IV.19). Curiosamente, o precursor LASSBio-1515, uma cicloalquil-*N*-acilidrazona não *N*-metilada, possui duplicação dos sinais em espectro de RMN de ^1H e ^{13}C [200MHZ em DMSO- d_6] (SILVA, 2012). Este efeito da *N*-metilação, provavelmente é resultante do efeito indutivo causado pela metila ao nitrogênio amídico (Figura IV.20), o que desloca o par

de elétrons livres para a ligação amídica, aumentando o caráter “s” da ligação, o que pode implicar numa maior barreira de rotação amídica.

Baseado nos estudos de Silva (SILVA, 2012), para os derivados *Ciclo-Alquil-NAH* descritos em sua dissertação de mestrado, quanto ao equilíbrio conformacional amídico evidenciado por espectro de RMN, foi sugerido por ele que a *N*-metilação pode ter implicado no deslocamento do equilíbrio conformacional, onde a forma *s-trans* provavelmente é favorecida devido aos efeitos estéricos agregados à metila introduzida. Além disso, a perda de um sítio de interação por ligação de H diminui a influência do solvente, resultando na menor solvatação do composto LASSBio-1733, o que também pode atuar desfavorecendo o conformero *s-cis* no equilíbrio (SILVA, 2012).

Para agregar mais informações quanto a influência estrutural da metila e confirmar a forma *s-trans* do composto, em fase sólida, foram realizados estudos de difração de raios X por policristais deste composto.

A aquisição de dados de DRXP de LASSBio-1733 foi realizada no LCCEM na UFABC, em Santo André – SP, em um difratômetro convencional da marca STOE, modelo STADI-P em alta resolução, utilizando um alvo de cobre ($\lambda=1,54056\text{\AA}$). As medidas foram coletadas varrendo a região de 2θ de 2° a 60° , com passo angular de $0,015^\circ$, com tempo de integração de 50s a cada $1,05^\circ$.

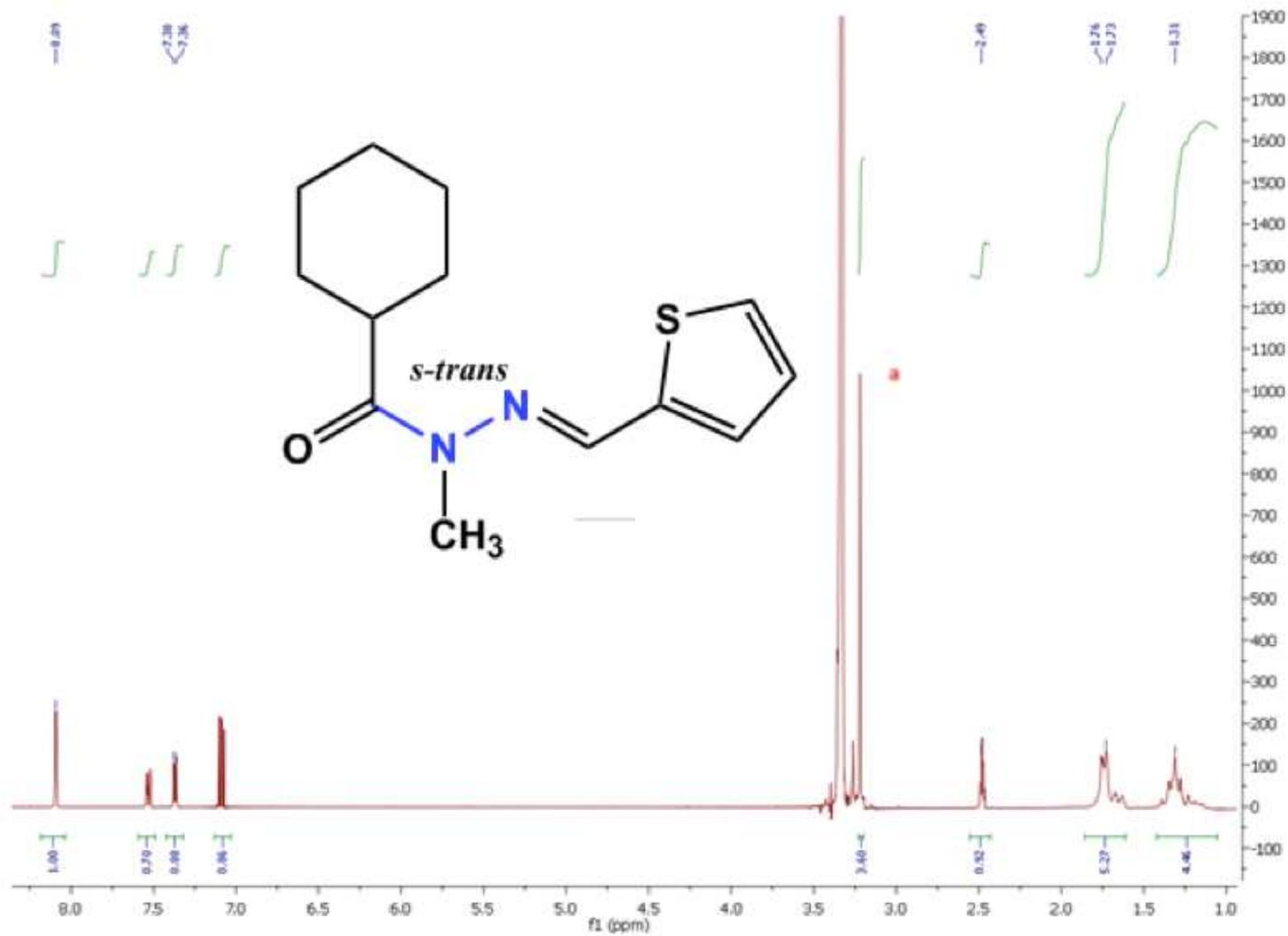


Figura IV.19 – Espectro de RMN de ^1H de LASSBio-1733 [300Mhz, DMSO-d6/TMS] (SILVA,2012).

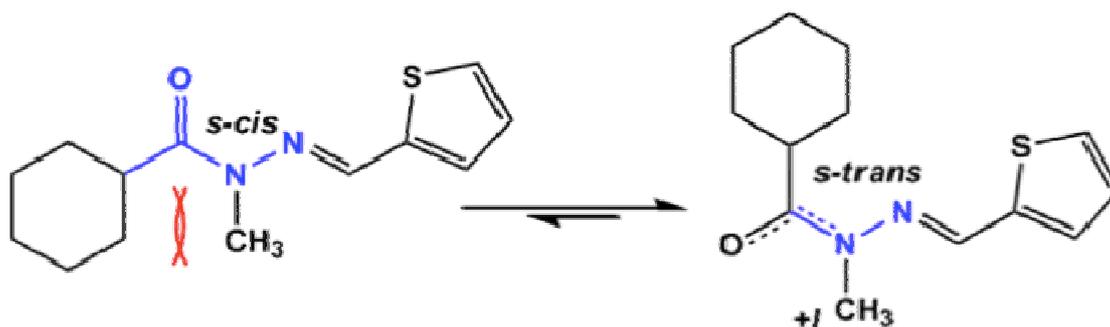


Figura IV.20 – Efeito indutivo da metila e aumento do caráter s da ligação amídica de LASSBio-1733 (SILVA, 2012)

Os processos de indexação e decomposição do perfil de difração de LASSBio-1733 foram realizados usando o programa *Topas Academic v.5.0* (COELHO, 2012). O ajuste de Pawley retornou os seguintes valores para uma cela ortorrômbica, $P2_12_12_1$: $a = 25,21029 \text{ \AA}$, $b = 10,296684 \text{ \AA}$, $c = 5,233751 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ e $V = 1358,59 \text{ \AA}^3$. O volume encontrado no procedimento de indexação sugeriu quatro moléculas por cela unitária ($Z=4$) e uma molécula na unidade assimétrica ($Z'=1$). Para o refinamento Pawley o indicador de qualidade do ajuste foi $\chi^2 = 2,688$.

Tanto o procedimento de determinação da estrutura cristalina de LASSBio-1733 quanto o refinamento Rietveld seguiram a metodologia apresentada na seção III.3. O ajuste visual obtido após o refinamento pode ser visualizado na Figura IV.21.

IV.3.3.1 – Descrição da Estrutura Cristalina

LASSBio-1733 cristalizou-se em um sistema ortorrômbico com grupo espacial $P2_12_12_1$. Os valores finais para os parâmetros de rede da cela unitária, após o refinamento Rietveld foram: $a = 25,2049(13) \text{ \AA}$, $b = 10,2952(6) \text{ \AA}$, $c = 5,2333(3) \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $V = 1357,99(13) \text{ \AA}^3$, com quatro moléculas compondo a cela unitária ($Z = 4$) e uma fórmula na unidade assimétrica ($Z' = 1$). Na Figura IV.22 pode ser vista a molécula de LASSBio-1733 e dados do cristal, valores finais para os parâmetros de rede da cela unitária após o refinamento, o indicador de qualidade do ajuste (χ^2) e os fatores R_{Bragg} , R_{wp} e R_{exp} podem se visualizados na Tabela IV.9.

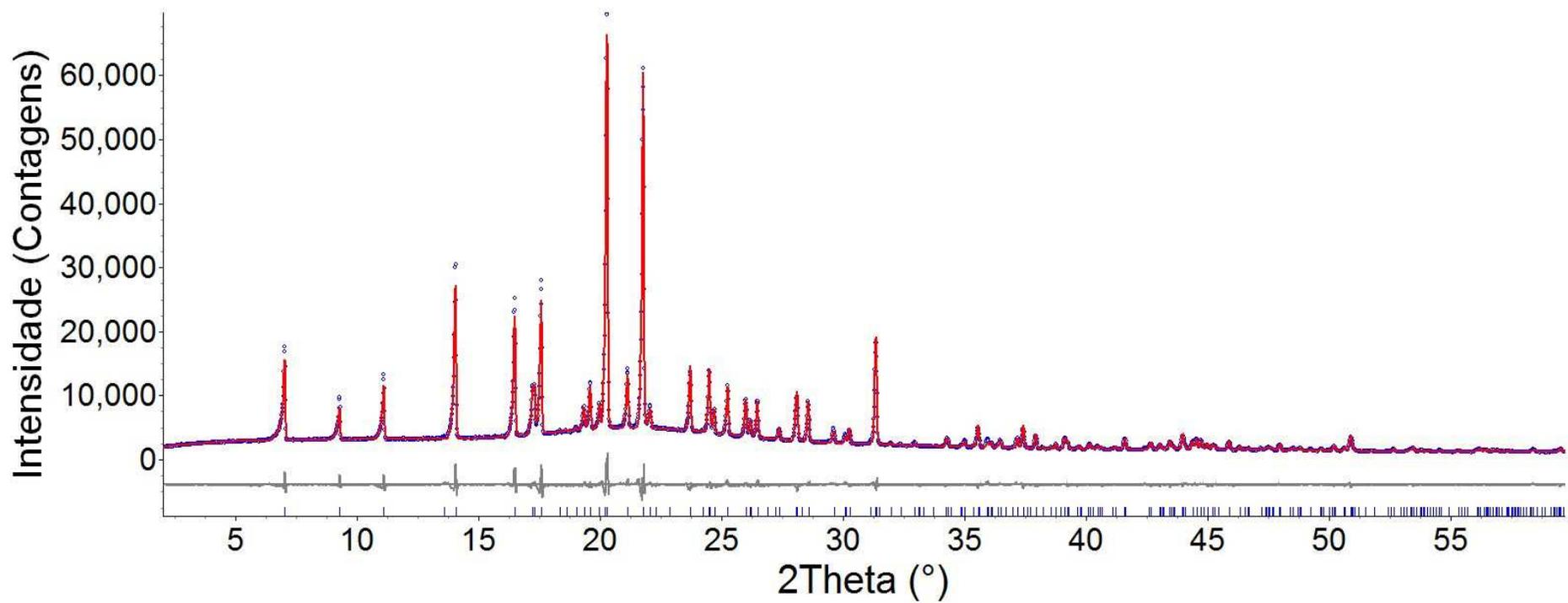


Figura IV.21 - Ajuste Rietveld para o LASSBio-1733 mostrando o bom acordo entre os dados experimentais (em azul) e o perfil calculado (em vermelho).

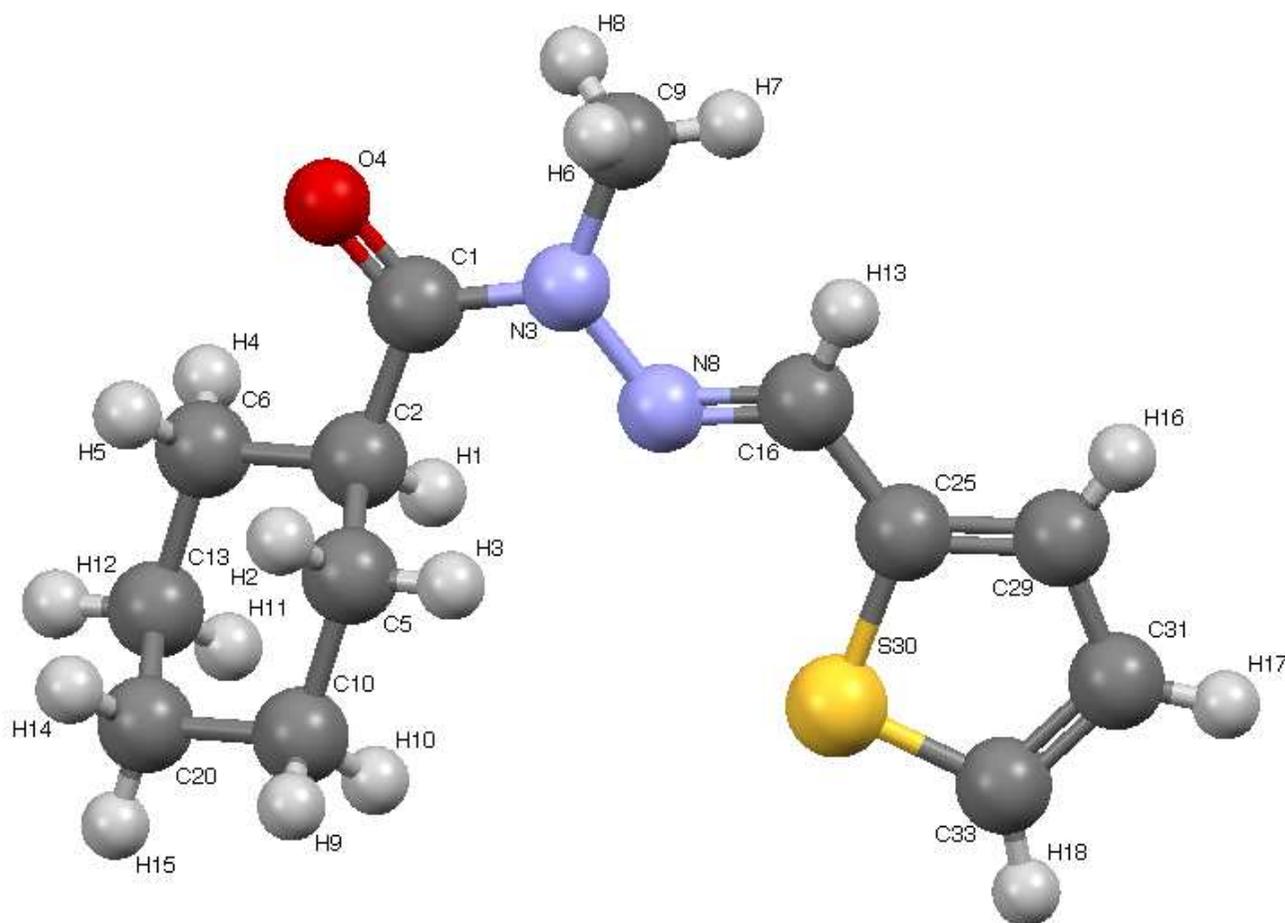


Figura IV.22 - Estrutura cristalina do LASSBio-1733. A configuração relativa *E* da dupla ligação imínica e a conformação cadeira da cicloexila, com substituição na posição equatorial e conformação dobrada, característica de compostos *N*-metilados.

Tabela IV.9 – Detalhes do refinamento Rietveld da estrutura cristalina de LASSBio-1733.

<i>Estrutura Cristalina</i>	
Nome do composto	(<i>E</i>)- <i>N</i> -metil- <i>N'</i> -(tiofen-2-il-metileno) ciclohexano-1-carbohidrazida
Fórmula química	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ OS
Peso molecular (g mol ⁻¹)	250,36
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (No. 19)
<i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	25,2049(13); 10,2952(6); 5,2333(3)
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90
Volume (Å ³)	1357,99(13)
<i>Z</i> ; <i>Z'</i>	4; 1
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1,2246(1)
μ (mm ⁻¹)	1,9983(2)
T (K)	298
<i>Coleta dos Dados</i>	
Difratômetro	STOE STADI-P CuK α ₁
Monocromador	Ge(111)
Comprimento de onda (Å)	1,54056
2 θ faixa (°)	2 – 60
Passo angular (°)	0,015
Tempo de integração (s/1,05°)	50
<i>Refinamento</i>	
R _{exp} (%)	1,791
R _{wp} (%)	4,528
R _{Bragg} (%)	2,168
χ^2	2,528
<i>d</i> -DW	0,501

A organização das moléculas de LASSBio-1733 em fase sólida, pode ser observada na Figura IV.23a. Não são observadas interações de hidrogênio clássicas¹⁰ como responsáveis pela formação do agregado cristalino. São observados apenas interações cujas distâncias são calculadas como sendo menores que a soma do raio de Van der Waals. Estas interações são de caráter mais fraco e pode-se sugerir que elas sejam as responsáveis pela agregação das moléculas em toda a rede (Figura IV.23b). Neste contexto ainda, é possível observar a sobreposição, provavelmente devido a interações do tipo π -stacking, entre a tiofenila e a função NAH. Pode-se inferir que estas interações também contribuem para a formação da rede, como mostra a Figura IV.24. As coordenadas fracionárias, que traduzem as posições dos átomos na cela unitária, bem como os parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($U_{iso} = B_{iso}/8\pi^2$) de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-1733, encontram-se dispostos na Tabela IV.10.

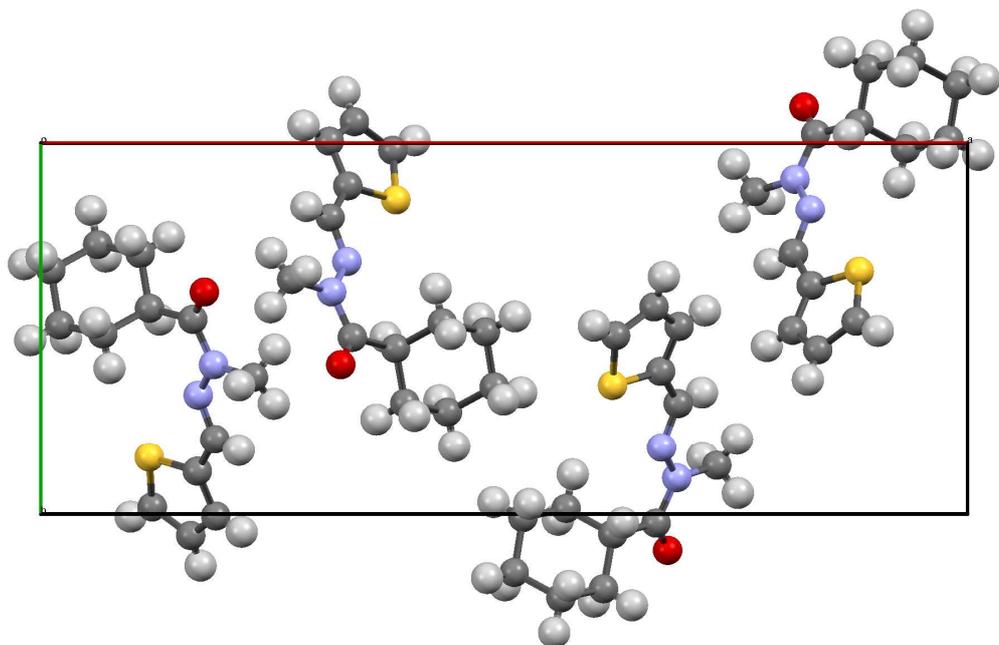
A estrutura cristalina (Figura IV.22) permitiu evidenciar aspectos estruturais do composto em fase sólida e assim foi caracterizado, de forma inequívoca, o diastereoisômero *E*. Além disso, também pode ser percebida a conformação do tipo cadeira para a cicloexila, com substituição na posição equatorial.

O ângulo de torção envolvendo os átomos C(2)-C(1)-N(3)-N(8) foi 9,23(3)°. Sob esta condição, a molécula está em uma conformação sinperiplanar (sp). Os ângulos de torção envolvendo os átomos N(3)-C(1)-C(2)-C(6), C(1)-N(4)-N(8)-C(16) e os átomos N(3)-N(8)-C(16)-C(25) foram, respectivamente, -164,2(2)°, -177,3(2)° e -177,9(2)°, adotando, neste caso, uma conformação antiperiplanar (ap).

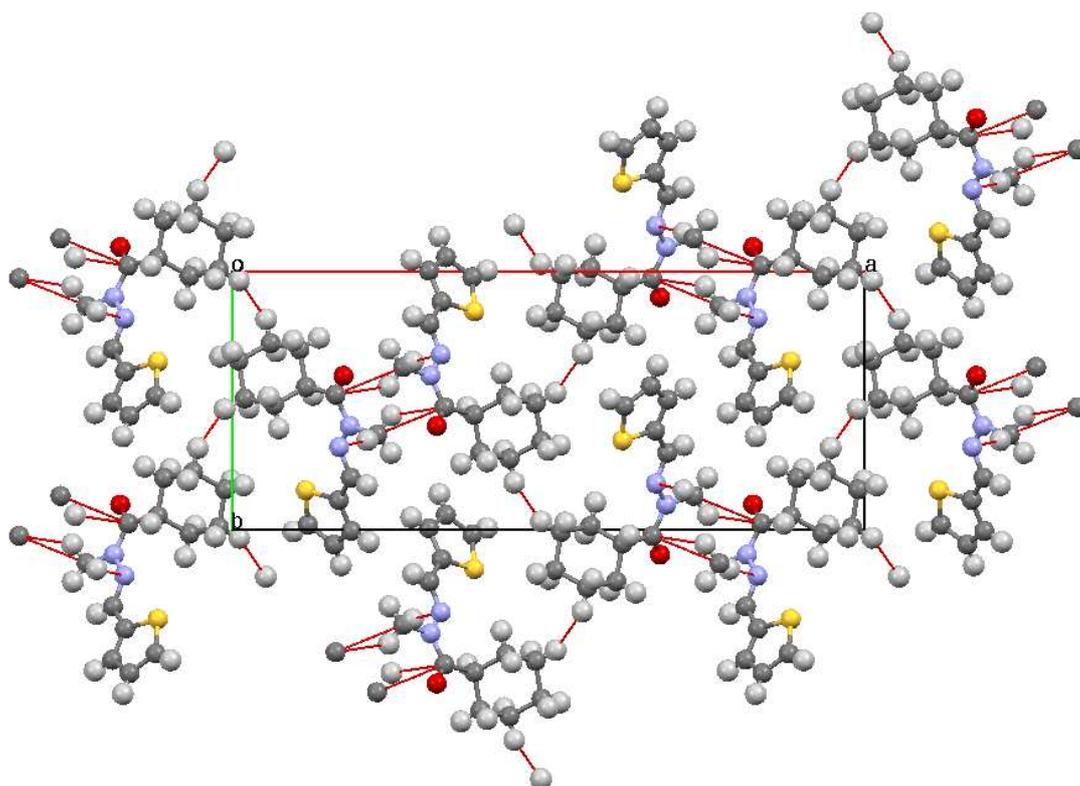
¹⁰ Um átomo aceptor (A), que possua um par de elétrons não ligado, pode interagir favoravelmente com um átomo doador (D) que carrega um hidrogênio ácido. A forma clássica deste tipo de interação requer que A e D sejam átomos eletronegativos (como por exemplo N, O e F). Se o átomo de H está ligado a um átomo muito eletronegativo, o H fica com uma carga parcial bastante positiva (ou ácido), e o outro átomo (D) fica com carga parcial negativa. Uma vez que o H é o menor átomo da tabela periódica, é possível que as duas moléculas entrem em contato muito próximo uma da outra. A combinação de alta polaridade da ligação H-D e o contato muito próximo resulta em uma interação particularmente forte que recebe o nome de interação de H. Nesta tese ligações do tipo C-H...N (muitas vezes considerado como um tipo de interação de H não-clássica, e este é um tema bastante controverso na literatura) não serão consideradas como interações de H.

Table IV.10 – Coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalente ($U_{iso} = B_{iso}/8\pi^2$) de todos os átomos da estrutura cristalina de LASSBio-1733.

Átomo	x/a	y/b	z/c	U_{iso}
C1	0,1639(11)	0,4758(26)	0,5769(43)	0,0686
C2	0,11723(98)	0,4462(17)	0,7515(37)	0,0686
N3	0,18624(84)	0,5975(22)	0,5822(44)	0,0686
O4	0,17640(50)	0,4026(14)	0,4073(28)	0,0686
C5	0,06680(71)	0,5150(17)	0,6571(35)	0,0686
C6	0,10713(80)	0,2996(18)	0,7766(31)	0,0686
N8	0,16977(62)	0,6793(16)	0,7725(38)	0,0686
C9	0,22936(68)	0,6310(18)	0,4059(40)	0,0686
C10	0,02030(75)	0,4907(16)	0,8401(34)	0,0686
C13	0,06123(77)	0,2754(20)	0,9644(37)	0,0686
C16	0,18777(79)	0,7983(20)	0,7833(36)	0,0686
C20	0,01071(67)	0,3435(18)	0,8693(30)	0,0686
C25	0,16876(94)	0,8849(23)	0,9793(50)	0,0686
C29	0,18877(73)	1,0053(21)	1,0433(39)	0,0686
S30	0,11691(27)	0,84708(57)	1,1769(12)	0,0686
C31	0,16169(89)	1,0575(24)	1,2513(36)	0,0686
C33	0,12020(71)	0,9809(19)	1,3390(33)	0,0686
H1	0,12801(98)	0,4767(17)	0,9177(37)	0,08232
H2	0,05798(71)	0,4846(17)	0,4961(35)	0,08232
H3	0,07398(71)	0,6068(17)	0,6571(35)	0,08232
H4	0,13790(80)	0,2554(18)	0,8355(31)	0,08232
H5	0,09690(80)	0,2650(18)	0,6110(31)	0,08232
H6	0,21390(68)	0,6529(18)	0,2440(40)	0,08232
H7	0,25130(68)	0,7022(18)	0,4593(40)	0,08232
H8	0,25220(68)	0,5563(18)	0,3990(40)	0,08232
H9	-0,01158(75)	0,5320(16)	0,7749(34)	0,08232
H10	0,02702(75)	0,5273(16)	1,0093(34)	0,08232
H11	0,06993(77)	0,3076(20)	1,1313(37)	0,08232
H12	0,05393(77)	0,1825(20)	0,9791(37)	0,08232
H13	0,21349(79)	0,8278(20)	0,6612(36)	0,08232
H14	0,00072(67)	0,3089(18)	0,7041(30)	0,08232
H15	-0,01838(67)	0,3283(18)	0,9866(30)	0,08232
H16	0,21661(73)	1,0476(21)	0,9575(39)	0,08232
H17	0,17230(89)	1,1382(24)	1,3375(36)	0,08232
H18	0,09681(71)	1,0070(19)	1,4811(33)	0,08232



a



b

Figura IV.23 – (a) Cella unitária de LASSBio-1733 (b) evidenciando as interações intermoleculares de caráter mais fraco (em vermelho), com distâncias menores que a soma do raio de van der Waals. Pode-se sugerir que estas interações contribuem para a organização das moléculas ao longo da rede cristalina.

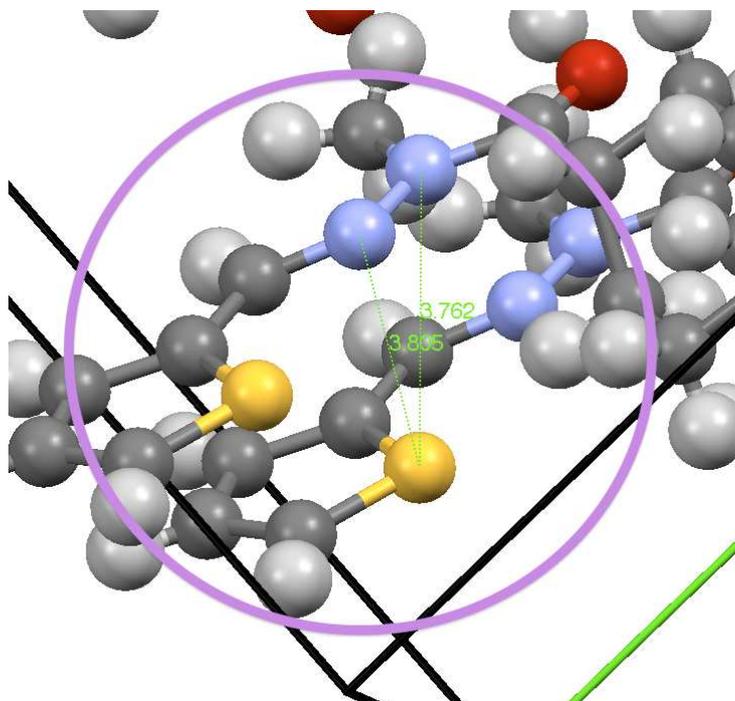


Figura IV.24 – Destaque para provável interação do tipo π -stacking envolvendo a função NAH e a tiofenila, com o comprimento das ligações $N(3)-S(30) = 3,76(2) \text{ \AA}$ e $N(8)-S(30) = 3,80(2) \text{ \AA}$.

Há, ainda, que se ressaltar que este composto difere de seu precursor, LASSBio-1515, quanto ao comportamento no estado sólido. LASSBio-1515 possui uma conformação estendida, onde o hidrogênio amídico está numa relação antiperiplanar com a carbonila da função NAH, enquanto que o composto *N*-metilado, LASSBio-1733 possui conformação dobrada, com a metila amídica em relação sinperiplanar à carbonila. Esta diferença pode ser visualizada na Figura IV.25.

Como foi sugerido, a *N*-metilação parece atuar no deslocamento do equilíbrio conformacional através de aspectos estéricos e eletrônicos. Isto porque o composto LASSBio-1733, diferente de LASSBio-1515, apresenta a forma *s-trans* amídica, preferencial em fase sólida, em relação a função NAH, possivelmente devido ao efeito estérico da *N*-metilação. Além disso, como já citado, este composto *N*-metilado, não realiza interações por ligação de H, apresentando somente interações intermoleculares de caráter apolares. A partir desta informação e conhecendo o fato que as interações intermoleculares estão intimamente relacionadas com certas propriedades dos

compostos, chama a atenção o diferente ponto de fusão observado para LASSBio-1733 em relação a LASSBio-1515.

O derivado *N*-metilado, possui baixo ponto de fusão, na faixa de 62-64 °C (LASSBio-1733), enquanto seu precursor não *N*-metilado possui ponto de fusão de 209-211 °C (LASSBio-1515)¹¹. A substituição do hidrogênio amídico pela metila parece contribuir para a diminuição da intensidade das interações intermoleculares que são responsáveis por propriedades físicas dos materiais. Entende-se que à medida que a intensidade das interações intermoleculares aumenta, há uma maior organização do sistema com a proximidade intermolecular. Portanto, podemos esperar que o ponto de fusão, por exemplo, seja maior para aquelas substâncias que possuam interações intermoleculares mais fortes e espera-se ponto de fusão menor para aquelas com interações intermoleculares mais fracas. Neste contexto, a perda de um sítio doador e receptor de H, importante para interações do tipo ligação de hidrogênio de LASSBio-1733, restringe o potencial de interações intermoleculares, desorganizando o sistema, favorecendo o afastamento entre moléculas resultando em um ponto de fusão mais baixo quando comparado com LASSBio-1515.

¹¹ O ponto de fusão destes compostos foram determinados em um aparelho Quimis modelo Q340.23 no LASSBio-UFRJ por Tiago Fernandes da Silva (SILVA, 2012).

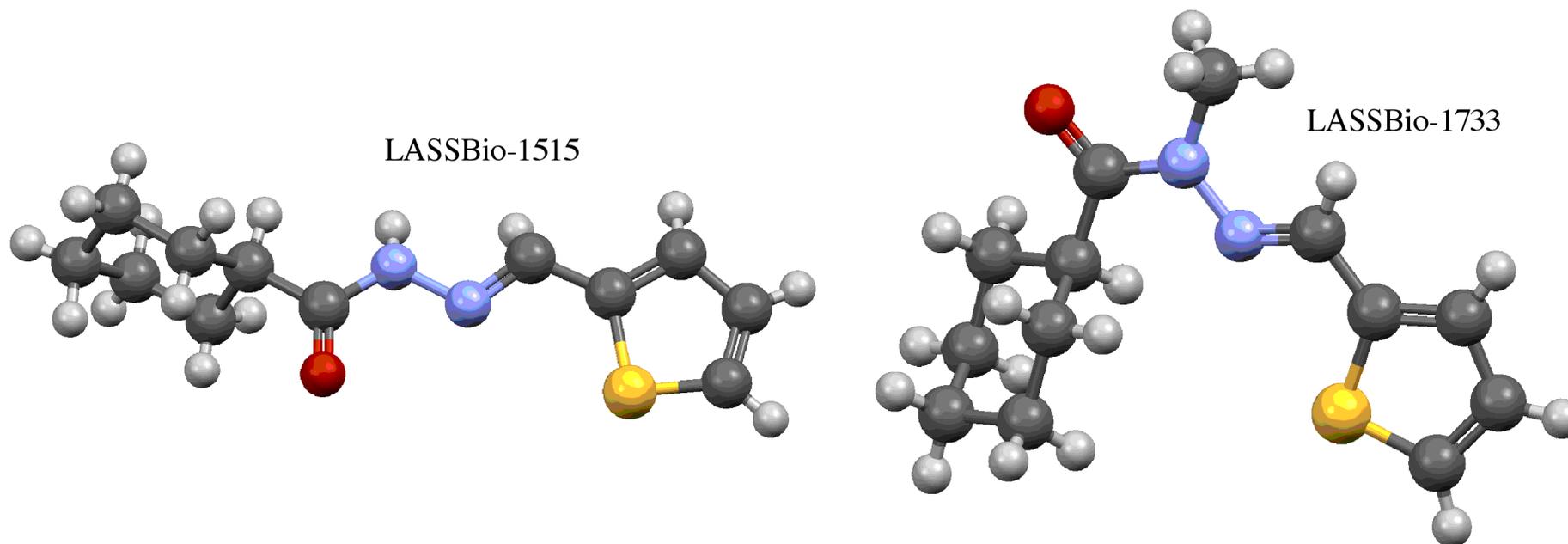


Figure IV.25 – Quanto aos aspectos estruturais, em fase sólida, a N-metilação de LASSBio-1515 levou a um dobramento na conformação de LASSBio-1733.

CAPÍTULO V

V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho permitiu a determinação da estrutura cristalina de cinco compostos candidatos a protótipo de novos fármacos. Este objetivo foi alcançado usando dados de difração de raios X por policristais, visto que para os compostos LASSBio-129, LASSBio-1515, LASSbio-1601 e LASSBio-1733 não foi possível a preparação do monocristal de tamanho, qualidade e estabilidade suficientes ao estudo por monocristal.

O LASSBio-294 foi o composto usado para validar a técnica frente aos compostos do *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas* (LASSBio), pois até então a técnica de DRXP não havia sido aplicada para os estudos de cristalografia dos compostos do referido laboratório. Como o LASSBio-294 é um composto bem conhecido e amplamente estudado no LASSBio e já havia sido objeto de avaliação por cristalografia de raios X por monocristal (KÜMMERLE *et al.*, 2009), a comparação entre as técnicas foi feita e então evidenciada a viabilidade do uso da DRXP como ferramenta para o estudo estrutural de outros derivados *N*-acilidrazônicos sintetizados no LASSBio.

A difração de raios X por policristais mostrou-se uma ferramenta importante na determinação de estruturas cristalinas de compostos *N*-acilidrazônicos. Esta técnica permitiu a inequívoca caracterização da diastereoisomeria *E* dos compostos em fase sólida, provendo informações para um entendimento mais completo em relação às propriedades farmacodinâmicas e físico-química dos mesmos. Ademais, a determinação estrutural através da DRXP proporcionou a observação da cela unitária dos compostos, informações estas que permitiram inferir quanto a organização mínima das moléculas e também visualizar interações intermoleculares de H e outros possíveis tipos interações, de caráter secundário, que contribuem para a formação do agregado cristalino dos compostos avaliados. Há que se destacar que a partir da análise das interações intermoleculares observou-se que a diminuição do ponto de fusão de LASSBio-1733, em relação a LASSBio-1515, pode estar relacionada com a introdução da metila em lugar do hidrogênio amídico, o que parece eliminar a possibilidade de que essa molécula

faça interações intermoleculares mais fortes como as de ligação de H, e assim promoveria tal fato.

O presente trabalho logrou êxito ao fornecer informações estruturais relevantes no que tange aos aspectos conformacionais de compostos NAH. Todas essas informações contribuem para uma melhor compreensão da relação estrutura-propriedades e podem ser agregadas também a estudos futuros visando a otimização das atividades farmacológicas destes compostos.

Pretende-se, ainda, continuar aplicando a técnica de difração de raios X de pó na unívoca caracterização dos compostos bioativos planejados e sintetizados no LASSBio. Ademais, a elucidação da estrutura cristalina de representantes das classes: ciclopentil-*N*- acilidrazônicos, ciclobutil-*N*-acilidrazônicos, ciclopropil-*N*-acilidrazônicos (Figura V.1) com o objetivo de confirmar de forma inequívoca a diastereoisomeria *E* dos compostos cicloalquil-*N*-acilidrazônicos, para uma melhor compreensão do perfil farmacodinâmico destes, já está em andamento.

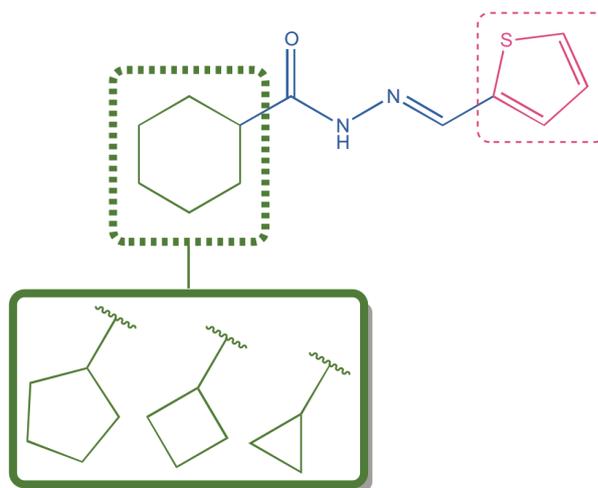


Figura V.1 - Representantes das classes ciclopentil-*N*-acilidrazônicos, ciclobutil-*N*-acilidrazônicos, ciclopropil-*N*-acilidrazônicos que poderão ser elucidados em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTS, E. H. L., KORST, J., 1991, *Simulated Annealing and Boltzmann Machines: a Stochastic Approach to Combinatorial Optimization and Neural Computing*, 2^a ed. Chichester, UK, John Wiley & Sons.
- ALBUQUERQUE, E. X., BARREIRO, E. J., SUDO, R. T., 2000, *3,4-methylenedioxybenzoyl- 2-thienylhydrazone, its derivatives and salts, useful for treating heart conditions, e.g. congestive heart failure or systolic dysfunction, and conditions associated with muscle fatigue, e.g. cancer*. Patente WO-200078754-A1.
- ALLEN, F. H., 2002, “The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising”, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci*, v. 58, pp. 380-388.
- ALS-NIELSEN, J., McMORROW, D., 2011, *Elements of modern X-ray physics*. 2^a ed. John Wiley & Sons, Ltda.
- ALTOMARE, A., BURLA, M. C., CASCARANO, G., *et al.*, 1996, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 29, pp. 341-345.
- ANDRADE, A., V., C., 2003, *Análises estrutural, nanoestrutural, e quantitativa de fases em materiais cerâmicos de interesse tecnológico, utilizando difração de raios x pelo método do pó*. Tese de D.Sc. Araraquara, SP, Brasil.
- ANTONIO, S. G., 2010, *Aplicação da difração de raios X por policristais e do método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas no estudo de polimorfos cristalinos de fármacos*. Tese de D.Sc., Instituto de Química/UNESP, Araraquara, SP, Brasil.
- ARION, D., SLUIS-CREMER, N., MIN, K., *et al.*, 2002, “Mutational analysis of Tyr-501 of HIV-1 reverse transcriptase”, *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 2, pp. 1370-1374.

- BALZAR, D., 1993, "X-Ray-diffraction line broadening - Modeling and applications to high- T_c superconductors", *J. Res. NIST*, 98, pp. 321-353.
- BARREIRO, E. J., 2013, "As Longas Pernas do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®; <http://www.farmacia.ufrj.br/lassbio>): Histórico e Perspectivas", *Revista Virtual de Química*, v. 5, no prelo.
- BARREIRO, E. J., 2009, "A Química Medicinal e o Paradigma do Composto Protótipo", *Revista Virtual de Química*, v.1, n.1, pp. 26-34.
- BARREIRO, E. J., 2002, "Estratégia de Simplificação Molecular no Planejamento Racional de Fármacos: A Descoberta de Novo Agente Cardioativo", *Química Nova*, v. 25, n. 6B, pp. 1172-1180.
- BARREIRO, E. J., 2011, "Lock-Key & Magic Bullets", Palestra apresentada na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, Brasil.
- BARREIRO, E. J., KUMMERLE, A. E., FRAGA, C. A., 2011a, "The methylation effect in medicinal chemistry", *Chem. Rev.*, v. 111, n. 9, p. 5215-46.
- BARREIRO, E. J., ALBUQUERQUE, M. G., SANT'ANA, C. M. R., *et al.*, 1997, "Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos na Química Medicinal", *Química Nova*, v. 20, n. 3, pp. 300-310.
- BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., MIRANDA, A. L. P., *et al.*, 2002, *Química Nova*, v.25, n.1, pp.129.
- BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., 2005, "A Questão da Inovação em Fármacos no Brasil: Proposta de Criação do Programa Nacional de Fármacos (PRONFAR)", *Química Nova*, v. 28, pp. S56-S63.

- BARREIRO, E. J., MANSSOUR, C. A. M., 2001, *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*. 2ª ed. pp. 83-122. Porto Alegre, Art Med Editora Ltda.
- BLEICHER, L., SASAKI, J. M., 2000, *Introdução à difração de raios X em cristais*. Fortaleza, Publicação da Universidade Federal do Ceará.
- BORGES, F. S., 1996, *Elementos de Cristalografia*. 2ª ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- BOSQUESI, P. L., MELO, T. R. F., VIZIOLI, E. O., *et al.*, 2011, “Anti-Inflammatory Drug Design Using a Molecular Hybridization Approach”, *Pharmaceuticals*, v. 4, pp. 1450-1474.
- BOTEZ, C. E., STEPHENS, P. W., NUNES, C., *et al.*, 2003, “Crystal structure of anhydrous delta-d-mannitol”, *Powder Diffr.*, v. 18, n. 3, pp. 214-218.
- BOULTIF, A., LOUER, D., 1991, “Indexing of powder diffraction patterns for low symmetry lattices by the successive dichotomy method”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 24, pp. 987.
- BRUNO, I. J., COLE, J. C., KESSLER, M., *et al.*, 2004, "Retrieval of crystallographically-derived molecular geometry information", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 44, pp. 2133–2144.
- BURGER, A. A., 1983, *Guide to the Chemical Basis of Drug Design*. pp. 24-29. New York, Wiley.
- BYRN, S., PFEIFFER, R., GANEY, M., *et al.*, 1995, “Pharmaceutical Solids: A Strategic Approach to Regulatory Considerations”, *Pharm. Res.*, v. 12, n.7, pp. 945-954.

- CALISTER Jr. W. D., 1994, *Materials Science and Engineering, an introduction*. 3^a ed. Wiley.
- CALIXTO, J. B., SIQUEIRA JR., J. M., 2008, “Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios”, *Gazeta Médica da Bahia*, v.78 (Suplemento 1), pp. 98-106.
- CHEARY, R. W., COELHO, A. A., 1998a, “Axial divergence in a conventional X-ray powder diffractometer. I. Theoretical foundations”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 31, pp. 851–861.
- CHEARY, R. W., COELHO, A. A., 1998b, “Axial divergence in a conventional X-ray powder diffractometer. II. Realization and evaluation in a fundamental-parameter profile fitting procedure”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 31, pp. 862–868.
- CHERNYCHEV, V. V., 2001, “Structure determination from powder diffraction” *Russ. Chem. Bull.*, v. 50, n.12, pp. 2273-2292.
- COELHO, A., *Topas Academic v4.1*, in, Coelho Software, Brisbane, Australia, 2007.
- COELHO, A., *Topas Academic v5*, in Coelho Software, Brisbane, Australia, 2012.
- COELHO, A. A., 2003, “Indexing of powder diffraction patterns by iterative use of singular value decomposition”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 36, pp. 86–95.
- COPPENS, P., 1992, *Synchrotron Radiation Crystallography*. New York, Academic Press.
- COSTA, L. M. M., 2008, *Estudo do Perfil Antiagregante Plaquetário de uma Nova Série de Derivados N-Acildrazônicos Otimizados a partir do Derivado LASSBio-129*. Dissertação de M. Sc., Faculdade de Farmácia/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- CULLITY, B. D., 2001, *Elements of X-Ray Diffraction*. 2^a ed. Addison-Wesley Publishing Company Inc.
- DAVID, W. I. F., SIVIA, D. S., 2001, “Background estimation using a robust Bayesian analysis”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 34, pp. 318-324.
- DAVID, W. I. F., SHANKLAND, K., VAN DE STREEK, J., *et al.*, 2006, “DASH: a program for crystal structure determination from powder diffraction data”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 39, pp. 910-915.
- DAVID, W. I. F., SHANKLAND, K., 2008, “Structure determination from powder diffraction data”, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, v. A64, pp.52–64.
- DIAS, R. L. A., CORRÊA, A. G., 2001, “Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos”, *Química Nova*, v. 24, n. 2, pp. 236-242.
- DINNEBIER, R. E., BILLINGE, J. L., 2008, *Powder Diffraction – Theory and Practice*. 1^a ed. Royal Society of Chemistry.
- DOLLASE, W. A., 1986, “Correction of Intensities for Preferred Orientation in Powder Diffractometry: Application of the March Model”, *J. Appl. Crystallogr.*, v.19, pp. 267-272.
- DREWS, J., 2000, “Drug Discovery: A Historical Perspective”, *Science*, v. 287, n. 5460, pp. 1960-1964.
- DUARTE, C. M., 2006, *Novos Derivados N-Acildrazônicos Planejados como Candidatos a Fármacos Analgésicos e Antiinflamatórios*. Tese de D.Sc., Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- DUARTE, C. D., BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., 2007a, "Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates", *Mini-Rev. Med. Chem.*, v. 7, pp. 1108-1119.
- DUARTE, C. M., TRIBUTINO, J. L. M., LACERDA, D. I., *et al.*, 2007b, "Synthesis, pharmacological evaluation and electrochemical studies of novel 6-nitro-3,4-methylenedioxyphenyl-*N*-acylhydrazone derivatives: Discovery of LASSBio-881, a new ligand of cannabinoid receptors", *Bioorg. Med. Chem.*, v. 15, n. 6, pp. 2421-2433.
- ERGENÇ, N., GÜNEY, N. S., 1998, "Synthesis and antidepressant evaluation of new 3-phenyl-5-sulfonamidoindole derivatives", *Eur. J. Med. Chem.*, v. 33, n. 2, pp. 143-148.
- EVANS, B. E., RITTLE, K. E., BOCK, M. G., *et al.*, 1988, "Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystokinin Antagonists", *J. Med. Chem.*, v. 31, pp. 2235.
- FAVRE-NICOLIN, V., CERNY, R., 2002, "*FOX*, 'free objects for crystallography': a modular approach to *ab initio* structure determination from powder diffraction" *J. Appl. Cryst.*, v. 35, pp. 734-743.
- FERREIRA, F. F., GRANADO, E., CARVALHO JR., *et al.*, 2006. "X-ray powder diffraction (XPD) beamline at D10B in LNLS: application to Ba₂FeReO₆ double perovskite", *J. Synchrotron Radiat.*, v. 13, pp. 46-53.
- FERREIRA, F. F., SILVA, E. G. M., 2009, *Manual da Linha D10B-XPD*. LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.
- FRAGA, A. G. M., 2010, *Avaliação do perfil metabólico in silico// in vitro de novo protótipo acilidrazônico cardioativo*. Tese de D.Sc., Programa de Pós-graduação em Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil..

- FRAGA, C. A. M., BARREIRO, E. J., 2006, "Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: New lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs", *Curr. Med. Chem.*, v. 13, n. 2, pp. 167-198.
- GALVÃO, A. S., 2011, *Desenvolvimento de amostras padrão de referência para difratometria*. Dissertação de M.Sc. IPEN, São Paulo, SP, Brasil.
- GANELLIN, C. R., 1990, *Chronicles of Drug Discovery*; Lednicer, D., ed.; Wiley: Nova Iorque, 1990.
- GIRON, D., EDEL, B., PIECHON, P., 1990, "X-ray quantitative determination of polymorphism in pharmaceuticals", *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol., Sect. A*, v. 187, pp. 297-307.
- GLUSKER, J.P., TRUEBLOOD, K.N., 2010, *Crystal structure analysis: a primer*. 3^a ed. pp. 3-8. New York, IUCr/ Oxford University Press Inc.
- GONZALEZ-SERRATOS, H., CHANG, R., PEREIRA, E. F. R., *et al.*, 2001, "A novel thienylhydrazone, (2-thienylidene)3,4-methylenedioxybenzoylhydrazine, increases inotropism and decreases fatigue of skeletal muscle", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 299, n. 2, pp. 558-566.
- HAMMOND, C., 2009, *The Basics of Crystallography and Diffraction*. 3^a ed. pp. 192. New York IUCr/Oxford University Press Inc.
- HARRIS, K. D. M., 2002, "Structure determination of molecular materials from powder diffraction data", *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, v.6, pp.125-130.
- HARRIS, K. D. M., TREMAYNE, M., KARIURI, B. M., 2001, "Contemporary advances in the use of powder X-ray diffraction for structure determination", *Angew. Chem. Int. Ed.*, v.40, pp.1626.

- HITZEMANN, R., 1988, "Thermodynamic aspect of drug-receptor interactions", *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 9, p. 408-409.
- HOFMANN, D. W. M., 2002, "Fast estimation of crystal densities", *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, v. 58, pp. 489-493.
- ITC, 2003, *International Tables for Crystallography, Volume D: Physical Properties of Crystals*. 1^a ed. IUCr.
- ITC, 2004, *International Tables for Crystallography, Volume C: Mathematical, Physical and Chemical*. 3^a ed. IUCr.
- IUPAC, 2007, *Compendium of Chemical Terminology*, 2^a ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8.
- JENKINS, R., SNYDER, R. L., 1996, *Chemical Analysis Introduction to X-ray Powder Diffractometry*, v. 138, New York, John Wiley & Sons, Inc.
- JÄRVINEN, M. J., 1993, "Application of Symmetrized Harmonics Expansion to Correction of the Preferred Orientation Effect", *J. Appl. Crystallogr.*, v. 26, pp. 525-531.
- KHATTAK, C. P., COX, D. E., 1977, "Profile Analysis of X-ray Powder Diffractometer Data: Structural Refinement of $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{CrO}_3^*$ ", *J. Appl. Crystallogr.*, v. 10, pp. 405-411.
- KING, F. D., 1994, *In Medicinal Chemistry: Principles and Practice*, Inglaterra, The Royal Society of Chemistry.

- KLUG, H. P., ALEXANDER, L. E., 1974, *X-ray Diffraction Procedures: For Polycrystalline And Amorphous Materials*, New York, John Wiley.
- KOCH, E. E., 1983, *Handbook of Synchrotron Radiation*. Amsterdam, North-Holland.
- KÜMMERLE, A. E., 2005, Síntese de compostos cardioativos 1,3-benzodioxolil-N-acilidrazônicos planejados por otimização estrutural do protótipo LASSBio-294. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- KÜMMERLE, A. E., RAIMUNDO, J. M., LEAL, C. M., *et al.*, 2009, “Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N-acylhydrazone derivatives”, *Eur. J. Med. Chem.*, v. 44, n. 10, pp. 4004-4009.
- KUPLICH, L., 2004, *Estudos sobre o CaC₂O₄.H₂O presente em pedras de rins*. Dissertação de M.Sc., Programa de Pós-Graduação em Física/UFES, Vitória, ES, Brasil.
- LE BAIL, A., DUROY, H., FOURQUET, J. L., 1988, “Ab-initio structure determination of LiSbWO₆ by X-ray powder diffraction”, *Mater. Res. Bull.*, v. 23 n. 3, pp. 447-452.
- LIMA, L. M., 2007, “Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira”, *Química Nova*, v. 30, n. 6, pp. 1456-1468.
- LIMA, L. M., BARREIRO, E. J., 2005, “Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design”, *Curr. Med. Chem.*, v. 12, n.1, pp. 23-49.
- LINDSAY, M. A., 2003, “Target discovery”, *Nat. Rev. Drug Discovery*, v. 2, n. 10, pp. 831-838.

LNLS, *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron*, disponível em: www.lnls.cnpem.br, acessado em 07 de Março de 2013.

LONSDALE, K., 1928, "The structure of the benzene ring", *Nature*, v. 122, pp. 810.

LOPES, A. B., 2010, *Síntese e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de compostos fenil-pirimidina-N-acilidrazonas planejados a partir de derivados imidazo[1,2a]piridina-N-acilidrazonas*. Dissertação de Msc, LASSBio/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MACRAE, C. F., BRUNO, I. J., CHISHOLM, J. A., *et al.*, 2008, "Mercury CSD 2.0–new features for the visualization and investigation of crystal structures", *J. Appl. Crystallogr.*, v. 41, 466-470.

MAIA, D. F. S., 2003, *Estudos Estruturais de Pequenas e Médias Moléculas por Difração de Raios X em Monocristais*. Dissertação de M.Sc.UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

MAIA, R. C., 2008, *Novos derivados quinazolinônicos planejados como análogos conformacionalmente restrito de n-acilidrazonas bioativas*. Dissertação de M.Sc., IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MASCIOCCHI, N., 1997, "The contribution of powder diffraction methods to structural crystallography. Rietveld and ab-initio techniques", *The Rigaku Journal*, v.14, n.2, pp.9-20.

MCCUSKER, L. B., VON DREELE, R. B., COX, D. E., *et al.*, 1999, "Rietveld refinement guidelines", *J. Appl. Crystallogr.*, v. 32, pp. 36-50.

- MENDEN, A., 1998, "Crystal Structure Solution from Powder Diffraction Data – State of the Art and Perspectives", *Croat. Chem. Acta*, v. 71, n. 3, pp. 615-633.
- METROPOLIS, N., ROSENBLUNTH, A., ROSENBLUNTH, M., *et al.*, 1953, "Equation of State Calculations by Fast Computing Machines", *J. Chem. Phys.*, v. 21, 1087.
- MIRANDA, A. L. P., LIMA, P. C., TRIBUTINO, J. L. M., *et al.*, 2002, "Antiinflammatory, analgesic and anti-platelet properties of LASSBio-294, a new thienylacylhydrazone derivative", *Abstracts du 6ème Congrès Annuel de la Société Française de Pharmacologie*, P296; Rennes, França.
- MIRANDA, A. L. P., SOLER, O., FREITAS, A. C. C., *et al.*, 1994, "New pyrazolylhydrazone derivatives as inhibitors of platelet-aggregation", *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 72, supl. 1, pp. 210-215.
- MORALES, M., "X-ray diffraction: an overview of the technique". 2nd Training Workshop, Madrid, Espanha, Agosto, 2010. Disponível em: <www.ecole.ensicaen.fr/~chateign/formation/>. Acessado em: 18 e Março de 2013.
- MORPHY, R.; KAY, C.; RANKOVIC, Z., 2004, "From magic bullets to designed multiple ligands", *Drug Discov. Today*, v. 9 (15), p. 641-51, 2004.
- MURCKO, M. A., CARON, P. R., CHARIFSON, P. S., 1999, "Structure-based drug design", *Annu. Rep. Med. Chem.*, v. 34, p. 297-306.
- NOGUEIRA, L. J., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., 2009, "Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch", *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 3, pp. 227-240.

- ORMELLI, C. B., 1999, *Estudo do mecanismo de ação da atividade antiagregante plaquetária de derivados heterocíclicos arilidrazônicos, acilidrazônicos e sulfonilarilidrazônicos*. Dissertação de M.Sc., Faculdade de Farmácia/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PAIVA-SANTOS, C. O., 2009, “Aplicações do Método de Rietveld”, *Disponível no website: http://labcacc3.iq.unesp.br/PDF/Aplicacoes_do_Metodo_de_Rietveld.pdf*
- PATANI, G. A., LA VOIE, E. J., 1996, “Bioisosterism: a rational approach in drug design”, *Chem. Rev.*, v.96, pp. 3147-3176.
- PATCHETT, A. A.; NARGUND, R. P., 2000, “Chapter 26. Privileged structures — An update”, *Annu. Rep. Med. Chem.*, v, 35, pp. 289.
- PAWLEY, G. S., 1981, “Unit-cell refinement from powder diffraction scans”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 14, pp. 357-361.
- PERSCHAR, R., SCHENK, H., CAPKOVA, P., 1995, “Preferred-Orientation Correction and Normalization Procedure for *Ab Initio* Structure Determination from Powder Data”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 28, pp. 127-140.
- PECHARSKY, V. K., ZAVALIJ, P. Y., 2005, *Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials*, 1^a ed. New York, Springer Science+Business Media, Inc.
- POROB, D. G., ROW, T. N. G., 2001, “Ab initio structure determination via powder X-ray diffraction”, *P. Indian As-Chem Sci*, v. 113, n. 44, pp. 435.
- RAVINA, H., 2011, *The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs*. 1^a ed. pp.16. Wiley-VCH.
- ROLLAS, S., KÜÇÜKGÜZEL, S. G., 2007, “Biological activities of hydrazones derivatives”, *Molecules*, v.12, pp. 1910-1939.

- RODRIGUES, A., P., C., 2008, *Otimização Estrutural do Protótipo 2-furanyl-1,3-benzodioxolil-N-Acildrazônico LASSBio-129*. Dissertação de M.Sc., LASSBio/Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- RIETVELD, H. M., 1967, “Line profiles of neutron powder-diffraction peaks for structure refinement”, *Acta Crystallogr.*, v. 22, pp. 151-152.
- RIETVELD, H. M., 1969, “A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 2, pp. 65-71.
- ROENTGEN, W. C., 1895, “Über eine neue Art von Strahlen (Vorläufige Mitteilung). *Sitzungsberichte der physikalisch-medizinischen Gesellschaft zu Würzburg*, v. 9, pp. 132.
- SANT’ANNA, C. M. R., 2002, “Glossário de Termos Usados no Planejamento de Fármacos”, *Química Nova*, v.25, n. 3, pp. 505-512.
- SANTOS, A. O., 2006, *Difração de raios-X de n-feixes na caracterização estrutural de monocristais sob a ação de temperatura e campo elétrico externo*. Tese de D.Sc., Instituto de Física “Gleb Wataghin”/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- SANTOS, C. M., 2011, *Síntese e caracterização de compostos $HoMn^I - X(Ni,Co)XO^3$* , Tese de D.Sc., Faculdade de Ciências/UNESP, Bauru, SP, Brasil.
- SETTI, E. L., MICETICH, R., 1996, “Modern drug design and lead discovery: an overview”, *Curr. Med. Chem.*, v.3, n. 5, pp. 317-324.
- SHMUELI, U., 2007, *Theories and Techniques of Crystal Structure Determination*. 1^a ed. pp. 91-100. New York, IUCr, Oxford University Press Inc.

- SILVA, T. F., 2012, *Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de uma nova série de derivados cicloalquil-N-acilidrazônicos: análogos de LASSBio-294*. Dissertação de M.Sc, Programa de Pós-graduação em Química/LASSBio/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SILVA, C. L. M., NOËL, F., BARREIRO, E. J., 2002, “Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio-294 in rat aorta”, *Brit. J. Pharmacol.*, v. 135, n. 1, pp. 293-298.
- SILVA, A. G., ZAPATA-SUDO, G., KÜMMERLE, A. E., *et al.*, 2005, “Synthesis and vasodilatory activity of new *N*-acylhydrazones derivatives, designed as LASSBio-294 analogues”, *Bioorg. Med. Chem.*, v. 13, n. 10, pp. 3431-3437.
- SNEADER, W., 2005, *Drug Discovery: A History*. 1^a ed. pp. 472, Wiley-Interscience.
- SNIDER, D. A., ADDICKS, W., OWENS, W., 2004, “Polymorphism in generic drug product development”, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v.56, pp. 391-395.
- SPEK, A. L., 2003, “Single-crystal structure validation with the program PLATON”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 36, pp. 7-13.
- STEPHENSON, G. A., 2005, “Applications of X-Ray powder diffraction in the pharmaceutical industry”, *The Rigaku Journal*, v. 22, n. 1, pp. 2-15.
- STEPHENSON, G. A., FORBES, R. A., REUTZEL-EDENS, S. M., 2001, “Characterization of solid state: quantitative issues”, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 48, pp. 67-90.
- STOICHEFF, B. P., 1954, “High resolution Raman spectroscopy of gases. II. Rotational spectra of C₆H₆ and C₆D₆ and internuclear distances in the benzene molecule”, *Can. J. Phys.*, v. 32, pp. 339–346.

- SUDO, R. T., ALBUQUERQUE, E. X., BARREIRO, E. J., *et al.*, “Thienylhydrazon with digitalis-like properties (positive inotropic effects)”, Patent Assignee University of Maryland, Application Number 10/070,328, US Patent 7,091,238 B1, 15 August 2006.
- SUDO, R. T., ZAPATA-SUDO, G., BARREIRO, E. J., 2001, “The new compound, LASSBio- 294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from wistar rats”, *Brit. J. Pharmacol.*, v. 134, n. 3, pp. 603-613.
- SUORTTI, P., 1972, “Effects of porosity and surface roughness on the X-ray intensity reflected from a powder specimen”, *J. Appl. Crystallogr.*, v. 5, pp. 325-331.
- TERZIOGLU, N., GÜRSOY, A., 2003, “Synthesis and anticancer evaluation of some new hydrazone derivatives of 2,6-dimethylimidazo [2,1-b]-[1,3,4]thiadiazole-5-carbohydrazide”, *Eur. J. Med. Chem.*, v. 38, n. 7-8, pp. 781-786.
- THORNBUR, C. W., 1957, “Isosterism and molecular modification in drug design”, *Chem. Soc. Rev.*, v. 8, pp. 563-580.
- TOBY, B. H., 2006, “R factors in Rietveld analysis: How good is good enough?”. *Powder Diffr.*, v.21, pp. 67-70.
- TORAYA, H., 2001, “Crystal structure analysis using high-resolution synchrotron radiation powder diffraction data”, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, v.1, n.10, 903.
- VAN LAARHOVEN, P. J. M., AARTS, E. H. L., 1992, *Simulated Annealing: Theory and Applications*, 4^a ed. Dordrecht, Holland, Kluwer Academic Publishers.
- VIEGAS-JÚNIOR, C., DANUELLO, A., BOLZANI, V. S., *et al.*, 2007, “Molecular hybridization: a useful tool in the desing of new drug prototypes”, *Curr. Med. Chem.*, v. 14, n.17, pp. 1829-1852.

VISSER, J. W., 1969, "A fully automatic program for finding the unit cell from powder data", *J. Appl. Crystallogr.* v. 2, pp. 89.

VON DREELE, R. B., 1998, "Quantitative texture analysis by Rietveld refinement", *J. Appl. Crystallogr.* v. 30, pp. 517-525.

WEBSITE <<http://www.fotonblog.com/2011/01/via-agencia-fapesp-dezenove.html>>, acessado em 22 de Maio de 2012.

WEBSITE <<http://www.gly.uga.edu/Schroeder/geol6550/millerindices.html>>, acessado em 23 de maio de 2012.

WEBSITE <http://www.cimm.com.br/portal/material_didatico>, acessado em 28 de Maio de 2012.

WERMUTH, C. G., 1996, *The Practice of Medicinal Chemistry*. 1^a ed. New York, Academic Press.

WERMUTH, C. G., GANELLIN, C. R., LINDENBERG, P , *et al.* Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations, 1997) . In *Annual Reports In Medicinal Chemistry* (Adam , J. , Ed.) . Academic Press San Diego, CA, 1998, pp. 385 – 395.

WERMUTH, C. G., 2004, "Selective optimization of side activities: another way for drug discovery", *J. Med. Chem.*, v. 47, pp. 1303-1314.

WERMUTH, C. G., 2006, "Similarity in drugs: reflections on analogue design", *Drug Discover. Today*, v. 11, n. 7-8, pp. 348-354.

WERMUTH, C. G., 2008, *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3^a ed. New York, Academic Press.

- WERMUTH, C. G., 2003, *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2^a ed. London, Academic Press.
- WERNER, P. E., ERIKSON, L., WESTDAHL, M., 1985, "A semi-exhaustive trial-and-error powder indexing program for all symmetries", *J. Appl. Crystallogr.*, v. 18, pp. 367.
- YONEDA, J. D. L., 2007, "Cânfora: Um bom modelo para ilustrar técnicas de RMN", *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 2053-2056.
- YOUNG, R. A., 1993, *The Rietveld Method*. 1^a ed. pp. 1-7. New York, Oxford University Press.
- YOUNG, R. A., DESAI, P., 1989, *Archiwun Nauki o Materialach*, pp. 71-90.
- YOUNG, R. A., 1995, *The Rietveld Method*, 2^a ed. New York, Oxford University Press Inc.
- YOUNG, R. A., SAKTHIVEL, A., 1988, "Bimodal distributions of profile-broadening effects in Rietveld refinement", *J. Appl. Crystallogr.*, 21, pp. 416-425.
- YUNES, R. A., PEDROSA, R. C., CECHINEL FILHO, V., 2001, "Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil", *Química Nova*, v. 24, n^o 1, pp. 147-152.
- ZHOU, Z., MADURA, J. D., 2004, "CoMFA 3D-QSAR analysis of HIV-1 RT nonnucleoside inhibitors, TIBO derivatives based on docking conformation and alignment", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 44, n. 6, pp. 2167-2178.

APÊNDICE A

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

1. F.N. Costa, D. Braz, F.F. Ferreira, T.F. da Silva, E.J. Barreiro, L.M. Lima, M.V. Colaço, L. Kuplich and R.C. Barroso, "Synchrotron X-ray powder diffraction data of LASSBio-1515: A new N-acylhydrazone derivative compound", Radiation Physics and Chemistry.Synchrotron, Elsevier, artigo aceito em 08 de Fevereiro de 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2013.02.014>. Indexado no JCR (Journal of Citation Report), ISSN: 0969-806X, Fator de Impacto: 1.227. Classificação Qualis: A1.
2. M.V. Colaço, R.C. Barroso, I.M. Porto, R.F. Gerlach, F.N. Costa, D. Braz, R. Droppa Jr.and F.B. de Sousa, "Synchrotron X-ray diffraction characterization of healthy and fluorotic human dental enamel", Radiation Physics and Chemistry, Elsevier, artigo aceito em 15 de Maio de 2012 e publicado em 01 de Junho de 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.05.011>. Indexado no JCR (Journal of Citation Report), ISSN: 0969-806X, Fator de Impacto: 1.227. Classificação Qualis: A1.

Trabalho completo publicado em anais de eventos:

- COLACO, M. V., BARROSO, R.C., PORTO, I.M., GERLACH, R.F., COSTA, F.N., BRAZ, D. "Comparison between powder and slices diffraction methods in teeth samples". In: 2011 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011, 2011, Belo Horizonte. Proceedings of INAC 2011. ABEN, 2011. v.CD.

Resumos publicados em anais de eventos:

1. COSTA, F.N., BRAZ, D., FERREIRA, F. F., Da SILVA, T. F., BARREIRO, E. J., KUPLICH, L., COLACO, M. V., BARROSO, R.C. "Structure Determination

- of LASSBio-1515: A New Lead-Compound Candidate of the *N*-Acylhydrazone Class”. In: 23^a Reunião Anual de Usuários do LNLS/CNPEM, 2013, Campinas. Resumos de Trabalhos Científicos. , 2013. v.23.
2. F.N. COSTA, FERREIRA, F. F., SILVA, T. F., BARREIRO, E. J., LIMA, L. M., BRAZ, D., BARROSO, R.C. “Structure Determination of LASSBio-294: A Bioactive Compound of the NAH class”. In: 13th European Powder Diffraction Conference, 2012, Grenoble. Book of Abstracts. , 2012. v.01. p.23.
 3. F.N. COSTA, BRAZ, D., FERREIRA, F. F., Da SILVA, T. F., BARREIRO, E. J., COLACO, M. V., KUPLICH, L., BARROSO, R.C. “Synchrotron X-ray Powder Diffraction Data of LASSBio-1515”. In: International Symposium on Radiation Physics - ISRP 2012, 2012, Rio de Janeiro. Abstracts, 2012.
 4. KUPLICH, L., F.N. COSTA, M.T.D. ORLANDO, BARROSO, R.C. “XRPD And Thermal Decomposition of Whewellite Kidney Stones”. In: nternational Symposium on radiation Physics - ISRP 2012, 2012, Rio de Janeiro. Book of Abstract, 2012.
 5. KUPLICH, L., BARROSO, R.C., F.N. COSTA, M.T.D. ORLANDO. XRPD and Thermal Decomposition of Whewellite Kidney Stones”. In: 13th European Powder Diffraction Conference, 2012, Grenoble. Book of Abstract, 2012.
 6. COLACO, M. V., BARROSO, R.C., DROPPA JR., R., COSTA, F.N., BRAZ, D., GERLACH, R.F., PORTO, I.M. “Comparison between powder and slices diffraction methods in teeth samples”. In: Encontro de Física 2011, 2011, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos SBF 2011. São Paulo: SBF, 2011. p.1972.
 7. COLACO, M. V., BARROSO, R.C., PORTO, I.M., GERLACH, R.F., COSTA, F.N., BRAZ, D., DROPPA JR., R. “XRD Analysis of Human Dental Tissues Using Synchrotron Radiation”. In: XXII International Congress and General Assembly of the IUCr, 2011, Madrid. Book of Abstracts XXII IUCr. IUCr, 2011. v.CD. p.MS37.P11.

8. COLACO, M. V., BARROSO, R.C., PORTO, I.M., GERLACH, R.F., COSTA, F.N., BRAZ, D., DROPPA JR., R. “XRD Analysis of Human Dental Tissues Using Synchrotron Radiation”. In: Joint ICTP-KFAS Conference on Nanotechnology for Biological and Biomedical Applications (Nano-Bio-Med), 2011, Trieste. Book of Abstracts of Nano-Bio-Med. , 2011. v.CD.