UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JUAN CARLOS TENORIO CLAVIJO

**Planejamento, Obtenção e Caracterização de Novas Formas Sólidas do
Fármaco Antirretroviral Lamivudina (3TC)**

São Carlos

2013

JUAN CARLOS TENORIO

**Planejamento, Obtenção e Caracterização de Novas Formas Sólidas do Fármaco
Antirretroviral Lamivudina (3TC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Javier Alcides Ellena

Versão Corrigida

(Versão Original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Tenorio, Juan Carlos

Planejamento, obtenção e caracterização de novas formas sólidas do fármaco antirretroviral lamivudina (3TC) / Juan Carlos Tenorio; orientador Javier Alcides Ellena.-versão corrigida- São Carlos, 2013.

132p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Estrutura cristalina. 2. Lamivudina. 3. Análise supramolecular. 4. Análise vibracional e Térmica. 5. Estrutura-propriedade. I. Ellena, Javier Alcides, orient. II. Título.

Dedico este trabalho ao apoio oferecido pelos meus pais e familiares, apesar da distância sempre estão presentes. E as boas amizades feitas no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Javier Ellena, pela sua orientação, disposição e ajuda. Além da oportunidade oferecida para trabalhar no seu grupo de pesquisa, que tem contribuído muito no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Instituto de Física de São Carlos pela oportunidade e a formação recebida. Aos professores do instituto e em especial à secretaria da pós-graduação.

Ao prof. Dr. Pedro Alejandro Ayala da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração na realização dos espectros vibracionais.

Aos meus companheiros do grupo de cristalografia de pequenas moléculas: Karina, Paulo, Cristiane, Cecília, Marcelo, Rebeca pelos gratos momentos, comemorações e discussões. E aos nossos colaboradores que passaram pelo laboratório: Natalia, Marcos, Hiram, Marcio e Felipe.

Ao grupo de química inorgânica do prof. Dr. Alzir Batista da Universidade Federal de São Carlos, pela doação de alguns reagentes e amizade de alguns integrantes do grupo. Em especial ao meu amigo e colega Rodrigo e a galera mineira e goiana.

Ao técnico José Augusto Lopes da Rocha do Grupo de Cristalografia do IFSC-USP, pela colaboração na aquisição dos difratogramas de raios X por pó.

À profa. Dra. Núbia Boechat do instituto Farmanguinhos-FIOCRUZ pelo fornecimento dos fármacos.

Aos profs. Dr. Rodolfo Moreno e Dr. Carlos Alberto Simone, pela ajuda oferecida e os trabalhos que temos desenvolvido.

Aos companheiros de casa: David, Julian e Terezinha, pela ótima convivência.

Aos meus pais, pois foram eles que me motivaram desde sempre para chegar até aqui, e muito mais longe.

À minha avó e irmã, e demais familiares e amigos na Colômbia.

À CAPES pela bolsa oferecida.

E ao Brasil por ter sido até o momento o lugar aconchegante que me recebeu.

*Mas hay también ¡oh Tierra! un día... un día... un día...
en que levamos anclas para jamás volver;
un día en que discurren vientos ineluctables...
¡Un día en que ya nadie nos puede retener!*

Porfirio Barba-Jacob

RESUMO

TENORIO, J.C. **Planejamento, obtenção e caracterização de novas formas sólidas do fármaco antirretroviral lamivudina (3TC)**. 2013. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Este trabalho enquadra-se dentro dos objetivos da engenharia de cristais moleculares para a obtenção de novas formas sólidas que possam apresentar propriedades farmacêuticas aprimoradas, especificamente de um dos fármacos mais utilizados e comercializados na terapia antirretroviral, contra o HIV: lamivudina, β -L-2',3'-didesoxi-3'-tiocitidina (3TC). As formas cristalinas apresentadas correspondem aos sais dos ácidos inorgânicos: bromidrato ($3TCH^+-Br^-$), difluoridrato de hidrogênio ($3TCH^+-FHF$) e nitrato de lamivudina ($3TCH^+-NO_3^-$). Estes novos sais cristalizaram no grupo espacial não-centrossimétrico $P2_1$, com um par iônico por unidade assimétrica. Os sais halogenados ($3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-FHF$) apresentaram arranjos supramoleculares isoestruturais inclusive com o sal anidro do cloridrato de lamivudina ($3TCH^+-Cl^-$), reportado em trabalhos anteriores no nosso grupo de pesquisa, e cuja solubilidade no equilíbrio apresentou um aumento em relação à forma farmacêutica da 3TC. A característica principal dos arranjos cristalinos destes sais está relacionada com o ordenamento supramolecular das unidades catiônicas $3TCH^+$, a qual é constante, observando-se a formação de vacâncias entre elas ao longo do eixo cristalino a , decorrente da simetria helicoidal característica do grupo espacial. Desta forma, os ânions se acomodam nos interstícios destas vacâncias estabilizando o arranjo cristalino. Entretanto, o sal $3TCH^+NO_3^-$ apresentou um comportamento conformacional e supramolecular diferente do observado nos sais halogenados. Neste caso observaram-se a formação de fitas helicoidais ao longo do eixo b , as quais vão se acoplando por simetria translacional na direção horizontal no plano $[10-1]$ por meio de ligações de hidrogênio clássicas do tipo $N-H\cdots O$ entre os fragmentos citosínicos e $O-H\cdots O$ dos grupos hidroxilas e os ânions nitrato correspondentemente. Portanto, há a formação de planos moleculares em ziguezague, que posteriormente vão se arquitetando paralelamente na direção $[1\ 0\ -1]$ através de interações de curto alcance. Tanto as características conformacionais e supramoleculares, quanto a pureza exibida pelos sais foram também corroboradas com a ajuda de outras técnicas de análise no estado sólido, como a difração de raios X por pó (DRXP), a análise vibracional no infravermelho (IV) e Raman, e a análise térmica: calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e microscopia termo-óptica (*Hot-stage*). Cálculos de *single-point* em nível da teoria do

funcional da densidade (DFT) foram realizados com o intuito de auxiliar na compreensão de algumas interações intermoleculares. Comparações das propriedades estruturais dos sais sintetizados com algumas formas já reportadas da 3TC (por exemplo, a 3TCH-Cl) permitiram inferir possíveis propriedades farmacêuticas.

Palavras-chaves: Estrutura cristalina. Lamivudina. Análise supramolecular. Análise vibracional e térmica. Relação estrutura-propriedade.

ABSTRACT

TENORIO, J.C. **Design, production and characterization of new solid forms of antiretroviral drug lamivudine (3TC)**. 2013. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

This work falls within the main goals of crystal engineering, the improvement of pharmaceutical properties, through the design of new solid forms of the lamivudine, β -L-2', 3'-dideoxy-3'-thiocytidine (3TC), one of the most used and marketed drug in the antiretroviral therapy against HIV. The crystalline forms herein presented correspond to inorganic acid salts: Lamivudine hydrobromide ($3TCH^+-Br^-$), hydrogen difluoride ($3TCH^+-FHF$) and nitrate ($3TCH^+-NO_3^-$). These new salts crystallized in non-centrosymmetric space group $P2_1$, with an ionic pair per asymmetric unit. The halogenated salts ($3TCH^+-Br^-$ and $3TCH^+-FHF$) exhibited isostructural supramolecular assemblies, similar to the anhydrous salt of lamivudine hydrochloride ($3TCH^+-Cl^-$) reported in a previous studies performed in our research group, and whose equilibrium solubility showed an increase when compared with 3TC pharmaceutical form. The main feature of the salt crystalline assemblies is related to the supramolecular ordering of the $3TCH^+$ cationic units, which is constant, by observing the formation of vacancies between them along the a crystalline axis due to the helical symmetry, characteristic of their space group. In this way, the anions accommodate themselves into the interstices of these vacancies, stabilizing the crystalline assemblies. Meanwhile, the $3TCH^+NO_3^-$ salt showed a conformational and supramolecular behavior different from that observed in the halogenated salts. In this case it was observed the formation of helical strands along the b axis, which will be engaging by translational symmetry in the horizontal direction in the $[10-1]$ plane through $N-H\cdots O$ e $O-H\cdots O$ classical hydrogen bonds, between the cytosine and hydroxyl fragments and the nitrate anions. Therefore, they form molecular zigzag plans which will subsequently architect parallel with the $[10-1]$ direction by short-contact interactions. Both conformational and supramolecular characteristics as well as the purity exhibited by these salts were also supported with the help of other solid state techniques such as X-ray powder diffraction (XRPD), vibrational analysis as Infrared (IR) and Raman spectroscopy and thermal analysis as differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG) and *hot-stage* microscopy. Single point theoretical calculations at the

level of density functional theory (DFT) were performed in order to assist in the understanding of some intermolecular interactions. Comparison of the structural properties of the synthesized salts with some forms already reported (e.g. 3TCH⁺-Cl⁻) allowed to infer some possible pharmaceutical properties.

Keywords: Crystal structure. Lamivudine. Supramolecular analysis. Vibrational and thermal analyses. Structure-property relationship.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfil da solubilidade por pH para um composto com um único valor de pK_a básico de 5.	31
Figura 2 - Estrutura química do fármaco lamivudina β -L-2',3'-didesoxi-3'-tiocitidina (3TC)	34
Figura 3 - Representação esquemática de uma cela unitária.....	35
Figura 4 - Ilustração dos 7 sistemas cristalinos e das 14 redes de Bravais.	36
Figura 5 - Espectro emitido por um ânodo metálico mostrando os comprimentos de onda características, a linha tracejada representa a curva de absorção de um determinado material, para a filtragem das linhas características. Representação das transições eletrônicas nos átomos do ânodo metálico, responsáveis pela geração das linhas características do espectro de raios X.	38
Figura 6 - Processo de difração de acordo com a lei de Bragg.	39
Figura 7 - Fatores de espalhamento sob efeitos de vibração térmica para átomos com números atômicos pequenos. Observa-se o baixo espalhamento do átomo de hidrogênio. ⁴⁴	41
Figura 8 - Representações das diferentes formas de mapeamento das superfícies de Hirshfeld: a) d_i , (b) d_e , (c) d_{norm} , (d) forma indexada, (e) forma curvada e (f) projeção bidimensional (<i>fingerprint</i>). Foi tomada como exemplo a estrutura de uma unidade protonada de um sal de citosina (extraída da base CSD).	45
Figura 9 - Imagem do difratômetro Kappa-CCD (Enraf-Nonius®) instalado no Instituto de Física de São Carlos, em destaque a geometria <i>kappa</i> e os componentes da cabeça goniométrica. ⁴²	54
Figura 10 - Imagem do padrão de difração obtido para o sal de 3TCH-Br, destaca-se em círculos intervalos aproximados da resolução na qual são integrados e escalados os dados das reflexões.	55
Figura 11 - Foto mostrando os equipamentos de: (a) DSC e (b) TGA, instalados no Instituto de Física de São Carlos.....	60
Figura 12 - Foto do microscópio termo-óptico. Destaca-se no círculo amarelo o dispositivo do <i>Hot-Stage</i>	61
Figura 13 - Diagrama tipo ORTEP ⁶⁹ das unidades assimétricas dos sais 3TCH ⁺ -Br ⁻ e 3TC-F ^{•••} HF, mostrando a numeração dos átomos e elipsoides de vibração térmica com 50% de probabilidade. Os átomos de hidrogênios são representados como esferas de raio arbitrário.	64
Figura 14 - Projeções estereográficas dos sais: (a) 3TC-Br, (b) 3TC-FHF, e (c) 3TC-Cl, na direção do eixo c (esquerda) e na direção do eixo b (direita). A seta indica o aumento no comprimento do eixo c para a cela de 3TC-FHF.	67
Figura 15 - Resumo da análise conformacional das ligações passíveis de rotação nas unidades catiônicas dos sais 3TCH ⁺ -Br ⁻ e 3TCH ⁺ -FHF. (a) Ligação N1—C1', entre os anéis	

da citosina e oxatolano conformação *anti*, (b) Ligação C4'—C5', posicionamento equatorial do grupo hidroxílico O5'H em orientação *syn* com o átomo S3', (c) Estrutura envelope do anel oxatolano, com conformação S3'-endo. Alguns átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza..... 70

Figura 16 - Sobreposição das conformações moleculares de: 3TCH⁺-Br⁻ (Vermelho), 3TCH⁺-F⁻ HF (Azul) e 3TCH⁺-Cl⁻ (Amarelo). 71

Figura 17 - Histogramas de análise da (a) Ligação N1—C1', (b) ângulo de torção C2—N1—C1'—O1' entre os anéis da citosina e oxatolano, (c) ângulo de torção S3'—C4'—C5'—O1' do braço 5'-hidroxi-metilenico..... 73

Figura 18 - Padrão de interações intermoleculares clássicas (ligações de hidrogênio) presente nas estruturas dos sais halogenados de lamivudina 3TCH⁺-X⁻ (Br, FHF e Cl). 74

Figura 19 - Empacotamentos cristalinos e padrões de interações dos sais 3TCH⁺-X⁻. Análise unidimensional: (a) formação de cadeias helicoidais ao longo da direção [010], (b) Projeção na direção do eixo *b*. Análise bidimensional: (c) formação de planos moleculares na direção [101] pela ligação das cadeias unidimensionais mediante interações clássicas, (d) Projeção sobre o eixo *b*. (e) Contribuição de interações não clássicas para a formação dos planos moleculares. Conformação tridimensional, ligação entre os planos paralelos da direção [101], (f) projeção ao longo do eixo *c* e (g) vista sobre eixo *b*. 76

Figura 20 - Hapticidade η^1 apresentadas entre os íons haleto X⁻ (Br⁻, FHF, Cl⁻) e os anéis de citosina das unidades catiônicas 3TCH⁺. 78

Figura 21 - Contatos intermoleculares entre unidades de 3TCH⁺ e os íons X⁻. Análise dos orbitais de fronteira HOMO-LUMO que intervêm nas interações dos átomos por contatos de Van der Waals. 80

Figura 22 - Interstícios aniônicos onde são ancorados os íons de X⁻: Br⁻, F...HF e Cl⁻. Projeção ao longo do eixo cristalográfico *c*. 80

Figura 23 - (a) Empacotamentos cristalinos dos sais de haleto de 3TC ao longo do eixo *a*. Projeção das superfícies correspondentes às cavidades moleculares onde são incorporados os íons: (b) na direção do eixo *a* e (c) na direção do eixo *b*. 81

Figura 24 - Gráfico de Isostar mostrando as interações intermoleculares reportadas entre uma unidade de base nucleica protonada (CytH⁺) e íons de Br⁻ (esquerda) e Cl⁻ (direita). As estruturas ao redor das superfícies das interações são as estruturas reportadas na CSD e cujas interações foram relatadas entre estes motivos específicos (CytH⁺ e X⁻). 82

Figura 25 - Superfícies de Hirshfeld (SH) normalizadas e projeções bidimensionais (*fingerprints*), escaladas em angstroms Å, para os sais de: a) 3TCH⁺-Br⁻, b) 3TCH⁺-Cl⁻ e c) 3TCH⁺-FHF. I (vista frontal) II (vista traseira) da SH. Regiões nos *fingerprints* dos principais contatos: Fortes (1) O...H, (2) X⁻...H, (3) H...H; fracos (4) C...X⁻, S...H, S...N, C...O, C...N, N...O. 84

Figura 26 - Distribuição das três principais contribuições percentuais relativas, através das áreas das SH, para os principais contatos intermoleculares dos sais de haleto de lamivudina 3TCH⁺-X⁻. 85

Figura 27 - <i>Fingerprints</i> , escalados em angstroms Å, dos contatos intermoleculares significativos que intervêm nas interações de curto alcance nos sais de 3TCH ⁺ -X ⁻	87
Figura 28 - Distribuição das mais significativas contribuições porcentuais relativas, através das áreas das SH, para os contatos intermoleculares que participam nas interações de curto alcance, dos sais de haleto de lamivudina 3TCH ⁺ -X ⁻	88
Figura 29 - Superfícies de Hirshfeld (SH) vistas de frente e verso, de tipo indexada para: (a) 3TCH ⁺ -Br ⁻ , (b) 3TCH ⁺ -FHF, (c) 3TCH ⁺ -Cl ⁻ ; e curvada para: (d) 3TCH ⁺ -Br ⁻ , (e) 3TCH ⁺ -FHF e (f) 3TCH ⁺ -Cl ⁻ . As SH do 3TCH ⁺ -Br ⁻ são ilustradas com as moléculas mais próximas.....	88
Figura 30 - Superposição dos empacotamentos cristalinos entre os sais de: a) 3TC-Br — 3TC-Cl, b) 3TC-Br — 3TC-FHF e c) 3TC-Cl — 3TC-FHF. Vista estereográfica ao longo do eixo cristalográfico <i>a</i>	90
Figura 31 - Comparação dos padrões de DRXP simulados para clusters de 15 moléculas dos sais halogenados de lamivudina 3TC-X.	91
Figura 32 - Comparação dos padrões teóricos (linha azul) e dos padrões experimentais (linha vermelha) de DRXP dos sais: (a) 3TCH ⁺ -Br ⁻ e (b) 3TCH ⁺ -FHF.....	92
Figura 33 - Espectros de absorção na região do IV do 3TCH ⁺ -Br ⁻ (vermelho) e 3TCH ⁺ -FHF (azul).....	94
Figura 34 - Curvas de DSC e TG para o sal de: (a) 3TCH ⁺ -Br ⁻ e (b) 3TCH ⁺ -FHF.....	96
Figura 35 - Microscopia óptica e análises por <i>Hot-Stage</i> dos cristais dos sais de: 3TCH ⁺ -FHF (acima) e 3TCH ⁺ -Br ⁻ (abaixo).	98
Figura 36 - Diagrama ORTEP da unidade assimétrica do sal 3TCH-NO ₃ a temperatura ambiente. Os elipsóides de vibração térmica são plotados com 50% de probabilidade, os átomos de hidrogênios são representados como esferas de raio arbitrário.	102
Figura 37 - Principais características conformacionais da estrutura 3TCH-NO ₃ . (a) Ressaltada a conformação anti entre as ligações C2=O2 e C1'-O1' (oxigênio intracíclico). (b) Ponto de inflexão do átomo S3' com relação a um plano que passa pelo anel oxatiolano, adotando uma conformação envelope do tipo C3'-endo. (c) Posicionamento axial do braço 5'-CH ₂ OH referente ao plano do anel oxatiolano, indica-se a rotação da hidroxila em torno de um eixo que passa pela ligação C4'-C5', esta conformação axial é <i>cys</i> orientada com relação ao plano do anel citosínico.....	104
Figura 38 - Histogramas das análises estatísticas da: a) ligação N1—C1', do b) ângulo de ligação C2—N1—C1' e c) ângulo de torção C2—N1—C1'—O1' entre os anéis da citosina e oxatiolano, e do c) ângulo de torção S3'—C4'—C5'—O5' do braço 5'-hidroximetilênico.	106
Figura 39 - Superposição das unidades catiônicas 3TCH ⁺ para os sais de ácidos do fármaco 3TC.	108
Figura 40 - Padrão de interações clássicas, do tipo ligação de hidrogênio, e formação de síntons moleculares, observados no sal 3TC ₃ H-NO ₃	109

Figura 41 - Formação dos planos moleculares [10-1], a partir das cadeias unidimensionais dos pares iônicos tanto horizontais como verticais (fitas helicoidais).....	110
Figura 42 - a) Projeções bidimensionais dos planos moleculares zigue-zagues [10-1], b) Interações e contatos intermoleculares responsáveis pela união dos planos [10-1], c) Projeções tridimensionais do empacotamento cristalino do sal 3TCH-NO ₃ , acoplamento dos planos moleculares [10-1].	111
Figura 43 - (a) Superfícies de Hirshfeld, (b) Projeções bidimensionais (<i>fingerprints</i>) dos principais contatos intermoleculares com suas porcentagens de contribuição para o sal 3TCH-NO ₃ . Vistas frontais e posteriores das SH's normalizada d_{norm} , interna d_i e externa d_e	113
Figura 44 - Superfícies de Hirshfeld a) indexada e b) curvada para o sal 3TCH-NO ₃ . I (fase frontal) e II (fase traseira). As SH são ilustradas com as moléculas mais próximas.....	114
Figura 45 - Espectro de IV para o sal 3TCH-NO ₃ . Estão ressaltadas as bandas em 1723 cm ⁻¹ e 3419 cm ⁻¹ , correlacionadas aos estiramentos $\nu_{C=O}$ do anel citosínico e ν_{O-H} do braço 5'-CH ₂ OH.	116
Figura 46 - Espectro de Raman para o sal 3TCH-NO ₃ . São ressaltadas as bandas em 1229 cm ⁻¹ e 3090 cm ⁻¹ , correspondentes à conformação C3'-endo e estiramento ν_{C-H} do grupo metileno pertencente ao braço 5'-CH ₂ OH. São ilustrados os efeitos indutivos eletrônicos do átomo de enxofre S3' e do íon nitrato. Também a inflexão do átomo S3' do anel oxatolano adotando a conformação C3'-endo.	117
Figura 47 - Curvas de DSC e TG para o sal 3TCH-NO ₃ . Ilustra-se a eliminação de HNO ₃ da amostra.	118
Figura 48 - Microscopia óptica e análise por <i>Hot-Stage</i> de um cristal para o sal de 3TCH-NO ₃	119

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Classificação atual das formas sólidas dos API's.	27
Esquema 2 - Procedimento básico para a formação de fármacos salinos	30
Esquema 3 - Passos e requisitos para a seleção e desenvolvimento de sais, para o melhoramento de propriedades farmacêuticas de API's.....	32
Esquema 4 - Resumo dos procedimentos desenvolvidos no preparo das modificações cristalinas dos sais do fármaco 3TC.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados cristalográficos dos sais de 3TCH ⁺ -Br ⁻ e 3TC-F•••HF.	64
Tabela 2 - Análise comparativa dos parâmetros de cela dos sais de haleto de lamivudina.	66
Tabela 3 - Ângulos de torção específicos envolvendo as ligações com liberdade conformacional nas unidades catiônicas de 3TC ⁺ , para os sais de 3TCH ⁺ -Br ⁻ , 3TCH ⁺ -FHF e 3TCH ⁺ -Cl ⁻	71
Tabela 4 - Lista geral das interações intermoleculares nos sais de haleto de lamivudina 3TCH ⁺ -X ⁻	79
Tabela 5 - Parâmetros de similaridade dos empacotamentos cristalinos.	90
Tabela 6 - Temperaturas dos pontos de fusão determinados nas curvas de DSC para os sais de 3TCH ⁺ -X ⁻	95
Tabela 7 - Dados cristalográficos do sal de 3TCH ⁺ -NO ₃ ⁻	100
Tabela 8 - Análise comparativa dos parâmetros de cela entre o sal de 3TCH-NO ₃ ⁻ e os sais 3TCH-X.	101
Tabela 9 - Ângulos de torção envolvidos nas principais características conformacionais da estrutura do sal 3TCH-NO ₃	105
Tabela 10 - Lista das interações intermoleculares do sal 3TCH-NO ₃	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CCDC	<i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DFT	Teoria do funcional da densidade
DRX	Difração de raios X
DRXM	Difração de raios X por monocristal
DRXP	Difração de raios X por pó
INTR	Inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa
IV	Infravermelho
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
3TC	β -L-2',3'-didesoxi-3'-tiocitidina, lamivudina
3TCH+	unidade catiônica da lamivudina
3TCH+Br-	Bromidrato de lamivudina
3TCH+Cl-	Cloridrato de lamivudina
3TCH+F-FH	Hidrogenio difluoridrato de lamivudina ou hidrogenodifluoreto de lamivuinda
3TCH+NO ₃ -	Nitrato de lamivudina
TG	Termogravimetria
SH	Superfície de Hirsfeld
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
vdW	Raios de van der Waals

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Fármacos no estado sólido: definições e classificações.	27
1.1.1	Polimorfismo	29
1.1.2	Sais farmacêuticos	30
1.2	Fármacos antirretrovirais e terapia antirretroviral.	32
1.3	Alguns conceitos e fundamentos de Cristalografia.	34
1.3.1	Cela unitária	34
1.3.2	Grupos espaciais	36
1.3.3	Os raios X	37
1.3.4	A lei de Bragg	38
1.3.5	Fator de estrutura	39
1.3.6	Síntese de Fourier	41
1.3.7	Métodos diretos	42
1.3.8	Refinamento da estrutura	43
1.4	Superfícies de hirschfeld.	43
1.5	Objetivos e organização da dissertação.	46
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
2.1	Reagentes e fármaco.....	49
2.2	Preparação e protocolo de síntese das novas modificações cristalinas	49
2.2.1	<i>Bromidrato de Lamivudina 3TCH-Br e Nitrato de Lamivudina 3TCH-NO₃</i>	50
2.2.2	<i>Difluoridrato de hidrogênio de lamivudina 3TCH-FHF</i>	50
2.3	Difração de raios X por monocristal.	51
2.3.1	Montagem da amostra	52
2.3.2	Coleta dos dados de difração	53
2.4	Cálculos Teóricos.	58
2.5	Difração de raios X por pó (DRXP)	58
2.6	Espectroscopia vibracional no Infravermelho (IV) e Raman.	59
2.7	Análises térmicas.....	60
3	CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO DOS SAIS BROMIDRATO (3TCH⁺-BR⁻) E DIFLUORIDRATO DE HIDROGÊNIO DE LAMIVUDINA (3TCH⁺-F⁻••HF).....	63
3.1	Análise estrutural e conformacional por DRXM.	63

3.1.1	Análise comparativa das células unitárias.	65
3.1.2	Análise conformacional.	68
3.1.3	Análise supramolecular.	74
3.1.4	Análise estatística das interações intermoleculares.	81
3.1.5	Análise da superfície de Hirshfeld e gráficos bidimensionais de dispersão das interações.	83
3.1.6	Similaridade dos empacotamentos cristalinos.	89
3.2	Caracterização das modificações cristalinas por DRXP.	92
3.3	Análise espectroscópica vibracional.	93
3.4	Análise térmica.	95
4	CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO DO NITRATO DE LAMIVUDINA (3TCH⁺-NO₃⁻).	99
4.1	Análise conformacional e estrutural por DRXM.	99
4.1.1	Análise comparativa das células unitárias.	101
4.1.2	Análise conformacional.	102
4.1.3	Análise supramolecular.	108
4.1.4	Análise das Superfícies de Hirshfeld.	112
4.2	Análise vibracional.	114
4.3	Análise térmica.	117
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.	121
	REFERÊNCIAS.	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fármacos no estado sólido: definições e classificações.

A eficácia terapêutica de um medicamento está relacionada com as propriedades físico-químicas do ingrediente sólido ativo administrado, conhecido como API (do inglês: *Active Pharmaceutical Ingredient*). Por sua vez, APIs podem se apresentar em diferentes formas sólidas de acordo com a composição e natureza química. Estas formas englobam sais, cocristais, polimorfos, hidratos, solvatos, compostos de inclusão, sólidos amorfos e etc. O Esquema 1 ilustra a classificação sugerida pela *United State Food and Drug Administration* (FDA),¹ em que se considera pontos de vista científico, industriais, estruturais e moleculares, para a categorização dessas diferentes formas sólidas. De modo geral, as formas cristalinas encontram-se reunidas em dois grupos gerais: monocomponentes e multicomponentes.

Esquema 1 - Classificação atual das formas sólidas dos APIs.¹

Quando a fase cristalina é composta única e exclusivamente de moléculas do API, tem-se uma forma cristalina monocomponente, a qual por sua vez, pode ser constituída por vários polimorfos, caso o API no cristal apresente várias conformações orientações e/ou

empacotamentos cristalinos (Secção 1.1.1). Por outro lado, quando o API apresenta uma interação com outra espécie química dentro da estrutura cristalina, considera-se este, um sistema cristalino multicomponente e, dependendo da natureza química, da composição e da maneira como estes interagem no cristal, têm-se três grandes subdivisões: hidratos/solvatos, sais e cocristais.¹⁻²

Embora a discussão esteja direcionada na definição específica dessas formas cristalinas, cabe destacar a importância dos API's amorfos, pois estes apresentam melhor solubilidade e biodisponibilidade quando comparados aos primeiros. Entretanto, uma vez que estas formas possuem estados de alta energia, elas são termodinamicamente mais instáveis e, portanto, converte-se espontaneamente em arranjos cristalinos estáveis, o que torna por fim, as formas cristalinas mais vantajosas em comparação com as amorfas.^{3, 4}

Quando uma molécula de água ou de qualquer solvente está incluída na rede cristalina junto com o API, em proporções estequiométricas ou não-estequiométricas, tem-se um hidrato ou solvato respectivamente.⁵⁻⁶

Seguindo a classificação das formas sólidas cristalinas sugeridas pela FDA, os sais são definidos como: *"Qualquer composto que resulta da substituição de parte ou da totalidade do hidrogênio ácido por uma espécie eletrodeficiente (metal ou um radical agindo como um metal); um sólido cristalino iônico ou eletrovalente"*. Assim, para a FDA, diferentes formas salinas da mesma unidade ativa do fármaco são consideradas como diferentes API's.⁷ A aplicação dos compostos salinos com fins farmacêuticos será discutida em detalhe na secção 1.1.2.

Por sua vez, os cocristais são materiais cristalinos de uma única fase constituídos de dois ou mais compostos moleculares e/ou iônicos diferentes, geralmente numa proporção estequiométrica, que não se enquadram na classificação de sais ou de simples solvatos. Esta definição de cocrystal talvez seja uma das mais sucintas e completas encontradas na literatura, pois a ambiguidade em torno da definição destas formas é um tema de discussão na comunidade científica que atua na área de engenharia de cristais;¹ isto ocorre devido à versatilidade química com a qual alguns API's conseguem se associar com outros componentes durante a execução dos ensaios de cristalização.

Alguns autores têm relacionado os cocristais como formulações farmacêuticas intermediárias, isto é, complexos moleculares do tipo API-excipientes⁸, contudo, supõe-se que os excipientes sejam substâncias quimicamente inertes em relação ao API estando, portanto, em contradição com a definição clássica de cocristais, onde os agentes co-cristalizantes

associados ao API interagem preferencialmente por ligações de hidrogênio ou alguma outra interação de curto alcance formando sítios supramoleculares dentro da rede cristalina.

Vantagens dos cocristais implicam melhor solubilidade, dissolução e outras propriedades físico-químicas. O planejamento e a síntese de cocristais, na maioria dos casos, é executada para fármacos que não possuem grupos ionizáveis e que, portanto, estão impossibilitados de formarem sais. Além disso, dependendo da natureza do agente co-cristalizante, pode-se aumentar a polaridade do sistema e conseqüentemente, aumentar a solubilidade aquosa do fármaco. Dessa forma, o *design* ou desenho racional de cocristais mediante a engenharia de cristais de API's, tem-se tornado uma forte estratégia no aprimoramento de fármacos; fato este que tem atraído a atenção de várias empresas farmacêuticas em termos de patenteabilidade ou de propriedade intelectual dessas novas formas cristalinas.⁸

1.1.1 Polimorfismo

McCrone (1965) referiu-se ao polimorfismo como a habilidade de uma espécie química em cristalizar em diferentes conformações e/ou arranjos cristalinos, a qual por sua vez ocorre quando a molécula é hábil a exibir múltiplas formas cristalinas devido a aspectos químicos, conformacionais e supramoleculares.⁹

Diferentes arranjos sólidos de um mesmo API apresentam diferentes padrões de interações intra e intermoleculares e conseqüentemente diferentes energias de rede. Isso resulta em propriedades físicas e químicas que variam, desde a solubilidade e biodisponibilidade até a estabilidade da forma farmacêutica no comprimido.¹⁰

É importante ressaltar que o polimorfismo constitui um fenômeno amplamente observado em sólidos farmacêuticos.¹¹ Estima-se que o fenômeno ocorra em 30–50% das drogas, embora somente 4–5% dos polimorfos estejam reportados no banco de dados de estruturas cristalográficas de pequenas moléculas (*Cambridge Structural Database – CSD-2012*).^{12, 13} Ao se incluir hidratos, solvatos e cristais de múltiplos componentes esta estatística é maior.¹⁴ Contudo, o polimorfismo configura-se como uma alternativa viável para a Indústria Farmacêutica,¹⁵ uma vez que o planejamento de novas formas sólidas de um mesmo API pode ser utilizado como uma estratégia para a otimização das propriedades farmacêuticas. Essas modificações são geradas sem que haja a necessidade de quebra das ligações covalentes sendo

geralmente executadas variando parâmetros termodinâmicos e meios de solubilização nos ensaios ou *screening* de cristalização.

1.1.2 Sais farmacêuticos

Estima-se que 50% de todas as moléculas de fármacos usadas em terapia medicinal são administradas na forma de sais.^{16, 17} Este fato indica que a salificação, ou formação de um sal, de uma substância farmacêutica é um passo crítico no desenvolvimento de um fármaco.

Os sais são formados quando um composto que é ionizado em solução forma uma forte interação iônica com um respectivo contra-íon, conduzindo à posterior forma salina.¹⁸ Na fase aquosa ou orgânica, o fármaco e o contra-íon são ionizados de acordo com a constante dielétrica do solvente da solução. Portanto, os grupos carregados da estrutura molecular do fármaco e o contra-íon são atraídos principalmente por forças de Coulomb. Dependendo das condições favoráveis presentes no meio, será este tipo de forças responsáveis inicialmente pela cristalização da forma salina (Esquema 2).

Esquema 2 - Procedimento básico para a formação de fármacos salinos

Todo composto com características tanto ácidas quanto básicas pode participar na formação de um sal. No entanto, o sucesso e a estabilidade da formação do sal dependem da força relativa do ácido ou da base, ou seja, das constantes ácidas ou básicas que possuem as

espécies envolvidas, sendo estas constantes uma medida da capacidade de doação ou recepção de prótons.¹⁹

Desta forma, o grau de ionização é um parâmetro crítico para o desempenho fisiológico do fármaco, no momento de desenvolver a formulação ou medicamento.²⁰ A constante ácida, expressada como pK_a , do fármaco e do contra-íon é importante para uma sucedida formação do sal. Nesse caso para a preparação de uma forma salina a partir de um fármaco básico (ou ácido), o pK_a do contra-íon deve ter pelo menos 2 unidades de pK_a inferior (ou superior no caso do ácido) ao pK_a do fármaco.²¹ Estas especificações são requeridas porque o contra-íon deve trazer o pH da solução a um nível mais baixo que o $pH_{máx}$, no qual ambas as espécies –ácido livre e o respectivo sal- coexistem no sólido não-dissolvido (Figura 1). O valor do $pH_{máx}$ constitui um descritor adicional do perfil de solubilidade de um sal em particular, no qual a solubilidade do sal prevalece sobre a solubilidade do ácido ou a base livre.¹⁸

Figura 1 - Perfil da solubilidade por pH para um composto com um único valor de pK_a básico de 5.¹⁸

A regra generalizada da diferença de unidades dos pK_a , ΔpK_a , do grupo ionizável no API, e do ácido ou base está relacionada com uma transferência de prótons, energeticamente favorável; com o qual a literatura prediz sob alguns fatos experimentais que: $\Delta pK_a = pK_a(\text{base}) - pK_a(\text{ácido})$, sendo que quanto maior seja essa diferença (maior de 2 ou 3 unidades), maior é a possibilidade de formar um sal.^{22, 23} Quando o pK_a do API e do contra-íon não são significativamente diferentes, poderia resultar na formação de um cocrystal (caso haja leves interações entre as espécies) ou na formação de um complexo sólido que por vezes

é rapidamente desproporcionado em um ambiente aquoso (sendo que não é mantido um equilíbrio entre ditas espécies), permanecendo sem interagir as entidades do fármaco e do contra-íon respectivamente.²⁴

Desta maneira, mudanças estruturais devido ao processo de formação de um sal permitem melhorar significativamente algumas propriedades do fármaco. Alguns API's com grupos ácidos ou básicos livres apresentam uma baixa solubilidade em meio aquoso. Portanto, o processo de salinização destes grupos frequentemente melhora a solubilidade por efeito da formação de cargas e aumento na polaridade do composto, resultando na maioria dos casos em um aumento significativo na biodisponibilidade. Além disso, os sais podem prover um meio de purificação e/ou um modo de melhorar a manipulação de um API, disponibilizando-o para uma posterior comercialização.¹⁶ No Esquema 3 se representa uma estratégia que relata os passos a se realizar usualmente na indústria farmacêutica, para a obtenção e seleção de novos compostos farmacêuticos salinos, os quais poderão ser incluídos dentro das formulações farmacêuticas uma vez que cumpram com os devidos requisitos de biodisponibilidade e bioequivalência.^{16, 25}

Esquema 3 - Passos e requisitos para a seleção e desenvolvimento de sais, para o melhoramento de propriedades farmacêuticas de API's.²⁵

1.2 Fármacos antirretrovirais e terapia antirretroviral.

A terapêutica para a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) está baseada na administração de fármacos inibidores de dois tipos de enzimas presentes no vírus da imunodeficiência humana (HIV): a DNA polimerase ou transcriptase reversa e a HIV aspartato protease. Dentre os inibidores da transcriptase reversa há três classes: os nucleosídicos, os nucleotídeos e os não nucleosídicos/nucleotídicos.²⁶

Os inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTRs) foram os primeiros fármacos aprovados para o tratamento da AIDS e são considerados como inibidores competitivos atuando cataliticamente sobre o sítio ativo da enzima DNA polimerase impedindo a polimerização do DNA viral.²⁶

Nesse sentido um dos fármacos representativos desta classe de INTR é a lamivudina ou β -L-2',3'-didesoxi-3'-tiocitidina (3TC), o qual é um análogo da citidina Cytd, derivado da substituição isostérica de um grupo metileno do anel glicosídeo da ribose (C3') por um átomo de enxofre (Figura 2). Dentro da série dos INTR que surgiram desde a época dos anos 70, a 3TC foi o quinto fármaco deferido para comercialização, no ano de 1995.²⁶ Desde então, o fármaco tem sido comercializado pela farmacêutica GlaxoSmithKline em uma formulação sólida cujo nome comercial é EPIVIR®. Entretanto o coquetel de fármacos INTR contendo lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) foi licenciado para o uso terapêutico no ano de 1997,²⁶ comercializado sob a marca COMBIVIR® também por GlaxoSmithKline. Este é um dos principais medicamentos antirretrovirais utilizados terapeuticamente até hoje,²⁷ estando entre os 200 fármacos mais vendidos nos Estados Unidos em 2011.²⁸ A fase cristalina da 3TC empregada em formulações farmacêuticas (forma II) apresenta uma solubilidade de 70 mg/mL a 20 °C e biodisponibilidade absoluta média por administração oral de 86%.²⁹

Estudos estruturais desenvolvidos até o momento para este fármaco apresentaram: inicialmente duas formas reportadas (forma I ortorrômbica, grupo espacial $P2_12_12_1$ e forma II tetragonal, grupo espacial $P4_32_12$).³⁰ Além destas primeiras formas, existem atualmente 14 formas de lamivudina depositadas no CSD: um hemidratado,³¹ um hemidrato ácido de 3TC³² e a conformação da 3TC dupla hélice II.³³ Os cocristais de 4-quinolinona e o coquetel de lamivudina-zidovudina monoidratado.³⁴ Os sais de maleato³⁵ e sacarinato,³⁶ os cloridratos anidro e monoidratado,³⁷ o hemicloridrato hemidratado,³³ e o hidrogenoftalato e salicilato monoidratado.³⁸ Os sais-cocristais de 3,5-dinitrosalicilato de 3TC monoidratado³⁴ e o complexo da lamivudina dupla hélice (cuja estequiometria é 8:2:2:1:4 3TC/ácido málico/HCl/(CH₃)₂CHOH/H₂O).³⁹ A quantidade de polimorfos e de modificações cristalinas apresentadas pela 3TC demonstra a versatilidade química e física dos hábitos estruturais que essa molécula apresenta. Consequentemente torna-se importante exaurir todas as

possibilidades de polimorfismo e em geral de modificações no estado cristalino que este API possa apresentar, seja para melhorar tanto a biodisponibilidade como a manufaturabilidade da mesma entre outras propriedades de interesse farmacológico.

Figura 2 - Estrutura química do fármaco lamivudina β-L-2',3'-didesoxi-3'-tiocitidina (3TC)

1.3 Alguns conceitos e fundamentos de Cristalografia.

Atualmente, a cristalografia de raios X é a ferramenta mais importante para a elucidação estrutural de moléculas em um arranjo sólido cristalino. Quando um feixe de raios X incide sobre um cristal, ele interage com a densidade eletrônica produzindo um padrão único e próprio do cristal em estudo. A simetria desse padrão contém informação acerca do arranjo interno das moléculas no cristal, enquanto que as intensidades das reflexões fornecem informação sobre a constituição química da molécula em si.^{40, 41}

1.3.1 Cella unitária

Em um sólido cristalino, as moléculas possuem uma ordem de longo alcance, contendo um arranjo periódico que se repete por translação nas três dimensões. A periodicidade pode ser convenientemente estudada considerando-se a geometria da repetição

ao invés do objeto ou motivo que se repete. Se o objeto se repete periodicamente em intervalos a , b , e c sobre as três direções não-coplanares do espaço, a geometria da repetição pode ser descrita por uma sequência de pontos separados pelos mesmos intervalos a , b e c sobre essas mesmas três direções. Dessa forma, qualquer que seja a origem, a posição de qualquer outro ponto na rede passa a ser definida pelo vetor (Equação 1)⁴²

$$Q_{u,v,w} = ua + vb + wc \quad (1)$$

onde u , v e w são números inteiros positivos ou negativos. Os vetores de base a , b e c definem um paralelepípedo chamado de cela unitária.⁴² A cela unitária é a menor unidade que apresenta a simetria do cristal; a partir dela, por deslocamentos puramente translacionais nas três regiões do espaço, o cristal pode ser construído (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática de uma cela unitária.⁴³

Entretanto, é importante ressaltar que a cela unitária é uma construção imaginária, definida pelos três vetores de base a , b e c e pelos três ângulos α , β e γ , de modo que para uma mesma rede pode haver distintas possibilidades de celas. Se a cela unitária for primitiva (P), haverá somente um único ponto de rede e u, v e w serão obrigatoriamente números inteiros. Nesse caso, os pontos de rede ocupam os vértices da cela unitária. Para celas contendo dois ou três pontos de rede, ou seja, celas unitárias não primitivas, u , v e w assumem valores racionais.⁴² Essas por sua vez podem ser classificadas em três tipos: face centrada (F), base centrada (A, B ou C) ou corpo centrado (I). Além dos pontos de rede nos vértices, essas celas apresentam outros pontos de rede situados no centro de todas as faces (F) ou no centro de uma das faces (A, B ou C) ou ainda, no meio da cela unitária (I).

Como a periodicidade cristalina é compatível apenas com a existência de eixos de rotação e de inversão de ordem 1, 2, 3, 4 e 6, os parâmetros a , b e c e α , β e γ não podem

assumir quaisquer valores, restringindo as possibilidades de cela unitária em apenas sete sistemas cristalinos. A combinação desses sete sistemas com os quatro tipos de redes já mencionadas gera 14 possibilidades diferentes, chamadas de 14 redes de Bravais (Figura 4).⁴¹

42

Sistema cristalino	Parâmetros de cela	Tipos de rede
Cúbico	$a = b = c,$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P I F
Tetragonal	$a = b \neq c,$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P I
Ortorrômico	$a \neq b \neq c,$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P I F A, B, or C
Hexagonal	$a = b \neq c,$ $\alpha = \beta = 90^\circ;$ $\gamma = 120^\circ$	P
Trigonal	$a = b \neq c,$ $\alpha = \beta = 90^\circ;$ $\gamma = 120^\circ$	P
Monoclínico	$a \neq b \neq c,$ $\alpha = \gamma = 90^\circ; \beta \neq 90^\circ$	P C
Triclínico	$a \neq b \neq c,$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	P

Figura 4 - Ilustração dos 7 sistemas cristalinos e das 14 redes de Bravais.⁴¹

1.3.2 Grupos espaciais

Em uma molécula isolada, a combinação das operações de simetria que não implicam em translação, isto é, a combinação de eixos de rotação e inversão que interceptam um ponto

fixo da molécula é conhecida como grupo pontual. Existem 32 combinações ou grupos pontuais que sejam compatíveis com a natureza periódica dos cristais, o que consequentemente exclui as combinações com certas operações de simetria tais como eixos de ordem 5. Entretanto, em um cristal os elementos de simetria estão arranjos de acordo com a periodicidade da rede, o que implica em um grupo de operações de simetria que considere também a periodicidade tridimensional da molécula em si, conhecido como grupo espacial. Existem no total 230 grupos espaciais; eles foram deduzidos pelos matemáticos Fedorov (1890) e Schoenflies (1891) no fim do século XIX.⁴²

Cada grupo espacial é denotado por um símbolo com uma letra em maiúsculo indicando o tipo de rede seguido por números e/ou letras indicando a combinação dos elementos de simetria. Por exemplo, o grupo espacial $P2_1/c$, um dos mais comuns em cristalografia de pequenas moléculas, consiste de uma cela unitária primitiva com um eixo helicoidal paralelo ao eixo b e um plano espelho perpendicular ao eixo b .^{41, 42}

1.3.3 Os raios X

Os raios X foram descobertos em 1895 pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen; laureado com o prêmio Nobel de física em 1901 por essa descoberta. Os raios X são ondas eletromagnéticas com comprimento de onda na faixa de 0,1 a 100 Å, aproximadamente da mesma ordem de magnitude das distâncias interatômicas (0,8 a 3,0 Å), o que permite que eles sejam difratados pelas moléculas no cristal.⁴¹

Eles são produzidos quando elétrons acelerados colidem sobre um alvo metálico, em geral molibdênio, Mo, ou cobre, Cu. O espectro de raios X é a superposição de um espectro contínuo e de uma série de linhas espectrais características do material do alvo. O espectro contínuo ou radiação branca se origina da rápida desaceleração dos elétrons durante a penetração no alvo metálico, enquanto que as linhas características se originam das transições eletrônicas (Figura 5). Quando um elétron colide com um átomo do alvo metálico, ele pode expulsar um elétron da sua camada mais interna (camada de mais alta energia). A lacuna deixada por este elétron será preenchida por outro elétron da camada mais externa (camada de mais baixa energia). Durante essas transições, que dependem da energia dos elétrons

incidentes e também dos níveis eletrônicos do material do alvo, o excesso de energia é liberado na forma de fótons de raios X.⁴³

Como existem dois estados eletrônicos na camada K para os quais um elétron da camada L pode decair, há o surgimento de duas linhas características muito próximas, $K_{\alpha 1}$ e $K_{\alpha 2}$ (Figura 5). Se o elétron que realiza essa transição provém da camada M, então são geradas as linhas $K_{\beta 1}$ e $K_{\beta 2}$, que possuem maior energia, mas menor intensidade, uma vez que essa transição é menos favorável. As transições dependem das regras de seleção na qual o número quântico azimutal deve variar em ± 1 , ou seja de $p \leftrightarrow s$ ou $d \leftrightarrow p$ (figura 1.3.1).⁴³

Figura 5 - Espectro emitido por um ânodo metálico mostrando os comprimentos de onda característicos, a linha tracejada representa a curva de absorção de um determinado material, para a filtragem das linhas características. Representação das transições eletrônicas nos átomos do ânodo metálico, responsáveis pela geração das linhas características do espectro de raios X.^{43, 44}

Nos experimentos de difração de raios X, somente uma dessas linhas características é utilizada, em geral a mais intensa, ou seja, $K_{\alpha 1}$.

1.3.4 A lei de Bragg

Em 1913, Bragg e seu filho mostraram uma nova descrição matemática, mais simples que a de Laue, para interpretar o processo de difração, segundo o qual um cristal é constituído

por inúmeros planos que interceptam a rede cristalina e que espalham os raios X como se fossem espelhos. Dessa forma, para qualquer reflexão, uma relação simples entre a distância que separa os planos cristalinos (os quais são definidos pelos índices de Miller hkl), o comprimento de onda da radiação incidente e o ângulo segundo o qual a radiação incide no cristal, deveria ser satisfeita (equação 2):

$$2d_{hkl} \sin \theta = n \lambda \quad (2)$$

onde θ é o ângulo entre o feixe incidente e o plano cristalino, d_{hkl} a distância entre os planos (hkl), λ o comprimento de onda da radiação incidente (tipicamente para as linhas $K_{\alpha 1}$ de 0,71073 Å para Mo e 1,5418 Å para Cu) e n um número inteiro (em geral, $n = 1$) Em resumo, para que ocorra interferência construtiva e uma reflexão seja observada, a diferença de caminho percorrida por duas ondas deve ser igual ao número inteiro de comprimento de onda (Figura 6).^{40, 41, 45}

Figura 6 - Processo de difração de acordo com a lei de Bragg.

1.3.5 Fator de estrutura

Os raios X são espalhados pelo cristal em três dimensões de forma que a única direção na qual a onda espalhada não é nula é aquela perpendicular aos planos (hkl). A intensidade do feixe difratado para cada família de planos (hkl) é proporcional ao quadrado do módulo do fator de estrutura (equação 3).^{40, 45}

$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2 \quad (3)$$

O fator de estrutura é um número complexo e representa a amplitude e a fase de uma onda espalhada por todos os átomos da cela unitária em uma dada direção prevista pela lei de Bragg; para uma reflexão hkl , ele é definido como (equação 4).^{40, 46}

$$F(hkl) = \sum_j f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (4)$$

onde f é o fator de espalhamento atômico, x_j , y_j e z_j são as coordenadas fracionárias do átomo j na cela unitária e hkl são os índices de reflexão. O fator de espalhamento atômico mede a amplitude das ondas de raios X espalhadas por um único átomo. Uma vez que os raios X são espalhados pelos elétrons do átomo é plausível esperar que esse fator esteja relacionado ao número atômico. Ele também constitui uma função do ângulo de Bragg. Para $2\theta = 0$, o fator de espalhamento atômico é igual ao número atômico ($F(000) = Z$),⁴⁰ enquanto que para ângulos maiores esse valor diminui, já que nem todos os elétrons irão espalhar as ondas em fase. Os valores de f para todos os átomos e íons da tabela periódica encontram-se listados na Tabela Internacional de Cristalografia.⁴⁷ Como os átomos nos sólidos cristalinos não se encontram no estado estacionário, o fator de espalhamento atômico também passa a ser influenciado pelas vibrações atômicas, que afetam diretamente as intensidades das reflexões modificando a densidade eletrônica e reduzindo a capacidade de espalhamento do átomo (Figura 7). Considerando que essa vibração é isotrópica, isto é, as componentes são iguais em todas as direções, pode-se dizer que o fator de espalhamento atômico sofrerá uma redução em função da vibração térmica, sendo descrito pela Equação 5.^{40, 46, 48}

$$f' = f \exp(-B \sin^2 \theta / \lambda^2) \quad (5)$$

onde θ é ângulo de espalhamento, f é a capacidade de espalhamento de um dado átomo para uma dada reflexão, λ é o comprimento de onda e B é o fator de vibração térmica definido como (equação 6).^{40, 46}

$$B = 8\pi^2 U \quad (6)$$

sendo U igual ao deslocamento médio quadrático do átomo em relação a sua posição de equilíbrio, $U = \langle u^2 \rangle$. Desse modo, o fator de estrutura passa a ser definido pela Equação 7:⁴⁰

$$F(hkl) = \sum_j f_j \exp(-8\pi^2 U_j \sin^2 \theta / \lambda^2) \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (7)$$

Figura 7 - Fatores de espalhamento sob efeitos de vibração térmica para átomos com números atômicos pequenos. Observa-se o baixo espalhamento do átomo de hidrogênio.⁴⁴

1.3.6 Síntese de Fourier

A Equação 8 mostra que é possível calcular os fatores de estrutura, uma vez que se conhece a espécie química e as coordenadas de cada átomo. Entretanto, a informação que pode ser retirada dos experimentos de difração de raios X é a amplitude dos fatores de estrutura, $|F(hkl)|$, de modo que é necessária uma operação matemática, conhecida como transformada inversa de Fourier para se obter a densidade eletrônica a partir dos fatores de estrutura. A Equação 8 é essencialmente um somatório de todos os fatores de estrutura sendo denominada equação de síntese de Fourier.^{40, 46}

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (8)$$

onde $\rho(xyz)$ é a densidade eletrônica nas coordenadas x,y,z ; V é o volume da cela unitária. Como os fatores de estrutura são números complexos ($F(hkl) = |F(hkl)|\exp[i\phi(hkl)]$), a Equação 8 pode ser reescrita deixando explícita a fase (equação 9):

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\phi(hkl)] \quad (9)$$

A amplitude dos fatores de estrutura, $|F(hkl)|$, pode ser obtida através das intensidades medidas (equação 3), contudo, ainda resta uma informação que não pode ser retirada diretamente do padrão de difração de raios X. Embora seja possível calcular as amplitudes e identificar as direções (estabelecidas pelos índices de Miller), as informações acerca dos ângulos de fase, $\phi(hkl)$, são perdidas, o que impossibilita o cálculo da densidade eletrônica e por conseguinte, a elucidação estrutural.^{40, 42, 46}

1.3.7 Métodos diretos

Em geral, a solução do problema das fases na cristalografia de pequenas moléculas pode ser realizada a partir dos chamados Métodos Diretos. Através deles é possível estimar estatisticamente as fases de cada fator de estrutura, utilizando as intensidades medidas experimentalmente. Dada a sua complexidade ele não será detalhado aqui, entretanto, duas condições são impostas à essa metodologia; a primeira assume que o valor da densidade eletrônica nunca possa ser negativo, esse valor pode ser positivo ou zero, mas nunca negativo e a segunda, que os mapas de densidade eletrônica, ρ , apresentem valores altos próximo das posições atômicas e zero ou próximos de zero quando distante delas.^{40, 42}

Esses métodos foram rapidamente implementados em diversos programas cristalográficos de resolução de estruturas, tais como os desenvolvidos por George Sheldrick (SHELXS-97)⁴⁹ e Altomare e colaboradores (SIR-92)⁵⁰ e é utilizado para obter as fases de moléculas constituídas por átomos leves com aproximadamente o mesmo número atômico (C, N e O). Entretanto, com o desenvolvimento computacional, esses métodos também estão sendo utilizado para determinar estruturas de compostos organometálicos e até de algumas proteínas. Contudo, o método de Patterson ainda é o mais utilizado para obter as fases de moléculas contendo átomos pesados.⁴⁰

1.3.8 Refinament o da estrutura

Uma vez estimadas as fases, um mapa inicial de densidade eletrônica é calculado, gerando um modelo aproximado da molécula em estudo que precisa posteriormente ser refinado. O processo de refinamento visa aprimorar o modelo inicial variando os parâmetros atômicos para obter um melhor ajuste entre os fatores de estrutura observados, ou seja, aqueles obtidos das intensidades medidas experimentalmente, e os fatores de estrutura calculados a partir do modelo gerado em cada etapa de refinamento. Além das coordenadas atômicas x, y, z , o parâmetro de deslocamento U também pode ser refinado. Embora a vibração atômica possa ser considerada isotrópica, ela é na realidade anisotrópica, ou seja, não possui as mesmas componentes em todas as direções sendo representado por um elipsoide ao invés de uma esfera. Dessa forma, o número de parâmetros a serem refinados para cada átomo aumenta de 4 para 9, o que proporciona uma melhor descrição do modelo estrutural.^{40, 41}

A qualidade do refinamento é monitorada por um fator de discordância R que mede a diferença entre a amplitude dos fatores de estrutura calculados, $|F_c|$, e a amplitude dos fatores de estrutura observados, $|F_o|$, e que pode ser descrito pela Equação 10:

$$R = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|} \quad (10)$$

É importante ressaltar que durante o processo de refinamento, os valores de $|F_o|$ permanecem fixos enquanto que os valores de $|F_c|$ variam na medida em que o modelo vai sendo modificado. Em geral, quanto menor o valor de R , melhor a concordância entre o modelo real e o modelo proposto para a estrutura da molécula.⁴⁰

1.4 Superfícies de hirshfeld.

Uma técnica recentemente utilizada para a análise e visualização dos contatos atômicos intermoleculares participantes dos arranjos supramoleculares, principalmente em cristais moleculares, é a superfície de Hirshfeld (SH). Estas superfícies têm o seu fundamento teórico na teoria de partição das densidades eletrônicas de moléculas em fragmentos atômicos

contínuos, desenvolvida em princípio por Hirshfeld em 1977.⁵¹ Ela foi introduzida para auxiliar a compreensão dos comportamentos supramoleculares de estruturas determinadas pela difração de raios X de monocristais (DRXM).^{52, 53} A forma da superfície está delimitada conforme a distribuição das moléculas e suas respectivas densidades eletrônicas dentro da cela unitária, sendo essa superfície única para cada estrutura. Desta forma técnicas computacionais têm sido desenvolvidas para a visualização e renderização das SH, permitindo caracterizar com maior exatidão, os contornos e as intensidades dos contatos atômicos.⁵³

Existem vários tipos de mapeamento sobre as SH. O primeiro mapeamento, d_i , representa os contatos entre as densidades eletrônicas dos átomos internos até a superfície (Figura 8.(a)); caso contrário acontece nas superfícies d_e , onde se apresentam os contatos provenientes de moléculas externas próximas da superfície (Figura 8. (b)). A coloração dessas superfícies permite determinar a intensidade dos contatos atômicos, sendo os mais intensos representados em cor vermelha, e os mais fracos em cor azul. Entretanto, a escala de cores pode estar definida segundo a diminuição nas distâncias dos contatos, da seguinte maneira: vermelho<laranja<amarelo<verde<azul.⁵⁴ Cabe destacar que nas superfícies d_i , as regiões em vermelho correspondem a locais onde a molécula age como doadora de contatos intermoleculares intensos, já na superfície d_e esta coloração indica regiões receptoras dos contatos, respectivamente.

Figura 8 - Representações das diferentes formas de mapeamento das superfícies de Hirshfeld: a) d_i , (b) d_e , (c) d_{norm} , (d) forma indexada, (e) forma curvada e (f) projeção bidimensional (*fingerprinth*). Foi tomada como exemplo a estrutura de uma unidade protonada de um sal de citosina (extraída da base CSD).

A fusão das superfícies d_i e d_e , normalizadas em função do raio de Van der Waals (vdW) permite a geração de uma terceira SH chamada normalizada (d_{norm}).⁵⁴ Neste mapeamento (Figura 8.(c)) é possível visualizar simultaneamente tanto as regiões aceptoras quanto as receptoras dos contatos intermoleculares. Neste caso a coloração da superfície permite identificar tanto a intensidade como a distância dos contatos. As distâncias menores aos raios vdW estão representadas em vermelho, e as distâncias no limite ou maiores em uma escala de branco à azul.^{53, 54}

Por outro lado, os mapeamentos das SH indexados e curvados (Figura 8. (d) e (e)) permitem fornecer uma ideia das topologias e os mecanismos envolvidos nos contatos. Nos mapas indexados podem-se identificar depressões ou cavidades (vermelho) e protuberâncias ou saliências (azul) das superfícies, uma vez que duas unidades moleculares entrem em contato. Os mapas curvados informam sobre as deformações nas SH, o que oferece uma visualização de como é perturbada a densidade eletrônica (presença de curvaturas gaussianas que indicam pequenos deslocamentos da densidade eletrônica) e isto acontece uma vez que as

moléculas são acomodadas nos interstícios cristalinos; assim as regiões em verde estão planas ou tensionadas e as regiões azuis deformadas ou curvadas.⁵³

Uma projeção bidimensional da SH em função das distâncias determinadas nas superfícies d_e e d_i , resulta em um gráfico denominado *fingerprint* (impressão digital). Este é um gráfico de dispersão (distribuição dos valores d_e versus d_i) que relaciona as distâncias dos contatos atômicos, permitindo de acordo à forma como está dada a distribuição, determinar se o contato participa de um tipo específico de interação intermolecular ou não, além de fornecer uma porcentagem de recorrência que este contato apresenta sobre a superfície (Figura 8. (f)).⁵³

1.5 Objetivos e organização da dissertação.

O objetivo principal deste trabalho envolve o planejamento, a obtenção e a caracterização de novas modificações cristalinas do fármaco antirretroviral lamivudina (3TC). Desse modo, foi proposta a síntese de novas formas cristalinas, sendo estas sais dos ácidos inorgânicos HBr, HF e HNO₃. Essas novas modificações sólidas apresentam um grande potencial de aplicação como sais farmacêuticos, o que poderia ser explorado em trabalhos futuros para o aprimoramento de algumas propriedades farmacêuticas associadas a esse fármaco. Estes novos sais foram caracterizados por difração de raios X de monocristais, DRXM, além de outras técnicas de caracterização no estado sólido como a difração de raios X por pó, DRXP, análises vibracionais e térmicas.

No Capítulo 1, apresenta-se uma introdução das formas sólidas cristalinas encontradas nos compostos farmacêuticos e a importância da determinação estrutural para a predição das propriedades farmacológicas. Também é apresentada uma revisão dos conceitos básicos da cristalografia e da teoria de difração de raios X.

No capítulo 2 são descritos os procedimentos experimentais que foram executados tanto na síntese, quanto na caracterização estrutural das formas cristalinas dos sais do fármaco 3TC.

No Capítulo 3, encontra-se a discussão sobre a caracterização no estado sólido das modificações cristalinas dos sais de lamivudina: bromidrato de lamivudina (3TCH-Br) e

difluoridrato de hidrogênio de lamivudina (3TCH-FHF). Sendo observado como um aspecto destacável o isoestruturalismo entre as espécies cristalinas dos sais de halogênio do fármaco 3TC.

No Capítulo 4, descreve-se a caracterização no estado sólido de um novo sal, o nitrato de lamivudina (3TCH-NO₃). Esta modificação cristalina apresenta um comportamento supramolecular interessante (arranjos helicoidais) que não foi observada em outras formas cristalinas análogas do fármaco 3TC.

O capítulo 5 apresenta as conclusões e as perspectivas do trabalho de pesquisa realizado nesta dissertação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e fármaco

Na síntese das modificações cristalinas aqui apresentadas, os solventes utilizados foram água deionizada (sistema de purificação Milli-Q, Millipore Corp.) e isopropanol (grau analítico P.A., Qhemis®). Os compostos utilizados como formadores de sais foram os ácidos inorgânicos: bromídrico HBr (grau analítico, Sigma-Aldrich®), ácido fluorídrico HF (grau analítico P.A., Vetec®) e ácido nítrico HNO₃ (grau analítico, Sigma-Aldrich®). O fármaco empregado da lamivudina 3TC foi fornecido em colaboração com o grupo de pesquisa da Dra. Núbia Boechat, do Instituto de tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos (10 g, Matéria-Prima Reg.56889, Farmanguinhos-FIOCRUZ, pureza de $99,55 \pm 0,07$ mol% e temperatura de fusão $175,6 \pm 0,3$ °C de acordo com a especificação ASTM E928). Este material fornecido, que foi o material de partida correspondeu à lamivudina (3TC) forma II. Purificação adicional deste fármaco como também outras caracterizações não foram realizadas neste estudo.

2.2 Preparação e protocolo de síntese das novas modificações cristalinas

Os processos de síntese realizados neste trabalho foram baseados nos relatos documentados pelo nosso grupo de pesquisa, nos quais se obtiveram outras formas cristalinas do fármaco 3TC, por exemplo, a forma anidra e hidratada do sal 3TCH-Cl.^{37, 55} Nesse sentido foi importante a determinação, a partir do reportado na literatura, do pKa = 4,3 apresentado pelo fármaco 3TC,⁵⁶ sendo estabelecido o caráter básico, com o qual se prosseguiu à formação dos correspondentes sais dos ácidos inorgânicos.

Para cada um dos testes foram pesadas as amostras em uma balança analítica (com uma sensibilidade mínima de 0,0010 g e desvio da medida de 0,0001 g, marca Sartorius®). Por outro lado os volumes tanto dos solventes quanto das soluções dos ácidos e das misturas

de reação, foram manipulados por meio de micropipetas automáticas (marca Eppendorf Research ®) de 1000 µL e 10 mL, devido às poucas quantidades de volumes aferidos em cada um dos testes. A continuação é descrito em detalhe, e resumido no Esquema 4, o protocolo desenvolvido durante a formação das novas modificações cristalinas correspondentes aos sais de bromidrato, difluoridrato de hidrogênio e nitrato de lamivudina:

2.2.1 *Bromidrato de Lamivudina 3TCH-Br e Nitrato de Lamivudina 3TCH-NO₃.*

O preparo dos cristais para os sais de nitrato e bromidrato, envolveu os seguintes passos:

- 1) Preparação de soluções de 3TC (10mg, 0,04mmol) em isopropanol e levadas a temperatura de ebulição, sob agitação constante, por um tempo de 10 min.
- 2) Adição em excesso de 100 µL, gota por gota, de uma solução previamente preparada de HNO₃ (caso nitrato) e HBr (caso bromidrato) de concentração 1M (1mol/L) às soluções de 3TC em ebulição.
- 3) Aquecimento das misturas de reação à temperatura de ebulição do solvente isopropanol durante 20 minutos, mantendo constante a ebulição das soluções.
- 4) Repouso das soluções a temperatura ambiente em frascos de penicilina (recipientes de vidro de cinco centímetros de altura por um centímetro e meio de diâmetro). Foi fechada a abertura dos frascos, com uma película de parafilm®, deixando no meio da película um buraco de pequeno tamanho, controlando assim a velocidade de evaporação.
- 5) Observaram-se cristais em forma de bastões e prismas de bom tamanho e qualidade, depois de dois dias de evaporação completa do solvente para cada um dos casos.

2.2.2 *Difluoridrato de hidrogênio de lamivudina 3TCH-FHF.*

O preparo desta modificação cristalina envolveu similarmente cada um dos passos descritos para a síntese das modificações de 3TCH-Br e 3TCH-NO₃. A exceção do passo 2.2.1 (4), onde foi utilizado um recipiente plástico de iguais dimensões. Isto devido ao fato do ácido fluorídrico HF reagir com o vidro, desta maneira, evitou-se formação de outras espécies químicas indesejáveis.

Esquema 4 - Resumo dos procedimentos desenvolvidos no preparo das modificações cristalinas dos sais do fármaco 3TC.

2.3 Difração de raios X por monocristal.

2.3.1 Montagem da amostra

Uma vez realizadas as sínteses para a obtenção das novas modificações cristalinas do fármaco 3TC, e posterior crescimento dos cristais a partir do método de evaporação lenta ou controlada do solvente, foram escolhidos apenas um cristal por cada uma das modificações; sendo oportunamente selecionado um cristal de composição homogênea com a maior qualidade possível para cada caso, isto é a escolha de um monocristal.

Para a avaliação das amostras monocristalinas, foi necessário se observar os cristais sob uma lupa estereoscópica com luz polarizada (Olympus®). Quando se trata de um verdadeiro monocristal, este polariza a luz de maneira uniforme. Desta maneira observou-se uma coloração homogeneamente brilhante à exposição da luz polarizada. Este foi um dos principais critérios para a escolha das amostras que foram levadas ao experimento de difração de raios X. O outro critério a considerar foi o tamanho do monocristal, assim, escolheram-se amostras em forma de bastões ou prismas alongados em todos os casos, tendo tamanhos que variaram de 0,05 a 0,35 mm por cada dimensão, respectivamente.

Após seleção dos monocristais, procedeu-se à montagem da amostra para a realização da coleta dos dados. Desta maneira, foram dispostos os cristais de tal forma que puderam ser montados sobre finos capilares de fibra de vidro, sendo que este material é escolhido devido a que não apresenta difração nem absorção considerável frente à radiação dos raios X, por ser amorfo. Cada capilar apresentou uma espessura (de dimensões próximas à do cristal) e um comprimento que permitiu suportar e colocar a amostra dentro do feixe de raios X, uma vez que fosse colocado sobre a cabeça goniométrica do difrator (secção 2.3.2). Utilizou-se pouca quantidade de cola de secagem rápida epoxídica (Poxipol ®) para fixar cada um dos cristais sobre as pontas dos capilares. Uma vez que foi concluída esta etapa de montagem, iniciou-se à respectiva coleta dos dados.

2.3.2 Coleta dos dados de difração

Para a caracterização cristalográfica e estrutural das modificações cristalinas do fármaco 3TC, foi realizada a coleta das reflexões utilizando um difratômetro de monocristal Kappa-CCD (da Enraf-Nonius®) que se encontra localizado no grupo de cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP). Este equipamento está constituído em essência por três componentes: Uma fonte de raios X, um goniômetro com geometria *kappa* e um detector de área, o qual é uma câmera CCD (Charge Coupled Device).

A geometria Kappa do goniômetro é caracterizada por uma combinação de quatro graus de liberdade rotacional: ω (eixo *omega*), κ (eixo *kappa*), ϕ (eixo *phi*) e 2θ (eixo *theta*). Sobre o eixo ϕ encontra-se localizada a cabeça goniométrica na qual está montado o monocristal, por sua vez este eixo está apoiado sobre o bloco κ , o qual pode rotacionar ao mesmo tempo sobre a base do braço goniométrico perante o eixo ω . Por último, o quarto eixo rotacional 2θ permite movimentar o detector ao redor do braço goniométrico. Entretanto outro grau de liberdade, do tipo translacional, DX, estabelece a distância do detector em relação ao cristal (Figura 9).

A distância, DX, permite aproximar ou afastar o detector CCD, dependendo da distribuição dos pontos ou “spots” presentes no perfil do padrão de difração (espaço recíproco), isto conseqüentemente está relacionado com as dimensões da cela unitária (espaço real), de tal forma que na maioria dos casos esta distância esteve em torno de 31 mm, de acordo com o perfil do padrão. A vantagem da geometria *Kappa* está na ampla acessibilidade ao cristal.⁴³

Figura 9 - Imagem do difratômetro Kappa-CCD (Enraf-Nonius®) instalado no Instituto de Física de São Carlos, em destaque a geometria *kappa* e os componentes da cabeça goniométrica.⁴³

A geração dos raios X foi por meio de um tubo selado com filamento de molibdênio e janelas de berílio, desta forma os experimentos de difração foram realizados com radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda=0,71073 \text{ \AA}$) monocromatizada através de um cristal de grafite, a qual posteriormente será canalizada por um colimador, dimensionando assim o tamanho do feixe de raios X. A tensão elétrica aplicada na fonte de raios X, foi mediante um gerador (modelo FR590) atingindo uma voltagem de 55 kV e uma corrente de 33 mA. Um sistema de refrigeração permite recircular água nos interstícios da fonte, mantendo estável a temperatura do tubo de descargas.

Quando o feixe de raios X atinge o monocristal, este é difratado gerando o correspondente padrão de difração (Figura 10), onde o padrão é registrado inicialmente pelo detector CCD, assim a difração de raios X espalhada pelo cristal é processada e transformada em luz visível por um agente fosforescente ($\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$ dopado com térbio). Logo a luz é conduzida por fibras ópticas no detector CCD, convertendo estes sinais ópticos em sinais elétricos, que posteriormente foram processados, amplificados, digitalizados e enviados a uma central, que é o computador do difrator, permitindo no final a interface gráfica do experimento (veja Figura 10). A grande vantagem dos detectores de área, tais como o CCD, está na possibilidade de coletar em curtos espaços de tempo um grande conjunto de reflexões.

Figura 10 - Imagem do padrão de difração obtido para o sal de 3TCH-Br, destaca-se em círculos intervalos aproximados da resolução na qual são integrados e escalados os dados das reflexões.

Os parâmetros das coletas de dados foram determinados, em todos os casos, de forma a coletar reflexões acima de $25,5^\circ$ em θ e valores de redundância de 3, o que garantiu em todas as medidas resoluções mínimas de $0,8 \text{ \AA}$ e consequentemente atingir valores de completeza dos dados em torno de 99%. Os tempos de exposição à radiação não foram superiores aos 60 segundos por grau para todas as amostras. As medidas realizadas a baixa temperatura, em torno de 100 K, foram desenvolvidas com ajuda de um soprador de nitrogênio líquido (marca Oxford Cryosystem®), desta maneira padrões de difração de maior qualidade foram possíveis de se obter.

A primeira etapa da experiência de difração envolve a determinação da cela unitária das amostras cristalinas. Para isto, uma vez que foram coletados os primeiros dados, realizou-se um refinamento dos parâmetros de cela assim como de outros parâmetros experimentais (Rotação e posição do cristal, posição do feixe, etc.) a partir do programa COLLECT.⁵⁷ Este procedimento permitiu o desenho das coletas de dados. Uma vez finalizadas as coletas foi realizada a integração e escalonamento dos dados com ajuda do pacote de programas HKL Denzo-Scalepack.⁵⁸

Com a informação das celas unitárias, procedeu-se à resolução e refinamento estrutural. Estes procedimentos foram realizados com a ajuda do pacote de programas

cristalográficos WINGX.⁵⁹ A resolução das estruturas foi realizada através de métodos diretos. Com o objetivo de encontrar as fases dos fatores de estrutura para cada uma das estruturas dos sais, foram utilizados os programas SHELXS-97,^{49, 60} SHELXS-2013,⁹ SIR2004⁶¹ e SIR2011,⁶² obtendo-se os mesmos resultados para cada um destes programas. A resolução das estruturas deu em princípio os esqueletos moleculares das modificações cristalinas aqui trabalhadas. Desta forma foram obtidos os correspondentes mapas de densidade eletrônica (mapas de Fourier), nos quais foram encontradas em princípio as posições dos átomos não hidrogênoides. As posições destes átomos foram inicialmente, refinadas de forma isotrópica pelo método de mínimos quadrados de matriz completa, tratando em cada ciclo de refinamento, minimizar a diferença entre os fatores de estrutura observados F_o e calculados F_c , em F^2 , utilizando o programa SHELXL-97 e SHELXL-2013.⁶⁰ Posteriormente, foi realizado o refinamento anisotrópico dos átomos, deixando em liberdade os parâmetros de vibração térmica, consolidando mais ainda o modelo estrutural.

A próxima etapa do refinamento foi a localização dos átomos de hidrogênio, os quais foram observados a partir do Mapa de Fourier Diferença. Todos os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono foram fixados, dependendo da natureza química ou hibridação do carbono respectivamente. Para átomos de hidrogênio ligados a carbonos aromáticos, as distâncias foram fixadas em 0,93 Å com um parâmetro isotrópico 20% maior do que o parâmetro de deslocamento isotrópico equivalente para o átomo de carbono ($U_{iso}(H) = 1.2 U_{eq}(Csp^2)$). Para os átomos de carbono secundários e terciários com hibridação, Csp^3 , presentes no anel da ribose modificada (oxatiolano) tiveram as distâncias idealizadas das ligações com os átomos de H, em torno de 0,97 Å (Csp^3-H dos grupos metilenos) e de 0,98 Å (Csp^3-H dos grupos metino) e com iguais percentagens de incremento em relação aos parâmetros de vibração equivalentes. Já os átomos de H ligados a átomos de oxigênio (O—H grupo hidroxila) e nitrogênio (N—H grupo amino e N^+-H imídico) foram localizados através dos mapas de densidade eletrônica, sendo suas posições refinadas livremente conforme as densidades observadas e com os parâmetros térmicos isotrópicos fixos definidos como: ($U_{iso}(H) = 1.2 U_{eq}(N)$ e $1.5 U_{eq}(O)$).

A determinação da configuração absoluta das unidades de $3TCH^+$ foi permitida pelo refinamento do parâmetro de Flack.⁶³ Isto devido à presença de átomos com número atômico maior que aquele do silício, o enxofre e o bromo, no caso de estruturas não centrossimétricas como as apresentadas pelas modificações cristalinas analisadas. Refinando-se este parâmetro com base nos pares de Friedel coletados, os quais, nestes casos, violam a Lei de Friedel, a

configuração absoluta S e R dos respectivos átomos quirais da lamivudina, foi determinada e concordante com a quiralidade esperada para este fármaco.

Para o sal de 3TCH-Br foi aplicado adicionalmente outro método de correção por absorção das reflexões, isto pelo fato do átomo de bromo ter um elevado número atômico o qual absorve em grande quantidade a radiação dos raios X, resultando num alto valor do coeficiente de absorção (capítulo 3, Tabela 1). Portanto, foi utilizado o método tipo Gaussian de estimativa dos fatores de transmissão e correção por absorção dos dados de DRX no processamento das intensidades provenientes desta estrutura.⁶⁴

As validações dos resultados cristalográficos, após serem concluídos os respectivos refinamentos, foram realizadas por intermédio do programa PLATON.⁶⁵ As informações dos refinamentos, das coletas e outros parâmetros associados nas determinações estruturais, encontram-se condensadas nos arquivos com extensão “*.cif*” (*Crystallography Information File*), os quais por sua vez foram validados utilizando a aplicação CheckCIF,⁶⁶ sendo este programa uma facilidade disponibilizada pela União Internacional de Cristalografia na rede mundial de computadores. Desta maneira, certificou-se a qualidade dos refinamentos e a coerência dos modelos estruturais propostos para cada modificação cristalina. A análise das geometrias intramoleculares foi realizada pelo programa Mogul.⁶⁷ As análises supramoleculares e determinação das interações intermoleculares foram realizadas com a ajuda do programa PARST⁶⁸ e PLATON,⁶⁵ incluídos no pacote computacional WINGX.⁵⁹ Por sua vez, para auxiliar e visualizar as conformações estruturais e os empacotamentos cristalinos, utilizaram-se os programas ORTEP-3,⁶⁹ Mercury 3.1.1,⁷⁰ DIAMOND⁷¹ e CHIMERA.⁷² Estes programas também foram empregados para a elaboração do material gráfico das estruturas cristalinas. Os contatos intermoleculares, determinados nas superfícies de Hirshfeld e os correspondentes gráficos de dispersão bidimensional (*fingerprints*) foram analisados pelo programa CrystalExplorer.⁵³

2.4 Cálculos Teóricos.

Realizaram-se cálculos teóricos utilizando o programa Gaussian 03⁷³ através de uma central ou computador Intel® Core™ i7-2600 (3.40GHz) e 8,00 GB de memória RAM. Estes cálculos foram realizados com o intuito de explicar alguns fenômenos eletrônicos associados às conformações e interações, que as novas modificações cristalinas do fármaco 3TC apresentaram. Cálculos de energia “*single point*”, orbitais de fronteira, otimização e cálculos das frequências dos modos normais de vibração foram desenvolvidos por meio da Teoria do funcional da Densidade (do inglês *Density Functional Theory*, DFT), utilizando o funcional híbrido de troca e correlação (B3LYP)⁷⁴ e a base 6-311++G(d,p). Neste trabalho só os cálculos de energia e de orbitais de fronteira foram reportados, com o objetivo de tentar explicar a natureza eletrônica de algumas interações apresentadas nas formas cristalinas. Já as otimizações e cálculos de frequências, serviram de apoio na compreensão de alguns espectros vibracionais.

2.5 Difração de raios X por pó (DRXP)

Amostras das modificações cristalinas 3TCH-Br e 3TCH-FHF foram pulverizadas em almofariz de ágata e montadas em lâminas de vidro sulcadas, usadas como porta-amostras, expondo-as ao feixe de raios X utilizando um difratômetro de raios X por pó (marca Rigaku-Denki®) de geometria θ -2 θ , o qual é equipado com detector de cintilação. A aplicação de uma tensão de 50 kV e uma corrente de 100 mA, em um ânodo rotatório de cobre, foi responsável pela geração dos raios X (radiação $\text{CuK}\alpha$ monocromada por grafite, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). O goniômetro horizontal de alto ângulo RINT2000 foi utilizado sob o modo de varredura contínua, permitindo deslocar a amostra em intervalos de θ e o detector em intervalos de 2 θ , rotacionando a amostra em relação ao feixe de raios X incidente. Ambos os deslocamentos foram conduzidos a uma velocidade de varredura de 1,000° /min. A varredura foi conduzida à temperatura ambiente (298(1) K) no intervalo de detecção compreendido entre 5° a 60° em 2 θ .

Foram realizadas comparações entre os difratogramas experimentais e os padrões teóricos de DRXP simulados através do programa Mercury 3.1.1.⁷⁰ As simulações são realizadas sob as mesmas condições dos padrões experimentais (radiação CuK α e faixa angular de varredura em 2 θ) utilizando os arquivos “.cif” das modificações cristalinas determinadas à temperatura ambiente.

2.6 Espectroscopia vibracional no Infravermelho (IV) e Raman.

As análises vibracionais por espectroscopia no IV e Raman se realizaram à temperatura ambiente em um espectrômetro por transformada de Fourier FT-IR/FT-Raman VERTEX 70 (Bruker®) equipado com um laser de Nd:YAG ($\lambda = 1064$ nm, potência de 200 mW) e um detector de Ge resfriado com nitrogênio líquido, a uma resolução de 4 cm⁻¹.

O preparo das amostras para os espectro de IV, precisou aproximadamente de 1 mg de cada amostra das modificações cristalinas analisadas, misturando com 200 mg de KBr (Vetec®). O KBr foi previamente mantido em estufa a 120 °C por 24 h. Após dessecação, este sal foi pulverizado em almofariz de ágata junto com as amostras das modificações cristalinas. Em seguida, a mistura foi comprimida em uma prensa hidráulica (Potente Brasil®, 15 toneladas). Pastilhas translúcidas foram obtidas com espessuras entre 1 e 2 mm e diâmetros variando entre 1,0 a 1,5 cm após compressão e analisadas pela técnica de transmissão. Os espectros foram obtidos através de 356 varreduras, cujas combinações forneceram espectros médios.

Para as análises espectroscópicas vibracionais por espalhamento Raman, as amostras foram diretamente colocadas em portas-amostra de alumínio, onde há hemisférios torneados com raio de 2 mm.

Estas medidas de espectroscopia vibracional foram desenvolvidas em colaboração com o grupo de pesquisa em Moléculas, Materiais e Medicamentos sob direção do Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

2.7 Análises térmicas.

Foram realizadas medidas das curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) das modificações cristalinas do fármaco 3TC, utilizando um calorímetro DSC -60 (Shimadzu®). Durante as medidas de DSC as amostras foram mantidas em um fluxo de calor através de um termopar, sob um fluxo de uma mistura de ar-nitrogênio com vazão de 50 ml/min. As amostras foram colocadas e pesadas (em torno de 5,0 mg por cada amostra) em cadinhos de alumínio (usados como porta-amostras e referencias) selados por uma prensa, e posteriormente as amostras são conduzidas a uma taxa de aquecimento de 5°/min, desde a temperatura ambiente até as correspondentes temperaturas de decomposição, conforme o avanço do perfil da curva.

As análises de termogravimetria TGA foram realizadas em uma termobalança TGA – 50/50H (Shimadzu®). Em torno de 5,0 mg das amostras foram colocadas em cadinhos cerâmicos, os quais foram previamente lavados com acetona a fim de remover possíveis impurezas. As medidas foram realizadas em uma taxa de aquecimento de 5°/min, dentro de uma faixa de temperatura entre 25°C a 300°C, sob uma atmosfera de ar-nitrogenio com vazão igual à do DSC.

Tanto o calorímetro DSC e a termobalança TGA, encontram-se instalados nas dependências do grupo de cristalografia do Insituto de Física de São Carlos (Figura 11).

Figura 11 - Foto mostrando os equipamentos de: (a) DSC e (b) TGA, instalados no Instituto de Física de São Carlos.

Os cristais dos sais do farmaco 3TC obtidos foram analisados utilizando um microscópio de luz polarizada Leica®, modelo DM2500P, instalado no laboratório de cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (Figura 12). Este microscópio está equipado com objetivas capazes de ampliar de 40x até 630x, além de uma câmera digital acoplada e um software de captação de imagens em tempo real que permitem adquirir, analisar e processar imagens de altíssima qualidade. Acoplado a este equipamento, há também uma platina de aquecimento (*Hot-Stage*) controlada por um sistema que variou automaticamente a temperatura da amostra entre a temperatura ambiente e 300°C, complementando os estudos de análise térmica por DSC e TGA.

Figura 12 - Foto do microscópio termo-óptico. Destaca-se no círculo amarelo o dispositivo do *Hot-Stage*.

3 CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO DOS SAIS BROMIDRATO ($3TCH^+-Br^-$) E DIFLUORIDRATO DE HIDROGÊNIO DE LAMIVUDINA ($3TCH^+-F^- \cdots HF$).

Neste capítulo apresentam-se os resultados de dois novos sais do fármaco lamivudina. Trata-se de um sal de bromidrato $3TCH^+-Br^-$ e um sal (sal cocristal) de difluoridrato de hidrogênio $3TCH^+-F^- \cdots HF$. Estas duas novas modificações cristalinas foram desenvolvidas como parte de um planejamento racional de fármacos mediante a engenharia de cristais, a fim de obter formas farmacêuticas que tenham propriedades farmacocinéticas melhoradas. Tendo como base a modificação do cloridrato de lamivudina $3TCH^+-Cl^-$ (anidro) e do cloridrato monohidratado de lamivudina $3TCH^+-Cl^- \cdot H_2O$, reportados na literatura³⁷ e protegidos por patentes no Brasil,⁷⁵ foi realizada a formação destes novos sais de halógenos (brometo e hidrogenodifluoreto).

A vantagem destes tipos de sais é, em geral, a obtenção de uma nova forma sólida com solubilidade aquosa melhorada, o que pode significar uma maior biodisponibilidade. Assim por exemplo, o sal de cloridrato,⁷⁶ $3TCH^+-Cl^-$, é mais solúvel que a forma neutra. Tendo isso em mente, foram analisados os comportamentos supramoleculares dos dois novos sais de halógenos anteriormente mencionados, a fim de poder correlacionar suas características estruturais com as suas propriedades farmacocinéticas.

3.1 Análise estrutural e conformacional por DRXM.

Ambos os sais de lamivudina apresentaram monocristais de boa qualidade com morfologias de prismas ou bastões o que permitiu realizar os experimentos de DRXM com precisão. Ambos cristalizaram no grupo espacial monoclinico não-centrossimétrico $P2_1$. Este grupo espacial apresenta duas unidades assimétricas por cela unitária. Cada unidade assimétrica está constituída por uma unidade catiônica de lamivudina, $3TCH^+$, e uma unidade aniônica do haleto, Br^- , no caso bromidrato, e $F^- \cdots HF$, no caso do difluoridrato de hidrogênio (Figura 13).

Figura 13 - Diagrama tipo ORTEP⁶⁹ das unidades assimétricas dos sais 3TCH⁺-Br⁻ e 3TC-F...HF, mostrando a numeração dos átomos e elipsoides de vibração térmica com 50% de probabilidade a temperatura ambiente. Os átomos de hidrogênio são representados como esferas de raio arbitrário.

As coletas de dados foram realizadas tanto em temperatura ambiente (298K) como em baixa temperatura (100K) para analisar a estabilidade térmica dos compostos. Nestas temperaturas observou-se uma consistência no grupo espacial e uma pequena diminuição dos parâmetros de cela conforme houve uma redução da temperatura, tal como é esperado. Os dados cristalográficos dos dois compostos, como também os resultados da resolução e refinamento, estão sumarizados na Tabela 1. Como pode ser observado nesta tabela, as estruturas não sofrem transições de fase na faixa de temperaturas analisadas (100K a 298K). Mesmo comportamento é observado no caso do cloridrato de lamivudina 3TCH⁺-Cl⁻.^{37, 55}

Tabela 1 - Dados cristalográficos dos sais de 3TCH⁺-Br⁻ e 3TC-F...HF.

Fórmula molecular	(C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₃ S)Br	(C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₃ S)F-HF
Massa fórmula mínima (g/mol)	310,18	269,27
Dimensões do cristal (mm ³)	0,19 x 0,05 x 0,03	0,19 x 0,05 x 0,03
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P ₂ ₁	P ₂ ₁
Unidade assimétrica Z/Z'	2/1	2/1
Comprimento de onda, Å	0,71073	0,71073

(continua)

(continuação)

Temperatura [K]		100,0(2)	298(2)	100,0(2)	298(2)
Dimensões da Cella unitária	a (Å)=	5,6198(2)	5,6885(2)	5,3598(1)	5,43490(10)
	b (Å)=	12,2315(6)	12,2872(7)	12,0206(4)	12,0714(3)
	c (Å)=	8,3857(3)	8,4185(4)	8,6306(3)	8,6515(3)
	β (°)=	104,303(2)	103,894(3)	104,550(1)	103,854(2)
Volume da cela [Å³]		558,55(4)	571,20(5)	538,22(3)	551,09(3)
Densidade calculada (mg/cm³)		1,844	1,803	1,662	1,623
Coefficiente de absorção (mm⁻¹)		3,863	3,777	0,331	0,324
Fatores de transmissão mínimo e máximo (Gaussian)		$T_{\min} = 0,3215$	$T_{\min} = 0,5339$	$T_{\min} = 0,9582$	$T_{\min} = 0,9441$
		$T_{\max} = 0,676$	$T_{\max} = 0,8951$	$T_{\max} = 0,9676$	$T_{\max} = 0,9561$
Intervalo de θ (°)		3,01 - 26,39	2,99 - 25,35	2,97 - 26,37	2,95 - 26,38
Intervalo dos índices	<i>h</i>	-6 a 6	-6 a 6	-6 a 6	-6 a 6
	<i>k</i>	-15 a 15	-14 a 14	-15 a 15	-15 a 14
	<i>l</i>	-10 a 10	-10 a 10	-10 a 10	-10 a 10
Reflexões coletadas		2681	3694	2189	2174
Reflexões independentes		1682	2030	2189	2174
Índice de simetria (R_{int})		0,0554	0,0444	0,0390	0,0270
Completeza para $\theta_{\max}$ (%)		99,0	99,3	99,4	99,7
F_{000}		312	312	280	280
Parâmetro refinados		146	146	155	156
Qualidade de ajuste sobre F^2		1,144	0,936	1,086	1,066
Índices residuais para $I > 2\sigma(I)$		$R_1 = 0,0444$	$R_1 = 0,0368$	$R_1 = 0,0314$	$R_1 = 0,0309$
		$wR_2 = 0,1024$	$wR_2 = 0,0611$	$wR_2 = 0,0745$	$wR_2 = 0,0773$
Índices residuais para todos os Dados		$R_1 = 0,0486$	$R_1 = 0,0460$	$R_1 = 0,0340$	$R_1 = 0,0341$
		$wR_2 = 0,1431$	$wR_2 = 0,0654$	$wR_2 = 0,0763$	$wR_2 = 0,0802$
$\Delta\rho_{\max} / \Delta\rho_{\min}$ (e/Å³)		0,695/-0,773	0,330/-0,409	0,206/-0,271	0,175/-0,188
Estrutura absoluta	Parâmetro de Flack	0,004(13)	-0,006(9)	-0,04(7)	0,069(6)
	Pares de Friedel	991	1087	1149	1182

3.1.1 Análise comparativa das celas unitárias.

Da Tabela 1, observa-se que existe uma grande similaridade entre os parâmetros das celas dos dois sais. As variações nas dimensões da cela não são superiores a 0,30Å. Isto sugere que os arranjos cristalinos possam ser isoestruturais, tal como será discutido na análise supramolecular (seção 3.1.3). Estes parâmetros são também similares aos encontrados para o

sal $3\text{TCH}^+\text{-Cl}^-$. Um método comumente utilizado para determinar similaridade estrutural é baseado na análise comparativa dos parâmetros de cela de duas estruturas. Isto permite calcular um índice de similaridade de cela unitária Π , definido como:

$$\Pi = \frac{(a+b+c)}{(a'+b'+c')} - 1 \quad (11)$$

Onde (a, b, c) e (a', b', c') são os eixos reduzidos da cela unitária para duas estruturas tais que Π apresenta um valor positivo para cada comparação. Assim, estruturas idênticas deveriam ser representadas por um valor do índice de similaridade de cela unitária igual a 0. Quanto mais próximo seja este índice deste valor, maior será a probabilidade de ter arranjos isoestruturais.⁷⁷ Desta maneira, considerando os parâmetros de cela unitária a temperatura ambiente tanto para os sais de $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$ e $3\text{TCH}^+\text{-FHF}$ como para o sal de $3\text{TCH}^+\text{-Cl}^-$, foi feita uma análise comparativa determinando os respectivos índices de similaridade para cada par de estruturas. Os resultados estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise comparativa dos parâmetros de cela dos sais de haleto de lamivudina.

Parâmetros de cela	$3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$	$3\text{TCH}^+\text{-FHF}$	$3\text{TCH}^+\text{-Cl}^-*$	Pares de estruturas	Índice Π
a (Å)	5,6885	5,4349	5,7060	3TCBr-3TCFHF	0,0090375
b (Å)	12,2872	12,0714	11,9670	3TCBr-3TCCl	0,0146503
c (Å)	8,4185	8,6515	8,3401	3TCFHF-3TCCl	0,0055626

*Dados extraídos da base de dados CCD.

Baseando-se só nas dimensões da cela, pode-se observar o caráter isoestrutural devido aos valores e às variações não significativas dos índices de similaridade (Tabela 2). Agora, considerando os tamanhos do raio iônico para os contraíons⁷⁸ a fim de estabelecer relações com o isoestruturalismo destes compostos, era de se esperar que as menores dimensões fossem para o sal de $3\text{TCH}^+\text{-FHF}$, o que realmente não acontece na direção do eixo c (Tabela 2) onde é observada uma anisotropia no comprimento deste parâmetro com relação aos homólogos $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$ e $3\text{TCH}^+\text{-Cl}^-$. A particularidade deste sal é a cristalização do íon difluoreto de hidrogênio ($\text{F}^-\cdots\text{HF}$) de geometria linear (com um ângulo estimado $\angle \text{F}^-\cdots\text{HF} \approx 175.15^\circ$) e com uma separação $\text{F}^-\cdots\text{F}$ de 2.284Å . Isto implica, portanto, que este íon linear

se acomoda ao longo da direção c o que explica o aumento deste parâmetro de célula. Embora a geometria deste contraíon seja diferente da geometria esférica dos íons Cl^- e Br^- , os arranjos supramoleculares não são significativamente modificados, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14 - Projeções estereográficas dos sais: (a) 3TC-Br, (b) 3TC-FHF, e (c) 3TC-Cl, na direção do eixo c (esquerda) e na direção do eixo b (direita). A seta indica o aumento no comprimento do eixo c para a cela de 3TC-FHF.

3.1.2 Análise conformacional.

A formação dos sais $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-F^-HF$ deve-se à protonação do nitrogênio imínico do anel pirimidínico ou fragmento de citosina. A disponibilidade do par eletrônico que dito nitrogênio possui, permite a capacidade de aceitar prótons provenientes de espécies ácidas fortes, como nos casos específicos dos ácidos inorgânicos halogenados HBr, HF e HCl. Isto também é observado pelo valor do pK_a da lamivudina (4,30),⁵⁶ que na presença de cocrystalizantes com um alto caráter ácido, facilita no equilíbrio estabelecido na matriz de cristalização uma majoritária formação de espécies protonadas, perante as espécies neutras. Como resultado tem-se a formação do correspondente par iônico que forma a unidade assimétrica do sistema cristalino (Figura 13).

Em ambos os casos se pode observar na unidade estrutural catiônica da lamivudina $3TCH^+$ a temperatura ambiente certa liberdade conformacional (rotacional) em torno de algumas ligações específicas. Esta característica é um aspecto importante que define a orientação espacial dos grupos funcionais e, portanto, a orientação das entidades supramoleculares ou "*synthons*", que posteriormente serão responsáveis pelos padrões de interações intermoleculares. Deste modo, as ligações passíveis de rotação nas unidades de $3TCH^+$, referem-se à ligação de $N1-C1'$ que liga o anel da citosina com o anel da pentose modificada oxatiolano, 2',3'-didesoxi-3'-tiotribose. No entanto, a liberdade rotacional desta ligação encontra-se restringida por efeitos de impedimento estérico entre estes fragmentos. Como resultado, esta ligação orienta os anéis em uma conformação *anti* que permite minimizar os efeitos das forças de repulsão. Dita conformação *anti* esta referida pela orientação oposta e paralela, com certo desvio, entre o oxigênio intracíclico da ligação $C1'-O1'$ do anel oxatiolano e o grupo carbonílico $C2=O2$ do fragmento pirimidínico (veja Figura 15.(a)). Outra ligação susceptível de liberdade conformacional é a ligação de caráter σ , $C4' - C5'$, que possui três estados rotacionais de 120° como consequência da geometria tetraédrica do carbono secundário $C5'$. Este átomo está ligado ao grupo hidroxílico $-O5'H$, o qual é capaz de rotacionar em virtude dos graus de liberdade permitidos pela ligação $C4' - C5'$ sob um eixo de ordem terciário. Este efeito já foi observado nos casos dos sais de cloridrato e cloridrato monohidratado de lamivudina.³⁷ No caso dos sais $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-F^-HF$, isoestruturais ao sal anidro de $3TCH^+-Cl^-$, a orientação do grupo 5'-hidroxílico está em posição equatorial em torno da ligação $C4'-C5'$, permanecendo em uma conformação *syn*

com relação ao átomo de enxofre S3' do anel oxatolano (Figura 15.(b)). Como veremos posteriormente, este posicionamento equatorial do grupo funcional hidroxílico é resultado do padrão de interações intermoleculares. Como já mencionado, conformações do braço 5'-CH₂OH similares às aqui observadas ocorrem tanto no caso do sal anidro 3TCH⁺-Cl⁻ ³⁷ como em cinco dos oito confôrmeros presentes na estrutura da dupla hélice de lamivudina,³³ estruturas que foram relatadas em trabalhos prévios dentro do nosso grupo de pesquisa.

O anel oxatolano de ambas as estruturas, 3TCH⁺-Br⁻ e 3TCH⁺-FHF, pode ser observado como a modificação do anel 2',3'-didesoxirribose com a substituição isostérica do grupo 3'-metileno por um átomo de enxofre. Este anel de cinco membros possui uma conformação de envelope com o enxofre S3' localizado no ponto de inflexão e deslocado do plano formado pelos átomos C2',C1',O1' e C4' (com desvio quadrático médio de 0,0365Å para o 3TCH⁺-Br⁻ e de 0,0409Å para o 3TCH⁺-FHF) por um valor de 0,865(1)Å no caso do 3TCH⁺-Br⁻ e de 0,8101(7)Å para o 3TCH⁺-FHF, respectivamente. De acordo com os parâmetros de deslocamento do átomo de enxofre, considera-se que este se encontra em orientação *syn* com relação ao plano do anel da citosina (Figura 15.(c)). Como resultado, obtém-se uma conformação *endo* como observado nas conformações C3'-endo comuns em anéis de ribose de nucleotídeos e nucleosídeos canônicos.⁷⁹ Estes valores são similares aos encontrados no 3TCH⁺-Cl⁻. Conformações S3'-*endo* do anel oxatolano ocorrem em outras modificações cristalinas de 3TC reportadas na literatura como: na forma I de lamivudina³⁰, no sacarinato de lamivudina,³⁶ no maleato de lamivudina,³⁵ em alguns confôrmeros da dupla helice de lamivudina,³³ no cocrystal de lamivudina com zidovudina,³⁴ no salicilato de lamivudina³⁸ e no 3,5-dinitrossalicilato de lamivudina.³⁴

Figura 15 - Resumo da análise conformacional das ligações passíveis de rotação nas unidades catiônicas dos sais 3TCH⁺-Br⁻ e 3TCH⁺-FHF⁻. (a) Ligação N1—C1', entre os anéis da citosina e oxatiolano conformação *anti*, (b) Ligação C4'—C5', posicionamento equatorial do grupo hidroxílico O5'H em orientação *syn* com o átomo S3', (c) Estrutura envelope do anel oxatiolano, com conformação S3'-endo. Alguns átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza.

As unidades catiônicas 3TCH⁺ apresentam diferenças discretas, mas não muito significativas, nas distâncias e nos ângulos de ligação. A superposição das estruturas catiônicas dos sais 3TCH⁺-Br⁻, 3TCH⁺-FHF⁻ e 3TCH⁺-Cl⁻ confirmam a isoestruturalidade conformacional que apresentam os sais dos três primeiros elementos da série dos halógenos do fármaco 3TC (Figura 16). Igualmente, podem-se observar a partir dos desvios discretos nos ângulos de torção, sobre as ligações que envolvem os grupos susceptíveis de liberdade conformacional, as semelhanças nos parâmetros estruturais (Tabela 3).

Figura 16 - Sobreposição das conformações moleculares de: 3TCH⁺-Br⁻ (Vermelho), 3TCH⁺-FHF (Azul) e 3TCH⁺-Cl⁻ (Amarelo).

Tabela 3 - Ângulos de torção específicos envolvendo as ligações com liberdade conformacional nas unidades catiônicas de 3TC⁺, para os sais de 3TCH⁺-Br⁻, 3TCH⁺-FHF e 3TCH⁺-Cl⁻.

Fragmento molecular	Ângulo de torção	Sal de halógeno:		
		3TCH ⁺ -Br ⁻	3TCH ⁺ -FHF	3TCH ⁺ -Cl ⁻ *
Ligação C1'-N1', união da base citosina com a ribose modificada oxatolano.	C2-N1-C1'-O1'	163,4(3)°	165,87(1)°	161,9(2)°
	C6-N1-C1'-O1'	-20,1(5)°	-13,6(2)°	-22,1(3)
	C2-N1-C1'-C2'	-76,8(4)°	-73,8(2)°	-78,1(3)°
	C6-N1-C1'-C2'	99,7(4)°	106,7(2)°	97,9(3)°
Anel da ribose modificada oxatolano	O1'-C1'-C2'-S3'	36,5(4)°	35,7(2)°	35,5(3)°
	C1'-C2'-S3'-C4'	-42,1(3)°	-39,99(15)°	-41,5(2)°
	C2'-S3'-C4'-O1'	38,2(3)°	35,60(14)°	38,7(2)°
	S3'-C4'-O1'-C1'	-23,3(4)°	-20,74(19)°	-24,6(2)°
	C4'-O1'-C1'-C2'	-8,5(5)°	-9,8(2)°	-7,13(3)°
Braço 5'-CH ₂ OH	O1'-C4'-C5'-O5'	-174,2(3)°	-173,14(16)°	-175,8(2)°
	S3'-C4'-C5'-O5'	64,4(4)°	67,7(2)°	65,13(3)°

*Dados extraídos da base de dados CCD.

Uma análise estatística dos parâmetros geométricos destas modificações cristalinas foi realizada empregando o programa MOGUL.⁶⁷ Este programa é uma ferramenta da base de dados estrutural CSD¹² que realiza uma análise comparativa entre os valores estruturais de comprimentos de ligação, ângulos de valência e ângulos de torção de uma conformação molecular, para analisar os valores padronizados de ditos parâmetros a partir de um conjunto de estruturas similares depositadas na base de dados. Desta forma podem ser inferidos alguns aspectos estruturais de uma molécula dada a partir dos desvios de alguns parâmetros.

No caso específico das conformações moleculares das unidades de $3TCH^+$ dos sais $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-FHF$, a grande maioria dos parâmetros geométricos estiveram dentro dos intervalos esperados, em torno dos valores padrões característicos de estruturas similares com estas bases nitrogenadas. O que demonstra que a qualidade do refinamento e, portanto, dos dados cristalográficos é satisfatória. Porém, alguns desvios foram observados, especificamente naquelas ligações com liberdade rotacional. Assim, apresenta-se um desvio considerável na ligação $N1-C1'$ que une aos anéis citosina e oxatiolano, assim como nos ângulos de torção que envolve esta ligação. Estes desvios se devem principalmente à conformação *trans* entre estes anéis (com o grupo carbonila $C2=O2$ contrário à ligação $C1'-O1'$) (veja Figura 17). A análise estatística dos parâmetros geométricos do braço 5'-hidroxi-metilênico $CH_2-O5'H$ mostra claramente as duas conformações possíveis (equatorial e axial) referentes ao plano do anel oxatiolano. Assim se observa a preferência pela posição equatorial deste grupo (Figura 17).

Portanto, as conformações adotadas pelos sais halogenados de $3TCH^+-X^-$ (X^- : Cl, Br e FHF) são bem comportadas com relação a estruturas canônicas de derivados de bases nucleicas ou nitrogenadas, sendo que nenhum desvio significativo foi observado. Consequentemente, pode-se inferir que as conformações adotadas pelos sais aqui analisados são estatisticamente as conformações mais preferidas por estruturas nucleosídeas, isto implica que energeticamente estas conformações são estáveis podendo-se considerar como conformações de mínima energia.

Figura 17 - Histogramas de análise da (a) Ligação N1—C1', (b) ângulo de torção C2—N1—C1'—O1' entre os anéis da citosina e oxatiolano, (c) ângulo de torção S3'—C4'—C5'—O1' do braço 5'-hidroximetilénico.

3.1.3 Análise supramolecular

Os empacotamentos cristalinos dos sistemas $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-F\cdots HF$ apresentam interações intermoleculares clássicas fortes do tipo $O-H\cdots O$, $N-H\cdots O$, $N-H\cdots Br$ e $N-H\cdots F$. Eles apresentam também interações não clássicas importantes do tipo $C-H\cdots O$, além de interações $\pi-\pi$ entre os sistemas eletrônicos π (aromáticos) dos fragmentos citosínicos. Assim, as estruturas de $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-F\cdots HF$ e seus comportamentos supramoleculares têm características isoestruturais com o sal de $3TCH^+-Cl^-$ já reportado.³⁷ Todas as estruturas dos $3TCH^+-X^-$ apresentam cadeias unidimensionais na direção do eixo *b*, com ligações bifurcadas entres os centros doadores do anel citosínico (nitrogênios N4, N3) e os aceptores aniônicos (X^- : Cl^- , Br^- e $F^- \cdots HF$).

Figura 18 - Padrão de interações intermoleculares clássicas (ligações de hidrogênio) presente nas estruturas dos sais halogenados de lamivudina $3TCH^+-X^-$ (Br^- , FHF^- e Cl^-).

Tais cadeias unidimensionais na direção do eixo *b*, são geradas especificamente pelas ligações bifurcadas entre os grupos imínico e amínico e os ânions, representadas por $N3^+-H3\cdots(Br, F\cdots HF)$ e $N4-H14x\cdots(Br^-, F\cdots HF)$. Em todos os casos é evidente que a força da ligação $N3^+-H3\cdots X^-$ é maior em comparação com as demais interações, inclusive da $N4-H4x\cdots X^-$, o que era de se esperar pelo efeito da protonação sobre o nitrogênio imínico,

dado que esta interação é de caráter predominantemente iônico. Como consequência destas interações o íon é coplanar com o anel da citosina. Desta maneira, os deslocamentos dos ânions com relação ao plano formado pelos átomos não-hidrogenóides do fragmento citosínico é de 0,2213(5) Å para o caso do Br⁻ do 3TCH⁺-Br⁻ e de 0,3824(16) Å para o F1⁻ do 3TCH⁺-FHF. Neste último caso também é importante considerar o deslocamento do átomo F2, que faz parte do ânion hidrogenodifluoreto, onde este átomo se encontra a -1,1283(15) Å abaixo do plano mínimo quadrado do anel citosínico. Apesar desses deslocamentos serem maiores em comparação com o deslocamento reportado para o Cl⁻ (-0,1745(7) Å), os acomodamentos destes íons em cada uma das estruturas terminam sendo similares e apresentando em todos os casos os mesmos padrões de interações (veja Figura 18), com ligeiras diferenças nos valores das distâncias (Tabela 4).

Nos sais 3TCH⁺-X⁻, o grupo amino por sua vez participa como doador de outra ligação de hidrogênio com outro ânion X⁻ que se encontra contrário à direção das ligações bifurcadas. Dito ânion pertence a um par iônico adjacente relacionado por um eixo com deslizamento 2₁. Assim, a ligação N4-H4y...X⁻ ⁽ⁱⁱ⁾ (posição equivalente de simetria (ii)=-x-1; y-1/2; -z+1) permite o acomodamento subsequente dos pares iônicos nas cadeias helicoidais. Neste caso os ânions não são coplanares com o anel citosínico se desviando 1,8443(5) Å, no caso do Br⁻, e 1,1378(16) Å e 2,5249(15) Å no caso do F1⁻ e o F2 do hidrogenodifluoreto, respectivamente. A ligação de hidrogênio O5'-H...O2 entre a hidroxila e o oxigênio da carbonila do fragmento citosínico se encontra ao longo da direção [10-1] sendo responsável pelo entrecruzamento das cadeias unidimensionais já mencionadas. Estas cadeias percorrem em forma de zigue-zague ao longo da direção do eixo cristalográfico *b*. As cadeias podem-se considerar como uma grade do par iônico (3TCH⁺-X⁻). Como resultado desse arranjo se observam planos moleculares formados pelas unidades catiônicas, que vão se ancorando na direção do plano [101]. Assim, gera-se uma projeção bidimensional estabilizada pelas ligações bifurcadas N4-(H4x,H4y)...O5' entre o grupo amino e a hidroxila de uma unidade de 3TCH⁺ subsequente. Estas interações são observadas tanto no sistema 3TCH⁺-Br⁻ como 3TCH⁺-Cl⁻ (Figura 19(c)). Já no sal de 3TCH⁺-FHF o padrão bifurcado não é encontrado devido à inclusão de HF na rede, dado que isto gera um deslocamento na diagonal do plano, resultando num maior afastamento das unidades de 3TCH⁺. Pode-se observar, também, a presença da interação N4-H4x...O5' que permite a ancoragem vertical das unidades 3TCH⁺ que conformam o plano. Vale a pena destacar o papel que desempenha a interação não clássica C4'-H4'...(X⁻:Br⁻, FHF, Cl⁻) a qual, junto com as interações dos grupos amino e hidroxilas,

permite arranjar não somente as unidades catiônicas de $3TC^+$ como também os ânions X^- dentro dos planos moleculares.

Figura 19 - Empacotamentos cristalinos e padrões de interações dos sais $3TCH^+-X^-$. Análise unidimensional: (a) formação de cadeias helicoidais ao longo da direção $[010]$, (b) Projeção na direção do eixo b . Análise bidimensional: (c) formação de planos moleculares na direção $[101]$ pela ligação das cadeias unidimensionais mediante interações clássicas, (d) Projeção sobre o eixo b . (e) Contribuição de interações não clássicas para a formação dos planos moleculares. Conformação tridimensional, ligação entre os planos paralelos da direção $[101]$, (f) projeção ao longo do eixo c e (g) vista sobre eixo b .

Portanto, as principais interações para cada um dos sais envolvem a formação de cadeias helicoidais, as quais percorrem horizontalmente ao longo do plano [101] e se encontram ligadas por interações $N-H\cdots X^-$ entre os fragmentos citosínicos e os íons (Figura 19(a)). Estas cadeias por sua vez são entrecruzadas pelas ligações $O-H\cdots O$ dos grupos hidroxilas com as carbonilas dos anéis citosínicos arquitetando assim os planos moleculares (Figura 19(b)). Já na direção vertical deste plano se formam as interações: $N-H\cdots O$ entre os grupos amino e hidroxila das unidades catiônicas adjacentes e $C-H\cdots X^-$ entre os carbonos quirais $C4'$ dos anéis oxatíolanos e os anions, reforçando a conformação de ditos planos (Figura 19(c) e (e)). Desta maneira se define, então, o arranjo dos pares iônicos dentro da família dos planos moleculares $\{101\}$.

Na mesma direção das ligações bifurcadas $N-H\cdots Br$, e como resultado do empacotamento gerado mediante a simetria roto-translacional na direção do eixo b , os sistemas $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-Cl^-$ apresentam uma interação não-clássica do tipo $C-H\cdots O$ entre o carbono quiral $C1'$ do anel oxatíolano e o oxigênio do grupo hidroxila $O5'$. No caso do $3TCH^+-FHF$, dita interação não apresenta uma distância apreciável devido a que o valor é maior que a soma dos raios de Van der Waals para os átomos de C e O. Assim, é provável que neste caso a inclusão da molécula de HF do íon hidrogenodifluoreto permita afastar alguns fragmentos das unidades de $3TCH^+$.

A rede cristalina envolve também outras interações não clássicas, incluindo orbitais π e não ligantes. Ditas interações são observadas no empacotamento das unidades catiônicas $3TCH^+$, ao longo da direção [100] devido à superposição dos fragmentos de citosina nesta direção. Isto resulta em um acoplamento dos orbitais π os quais conseguem interagir principalmente com o oxigênio $O1'$ do anel oxatíolano. Assim, tem-se um contato curto $C4\cdots O1'$ como resultado desta aproximação entre unidades $3TCH^+$. Igualmente, os íons X^- das unidades dos pares iônicos superpostos em planos paralelos interagem na direção [100]. Esta interação do tipo $C2\cdots X^-$ é paralela à interação $C4\cdots O1'$, sendo a primeira da classe de ligações $\text{ânion}\cdots\pi$,⁸⁰ a qual auxilia na estabilização energética do empacotamento tridimensional. O anel eletrodeficiente da citosina interage com o ânion localizando-o perto do carbono C2 do fragmento imídico. Na nomenclatura frequentemente usada na química organometálica isto é chamado de *hapticidade* η^1 .⁸¹ Assim, considerando que a protonação do anel ressonante da citosina consegue um efeito de deslocamento da carga positiva, tendo, portanto, um efeito de carga distendida na região imídica principalmente (Figura 20). Hapticidade (η^x) pode ser definida como o número de átomos que estão dentro da distância de

ligação do átomo metálico, ou seja, o número de átomos de um ligante que interage diretamente com o metal. O valor de x informa justamente este número.

Figura 20 - Hapticidade η^1 apresentadas entre os íons haleto X^- (Br^- , FHF , Cl^-) e os anéis de citosina das unidades catiônicas $3TCH^+$.

Na direção [001] observa-se outra interação de van der Waals entre os átomos de enxofre intracíclico S3' e do grupo amino N4 do anel citocínico das unidades $3TC^+$ adjacentes $S3' \cdots N4$. Cálculos teóricos ao nível de DFT⁷⁴ têm mostrado que interações podem estar originadas numa transição eletrônica entre o orbital molecular mais alto ocupado (HOMO) e o orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO). No primeiro caso o HOMO encontra-se localizado no anel oxatolano levando a um aumento da densidade eletrônica no átomo de enxofre S3'. Já no segundo caso observa-se que o LUMO está distendido em torno do anel da citosina (Figura 21). Assim estas interações de curto alcance, desde o ponto de vista computacional para moléculas isoladas no estado gasoso, podem-se entender como um processo de transferência de carga doador-aceptor, sendo os grupos oxatolanos os doadores e os grupos citosínicos os aceptores, respectivamente.⁸²

Entretanto, no sal de $3TCH^+ - FHF$ algumas das interações anteriores já não são observadas, ou aparecem com menor intensidade. Isto se deve a que as distâncias calculadas são maiores resultando em um leve afastamento dos fragmentos moleculares no arranjo tridimensional. Porém, em contrapartida está a geração de outras interações consideráveis a partir do átomo F2.

Tabela 4 - Lista geral das interações intermoleculares nos sais de haleto de lamivudina 3TCH⁺-X⁻.

Bromidrato de Lamivudina 3TCH ⁺ -Br ⁻				
D-H...A	D-H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D-H...A (°)
N4-H4x...Br1 ⁱ	0.86	2.709(1)	3.469(4)	148.11(25)
N3-H3...Br1 ⁱ	0.86	2.408(1)	3.242(4)	163.37(22)
N4-H4y...Br1 ⁱⁱ	0.86	2.722(1)	3.417(4)	138.86(24)
O5'-H5'...O2 ⁱⁱⁱ	0.82	2.057(4)	2.810(5)	152.39(24)
C4'-H4'...Br1 ^{iv}	0.98	2.824(1)	3.736(5)	155.24(25)
N4-H4x...O5' ^v	0.86	2.711(4)	3.000(5)	101.28(24)
N4-H4y...O5' ^v	0.86	2.664(4)	3.000(5)	104.68(24)
N4-H4y...O2 ^{vi}	0.86	2.703(4)	3.286(5)	126.32(26)
C1'-H1'...O5' ^{vii}	0.98	2.443(4)	3.360(5)	155.68(26)
Centroides	Distância	Ângulo		
Cg1...O1' ^{viii}	3.2456(36)	19.774(81)		
C4...O1' ^{viii}	3.1919(47)	18.474(135)		
N3...O1' ^{viii}	3.1027(40)	6.615(138)		
C2...Br1 ^{viii}	3.5757(45)	11.221(16)		
N4...S3' ^{ix}	3.2943(40)	15.612(87)		
Difluoridrato de Hidrogenio de Lamivudina 3TCH ⁺ -F ⁻ HF				
N4-H4x...F1 ⁱ	0.86	2.697(2)	3.303(3)	128.67(13)
N3-H3...F1 ⁱ	0.86	1.728(2)	2.561(2)	162.50(12)
N4-H4y...F1 ⁱⁱ	0.86	2.309(2)	3.095(3)	151.98(14)
O5'-H5'...O2 ⁱⁱⁱ	0.82	1.942(1)	2.756(2)	171.53(14)
C4'-H4'...F2 ^{iv}	0.98	2.338(2)	3.241(3)	152.88(12)
N4-H4x...O5' ^v	0.86	2.245(2)	2.813(3)	123.49(13)
N4-H4y...O2 ^{vi}	0.86	2.484(1)	3.058(2)	124.82(12)
C1'-H1'...O5' ^{vii}	0.9795(24)	2.752(1)	3.670(1)	156.12(13)
C6-H6...F2 ^{vi}	0.930(2)	2.339(2)	3.127(3)	142.33(13)
C2'-H2B'...F2 ^{ix}	0.970(3)	2.592(1)	3.175(3)	118.85(15)
Centroide	Distância	Ângulo		
Cg1...O1' ^{viii}	3.2260(10)	18.930(42)		
C2...O1' ^{viii}	3.2215(21)	18.650(51)		
N3...O1' ^{viii}	3.0872(17)	7.248(45)		
C2...F1 ^{viii}	3.0814(24)	18.558(51)		
Cloridrato de Lamivudina 3TCH ⁺ -Cl ⁻				
N4-H4x...Cl1 ⁱ	0.8613(87)	2.5922(36)	3.3551(26)	148.21(30)
N3-H3...Cl1 ⁱ	0.8737(40)	2.2296(42)	3.0731(27)	162.21(33)
N4-H4y...Cl1 ⁱⁱ	0.9657(48)	2.3794(49)	3.2475(24)	149.32(40)
O5'-H5'...O2 ⁱⁱⁱ	1.004(52)	1.8233(53)	2.7632(34)	154.35(48)
C4'-H4'...Cl1 ^{iv}	0.9793(28)	2.7667(80)	3.6840(28)	156.20(15)
N4-H4x...O5' ^v	0.8613(87)	2.6083(37)	2.9117(39)	101.98(25)
N4-H4y...O5' ^v	0.9657(48)	2.6361(62)	2.9117(39)	96.73(35)
N4-H4y...O2 ^{vi}	0.9657(48)	2.7034(47)	3.1993(30)	112.46(35)
C1'-H1'...O5' ^{vii}	0.9795(24)	2.4315(25)	3.3526(35)	156.49(16)
Centroides	Distância	Ângulo		
Cg...O1' ^{viii}	3.2401(15)	20.513(49)		
C4...O1' ^{viii}	3.1518(26)	17.390(73)		
N3...O1' ^{viii}	3.0977(26)	7.744(77)		
C2...Cl1 ^{viii}	3.5032(25)	14.225(69)		
N4...S3' ^{ix}	3.3463(23)	18.007(55)		

Termos: D (Doador) e A (Aceptor). Códigos de simetria das posições equivalentes: *i* x,y,z; *ii* -x-1,y-1/2,-z+1; *iii* -x,y+1/2,-z; *iv* x+1,y,z-1; *v* x-1,y,z+1; *vi* -x,y-1/2,-z+1; *vii* -x+1,y+1/2,-z; *viii* x+1,y,z; *ix* x,y,z-1.

Assim, observa-se que apesar das unidades $3TCH^+$ estarem deslocadas levemente, elas estão ligadas por interações de curto alcance do tipo $C-H\cdots F$ (Tabela 4). Estas últimas interações cumprem o papel de estabilizar o ordenamento das unidades de $3TCH^+$ mantendo ao mesmo tempo a isoestruturalidade do sal $3TCH^+-FHF$, com relação aos outros sais halogenados.

Figura 21 - Contatos intermoleculares entre unidades de $3TCH^+$ e os íons X^- . Análise dos orbitais de fronteira HOMO-LUMO que intervêm nas interações dos átomos por contatos de van der Waals.

Desde outra perspectiva o empacotamento cristalino mostra um arranjo de canais iônicos ao longo do eixo c . Assim, podemos considerar que o empacotamento está formado por colunas de íons X^- arranjados ao longo do eixo c . Nos interstícios dessas colunas estão localizadas as unidades catiônicas de $3TCH^+$ (Figura 22). Comportamento este que é observado em todos os sais de $3TCH^+-X^-$, embora as distâncias entre os íons variem, como era de se esperar, pelas variações nos raios iônicos correspondentes.

Figura 22 - Interstícios aniônicos onde são ancorados os íons de X^- : Br^- , F^- , $\dots HF$ e Cl^- . Projeção ao longo do eixo cristalográfico c .

Desta forma, os arranjos isoestruturais caracterizam-se pela formação de vacâncias ao longo do eixo *a* onde são incorporados os íons X^- (a exceção do $3TCH^+-FHF$, onde a força da ligação $F\cdots H-F$ obriga a cristalizar uma molécula do ácido na rede cristalina). Esta é a principal característica do empacotamento cristalino dos sais de haleto de 3TC. As vacâncias são vistas como canais iônicos, com raios de prova que variam entre 1,35 Å ($3TCH^+-Br^-$), 1.15 Å ($3TCH^+-Cl^-$) e 1.0 Å ($3TCH^+-FHF$) respectivamente (Figura 23).

Figura 23 - (a) Empacotamentos cristalinos dos sais de haleto de 3TC ao longo do eixo *a*. Projeção das superfícies correspondentes às cavidades moleculares onde são incorporados os íons: (b) na direção do eixo *a* e (c) na direção do eixo *b*.

3.1.4 Análise estatística das interações intermoleculares.

A base de dados Isostar⁸³ permite comparar interações específicas que ocorrem em espécies químicas derivadas de um dado grupo. Isostar provê gráficos de dispersão interativos e tridimensionais, que mostram a probabilidade de ocorrência de interações intermoleculares em um determinado grupo químico funcional. Esta aplicação é incluída na CCDC (do inglês *Cambridge Crystallographic Data Centre*)¹² e fornece informação relacionada às interações intermoleculares que acontecem nas estruturas cristalinas depositadas. Assim, foi elaborada uma busca de interações reportadas entre fragmentos de bases nitrogenadas protonadas e íons

halogênios procurando interações entre unidades com fragmentos citosínicos protonados CytH^+ e os íons Cl^- e Br^- . Todas as estruturas encontradas foram análogas às unidades catiônicas de 3TCH^+ . Desta forma, foi possível observar duas estruturas análogas do sal $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$ e nove estruturas análogas do sal $3\text{TCH}^+\text{-Cl}^-$, respectivamente. A disposição dos ânions ao redor das unidades de CytH^+ em ambos os casos permite inferir um comportamento geral das interações que acontecem em torno da base nitrogenada corroborando a presença de algumas interações não clássicas, neste caso das interações $\text{Cl}^- \cdots \pi$ e $\text{Br}^- \cdots \pi$ especificamente. A análise mostra uma superfície de contatos onde os ânions podem interagir, deixando clara a presença forte de contornos envolta dos nitrogênios imídicos e amínicos principalmente e dos orbitais- π (Figura 24). Isto auxilia na predição da presença destas interações como características do comportamento supramolecular destes fragmentos moleculares como, por exemplo, a hapticidade η^1 observada nas unidades de 3TCH^+ (Figura 20). Observa-se também, que os sistemas iônicos de sais de cloreto têm sido mais estudados em comparação com os sais de brometo. Também pode-se observar que não se tem reportado até o momento nenhum resultado para sais de fluoreto ou grupos hidrogenodifluoreto.

Figura 24 - Gráfico de Isostar mostrando as interações intermoleculares reportadas entre uma unidade de base nucleica protonada (CytH^+) e íons de Br^- (esquerda) e Cl^- (direita). As estruturas ao redor das superfícies das interações são as estruturas reportadas na CSD e cujas interações foram relatadas entre estes motivos específicos (CytH^+ e X^-).

3.1.5 Análise da superfície de Hirshfeld e gráficos bidimensionais de dispersão das interações.

Com o objetivo de obter informação mais detalhada das interações intermoleculares, foram calculadas as superfícies de Hirshfeld (SH) dos compostos estudados, assim como as suas respectivas projeções bidimensionais em função dos parâmetros d_e e d_i chamados de *fingerprint* (impressão digital). Estas são poderosas ferramentas para a visualização e análise das propriedades estruturais, em relação ao padrão de interações no empacotamento cristalino (incluídas como aplicações do programa Crystal Explorer).⁸⁴ Esta análise mostra a contribuição relativa de cada contato presente nas novas formas cristalinas (Figura 25). Entretanto, permite realizar de uma forma mais clara, uma análise comparativa estabelecendo semelhanças e diferenças nos padrões de interações e contatos, entre os sais isoestruturais de haletos de lamivudina $3TCH^+-X^-$.

A visualização das interações é realizada a partir da superfície de Hirshfeld (SH) normalizada para as unidades de $3TCH^+$ de cada um dos sais (Figura 25). A normalização da superfície é realizada em função dos raios de van der Waals (vdW). Assim, regiões onde as interações intermoleculares são mais intensas aparecem em cor vermelha, indicando que as distâncias desses contatos são menores que a soma dos raios de vdW dos átomos que estão envolvidos nessa interação. Da mesma forma, contatos de intensidade média à fraca, estão em uma escala de branco a azul, onde o branco e o azul representam as regiões onde as distâncias são iguais e maiores à soma dos raios de vdW, respectivamente.⁵³

Como era de se esperar as correspondentes SH são bastante similares, sendo que as regiões que caracterizam os contatos mais fortes (regiões vermelhas) são referentes às interações clássicas de hidrogênio envolvendo os grupos amina e imida do anel citosínico, e o grupo hidroxila do anel oxatiolano, respectivamente. Assim, das SH pode-se observar que as intensidades destas interações são parecidas e apresentam o mesmo padrão.

No entanto, quando visualizados os *fingerprints* das SH correspondentes a cada um dos sais se percebe uma diferença significativa nas distâncias das interações clássicas entre os átomos $O\cdots H$ e $X\cdots H$. No caso dos sais de $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-Cl^-$, as frequências das ligações entre os átomos $O\cdots H$, devido à magnitude da força de ligação na interação $O5'-H5'\cdots O2$, é maior em comparação com a magnitude da força de ligação $N-H\cdots Br^-$ e $N-$

$\text{H}\cdots\text{Cl}^-$, responsáveis pela formação dos pares iônicos. Isto fica demonstrado pelas distribuições dos contatos $\text{O}\cdots\text{H}$, cujos valores dos pares d_e-d_i são menores que os apresentados pelas distribuições dos contatos $\text{Br}\cdots\text{H}$ e $\text{Cl}\cdots\text{H}$, respectivamente. Por outro lado, no sal $3\text{TCH}^+\text{-FHF}^-$ o *fingerprint* apresenta uma distribuição de pares d_e-d_i para os contatos $\text{O}\cdots\text{H}$ e $\text{F}\cdots\text{H}$ inversa à encontrada para os seus homólogos $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$ e $3\text{TCH}^+\text{-Cl}^-$. Assim, as interações $\text{N-H}\cdots\text{F}^-$ são mais fortes que as correspondentes interações $\text{O5'-H5'}\cdots\text{O2}$, $\text{N-H}\cdots\text{Br}^-$ e $\text{N-H}\cdots\text{Cl}^-$, fato que pode ser corroborado ao analisar os dados da Tabela 4. Portanto, embora os padrões das interações nos sais de haletos sejam similares, a principal diferença entre estes se encontra nas intensidades.

Figura 25 - Superfícies de Hirshfeld (SH) normalizadas e projeções bidimensionais (*fingerprints*), escaladas em angstroms Å, para os sais de: a) $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$, b) $3\text{TCH}^+\text{-Cl}^-$ e c) $3\text{TCH}^+\text{-FHF}^-$. I (vista frontal) II (vista traseira) da SH. Regiões nos *fingerprints* dos principais contatos: Fortes (1) $\text{O}\cdots\text{H}$, (2) $\text{X}^-\cdots\text{H}$, (3) $\text{H}\cdots\text{H}$; fracos (4) $\text{C}\cdots\text{X}^-$, $\text{S}\cdots\text{H}$, $\text{S}\cdots\text{N}$, $\text{C}\cdots\text{O}$, $\text{C}\cdots\text{N}$, $\text{N}\cdots\text{O}$.

As interações clássicas fortes $\text{N-H}\cdots\text{X}^-$ que envolvem a formação dos pares iônicos, assim como as ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila do anel oxatolano e carbonila do anel de citosina, podem claramente ser observadas nas SH e nos correspondentes *fingerprints*. Estas interações apresentam os maiores valores percentuais de ocorrência nas áreas da SH os quais variam entre 18% a 20% entre os átomos $\text{X}^-\cdots\text{H}$ e entre 20% a 22% nos

átomos O...H para todos os sais $3TCH^+-X^-$. Entretanto, vale a pena salientar que o maior valor percentual corresponde para os contatos H...H os quais variam entre 33% a 38% (Figura 26).

Figura 26 - Distribuição das três principais contribuições percentuais relativas, através das áreas das SH, para os principais contatos intermoleculares dos sais de haleto de lamivudina $3TCH^+-X^-$.

Os contatos que apresentaram as maiores porcentagens de contribuição nas áreas das SH estão associados ao ordenamento uni e bidimensional do empacotamento cristalino dos sais $3TCH^+-X^-$, e exceção dos contatos H...H. Já as menores porcentagens correspondem às interações de curto alcance envolvidas no caráter tridimensional dos empacotamentos cristalinos (descritos principalmente nas regiões (4) dos *fingerprints* da Figura 25). O fato de se observar nesta análise contatos desta natureza justifica a presença das interações mostradas

na Tabela 4. Porém, desta vez as distribuições destes contatos nas SH normalizadas e dos *fingerprints* não apresentam maiores diferenças entre os sais. Desta forma os contatos a considerar para cada um dos dois sais são: C...H (7,7% a 8,2%), S...H (6,3% a 9,7%), S...N (1,5% a 2,5%), O...C (2,5% a 2,95%), N...O (1,9% a 2,1%), C...X⁻ (1,3% a 1,5%), os quais estão envolvidos principalmente nas interações entre os átomos de enxofre da pentose modificada (anel oxatiolano) e os átomos de carbono, nitrogênio e hidrogênio da região imídica dos anéis citosínicos, das unidades adjacentes ao longo da direção [001]. Por sua vez, ditos contatos também estão relacionados com as interações envolvidas com os átomos de oxigênio, entre os fragmentos dos anéis oxatiolanos e os fragmentos imídicos das citosinas consecutivas na direção [100].

As interações $\pi \cdots \pi$ ânion ao longo da direção [100] podem ser observadas tanto na SH normalizada, representadas por uma região ligeiramente avermelhada (Figura 25, código II), como nos *fingerprints* (Figura 27). Cabe mencionar que as SH dos sais 3TCH⁺-X⁻ confirmam a posição η^1 dos íons X⁻ (Br⁻, Cl⁻, F⁻...HF) ao redor do fragmento amido do anel aromático da citosina, especificamente mais próximo ao átomo de carbono da carbonila, como sugerido anteriormente (Figura 20). As Figura 27 e Figura 28 mostram as contribuições relativas dos contatos envolvidos nas ligações fracas. Assim se observa que os sais 3TCH⁺-Br⁻ e 3TCH⁺-Cl⁻ têm distribuições mais parecidas em comparação ao 3TCH⁺-F⁻HF.

Uma descrição geral das SH de forma indexada e de forma curvada dos sais estudados permite nos dar detalhes, das deformações nas superfícies indicando a presença dos contatos intermoleculares. Estas deformações ajudam a perceber a tridimensionalidade dos empacotamentos e à sua vez fornecem mais indícios das possíveis interações. Considerando que ao momento das moléculas catiônicas de 3TCH⁺ ancorarem-se nos arranjos helicoidais 2₁, a proximidade das moléculas e, por conseguinte dos íons, só podem cumprir com os máximos de interação e mínimos de repulsão, uma vez que haja um ordenamento simétrico e consequentemente termodinâmico das cargas iônicas.

Figura 27 - *Fingerprints*, escalados em angstroms Å, dos contatos intermoleculares significativos que intervêm nas interações de curto alcance nos sais de 3TCH⁺-X⁻.

Figura 28 - Distribuição das mais significativas contribuições percentuais relativas, através das áreas das SH, para os contatos intermoleculares que participam nas interações de curto alcance, dos sais de haleto de lamivudina $3TCH^+ - X^-$.

Assim a tridimensionalidade destas formas particulares de SH, e suas deformações devido aos contatos das esferas de van der Waals, ajuda a visualizar como nos interstícios cristalinos as densidades eletrônicas das moléculas de $3TCH^+$ conseguem se localizar.

Figura 29 - Superfícies de Hirshfeld (SH) vistas de frente e verso, de tipo indexada para: (a) $3TCH^+ - Br^-$, (b) $3TCH^+ - FHF$, (c) $3TCH^+ - Cl^-$; e curvada para: (d) $3TCH^+ - Br^-$, (e) $3TCH^+ - FHF$ e (f) $3TCH^+ - Cl^-$. As SH do $3TCH^+ - Br^-$ são ilustradas com as moléculas mais próximas.

Cabe destacar nas SH da Figura 29 os contatos não clássicos entre os íons X⁻ e as unidades carregadas dos anéis aromáticos citosínicos. Isto se observa pelas regiões côncavas vermelhas nas SH indexadas para cada sal, onde ditas regiões situam-se próximas do carbono C2 que pertence ao fragmento imídico do anel. As SH curvadas mostram, também, uma deformação notória na região imídica relacionada com a hapticidade η^1 . Igualmente, a parte frontal das SH indexadas mostra as interações entre os átomos intracíclicos de O1' dos anéis oxatiolanos com os anéis da citosina, sendo mais próximas as interações ao redor dos fragmentos imídicos N3-C2(O2) de todos os sais (regiões vermelhas das SH indexadas e deformações côncavas das SH curvadas). Evidencia-se também que estes contatos são mais fracos para o sal 3TCH⁺-FHF, pois as colorações e as deformações das SH são menos intensas.

3.1.6 Similaridade dos empacotamentos cristalinos.

Para analisar a isoestruturalidade dos sais foi determinado de forma quantitativa o nível de similaridade estrutural entre as formas cristalinas, usando a ferramenta do programa Mercury⁸⁵ para cálculos de similaridade de empacotamento cristalino.⁸⁶ Os cálculos foram realizados analisando a similaridade entre pares de estruturas. Para isto foram escolhidas um conjunto de 15 moléculas de cada empacotamento cristalino, e as mesmas foram superpostas a fim de poder comparar clusters moleculares de 15 unidades de pares iônicos por cada sal. Ou seja, uma molécula central mais 14 unidades próximas. As tolerâncias geométricas utilizadas para delimitar, se os parâmetros do empacotamento são similares ou não foi de 20% para os valores das distâncias, e de 20° para os ângulos. Por sua vez, as comparações foram realizadas permitindo um leve grau de diferenças moleculares, encontrando assim as similaridades dos empacotamentos entre estruturas que contém espécies moleculares próximas, mas não exatas. Isto foi essencial no momento de comparar os ânions de brometo, cloreto e hidrogenodifluoreto. Foram, também, ignoradas as diferenças entre as posições dos átomos de hidrogênio e os tipos de ligações químicas, especificamente entre as unidades catiônicas de 3TCH⁺ para cada sal. Igualmente, foi possível estimar um valor quantitativo do grau de similaridade apresentado pelos empacotamentos dos sais de 3TCH-X. O valor do desvio quadrático médio (RMS, do inglês *root mean square deviation*) correspondente à

comparação entre os parâmetros de empacotamento dos clusters moleculares estão sumarizados na Tabela 5. Adicionalmente foi determinado um parâmetro de similaridade, baseado respectivamente na similaridade dos padrões de difração de pó simulados para cada um dos sais. Esta medida de similaridade é calculada usando o algoritmo de De Gelder, Wehrens e Hageman o qual emprega uma nova triangulação da função de ponderação, entre os picos mais relevantes de cada difratograma.^{86, 87} Os resultados destes cálculos estão também listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de similaridade dos empacotamentos cristalinos.

Composto de referencia	Composto de comparação	Nº de moléculas similares	RMS	Similaridade DRXP
3TCH ⁺ -Br ⁻	3TCH ⁺ -Cl ⁻	15 de 15	0.15566	0.980403
3TCH ⁺ -Br ⁻	3TCH ⁺ -FHF	15 de 15	0.38854	0.960573
3TCH ⁺ -Cl ⁻	3TCH ⁺ -FHF	15 de 15	0.37621	0.967026

Figura 30 - Superposição dos empacotamentos cristalinos entre os sais de: a) 3TC-Br — 3TC-Cl, b) 3TC-Br — 3TC-FHF e c) 3TC-Cl — 3TC-FHF. Vista estereográfica ao longo do eixo cristalográfico *a*.

A partir da Tabela 5, pode-se observar que o menor desvio na similaridade dos empacotamentos corresponde às estruturas dos sais $3TCH^+-Cl^-$ e $3TCH^+-Br^-$. Consequentemente, o maior desvio calculado foi para o par $3TCH^+-Br^-$ - $3TCH^+-FHF$. Isto concorda com as características observadas nos padrões das interações intermoleculares. Assim, o comportamento supramolecular dos sais $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-Cl^-$ é bastante similar. Já o sal $3TCH^+-FHF$ apresentou algumas divergências que podem ser explicadas pela presença da molécula de HF incluída no íon hidrogenodifluoreto. Esta inclusão, embora seja pequena, modificou consideravelmente algumas interações intermoleculares, a maioria delas sendo interações de curto alcance, que acaba modificando os empacotamentos cristalinos (Figura 30). A comparação dos padrões simulados de DRXP com clusters moleculares de 15 unidades não revelaram diferenças substanciais (Figura 31). Porém, vale a pena notar que as variações nos comprimentos das celas, por inclusão dos diferentes ânions, não são isotrópicos (secção 3.1.1). Assim é possível observar a partir dos valores da Tabela 5 que o maior valor de similaridade corresponde ao par $3TCH^+-Cl^-$ - $3TCH^+-Br^-$, e o menor ao $3TCH^+-Br^-$ - $3TCH^+-FHF$, em coerência com as características assinaladas nas superposições dos empacotamentos.

Figura 31 - Comparação dos padrões de DRXP simulados para clusters de 15 moléculas dos sais halogenados de lamivudina 3TC-X.

3.2 Caracterização das modificações cristalinas por DRXP.

Os difratogramas de pó experimentais para os sais $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$ e $3\text{TCH}^+\text{-FHF}$ são apresentados na Figura 32. Estes padrões foram comparados com os padrões teóricos simulados, mediante os resultados obtidos a partir dos dados DRX em monocristal a temperatura ambiente. Como os novos sais foram sintetizados a partir da forma II de 3TC, os difratogramas foram utilizados para detectar a presença do material de partida na amostra final. Igualmente, se houvesse a presença de outros tipos de formas polimórficas dentro do meio de cristalização, seja tanto da nova modificação cristalina quanto do material de partida, por exemplo, da presença das formas I e III de 3TC, elas poderiam ser detectadas pelos respectivos picos associados a estas formas nos difratogramas. Assim, a técnica de DRX de pó foi utilizada para garantir a pureza dos novos sólidos obtidos.

Figura 32 - Comparação dos padrões teóricos (linha azul) e dos padrões experimentais (linha vermelha) de DRXP dos sais: (a) $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$ e (b) $3\text{TCH}^+\text{-FHF}$.

Na Figura 32 pode-se observar uma excelente concordância entre os padrões experimentais e simulados. Só as magnitudes das intensidades observadas e calculadas apresentaram algumas diferenças para certos valores de 2θ . Isto se deve a efeitos de orientação preferencial dos cristalitos, os quais apresentaram tanto na amostra de $3TCH^+-Br^-$ como de $3TCH^+-F^-HF$ morfologias de bastões ou prismas alongados.⁵⁵ É importante destacar a ausência nos padrões experimentais de halos amorfs referentes a regiões de espalhamento difuso dos raios X, usualmente associados à presença de material amorfo. Considerando as concordâncias entre os padrões de DRXP, é possível inferir uma pureza cristalina de no mínimo 95% para cada uma das amostras. Esta estimativa no valor da porcentagem de pureza reside na consideração, de que reflexões de Bragg de fases cristalinas diversas ou intensidades difusas de espalhamento, originadas de sólidos amorfos são observadas somente quando as porcentagens de massa de uma mistura de sólidos forem maiores ou iguais a 5%.^{88, 89} Portanto, pela caracterização realizada a partir da técnica de DRXP foi possível determinar um alto rendimento do procedimento de síntese dos sais de halógeno.

3.3 Análise espectroscópica vibracional.

Espetros de absorção na região do infravermelho IV foram medidos para os sais de $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-F^-HF$ mostrando perfis vibracionais com alto grau de similaridade. As bandas mais características dos espetros se encontram na região I (Figura 33), $\nu_{C=O} = 1666\text{ cm}^{-1}$, e correspondem às bandas de estiramento dos grupos carbonílicos dos anéis citosínicos. Nesta região observam-se também as vibrações de estiramento $\nu_{C=C}$ e $\nu_{C=N}$ em 1685 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} , respectivamente. As posições destas bandas estão deslocadas como consequência da protonação do anel citosínico, dado que este processo é acompanhado por mudanças nos comprimentos das ligações do anel. Este é um comportamento vibracional bastante comum em derivados citidínicos protonados.⁹⁰ É importante destacar que a banda de absorção atribuída ao modo vibracional $\nu_{C=O}$ se encontra deslocada a um número de onda menor do esperado (ao redor de $1700\text{ a }1730\text{ cm}^{-1}$) devido à participação dos grupos carbonílicos em interações intermoleculares, como foi mostrado na análise supramolecular (seção 3.1.3).⁹¹

Figura 33 - Espectros de absorção na região do IV do $3TCH^+-Br^-$ (vermelho) e $3TCH^+-FHF^-$ (azul).

A região II de mais alta energia apresenta bandas correspondentes às vibrações de estiramento dos grupos hidroxila ν_{OH} em torno de 3420 cm^{-1} . Nessa região se observam, também, os estiramentos simétrico e assimétrico dos grupos amina, ν_{aNH} e ν_{sNH} entre os 3350 e 3280 cm^{-1} , respectivamente.⁹² Porém no caso do sal $3TCH^+-FHF^-$ esta região apresentou um comportamento de absorção intensa e difusa, dificultando a determinação específica de algumas vibrações típicas desta região. Isto pode ser atribuído à vibração de estiramento do próton no íon $F^-\cdots HF$, cuja alta intensidade estaria se sobrepondo com os demais modos de vibração nesta região.^{93, 94} No sal de $3TCH^+-FHF^-$ observa-se, também, uma banda larga de baixa absorção em 1800 cm^{-1} (Figura 21, círculo ressaltado) provavelmente correspondente à vibração de estiramento assimétrico entre os átomos de flúor que formam o íon $F^-\cdots HF$, conforme relatado na literatura.^{93, 94}

3.4 Análise térmica.

Foi realizada, também, uma análise do comportamento térmico das novas modificações sólidas com o intuito de avaliar a sua estabilidade e, conseqüentemente, as energias de rede cristalina que estes sais possuem. As curvas de DSC revelaram em ambos os sais eventos entálpicos de alta intensidade associados aos seus pontos de fusão. Assim para o sal de $3TCH^+-Br^-$ observa-se um pico máximo endotérmico em torno de $205,7^\circ C$ (Figura 34(a)), por sua vez para o sal de $3TCH^+-FHF$ este evento acontece em $135,46^\circ C$ (Figura 34(b)). Estes eventos foram seguidos das decomposições das amostras apresentando em cada caso, regiões de comportamentos anômalos, uma vez que foram atingidos os pontos de fusão. As temperaturas dos pontos de fusão, sumarizadas na Tabela 6, estão diretamente relacionadas com as energias das redes cristalinas. Desta forma é possível considerar que o arranjo cristalino do sal $3TCH^+-FHF$ é o menos coeso pelo baixo ponto de fusão quando comparado ao seu homólogo $3TCH^+-Br^-$ e inclusive ao seu homólogo $3TCH^+-Cl^-$.^{37, 55} Este fato é corroborado pelos valores da densidade do cristal a temperatura ambiente (Tabela 1) onde a densidade do sal $3TCH^+-FHF$ é consideravelmente menor que a do sal $3TCH^+-Br^-$. Isto está relacionado com o fato de que as interações intermoleculares apresentaram menos intensidade e direcionalidade no caso do sal $3TCH^+-FHF$ com relação aos sais $3TCH^+-Br^-$ e $3TCH^+-Cl^-$ (secção 3.1.3). Assim, apesar da isoestruturalidade as energias das redes cristalinas são notoriamente divergentes.

Tabela 6 - Temperaturas dos pontos de fusão determinados nas curvas de DSC para os sais de $3TCH^+-X^-$.

Forma Cristalina	Ponto de fusão ($^\circ C$)
$3TCH^+-Br^-$	205,7
$3TCH^+-FHF$	135,5
$3TCH^+-Cl^-$	192,3 ⁵⁵

O alto valor da temperatura de fusão do sal de $3TCH^+-Br^-$ revela a estabilidade deste composto. Isto concorda com o fato de que o seu arranjo cristalino apresenta interações de curto alcance mais intensas e direcionadas que as encontradas no sal $3TCH^+-FHF$. Porém, chama a atenção que o ponto de fusão para o sal $3TCH^+-Br^-$ seja maior que o do sal $3TCH^+-Cl^-$. Considerando uma variação nos tamanhos dos raios iônicos, o íon Br^- apresenta um raio maior, quando comparado ao Cl^- , de forma que os comprimentos das ligações

intermoleculares se espera que sejam maiores, e consequentemente as energias de coesão terminem sendo menores. Porém, este não é o caso que foi observado na análise térmica. Uma possível explicação retoma a discussão supramolecular, porque embora as distâncias das interações sejam maiores para o sal $3TCH^+-Br^-$ (Tabela 4) o íon neste caso apresenta uma densidade eletrônica maior e, portanto, esta alta densidade poderia intensificar as transições eletrônicas tanto nas espécies $3TC^+$ e Br^- mais próximas, como entre as espécies $3TC^+$ (Figura 21), reforçando este empacotamento em comparação ao do sal $3TCH^+-Cl^-$.^{37, 55}

Figura 34 - Curvas de DSC e TG para o sal de: (a) $3TCH^+-Br^-$ e (b) $3TCH^+-FHF^-$.

A curva de TG do $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$ (Figura 34(a)) mostrou uma perda de massa significativa que se inicia em torno de $225,30^\circ\text{C}$ e com um decréscimo ao redor de 15,38%. Este valor pode ser atribuído à liberação de aproximadamente um 50% da quantidade de HBr total presente na estrutura, dado que o valor teórico esperado para a liberação de uma molécula de HBr da estrutura seria de 26,06%. Assim, a porcentagem determinada no decréscimo da massa é aproximadamente a metade do valor teórico. Este fato pode estar relacionado com a formação de uma estrutura gerada pela liberação da metade da quantidade total de moléculas de HBr presentes. Também é factível que a utilização de uma mistura de gases de arraste N_2 -ar haja afetado o processo de liberação total das moléculas de HBr. Deve-se ressaltar que o procedimento de aquecimento da amostra $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$ é bastante complexo, uma vez que está envolvida a liberação de HBr gasoso, o qual é bastante tóxico e corrosivo. Portanto, não foram realizadas medidas detalhadas posteriores para corroborar este procedimento de degradação, dado que os equipamentos de DSC e TGA podem ser consideravelmente afetados por estas medidas, apesar de ter utilizado um alto fluxo de gás de arraste. Já a curva de TG do sal de $3\text{TCH}^+\text{-FHF}$ revela que bem após a temperatura de fusão, $\sim 195^\circ\text{C}$, começa uma perda de massa praticamente constante ao longo de toda a faixa de temperatura chegando até um decréscimo de 41,5% a 300°C . Assim, a decomposição deste sal é um evento endotérmico bastante prolongado e cineticamente mais lento em comparação ao sal de $3\text{TCH}^+\text{-Br}^-$, onde é observada a decomposição logo depois da fusão da amostra.

Por último, cristais de ambas as amostras foram avaliados por Microscopia Óptica Polarizada Térmica (Figura 35). Esta técnica permite o seguimento em tempo real dos processos de transformação que acontecem na amostra quando a temperatura é variada usando um sistema de "*Hot-stage*" acoplado a um microscópio óptico polarizado contendo uma câmara de vídeo acoplada. Uma primeira análise mostrou que ambas as amostras apresentam morfologias cristalinas de bastões ou prismas finos alongados. O aquecimento das amostras mostraram claramente os processos de decomposição, sendo que os eventos observados concordaram com os resultados determinados nas curvas de DSC e TG (Figura 34) respectivamente. Assim, para o sal 3TCH-Br observou-se a fusão acompanhada quase simultaneamente da decomposição da mesma em torno de 210°C , fato este associado ao enegrecimento do resíduo sólido uma vez que sofresse a transição de fase. Este processo esteve por sua vez acompanhado de uma intensa liberação de gás, manifestado pela constante formação de bolhas, as quais podem ser associadas à emissão de HBr gasoso. Este fenômeno continuou até os 300°C sendo esta a temperatura máxima da análise, resultando

nesse ponto em um completo enegrecimento do resíduo sólido, o qual provavelmente esteja relacionado à carbonização da amostra (parte inferior da Figura 35).

Por outro lado o *Hot-Stage* para uma amostra cristalina do sal $3TCH-FHF$ (Figura 35, parte superior), foi concomitante com os eventos observados na curva de DSC (Figura 34(b)), uma vez que foi possível a visualização do ponto de fusão em torno dos $135^{\circ}C$, tal como foi determinado na correspondente curva. Entretanto a experiência também permitiu observar após de ter atingido a fusão do cristal, um resíduo fundido com a aparência de um líquido estável e homogêneo, o qual não sofreu algum tipo de alteração até aproximadamente $200^{\circ}C$. Somente depois dessa temperatura foi observado um processo de evaporação lenta e constante até uma temperatura aproximada de $300^{\circ}C$. Estes fenômenos estiveram coerentes com os resultados vistos na curva de TG (Figura 34(b)).

Figura 35 - Microscopia óptica e análises por *Hot-Stage* dos cristais dos sais de: $3TCH^+-FHF$ (acima) e $3TCH^+-Br^-$ (abaixo).

4 CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO DO NITRATO DE LAMIVUDINA ($3TCH^+-NO_3^-$).

Sais farmacêuticos do ácido nítrico têm sido bastante utilizados, uma vez que estes apresentam normalmente alta solubilidade aquosa, quando comparado com algumas formas neutras do fármaco (API) ou inclusive com alguns outros sais com íons de tipo orgânico ou inorgânico.⁹⁵ O nitrato é um íon poliatômico de carga pequena, -1, geometria trigonal planar e raio iônico de 165 pm. Estas características entre outras, conferem-lhe uma baixa entalpia de hidratação ($\Delta H^\circ = -295 \text{ kJ/mol}$) e entropia consideravelmente alta em água ($S^\circ = 146,7 \text{ kJ/mol.K}$).⁹⁶ Desta forma, a escolha deste íon para a preparação de sais é considerada uma estratégia coerente, a fim de melhorar a estabilidade cristalina de um composto sem afetar sua solubilidade. Isto aplicado em engenharia de cristais farmacêuticos é uma razoável prática a se realizar, uma vez que o intuito seja o aprimoramento das propriedades farmacocinéticas, que ditam modificações cristalinas possam apresentar. Assim foi desenhada a síntese de um novo sal do fármaco lamivudina 3TC, tratando-se do nitrato de lamivudina $3TCH^+-NO_3^-$. A partir dos cristais obtidos desta nova forma sólida realizou-se uma análise de DRXM. Estes estudos foram complementados com dados provenientes da análise vibracional e térmica.

4.1 Análise conformacional e estrutural por DRXM.

O protocolo desenvolvido para a síntese do sal $3TCH^+-NO_3^-$ permitiu a obtenção de monocristais de boa qualidade, a partir de evaporação lenta do solvente, com morfologia de bastões ou prismas com os quais foi possível realizar os estudos de DRXM. Este sal cristalizou no grupo espacial monoclinico não centrossimétrico $P2_1$. A unidade assimétrica está constituída por um par iônico (Tabela 7). Desta forma o sal $3TCH^+-NO_3^-$ mostrou a mesma simetria cristalina apresentada pelas novas modificações dos sais $3TCH^+-Br^-$, e $3TCH^+-FHF$ e pelos sais já reportados $3TCH^+-Cl^-$ e $3TC^+-Cl^- \cdot H_2O$.^{37, 55} Porém, as dimensões da cela unitária e os padrões das interações intermoleculares são consideravelmente diferentes. Isto mostra que o sal de nitrato não é isoestrutural com os sais halogenados. Cabe

destacar que a simetria da densidade de carga do íon nitrato é diferente da apresentada pelos outros íons estudados, sendo esta trigonal planar com os átomos de oxigênio orientados em cada um dos vértices do triângulo e o átomo de nitrogênio no centro. Esta geometria se diferencia bastante da densidade esférica dos íons halogênios X^- , e daí as mudanças nos padrões das interações intermoleculares. As análises de DRXM a baixa temperatura (100,0 K) não mostraram nenhuma mudança drástica pela contração nos parâmetros da cela em função da temperatura. Isto revelou que não há uma transição de fase neste intervalo de temperaturas.

Tabela 7- Dados cristalográficos do sal de $3TCH^+-NO_3^-$.

Fórmula molecular		(C₈H₁₂N₃O₃S)NO₃	
Massa formula mínima (g/mol)		292,28	
Dimensões do cristal (mm³)		0,50 x 0,07 x 0,01	
Sistema cristalino		Monoclínico	
Grupo espacial		P2 ₁	
Unidade assimétrica Z/Z'		2/1	
Comprimento de onda, Å		Mo K _α = 0,71073	
Temperatura [K]		100,0(2)	293(2)
Dimensões da Cella unitária	a (Å)=	5,1572(1)	5,2242(1)
	b (Å)=	17,8898(3)	18,0056(5)
	c (Å)=	6,5144(1)	6,5760(2)
	β (°)=	104,681(1)	105,192(2)
Volume da cela[Å³]		581,404(17)	596,95(3)
Densidade calculada (mg/cm³)		1,670	1,626
Coefficiente de absorção (mm⁻¹)		0,311	0,303
Intervalo de θ (°)		3,23 – 26,36	3,21 – 27,47
Intervalo dos índices	h	-6 a 6	-6 a 6
	k	-22 a 22	-23 a 21
	l	-8 a 8	-8 a 8
Reflexões coletadas		8408	9055
Reflexões independentes		2337	2571
Índice de simetria (R_{int})		0,0826	0,0873
Completeza para θ_{máx} (%)		99,8	99,8
F₀₀₀		304	304
Parâmetro refinados		173	174
Qualidade de ajuste sobre F²		1,072	1,015
Índices residuais para I>2σ(I)		R ₁ = 0,0314	R ₁ = 0,0415
		wR ₂ = 0,0761	wR ₂ = 0,0959
Índices residuais para todos os Dados		R ₁ = 0,0347	R ₁ = 0,0577
		wR ₂ = 0,0784	wR ₂ = 0,1041

(continua)

(continuação)

$\Delta\rho_{\text{máx}} / \Delta\rho_{\text{mín}} (e/\text{\AA}^3)$		0,267/-0,269	0,262/-0,20
Estrutura	Parâmetro de Flack	-0,08(5)	-0,015(8)
absoluta	Pares de Friedel	1222	1397
Coeficiente de Extinção		-----	0,03(1)

Da tabela 7 é observado que realmente não há uma diferença notória nos parâmetros da cela unitária, entre 293 K e 100K, sendo que o maior desvio está em torno de 0,15 Å. Por sua vez também se observa que a qualidade do refinamento foi adequada, devido aos baixos valores atingidos nos fatores de discordância, como também à boa resolução lograda, uma vez que se conseguiu observar até um valor de $\theta_{\text{máx}}$ superior a 25°, o que permitiu igualmente refinar com exatidão distâncias entre as densidades eletrônicas em torno de 1,0 Å.

4.1.1 Análise comparativa das celas unitárias.

É notória a discrepância entre os parâmetros de cela unitária entre os sais inorgânicos discutidos anteriormente e o nitrato. Assim, utilizando a mesma relação matemática descrita anteriormente para o índice de similaridade, obtiveram-se discrepâncias em torno de 90% para os valores destes índices, quando comparados aos índices dos sais 3TCH-X (capítulo 3, Tabela 2). Os valores desta análise comparativa estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise comparativa dos parâmetros de cela entre o sal de 3TCH-NO₃⁻ e os sais 3TCH-X.

Parâmetros de cela	3TCH-NO ₃	3TCH-Br	3TCH-FHF	3TCH-Cl*	Pares de sais	Índice π
a (Å)	5,2242	5,6885	5,4349	5,706	NO ₃ -Br	0,129259
b (Å)	18,0057	12,2872	12,0714	11,967	NO ₃ -Cl	0,145803
c (Å)	6,576	8,4185	8,6515	8,3401	NO ₃ -FHF	0,139465

4.1.2 Análise conformacional.

O sal de 3TCH-NO₃ (Figura 36) foi obtido pela reação ácido-base entre o fármaco 3TC, o qual é uma base livre, e o ácido mineral ou inorgânico forte HNO₃. A protonação, como esperada, ocorreu no nitrogênio imidico do anel citosínico N3. Como resultado da formação do par iônico, este apresentou um sinton molecular do tipo heterodímero definido pela teoria de grafos⁹⁷ como, $R(8)_2^2$, conformado por duas ligações de hidrogênio fortes e criando um anel de seis membros, desconsiderando os hidrogênios, entre o íon nitrato NO₃ e a região que contem os nitrogênios do anel da citosina.

Figura 36 - Diagrama ORTEP⁶⁹ da unidade assimétrica do sal 3TCH-NO₃ a temperatura ambiente. Os elipsóides de vibração térmica são plotados com 50% de probabilidade a temperatura ambiente, os átomos de hidrogênios são representados como esferas de raio arbitrário.

Como foi discutido, na análise estrutural dos sais de haleto, a unidade catiônica de 3TCH⁺ apresenta liberdade conformacional, a temperatura ambiente, em torno das ligações químicas que unem os principais grupos funcionais deste nucleosídeo modificado. Desta forma, a ligação N1—C1', passível de rotação e responsável pela união entre os fragmentos do anel da citosina e o anel da ribose modificada oxatolano, apresenta também uma conformação *anti*. Isto se deve à orientação contrária entre as ligações C2=O2 do grupo

carbonila, do anel citosínico, e a ligação C1'—O1' que liga o oxigênio intracíclico do anel oxatiolano (Figura 37(a)), respectivamente. Esta conformação, como acontece na maioria dos sais de lamivudina reportados até o momento, permite distanciar estes grupos funcionais que contém altas densidades eletrônicas, evitando assim efeitos de impedimento estérico e atingindo uma conformação de mínima energia.

Uma característica estrutural similar observada na estrutura do 3TCH-NO₃ com relação aos sais anidros de 3TCH-X é a conformação do anel oxatiolano que apresentou uma conformação envelope do tipo C3'-*endo*⁷⁹ (Figura 37(b)). Assim o átomo S3' apresentou na modificação de 3TCH-NO₃ um deslocamento referente ao plano do anel oxatiolano de 0,73344(1) Å (com um desvio quadrático médio de 0,0519Å para o plano que passa através dos átomos C2'-C1'-O1'-C4').

Por outro lado, a ligação C4'—C5' que une o braço 5'-hidroximetilênico ao anel oxatiolano, -C5'H₂-O5'H, sofre uma rotação de ordem terciária C3, ou seja de 120° ao longo do eixo da ligação e cujas hibridações são do tipo *sp*³—*sp*³ tendo assim alto grau de liberdade rotacional em torno do carbono C5', isto quando comparado com os sais de haleto 3TC-X. Assim a liberdade rotacional, permitiu nesta ocasião localizar o grupo hidroxila, -O5'—H, em uma orientação axial com relação ao plano do anel oxatiolano, e *syn* com relação à orientação do anel citosínico. Consequentemente, as posições dos hidrogênios metilênicos permanecem nas orientações equatoriais do plano oxatiolano. Esta é uma das principais diferenças conformacionais entre o sal 3TCH-NO₃ e os sais anidros dos haletos de lamivudina 3TCH-X, pois no caso dos sais de haleto a orientação do grupo hidroxila encontrase na posição equatorial, *syn* orientado com o átomo de enxofre intracíclico S3' do anel oxatiolano (Figura 37(c)).

Figura 37 - Principais características conformacionais da estrutura 3TCH-NO₃. (a) Ressaltada a conformação anti entre as ligações C2=O2 e C1'-O1' (oxigênio intracíclico). (b) Ponto de inflexão do átomo S3' com relação a um plano que passa pelo anel oxatiolano, adotando uma conformação envelope do tipo C3'-endo. (c) Posicionamento axial do braço 5'-CH₂OH referente ao plano do anel oxatiolano, indica-se a rotação da hidroxila em torno de um eixo que passa pela ligação C4'-C5', esta conformação axial é *cys* orientada com relação ao plano do anel citosínico.

A geometria trigonal planar dos ânions NO₃⁻ gera um efeito estereoquímico nas unidades carregadas da lamivudina 3TCH⁺, de tal maneira que a interação entre estas unidades dirigem os grupos OH à posição axial referente ao plano oxatiolano e *syn* com a orientação dos planos citosínicos, permitindo assim arranjos helicoidais característicos dos empacotamentos cristalinos deste tipo de moléculas. A orientação axial do braço 5'-hidroximetilênico é um fenômeno observado em outras formas cristalinas da 3TC, como são os casos dos sais: cloridrato monohidratado,³⁷ salicilato monohidratado,³⁸ maleato,³⁵ sacarinato,³⁴ alguns conformêros da dupla hélice,³³ igualmente nos cocristais 3,5dinitrosalicilato de 3TC³⁴ e o cocrystal 3TC-AZT (zidovudina) hidratado.³⁴ Esta conformação também é observada na forma I³⁰ e em alguns conformêros de um solvato hemidrato.³¹ Assim, a adoção da conformação axial do grupo, -C5'H₂-O5'H, é recorrente entre algumas formas cristalinas análogas deste nucleosídeo modificado. As conformações estruturais das unidades catiônicas dos sais de ácidos inorgânicos têm características estruturais similares devido ao processo de protonação no anel citosínico. Desta forma cada uma das características estruturais observadas nestas moléculas é resultado dos balanços energéticos, que ditam modificações precisam desenvolver no momento que incorporassem nos arranjos cristalinos. Isto é

fundamental na discussão do comportamento supramolecular exibido pelo sal 3TCH-NO₃, onde a disposição estrutural da unidade catiônica 3TCH⁺ é tal que permite arquitetar um arranjo cristalino de natureza helicoidal, como será discutido na análise supramolecular (secção 4.1.3).

Tabela 9 - Ângulos de torção envolvidos nas principais características conformacionais da estrutura do sal 3TCH-NO₃.

Fragmento molecular	Ângulo de torção	Sal de nitrato: 3TCH ⁺ -NO ₃ ⁻
Ligação C1'-N1', entre o anel citosínico e o anel oxatiolano. Orientação Anti dos anéis.	C2—N1—C1'—O1'	165,5(3)°
	C6—N1—C1'—O1'	-7,5(4)°
	C2—N1—C1'—C2'	-72,9(4)°
	C6—N1—C1'—C2'	114,2(4)°
Anel da ribose modificada Oxatiolano. Conformação envelope do tipo C3'-endo	O1'—C1'—C2'—S3'	35,1(4)°
	C1'—C2'—S3'—C4'	-36,97(3)°
	C2'—S3'—C4'—O1'	30,7(3)°
	S3'—C4'—O1'—C1'	-15,52(4)°
	C4'—O1'—C1'—C2'	-12,7(4)°
Braço 5'-CH ₂ OH Orientação axial	O1'—C4'—C5'—O5'	72,5(4)°
	S3'—C4'—C5'—O5'	-47,2(4)°

Uma análise estatística da conformação estrutural (Figura 38), realizada usando o programa MOGUL,⁶⁷ demonstrou alguns desvios significativos dos valores de referência, para os parâmetros associados com as ligações passíveis de liberdade rotacional, as quais ligam os três fragmentos fundamentais que conformam estas unidades (os anéis da citosina e oxatiolano e o braço 5'-hidroximetilênico).

a)

Estatísticas	
Total:	665
Selecionadas:	665
Media:	1.477Å
Desvio padrão:	0.028Å
Mínimo:	1.392Å
Quartil inferior:	1.462Å
Mediano:	1.473Å
Quartil superior:	1.487Å
Máximo:	1.676Å
Z-score :	0.869
Valor da	
Consulta:	1.501Å

N1—C1'

b)

Estatísticas	
Total:	343
Selecionadas:	343
Media:	117.770°
Desvio padrão:	2.079°
Mínimo:	101.195°
Quartil inferior:	116.630°
Mediano:	117.890°
Quartil superior:	119.027°
Máximo:	129.967°
Z-score :	0.765
Valor da	
Consulta:	116.179°

C2—N1—C1'

c)

Estatísticas	
Total:	506
Selecionadas:	506
d(min) :	0.131°
Valor da	
consulta:	165.506°

C2—N1—C1'—O1'

d)

Estatísticas	
Total:	84
Selecionadas:	84
d(min) :	3.234°
Valor da	
consulta:	47.268°

S3'—C4'—C5'—O5'

Figura 38 - Histogramas das análises estatísticas da: (a) ligação N1—C1', do (b) ângulo de ligação C2—N1—C1' e (c) ângulo de torção C2—N1—C1'—O1' entre os anéis da citosina e oxatolano, e do (c) ângulo de torção S3'—C4'—C5'—O5' do braço 5'-hidroxi-metilênico.

A ligação N1—C1', responsável pela união entre os fragmentos do anel da citosina e do anel oxatolano, apresentou um desvio de 0,028 Å com relação ao valor de referência para este tipo de ligações (Figura 38(a)). Este desvio pode ser justificado pela conformação *anti* adotada entre estes fragmentos, uma vez que as orientações entre a ligação da carbonila C2=O2 e a ligação C1'—O1' são contrárias, o que permite maximizar a separação destes grupos de alta concentração eletrônica. Contudo, apesar dos desvios, as demais distâncias e ângulos de ligação do sal, estiveram dentro do intervalo esperado em torno dos máximos de distribuição (exemplos representativos Figura 38 (b) e (c)). Esta modificação cristalina é a mais recorrente entre espécies químicas análogas a este tipo de nucleosídeos modificados.

O ângulo de torção S3'—C4'—C5'—O1' (Figura 38 (d)), resultado da orientação axial do braço 5'-hidrometilênico, encontra-se próximo ao valor de maior número de estruturas. No entanto, não é a orientação axial preferencialmente escolhida para este grupo funcional (CH₂OH), uma vez que dita orientação é comparada, por exemplo, com a orientação equatorial do mesmo fragmento molecular observada nos sais anidros de haleto de lamivudina 3TCH-X.

Uma superposição de todas as estruturas correspondentes às unidades catiônicas (Figura 39) dos sais permite conferir muitas das características isoestruturais. Em todos os casos a orientação da maioria dos grupos químicos funcionais é constante. Sendo, por exemplo, a orientação *trans* entre a ligação da carbonila do anel citosínico C2=O2 e a ligação intracíclica C1'—O1' do anel oxatolano, que por sua vez apresenta uma conformação em envelope com o átomo S3' em configuração C3'-*endo*, as características conformacionais recorrentes desta classe de sais. Porém, a orientação do grupo 5'-hidroximetilênico apresenta uma variação considerável dado que a ligação C4'—C5' permite rotacionar o grupo O5'—H5' num eixo de ordem C3 (Figura 39). Assim, os sais halogenados anidros orientaram os grupos 5'-OH em uma posição equatorial em relação ao plano do anel oxatilano, estando *syn* orientados com o átomo S3'. Nestes casos estes grupos participam de ligações O5'-H...O2. Entretanto, no sais 3TCH-NO₃ e 3TCH-Cl.H₂O³⁷ as posições dos grupos hidroxilas foram axiais. Nestes casos as mudanças conformacionais dos grupos 5'-OH levaram a mudanças nos padrões das interações intermoleculares.

Figura 39 - Superposição das unidades catiônicas 3TCH⁺ para os sais de ácidos do fármaco 3TC.

4.1.3 Análise supramolecular.

O sistema 3TCH-NO₃ apresenta um comportamento supramolecular determinado pela simetria helicoidal de ordem 2₁. O empacotamento cristalino envolve principalmente ligações de hidrogênio clássicas do tipo N—H...O e O—H...O, as quais ligam as unidades aniônicas NO₃⁻ e catiônicas 3TC⁺. Estas interações formam *síntons* moleculares definidos pela teoria de grafos através dos anéis $R_2^2(8)$ com dois centros doadores (o grupo amino, N4-H4x e o nitrogênio imidico protonado do anel citosínico, N3⁺-H3) e dois centros aceptores (oxigênios O3 e O4 do íon trigonal planar NO₃⁻) de ligações de hidrogênio. Por sua vez, estas ligações permitem a união dos pares iônicos direcionando o arranjo supramolecular ao longo das simetrias helicoidais. Já a estrutura tridimensional é estabilizada por ligações não clássicas de curto alcance do tipo C—H...O, C—H...S assim como contatos intermoleculares do tipo C...O e $\pi\cdots(N, O)$.

Inicialmente em uma projeção unidimensional, observa-se a formação de cadeias produto da operação de translação dos pares iônicos na direção horizontal ao plano [101]. As interações que ligam estas cadeias são N3—H3...O4 e N4-H4x...O3. Estas formam pares

iônicos mediante os anéis $R_2^2(8)$. A disposição dos íons que conformam o par iônico não é completamente planar, uma vez que o plano que passa entre os átomos do íon NO_3^- apresenta um desvio de $24,0(2)^\circ$ com relação ao plano do fragmento citosínico carregado CytH^+ (os valores do desvio quadrático médio dos átomos ajustados são de $0,0004 \text{ \AA}$ para o íon NO_3^- e de $0,0056 \text{ \AA}$ para os fragmentos CytH^+ , respectivamente). Entretanto, os pares iônicos são ligados aos pares adjacentes mediante as interações clássicas $\text{N4—H4y} \cdots \text{O5}^{ii}$ e não clássicas, $\text{C5—H5} \cdots \text{O4}$ (Figura 40). Isto ocorre entre as unidades carregadas dos anéis citosínicos e os ânions NO_3^- . Neste último caso também se conserva uma geometria análoga ao *sínton* molecular definido pelo anel $R_2^2(8)$.

Figura 40 - Padrão de interações clássicas, do tipo ligação de hidrogênio, e formação de síntons moleculares, observados no sal $3\text{TC}_3\text{H-NO}_3$.

Na direção perpendicular ao plano $[10-1]$ tem-se a formação de cadeias helicoidais ao longo do eixo cristalino b . Estas se caracterizam pela inclusão de um eixo de simetria 2_1 . Desta forma os pares iônicos vão se ancorando como fitas helicoidais (Figura 41, parte esquerda). Desta vez as fitas são direcionadas a partir das ligações de hidrogênio bifurcadas $\text{O5}'\text{—HO5}' \cdots \text{O3}$ e $\text{O5}'\text{—HO5}' \cdots \text{O5}$, as quais ocorrem entre os grupos hidroxilas das unidades 3TCH^+ e os íons NO_3^- adjacentes. Desta maneira a combinação das cadeias tanto horizontais como verticais, resulta, dentro de uma projeção bidimensional, na formação do plano molecular $[10-1]$ (Figura 41, parte direita). Entretanto, uma projeção no plano $[1\ 0\ 1]$ permite visualizar um perfil lateral do plano molecular, o qual apresenta uma forma zig-zague ao longo do eixo b (veja Figura 42(a)). Em resumo, o empacotamento cristalino pode

ser entendido como a formação de um plano molecular que contém as unidades dos pares iônicos, arranjados inicialmente em filas horizontais as quais posteriormente, por aplicação da operação de simetria 2_1 , são repetidas na vertical do plano, que coincide com a direção do eixo cristalográfico b , conformando assim as fitas. Esta simetria forma um plano que cresce em forma de zigue-zague, quando visto na direção $[101]$.

Figura 41 - Formação dos planos moleculares $[10-1]$, a partir das cadeias unidimensionais dos pares iônicos tanto horizontais como verticais (fitas helicoidais).

A tridimensionalidade do empacotamento cristalino é lograda através da superposição dos planos moleculares zigue-zagues, os quais se sobrepõem como resultado de interações intermoleculares não clássicas do tipo $C4'-H4'\cdots S3'$ que ocorrem entre os anéis oxatíolanos das unidades $3TCH^+$ adjacentes na direção $[10-1]$ e contatos do tipo $C2\cdots O1'$ e $C2\cdots O4$ (Figura 42(b)). Estes contatos apresentam distâncias menores que a somatória dos raios de van der Waals (vdW). O primeiro contato se deve à sobreposição na fase frontal de um anel citosínico com o oxigênio intracíclico $O1'$ do anel oxatíolano de uma unidade $3TCH^+$ adjacente. Simultaneamente o mesmo fragmento citosínico está interagindo na fase posterior (neste caso apontando na parte traseira ao átomo $O1'$) com um átomo $O4$ que pertence a um dos vértices dos íons trigonais NO_3^- na direção $[10-1]$ (Figura 42(c)). Estes planos se caracterizam por apresentarem uma separação de aproximadamente $2,95(5)$ Å e um deslocamento entre as unidades $CytH^+$ que permanecem em ditos planos de $54,38(3)^\circ$.

Figura 42 - a) Projeções bidimensionais dos planos moleculares zigue-zagues [10-1], **b)** Interações e contatos intermoleculares responsáveis pela união dos planos [10-1], **c)** Projeções tridimensionais do empacotamento cristalino do sal 3TCH-NO₃, acoplamento dos planos moleculares [10-1].

A separação entre as unidades 3TCH⁺ permite dar uma ideia das energias de rede cristalina considerando que o arranjo dos pares iônicos apresenta interações predominantemente eletrostáticas, principalmente do tipo iônicas e entre orbitais π associadas

pela aromaticidade dos fragmentos CytH^+ . Este empacotamento maximiza assim as interações atrativas e minimiza as repulsivas.^{54,98} Os parâmetros e os códigos de simetria das principais interações intermoleculares estão sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10 - Lista das interações intermoleculares do sal 3TCH- NO_3 .

D–H...A	D–H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D–H...A (°)
N4–H4 _x ...O3 ⁱ	0,860	2,124(1)	2,973(1)	169,48(10)
N3–H3...O4 ⁱ	0,860	1,949(0)	2,781(1)	162,39(10)
N4–H4 _y ...O5 ⁱⁱ	0,860	2,220(3)	3,047(1)	161,22(15)
O5'–HO5'...O3 ⁱⁱⁱ	0,820(1)	2,073(1)	2,847(1)	157,09(10)
O5'–HO5'...O5 ⁱⁱⁱ	0,820(1)	2,636(0)	3,311(1)	140,66(25)
C5–H5...O4 ⁱⁱ	0,930(1)	2,386(1)	3,256(1)	155,71(20)
C4'–H4'...S3' ^{iv}	0,980(2)	2,935(1)	3,648(1)	133,39(22)
Contatos	Distância (Å)	Ângulo (°)		
O1'...C2 ^{iv}	3,048(5)	19,20(14)		
O4...C2 ^v	2,994(5)	22,02(15)		

Termos: D (Doador) e A (Aceptor). Códigos de simetria das posições equivalentes: i x,y,z; ii x-1,y,z-1; iii – x+1,y-1/2,-z+1; iv x+1,y,z; v x-1,y,z.

4.1.4 Análise das Superfícies de Hirshfeld.

Uma análise das superfícies de Hirshfeld (SH) e dos correspondentes *fingerprints* para o sal 3TCH- NO_3 (Figura 43) mostra que o principal contato intermolecular é o O...H, apresentando uma contribuição relativa do 44,1% do total de contatos intermoleculares sobre a superfície de contatos (Figura 43(b)), e o qual está envolvido nas interações O–H...O, N–H...O responsáveis tanto pela formação dos pares iônicos como pela união entre eles. O segundo contato de maior contribuição relativa é o H...H, com 24,1%. A contribuição deste contato permite dar uma ideia da intensidade que apresenta as interações hidrofóbicas entre as unidades de 3TCH^+ , além da proximidade entre as mesmas. Já os principais contatos com menores contribuições nos mapas bidimensionais *fingerprint's*, correspondem aos contatos S...H (7,1%), C...H (7,0%) e C...O (4,3%) (veja Figura 43(b)), os quais fazem parte das interações de curto alcance que estão essencialmente associadas ao acoplamento dos planos moleculares zigue-zagues [10-1]. Um aspecto destacável é a participação do átomo de enxofre

S3' na interação do tipo C—H...S, considerando que o S e o grupo C-H são um aceitador e um doador de ligações de hidrogênio fracas, respectivamente.⁹⁹

a)

b)

Figura 43 - (a) Superfícies de Hirshfeld, (b) Projeções bidimensionais (*fingerprints*) dos principais contatos intermoleculares com suas porcentagens de contribuição para o sal 3TCH-NO₃. Vistas frontais e posteriores das SH's normalizada d_{norm} , interna d_i e externa d_e .

Outro aspecto a se destacar é a presença dos contatos C...O. Apesar da sua pouca contribuição são fundamentais como pontos de coesão entre os planos, permitindo assim o acoplamento deles tal como é observado na Figura 42 (b,c). A contribuição e importância dos

contatos intermoleculares envolvidos em interações não clássicas ou de curto alcance podem-se visualizar melhor a partir das SH indexadas e curvadas (Figura 44), pois as deformações destas SH são mais perceptíveis no momento de definir como as unidades de $3TCH^+$ estão se ancorando no momento de arquitetar os interstícios helicoidais que estes arranjos cristalinos apresentam.

Figura 44 - Superfícies de Hirshfeld **a)** indexada e **b)** curvada para o sal $3TCH-NO_3$. I (fase frontal) e II (fase traseira). As SH são ilustradas com as moléculas mais próximas.

4.2 Análise vibracional.

O espectro na região do IV do sal $3TCH-NO_3$ está caracterizado pela presença de bandas de absorção relacionadas, principalmente, a modos vibracionais das unidades catiônicas $3TCH^+$ (Figura 45). Em 1639 cm^{-1} e 1678 cm^{-1} é possível observar as bandas de absorção correspondentes à superposição entre os estiramentos $\nu_{C=N}$ e $\nu_{C=C}$ além da vibração ν_a^6 do anel citosínico, tal como é sugerido para o sal de nitrato de citidina $CydH-NO_3$ ¹⁰⁰ um

homologo ao sal 3TCH-NO₃.⁹⁰ Por sua vez, é importante destacar que a região dos 1500-1800 cm⁻¹, no caso dos sais de íon nitrato, caracteriza-se pela presença de uma banda correspondente a um sobretom devido à vibração do íon NO₃⁻ em torno dos 1600 cm⁻¹ especificamente, o que resulta em um comportamento de absorção difuso nesta região. Este fato dificulta a diferenciação dos modos vibracionais nesta faixa do espectro. Contudo, a banda de absorção em 1723 cm⁻¹, com uma intensidade de absorção meia, foi atribuída ao modo vibracional $\nu_{C=O}$. Nesta ocasião a banda é deslocada teoricamente por uma série de aspectos. Um deles é o efeito da protonação do anel citosínico e o consequente rearranjo eletrônico no anel aromático.¹⁰¹ Isto pode ser comprovado pela variação nos comprimentos das ligações químicas envolvidas no anel, onde o comprimento da ligação C2=O2 (de 1,209 Å) tem uma diminuição considerável com relação aos comprimentos para este mesmo grupo nos sais de haleto 3TCH-X (de 1,220 Å no caso de 3TCH-Br e de 1,229 Å para 3TCH-FHF). Estas variações nos comprimentos dos grupos carbonila são concomitantes com o fato de que no sal 3TCH-NO₃ dito grupo não intervém em interações intermoleculares. Isto explica assim, o aumento no número de onda assinalado para a vibração $\nu_{C=O}$ desta modificação, uma vez que é comparada com as vibrações correspondentes dos grupos C=O dos sais de haleto 3TCH-X em torno de 1666 cm⁻¹ (capítulo 3, Figura 33).

Entretanto, foram observadas bandas de absorção em 3346 cm⁻¹ e 3419 cm⁻¹ no espectro de alta energia, as quais poderiam ser atribuídas aos estiramentos ν_{N-H} do fragmento de citosina e ao estiramento ν_{O-H} do grupo hidroxila do braço 5'-hidroximetilênico, respectivamente. Neste caso a participação da hidroxila nas ligações bifurcadas O5'-HO5'...O3 e O5'-HO5'...O5 (secção 4.1.3) com uma unidade de íon NO₃⁻, produz uma leve diminuição no valor do número de onda para a banda ν_{O-H} com relação ao valor observado nos sais 3TCH-X.

O espectro de espalhamento Raman do sal 3TCH-NO₃ mostra bandas associadas a modos vibracionais de deformações e estiramentos do esqueleto molecular (Figura 46). A banda intensa e de largura considerável em 1229 cm⁻¹ corresponde à conformação C3'-endo do anel da ribose modificado. Essa banda está definida em torno dos 1250 cm⁻¹ para derivados de sais citidínicos que apresentam dita conformação, tal é o caso do sal CydH-NO₃ cuja banda está em 1252 cm⁻¹.^{90,102} A 3TC está conformada pelo anel oxatiolano, no qual há uma substituição isostérica de um átomo de enxofre no anel da ribose por um grupo metilênico, em comparação à citidina Cyd. Isto explica, portanto, a diminuição no número de onda de esta banda de espalhamento Raman, sendo que a massa atômica maior do enxofre apresentará uma

menor frequência de vibração nos derivados de 3TC, quando comparada a um átomo de carbono nos derivados de Cyd. O estiramento ν_{C-H} em 3090cm^{-1} corresponde à ligação metilênica, do braço 5'-hidroximetilênico, entre o carbono C5' e o átomo de hidrogênio que se encontra na posição equatorial *syn* orientada em relação ao átomo de enxofre do anel oxatolano.

Figura 45 - Espectro de IV para o sal 3TCH-NO₃. Estão ressaltadas as bandas em 1723 cm^{-1} e 3419 cm^{-1} , correlacionadas aos estiramentos $\nu_{C=O}$ do anel citosínico e ν_{O-H} do braço 5'-CH₂OH.

O Espalhamento Raman mostra o deslocamento da banda referente ao estiramento ν_{CH} para valores de frequências maiores que o esperado. Este fenômeno se deve à indução eletrônica proveniente do átomo de enxofre S3', o qual apresenta uma alta densidade eletrônica que se encontra envolta ao átomo de hidrogênio metilênico.^{55, 103} Além disso, a proximidade de unidades de íons nitrato em torno do grupo 5'-hidroxila, poderiam gerar um efeito de indução eletrônica em torno da região do braço 5'-CH₂OH, reforçando mais ainda a constante de força para vibração dos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono C5'.

Figura 46 - Espectro de Raman para o sal 3TCH-NO₃. São ressaltadas as bandas em 1229 cm⁻¹ e 3090 cm⁻¹, correspondentes à conformação C3'-endo e estiramento νC—H do grupo metileno pertencente ao braço 5'-CH₂OH. São ilustrados os efeitos indutivos eletrônicos do átomo de enxofre S3' e do íon nitrato. Também a inflexão do átomo S3' do anel oxatíolano adotando a conformação C3'-endo.

4.3. Análise térmica.

A curva de DSC para o nitrato (Figura 47) apresentou um comportamento de estabilidade numa faixa de temperatura entre os 25°C e os 300°C, observando-se unicamente um evento entálpico de alta intensidade, manifestado por um pico que teve o seu valor máximo em torno de 169,01 °C com um valor de entalpia de 321,43 J/g sendo, portanto, este evento endotérmico associado ao ponto de fusão. Este é próximo das temperaturas observadas nos sais de haletos. Outro aspecto a destacar é a coesão do empacotamento cristalino observado para este sal, pois os arranjos helicoidais nos quais vão se ancorando as unidades dos pares iônicos resultam em enquadramentos menos coesos, quando comparados, por exemplo, aos sais 3TCH-Cl e 3TCH-Br. As interações intermoleculares são menores no sal 3TCH-NO₃ que em ditos sais halogenados, o que termina refletindo no menor ponto de fusão do nitrato.

Figura 47 - Curvas de DSC e TG para a o sal 3TCH-NO₃. Ilustra-se a eliminação de HNO₃ da amostra.

A curva de TG do sal 3TCH-NO₃ (Figura 47) mostrou uma perda de massa relativa de aproximadamente 31,54% que se iniciou ao redor de 170°C. Isto mostra que depois de atingir o ponto de fusão houve uma degradação da modificação cristalina, que em princípio estaria associada com a liberação de HNO₃. Esta perda de massa concorda aproximadamente com a porcentagem de massa que este fragmento teria na massa molar do sal 3TCH-NO₃. Dita perda se encontra numa faixa de temperatura entre 170,0°C e 180,98°C. Após deste intervalo de temperaturas é possível que comece a decomposição do resíduo. Esta degradação vai dos 190°C até os 350°C. Comportamentos anômalos não foram observados, tanto na curva de DSC como na curva de TG, sendo esta observação uma inferência da pureza que a modificação cristalina de 3TCH-NO₃ apresenta. Isto mostra que não há a presença de impurezas sólidas ou de formas polimórficas geradas durante os procedimentos tanto de síntese quanto de cristalização.

Com o intuito de obter um acompanhamento visual do comportamento térmico foi realizada uma análise por microscopia óptica térmica (*Hot-Stage*, Figura 48). A grande maioria dos cristais deste sal apresentou uma morfologia de prismas ou bastões de grande tamanho e boa qualidade. Um destes cristais foi escolhido para o estudo em função da temperatura. Dito cristal foi submetido a um aquecimento controlado assistido em tempo real

onde foi possível observar o ponto de fusão em torno de 170 °C, em coerência com o observado na curva de DSC. Sendo atingido o ponto de fusão, foi possível observar a degradação da amostra, tendo inicialmente a liberação de HNO_3 gasoso. Este fato foi associado à liberação de gás a partir do cristal levando à formação de bolhas dentro da faixa de temperaturas de 170°C a 180°C, corroborado assim a degradação parcial conforme visto na curva de TG. Após esta faixa de temperaturas, houve uma diminuição na formação de bolhas e consequentemente da liberação de gás, resultando em um resíduo fundido o qual continuou a degradar até a carbonização conforme o aumento gradual da temperatura desde 180°C, o que foi sugerido devido ao enegrecimento que apresentou a amostra.

Figura 48 - Microscopia óptica e análise por *Hot-Stage* de um cristal para o sal de 3TCH-NO₃.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como resultado deste trabalho de pesquisa foram desenhadas, sintetizadas e cristalizadas três novas formas sólidas do fármaco antirretroviral lamivudina. Essas modificações inéditas do insumo farmacêutico antirretroviral 3TC com os ácidos inorgânicos HBr, HF e HNO₃, foram planejadas usando como referência o *pKa* do fármaco base livre. Desse modo, foi possível obter e caracterizar o bromidrato de lamivudina (3TCH⁺-Br⁻), o difluoridrato de hidrogênio de lamivudina (3TCH⁺-FHF) e o nitrato de lamivudina (3TCH⁺-NO₃⁻).

A obtenção de cristais únicos de qualidade aceitável foi um passo primordial no estudo destas novas modificações sólidas, dado que permitiram as análises das mesmas através do uso das técnicas de difração de raios X em monocristal; técnica mais específica para o estudo de novos insumos farmacêuticos no estado sólido. Estas caracterizações estruturais permitiram a determinação das conformações moleculares e supramoleculares dos três sais, apresentando eles características similares. A única diferença se observou na conformação dos braços 5'-hidroximetilênicos, tendo estes posições equatoriais nos sais halogenados (3TCH-X) e axial no sal 3TCH⁺NO₃⁻, quando comparados com os planos definidos pelos anéis oxatíolanos. A análise dos empacotamentos cristalinos mostrou que as disposições adotadas por estes fragmentos moleculares, passíveis de liberdade rotacional, vêm determinadas pelos diferentes conjuntos de interações intermoleculares apresentados por cada sal.

Os arranjos supramoleculares dos sais 3TCH⁺Br⁻ e 3TCH⁺FHF apresentam características isoestruturais entre si e também com o cloridrato de lamivudina (3TCH⁺Cl⁻) já reportado pelo nosso grupo de pesquisa. Esses arranjos são construídos por ligações de hidrogênio fortes do tipo N—H•••(X⁻:Br⁻, FHF e Cl⁻), as quais ligam os pares iônicos ao longo de eixos helicoidais, enquanto que as ligações O—H•••O permitem a formação de planos moleculares, levando por último a um arranjo tridimensional a partir da superposição de tais planos estabilizados por interações de curto alcance (por exemplo, $\pi\cdots X^-$). A análise vibracional no IV confirmou alguns dos aspectos estruturais determinados a partir da DRXM. Técnicas de DRXP e análises térmicas foram utilizadas para determinar a pureza e a homogeneidade obtida a partir do processo de síntese destas modificações. Um aspecto

destacável dessas técnicas complementárias foi a determinação dos pontos de fusão, os quais permitiram ter uma noção das energias de rede cristalina; fator relacionado com a solubilidade aquosa do insumo. O baixo ponto de fusão apresentado pelo sal $3TCH^+FHF^-$ em relação aos seus dois sais homólogos $3TCH^+Br^-$ e $3TCH^+Cl^-$, sugere que esta nova modificação poderia apresentar uma maior solubilidade. O fato da isoestruturalidade é importante na medida em que as propriedades farmacocinéticas do sal $3TCH^+Cl^-$ já são conhecidas, sendo inclusive uma forma farmacêutica da 3TC protegida por patente no Brasil. Desta maneira espera-se que estes novos sais halogenados apresentem uma solubilidade aquosa igual ou maior à determinada para o cloridrato.

Já o sal $3TCH^+NO_3^-$ apresentou um comportamento supramolecular bastante interessante na medida em que está definido pela translação de cadeias ou fitas helicoidais dos pares iônicos, conformando planos moleculares em ziguezagues na direção [10-1] através de ligações de hidrogênio fortes $N-H\cdots O$ e $O-H\cdots O$. O empilhamento desses planos moleculares a partir de interações de curto alcance permite a estabilização do empacotamento cristalino. Assim, a rede cristalina desse sal apresentou uma estabilidade considerável, a qual foi inferida pelos resultados observados nas análises térmicas. A proximidade do ponto de fusão deste sal em relação ao do cloridrato, assim como algumas características cristalinas similares, também poderia sugerir uma solubilidade no equilíbrio similar.

Portanto, a contribuição deste trabalho foi o desenvolvimento de formas sólidas partindo das estratégias desenhadas no campo da engenharia de cristais utilizando como base um fármaco utilizado nas terapias de combate à AIDS como é a lamivudina. Espera-se que estas novas modificações apresentem melhoras nas suas propriedades farmacocinéticas quando comparadas com a forma farmacêutica atual, a fim de: aprimorar o funcionamento farmacológico do medicamento, reduzir os efeitos de interação medicamentosa com os outros integrantes do chamado coquetel da AIDS pela redução da quantidade do princípio ativo no comprimido e diminuir os custos de produção que possam levar a fármacos mais seguros e baratos para a população em geral.

REFERÊNCIAS

- 1 AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, salts, and cocrystals: what's in a name? **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 5, p. 2147-2152, 2012.

- 2 HILFIKER, R. **Polymorphism**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.

- 3 PETIT, S.; COQUEREL, G. The amorphous state. In: HILFIKER, R. (Ed.). **Polymorphism**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. p. 259-285.

- 4 SSCI: screening for amorphous drug substance, 2006. Disponível em: <<http://www.ssci-inc.com/information/recentpublications/applicationnotes/screeningforamorphousdrugsubstance/tabid/139/default.aspx>>. Acesso em: 01 mar. de 2013.

- 5 CHADHA, R.; ARORA, P.; SAINI, A.; JAIN, D. Solvated crystalline forms of nevirapine: thermoanalytical and spectroscopic studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1328-1339, 2010.

- 6 GRIESSER, U. J. The Importance of Solvates. In: HILFIKER, R. (Ed.). **Polymorphism**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. p. 211-233.

- 7 GUIDANCE for industry: computerized systems used in clinical investigations. May 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/04d-0440-gdl0002.pdf>>. Acesso em: 01 mar.2013.

- 8 ALMARSSON, Ö.; ZAWOROTK, M. The A to Z of pharmaceutical cocrystals: a decade of fast-moving new science and patents. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 1, n. 3, p. 313-327, 2012.

- 9 BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystals**. New York: Oxford University Press, 2007.

- 10 MORISSETTE, S. L.; ALMARSSON, Ö.; PETERSON, M. L.; REMENAR, J. F.; READ, M. J.; LEMMO, A. V.; ELLIS, S.; CIMA, M. J.; GARDNER, C. R. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 275-300, 2004.

11 NANGIA, A. Conformational polymorphs, multiple Z' crystal structures and phase transformations. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 87, n. 2, p. 133-147, 2007.

12 ALLEN, F. The Cambridge structural database: a quarter of a million crystal structures and rising. **Acta Crystallographica Section B**, v. 58, n. 3 pt. 1, p. 380-388, 2002.

13 HILFIKER, R.; BLATTER, F.; RAUMER, M. V. Relevance of solid-state properties for pharmaceutical products. In: HILFIKER, R (Ed.). **Polymorphism**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. p. 1-19.

14 BERNSTEIN, J. Polymorphism – a perspective. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 3, p. 632-650, 2011.

15 ALMARSSON, O.; ZAWOROTKO, M. J. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? **Chemical Communications**, n. 17, p. 1889-1896, 2004. DOI: 10.1039/B402150A.

16 STAHL, P. H.; WERMUTH, C. G. **Pharmaceutical salts**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.

17 BERGE, S. M.; BIGHLEY, L. D.; MONKHOUSE, D. C. Pharmaceutical salts. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 1, p. 1-19, 1977.

18 BHATTACHAR, S. N.; DESCHENES, L. A.; WESLEY, J. A. Solubility: it's not just for physical chemists. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 21–22, p. 1012-1018, 2006.

19 BIGHLEY, L. D.; S.M. BERGE; MONKHOUSE, D. C. Salt forms of drugs and absorption, In: SWARBRICK, J.S.; BOYLAN, J. C. (Eds.). **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 453–499.

20 BALBACH, S.; KORN, C. Pharmaceutical evaluation of early development candidates “the 100 mg-approach”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 275, n. 1–2, p. 1-12, 2004.

21 TONG, W.-Q. T.; WHITESELL, G. In situ salt screening-a useful technique for discovery support and preformulation studies. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 3, n. 2, p. 215-223, 1998.

22 CHILDS, S. L.; STAHL, G. P.; PARK, A. The salt–cocrystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 323-338, 2007.

23 CHENEY, M. L.; SHAN, N.; HEALEY, E. R.; HANNA, M.; WOJTAS, L.; ZAWOROTKO, M. J.; SAVA, V.; SONG, S.; SANCHEZ-RAMOS, J. R. Effects of crystal form on solubility and pharmacokinetics: a crystal engineering case study of lamotrigine. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 1, p. 394-405, 2009.

24 GARDNER, C. R.; ALMARSSON, O.; CHEN, H.; MORISSETTE, S.; PETERSON, M.; ZHANG, Z.; WANG, S.; LEMMO, A.; GONZALEZ-ZUGASTI, J.; MONAGLE, J.; MARCHIONNA, J.; ELLIS, S.; MCNULTY, C.; JOHNSON, A.; LEVINSON, D.; CIMA, M. Application of high throughput technologies to drug substance and drug product development. **Computers & Chemical Engineering**, v. 28, n. 6–7, p. 943-953, 2004.

25 SSCI: Salt Selection - Reducing Time to Market. 2006. Disponível em: <<http://www.ssci-inc.com/information/recentpublications/applicationnotes/saltselectionreducingtimetomarket/tabid/144/default.aspx>>. Acesso em: 01 mar. de 2013.

26 DE CLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 307-320, 2009.

27 FISHER, M.; MOYLE, G. J.; SHAHMANESH, M.; ORKIN, C.; KINGSTON, M.; WILKINS, E.; EWAN, J.; LIU, H.; EBRAHIMI, R.; REILLY, G. A randomized comparative trial of continued zidovudine/lamivudine or replacement with tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine in efavirenz-treated HIV-1-infected individuals. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 51, n. 5, p. 562-568, 2009.

28 DRUGS information online drugs com pharmaceutical sales 2010. 2013. Disponível em: <<http://www.drugs.com/top200.html>>. Acesso em: 01 de mar. de 2013.

29 YUEN, G.; MORRIS, D.; MYDLOW, P.; HAIDAR, S.; HALL, S.; HUSSEY, E. Pharmacokinetics, absolute bioavailability, and absorption characteristics of lamivudine. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 35, n. 12, p. 1174-1180, 1995.

30 HARRIS, R. K.; YEUNG, R. R.; LAMONT, R. B.; LANCASTER, R. W.; LYNN, S. M.; STANFORTH, S. E. 'Polymorphism' in a novel anti-viral agent: lamivudine. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 0, n. 12, p. 2653-2660, 1997..

- 31 BHATTACHARYA, A.; ROY, B. N.; SINGH, G. P.; SRIVASTAVA, D.; MUKHERJEE, A. K. Lamivudine hemihydrate. **Acta Crystallographica Section C**, v. 66, n. 7, p. 0329-0333, 2010.
- 32 DUTKIEWICZ, G.; CHIDAN KUMAR, C. S.; YATHIRAJAN, H. S.; NARAYANA, B.; KUBICKI, M. 5-(4-Ammonio-2-Oxopyrimidine-1(2H)-yl)-1,3-Oxathiolane-2-Carboxylate (lamivudine acid) semihydrate: the six-fold symmetry created by hydrogen bond network. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 41, n. 2, p. 214-218, 2011.
- 33 ELLENA, J.; BOCELLI, M. D.; HONORATO, S. B.; AYALA, A. P.; DORIGUETTO, A. C.; MARTINS, F. T. Base-paired and base-stacked structures of the anti-hiv drug lamivudine: a nucleoside dna-mimicry with unprecedented topology. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 10, p. 5138-5147, 2012.
- 34 BHATT, P. M.; AZIM, Y.; THAKUR, T. S.; DESIRAJU, G. R. Co-crystals of the anti-HIV drugs lamivudine and zidovudine. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 2, p. 951-957, 2008.
- 35 MARTINS, F. T.; PAPARIDIS, N.; DORIGUETTO, A. N. C.; ELLENA, J. Crystal engineering of an anti-HIV drug based on the recognition of assembling molecular frameworks. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 12, p. 5283-5292, 2009.
- 36 BANERJEE, R.; BHATT, P. M.; RAVINDRA, N. V.; DESIRAJU, G. R. Saccharin salts of active pharmaceutical ingredients, their crystal structures, and increased water solubilities. **Crystal Growth & Design**, v. 5, n. 6, p. 2299-2309, 2005.
- 37 ELLENA, J.; PAPARIDIS, N.; MARTINS, F. T. Toward supramolecular architectures of the anti-HIV drug lamivudine: understanding the effect of the inclusion of water in a hydrochloride form. **CrystEngComm**, v. 14, n. 7, p. 2373-2376, 2012.
- 38 CAPELETTI DA SILVA, C.; COELHO, R. R.; DE LIMA CIRQUEIRA, M.; CAMPOS DE MELO, A. C.; LANDRE ROSA, I. M.; ELLENA, J.; MARTINS, F. T. Salts of the anti-HIV drug lamivudine with phthalic and salicylic acids. **CrystEngComm**, v. 14, n. 14, p. 4562-4566, 2012.
- 39 MARTINS, F. T.; DORIGUETTO, A. N. C.; ELLENA, J. From rational design of drug crystals to understanding of nucleic acid structures: lamivudine duplex. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 2, p. 676-684, 2009.
- 40 CLEGG, W. **Crystal structure determination**. New York: Oxford University Press, 1998.

- 41 OOI, L. **Principles of x-ray crystallography**. New York: Oxford University Press, 2010.
- 42 GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of crystallography**. New York: Oxford University Press, 2002.
- 43 INSTITUTO DE FÍSICA QUÍMICA ROCASOLANO. **Cristalografía**. 2013. Disponível em: <<http://www.xtal.iqfr.csic.es/cristalografia/index.html>>. Acesso em: 01 de maio de 2013.
- 44 CULLITY, B. D. **Elements of X-ray diffraction**. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company, 1978.
- 45 GLUSKER, J. P.; LEWIS, M.; ROSSI, M. **Crystal structure analysis for chemists and biologists**. New York: Wiley-VCH, 1994.
- 46 MASSA, W. **Crystal structure determination**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2004.
- 47 DELATORRE, P.; AZEVEDO JUNIOR, W. F. D. A influência do fator de vibração térmica na densidade eletrônica de cristais bidimensionais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 23, n. 2, p. 211-214, 2001.
- 48 PRINCE, E. **International tables for crystallography: mathematical, physical and chemical tables**. 3rd ed. London: The International Union of Crystallography, 2004. v. C
- 49 STOUT, G. H.; JENSEN, L. H. **X-Ray structure determination: a practical guide**. New York: Wiley-VHC, 1989.
- 50 SHELDRICK, G. M. SHELXS-97: program for crystal structure resolution. Göttingen, Germany: University of Göttingen, 1997.
- 51 ALTOMARE, A.; CASCARANO, G.; GIACOVAZZO, C.; GUAGLIARDI, A.; BURLA, M. C.; POLIDORI, G.; CAMALLI, M. SIRPOW.92 - a program for automatic solution of crystal structures by direct methods optimized for powder data. **Journal of Applied Crystallography**, v. 27, n. 3, p. 435-436, 1994.
- 52 HIRSHFELD, F. L. Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. **Theoretica Chimica Acta**, v. 44, n. 2, p. 129-138, 1977.

53 SPACKMAN, M. A.; BYROM, P. G. A novel definition of a molecule in a crystal. **Chemical Physics Letters**, v. 267, n. 3–4, p. 215-220, 1997.

54 MCKINNON, J. J.; SPACKMAN, M. A.; MITCHELL, A. S. Novel tools for visualizing and exploring intermolecular interactions in molecular crystals. **Acta Crystallographica Section B**, v. 60, n. 6, p. 627-668, 2004.

55 CORRÊA, R. D. S. **Xantonas oxigenadas bioativas: cristalização, estrutura e suas interações intra e intermoleculares**. 2009. 182 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

56 MARTINS, F. T. **Química supramolecular de fármacos antirretrovirais inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa: novas formas cristalinas e alteração de propriedades de estado sólido**. 2010. 268 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

57 SHALAEVA, M.; KENSETH, J.; LOMBARDO, F.; BASTIN, A. Measurement of dissociation constants (pKa values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2581-2606, 2008.

58 COLLECT: data collection software. Delft, The Netherlands: Nonius, 1998.

59 OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: CARTER, C. W.; SWEET, R. M. (Eds.). **Methods in Enzymology: macromolecular crystallography**. New York: Academic Press, 1997. v. 276. pt. A., p. 307-326.

60 FARRUGIA, L. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, n. 4, p. 837-838, 1999.

61 SHELDRICK, G. A short history of SHELX. **Acta Crystallographica Section A**, v. 64, n. 1, p. 112-122, 2008.

62 BURLA, M. C.; CALIANDRO, R.; CAMALLI, M.; CARROZZINI, B.; CASCARANO, G. L.; DE CARO, L.; GIACOVAZZO, C.; POLIDORI, G.; SPAGNA, R. SIR2004: an improved tool for crystal structure determination and refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 38, n. 2, p. 381-388, 2005.

63 BURLA, M. C.; CALIANDRO, R.; CAMALLI, M.; CARROZZINI, B.; CASCARANO, G. L.; GIACOVAZZO, C.; MALLAMO, M.; MAZZONE, A.; POLIDORI, G.; SPAGNA, R. SIR2011: a new package for crystal structure determination and refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 2, p. 357-361, 2012.

64 FLACK, H. On enantiomorph-polarity estimation. **Acta Crystallographica Section A**, v. 39, n. 6, p. 876-881, 1983.

65 COPPENS, P.; LEISEROWITZ, L.; RABINOVICH, D. Calculation of absorption corrections for camera and diffractometer data. **Acta Crystallographica**, v. 18, n. 6, p. 1035-1038, 1965.

66 SPEK, A. Single-crystal structure validation with the program PLATON. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 1, p. 7-13, 2003.

67 SPEK, A. Structure validation in chemical crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v. 65, n. 2, p. 148-155, 2009.

68 BRUNO, I. J.; COLE, J. C.; KESSLER, M.; LUO, J.; MOTHERWELL, W. D. S.; PURKIS, L. H.; SMITH, B. R.; TAYLOR, R.; COOPER, R. I.; HARRIS, S. E.; ORPEN, A. G. Retrieval of crystallographically-derived molecular geometry information. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 6, p. 2133-2144, 2004.

69 NARDELLI, M. PARST95 - an update to PARST: a system of Fortran routines for calculating molecular structure parameters from the results of crystal structure analyses. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, n. 5, p. 659, 1995.

70 FARRUGIA, L. ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, n. 5 pt. 1, p. 565, 1997.

71 MACRAE, C. F.; BRUNO, I. J.; CHISHOLM, J. A.; EDGINGTON, P. R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; RODRIGUEZ-MONGE, L.; TAYLOR, R.; VAN DE STREEK, J.; WOOD, P. A. Mercury CSD 2.0 - new features for the visualization and investigation of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, n. 2, p. 466-470, 2008.

72 BERGERHOFF, G. B.; BRANDENBURG, K. Evaluation of crystallographic data with the program DIAMOND. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 101, n. 3, p. 221-225, 1996.

73 PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

74 FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 03**: revision C.02. Wallingford: Gaussian Inc., 2004.

75 BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, n. 6, p. 3098-3100, 1988.

76 FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Javier Alcides Ellena; Felipe Terra Martins; Nikolas Paparidis. **Método de obtenção de nova forma cristalina de lamivudina, seu sal cloridrato monoidratado, formulações farmacêuticas e seus usos**. BR n. PI0903664-4A2, 22 set. 2009, 24 maio 2011.

77 MARTINS, F. T.; BONFILIO, R.; DE ARAÚJO, M. B.; ELLENA, J. Lamivudine salts with improved solubilities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 6, p. 2143-2154, 2012.

78 KALMAN, A.; ARGAY, G.; SCHARFENBERG-PFEIFFER, D.; HOHNE, E.; RIBAR, B. 'Main-part' isostructuralism of several cardenolides and bufadienolides. Structures of three cardenolides: (21S)-methyldigitoxigenin, uzarigenin and sarmentogenin methanol solvate. **Acta Crystallographica Section B**, v. 47, n. 1, p. 68-77, 1991.

79 PAULING, L. The sizes of ions and the structure of ionic crystals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 49, n. 3, p. 765-790, 1927.

80 DICKERSON, R.; DREW, H.; CONNER, B.; WING, R.; FRATINI, A.; KOPKA, M. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. **Science**, v. 216, n. 4545, p. 475-485, 1982.

81 SCHOTTEL, B. L.; CHIFOTIDES, H. T.; DUNBAR, K. R. Anion-[small pi] interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 1, p. 68-83, 2008.

82 BERRYMAN, O. B.; BRYANTSEV, V. S.; STAY, D. P.; JOHNSON, D. W.; HAY, B. P. Structural criteria for the design of anion receptors: the interaction of halides with electron-deficient arenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 1, p. 48-58, 2006.

83 TIEKINK, E. R. T.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. **The importance of Pi-interactions in crystal engineering**: frontiers in crystal engineering. Chichester: John Wiley & Sons, 2012.

- 84 BRUNO, I.; COLE, J.; LOMMERSE, J. M.; ROWLAND, R. S.; TAYLOR, R.; VERDONK, M. IsoStar: a library of information about nonbonded interactions. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 11, n. 6, p. 525-537, 1997.
- 85 WOLFF, S.K.; MCKINNON, J.J.; JAYATILAKA, D.; SPACKMAN, M.A. **CrystalExplorer**. Perth: University of Western Australia, 2007.
- 86 BRUNO, I. J.; COLE, J. C.; EDGINGTON, P. R.; KESSLER, M.; MACRAE, C. F.; MCCABE, P.; PEARSON, J.; TAYLOR, R. New software for searching the Cambridge structural database and visualizing crystal structures. **Acta Crystallographica Section B**, v. 58, n. 1 pt. 3, p. 389-397, 2002.
- 87 WOOD, P. A.; OLIVEIRA, M. A.; ZINK, A.; HICKEY, M. B. Isostructurality in pharmaceutical salts: how often and how similar? **CrystEngComm**, v. 14, n. 7, p. 2413-2421, 2012.
- 88 DE GELDER, R.; WEHRENS, R.; HAGEMAN, J. A. A generalized expression for the similarity of spectra: application to powder diffraction pattern classification. **Journal of Computational Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 273-289, 2001.
- 89 VARASTEHE, M.; DENG, Z.; HWANG, H.; KIM, Y. J.; WONG, G. B. Quantitative determination of polymorphic impurity by X-ray powder diffractometry in an OROS® formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1-2, p. 74-81, 2009.
- 90 BYRN, S.; PFEIFFER, R.; GANEY, M.; HOIBERG, C.; POOCHIKIAN, G. Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory considerations. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 7, p. 945-954, 1995.
- 91 ŚLÓSAAREK, G.; ZAMBONI, R. Infrared and Raman spectra of cytosine and cytidinium salts. **Spectrochimica Acta Part A: molecular spectroscopy**, v. 47, n. 7, p. 863-874, 1991.
- 92 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley & Sons, 2005.
- 93 MATHLOUTHI, M.; SEUVRE, A. M.; KOENIG, J. L. F.T.-I.R. and laser-Raman spectra of cytosine and cytidine. **Carbohydrate Research**, v. 146, n. 1, p. 1-13, 1986.
- 94 KAWAGUCHI, K.; HIROTA, E. Infrared diode laser study of the hydrogen bifluoride anion: FHF⁻ and FDF⁻. **The Journal of Chemical Physics**, v. 84, n. 6, p. 2953-2960, 1986.

- 95 SPINNER, E. The infrared spectrum of solid sodium hydrogen bifluoride. Doubling of the HF stretching band of dilute NaHF_2 in NaDF_2 . **Australian Journal of Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 933-947, 1980.
- 96 HAYNES, D. A.; JONES, W.; MOTHERWELL, W. D. S. Occurrence of pharmaceutically acceptable anions and cations in the Cambridge structural database. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 10, p. 2111-2120, 2005.
- 97 SILVA, L. A.; MARTINS, C. R.; ANDRADE, J. B. D. Por que todos os nitratos são solúveis? **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1016-1020, 2004.
- 98 ETTER, M. C. Encoding and decoding hydrogen-bond patterns of organic compounds. **Accounts of Chemical Research**, v. 23, n. 4, p. 120-126, 1990.
- 99 HUNTER, C. A.; SANDERS, J. K. M. The nature of .pi.-.pi. interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 14, p. 5525-5534, 1990.
- 100 DESIRAJU, G. G. R.; STEINER, T. **The weak hydrogen bond:** in structural chemistry and biology. New York: Oxford University Press, 2001.
- 101 GUY, J. J.; NASSIMBENI, L. R.; SHELDRIK, G. M.; TAYLOR, R. Cytidinium nitrate. **Acta Crystallographica Section B**, v. 32, n. 10, p. 2909-2911, 1976.
- 102 BORAH, B.; WOOD, J. L. The cytidinium—cytidine complex: infrared and Raman spectroscopic studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 30, n. 1, p. 13-30, 1976.
- 103 NISHIMURA, Y.; TSUBOI, M.; SATO, T.; AOKI, K. Conformation-sensitive Raman lines of mononucleotides and their use in a structure analysis of polynucleotides: guanine and cytosine nucleotides. **Journal of Molecular Structure**, v. 146, p. 123-153, 1986. DOI: 10.1016/0022-2860(86)80288-5.
- 104 VARSÁNYI, G.; SZÖKE, S. **Vibrational spectra of benzene derivatives**. New York: Academic Press, 1969.