UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

FELIPE TERRA MARTINS

**Química supramolecular de fármacos antirretrovirais inibidores nucleosídeos de
transcriptase reversa: novas formas cristalinas e alteração de propriedades de
estado sólido**

São Carlos

2010

FELIPE TERRA MARTINS

**Química supramolecular de fármacos antirretrovirais inibidores nucleosídeos de
transcriptase reversa: novas formas cristalinas e alteração de propriedades de
estado sólido**

Tese 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 Doutor em Ciências.

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

São Carlos

2010

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 IFSC/USP

Martins, Felipe Terra

Química supramolecular de fármacos antirretrovirais inibidores nucleosídeos de transcriptase: novas formas cristalinas e alteração de propriedades de estado sólido./ Felipe Terra Martins; orientador Javier Alcides Ellena.-- São Carlos, 2010.
268p.

Tese (Doutorado em Ciência - Área de concentração: Física Aplicada – opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Estrutura cristalina. 2. Fármacos antirretrovirais. 3. Relação estrutura – propriedade de estado sólido. 4. Solubilidade. 5. Lamivudina. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Terra Martins

Tese apresentada ao Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada -
Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 07.10.2010

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Javier Alcides Ellena

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Carlito Lariucci

Instituição: UFG

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Bernardo Lages Rodrigues

Instituição: UFRJ

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Rosângela Itri

Instituição: IF/USP

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Nelson Gonçalves Fernandes

Instituição: UFMG

Assinatura

Agradecimentos

Ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo pela oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Javier Alcides Ellena, orientador, pela dedicação, compreensão, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto, co-orientador, pelo auxílio, incentivo e, sobretudo, amizade durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Altivo Pitaluga Jr. (Farmanguinhos - FIOCRUZ), por fornecer amostras dos fármacos abordados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala e à Dra. Sara Braga Honorato (Dep. Física - UFC), pela colaboração nas análises térmicas e espectroscópicas vibracionais.

À Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo (CEFAR-NCQ - UNIFAL-MG) e ao doutorando Rudy Bonfilio (Ciências Farmacêuticas - UNESP), pela colaboração nos ensaios de solubilidade e recuperação por cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao técnico José Augusto Lopes da Rocha (Grupo de Cristalografia – IFSC-USP), pela colaboração na aquisição dos difratogramas de raios X por material policristalino.

Ao técnico Nelson José Heraldo Gallo (Lab. Microscopia Eletrônica – IFSC-USP), pela colaboração na captura de micrografias eletrônicas de varredura.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação pela política de incentivo à produção científica acadêmica.

Aos colegas e companheiros de trabalho, pela ótima convivência.

Aos amigos, pais, Ana Flávia e Mariane, meu eterno amor e confiança.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e fomento deste trabalho.

Resumo

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) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Propriedades de estado sólido estão diretamente relacionadas ao desempenho de um fármaco. Entre todas as propriedades físicas e químicas dependentes da fase cristalina de um fármaco, estabilidade e solubilidade são as mais que alteram sua biodisponibilidade. Neste sentido, a engenharia de cristais moleculares é uma estratégia para aperfeiçoar as propriedades de estado sólido relacionadas às eficácias dos fármacos. Neste trabalho, nove novas formas cristalinas de fármacos antirretrovirais inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa, a saber, lamivudina, zalcitabina e didanosina, foram preparadas e suas estruturas cristalinas foram elucidadas por difração de raios X por monocristal. As modificações cristalinas preparadas foram também caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X por pó, espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria. Suas solubilidades aquosas e puresas foram determinadas por espectrofotometria de absorvância no ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência, respectivamente. A solubilidade de lamivudina nas modificações cristalinas preparadas pode ser tanto aumentada quanto reduzida quando comparada com a solubilidade da fase cristalina do fármaco incorporada em formulações farmacêuticas. As solubilidades foram também correlacionadas às características estruturais e calorimétricas, o que permitiu o estabelecimento de relações entre estrutura/energia de rede cristalina e propriedade de estado sólido. Ainda, duas modificações cristalinas de lamivudina, em que moléculas do fármaco estão pareadas através de seus fragmentos de citosina, sendo estes pares helicoidalmente sobrepostos, mimetizando uma estrutura polimérica de ácido desoxirribonucléico, revelaram que nucleosídeos têm a informação estrutural necessária para arquitetar duplexes de ácidos nucleicos.

Palavras-chave: Estrutura cristalina. Fármacos antirretrovirais. Relação estrutura-propriedade de estado sólido. Solubilidade. Lamivudina.

Abstract

MARTINS, F. T. **Supramolecular chemistry of antiretroviral nucleoside reverse transcriptase inhibitor drugs: new crystal forms and alteration of solid state properties.** 2010. 268 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Solid state properties are directly related to drug performance. Among all physical and chemical properties dependent on the crystal phase of a drug, stability and solubility are the main ones that alter its bioavailability. In this way, molecular crystal engineering is a strategy to improve solid state properties of drugs related to their efficacies. In this work, nine new crystal forms of antiretroviral nucleoside reverse transcriptase inhibitor drugs, namely, lamivudine, zalcitabina and didanosine, were prepared and their crystal structures were elucidated by single crystal X-ray diffraction. The prepared crystal modifications were also characterized by scanning electron microscopy, powder X-ray diffraction, infrared and Raman vibrational spectroscopy, differential scanning calorimetry and thermogravimetry. Their water solubilities and purities were determined by ultraviolet absorbance spectrophotometry and high performance liquid chromatography, respectively. The solubility of lamivudine in the prepared crystal modifications can be either increased or decreased when compared to the solubility of the drug crystal phase incorporated into pharmaceutical formulations. The solubilities were also correlated to calorimetric and structural features, which allowed the establishment of relationships between crystal lattice energy/structure and solid state property. In addition, two crystal modifications of lamivudine, in which drug molecules are paired through their cytosine fragments, being these pairs helically stacked, mimicking a polymeric structure of deoxyribonucleic acid, have revealed that nucleosides possess the structural information necessary to assemble duplexes of nucleic acids.

Keywords: Crystal structure. Antiretroviral drugs. Structure-solid state property relationship. Solubility. Lamivudine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	ácido desoxirribonucléico
AZT	3'-azido-3'-desoxitimidina
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CCDC	<i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
CED	calorimetria exploratória diferencial
ddC	2',3'-didesoxicitidina, zalcitabina
ddI	2',3'-didesoxinosina, didanosina
ddN	2',3'-didesoxinucleosídeo
ddNTP	2',3'-didesoxinucleosídeo trifosfatado
5'-dGMP	5'-monofosfato de desoxiguanosina
DMSO	dimetilsulfóxido
DRX	difração de raios X
5'-GMP	5'-monofosfato de guanosina
<i>i</i> -ADN	ácido desoxirribonucléico intercalado
INTR	inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa
IV	infravermelho
MEV	microscopia eletrônica de varredura
RMN	ressonância magnética nuclear
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
3TC	β -L-2',3'-didesoxi-3'-tiocitidina, lamivudina
TG	termogravimetria
THF	tetraidrofurano
VHB	vírus da hepatite B
VIH	vírus da imunodeficiência humana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Modificações cristalinas de fármacos	17
1.2 Formação de modificações cristalinas de fármacos	18
1.3 Influência de modificações cristalinas de fármacos no desempenho farmacêutico..	20
1.4 Fármacos antirretrovirais inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa (INTR): didanosina, zalcitabina e lamivudina	22
1.5 Estruturas de ácidos nucléicos	27
1.6 Técnicas de caracterização de modificações cristalinas de fármacos.....	29
1.7 Objetivos	31
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Reagentes e amostras dos fármacos	35
2.2 Preparo das modificações cristalinas	37
2.2.1 Cloridrato de lamivudina	38
2.2.2 Cloridrato monoidratado de lamivudina	38
2.2.3 Maleato de lamivudina	38
2.2.4 Hemicloridrato hemidratado de lamivudina	40
2.2.5 0,67-Hidrato de lamivudina	40
2.2.6 Dupla hélice de lamivudina	40
2.2.7 Cloridrato de zalcitabina	40
2.2.8 Cloridrato de zalcitabina e lamivudina.....	41
2.2.9 Hidrato de didanosina	41
2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
2.4 Difração de raios X por monocristal (DRXM)	42
2.5 Difração de raios X por pó (DRXP)	51
2.6 Espectroscopia vibracional no infravermelho (IV) e Raman	52
2.7 Análises térmicas por calorimetria exploratória diferencial (CED) e termogravimetria (TG)	53
2.8 Recuperação de lamivudina nas modificações cristalinas	53
2.9 Solubilidade no equilíbrio das modificações cristalinas de lamivudina	54

3	CLORIDRATO DE LAMIVUDINA E CLORIDRATO MONOIDRATADO DE LAMIVUDINA	57
3.1	Caracterização morfológica por MEV	57
3.2	Determinação estrutural por DRXM	58
3.3	Caracterização cristalográfica por DRXP	71
3.4	Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman.....	73
3.5	Caracterização térmica por CED e TG	76
3.6	Recuperação em solução por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	79
3.7	Solubilidade no equilíbrio	81
4	ENGENHARIA DE CRISTAIS DE FÁRMACOS: MALEATO DE LAMIVUDINA.....	85
4.1	Caracterização morfológica por MEV	90
4.2	Determinação estrutural por DRXM	91
4.3	Caracterização cristalográfica por DRXP	99
4.4	Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman.....	100
4.5	Caracterização térmica por CED e TG	103
4.6	Recuperação em solução por CLAE.....	104
4.7	Solubilidade no equilíbrio	105
5	ESTRUTURAS DE LAMIVUDINA SIMILARES A ÁCIDOS NUCLEÍCOS: HEMICLORIDRATO HEMIDRATADO DE LAMIVUDINA, 0,67-HIDRATO DE LAMIVUDINA E DUPLA HÉLICE DE LAMIVUDINA.....	109
5.1	Determinação estrutural por DRXM: Hemicloridrato hemidratado de lamivudina...	111
5.2	Determinação estrutural por DRXM: 0,67-Hidrato de lamivudina	119
5.3	Determinação estrutural por DRXM: Dupla hélice de lamivudina.....	133
5.4	Caracterização morfológica por MEV: Dupla hélice de lamivudina	152
5.5	Caracterização cristalográfica por DRXP: Dupla hélice de lamivudina.....	153
5.6	Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman: Dupla hélice de lamivudina	154
5.7	Caracterização térmica por CED e TG: Dupla hélice de lamivudina.....	157
5.8	Recuperação em solução por CLAE: Dupla hélice de lamivudina.....	158
5.9	Solubilidade no equilíbrio	159
6	CLORIDRATO DE ZALCITABINA E CLORIDRATO DE ZALCITABINA E LAMIVUDINA	161
6.1	Caracterização morfológica por MEV	161
6.2	Determinação estrutural por DRXM	161

6.3 Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman: Cloridrato de zalcitabina	174
7 PREPARAÇÃO SOLVOTÉRMICA DE CRISTAIS DE FÁRMACOS: HIDRATO DE DIDANOSINA	177
7.1 Caracterização morfológica por MEV	178
7.2 Determinação estrutural por DRXM	178
7.3 Caracterização cristalográfica por DRXP	187
7.4 Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman.....	188
7.5 Caracterização térmica por CED e TG	191
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	195
REFERÊNCIAS	199
APÊNDICE	219
ANEXOS	239

1 INTRODUÇÃO

1.1 Modificações cristalinas de fármacos

Sólidos moleculares podem exibir polimorfismo, o que é definido como a habilidade de um composto existir em duas ou mais estruturas no estado sólido (1-4). Em outras palavras, polímeros são fases sólidas de uma mesma substância caracterizadas por diferentes arranjos arquitetônicos de suas estruturas cristalinas. Com relação aos insumos farmacêuticos, este fenômeno vem atualmente recebendo destaque devido ao seu impacto na produção e desempenho de medicamentos (5-7).

Dois mecanismos principais pelos quais compostos orgânicos se empacotam em formas diferentes na rede cristalina são reconhecidos (8,9). Um deles ocorre quando moléculas consideravelmente rígidas são arranjadas em formas diferentes dentro da estrutura cristalina, como consequência dos variados padrões de interações intermoleculares que podem ser formados, originando, portanto, cristais com diferentes estruturas tridimensionais (10-13). Ou seja, quando alterações no ordenamento molecular são responsáveis pela diferença estrutural, há o polimorfismo orientacional ou de empacotamento (8). Neste caso, alterações na estrutura intramolecular não são significativas. Quando torções no esqueleto molecular são associadas a mudanças no ordenamento a longo alcance, configura-se o polimorfismo conformacional, o qual é comumente observado em diferentes estruturas de moléculas pouco rígidas (14-19). Na maioria dos casos, alterações conformacionais estão relacionadas a mudanças nos padrões de interações intermoleculares (9,15).

Além dos polímeros verdadeiros, em que a constituição química de estruturas diferentes de um mesmo composto é idêntica, em alguns casos podem ser obtidos solvatos, co-cristais e sais de fármacos com a finalidade de aperfeiçoar determinada propriedade de estado sólido ligada ao processamento técnico de um fármaco e/ou ao seu perfil farmacológico (20-24). Solvatos podem ser preparados através da incorporação de outras espécies, orgânicas ou inorgânicas, à estrutura cristalina do fármaco (25). Estas espécies são oriundas do processo de obtenção das formações sólidas. Por sua vez, modificações cristalinas

em que fármacos cristalizam junto com outras espécies moleculares são denominadas co-cristais, caso as espécies orgânicas não estejam ionizadas (espécies neutras) (26). Na comprovação da existência de cargas entre as unidades formadoras do cristal, a denominação “co-cristal” é substituída por “sal” (27).

1.2 Formação de modificações cristalinas de fármacos

A engenharia de cristais moleculares está fundamentada na síntese supramolecular racional, o que consiste na inspeção e reconhecimento de características químico-estruturais relacionadas à estruturação de formas sólidas a partir de moléculas conhecidas sem a necessidade de quebrar ou formar ligações covalentes (28). Dentro de uma abordagem racional de engenharia de cristais moleculares, uma série de fatores e variáveis deve ser levada em consideração na tentativa de encontrar condições termodinâmicas favoráveis para a nucleação dos diferentes espécimes cristalinos, tais como polimorfos verdadeiros, solvatos, co-cristais e sais de fármacos (29). Não obstante, o planejamento racional de cristais moleculares envolve uma análise detalhada de características estruturais moleculares e reconhecimento de padrões supramoleculares de interações químicas entre candidatos a componente de uma modificação cristalina (26,30).

Para a escolha de agentes de co-cristalização e contra-íons a serem utilizados na triagem de co-cristais e sais de fármacos dentro de uma estratégia racional para o preparo de modificações cristalinas, alguns pontos merecem destaque. A análise do caráter ácido-base é muito útil no direcionamento da pesquisa por co-cristais (pequena diferença entre os valores de pK_a dos constituintes do cristal, geralmente menor que três) ou sais (notável diferença entre os valores de pK_a dos constituintes do cristal, geralmente maior que três) (31).

Em adição, outras características estruturais relevantes devem ser inspecionadas quando cristais de fármacos são planejados. A observação de funcionalidades supramoleculares e características conformacionais dos componentes do cristal é uma etapa decisiva durante a seleção de agentes de co-cristalização e formadores de sais com maior probabilidade de formar modificações cristalinas sob condições laboratoriais. Esta prática também permite prever a compatibilidade de co-cristalização de diferentes fármacos dentro de uma fase cristalina (32), o que, em determinados casos, é desejado do ponto de vista farmacotécnico dado que a incorporação de múltiplos fármacos dentro de uma única fase

sólida pode evitar incompatibilidades físicas entre diferentes insumos farmacêuticos (33), sendo isto, entretanto, algo pouco reportado na literatura (34).

A presença de grupos receptores e doadores de ligações de hidrogênio intermoleculares, a existência de anéis aromáticos aptos a interagirem através de contatos do tipo π - π e a presença de grupos hidrofóbicos são algumas das principais funcionalidades supramoleculares que devem ser levadas em consideração durante o exercício de predição da viabilidade de cristais moleculares ocorrerem (35-38). As possibilidades conformacionais dos componentes constituintes do cristal devem também ser analisadas no momento da seleção e triagem de candidatos aos ensaios de cristalização de fármacos (39,40). A liberdade (ou o impedimento) de rotação sobre ligações químicas determina a conformação e, conseqüentemente, a posição de funcionalidades supramoleculares dos componentes dentro da rede cristalina. Isto pode reger a compatibilidade do arranjo supramolecular predito, e, conseqüentemente, a formação ou não da modificação cristalina no laboratório.

Uma vez que a viabilidade de formação de uma modificação cristalina foi predita através de abordagens de engenharia de cristais moleculares, a definição das condições de cristalização pode ser definida laboratorialmente (29). Neste ponto, a formação espontânea de uma modificação cristalina é uma questão termodinâmica em que a contribuição energética para a diminuição da energia livre de Gibbs, proveniente da entalpia de rede cristalina, deve compensar o componente desfavorável à espontaneidade do processo de cristalização relacionado ao ordenamento molecular no cristal (41). O processo de cristalização envolve vários passos, sendo que a etapa de nucleação é limitante (29,42). Nesta etapa, cristalitos medindo alguns nanômetros, os quais possuem dimensões suficientes para existirem individualmente e são conhecidos como núcleos, são formados em uma solução supersaturada (42). O processo de nucleação pode ser primário, o qual não requer cristais preexistentes da modificação cristalina na matriz de cristalização, ou secundário, onde a nucleação é induzida pela presença de cristais da modificação cristalina em questão. Ainda, a nucleação primária pode ser homogênea, ocorrendo formação espontânea dos núcleos da modificação cristalina na matriz de cristalização, ou heterogênea, quando a nucleação é induzida por partículas exógenas ao meio de cristalização (43). Após a nucleação, moléculas constituintes da modificação cristalina são progressivamente atreladas aos cristalitos em uma etapa de crescimento do cristal (29,42). Este processo de crescimento do cristal pendura até que a saturação da solução seja atingida. Nesse momento, núcleos cujos raios são inferiores a um valor crítico e característico de cada modificação cristalina tendem a se dissolverem, enquanto

que cristalitos maiores, cujos diâmetros superam este raio crítico, originam núcleos verdadeiros que formarão cristais macroscópicos (8).

Nos casos em que estratégias de planejamento racional de modificações cristalinas não prosperam experimentalmente, novas fases cristalinas de insumos farmacêuticos ativos podem ser preparadas através de métodos randômicos de investigação laboratorial, o que envolve a variação de condições de cristalização dos fármacos (44). Proporção de solventes da matriz de cristalização, pH da fase aquosa (quando presente), taxa de evaporação da matriz solvente, temperatura e pressão são algumas das variáveis mais freqüentemente experimentadas (44,45). Este procedimento é amplamente difundido para o preparo de modificações cristalinas, sendo que a contemplação do maior número possível de ambientes químicos durante a experimentação aumenta a probabilidade de se obter novas formas cristalinas de fármacos (46).

1.3 Influência de modificações cristalinas de fármacos no desempenho farmacêutico

A biodisponibilidade de um fármaco é um dos principais parâmetros farmacocinéticos e está intimamente relacionada à sua eficácia, uma vez que este parâmetro é definido como a fração de moléculas intactas de um fármaco disponível à circulação sistêmica ou ao sítio de ação farmacológica, em relação à dose administrada (47-49). No que diz respeito às formas farmacêuticas sólidas, a biodisponibilidade de um fármaco é função da sua taxa de absorção gastrointestinal e da fração absoluta absorvida (50). Nesse sentido, a liberação de um fármaco de sua forma farmacêutica sólida determina sua biodisponibilidade (51,52).

Por sua vez, a liberação de um fármaco de sua forma farmacêutica sólida envolve a desintegração do medicamento em uma matriz onde então ocorrerá a solubilização (53). Este processo de transferência de massa de uma forma farmacêutica sólida para uma solução, seja esta sistêmica ou não, é a definição de dissolução de um fármaco (52). Vários parâmetros físicos e químicos governam este processo, como, por exemplo, a composição de uma formulação farmacêutica (presença de excipientes e adjuvantes), compressibilidade, área superficial e forma da partícula, pH e temperatura da matriz onde ocorrerá a dissolução (54,55).

Não obstante, a solubilidade no equilíbrio de determinada fase sólida limita o processo de dissolução de um fármaco. A quantidade solúvel de um fármaco em determinado volume

de solução será máxima quando ocorrer equilíbrio entre a fase sólida e a fase em solução (53). Na condição de equilíbrio termodinâmico, as forças de coesão das moléculas em solução à fase sólida são equivalentes às forças de liberação das moléculas do cristal. Agora, não há redução efetiva de energia livre de Gibbs proveniente da solubilização de quantidade adicional do fármaco (8). Portanto, macroscopicamente não será mais observada solubilização da fase sólida quando a quantidade máxima solúvel for alcançada.

Em última análise, a solubilidade no equilíbrio de uma fase sólida de um fármaco está relacionada à sua eficácia farmacêutica. Por sua vez, a solubilidade no equilíbrio é determinada pela estrutura da fase sólida (56,57). Certa quantidade de um fármaco é dissolvida até que a redução de energia livre de Gibbs do sistema não compense mais a energia livre da rede cristalina (41,58,59). A energia livre de solvatação é responsável pela redução de energia livre de Gibbs do sistema e é composta pela entalpia de formação de ligações entre moléculas do solvente e do soluto (favorável à espontaneidade do processo de solubilização) e pela entropia de desordenamento molecular no solvente (desfavorável à espontaneidade do processo de solubilização devido ao ordenamento das moléculas do solvente) (41). Similarmente, a energia de rede cristalina também recebe contribuições entrópicas, referentes ao ordenamento molecular no cristal, e entálpicas, devido às forças atrativas entre as espécies moleculares (41). Diferentes arranjos intermoleculares caracterizam modificações cristalinas, e, portanto, diferentes ordenamentos moleculares e padrões de interações intermoleculares são descritos para modificações cristalinas de um fármaco, culminando em distintas energias de rede (8,29). Consequentemente, modificações cristalinas de fármacos apresentam diferentes solubilidades no equilíbrio e podem apresentar distintas eficácias farmacológicas.

Uma estratégia muito utilizada para melhorar a solubilidade no equilíbrio e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de um fármaco consiste em preparar sais (60). Em sais, fármacos básicos estão protonados na forma de cátions, enquanto fármacos ácidos estão em suas formas aniônicas. Entretanto, a presença de um grupo protonável em fármacos básicos ou de um grupo dissociável em fármacos ácidos não necessariamente significa que um sal será formado sob condições laboratoriais (61). Um sal será formado apenas se o pH da solução aquosa ou suspensão de um fármaco básico é ajustado abaixo de seu pH_{max} , o pH em que a solubilidade do sal é máxima e que varia linearmente com o pK_a do fármaco (60,62). No caso de um fármaco ácido, a formação do sal ocorrerá se o pH do meio assumir valores acima do pH_{max} . Portanto, a preparação de um sal pode ser planejada com base no comportamento de solubilidade de um fármaco em função do pH e de seu caráter ácido-base.

Para incorporação em formulações de formas farmacêuticas sólidas, fases cristalinas de sais são preferidas devido às relações estequiométricas entre fármacos e contra-íons, os quais podem ser inorgânicos (como, por exemplo, haletos) ou orgânicos (como, por exemplo, ácidos carboxílicos), e a baixas taxas de interconversão sólido-sólido, o que implica em reprodutibilidade de propriedades farmacotécnicas e farmacológicas (60,63).

Sais de fármacos podem ser preparados com contra-íons inorgânicos ou orgânicos. Cloridratos de fármacos básicos são sais contendo um ânion inorgânico como contra-íon, mais especificamente, o íon cloreto. Estes sais são apreciados pelas suas características físicas, químicas e técnicas, como praticidade de preparação, elevado rendimento do preparo laboratorial, baixo percentual de impurezas residuais, aperfeiçoamento de propriedades farmacotécnicas e, principalmente, incremento substancial da solubilidade do fármaco quando comparada com a solubilidade da espécie molecular não ionizada (64-70). Há muitos ânions orgânicos que podem ser utilizados na preparação de sais de fármacos básicos. Um dos contra-íons orgânicos mais utilizados para este propósito é o ácido maléico. Quimicamente, ele é um ácido dicarboxílico insaturado formado por quatro átomos de carbono, nomeado sistematicamente ácido 2(Z)-butenodióico. Sais de maleato também podem apresentar vantagens técnicas e solubilidades aperfeiçoadas em relação às fases sólidas contendo apenas o fármaco neutro (71,72). Por sua vez, um fármaco ácido pode formar um sal sódico (73,74) ou um sal de amônio quaternário (75,76), por exemplo.

Portanto, o conhecimento acerca da existência e o controle da formação de modificações cristalinas são fundamentais para que o desempenho farmacêutico de uma pequena molécula esteja dentro dos limites esperados. As características técnicas e farmacológicas de uma molécula bioativa podem ser aperfeiçoadas através da seleção e preparo de certa modificação cristalina, constituindo em uma atraente alternativa para melhoramento de perfis farmacêuticos através de química supramolecular no estado sólido.

1.4 Fármacos antirretrovirais inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa (INTR): didanosina, zalcitabina e lamivudina

Os inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa (INTR) foram os primeiros fármacos aprovados para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (77). Todos os fármacos desta classe antirretroviral são 2',3'-didesoxinucleosídeos (ddN). Estes fármacos são fosforilados às suas formas trifosfatadas (ddNTP) nas células humanas e

competem com nucleotídeos canônicos pelo sítio ativo da enzima transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (VIH) como substratos alternativos. Uma vez que uma molécula de INTR é incorporada à molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), a síntese é interrompida prematuramente devido à ausência de um grupo hidroxílico na posição 3' do INTR ao qual seria ligado outro nucleotídeo (78).

Zidovudina (3'-azido-3'-desoxitimidina, AZT), foi o primeiro fármaco antirretroviral INTR com atividade contra o VIH liberado para uso terapêutico no ano de 1987 (79). Didanosina (2',3'-didesoxinosina, ddI) foi o segundo INTR legalmente licenciado para uso clínico no ano de 1991, enquanto que zalcitabina (2',3'-didesoxicitidina, ddC) foi o terceiro fármaco desta classe liberado para uso terapêutico no ano de 1992 (79).

O emprego terapêutico de didanosina contra a infecção por VIH é amplo, sempre em associação com outros agentes anti-VIH (80). Este fármaco é o insumo ativo de formulações farmacêuticas sólidas comercializadas sob a marca VIDEX® pela companhia Bristol-Myers Squibb (79). Didanosina apresenta algumas propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, como baixa solubilidade aquosa (27,3 mg/mL a 25°C), tendência de hidrólise em meio ácido, baixa biodisponibilidade absoluta por administração oral (em média 42%) e meia-vida biológica curta (em média 1h30min) (81,82).

Apesar de uma estratégia para melhorar estas características desfavoráveis consistir na alteração das propriedades de estado sólido, poucos estudos sobre modificações cristalinas de ddI são reportados na literatura (83,84). O aperfeiçoamento de perfis de solubilidade e dissolução por meio da engenharia de cristais moleculares é uma alternativa neste sentido, até mesmo pelo fato da baixa solubilidade da forma comercial de didanosina estar relacionada às suas propriedades farmacocinéticas desfavoráveis.

Três modificações cristalinas de didanosina são reportadas:

- 1) a forma sólida comercial de baixa solubilidade (81);
- 2) um sal sódico monoidratado com maior solubilidade em soluções básicas (pH 9,5-11) e, conseqüentemente, propriedades farmacocinéticas aperfeiçoadas quando comparadas àquelas da fase sólida do fármaco base utilizado em formulações farmacêuticas (85);
- 3) uma forma recristalizada de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) usando como anti-solvente CO₂ supercrítico (83).

Entretanto, nenhuma estrutura cristalina deste fármaco foi reportada até o presente momento embora este seu uso terapêutico advenha desde o ano de 1991, o que é creditado ao fato dos espécimes cristalinos possuírem dimensões inadequadas para a análise por difração de raios X por monocristal (DRXM) (83).

A forma comercial de didanosina apresenta-se como um material policristalino, com predominância de cristalitos morfológicamente irregulares (83). Esta fase sólida de didanosina pode ser recristalizada usando solventes orgânicos, como, por exemplo, álcoois metílico, etílico e isopropílico (86,87). Seu sal sódico monoidratado pode ser preparado através da dissolução de 1 g do fármaco em 4,51 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 1 mol/L, seguido pela adição desta solução a um volume de isopropanol (ou acetona) compreendido entre 50 e 75 mL (85). A terceira forma sólida de didanosina conhecida cristaliza como agulhas e foi preparada através da lavagem de uma solução do fármaco a 100 mg/mL em DMSO com CO₂ supercrítico a uma vazão de 4,5 µmol/min (83).

A companhia farmacêutica Roche comercializa zalcitabina sob a marca HIVID® (79). Este fármaco apresenta uma solubilidade de 76,4 mg/mL a 25°C e biodisponibilidade absoluta média por administração oral de 80% (88). Estudos acerca de polimorfismo e modificações cristalinas de zalcitabina são escassos. Apenas uma fase sólida é conhecida e elucidada estruturalmente (89,90). Esta forma cristalina apresenta uma molécula de zalcitabina na unidade assimétrica cristalográfica de sua cela unitária tetragonal resolvida no grupo espacial *P*4₁2₁2 (89,90). Cristais bipiramidais de zalcitabina podem ser obtidos de uma solução do fármaco a 10% (m/vol.) em uma mistura de volumes iguais de butanol e metanol (89,90).

Lamivudina (β -L-2',3'-didesoxi-3'-tiocitidina, 3TC) foi o quinto fármaco da série dos INTR a ser liberado para comercialização no ano de 1995 (79). Este fármaco é comercializado pela companhia farmacêutica GlaxoSmithKline em uma formulação sólida sob a marca EPIVIR®. No ano de 1997, a associação entre lamivudina e zidovudina foi licenciada para o uso terapêutico (79). Esta associação é comercializada sob a marca COMBIVIR® também por GlaxoSmithKline, e é um dos principais medicamentos antirretrovirais utilizados terapeuticamente até hoje (91). A companhia farmacêutica GlaxoSmithKline também comercializa lamivudina em uma forma farmacêutica para administração oral sob a marca ZEFFIX®, a qual é muito utilizada para combater a infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) (92,93). A fase cristalina de lamivudina utilizada em formulações farmacêuticas apresenta uma solubilidade de 70 mg/mL a 20°C e biodisponibilidade absoluta média por administração oral de 86% (94).

Modificações cristalinas de lamivudina vêm sendo investigadas. Sete fases cristalinas de lamivudina são conhecidas até o presente momento:

1) forma I, um 0,2-hidrato de lamivudina, a qual cristaliza no grupo espacial ortorrômbico *P*2₁2₁2₁ com quatro moléculas de água e vinte moléculas do fármaco por cela unitária cristalográfica (95);

2) forma II, o único polimorfo verdadeiro de lamivudina conhecido, o qual cristaliza no grupo espacial tetragonal $P4_32_12$ com oito moléculas do fármaco por cela unitária (95) e é a fase cristalina utilizada em formulações farmacêuticas sólidas (96,97);

3) forma III, um hemidrato cristalizando no grupo espacial monoclinico $P2_1$ com duas moléculas de água e quatro moléculas do fármaco por cela unitária (98);

4) um sacarinato de lamivudina cristalizando no grupo espacial $P2_12_12_1$ com quatro pares iônicos por cela unitária (99);

5) um 3,5-dinitrossalicilato de lamivudina cristalizando no grupo espacial $P2_1$ com duas moléculas de água, duas unidades neutras de lamivudina e dois pares iônicos $(\text{lamivudina})^+(3,5\text{-dinitrossalicilato})^-$ por cela unitária (100);

6) um co-cristal estequiométrico formado por duas moléculas de lamivudina e duas moléculas de 4-quinolinona por cela unitária monoclinica (grupo espacial $P2_1$) (100);

7) um co-cristal monoidratado estequiométrico entre lamivudina e zidovudina, contendo duas unidades moleculares de cada espécie por cela unitária monoclinica (grupo espacial $P2_1$) (100).

A forma I de lamivudina pode apresentar dois hábitos cristalinos morfologicamente distintos: bastões curtos e agulhas extremamente finas (95). Esta forma pode ser preparada através do aquecimento até 45°C de uma suspensão de 64,8 mg de lamivudina em 200 mL de água com o propósito de obter uma solução que posteriormente é resfriada até 30°C (101). Com este procedimento, uma massa é depositada. Sequencialmente, etapas de filtração e secagem durante 24 horas a 45°C rendem os cristais da forma I de lamivudina (101).

Os cristais da forma II de lamivudina são bipirâmides (95), assim como os cristais de zalcitabina (89,90). Esta similaridade morfológica reflete a mesma ordem arquitetônica interna e o caráter isoestrutural destas fases cristalinas de lamivudina e zalcitabina. Na forma sólida de zalcitabina, moléculas do fármaco estão ordenadas similarmente às moléculas de lamivudina na forma II de lamivudina (95). Em ambas as estruturas, a conformação molecular e o padrão de interações intermoleculares são similares.

A forma II pode ser preparada através do aquecimento até refluxo de uma suspensão de 10 mg de lamivudina em 200 ml de álcool etílico, obtendo-se uma solução límpida que é filtrada ainda quente (101). Depois, cerca da metade do volume do solvente é destilado, quando, então, o aquecimento é interrompido. Na sequência, cristais da forma II são semeados na solução pré-concentrada. Na próxima etapa, a solução já adicionada dos cristais sementes da forma II é então resfriada de 80°C para 25°C, com início do crescimento dos cristais a 79°C. Por fim, etapas de resfriamento, agora até 15°C, e agitação por uma hora, sucedidas de

filtração, lavagem com álcool desnaturado e secagem, fornecem os cristais da forma II de lamivudina (101). Alternativamente, a forma II de lamivudina também pode ser obtida através da suspensão de 100 g de salicilato de lamivudina monoidratado em 600 ml de acetato de etila (ou acetonitrila) (102). Esta mistura é agitada por 10 minutos a uma faixa de temperatura compreendendo entre 30°C até 35°C, seguido por aquecimento lento até uma temperatura suficiente para atingir o refluxo do solvente utilizado. No momento em que o refluxo do solvente ocorre, 60 g de trietanolamina em 50 ml de acetato de etila são adicionados vagarosamente. Sequencialmente, o processo de refluxo é mantido por 30 minutos, sucedido por resfriamento da solução e agitação por uma hora a 30°C, resultando, após filtração, lavagem e secagem, em cristais da forma II de lamivudina (102).

As solubilidades no equilíbrio da forma I e forma II de lamivudina são similares (70 mg/mL a 20°C) (103). Devido ao hábito cristalino, a forma II possui melhores propriedades de escoamento, e, portanto, esta forma sólida é preferida em formulações farmacêuticas (103). A forma I de lamivudina também é menos estável que a forma II, o que inviabiliza o emprego deste 0,2-hidrato de lamivudina em formulações farmacêuticas (95,101,103).

Por sua vez, cristais prismáticos da forma III podem ser preparados dissolvendo 25 g de lamivudina (forma I ou forma II) em 75 mL de água a 45°C, seguido por resfriamento lento da solução e isolamento do material cristalino da solução matriz (98).

O sacarinato de lamivudina foi preparado através da moagem de quantidades equimolares de lamivudina (45,8 mg) e sacarina (36,6 mg) em almofariz, seguido por dissolução em uma mistura binária de metanol (5 mL) e clorofórmio (5 mL) e evaporação lenta da matriz solvente (99). Contrariando o comportamento geral da maioria dos fármacos cristalizados na forma de sais, o sacarinato de lamivudina é pouco solúvel. Através da dissolução deste sal, a solubilidade do fármaco no equilíbrio é 10,56 mg/mL à temperatura ambiente (99).

O 3,5-dinitrossalicilato hidratado de lamivudina foi preparado dissolvendo quantidades equimolares de lamivudina (22,9 mg) e sacarina (22,8 mg) em uma mistura binária de metanol (5 mL) e dimetilformamida (5 mL) (100). O co-cristal de lamivudina com 4-quinolinona foi preparado dissolvendo quantidades equimolares do fármaco (22,9 mg) e do agente de co-cristalização (14,5 mg) em etanol (10 mL) (100). O co-cristal monoidratado de lamivudina com zidovudina também foi preparado dissolvendo quantidades equimolares dos fármacos (22,9 mg de lamivudina e 26,7 mg de zidovudina) em etanol (10 mL). Após evaporação lenta da matriz solvente, cristais destas três modificações cristalinas de lamivudina foram isolados (100).

1.5 Estruturas de ácidos nucléicos

No ano de 1953, James Watson e Francis Crick postularam pela primeira vez o modelo estrutural do ADN com base em dados de difração de raios X (DRX) (104). Neste modelo, cada cadeia é formada por nucleotídeos ligados covalentemente através de ligações fosfodiéster entre os grupos fosfato na posição 5' e suas hidroxilas na posição 3'. Duas cadeias de polinucleotídeos são então pareadas através de ligações de hidrogênio entre as bases purínicas e pirimidínicas e espiraladas à direita ao longo do seu eixo principal, arquitetando uma dupla hélice (ou duplex) onde interações π - π responsáveis pela sobreposição entre sistemas eletrônicos π das bases nitrogenadas contribuem para manutenção da estrutura (104). Duas ligações de hidrogênio entre resíduos de adenosina e timidina e três ligações de hidrogênio entre resíduos de citidina e guanosina são responsáveis pelo pareamento das cadeias de polinucleotídeos. Neste primeiro modelo de ADN, todos os anéis de 2'-desoxirribose apresentaram a conformação C-2' *endo*, bem como a rotação sobre o eixo da ligação glicosídica configura uma conformação *anti* dos anéis de purina e pirimidina. A distância média entre as bases sobrepostas foi modelada como sendo 3,4 Å, e a presença de sulcos principais e secundários foi atribuída ao caráter helicoidal da estrutura polimérica (104).

Depois de quase seis décadas da elucidação estrutural do ADN, a compreensão dos princípios físicos que governam sua estruturação e, conseqüentemente, sua função biológica ainda é objeto de muitos estudos. Hoje se sabe, por exemplo, que o ADN pode apresentar variações nas distâncias entre as bases sobrepostas, orientação de espiralização à esquerda, pareamentos atípicos entre bases purínicas e pirimidínicas (pareamentos *Hoogsteen* e *wobble*) e nucleotídeos com conformações diferentes daquelas inicialmente reportadas, formação de triplexes e tetraplexes e incorporação de nucleotídeos e bases modificadas em sua estrutura (105-110).

Apesar dos conhecimentos adquiridos com o passar do tempo acerca de estruturas de ADN, evidências experimentais ainda asseguram que a dupla hélice é mantida por três forças principais (111):

- 1) ligações fosfodiéster entre os resíduos de nucleotídeos, as quais estruturam o esqueleto covalente das cadeias individuais;

2) ligações de hidrogênio entre os fragmentos purínicos e pirimidínicos, responsáveis pelo pareamento e complementaridade das cadeias de polinucleotídeos;

3) interações π - π responsáveis pela sobreposição entre as bases nitrogenadas, as quais contribuem para a manutenção do alinhamento da hélice ao longo de seu eixo principal.

De fato, estas interações estão presentes até mesmo na estrutura da menor duplex que pode ser formada (112). Dois dinucleotídeos complementares são pareados e sobrepostos através de suas bases nitrogenadas dentro de cavidades hidrofóbicas, revelando que uma duplex pode ser estruturada apenas com dois pares de base quando as três forças acima são estabelecidas (112).

Em soluções aquosas ácidas e neutras, a formação de estruturas de ADN sem ligações covalentes fosfodiéster vem sendo mostrada em tetraplexes de 5'-monofosfato de guanosina (5'-GMP) e 5'-monofosfato de desoxiguanosina (5'-dGMP) (113-115), como também em estruturas tetraméricas de derivados deste nucleotídeo (116,117). Tais compostos são capazes de se organizarem em agregados estabilizados por pareamentos e interações π - π entre os fragmentos de guanina helicoidalmente sobrepostos, sem que ocorra a formação de ligações covalentes entre os grupos 5'-fosfato e 3'-hidroxila (115). Entre os resíduos de ribose das moléculas sobrepostas, há uma ligação de hidrogênio entre os grupos 5'-fosfato e 3'-hidroxila através dos átomos $\text{P}-\text{O}^- \cdots \text{H}-\text{O}$. Esta ligação de hidrogênio posiciona as moléculas dos nucleotídeos para a formação da ligação fosfodiéster, em uma estrutura primitiva de ADN que poderia ter precedido, em condições prebióticas, à formação dos polinucleotídeos modernos (115). Entretanto, esta evidência que estruturas de ADN podem ser arquitetadas mesmo sem ligações covalentes fosfodiéster não descarta a necessidade de um grupo fosfato na posição 5' do anel de ribose para que o arranjo supramolecular possa ser formado. Nestas estruturas de ADN estabilizadas por interações intermoleculares na periferia da fibra, o grupo 5'-fosfato deve estar posicionado similarmente àquele envolvido em uma ligação covalente fosfodiéster (115). Igualmente, a formação de estruturas helicoidais de ADN desprovidas de ligações fosfodiéster foi observada apenas em tetraplexes, sendo que a formação de duplexes equivalentes sem ligações covalentes entre os grupos 5'-fosfato e 3'-hidroxila não é reportada.

Estruturas de nucleobases, nucleosídeos e nucleotídeos em que há pareamento e sobreposição dos anéis de purina e pirimidina são conhecidas (118-122). Nestas estruturas, a sobreposição dos fragmentos purínicos ou pirimidínicos não é helicoidal. Isto corrobora o princípio básico que ligações covalentes fosfodiéster são requeridas para a organização de duplexes.

Em uma das modificações cristalinas de lamivudina, o 3,5-dinitrossalicilato hidratado de lamivudina, as moléculas do fármaco estão parcialmente protonadas (100). Nesta modificação cristalina, unidades protonadas e neutras de lamivudina estão pareadas através de três ligações de hidrogênio. Entretanto, estes pares não estão sobrepostos uns sobre os outros. Um ânion (3,5-dinitrossalicilato)[−] intercala os pares lamivudina≡lamivudina⁺ (100). Este ânion é justaposto sobre os pares de lamivudina através de interações π – π . Nesta estrutura, lamivudina exibe pareamento de bases similar àquele encontrado em estruturas de ADN intercalado (denominado *i*-ADN), as quais são ricas em resíduos de citidina e formadas através do pareamento entre resíduos hemiprotonados deste nucleotídeo (123-127).

1.6 Técnicas de caracterização de modificações cristalinas de fármacos

Certas técnicas de caracterização no estado sólido são freqüentemente empregadas para identificação e elucidação estrutural em sólidos farmacêuticos (128). Entre elas, podemos citar técnicas microscópicas, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV), as quais permitem a descrição do hábito cristalino, fornecendo informações morfológicas valiosas para a triagem de modificações cristalinas (129,130), técnicas térmicas por calorimetria exploratória diferencial (CED) e termogravimetria (TG) (131,132), técnicas espectroscópicas por absorção na região do infravermelho (IV) (133), espalhamento Raman (134), e ressonância magnética nuclear (RMN) (135), e técnicas cristalográficas por DRX (136,137).

As técnicas de análises térmicas distinguem modificações cristalinas com base nas transições de fase que sofrem durante alteração da temperatura (131,132). Tais técnicas fornecem informações adicionais com respeito a estas transições de fase, como o ponto de fusão, dessolvatação, cristalização e transição vítrea (131). A técnica de CED permite a quantificação da energia absorvida ou liberada pela amostra quando esta é aquecida, resfriada ou mantida em temperatura constante. A técnica de TG permite mensurar a perda de massa em função da temperatura (132). Termogramas por CED e TG podem ser correlacionados e exibem diferenças no comportamento térmico de modificações cristalinas, sendo úteis para estabelecimento de relações estruturais e energéticas, assim como para a diferenciação e identificação de modificações cristalinas de fármacos (138,139).

Técnicas térmicas também podem ser empregadas para determinar a estabilidade relativa entre polimorfos e diferenciar sistemas enantiotrópicos e monotrópicos (8,29).

Quando a forma cristalina sofre uma transição de fase reversível, tem-se uma relação enantiotrópica. No caso de uma transição irreversível, a relação é dita monotrópica (8).

A espectroscopia de estado sólido (absorção no IV, espalhamento Raman e RMN) tem tornado-se parte integral das técnicas físicas de caracterização de sólidos farmacêuticos. As técnicas espectroscópicas de absorção no IV e espalhamento Raman exploram os modos vibracionais das moléculas (133,134). Bandas de absorção ou espalhamento da radiação na região do IV podem ser atribuídas a grupos funcionais e à conformação molecular, sendo, portanto, úteis na caracterização estrutural de modificações cristalinas de fármacos (133,134). Espectros vibracionais de absorção no IV e espalhamento Raman são impressões digitais das formas sólidas, permitindo a caracterização e distinção de modificações cristalinas de fármacos. A espectroscopia vibracional é também importante para caracterizar solvatos isoestruturais e dessolvatos isomórficos, para os quais as técnicas de difração indicam somente mudanças sutis na ordem de longo alcance (8,29). Ambas as técnicas oferecem informações sobre a estrutura e conformação molecular do sólido, e a comparação com os espectros de RMN no estado sólido auxilia a compreensão das mudanças conformacionais ocorridas durante as transições de fase (133-135).

Uma das técnicas mais apropriadas para diferenciar formas cristalinas são as técnicas de DRX por pó (DRXP) e por monocristal (DRXM) (136,137). A análise dos difratogramas obtidos nos experimentos de DRX permite distinguir os diferentes arranjos dos átomos nos sólidos. Através da DRXM é possível determinar a estrutura de moléculas dentro da rede cristalina, fornecendo uma informação essencial sobre a modificação cristalina, uma vez que o critério que define a existência do polimorfismo é a demonstração de estruturas não equivalentes nas redes cristalinas (1). Um fator limitante desta técnica é a necessidade de amostra em forma monocristalina adequada. A DRXP é outra poderosa técnica apropriada para distinguir fases cristalinas com diferentes propriedades estruturais (137). Diferente da DRXM, a amostra pode estar na forma de um material policristalino (pó), o qual é constituído de cristalitos de dimensões entre 1 e 10 μm (140). Em alguns casos favoráveis é possível determinar parâmetros da cela unitária e o grupo espacial bem como a determinação da estrutura molecular (141). A técnica de DRXP também pode ser usada para determinação do grau de cristalinidade, análise quantitativa das fases nos sólidos polimórficos e cinética das reações no estado sólido (142).

Uma vez que a principal técnica estrutural utilizada neste trabalho foi a DRXM, uma breve abordagem sobre a análise de DRX será apresentada no Apêndice.

1.7 Objetivos

O objetivo principal desta tese de doutorado foi preparar novas modificações cristalinas de fármacos antirretrovirais INTR e determinar suas estruturas no estado sólido por DRXM. Tal objetivo é justificado considerando que a eficácia de um fármaco está relacionada às suas propriedades de estado sólido, como a solubilidade aquosa, a qual pode ser alterada através da modificação de estruturas no estado sólido. Portanto, o perfil farmacológico pode ser aperfeiçoado através da alteração da estrutura cristalina de um fármaco. Neste sentido, o aumento da solubilidade de um fármaco pode ser necessário para alcançar um perfil farmacológico adequado. Modificações cristalinas em que os fármacos estão em suas formas dissociadas (saís) se revelam promissoras para este propósito.

Os INTR são fármacos antirretrovirais de primeira escolha para a terapia anti-VIH. Lamivudina é um dos principais insumos farmacêuticos ativos disponíveis para a terapia contra os retrovírus VIH e VHB. Até mesmo pela sua importância clínica, o comportamento de lamivudina no estado sólido vem sendo mais bem investigado. Sete modificações cristalinas deste fármaco são conhecidas e já tiveram suas estruturas cristalográficas determinadas (95,98-100). Baseado no conhecimento das características estruturais destas fases sólidas, estratégias de planejamento racional de modificações cristalinas podem ser delineadas. A engenharia de cristais moleculares não só direciona a obtenção de modificações cristalinas como também viabiliza a predição e compreensão de propriedades de estado sólido com base em relações estruturais.

Em uma das modificações cristalinas de lamivudina conhecidas, este fármaco demonstrou um comportamento estrutural notável. Na estrutura cristalina do 3,5-dinitrossalicilato hidratado de lamivudina, moléculas do fármaco estão pareadas através de seus fragmentos de citosina em um padrão de três ligações de hidrogênio similar àsquelas responsáveis pelo pareamento entre dois resíduos hemiprotonados de citidina que ocorre em estruturas de *i*-ADN (123). Esta similaridade estrutural embasa a estratégia de engenharia de modificações cristalinas de lamivudina em que os pares do fármaco pudessem ser sobrepostos helicoidalmente. Além de serem novas fases cristalinas deste importante fármaco com propriedades de estado sólido características, tais estruturas implicariam diretamente sobre os conceitos de estruturação de ácidos nucleicos.

Outro fármaco usado na terapia antirretroviral cujas caracterizações no estado sólido e, principalmente, estudos cristalográficos são escassos é zalcitabina (89,90). Somente uma fase

cristalina é conhecida, inexistindo informações sobre a ocorrência de demais polimorfos e modificações cristalinas.

Por sua vez, didanosina é um INTR com importância terapêutica que apresenta características desfavoráveis de solubilidade aquosa e baixa biodisponibilidade associada. Neste sentido, a solubilidade deste fármaco pode ser aumentada através da alteração de sua estrutura cristalina. Vale ressaltar que nenhuma estrutura cristalina deste fármaco é conhecida apesar de três fases sólidas serem reportadas na literatura (81,83,85). O conhecimento de relações estruturais poderia contribuir para a compreensão das propriedades de estado sólido de didanosina, direcionando estratégias de engenharia de cristais visando melhorar a solubilidade deste fármaco.

Por estas razões, experimentos destinados ao preparo e determinação estrutural de novas modificações cristalinas destes três fármacos são justificados. Em adição, a obtenção de novas modificações cristalinas destes fármacos e o estabelecimento de suas relações estruturais contribuirão para a compreensão das interações químicas que governam suas organizações supramoleculares no estado sólido. Considerando que estes fármacos são nucleosídeos, informações acerca da arquitetura supramolecular destes fármacos poderão ser úteis para o entendimento sobre a estruturação de ácidos nucleicos.

Também foi um objetivo caracterizar as modificações cristalinas preparadas usando as técnicas estruturais e térmicas para análise de sólidos farmacêuticos, como MEV, DRXP, espectroscopia vibracional no IV e de Raman, CED e TG. Poucos trabalhos aproveitam a complementaridade oferecida por estas técnicas quando utilizadas em conjunto, sendo que na maioria das vezes são reportados estudos lidando isoladamente com técnicas cristalográficas, espectroscópicas ou térmicas. Esta falta de relacionamento entre caracterizações provenientes de técnicas diferentes é ainda maior quando nos voltamos para o aspecto relacionado às especificações farmacêuticas para fases sólidas de fármacos. O uso de todas as técnicas supramencionadas propicia uma interpretação coesiva das relações estruturais ocorrendo dentro do sólido, fortalecendo as determinações inferidas através de cada técnica individualmente, além de fornecer uma gama de informações analíticas para a identificação e controle de qualidade das formas sólidas dos fármacos. Com o objetivo de avaliar a alteração das propriedades de estado sólido relacionadas à eficácia de lamivudina, importante fármaco para o tratamento das infecções por VIH e VHB, as solubilidades no equilíbrio das suas modificações cristalinas preparadas como sólidos monofásicos foram determinadas e correlacionadas às suas características estruturais e termoquímicas.

No capítulo seguinte (Capítulo 2) são descritos os procedimentos que levaram à preparação de nove novas modificações cristalinas de lamivudina, zalcitabina e didanosina, as condições experimentais e os procedimentos cristalográficos das determinações estruturais por DRXM. As nove modificações cristalinas tiveram suas estruturas determinadas por DRXM. Em adição, parte das modificações cristalinas foi caracterizada por outras técnicas, a saber, MEV, DRXP, espectroscopia vibracional no IV e de Raman, CED e TG. As modificações cristalinas de lamivudina preparadas como sólidos monofásicos foram avaliadas quanto às recuperações do fármaco por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Suas solubilidades aquosas no equilíbrio também foram determinadas. Neste capítulo são apresentadas todas as condições analíticas e instrumentais referentes às estas outras técnicas e ensaios.

No Capítulo 3 são apresentados os resultados e discussões sobre as caracterizações (DRXM, DRXP, MEV, IV, Raman, CED e TG) e solubilidades de duas modificações cristalinas de lamivudina. Estas duas fases sólidas, um cloridrato de lamivudina e um cloridrato monoidratado de lamivudina, são sais mais solúveis em água que a forma sólida do fármaco incorporada em formulações farmacêuticas (forma II).

No Capítulo 4 são apresentados os resultados e discussões sobre as caracterizações (DRXM, DRXP, MEV, IV, Raman, CED e TG) e solubilidade de uma modificação cristalina de lamivudina. Esta fase sólida, um maleato de lamivudina, foi planejada com base no reconhecimento de características químico-estruturais responsáveis por arquitetar uma modificação cristalina conhecida de lamivudina (sacarinato de lamivudina) (100). O preparo deste maleato de lamivudina representa um exemplo de uma estratégia bem sucedida de engenharia de cristais moleculares. O maleato de lamivudina é menos solúvel em água que a forma II do fármaco. Esta menor solubilidade do maleato de lamivudina está de acordo com a estratégia de planejamento racional baseada na estrutura do sacarinato de lamivudina, uma vez que esta última forma sólida também é pouco solúvel em água.

No Capítulo 5 são apresentados os resultados e discussões sobre as caracterizações (DRXM) de três modificações cristalinas de lamivudina. Nestas três modificações cristalinas de lamivudina, estruturas supramoleculares são caracterizadas pelo pareamento entre moléculas do fármaco e sobreposição destes pares. Em duas destas, um 0,67-hidrato de lamivudina com topologia “hexagrama” e um sal de lamivudina contendo como contra-íons ânions cloreto e maleato, além de moléculas de solventes (água e isopropanol), há sobreposição helicoidal dos pares, caracterizando dois variantes de dupla hélice de nucleosídeos. Em outra fase cristalina, um hemiclорidrato hemidratado de lamivudina, não há

sobreposição helicoidal dos pares. As características estruturais destas modificações cristalinas relacionadas à organização de estruturas de ácidos nucleicos também são discutidas neste capítulo. Em adição, a duplex de lamivudina contendo ânions cloreto e maleato, e moléculas de solventes, foi caracterizada por DRXP, MEV, IV, Raman e CED e teve sua solubilidade aquosa determinada, a qual é muito maior que aquela da forma II do fármaco.

No Capítulo 6 são apresentados os resultados e discussões sobre a caracterização por DRXM de duas modificações cristalinas de zalcitabina. Uma destas, um cloridrato de zalcitabina, é isoestrutural à outra modificação cristalina preparada neste trabalho, o cloridrato de lamivudina. Esta similaridade estrutural denota a habilidade de moléculas quimicamente relacionadas para estruturar arranjos supramoleculares equivalentes, o que pode ser constatado também pelo caráter isoestrutural da forma II de lamivudina em relação à fase cristalina conhecida de zalcitabina. A outra modificação cristalina é caracterizada pela co-cristalização de lamivudina e zalcitabina na forma de um cloridrato, onde ambos os fármacos estão protonados. O preparo desta fase sólida representa um exemplo de uma estratégia combinatória de engenharia de cristais moleculares de dois fármacos, onde a solubilidade de ambos pode estar aumentada em relação às respectivas fases sólidas formadas pelos fármacos neutros. Em adição, o cloridrato de zalcitabina foi também caracterizado por MEV, IV e Raman.

No capítulo 7 são apresentados os resultados e discussões sobre as caracterizações (DRXM, DRXP, MEV, IV, Raman, CED e TG) de uma modificação cristalina de didanosina. Esta modificação cristalina é um hidrato não estequiométrico do fármaco que acomoda uma fração de água dentro de canais hidrofóbicos formados na estrutura. Esta fase sólida apresenta a mesma estrutura cristalina da forma comercial do fármaco, embora os conteúdos de água alojados nestes canais sejam diferentes. Esta é a primeira determinação estrutural deste fármaco e um exemplo de emprego de um procedimento solvotérmico para o preparo de modificações cristalinas de fármacos.

O capítulo 8 encerra as conclusões gerais desta tese, as quais são sucedidas pelas referências bibliográficas citadas.

No Apêndice, uma revisão sobre a técnica de DRXM é apresentada.

Por fim, a produção científica relevante relacionada a esta tese é listada nos Anexos, onde três artigos publicados referentes à parte dos resultados descritos nos Capítulos 4, 5 e 7 estão também presentes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e amostras dos fármacos

Os solventes utilizados foram água deionizada (sistema de purificação Milli-Q, Millipore Corp.), isopropanol (grau analítico P.A., Qhemis®) e ácido clorídrico (grau analítico P.A., Vetec®). O agente formador de sal foi ácido maléico (500 g, grau de síntese P.S., Vetec®, lote 0706920, validade 10/2011). Os fármacos foram zalcitabina (25 mg, grau para CLAE, Sigma-Aldrich®, lote 23207045, validade 05/2011), lamivudina (2,5 g, 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) e didanosina (2,5 g, Farmanguinhos-FIOCRUZ, pureza de $99,40 \pm 0,08$ mol% e temperatura de fusão $160,6 \pm 0,4$ °C de acordo com a especificação ASTM E928). Na figura 1 são mostradas as estruturas químicas dos fármacos e do agente formador do sal.

Figura 1 – Estruturas químicas de lamivudina, zalcitabina, didanosina e ácido maléico.

Uma vez que não havia informação referente à fase polimórfica dos fármacos, as amostras de zalcitabina, lamivudina e didanosina foram analisadas antes de serem empregadas nos ensaios destinados ao preparo das modificações cristalinas.

Cristais de zalcitabina e lamivudina tiveram suas celas unitárias cristalográficas determinadas por DRXM. A seleção de cristais apropriados para o experimento de DRXM foi feita utilizando um microscópio de polarização (Olympus®). Primeiramente, aspectos

morfológicos foram considerados na triagem dos cristais. Cristais medindo no mínimo 0,05 mm em sua menor dimensão eram selecionados. Outra característica importante usada como critério para seleção dos cristais foi a ausência de fragmentação. Cristais com faces e arestas definidas eram também escolhidos, embora este não fosse um critério para exclusão dos espécimes cristalinos. Uma vez selecionados monocristais com dimensões adequadas e desprovidos de fragmentação, estes cristais eram destinados ao experimento de DRXM se suas aparências variassem uniformemente em função da alteração rotacional da polarização da luz em 90°. Cristais geminados, ou seja, com dois ou mais fragmentos com diferentes orientações, não exibem aparências uniformes quando a polarização da luz é alterada. Entretanto, a evidência cabal que um cristal apresentava somente uma orientação interna e, portanto, era adequado para o experimento cristalográfico advinha do seu padrão de DRX. Antes da determinação da cela unitária de um cristal, uma primeira imagem de DRX era coletada durante um tempo de exposição ao feixe de raios X de 40 s sob rotação de 1° em ϕ . Se as reflexões fossem caracterizadas por pontos únicos e bem definidos, sem pontos secundários, dispersão difusa ou traços conectados a eles, o cristal era considerado adequado para o experimento de DRXM. Nos experimentos de determinação de celas unitárias de zalcitabina e lamivudina para identificação das suas fases sólidas correspondentes, pelo menos três cristais de cada fármaco foram submetidos ao experimento de DRXM para determinação de suas constantes de cela.

Em ambos os casos, foram coletadas dez imagens de DRX em um difratômetro Kappa-CCD (Enraf-Nonius®) equipado com uma câmera CCD (*Charge-Coupled Device*) de 95 mm como detector e geometria angular κ , usando radiação de um tubo selado de Mo (MoK α monocromada por grafite, $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) gerada a 60 kV e 33 mA. A aquisição das imagens de DRX foi realizada com auxílio do programa COLLECT (143). Cada imagem foi adquirida durante um tempo de exposição ao feixe de raios X de 40 s sob rotação de 1° em ϕ .

Dez imagens de DRX foram obtidas para os cristais de zalcitabina e usados para indexar uma cela unitária cristalográfica cujos parâmetros foram similares àqueles da forma tetragonal conhecida do fármaco (89,90). A cela unitária foi indexada com auxílio dos programas embutidos no conjunto de programas HKL Denzo-Scalepack (144). Devido à reduzida quantidade de amostra disponível deste fármaco, a caracterização por DRXP não foi possível. Com base na determinação da cela unitária por DRXM, foi possível concluir que a fase sólida conhecida de zalcitabina compunha a amostra do fármaco. Os parâmetros de cela unitária dos espécimes de lamivudina foram indexados usando também dez imagens de DRX,

parâmetros estes remetentes àqueles reportados para a forma II de lamivudina (95). O difratograma de raios X por pó da amostra de lamivudina foi composto por reflexões de Bragg em posições 2θ características das reflexões de Bragg simuladas com a estrutura cristalina da forma II do fármaco, conforme mostrado na Figura 2 (95). As condições analíticas e instrumentais usadas na aquisição dos difratogramas de raios X por pó e os procedimentos para as simulações dos difratogramas teóricos correspondentes são descritos na seção 2.5. Baseado nas comparações entre os parâmetros de cela unitária e os difratogramas de raios X por pó, foi possível concluir que a amostra de lamivudina era composta pela forma II do fármaco.

Figura 2 - Comparação entre o padrão teórico de DRX simulado com a estrutura cristalina da forma II de lamivudina (linhas verticais vermelhas) e o difratograma experimental da amostra de lamivudina usada para preparar as modificações cristalinas deste fármaco (linha contínua através dos pontos experimentais).

A amostra de didanosina foi constituída de cristalitos de dimensões inadequadas para um experimento de DRXM. Por esta razão, a amostra deste fármaco foi somente caracterizada através da técnica de DRXP. O difratograma de raios X por pó da amostra de didanosina, conforme mostrado na seção 7.3, foi similar ao difratograma correspondente da forma comercial do fármaco (81,83). Portanto, foi possível concluir que a amostra de didanosina apresentava a forma cristalina do fármaco incorporada em formulações terapêuticas.

2.2 Preparo das modificações cristalinas

As massas dos fármacos e do ácido maléico foram devidamente pesadas em balanças analíticas, assim como volumes de solventes e soluções foram aferidos com auxílio de pipetas graduadas convencionais. Pipetas automáticas foram utilizadas para aferir volumes inferiores

a um mililitro. As matrizes de cristalização foram acondicionadas em recipientes cilíndricos de vidro medindo cinco centímetros de altura por um centímetro e meio de diâmetro. Os frascos não foram vedados durante o período de repouso. As modificações cristalinas foram preparadas através dos procedimentos descritos a seguir e ilustrados na Figura 3.

2.2.1 Cloridrato de lamivudina

O preparo de cristais do cloridrato de lamivudina envolveu os seguintes procedimentos:

- 1) Dissolução de lamivudina (10 mg, 0,04 mmol) em álcool isopropílico (5 mL) à temperatura de 45 °C, sob agitação, por 5 minutos;
- 2) Repouso da solução por 10 minutos à temperatura ambiente;
- 3) Adição de 250 µL de uma solução aquosa de ácido clorídrico a 1% (m/vol) à solução de lamivudina preparada em 1), sob agitação;
- 4) Repouso da solução à temperatura ambiente até completa evaporação da matriz solvente.

2.2.2 Cloridrato monoidratado de lamivudina

O preparo de cristais do cloridrato monoidratado de lamivudina envolveu as mesmas etapas descritas na seção 2.2.1, exceto pelo procedimento:

- 1) Dissolução de lamivudina (10 mg, 0,04 mmol) em água deionizada (5 mL) à temperatura de 40 °C, sob agitação, por 5 minutos.

2.2.3 Maleato de lamivudina

Cristais do maleato de lamivudina foram preparados através dos procedimentos descritos na seção 2.2.1, exceto pela etapa:

- 3) Adição de ácido maléico (5 mg 0,04 mmol) à solução de lamivudina preparada em 1), seguido por agitação da mistura até dissolução completa do agente formador do sal.

Figura 3 – Procedimentos utilizados para o preparo das modificações cristalinas.

2.2.4 Hemicloridrato hemidratado de lamivudina

Procedimentos similares àqueles descritos na seção 2.2.1 conduziram à obtenção de cristais do hemicloridrato hemidratado de lamivudina, exceto pela etapa:

3) Adição de 100 μL de uma solução aquosa de ácido clorídrico a 1% (m/vol) à solução de lamivudina preparada em 1), sob agitação.

2.2.5 0,67-Hidrato de lamivudina

Cristais do 0,67-hidrato de lamivudina com topologia “Hexagrama” foram obtidos juntamente com cristais do hemicloridrato hemidratado de lamivudina, sendo que o hábito destas duas modificações cristalinas permitiu a identificação e isolamento de ambas as fases sólidas de um mesmo sistema de cristalização. O hemicloridrato hemidratado de lamivudina cristalizou na forma de placas delgadas, enquanto que o 0,67-hidrato de lamivudina cristalizou como primas hexagonais.

2.2.6 Dupla hélice de lamivudina

Cristais da dupla hélice de lamivudina foram preparados procedendo da mesma forma relatada na seção 2.2.1, exceto pela etapa:

3) Adição de 250 μL de uma solução de ácido maléico, processada através da dissolução de 4 mg desse ácido orgânico em 1 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico a 1% (m/vol), à solução de lamivudina preparada em 1), sob agitação.

2.2.7 Cloridrato de zalcitabina

Cristais do cloridrato de zalcitabina foram obtidos após realização das etapas descritas na seção 2.2.1, exceto pelo procedimento:

1) Dissolução de zalcitabina (10 mg, 0,04 mmol) em álcool isopropílico (5 mL) à temperatura de 45 °C, sob agitação, por 5 minutos.

2.2.8 Cloridrato de zalcitabina e lamivudina

Os mesmos procedimentos apresentados na seção 2.2.1 renderam cristais do cloridrato de zalcitabina e lamivudina, exceto pelo procedimento:

1) Dissolução de zalcitabina (5 mg, 0,023 mmol) e lamivudina (5 mg, 0,022 mmol) em álcool isopropílico (5 mL) à temperatura de 45 °C, sob agitação, por 5 minutos.

2.2.9 Hidrato de didanosina

Cristais do hidrato de didanosina foram preparadas através dos seguintes procedimentos:

1) Dissolução de didanosina (1 mg, 0,004 mol) em isopropanol (5 mL) à temperatura ambiente sob agitação, por 5 minutos;

2) Aquecimento da solução à temperatura de 100 °C durante 12 horas em uma autoclave de aço inoxidável na qual se encaixa um recipiente de teflon, conforme mostrado na Figura 4;

3) Resfriamento lento até a temperatura ambiente, quando, então, agregados cristalinos de placas extremamente finas foram observados antes mesmo da evaporação do solvente;

4) Repouso da solução à temperatura ambiente até evaporação completa do solvente.

Figura 4 - Autoclave utilizada para a preparação solvotérmica de cristais do hidrato de didanosina. Em destaque é mostrado o recipiente de teflon que se encaixa no sulco torneado da autoclave de aço inoxidável.

Quantidades entre 1 e 14 mg das modificações cristalinas puderam ser isoladas executando os procedimentos descritos nesta seção. Para preparar maiores quantidades, as condições e métodos desenvolvidos foram repetidos. Antes do agrupamento dos materiais cristalinos obtidos de diferentes repetições, a fim de obter quantidades suficientes para as caracterizações pelas técnicas estruturais e térmicas de análise no estado sólido e ensaios de recuperação e solubilidade, três monocristais de cada frasco foram selecionados e tiveram suas celas unitárias cristalográficas determinadas por DRXM. Caso as constantes de cela unitária destes cristais fossem concordantes com os valores determinados para as estruturas das modificações cristalinas em questão, a homogeneidade do material em termos de hábito cristalino era inspecionada usando um microscópio de polarização, conforme descrito na seção 2.1. Uma vez que a amostra fosse considerada morfologicamente homogênea, os materiais cristalinos de diferentes repetições eram então agrupados.

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a caracterização microscópica das modificações cristalinas preparadas, cristais foram assentados em bases metálicas revestidas com fitas adesivas de carbono condutivo, seguido da deposição de uma camada delgada de 20 nm de ouro coloidal usando um equipamento SCD-040 Ion Sputter Balzer. As micrografias eletrônicas dos cristais foram capturadas em um microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP a uma voltagem de 20 kV e distância de 16 mm.

2.4 Difração de raios X por monocristal (DRXM)

Os dados completos para determinação estrutural das modificações cristalinas preparadas foram coletados à temperatura de 150 K. No caso do experimento de DRXM para determinação da estrutura do maleato de lamivudina, a coleta foi conduzida à temperatura de 100(2) K devido à determinação da estrutura do sacarinato de lamivudina ter sido conduzida a esta temperatura. Vale ressaltar que o maleato de lamivudina foi planejado através do reconhecimento de características estruturais do sacarinato de lamivudina. Portanto, a comparação entre as geometrias intramoleculares e intermoleculares destes sais não apenas reforçaria a aplicabilidade da estratégia de engenharia de cristais utilizada como também revelaria diferenças estruturais entre estas modificações cristalinas, as quais poderiam então

ser correlacionadas às suas propriedades de estado sólido e às estruturas dos agentes formadores dos sais. Uma vez que as geometrias intramoleculares e intermoleculares variam com a temperatura, as comparações entre estas características só seriam válidas se a determinação do maleato de lamivudina fosse conduzida sobre dados de DRXM coletados à mesma temperatura em que a estrutura do sacarinato de lamivudina foi determinada. A estrutura do hidrato de didanosina também foi determinada à temperatura de 100 K devido às pequenas dimensões dos cristais obtidos, sendo que reflexões de Bragg desta modificação cristalina foram intensificadas a esta temperatura. Adicionalmente, as estruturas do cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina, maleato de lamivudina e cloridrato de zalcitabina foram determinadas à temperatura ambiente (298 K). Tais experimentos às temperaturas baixa e ambiente demonstraram que não há transições de fase cristalina entre as faixas de temperatura avaliadas, embora ocorra contrações esperadas de celas unitárias cristalográficas. Tais contrações são reflexos das aproximações intermoleculares dentro das redes cristalinas quando expostas à baixa temperatura.

A ausência de transições estruturais entre as temperaturas baixa e ambiente também foi comprovada para as outras modificações cristalinas que não tiveram suas estruturas determinadas à temperatura ambiente, uma vez que suas celas unitárias puderam ser determinadas à temperatura de 298 K. A baixa qualidade e pequenas dimensões dos cristais do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina, cloridrato de zalcitabina e lamivudina e hidrato de didanosina inviabilizaram a coleta à temperatura ambiente de reflexões de média resolução intensas suficientes para a determinação estrutural satisfatória de pequenas moléculas. Os experimentos realizados à temperatura ambiente com cristais do 0,67-hidrato de lamivudina e da dupla hélice de lamivudina permitiram as coletas de dados completos, os quais, após serem devidamente tratados, foram utilizados para a resolução e refinamento de estruturas com múltiplos sítios de ocupação para átomos individuais. Os refinamentos destas estruturas foram instáveis e não convergiram satisfatoriamente, com valores médios das razões entre as oscilações nos parâmetros refinados e os seus desvios padrões maiores que 0,1. Altas correlações ($>0,8$) entre os parâmetros refinados foram observadas. Com o abaixamento da temperatura, os múltiplos sítios de ocupação de um mesmo átomo foram mais bem discernidos, com valores de correlações entre parâmetros refinados e fatores residuais mais baixos. Portanto, as determinações estruturais destas duas modificações cristalinas foram realizadas usando somente os dados coletados à baixa temperatura, embora fora possível concluir que o 0,67-hidrato de lamivudina e a dupla hélice de lamivudina não exibam transições de fase cristalina entre as temperaturas de 298 K e 150 K.

Para os experimentos de DRXM, os cristais foram selecionados e tiveram suas celas unitárias determinadas conforme descrito na seção 2.1 para as amostras dos fármacos utilizadas para preparar as modificações cristalinas. Após indexação das celas unitárias usando o conjunto de programas HKL Denzo-Scalepack (144), a configuração angular do difratômetro Kappa-CCD (Enraf-Nonius®) descrito na seção 2.1 foi calculada assumindo liberdade dos eixos ϕ e ω , com o eixo κ fixo, usando o programa COLLECT (143). As reflexões foram coletadas com uma multiplicidade compreendida entre 3 e 4, e o tempo de exposição ao feixe de raios X variou entre 60 e 240 segundos por grau de rotação em ϕ , dependendo da intensidade difratada a médios ângulos. Após a coleta dos dados completos, as reflexões foram indexadas, integradas e corrigidas por fatores de escala físicos e geométricos, e cristalográficos, devido às equivalências por simetria. Para estes propósitos, o programa HKL Denzo-Scalepack foi utilizado (144). Para abaixamento e manutenção da temperatura, um soprador de nitrogênio (Oxford Cryosystem®) foi empregado.

Os métodos diretos foram utilizados para resolver as estruturas usando os programas SHELXS-97 (145), SIR92 (146) e SIR2004 (147). Nas soluções obtidas, os átomos não hidrogenóides foram localizados em mapas de densidade eletrônica calculados por síntese de Fourier usando os mesmos programas anteriores. A estrutura foi refinada usando o programa SHELXL-97 (148). O método dos mínimos quadrados de matriz completa foi utilizado para todos os ciclos de refinamentos da estrutura, e as diferenças entre os fatores de estrutura observados e calculados, em F^2 , foram minimizados. Estes programas foram acessados por meio da interface de programas de cristalografia WinGX (149).

Parâmetros anisotrópicos de deslocamento térmico foram refinados para os átomos não hidrogenóides, exceto para alguns átomos desordenados da estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina. Assim, os átomos de carbono e oxigênio dos grupos oxatiolano e 5'-CH₂OH de uma das três moléculas cristalograficamente independentes, a qual está desordenada em duas orientações com fatores de ocupação de 50% cada, e as frações do átomo de oxigênio hidroxílico de outra molécula do fármaco presente na unidade assimétrica do 0,67-hidrato de lamivudina foram refinados isotropicamente.

Parâmetros isotrópicos de deslocamento térmico foram adotados para todos os átomos de hidrogênio. Seus parâmetros de deslocamento térmico não foram refinados, sendo considerados iguais aos parâmetros isotrópicos equivalentes dos átomos aos quais foram ligados somados de 20% deste valor, no caso de serem ligados a átomos de carbono do tipo CH ou CH₂ e nitrogênio, ou 50%, caso os átomos de hidrogênio estivessem ligados a átomos

de oxigênio ou átomos de carbono de grupos CH_3 do solvente isopropanol cristalizado na estrutura da dupla hélice de lamivudina.

Ânions cloreto estão presentes nas estruturas do cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina, hemicloridrato hemidratado de lamivudina, dupla hélice de lamivudina, cloridrato de zalcitabina e cloridrato de zalcitabina e lamivudina. Este ânion absorve raios X em frações maiores que átomos leves como oxigênio, nitrogênio, carbono e hidrogênio (150). Portanto, o método tipo Gaussian de estimativa dos fatores de transmissão e correção por absorção dos dados de DRX foi utilizado no processamento das intensidades provenientes destas estruturas (151). Este procedimento foi aplicado também com a estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina na tentativa de melhorar a qualidade dos dados de DRX. Nesta última modificação cristalina, ânions cloreto não foram presentes, embora o átomo de enxofre de lamivudina absorva raios X em proporções que justificam a correção por absorção. Após a correção das intensidades de DRX do 0,67-hidrato de lamivudina, fatores residuais aceitáveis foram alcançados. Em todos os casos que correções por absorção foram aplicadas aos fatores de estrutura, as estruturas foram refinadas e as estatísticas do refinamento foram expressas baseadas nos dados corrigidos.

A presença de átomos com número atômico maior que aquele do silício, o enxofre e o cloro, em estruturas não centrossimétricas de todas as modificações cristalinas, permitiu o refinamento do parâmetro de Flack (152). Refinando-se este parâmetro com base nos pares de Friedel coletados, os quais, nestes casos, violam a Lei de Friedel, as configurações absolutas *R* e *S* dos carbonos C1' e C4' de zalcitabina e *S* e *R* dos respectivos átomos de lamivudina foram determinadas e concordantes com a quiralidade dos respectivos fármacos. No caso da estrutura do hidrato de didanosina, o parâmetro de Flack não foi refinado devido à inexistência de átomos com $Z > Z(\text{Si})$. Neste caso, a configuração *R* e *S* dos carbonos C1' e C4' de didanosina foi assumida conhecendo de antemão a estereoquímica deste fármaco.

As posições dos átomos de hidrogênio receberam diferentes tratamentos. Em todas as estruturas, átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono não tiveram seus parâmetros posicionais refinados. Eles foram posicionados com distâncias interatômicas idealizadas e fixas em relação aos átomos aos quais foram ligados covalentemente. Suas coordenadas fracionárias acompanharam os desvios nos parâmetros posicionais refinados dos respectivos átomos de carbono obedecendo às separações interatômicas assumidas usando o programa SHELXL-97 (148).

Os átomos de hidrogênio ligados a átomos de oxigênio e nitrogênio foram localizados em mapas de densidade eletrônica calculados através de síntese de Fourier por diferença.

Após identificar picos de densidade eletrônica correspondentes aos átomos de hidrogênio, suas posições foram definidas como segue:

1) Atribuição das coordenadas fracionárias de picos de densidade eletrônica aos átomos de hidrogênio O—H dentro de grupos hidroxílicos de lamivudina, zalcitabina, didanosina e hidrogenomaleato presentes nas estruturas do cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina, maleato de lamivudina, cloridrato de zalcitabina e hidrato de didanosina, refinando-se livremente seus parâmetros posicionais. Nestas mesmas estruturas, átomos de hidrogênio N—H dentro de fragmentos de citosina e hipoxantina e $N^+—H$ de citosinas protonadas e átomos de hidrogênio da molécula de água foram refinados conforme descrito para os átomos de hidrogênio hidroxílicos;

2) Posicionamento dos átomos de hidrogênio hidroxílicos, amínicos e prótons imínicos das espécies de lamivudina, zalcitabina, hidrogenomaleato e isopropanol presentes nas estruturas do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina, 0,67-hidrato de lamivudina, dupla hélice de lamivudina e cloridrato de zalcitabina e lamivudina. Similar ao descrito para átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono, distâncias interatômicas idealizadas governaram as posições destes átomos de hidrogênio, embora os picos de densidade eletrônica referentes a estes átomos tenham sido devidamente identificados nos mapas de densidade eletrônica por diferença e foram concordantes com as posições calculadas. Nestes casos, as coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio não foram refinadas;

3) Atribuição dos parâmetros posicionais de picos de densidade eletrônica às coordenadas dos átomos de hidrogênio das moléculas de água do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina, 0,67-hidrato de lamivudina e dupla hélice de lamivudina, sem refinamento dos parâmetros posicionais.

As estruturas de três modificações cristalinas preparadas apresentaram átomos desordenados em dois sítios diferentes de ocupação. A dupla hélice de lamivudina foi composta por oito moléculas cristalograficamente independentes do fármaco, as quais foram rotuladas com letras compreendidas entre A e H. Os rótulos dos átomos de lamivudina nesta estrutura foram encerrados com letras que remetem a cada uma das oito moléculas. Cinco das oito moléculas do fármaco na unidade assimétrica da dupla hélice de lamivudina apresentaram desordens. Dois sítios de ocupações fixas de 60% e 40% foram assumidos para os átomos de oxigênio e de hidrogênio dos grupos hidroxílicos de quatro moléculas de lamivudina (rotuladas como B, D, E, F). Assim, as frações dos átomos dos grupos hidroxílicos as nos sítios de ocupação 60% foram rotuladas O5'b—H5'Ob, O5'd—H5'Od, O5'e—H5'Oe e O5'f—H5'Of, enquanto que as frações atômicas correspondentes nos sítios

de ocupação 40% foram nomeadas O5'b'—H5'Ob', O5'd'—H5'Od', O5'e'—H5'Oe' e O5'f'—H5'Of'. Os valores de ocupação foram previamente determinados através de ciclos de refinamento realizados unicamente para estimar a ocupação exata de cada sítio. Neste refinamento, os parâmetros térmicos dos átomos de oxigênio foram adotados como isotrópicos e não foram refinados, enquanto que a ocupação de cada sítio foi refinada. As ocupações dos átomos hidroxílicos de hidrogênio foram forçadas a serem iguais àsquelas dos oxigênios aos quais os hidrogênios foram ligados covalentemente.

Após a determinação do valor de ocupação dos múltiplos sítios, tal parâmetro foi fixo conforme estimado e os parâmetros térmicos dos átomos de oxigênio hidroxílicos das moléculas em questão foram refinados adotando o modelo anisotrópico de vibração. Os átomos de carbono destes grupos não revelaram sítios de ocupação adicionais, até mesmo após a execução de ciclos de refinamento onde uma ocupação de 50% foi atribuída ao único sítio encontrado para estes átomos. Tais refinamentos foram realizados com a finalidade exclusiva de evidenciar possíveis sítios extras para os carbonos metilênicos dos braços 5'-CH₂OH destas moléculas. A inexistência de desordem para a posição deste átomo de carbono se deve ao fato dos oxigênios dos grupos hidroxílicos desordenados ocuparem dois sítios direcionados a duas das três posições variáveis de ligação ao átomo de carbono metilênico, considerando fixas as posições dos átomos de carbono C4' e C5' ao redor da ligação C4'—C5' conectando o braço 5'-CH₂OH ao anel oxatiolano. Ou seja, rotações de 120° sobre o eixo da ligação C4'—C5' posicionam diferentemente os ligantes de C5', com três posições nas quais podem estar diferentes átomos conforme esta rotação. Desta forma, apenas um dos dois átomos de hidrogênio metilênico foi desordenado nestas quatro moléculas. Este átomo ocupa duas posições estereoquímicas, em direção das quais também estão orientados os dois sítios de ocupação do átomo de oxigênio hidroxílico. Portanto, foram considerados dois sítios de ocupação para este átomo de hidrogênio desordenado. Estes sítios foram preenchidos com frações atômicas de hidrogênio com fatores de ocupação iguais àquelas dos sítios dos átomos de oxigênio hidroxílicos situados na outra posição desordenada.

As frações dos átomos de hidrogênio nos sítios de ocupação fixa de 60% receberam rótulos H5'xb, H5'xd, H5'xe e H5'xf. Estas frações atômicas pertencem à mesma conformação das frações hidroxílicas O5'b'—H5'Ob', O5'd'—H5'Od', O5'e'—H5'Oe' e O5'f'—H5'Of', respectivamente. As frações dos átomos de hidrogênio correspondentes com os rótulos H5'zb, H5'zd, H5'ze e H5'zf preencheram os sítios de ocupação fixa de 40%, as quais seguem a conformação descrita pelas frações hidroxílicas O5'b'—H5'Ob', O5'd'—H5'Od', O5'e'—H5'Oe' e O5'f'—H5'Of', respectivamente. Os átomos metilênicos de hidrogênio

rotulados como H5'yb, H5'yd, H5'ye e H5'yf nas moléculas B, D, E e F, respectivamente, foram posicionados em um único sítio de ocupação 100%, pertencendo a ambas as conformações adotadas pelas frações hidroxílicas. Na Figura 5 são ilustradas as orientações atômicas nos grupos 5'-hidroximetilênicos desordenados na estrutura da dupla hélice de lamivudina.

Figura 5 – Modelo de desordem nos braços 5'-hidroximetilênicos de lamivudina observado na dupla hélice de lamivudina e no 0,67-hidrato de lamivudina. Exatamente este arranjo é observado nos confôrmeros B e F da dupla hélice de lamivudina. No confôrmero E as populações estão invertidas entre estas duas conformações, enquanto que no confôrmero D a população predominante exibe a conformação ilustrada da população de 40% e a população secundária mostra seu átomo de oxigênio hidroxílico posicionado em direção ao átomo ilustrado H5'y. O confôrmero B do 0,67-hidrato de lamivudina possui arranjo similar ao ilustrado, exceto pela sua população secundária que possui conformação equivalente àquela da população extra do confôrmero D da dupla hélice de lamivudina. As setas indicam os movimentos rotacionais que levam uma conformação à outra.

Uma das moléculas de lamivudina, rotulada como molécula A, também apresentou átomos desordenados. Nesta molécula, porém, os átomos do anel oxatiolano revelaram possuir múltiplos sítios de ocupação. Foram encontrados dois sítios de ocupação, também com valores de 60% e 40%, para o átomo de enxofre e para os átomos metilênicos vizinhos ao enxofre. Neste caso, tanto o átomo de carbono metilênico quanto os dois átomos de hidrogênio ligados a ele foram modelados como desordenados. Os rótulos S3'a, C2'a, H2'xa e H2'ya foram atribuídos às frações dos átomos de enxofre, carbono e dos dois hidrogênios nos sítios de ocupação 60%. Os rótulos S3'a', C2'a', H2'xa' e H2'ya' aludem às partes dos respectivos átomos nos sítios de ocupação 40%. Os dois grupos metílicos do solvente isopropanol também foram desordenados, e seis sítios de ocupação 50% foram refinados para os três átomos de hidrogênio de cada grupo metílico.

Na estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina com topologia “hexagrama”, uma das três moléculas cristalograficamente independentes de lamivudina exibiu uma desordem orientacional incomum (153,154). Populações estatisticamente iguais de dois confôrmeros similares rotulados como moléculas C e D foram observadas em duas orientações diferentes,

sendo que estes confôrmeros podem ser relacionados por um pseudo-eixo rotacional de segunda ordem. Estas moléculas de lamivudina foram sobrepostas através de suas nucleobases de citosina. As frações dos átomos de carbono C4 e C5 dos fragmentos de citosina de cada um dos confôrmeros C e D se sobrepuseram, assim como as frações dos átomos de nitrogênio N3 e N4 da molécula C se justapuseram exatamente sobre as frações dos átomos de nitrogênio N4 e N3 do confôrmero D, respectivamente. Assim, os carbonos C4 e C5 e nitrogênios N3 e N4 foram posicionados em um único sítio de ocupação 100%, enquanto que cada um dos demais átomos dos dois confôrmeros C e D foi fracionado em dois sítios de ocupação 50%. Esta ocupação de 50% foram aqueles com mais baixa correlação com os parâmetros térmicos refinados dos átomos correspondentes, além de levarem aos valores aceitáveis de índices residuais do refinamento. Não obstante, esta ocupação também foi imposta por equivalências de simetria do grupo espacial considerando que uma molécula unitária do fármaco foi distribuída em duas orientações diferentes. Aqui, os rótulos dos átomos de lamivudina também foram encerrados com letras que correspondem às suas respectivas moléculas cristalograficamente independentes, exceto pelos átomos pertencentes a ambos os confôrmeros sobrepostos C e D. Os átomos C4, C5, N3 e N4 foram rotulados como C4cd, C5cd, N3/4 (nitrogênio endocíclico da molécula C) e N4/3 (nitrogênio endocíclico da molécula D). Na Figura 6 é ilustrado o padrão de sobreposição dos anéis de citosina dos confôrmeros C e D encontrados na estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina.

Em adição, uma desordem no braço 5'-CH₂OH similar àquela reportada para quatro confôrmeros do fármaco presentes na dupla hélice de lamivudina foi observada em uma das três moléculas de lamivudina na unidade assimétrica cristalográfica do 0,67-hidrato de lamivudina. Dois sítios de ocupações fixas de 75% e 25% foram adotados para os átomos de oxigênio e hidrogênio do grupo hidroxílico da molécula B de lamivudina, seguindo os mesmos procedimentos para determinação dos fatores de ocupação dos sítios dos átomos hidroxílicos descritos para a dupla hélice de lamivudina. As frações dos átomos dos grupos hidroxílicos nos sítios de ocupações 75% e 25% foram rotuladas O5'b—H5'Ob e O5'b'—H5'Ob', respectivamente. Como no refinamento de quatro confôrmeros da dupla hélice de lamivudina, somente um hidrogênio metilênico foi fracionado em dois sítios de ocupação. A fração atômica de hidrogênio rotulada como H5'xb pertenceu à mesma conformação da fração hidroxílica O5'b—H5'Ob, e, portanto, seu sítio teve ocupação fixa de 75%. Já a fração H5'zb, referente à conformação assumida pela fração O5'b'—H5'Ob', foi posicionada no sítio de ocupação fixa de 25%. O átomo de hidrogênio metilênico rotulado como H5'yb ocupou um único sítio com fator de ocupação 100%. A configuração dos átomos ao redor do

átomo de carbono metilênico C5'b de um dos conformêros estruturando o 0,67-hidrato de lamivudina é exemplificada na Figura 5, onde a configuração dos átomos desordenados de hidrogênio e oxigênio ligados aos carbonos C5' de quatro moléculas cristalograficamente independentes da dupla hélice de lamivudina é ilustrada.

Figura 6 – Modelo de desordem de uma das três moléculas na unidade assimétrica do 0,67-hidrato de lamivudina. Esta molécula é representada por dois conformêros com ocupação de 50% cada, os quais assumem diferentes orientações relativas e são sobrepostos através de seus fragmentos de citosina. Mais especificamente, as frações dos átomos N3, N4, C4 e C5 de um conformêro são justapostas sobre as frações N4, N3, C4 e C5 do outro, respectivamente. Os átomos e as ligações dos conformêros C e D destacados com cores diferentes estão sobrepostos no híbrido cristalográfico e podem ser representados pelos átomos N3/4, N4/3, C4cd e C5cd, os quais estão em sítios únicos de ocupação 100%. Estes átomos e as ligações entre eles são destacados com uma mesma cor e pertencem a ambos os conformêros. A seta representa o pseudo-eixo rotacional de segunda ordem passando exatamente ao longo do eixo da ligação C4cd—C5cd.

No cloridrato de zalcitabina e lamivudina, a molécula protonada de lamivudina apresentou os átomos do braço 5'-hidroximetilênico desordenados. Nesta molécula, ao contrário de algumas das moléculas do fármaco presentes na dupla hélice de lamivudina e no 0,67-hidrato de lamivudina, o átomo de carbono metilênico revelou ter dois sítios de ocupação de 60% e 40%, assim como os átomos de hidrogênio ligados a ele e os átomos de oxigênio e hidrogênio hidroxílicos. Os sítios extras tiveram seus fatores de ocupação estimados conforme o procedimento para determinação da percentagem de ocupação dos sítios dos átomos de oxigênio desordenados presentes na dupla hélice de lamivudina. Tal procedimento se baseou em ciclos de refinamentos com parâmetros térmicos isotrópicos fixos para as duas frações do átomo de oxigênio hidroxílico de lamivudina, refinando-se os fatores de ocupação dos seus

sítios. Após determinação dos fatores de ocupação dos sítios, tais parâmetros foram fixos e as frações dos átomos de carbono e oxigênio foram refinadas anisotropicamente. Os rótulos C5'L, H5'xL e H5'yL foram atribuídos às frações atômicas dos átomos de carbono e hidrogênio metilênicos nos sítios de ocupação 60%, enquanto que os rótulos O5'L e H5'OL remetem às frações hidroxílicas dos átomos de oxigênio e hidrogênio de lamivudina neste sítio principal de ocupação. No caso das frações atômicas nos sítios extras de ocupação 40%, os rótulos são similares (C5'L', H5'xL', H5'yL', O5'L' e H5'OL').

Depois de finalizados os refinamentos das estruturas, arquivos com extensão “.cif” (*Crystallographic Information File*) foram preparados e validados usando os relatórios gerados para cada estrutura pelos programas de aferição da consistência e aceitabilidade de determinações de estruturas cristalinas. Para as avaliações dos arquivos “.cif” foram utilizados os programas PLATON (155) e checkCIF (156). Este último programa é uma facilidade disponibilizada pela União Internacional de Cristalografia na rede mundial de computadores. Uma vez validados, os arquivos “.cif” contendo todas as informações sobre as coletas e processamentos dos dados de DRX, constantes de cela unitária, resolução e refinamento das estruturas, incluindo procedimentos e estatísticas das determinações estruturais, coordenadas fracionárias e parâmetros térmicos dos átomos, e características geométricas moleculares, foram depositados no Centro de Dados Cristalográficos de Cambridge (CCDC - *Cambridge Crystallographic Data Centre*) (157). Estes arquivos podem ser gratuitamente obtidos sob solicitação (158).

Para interpretação e análise das características intramoleculares e supramoleculares e preparo das representações gráficas estruturais, os programas MERCURY (159), ORTEP-3 (160) e CHIMERA (161) foram utilizados. Todas as ilustrações apresentadas foram preparadas com as estruturas determinadas a baixas temperaturas, assim como todos os valores de parâmetros geométricos foram mensurados nas estruturas determinadas à temperatura de 150 K (ou a 100 K nos casos do maleato de lamivudina e do hidrato de didanosina).

2.5 Difração de raios X por pó (DRXP)

Cristais do cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina, maleato de lamivudina, dupla hélice de lamivudina e hidrato de didanosina foram triturados em almofariz de ágata e montados em uma lâmina de vidro sulcada, usada como porta-amostra, e

expostas ao feixe de raios X usando um difratômetro de raios X por pó (Rigaku-Denki®) de geometria θ - 2θ equipado com detector de cintilação. Uma corrente de 100 mA foi gerada sob uma tensão de 50 kV. A radiação foi proveniente de um ânodo rotatório de cobre (radiação $\text{CuK}\alpha$ monocromada por grafite, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). O goniômetro horizontal de alto ângulo RINT2000 foi empregado sob o modo de varredura contínua, deslocando-se a amostra em intervalos de θ e o detector em intervalos de 2θ , variações angulares estas relativas ao feixe de raios X incidente. Ambos os deslocamentos foram conduzidos a uma velocidade de varredura de $1,000^\circ/\text{min}$. A varredura foi conduzida à temperatura ambiente (298(1) K) no intervalo de detecção compreendido entre 5° a 40° em 2θ , com passo de amostragem de $0,02^\circ$. A abertura das fendas de divergência e espalhamento foi de 1° , enquanto que a largura da fenda de recepção foi 0,3 mm.

Os difratogramas experimentais foram comparados com padrões teóricos de DRXP simulados usando o programa DIAMOND (162). Nestas simulações foram utilizados os arquivos “*.cif*” validados para as estruturas cristalinas determinadas à temperatura ambiente (ou a baixas temperaturas nos casos da dupla hélice de lamivudina e do hidrato de didanosina). Os padrões teóricos foram calculados simulando as mesmas condições de análise das amostras das modificações cristalinas (λ dos raios X, passo de amostragem e faixa angular de varredura em 2θ).

2.6 Espectroscopia vibracional no infravermelho (IV) e Raman

As análises vibracionais por espectroscopia no IV e Raman foram conduzidas à temperatura ambiente em um espectrômetro no IV por transformada de Fourier FT-IR/FT-Raman VERTEX 70 (Bruker®) equipado com um laser de Nd:YAG ($\lambda = 1064 \text{ nm}$, potência de 200 mW) e um detector de Ge resfriado com nitrogênio líquido, a uma resolução de 4 cm^{-1} . Para aquisição dos espectros no IV, 1 mg de cada amostra das modificações cristalinas analisadas foi misturada com 200 mg de KBr (Vetec®). Amostras do cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina, maleato de lamivudina, dupla hélice de lamivudina, cloridrato de zalcitabina e hidrato de didanosina foram caracterizadas por ambas as técnicas de espectroscopia vibracional no IV e Raman. O KBr foi previamente mantido em estufa a 120°C por 24 h. Após dessecação, este sal foi triturado em almofariz de ágata junto com as amostras das modificações cristalinas. Em seguida, a mistura foi comprimida em prensa hidráulica (Potente Brasil®, 15 toneladas) sob uma pressão de 4 toneladas por três

minutos. Pastilhas translúcidas com espessura entre 1 e 2 mm e diâmetro variando entre 1 a 1,5 cm foram obtidas após compressão e analisadas pela técnica de transmissão, sendo que os espectros foram obtidos através de 356 varreduras onde que a combinação de todas as varreduras proveu um espectro médio.

No caso das análises espectroscópicas vibracionais por espalhamento Raman, as amostras foram diretamente assentadas em portas-amostra de alumínio, onde há hemisférios torneados com raio de 2 mm, e 906 coletas espectrais foram realizadas.

2.7 Análises térmicas por calorimetria exploratória diferencial (CED) e termogravimetria (TG)

Amostras do cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina, maleato de lamivudina, dupla hélice de lamivudina e hidrato de didanosina foram caracterizadas através das técnicas térmicas de CED e TG. As análises por CED foram conduzidas sob fluxo de calor em atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL/min e taxa de aquecimento de 5 °C/min em um equipamento DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch®). As análises compreenderam uma faixa de temperatura entre 25 e 400 °C, embora faixas de 40 a 350 °C são apresentadas nos termogramas devido à inexistência de eventos térmicos fora desta faixa. Cadinhos de alumínio foram utilizados como porta-amostra e referência. Cerca de 5 mg de cada amostra foram exatamente pesadas diretamente sobre os cadinhos, os quais foram então selados e perfurados antes das análises. Anteriormente aos experimentos de CED, o ambiente dentro do equipamento foi purgado com nitrogênio por 15 minutos para remoção de ar.

As análises por TG foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio em um equipamento STA 409 PC Luxx (Netzsch®) de análise térmica simultânea. Nestas análises, uma massa de aproximadamente 10 mg das modificações cristalinas foi utilizada, sob as mesmas condições analíticas das corridas de CED.

2.8 Recuperação de lamivudina nas modificações cristalinas

As recuperações do fármaco a partir do cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina, maleato de lamivudina e dupla hélice de lamivudina foram determinadas por CLAE conforme monografia existente na farmacopéia americana para a sua quantificação (163). Estas modificações cristalinas tiveram suas purezas cristalinas

demonstradas por DRXP e, portanto, a pureza inferida com base na recuperação do fármaco remeteria especificamente a pureza química de cada modificação cristalina preparada. A comprovação de ambas as purezas cristalina e química são requisitos para a validação dos resultados dos ensaios de solubilidade no equilíbrio realizados para as modificações cristalinas mencionadas nesta seção (164). Todos os ensaios descritos nesta e na próxima seção foram conduzidos em quintuplicata.

Amostras das modificações cristalinas e da forma II de lamivudina (amostra padrão, cuja pureza de lamivudina é $99,55 \pm 0,07$ mol% de acordo com as especificações descritas na seção 2.1) foram dissolvidas na fase móvel (acetato de amônio (0,025 mol/L)/ metanol, 95:5 v/v) a uma concentração final de 0,15 mg/mL. As análises por CLAE foram conduzidas à temperatura de 35 ± 1 °C em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu®) equipado com uma coluna de fase reversa C18 (coluna empacotada LiChroSpher RP-18 (Merck®) de $100 \times 4,6$ mm d.i. e tamanho de partículas de 5 μ m, a qual foi acoplada a uma pré-coluna de $10 \times 4,6$ mm d.i.) e detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp ajustado para detecção por absorção da radiação ultravioleta ($\lambda = 277$ nm). A vazão da fase móvel e o volume injetado de cada amostra foram 1,0 mL/min e 20 μ L, respectivamente. A fração recuperada do fármaco foi determinada através da proporcionalidade entre as áreas dos picos cromatográficos de lamivudina e suas respectivas concentrações nas soluções preparadas através da dissolução das fases sólidas do fármaco na fase móvel. Para determinar a concentração de lamivudina nas amostras das modificações cristalinas, a concentração conhecida de lamivudina na amostra padrão preparada por dissolução da forma II do fármaco foi corrigida em função do teor especificado de lamivudina.

2.9 Solubilidade no equilíbrio das modificações cristalinas de lamivudina

A solubilidade no equilíbrio das modificações cristalinas foi determinada através do método miniaturizado de agitação em frasco (165). Cerca de 50 mg de cloridrato de lamivudina, 100 mg de cloridrato monoidratado de lamivudina, 30 mg de maleato de lamivudina e 120 mg de dupla hélice de lamivudina foram transferidos para recipientes apropriados já contendo 150 μ L de água, a qual foi previamente deionizada por osmose reversa. Em seguida, a mistura foi agitada sob 450 rpm, durante 24 horas à temperatura ambiente (26 ± 3 °C), e posteriormente filtrada através de um filtro (Millipore®) de 0,45 μ m. Deste filtrado, uma alíquota de 50 μ L foi retirada e diluída em água deionizada (10 mL). A

solução resultante foi diluída novamente, transferindo-se 1 mL para recipientes volumétricos com capacidade para 50 mL (no caso do cloridrato de lamivudina), 25 mL (no caso do maleato de lamivudina) ou 200 mL (no caso do cloridrato monoidratado de lamivudina e dupla hélice de lamivudina). Em seguida, água deionizada foi adicionada até o volume preestabelecido do frasco correspondente. As leituras de absorvância foram conduzidas com alíquotas desta última solução, usando um espectrofotômetro UV-VIS U-2000 (Shimadzu®). O comprimento de onda utilizado para as medidas foi 270 nm, e a concentração de lamivudina na solução foi determinada interpolando os resultados de absorvância obtidos para as modificações cristalinas em uma curva de calibração gerada com a amostra padrão de lamivudina. A curva de calibração foi gerada com valores de concentração de 0,006, 0,009, 0,012, 0,015 e 0,018 mg/mL, as quais forneceram valores médios de absorvância de $0,265 \pm 0,007$, $0,390 \pm 0,003$, $0,517 \pm 0,002$, $0,648 \pm 0,005$ e $0,778 \pm 0,004$, respectivamente. Os valores de absorvância para cada solução de calibração foram aferidos em quintuplicata. As soluções de calibração foram preparadas através de diluições da solução da amostra padrão de lamivudina, conforme descrito na seção anterior (solução de lamivudina a 0,15 mg/mL). As concentrações de lamivudina nas soluções de calibração foram corrigidas de acordo com o teor especificado de lamivudina. Um coeficiente médio de correlação linear entre as concentrações corrigidas das soluções de calibração e os seus valores de absorvância de $0,9998 \pm 0,0002$ validou a aplicação da curva gerada para interpolação dos valores de absorvância mensurados com as soluções das modificações cristalinas. A equação linear da curva de calibração usada para as interpolações dos valores de absorvância foi:

$$\text{Absorvância} = (42,9 \pm 0,3 \text{ mL/mg}) \text{ concentração} + 0,006 \pm 0,004.$$

Uma amostra da forma II de lamivudina também foi avaliada quanto à sua solubilidade no equilíbrio para compará-la com as solubilidades das modificações cristalinas preparadas, sob as mesmas condições experimentais. Neste caso, foi aplicada a mesma configuração experimental descrita para o ensaio de solubilidade do cloridrato de lamivudina, incluindo quantidade da fase sólida, número e volume das diluições. Portanto, a forma II de lamivudina foi utilizada para dois propósitos no ensaio de solubilidade:

- 1) gerar uma curva de calibração através de medidas espectrofotométricas de soluções diluídas, cujas concentrações são conhecidas. Neste caso, toda a quantidade do fármaco foi dissolvida nas soluções de calibração devido à diluição das mesmas;

- 2) determinar sua solubilidade no equilíbrio sob as mesmas condições experimentais em que esta propriedade de estado sólido foi estimada para as modificações cristalinas

preparadas. Neste caso, a quantidade máxima que pode ser dissolvida da fase sólida em um determinado volume de água deionizada foi determinada.

Conforme estabelecido pelo método de agitação em frasco para determinação da solubilidade no equilíbrio ou solubilidade termodinâmica (165), há necessidade de formação de uma solução saturada após adição da amostra sólida a ser analisada ao meio dissolutor (neste caso, água deionizada). A formação de uma solução saturada é verificada pela presença de material sólido não dissolvido após agitação, a uma determinada temperatura, indicando que a quantidade máxima do sólido que pode ser dissolvida em um volume determinado de solvente já fora alcançada. Neste ponto, as velocidades de dissolução e agregação molecular à fase sólida se equivalem, configurando, portanto, um estado de equilíbrio termodinâmico. As quantidades das modificações cristalinas empregadas nos ensaios de solubilidade foram diferentes devido às solubilidades características de cada forma cristalina. Mas, em todos os casos, a adição das quantidades de cada modificação cristalina mencionadas nesta seção em 150 μL de água foi suficiente para formação de uma solução saturada com a presença de material sólido não dissolvido.

Depois de adequada diluição do filtrado obtido após agitação em frasco por 24 horas, valores médios de absorvância de $0,64 \pm 0,02$, $0,45 \pm 0,02$, $0,39 \pm 0,03$, $0,62 \pm 0,01$ e $0,552 \pm 0,006$ foram determinados para o cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina, maleato de lamivudina, dupla hélice de lamivudina e forma II de lamivudina, respectivamente. Vale ressaltar que as duas diluições foram conduzidas com o propósito dos valores de absorvância estarem dentro da faixa de valores de absorvância mensurados para as soluções da curva de calibração preparada com a amostra padrão de lamivudina.

3 CLORIDRATO DE LAMIVUDINA E CLORIDRATO MONOIDRATADO DE LAMIVUDINA

3.1 Caracterização morfológica por MEV

Após as etapas de preparação do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina, foram obtidos dois tipos de cristais quanto ao hábito cristalino para cada um dos dois sais. Cristais apresentando aspectos de placas e de bastões foram encontrados sob inspeção microscópica. Assim, ambos os tipos morfológicamente distintos tiveram suas celas unitárias determinadas por DRXM. Foi constatado que se tratava de uma única fase sólida de cada modificação cristalina, uma vez que os parâmetros de cela unitária cristalográfica dos diferentes cristais isolados de uma mesma condição de cristalização foram coincidentes.

As morfologias dos cristais da forma II de lamivudina, do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina são exibidas na Figura 7.

cloridrato de lamivudina **forma II de lamivudina** **cloridrato monoidratado de lamivudina**

Figura 7 – Micrografias eletrônicas de varredura de cristais da forma II de lamivudina, do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina. Enquanto a forma II exibe uma morfologia bipiramidal característica, os dois sais de lamivudina podem cristalizar como placas ou bastões. Barra: 100 μm .

3.2 Determinação estrutural por DRXM

Cristais do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina apresentando morfologia de bastões foram selecionados para o experimento de DRXM. Ambas as modificações cristalinas foram resolvidas no grupo espacial monoclínico $P2_1$, com duas espécies catiônicas (lamivudina)⁺ com o átomo de nitrogênio imínico do anel pirimidínico protonado e dois contra-íons cloreto por cela unitária cristalográfica, além de duas moléculas de água no caso do cloridrato monoidratado de lamivudina. A Tabela 1 sumariza as informações relativas às determinações estruturais destes sais conduzidas às temperaturas de 298 K e 150 K, inclusive com os números de referência dos depósitos no Centro de Dados Cristalográficos da Cambridge (157).

Tabela 1 - Parâmetros cristalográficos e estatísticos das determinações estruturais do cloridrato de lamivudina e cloridrato monoidratado de lamivudina.

		Cloridrato de lamivudina		Cloridrato monoidratado de lamivudina	
Fórmula mínima		(C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₃ S)Cl		(C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₃ S)(H ₂ O)Cl	
Massa da fórmula mínima (g/mol)		265,72		283,73	
Dimensões do cristal (mm ³)		0,43 x 0,10 x 0,05		0,58 x 0,10 x 0,03	
Sistema cristalino		monoclínico		monoclínico	
Grupo espacial		<i>P</i> 2 ₁		<i>P</i> 2 ₁	
<i>Z</i> / <i>Z'</i>		2 / 1		2 / 1	
Temperatura (K)		298(2)	150(2)	298(2)	150(2)
Dimensões da cela unitária	<i>a</i> (Å)	5,7060(2)	5,6520(3)	5,2927(2)	5,2554(1)
	<i>b</i> (Å)	11,9670(5)	11,9240(6)	17,252(1)	17,1944(6)
	<i>c</i> (Å)	8,3401(4)	8,3220(6)	6,8518(4)	6,8210(2)
	β (°)	104,273(2)	104,760(3)	98,865(3)	98,774(2)
Volume da cela unitária (Å ³)		551,91(4)	542,35(6)	618,18(6)	609,16(3)
Densidade calculada (g/cm ³)		1,599	1,627	1,524	1,547
Coeficiente de absorção μ (mm ⁻¹)		0,531	0,541	0,485	0,492
Fatores de transmissão mínimo e máximo (Gaussian)	<i>T</i> _{mín}	0,866	0,833	0,881	0,941
	<i>T</i> _{máx}	0,974	0,944	0,986	0,987
Intervalo em θ (°)		3,04 – 26,63	3,05 – 25,37	3,83-25,10	3,02-27,45
Intervalo dos índices	<i>h</i>	-6 a 7	-6 a 6	-6 a 5	-5 a 6
	<i>k</i>	-14 a 15	-14 a 14	-19 a 19	-21 a 20
	<i>l</i>	-10 a 10	-10 a 9	-7 a 7	-8 a 8
Reflexões coletadas		6374	4562	7849	8661
Reflexões independentes		2284	1955	1854	2547
Índice de simetria (<i>R</i> _{int})		0,0646	0,0848	0,0840	0,1170
Completeza para θ _{máx} (%)		99,0	99,4	98,9	98,5
<i>F</i> ₀₀₀		276	276	296	296
Parâmetros refinados		157	157	172	172
Qualidade do ajuste sobre <i>F</i> ²		1,030	0,994	1,039	1,058
Índices residuais para <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	<i>R</i> ₁	0,0365	0,0497	0,0364	0,0500
	<i>wR</i> ₂	0,0896	0,1140	0,0754	0,1137
	<i>R</i> _I	0,0438	0,0667	0,0528	0,0529
	<i>wR</i> ₂	0,0943	0,1239	0,0823	0,1166
Δρ _{máx} / Δρ _{mín} (e/Å ³)		0,293/-0,234	0,266/-0,416	0,164/-0,212	0,412-0,514
Estrutura absoluta	Parâmetro de Flack	0,09(7)	-0,04(12)	-0,06(8)	0,11(8)
	Pares de Friedel	1080	913	889	1177
Nº de depósito no CCDC		751365	751367	751366	751368

De acordo com a concentração da solução de HCl usada para o preparo das matrizes de cristalização destas duas modificações cristalinas, valores de pH inferiores a 2 foram obtidos nas soluções matrizes finais, das quais foram isolados os cristais do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina após evaporação do solvente. Considerando o p*K*_a de lamivudina (4,30) (166), a concentração da forma protonada do fármaco nas matrizes foi no mínimo 200 vezes maior que a concentração da forma neutra do

fármaco, o que garantiu a cristalização de lamivudina na forma dos sais ao invés de cristalizar como uma de suas formas básicas.

A inclusão da molécula de água na rede cristalina do cloridrato monoidratado de lamivudina não resultou no desordenamento da molécula de lamivudina. Na Figura 8, as unidades assimétricas cristalográficas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina são ilustradas, onde é possível observar elipsóides térmicos característicos de vibrações discretas dos átomos posicionados em um único sítio de ocupação.

Figura 8 - Unidades assimétricas cristalográficas do (a) cloridrato de lamivudina e (b) cloridrato monoidratado de lamivudina. Elipsóides térmicos a uma probabilidade de 50% representam os átomos, exceto átomos de hidrogênio (representados como esferas de raio arbitrário). Em (b), há uma rotação de 120° (seta) sobre o eixo da ligação C4'—C5' em relação àquela da modificação cristalina anidra (a).

Introdução de desordens estáticas devido à cristalização de água estrutural é um fenômeno comum em cristais moleculares (167,168). Tal comportamento está relacionado ao fato da água participar como doadora e receptora de ligações de hidrogênio intermoleculares na rede cristalina, o que possibilita diferentes padrões de interações envolvendo as componentes moleculares do cristal (167). A liberdade conformacional de grande parte dos compostos orgânicos contribui para o desordenamento molecular associado à presença de água estrutural na rede cristalina, uma vez que funcionalidades supramoleculares podem ser posicionadas diferentemente para interagir ora com a água ora com moléculas vizinhas do composto. Como um resultado, conformações e padrões de interações intermoleculares para

uma mesma molécula cristalograficamente independente podem variar a longo alcance, resultando em desordens estruturais (168).

Entretanto, um único padrão definido de ligações de hidrogênio intermoleculares é observado na estrutura do cloridrato monoidratado de lamivudina (Figura 9). De fato, o desordenamento devido a diferentes padrões de ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de água está relacionado com a possibilidade de posicionamento diferencial de grupos doadores e receptores de ligações de hidrogênio dos compostos orgânicos. Neste sentido, lamivudina possui duas ligações intramoleculares passíveis de rotação que podem orientar suas funcionalidades supramoleculares diferentemente. Uma delas, a ligação N1—C1' entre os anéis de citosina e oxatiolano, não apresenta muitos graus de liberdade rotacional devido a efeitos estéricos entre os dois anéis que ela conecta. Com raras exceções onde a forte contribuição entálpica proveniente de interações intermoleculares supera as forças estéricas repulsivas intramoleculares, a ligação N1—C1' configura uma conformação *anti* do fragmento de citosina com discretas variações dos ângulos de torção sobre seu eixo. Esta conformação *anti* é caracterizada pelo plano do anel pirimidínico estar quase paralelo (ou paralelo) ao eixo longitudinal da ligação O1'—C1', com o grupo carbonílico C2=O2 orientado em uma posição oposta ao átomo de oxigênio intracíclico do anel oxatiolano. Já a outra ligação C4'—C5' possui três estados rotacionais de 120° que definem a conformação alternada das ligações a estes dois átomos. Portanto, uma das funcionalidades supramoleculares de lamivudina em ligações de hidrogênio, o grupo hidroxílico ligado a C5', pode assumir três posições diferentes de acordo com a rotação sobre o eixo da ligação C4'—C5'. Diferentes possibilidades conformacionais deste motivo estrutural poderiam estar relacionadas a diferentes padrões de interações intermoleculares envolvendo, por exemplo, a molécula de água.

Figura 9 – Padrão de ligações de hidrogênio clássicas no (a) cloridrato de lamivudina e (b) cloridrato monoidratado de lamivudina. Elipsóides térmicos a uma probabilidade de 50% representam os átomos, exceto átomos de hidrogênio (representados como esferas de raio arbitrário). Projeções nos planos cristalográficos (001) e (010) são mostradas em (a) e (b), respectivamente.

Todavia, o grupo hidroxílico do fármaco não interage com a molécula de água na rede cristalina do cloridrato monoidratado de lamivudina. Os átomos de oxigênio do grupo hidroxílico e da água estão distanciados por 3,793(4) Å, revelando a inexistência de ligações de hidrogênio entre estes átomos. Na versão hidratada do cloridrato de lamivudina, o grupo 5'-OH é doador de ligação de hidrogênio para o grupo carbonílico de citosina, assim como na versão anidra.

Em ambas as estruturas cristalinas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado há ligações de hidrogênio intermoleculares e interações entre sistemas eletrônicos π dos anéis de citosina (interações π - π). Nestas estruturas, há ligações de hidrogênio bifurcadas em que o ânion cloreto está ligado a ambos os grupos amínicos N—H e imínicos protonados N⁽⁺⁾—H. Estes contatos são ilustrados nas Figuras 8 e 9. As ligações bifurcadas envolvendo os átomos N3⁽⁺⁾—H•••Cl1⁽⁻⁾ e N4—H4Nx•••Cl1⁽⁻⁾ ocorrem em ambos os sais e são responsáveis pela formação do par iônico (lamivudina)⁺Cl⁻. A ligação de hidrogênio N4—H4Nx•••Cl1⁽⁻⁾ é mais fraca que a ligação N3⁽⁺⁾—H•••Cl1⁽⁻⁾ em ambos os sais, o que é constatado pelas geometrias das ligações correspondentes (Tabela 2). Estas duas ligações posicionam o ânion cloreto coplanar ao fragmento de citosina. Esta coplanaridade é constatada pelo fato dos ânions cloreto estarem distanciados por apenas 0,092(1) Å e 0,105(1) Å do plano citosínico formado pelos átomos N1, C2, O2, N3, C4, N4, C5 e C6 nas estruturas anidra e hidratada, respectivamente (o desvio quadrático médio dos átomos ajustados no plano

mínimo quadrado é 0,0310 Å no cloridrato de lamivudina e 0,0210 Å no cloridrato monoidratado de lamivudina).

No cloridrato de lamivudina, o grupo amínico também é doador de uma ligação de hidrogênio para outro ânion cloreto por meio de seu átomo de hidrogênio oposto àquele ligado ao ânion cloreto coplanar ao anel de citosina. A ligação de hidrogênio $N4-H4N_y \cdots Cl1^{(-)i}$ (posição equivalente por simetria: (i) = - x; -0,5 + y; 1 - z) ocorre somente na estrutura do cloridrato de lamivudina. Este ânion cloreto $Cl1^{(-)i}$ não exibe coplanaridade em relação ao fragmento de citosina ligado a ele por meio da ligação $N4-H4N_y \cdots Cl^{(-)i}$. Neste caso, seu desvio em relação ao plano citosínico é 1,434(1) Å. Estes ânions cloretos $Cl1^{(-)}$ e $Cl1^{(-)i}$ ligados a um mesmo fragmento de citosina são relacionados por simetria roto-translacional de segunda ordem. O ânion cloreto $Cl1^{(-)i}$ está envolvido também nas ligações bifurcadas. Portanto, cadeias unidimensionais formadas por unidades catiônicas e aniônicas alternantes são arquitetadas ao longo da direção [010], onde as ligações $N4-H4N_y \cdots Cl^{(-)i}$ unem as unidades $[(lamivudina)^+Cl^-]_n$ adjacentes relacionadas por simetria roto-translacional 2_1 . Paralelo a esta direção, moléculas do fármaco relacionadas por simetria roto-translacional interagem por meio de uma ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxílico e carbonílico. A ligação de hidrogênio $O5'-H \cdots O2^{ii}$ (ii = 1 - x; -0,5 + y; - z) entrecruza as cadeias $[(lamivudina)^+Cl^-]_n$ ao longo da direção [10-1]. Por fim, a estruturação tridimensional da rede cristalina é alcançada por interações π - π , onde os fragmentos de citosina são sobrepostos a uma distância de 3,28(4) Å paralelamente à direção [100]. Canais de ânions cloreto são formados ao longo desta direção cristalográfica. O empacotamento do cloridrato de lamivudina é apresentado na Figura 10. Vale ressaltar que aqui foram discutidas apenas as interações mais fortes, embora contatos fracos, como ligações de hidrogênio não clássicas e forças de van der Waals, também contribuam para o empacotamento molecular.

Figura 10 – Empacotamento cristalino do cloridrato de lamivudina. (a) Cadeia unidimensional formada por unidades catiônicas e aniônicas alternantes é arquitetada ao longo da direção [010]. (b) Projeção paralela ao eixo b da cadeia exibida em (a). (c) Ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxílico e carbonílico (circundado) conectam as cadeias unidimensionais ao longo da direção [10-1]. Nesta ilustração e em (d), átomos e ligações das cadeias unidimensionais conectadas por ligações de hidrogênio à cadeia central exibida em (a) e em (b) foram representadas com cores diferentes para facilitar a identificação das cadeias individualmente. (d) Projeção paralela ao eixo b das três cadeias exibidas em (c). (e) Sobreposição das moléculas de lamivudina vista ao longo do a . (f) Canais de ânions cloreto são formados paralelamente à direção [100]. Nesta ilustração, a distância de sobreposição entre os fragmentos de citosina é apresentada.

A inclusão da água na rede cristalina alterou o arranjo supramolecular do cloridrato monoidratado de lamivudina, o que foi acompanhado por mudança conformacional do fármaco. A alteração do empacotamento do cloridrato monoidratado de lamivudina em comparação à versão anidra é ilustrada na Figura 11, em que o efeito da inclusão da água na rede cristalina é enfatizado. A molécula de água é receptora de ligação de hidrogênio do grupo NH_2 e ocupa aproximadamente a mesma posição do ânion cloreto $\text{Cl}^{(-)i}$ da estrutura do cloridrato de lamivudina. Este posicionamento da água similar àquele do ânion $\text{Cl}^{(-)i}$ na versão anidra, ambas as espécies inorgânicas atuando como receptoras de ligações de hidrogênio do grupo amínico, explica a inexistência, na versão hidratada do sal, de uma ligação análoga à ligação de hidrogênio $\text{N4—H4Ny} \cdots \text{Cl}^{(-)i}$ observada no cloridrato de lamivudina. Portanto, no cloridrato monoidratado de lamivudina há a ligação de hidrogênio $\text{N4—H4Ny} \cdots \text{O}_w$ ao invés da ligação $\text{N4—H4Ny} \cdots \text{Cl}^{(-)i}$ presente no cloridrato de lamivudina. Nesta estrutura, há uma maior coplanaridade entre a espécie receptora da ligação de hidrogênio de N4—H4Ny e o anel de citosina. O desvio do átomo de oxigênio da água em relação ao plano citosínico é de 0,334(3) Å.

Em comparação com a estrutura da versão anidra do sal, a presença da água nesta posição específica afeta a arquitetura supramolecular como se deslocasse em sua direção o par iônico $(\text{lamivudina})^+\text{Cl}^-$ vizinho relacionado por simetria translacional (Figura 11). Esta aproximação ocorre como uma consequência da doação de uma ligação de hidrogênio da água para o ânion cloreto vizinho, a qual envolve os átomos $\text{O}_w\text{—H1}_w \cdots \text{Cl}^{(-)iii}$ ($iii = 1 + x; y; 1 + z$). Nesta estrutura, as unidades alternantes $[(\text{lamivudina})^+\text{Cl}^-]_n$ são relacionadas por simetria translacional, as quais são conectadas ao longo da direção [101] por meio da ligação $\text{O5}'\text{—H} \cdots \text{O2}^{iii}$ entre os grupos hidrofílico e carbonílico. No cloridrato monoidratado de lamivudina, a formação desta ligação de hidrogênio está relacionada a uma rotação de aproximadamente 120° sobre o eixo da ligação covalente $\text{C4}'\text{—C5}'$ em relação à versão anidra do sal. Esta rotação leva à principal diferença conformacional destes dois sais, como será discutido ainda nesta seção. A água ainda doa uma ligação de hidrogênio para outro ânion cloreto ligado ao fragmento de citosina sobreposto ao longo da direção [100]. Junto com a ligação $\text{O}_w\text{—H1}_w \cdots \text{Cl}^{(-)iii}$, a ligação de hidrogênio $\text{O}_w\text{—H2}_w \cdots \text{Cl}^{(-)iv}$ ($iv = x; y; 1 + z$) estrutura verdadeiras fileiras hidrofílicas formadas por unidades alternantes de moléculas de água e ânions cloreto (Figura 12). A estas fileiras hidrofílicas formadas por unidades $[(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}^-]_n$ se ancoram os cátions de lamivudina por meio das ligações bifurcadas $\text{N3}^{(+)}\text{—H} \cdots \text{Cl}^{(-)}$ e $\text{N4—H4Nx} \cdots \text{Cl}^{(-)}$ com ânions cloreto e ligações $\text{N4—H4Ny} \cdots \text{O}_w$ com

moléculas de água. Entre as moléculas de lamivudina, há ligações $O5'—H\cdots O2^{iii}$ ao longo da direção [101] e interações $\pi-\pi$ responsáveis pela sobreposição a 3,30(1) Å paralelamente ao eixo *a*, como mostrado respectivamente nas Figuras 11 e 12. Na versão hidratada, espécies relacionadas por simetria roto-translacional são posicionadas em fileiras hidrofílicas com orientações opostas (Figura 12).

Figura 11 – Efeito da inclusão da molécula de água na rede cristalina do cloridrato monoidratado de lamivudina. (a) Dois pares iônicos (lamivudina)⁺Cl[−] relacionados por simetria translacional são posicionados ao longo das direções [010] (cloridrato de lamivudina) e [101] (cloridrato monoidratado de lamivudina). (b) A molécula de água entra na posição equivalente àquela de Cl1ⁱ do cloridrato de lamivudina. (c) Formação da ligação de hidrogênio entre a molécula de água e o ânion cloreto (seta vermelha) pode ser entendida como promotora do deslocamento do par iônico vizinho (seta preta) e conseqüente rotação sobre o eixo da ligação C4'—C5' para formação da ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxílico e carbonílico (circundado). (d) No cloridrato de lamivudina, a ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxílico e carbonílico (circundado) envolve moléculas de lamivudina relacionadas por simetria roto-translacional. Posições equivalentes: (i) = −*x*; −0,5 + *y*; 1 − *z*; (ii) = 1 − *x*; −0,5 + *y*, −*z*; (iii) = 1 + *x*; *y*; 1 + *z*.

Figura 12 – Empacotamento cristalino do cloridrato monoidratado de lamivudina. Fileiras hidrofílicas formadas por unidades $[(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}^-]_n$ projetadas ao longo das direções (a) $[100]$ e (b) $[101]$. A ancoragem das moléculas de lamivudina às fileiras hidrofílicas é ilustrada nas projeções paralelas às direções (c) $[100]$ e (d) $[101]$. (e) A sobreposição das moléculas de lamivudina ocorre ao longo do eixo a . Nesta ilustração, a distância de sobreposição entre os fragmentos de citosina é mostrada. (f) Ligações de hidrogênio entre a molécula de água e os ânions cloreto. Posições equivalentes: (iii) = $1 + x$; y ; $1 + z$; (iv) = x ; y ; $1 + z$.

A geometria das ligações de hidrogênio comuns a ambas as estruturas foram similares, conforme mostrado na Tabela 2, embora haja uma maior direcionalidade da ligação de

hidrogênio $O5'—H\cdots O2^{iii}$ no cloridrato monoidratado de lamivudina. Esta observação resulta da inspeção dos valores de ângulos das ligações de hidrogênio, em que a direcionalidade é proporcional à aproximação destes parâmetros de 180° , ou seja, correspondendo a uma geometria linear. Na versão hidratada do sal, o ângulo $O5'—H\cdots O2$ mede $174(4)^\circ$, enquanto na versão anidra este valor é igual a $170(6)^\circ$.

Tabela 2 - Geometria das ligações de hidrogênio clássicas presentes nas estruturas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina.

$D—H\cdots R^h$	$D—H$ (Å)	$H\cdots R$ (Å)	$D\cdots R$ (Å)	$D—H\cdots R$ ($^\circ$)
Cloridrato de lamivudina				
$N_3^{(+)}—H_3\cdots Cl_1^{(-)}$	1,02(6)	2,09(6)	3,075(5)	162(4)
$N_4—H_{4Nx}\cdots Cl_1^{(-)}$	0,96(6)	2,48(6)	3,346(4)	151(5)
$N_4—H_{4Ny}\cdots Cl_1^{(-)i}$	1,05(6)	2,28(6)	3,235(4)	151(5)
$O_5'—H_{5'O}\cdots O_2^{ii}$	0,90(6)	1,85(6)	2,746(5)	170(6)
Cloridrato monoidratado de lamivudina				
$N_3^{(+)}—H_3\cdots Cl_1^{(-)}$	0,98(4)	2,15(4)	3,112(3)	167(3)
$N_4—H_{4Nx}\cdots Cl_1^{(-)}$	0,90(4)	2,40(4)	3,193(3)	148(3)
$N_4—H_{4Ny}\cdots O_w$	0,91(4)	1,88(4)	2,776(4)	166(4)
$O_5'—H_{5'O}\cdots O_2^{iii}$	0,89(5)	1,87(4)	2,756(3)	174(4)
$O_w—H_{1w}\cdots Cl_1^{(-)iii}$	0,90(4)	2,26(4)	3,156(3)	173(4)
$O_w—H_{2w}\cdots Cl_1^{(-)iv}$	0,90(5)	2,26(5)	3,154(3)	174(4)

^h Os termos D e R generalizam átomos doadores e receptores de ligações de hidrogênio. Posições equivalentes: ⁱ $-x; -0,5+y; 1-z$; ⁱⁱ $1-x; -0,5+y, -z$; ⁱⁱⁱ $1+x; y; 1+z$; ^{iv} $x; y; 1+z$.

Como mencionado anteriormente, a formação da ligação de hidrogênio $O5'—H\cdots O2$ está relacionada à principal diferença conformacional de lamivudina nestes dois sais. Exceto por esta característica conformacional, o fármaco adota conformações similares nestas duas modificações cristalinas.

No cloridrato de lamivudina, o grupo 5'-hidroxílico está ligado ao átomo de carbono C5' em uma das duas posições equatoriais, aquela *syn* orientada em relação ao átomo de enxofre intracíclico do anel oxatiolano. Na posição axial está ligado um átomo de hidrogênio metilênico. Devido à conformação alternada das ligações aos átomos C4' e C5', a posição axial de ligação a C5' de lamivudina sempre estará *syn* orientada em relação ao fragmento de citosina, assumindo o plano do anel oxatiolano como referência. Tal conformação é assumida devido à impossibilidade de rotação sobre o semi-eixo da ligação C4'—C5' referente ao átomo de carbono C4', o qual é intracíclico ao anel oxatiolano. Conformações do braço 5'-CH₂OH similar a esta são observadas também em cinco dos oito confôrmeros presentes na dupla hélice de lamivudina, sendo que duas destas cinco cristalograficamente independentes moléculas de lamivudina apresentam átomos em sítios de ocupação desordenados.

No cloridrato monoidratado de lamivudina, o grupo 5'-OH está ligado ao átomo C5' na posição axial, conformação esta também encontrada em três das cinco moléculas cristalograficamente independentes de lamivudina presentes na forma I (95), na forma II (95), no sacarinato de lamivudina (99), no co-cristal de lamivudina com zidovudina e no 3,5-dinitrossalicilato de lamivudina (100), no maleato de lamivudina e em quatro confôrmeros da dupla hélice de lamivudina, sendo que três destas quatro cristalograficamente independentes moléculas apresentam átomos em sítios de ocupação desordenados.

De fato, uma rotação de cerca de 120° sobre o eixo da ligação covalente C4'—C5' diferencia os confôrmeros presentes nas versões anidra e monoidratada do cloridrato de lamivudina, conforme mostrado na Figura 13. Os ângulos torsionais O1'—C4'—C5'—O5' e S3'—C4'—C5'—O5' medem -175,8(2)° e 65,1(3)° no cloridrato de lamivudina e 63,4(4)° e -57,4(4)° no cloridrato monoidratado de lamivudina, respectivamente (Tabela 3). Como pode ser observado, há diferenças $\Delta\varphi$ entre os valores dos ângulos torsionais O1'—C4'—C5'—O5' e S3'—C4'—C5'—O5' das duas modificações cristalinas de lamivudina de 239,2° e 122,5° ($\Delta\varphi$ O1'/S3'—C4'—C5'—O5' = $|\varphi$ O1'/S3'—C4'—C5'—O5' do cloridrato de lamivudina - φ O1'/S3'—C4'—C5'—O5' do cloridrato monoidratado de lamivudina), o que denota esta rotação de terceira ordem sobre o eixo da ligação C4'—C5'.

Exceto pela diferença conformacional do braço hidroximetilênico, os confôrmeros de lamivudina presentes em ambas as estruturas não diferem muito. O fragmento de citosina exibe uma conformação *anti* devido à orientação oposta do oxigênio carbonílico em relação ao anel 2',3'-didesoxi-3'-tiiorribose, embora existam pequenas diferenças entre os valores dos ângulos de torção sobre a ligação glicosídica N1—C1' dos confôrmeros de lamivudina presentes no cloridrato de lamivudina e no cloridrato monoidratado de lamivudina (Tabela 3).

O fragmento de citosina exibe uma conformação *anti* em todas as fases cristalinas de lamivudina conhecidas correntemente.

Figura 13 – Sobreposição dos conformêros de lamivudina presentes nas estruturas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma maior clareza da ilustração.

Similarmente às conformações do fragmento de citosina relacionadas nas duas modificações cristalinas descritas acima, o anel 2',3'-didesoxirribose com a substituição isostérica do grupo 3'-metileno por um átomo de enxofre apresenta uma conformação envelope com o átomo de enxofre no ponto de inflexão no cloridrato de lamivudina e no cloridrato monoidratado de lamivudina, átomo de enxofre este deslocado do plano mínimo quadrado formado pelos átomos O1', C1', C2' e C4' por 0,853(1) Å e 0,787(1) Å nas duas estruturas, respectivamente (o desvio quadrático médio dos átomos ajustados no plano mínimo quadrado é 0,0319 Å no cloridrato de lamivudina e 0,0456 Å no cloridrato monoidratado). Considerando o plano formado por estes quatro átomos, o átomo de enxofre está *syn* orientado em relação à citosina, configurando uma conformação similar a C3'-*endo* comum em anéis de ribose de nucleotídeos canônicos. Esta conformação também ocorre na forma I de lamivudina (95), no sacarinato de lamivudina (99), no co-cristal de lamivudina com zidovudina e no 3,5-dinitrossalicilato de lamivudina (100), no maleato de lamivudina e na dupla hélice de lamivudina. Desvios discretos entre os valores dos ângulos de torção sobre as ligações do anel oxatiolano foram observados nas estruturas destes sais de lamivudina (Tabela 3).

Tabela 3 - Ângulos de torção selecionados dos confôrmeros de lamivudina presentes nas estruturas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina determinadas à temperatura de 150 K.

Parte da estrutura	Torção	Cloridrato de lamivudina	Cloridrato monoidratado de lamivudina
Ligação N1—C1' entre os anéis de citosina e oxatiolano	C2—N1—C1'—O1'	161,9(2)°	164,2(3)°
	C6—N1—C1'—O1'	-22,1(3)°	-13,8(4)°
	C2—N1—C1'—C2'	-78,1(3)°	-75,3(4)°
	C6—N1—C1'—C2'	97,9(3)°	106,7(4)°
Anel oxatiolano	O1'—C1'—C2'—S3'	35,4(4)°	36,6(3)°
	C1'—C2'—S3'—C4'	-41,4(3)°	-40,0(2)°
	C2'—S3'—C4'—O1'	38,7(3)°	34,8(2)°
	S3'—C4'—O1'—C1'	-24,8(4)°	-19,2(3)°
	C4'—O1'—C1'—C2'	-6,6(5)°	-11,4(3)°
Braço 5'-CH ₂ OH	O1'—C4'—C5'—O5'	-175,8(2)°	63,4(4)°
	S3'—C4'—C5'—O5'	65,1(3)°	-57,4(4)°

3.3 Caracterização cristalográfica por DRXP

Os difratogramas de raios X experimentais do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina foram comparados com os padrões teóricos de DRX simulados a partir das respectivas estruturas cristalinas determinadas à temperatura ambiente (Figura 14).

Uma vez que estes sais de lamivudina foram preparados usando a forma II do fármaco, sinais de DRX característicos desta fase poderiam ser observados nos difratogramas experimentais do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina como consequência da cristalização da forma sólida usada como partida a para preparação destes sais. A cristalização simultânea do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina também seria sondada através da detecção de picos de DRX de uma destas duas fases cristalinas no difratograma experimental da outra. Igualmente, reflexões de Bragg da forma I e da forma III, as quais são hidratos de lamivudina, poderiam ser detectadas caso estas fases sólidas cristalizassem como impurezas cristalinas.

Figura 14 – Comparação entre os padrões teóricos de DRXP do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina (linhas verticais) e os difratogramas experimentais de amostras destas modificações cristalinas (linhas contínuas através dos pontos experimentais).

Entretanto, houve concordância entre os difratogramas experimentais e simulados, inexistindo intensidades de DRX em posições 2θ que não foram esperadas para as respectivas fases cristalinas. Faixas angulares em 2θ caracterizadas por intensidades difusas também não foram observadas nos difratogramas experimentais do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina. Estas regiões de espalhamento difuso nos difratogramas são comumente referidas como halos amorfos e são referentes ao espalhamento dos raios X por material amorfo.

Portanto, as comparações entre os difratogramas experimentais e teóricos dos sais de lamivudina preparados permitiram inferir a inexistência de impurezas cristalinas ou amorfas em proporções maiores ou iguais a 5% (m/m). Em termos quantitativos, vale destacar que intensidades de DRX de fases cristalinas ou amorfas cujas percentagens em massa são $\geq 5\%$ podem ser detectadas em misturas sólidas (169,170). Uma vez que impurezas sólidas não

foram detectadas nos difratogramas de raios X dos dois sais preparados, foi possível concluir que as amostras do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina foram preparadas com uma pureza $\geq 95\%$ (m/m). Igualmente, foi demonstrado o alto rendimento dos processos de preparação destas modificações cristalinas.

3.4 Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman

A comparação dos espectros no IV do cloridrato de lamivudina e cloridrato monoidratado de lamivudina confirmaram a presença de água nesta segunda modificação cristalina (Figura 15). Bandas de absorção em 1704 cm^{-1} e 3420 cm^{-1} foram observadas no espectro na região do IV do cloridrato monoidratado de lamivudina. Estas bandas foram atribuídas aos modos vibracionais de deformação angular δ_{OH} e estiramento ν_{OH} da molécula de água, respectivamente. Na estrutura do cloridrato monoidratado de lamivudina, as moléculas de água são doadoras de ligações de hidrogênio para os ânions cloreto, estruturando as fileiras hidrofílicas $[(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}^-]_n$. Este envolvimento das moléculas de água em ligações de hidrogênio fortes está de acordo com o deslocamento da banda de absorção referente à deformação angular δ_{OH} para uma frequência maior que a esperada (em torno de 1630 a 1650 cm^{-1}). Ao mesmo tempo, a banda de absorção referente ao estiramento ν_{OH} da molécula de água é deslocada para uma frequência menor que a esperada (em torno de 3480 a 3520 cm^{-1}) devido à doação de ligações de hidrogênio pelas moléculas de água para os ânions cloreto. Bandas de absorção referentes a estes modos não foram observados no espectro na região do IV do cloridrato de lamivudina, o que reforça a determinação de uma estrutura anidra desta modificação cristalina.

Exceto por estas duas bandas de absorção no IV devido à presença da molécula de água estrutural no cloridrato monoidratado de lamivudina, os espectros das duas modificações cristalinas foram similares. Em 1667 cm^{-1} e 3390 cm^{-1} são observados em ambos os espectros das duas modificações cristalinas bandas intensas de absorção no IV. Estas bandas foram atribuídas aos modos vibracionais de estiramento $\nu_{\text{C=O}}$ e estiramento $\nu_{\text{N(+)—H}}$ do fragmento de citosina, respectivamente. Nos espectros de absorção na região do IV do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina, a banda referente ao modo vibracional $\nu_{\text{C=O}}$ sofre um deslocamento significativo para uma frequência menor que a esperada (em torno de 1700 a 1730 cm^{-1}) devido ao fato do grupo carbonílico participar da ligação de hidrogênio $\text{O5}'\text{—H}\cdots\text{O2}$ em ambos os casos (171,172).

Figura 15 - Espectros de absorção na região do IV do cloridrato de lamivudina (linha preta) e do cloridrato monoidratado de lamivudina (linha vermelha). (i) Bandas de absorção em 1704 cm⁻¹ e 3420 cm⁻¹ atribuídas a modos vibracionais da água. (*) Bandas de absorção em 1667 cm⁻¹ e 3390 cm⁻¹ atribuídas aos modos vibracionais $\nu_{C=O}$ e $\nu_{N(+)-H}$ do fragmento de citosina de lamivudina.

Espectros Raman são habitados principalmente por bandas referentes a modos vibracionais associados com deformações e estiramentos do esqueleto das moléculas constituintes do cristal (171). Os espectros de espalhamento Raman das duas amostras foram similares (Figura 16), exceto pelas bandas em 1635 cm⁻¹ e 3058 cm⁻¹ no espectro do cloridrato monoidratado de lamivudina. Estas bandas foram atribuídas à deformação angular δ_{OH} da molécula de água e ao estiramento ν_{CH} da ligação metilênica entre o carbono C5' e o átomo de hidrogênio na posição equatorial *syn* orientada em relação ao átomo de enxofre do anel oxatiolano.

Este último modo vibracional do cloridrato monoidratado de lamivudina está relacionado à conformação do braço hidroximetilênico de lamivudina. Conforme descrito anteriormente com base na determinação da estrutura desta modificação cristalina pela técnica

de DRXM, a orientação do grupo 5'-CH₂OH é a principal diferença conformacional entre estes dois sais de lamivudina. A similaridade entre os espectros Raman destas duas modificações está de acordo com a geometria similar dos confôrmeros de lamivudina nestas estruturas. As diferenças nos espectros podem ser correlacionadas à presença de água estrutural e à conformação do braço 5'-CH₂OH.

Figura 16 - Espectros Raman do cloridrato de lamivudina (linha preta) e do cloridrato monoidratado de lamivudina (linha vermelha). (i) Bandas de espalhamento em 1635 cm⁻¹ e 3058 cm⁻¹ atribuídas a um modo vibracional da água e à conformação do braço hidroximetilênico.

Referente à conformação do braço hidroximetilênico no cloridrato monoidratado de lamivudina, um dos átomos de hidrogênio nas posições equatoriais de ligação ao carbono C5' está *syn* orientado com respeito ao átomo de enxofre, o qual influencia o ambiente eletrônico ao redor deste átomo de hidrogênio. Este modo vibracional referente à banda em 3058 cm⁻¹ indica que o átomo de hidrogênio metilênico na posição equatorial em questão estaria sob um possível efeito de indução eletrônica causada pelo átomo de enxofre, aumentando a constante de força da ligação C5'—H entre o átomo de carbono C5' e o átomo de hidrogênio *syn* posicionado em relação ao enxofre. Tal efeito refletiria no deslocamento da banda de

espalhamento Raman referente a este estiramento ν_{CH} para uma frequência maior que a esperada (em torno de 2950 a 3020 cm^{-1}) (172,173).

De fato, a posição equatorial de ligação ao átomo C5' *syn* orientada em relação ao enxofre é ocupada pelo átomo de oxigênio hidroxílico no cloridrato de lamivudina. Portanto, o efeito do enxofre sobre o estiramento ν_{CH} das ligações metilênicas não é observado, uma vez que no cloridrato de lamivudina há átomos de hidrogênio ligados ao átomo C5' na posição axial e na posição equatorial *anti* orientada em relação ao enxofre. Portanto, a banda de espalhamento em 3058 cm^{-1} não está presente no espectro Raman da versão anidra do cloridrato de lamivudina. A Figura 17 ilustra a relação entre as conformações do braço 5'-CH₂OH destes dois sais e o estiramento ν_{CH} das ligações metilênicas.

Cloridrato monoidratado de lamivudina

Cloridrato de lamivudina

Figura 17 – O efeito de indução eletrônica proveniente do átomo de enxofre S3' do anel oxatolano em direção ao átomo de hidrogênio metilênico vizinho desloca a banda de espalhamento Raman referente ao estiramento ν_{CH} para frequências maiores que as esperadas no cloridrato monoidratado de lamivudina. Na versão anidra, tal efeito não é observado devido à conformação do braço hidroximetilênico de lamivudina.

3.5 Caracterização térmica por CED e TG

Os padrões de hidratação das duas versões do cloridrato de lamivudina inferidos com base nas determinações das estruturas por DRXM e nas atribuições espectroscópicas vibracionais foram corroborados pelas análises térmicas. No termograma do cloridrato monoidratado de lamivudina obtido por CED, um evento endotérmico em 124,6 °C foi

atribuído à eliminação da água estrutural e conseqüente formação de um dessolvato que funde em 186,9 °C (Figura 18). As temperaturas apresentadas nesta seção foram aquelas em que os eventos observados tanto nos termogramas de CED quanto naqueles por TG se iniciaram. Nenhuma anomalia abaixo da provável temperatura de fusão foi observada no termograma de CED do cloridrato de lamivudina (Figura 18). No termograma de CED desta modificação cristalina, há um evento endotérmico muito entálpico em 192,3 °C, o qual foi atribuído à fusão do cloridrato de lamivudina.

As prováveis temperaturas de fusão dos dois sais de lamivudina foram similares, mas não iguais. A diferença entre estas temperaturas de fusão pode ser correlacionada com a energia das redes cristalinas das fases sólidas em questão. Consequentemente, os valores da propriedade de estado sólido determinados para os dois sais de lamivudina, propriedade esta que está relacionada à energia de rede, foram concordantes com os perfis entálpicos das modificações cristalinas. As solubilidades do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina e suas relações com as energias de rede cristalina serão apresentadas na seção 3.7.

A partir da temperatura de 230 °C há anomalias nos termogramas de CED de ambas as modificações cristalinas. Estas anomalias ocorrem em temperaturas similares nos termogramas das duas modificações cristalinas, com entalpias aproximadas. Tais eventos podem ser atribuídos à decomposição das moléculas de lamivudina, conforme reportado na literatura para este fármaco (95,103).

Pelas curvas de TG (Figura 19), a amostra do cloridrato monoidratado de lamivudina sofre um decréscimo de 6,51% em sua massa à temperatura de 126,7 °C. Os termogramas de CED e TG da versão hidratada do cloridrato de lamivudina foram coerentes, uma vez que o termograma de CED desta modificação cristalina revelou a existência de um evento endotérmico em 124,6 °C, provavelmente devido à eliminação da água estrutural. Adicionalmente, o valor teórico para a perda de massa devido à dessolvatação de uma estrutura monoidratada do cloridrato de lamivudina é 6,35%. Portanto, os valores experimental e teórico para a eliminação da água estrutural da amostra do cloridrato monoidratado de lamivudina estão em boa concordância, o que corrobora a atribuição do evento térmico referente à dessolvatação e a estequiometria equimolar entre água e cloridrato de lamivudina desta estrutura.

Figura 18 – Termogramas de CED do cloridrato de lamivudina (linha preta) e cloridrato monoidratado de lamivudina (linha vermelha).

No termograma de TG do cloridrato de lamivudina (Figura 19), por sua vez, a perda de massa significativa se inicia em 193,7 °C, com um decréscimo de massa de 13,87%. Esta perda de massa está em concordância com o valor teórico de 13,74% para a eliminação do cloreto de hidrogênio da estrutura do cloridrato de lamivudina. Então, há a fusão do cloridrato de lamivudina seguida por decomposição devido à remoção do cloreto de hidrogênio. Este evento é observado no termograma de CED do cloridrato de lamivudina como um pico exotérmico bem definido que sucede a fusão endotérmica em 192,3 °C. Na curva de TG do cloridrato monoidratado de lamivudina, há também uma perda de massa de 13,04% à temperatura de 188,3 °C. Este evento foi atribuído, também, à eliminação do cloreto de hidrogênio. No caso do cloridrato monoidratado de lamivudina, a perda teórica referente à eliminação do cloreto de hidrogênio é 12,86%.

Figura 19 - Curvas de TG do cloridrato de lamivudina (linha preta) e cloridrato monoidratado de lamivudina (linha vermelha). A primeira derivada da curva de TG do cloridrato monoidratado de lamivudina (linha azul) destaca os limites da integração para as perdas de massa em 126, 7 °C e 188,3 °C.

3.6 Recuperação em solução por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A pureza química das modificações cristalinas preparadas e a estequiometria equimolar proposta com base na determinação estrutural pela técnica de DRXM foram avaliadas através do procedimento de recuperação do fármaco em solução por CLAE. Na Figura 20 são mostrados os cromatogramas referentes aos ensaios de recuperação do fármaco a partir do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina.

Figura 20 - Cromatogramas da forma II de lamivudina (amostra padrão), cloridrato de lamivudina e cloridrato monoidratado de lamivudina. Um único sinal cromatográfico referente à lamivudina é observado nos três cromatogramas.

Os teores recuperados de lamivudina nas duas modificações cristalinas, os teores esperados com base na estequiometria equimolar e as purezas relativas determinadas são apresentados na Tabela 4. Houve concordância entre as quantidades recuperadas de lamivudina e os valores calculados correspondentes. Portanto, a estequiometria equimolar destas modificações cristalinas pode ser quantitativamente confirmada também por CLAE.

As purezas relativas médias das amostras do cloridrato de lamivudina e cloridrato monoidratado de lamivudina foram calculadas assumindo a equimolaridade entre as espécies formadoras dos cristais (Tabela 4). Os valores obtidos revelaram que as amostras destas duas modificações cristalinas apresentavam purezas satisfatórias para serem representativas das respectivas fases sólidas nos ensaios de solubilidade no equilíbrio.

Tabela 4 - Recuperação e pureza do fármaco no cloridrato de lamivudina e no cloridrato monoidratado de lamivudina.

	Cloridrato de lamivudina	Cloridrato monoidratado de lamivudina
Teor experimental médio (g de lamivudina /g de amostra)	0,927±0,008	0,839±0,018
Teor esperado para estequiometria equimolar (g de lamivudina /g de amostra)	0,866	0,812
Pureza relativa média (%)	107,5±0,7	102,8±2,3

3.7 Solubilidade no equilíbrio

As solubilidades no equilíbrio do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina foram maiores que a solubilidade da forma II do fármaco. O cloridrato de lamivudina apresentou uma solubilidade no equilíbrio de 148 ± 5 mg/mL. Sua versão monoidratada foi solúvel 417 ± 15 mg/mL.

Para comparar estes valores com a respectiva propriedade de estado sólido da forma II de lamivudina, a qual é incorporada em formulações farmacêuticas, a sua solubilidade foi também determinada sob as mesmas condições analíticas empregadas nos ensaios de solubilidade do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina.

A forma II de lamivudina revelou uma solubilidade de 127 ± 2 mg/mL. Este valor é maior que a solubilidade reportada para esta fase cristalina de lamivudina, o que se deve principalmente à diferença da temperatura de dissolução entre os experimentos. A solubilidade reportada da forma II de lamivudina é 70 mg/mL à temperatura de 20 °C, enquanto que neste estudo a solubilidade foi determinada à temperatura de 26 ± 3 °C. Por esta razão, os valores de solubilidade das modificações cristalinas preparadas devem ser interpretados comparativamente com a solubilidade de uma forma conhecida estimada usando os mesmos métodos e procedimentos experimentais.

Geralmente, modificações cristalinas contendo as espécies ionizadas são mais solúveis que as correspondentes formas cristalinas contendo as espécies neutras (167). Desta forma, as altas solubilidades do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina estão de acordo com o caráter iônico das duas modificações cristalinas. Em adição, ânions

cloreto apresentam um raio iônico pequeno e, por esta razão, a hidratação destes íons é favorável (174).

A maior solubilidade do cloridrato monoidratado de lamivudina em comparação à sua versão anidra foge à regra, uma vez que hidratos comumente são menos solúveis que as respectivas formas anidras (167). Lamivudina apresenta um comportamento anômalo com respeito à solubilidade de suas formas sólidas. O sacarinato de lamivudina (e também o maleato de lamivudina, conforme apresentado no próximo Capítulo) é menos solúvel que a forma II de lamivudina (99), contrariando o comportamento geral dos sais. As solubilidades dos sais geralmente são maiores que aquelas dos correspondentes precursores neutros em soluções de pH cujas formas moleculares ionizadas prevalecem sobre as neutras (60,61,62). Neste sentido, lamivudina também excede a regra sobre a solubilidade de hidratos, uma vez que o cloridrato de lamivudina é menos solúvel que cloridrato monoidratado de lamivudina.

Em ambas as modificações cristalinas, há uma ligação de hidrogênio intermolecular $O5'-H\cdots O2$ entre as moléculas de lamivudina através dos grupos carbonílico e hidroxílico. No cloridrato monoidratado de lamivudina, a direcionalidade desta ligação de hidrogênio é maior que no cloridrato de lamivudina, conforme discutido na seção 3.2. Considerando somente a inspeção geométrica desta ligação de hidrogênio, haveria uma maior estabilização da estrutura do cloridrato monoidratado de lamivudina. Isto refletiria em uma menor solubilidade desta modificação cristalina em relação à versão anidra. Todavia, isto não foi observado experimentalmente.

De fato, o estabelecimento de relações entre solubilidade e estrutura cristalina não é um exercício simples (99). Contribuições entálpicas e entrópicas governam as propriedades de estado sólido, sendo que características estruturais permitem apenas inferir o comportamento de uma fase cristalina. Vale ainda destacar que lamivudina é uma exceção às regras de solubilidades de sais e pouco é conhecido sobre esta irregularidade.

Mesmo assim, a maior solubilidade do cloridrato monoidratado de lamivudina em relação à forma anidra correspondente pode ser interpretada com base em características estruturais discutidas na seção 3.2. Na versão hidratada, as moléculas do fármaco são ancoradas através das ligações de hidrogênio $N3^{(+)}-H\cdots Cl1^{(-)}$ e $N4-H4N_x\cdots Cl1^{(-)}$ a cadeias hidrofílicas formadas ao longo da direção [100] por unidades alternantes de moléculas de água e ânions cloreto. Interações $\pi-\pi$ são responsáveis pela sobreposição das moléculas do fármaco paralelamente a esta direção. Ao longo da direção [101], cada unidade de lamivudina também se ancora a uma outra fileira hidrofílica vizinha relacionada por simetria translacional

através da ligação de hidrogênio $N4-H4Ny\cdots Ow$ e a outra molécula do fármaco por meio da ligação $O5'-H\cdots O2^{iii}$ (Tabela 2). Em duas dimensões, o empacotamento cristalino do cloridrato monoidratado de lamivudina também pode ser descrito como cadeias unidimensionais estruturadas paralelamente à direção [101] e sobrepostas ao longo da direção [100]. Ao longo destas duas dimensões, ligações de hidrogênio e interações $\pi-\pi$ são responsáveis pela manutenção da estrutura. Contudo, não há interações fortes entre as moléculas de lamivudina ancoradas a cadeias hidrofílicas relacionadas por simetria roto-translacional. Consequentemente, o empacotamento cristalino não é fortemente estruturado ao longo do eixo *b* (Figura 21).

Já no cloridrato de lamivudina, há interações intermoleculares fortes entre as espécies constituintes do cristal ao longo das três dimensões. Cadeias unidimensionais arquitetadas ao longo da direção [010] são estabilizadas através de ligações de hidrogênio $N3^{(+)}-H\cdots Cl1^{(-)}$, $N4-H4Nx\cdots Cl1^{(-)}$ e $N4-H4Ny\cdots Cl1^{(-)i}$ entre unidades catiônicas e aniônicas alternantes. Estas cadeias são entrecruzadas ao longo da direção [10-1] por meio da ligação de hidrogênio $O5'-H\cdots O2^{ii}$ entre moléculas de lamivudina e sobrepostas ao longo da direção [100] por meio de interações $\pi-\pi$ entre fragmentos de citosina (Figura 21). Portanto, o empacotamento cristalino do cloridrato de lamivudina resulta em uma estrutura tridimensional mais coesa em relação ao cloridrato monoidratado de lamivudina. No cloridrato de lamivudina há sobreposição de redes unidimensionais entrecruzadas bidimensionalmente, arquitetando uma estrutura densamente empacotada. Já na versão hidratada, a coesão da estrutura é menor devido à inexistência de interações intermoleculares fortes entre as moléculas de lamivudina ancoradas a fileiras hidrofílicas dispostas ao longo do eixo *b*.

Valores de densidade calculados com base nas estruturas cristalinas destes dois sais determinadas por DRXM (Tabela 1) corroboram a coesão diferencial destas modificações cristalinas. À temperatura ambiente, as densidades calculadas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monoidratado de lamivudina são $1,599\text{ g/cm}^3$ e $1,524\text{ g/cm}^3$, respectivamente. A maior densidade da versão anidra indica que o seu empacotamento cristalino é mais compacto em relação à forma monoidratada. Esta forte coesão intermolecular dificulta a acessibilidade da água às moléculas de lamivudina dentro da rede cristalina do cloridrato de lamivudina. Já no cloridrato monoidratado de lamivudina a liberação das moléculas do fármaco para a solução pode ser favorecida devido a menor compactação de sua rede cristalina. As moléculas do fármaco podem ser prontamente desancoradas das fileiras hidrofílicas do cloridrato monoidratado de lamivudina.

Figura 21 – Estruturação tridimensional do (a) cloridrato de lamivudina e do (b) cloridrato monoidratado de lamivudina. Direções cristalográficas paralelas e normais aos planos de projeção são representadas como setas pretas e cinzas, respectivamente.

Em termos termodinâmicos, a provável temperatura de fusão do cloridrato de lamivudina é mais elevada que aquela do cloridrato monoidratado de lamivudina, conforme apresentado na seção 3.5. Esta propriedade de estado sólido reflete diretamente a energia da rede cristalina, parâmetro termodinâmico este que está relacionado à solubilidade no equilíbrio (58). Portanto, a versão anidra possui uma maior energia de rede, o que pode ser entendido como um resultado da estabilização tridimensional da estrutura por meio de interações intermoleculares fortes. Quanto maior a energia de rede cristalina, maior a estabilidade da fase sólida e menor a solubilidade no equilíbrio (58). Em suma, a maior energia da rede cristalina do cloridrato de lamivudina está em concordância com sua menor solubilidade.

4 ENGENHARIA DE CRISTAIS DE FÁRMACOS: MALEATO DE LAMIVUDINA

O maleato de lamivudina foi planejado com base na estrutura do sacarinato de lamivudina reportado na literatura (99). A inspeção da estrutura do sacarinato de lamivudina resultou no reconhecimento de características químicas e estruturais da sacarina que direcionaram a seleção de um agente formador com maiores possibilidades de arquitetar um sal de lamivudina experimentalmente. Portanto, uma estratégia de engenharia de cristais moleculares baseada na inspeção de uma estrutura conhecida foi empregada no preparo do maleato de lamivudina.

A abordagem racional usada para a seleção do agente formador de sal foi baseada em aspectos físico-químicos, intramoleculares e intermoleculares. Primeiramente, sacarina é desprotonada no sacarinato de lamivudina (99). A forma aniônica (sacarina)[−] cristaliza neste sal de lamivudina devido à transferência de seu próton dissociável para o fármaco. Desta forma, um agente formador de sal com uma constante de dissociação ácido-base (pK_a) similar àquela de sacarina é um candidato promissor a formar um sal com lamivudina, transferindo seu próton para o fármaco com uma força ácida equivalente àquela de sacarina. De fato, esta característica físico-química deve ser respeitada quando e um sal de lamivudina é planejado com base no sacarinato de lamivudina. Valores de pK_a de 1,8 e 4,3 são reportados para sacarina e lamivudina, respectivamente (166,175,176), com uma diferença de 2,5 entre os valores de pK_a do ácido (sacarina) e da base (lamivudina). Para que ocorra a formação de um sal e não um co-cristal, a diferença entre os valores de pK_a dos constituintes do cristal deve ser geralmente maior que três (31). No sacarinato de lamivudina, esta diferença revela que as forças de doação do próton de sacarina e de recepção de lamivudina cerceiam o limite para que a dissociação ácido-base ocorra. Portanto, o pK_a do agente formador de sal candidato à formação de uma sal com lamivudina não deve ser maior que àquela de sacarina.

O sacarinato de lamivudina cristalina no grupo espacial ortorrômbico $P2_12_12_1$ (99), com um par iônico (lamivudina)⁺(sacarina)[−] na unidade assimétrica cristalográfica. A inspeção de sua estrutura supramolecular revela que cada unidade aniônica de (sacarina)[−] é receptora de três ligações de hidrogênio intermoleculares doadas por dois cátions de

lamivudina relacionados por simetria roto-translacional de segunda ordem paralela ao eixo *c*. O nitrogênio $N^{(-)}$, o oxigênio carbonílico e um dos dois oxigênios do grupo SO_2 são as funcionalidades supramoleculares de sacarina envolvidas como receptoras destas três ligações de hidrogênio. Os grupos amínico $N-H$, imínico $N^{(+)}-H$ e hidroxílico $O-H^v$ ($v = 1,5 - x; 1 - y; -0,5 + z$) são doadores de ligações de hidrogênio de lamivudina para as funcionalidades supramoleculares de sacarina descritas anteriormente, nesta ordem (99). Portanto, um agente formador de sal candidato a substituir sacarina em uma estrutura ortorrômbica similar àquela do sacarinato de lamivudina deve possuir três funcionalidades supramoleculares receptoras de ligações de hidrogênio devidamente espaçadas como na molécula de sacarina. Em adição, sacarina é conformacionalmente rígida devido sua estrutura cíclica, o que restringe suas funcionalidades supramoleculares a posições definidas. Esta rigidez conformacional em torno das funcionalidades de ligações de hidrogênio deve ser também observada no agente formador de sal a ser selecionado para arquitetar uma estrutura ortorrômbica similar ao sacarinato de lamivudina.

Um ácido dicarboxílico insaturado, a saber, o ácido maléico, há muito tempo usado pela indústria farmacêutica como agente formador de sal para o preparo de cristais moleculares de fármacos (177-179), satisfaz estes requisitos químico-estruturais. Sua constante de dissociação ácida para o primeiro próton (pK_{a1}) é 1,83 (180), um valor condizente com o pK_a de sacarina. Portanto, a força ácida destes dois agentes formadores de sais é equiparável.

Os grupos carboxílico e carboxilato do ânion hidrogenomaleato possuem quatro oxigênios aptos a receber ligações de hidrogênio, dos quais três deles estão devidamente espaçados como as funcionalidades receptoras de ligações de hidrogênio de sacarina. Os dois oxigênios do grupo carboxilato $COO^{(-)}$ e o oxigênio carbonílico do grupo carboxílico $COOH$ do (ácido maléico) $^-$ são funcionalidades supramoleculares equivalentes ao nitrogênio $N^{(-)}$, ao oxigênio carbonílico $C=O$ e um dos dois oxigênios $S=O$ do grupo SO_2 de sacarina envolvidos em ligações de hidrogênio com lamivudina. Portanto, há equivalência estereoquímica das funcionalidades receptoras de ligações de hidrogênio de (sacarina) $^-$ e do (ácido maléico) $^-$. Similar à *Z*-estereoquímica em torno da ligação dupla do (ácido maléico) $^-$ que posiciona os grupos carboxílico e carboxilato do mesmo lado em relação ao plano de referência da ligação $C=C$, os grupos $CON^{(-)}$ e SO_2 de (sacarina) $^-$ estão *cis* orientados em relação à ligação $C-C$ responsável pela fusão dos anéis de sacarina. As características estruturais mínimas para a estruturação dos sais de lamivudina, ambas encontradas nas moléculas de sacarina e de ácido maléico, são ilustradas na Figura 22.

Figura 22 – Cristalóforo responsável pela formação do arranjo supramolecular definido observado nas estruturas do sacarinato de lamivudina e do maleato de lamivudina.

De fato, o arranjo dos quatro átomos de carbono do ácido maléico remete à disposição do átomo de carbono carbonílico, dos dois átomos responsáveis pela fusão intracíclica e do átomo de enxofre de sacarina, assim como os quatro átomos de oxigênio do ácido maléico são análogos aos átomos de oxigênio do grupo SO_2 e $C=O$ e ao nitrogênio $N^{(-)}$. O posicionamento fixo das funcionalidades receptoras de ligações de hidrogênio do ácido maléico é assegurado pela rigidez conformacional deste ácido dicarboxílico, o que é fornecido pela formação de uma estrutura cíclica estabilizada pela ligação de hidrogênio intramolecular $O-H \cdots O$ e, principalmente, pela dupla ligação.

A importância da rigidez e da estereoquímica da dupla ligação do ácido maléico para formação de um arranjo com lamivudina isoestrutural ao sacarinato de lamivudina é corroborada considerando um estudo de engenharia de cristais do fármaco anti-epilético lamotrigina. O arranjo supramolecular do sacarinato de lamotrigina (181) difere da arquitetura

supramolecular dos sais deste fármaco com ácido fumárico, ácido succínico e DL-ácido tartárico (182) (Figura 23).

Como o ácido maléico, estes três agentes formadores dos sais são ácidos dicarboxílicos com cadeia formada por quatro átomos de carbono. Todavia, a *E*-estereoquímica em torno da dupla ligação C=C do ácido fumárico (estereoisômero do ácido maléico devido à configuração dos ligantes em torno da dupla ligação) e a flexibilidade da ligação simples $C_{sp}^3-C_{sp}^3$ do ácido succínico e do DL-ácido tartárico posicionam os grupos carboxilato em lados opostos em relação ao plano das ligações C=C ou $C_{sp}^3-C_{sp}^3$. Portanto, as funcionalidades de ligações de hidrogênio destes ânions são orientadas diferentemente daquelas de (sacarina)⁻, resultando em arranjos diferentes dos sais de lamotrigina.

Vale ressaltar também a relevância do caráter ácido-base dos agentes formadores do sal na estruturação de arranjos supramoleculares equivalentes. Nos sais de lamotrigina com ácido fumárico, ácido succínico e DL-ácido tartárico, os dois grupos carboxílicos estão dissociados, enquanto que no sacarinato de lamotrigina há a transferência de somente um próton do agente formador do sal para uma molécula do fármaco. De fato, sacarina possui apenas um próton dissociável. Já o ácido maléico possui dois prótons dissociáveis, embora a formação da ligação de hidrogênio intramolecular O—H•••O, relacionada à sua *Z*-estereoquímica, favoreça a permanência de um dos átomos de hidrogênio dissociáveis na estrutura do ânion hidrogenomaleato. Como consequência, a força ácida relativa à liberação de um dos dois prótons do ácido maléico é reduzida, com aumento da constante de dissociação para o segundo próton (pK_{a2}). O pK_{a2} do ácido maléico (6,02) é maior que os valores correspondentes do ácido fumárico (4,54), ácido succínico (5,48) e DL-ácido tartárico (4,24) (182), os quais não possuem ligações de hidrogênio intramoleculares estabilizando seus prótons dissociáveis. Portanto, o caráter ácido-base do ácido maléico assegura a dissociação de apenas um dos seus prótons na estrutura de um sal correspondente, assim como a sacarina também apresenta apenas uma carga negativa no sacarinato de lamivudina (99) e no sacarinato de lamotrigina (181). Por outro lado, ácido fumárico, ácido succínico e DL-ácido tartárico possuem pK_{a1} e pK_{a2} similares (182), resultando na transferência de ambos os prótons para as moléculas do fármaco.

A equivalência estrutural entre sais de fármacos depende desta transferência de prótons. Os arranjos supramoleculares do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina, onde há a transferência de um único próton dos contra-íons para lamivudina, são isoestruturais. Os sais de lamotrigina com ácido fumárico, ácido succínico e DL-ácido tartárico também são estruturalmente equivalentes (Figura 23), ocorrendo a doação de dois prótons dos

ácidos dicarboxílicos (182). O caráter isoestrutural destes sais de lamotrigina com os ácidos dicarboxílicos descarta a necessidade da planaridade dos agentes formadores de sais. Ácido fumárico é uma molécula planar devido à hibridização sp^2 dos seus átomos de carbono, enquanto ácido succínico e DL-ácido tartárico não são devido à presença de dois átomos de carbono com hibridização sp^3 . Mesmo assim, os sais de lamotrigina com estes agentes formadores de sais cristalizam em estruturas monoclinicas com um mesmo arranjo supramolecular (182).

A estrutura mínima de um agente formador de sal responsável pela formação de um cristal molecular com uma arquitetura supramolecular definida foi denominada como *cristalóforo*, em analogia ao termo *farmacóforo* usado em química medicinal para definir uma estrutura molecular mínima responsável por determinada atividade farmacológica (183,184). O reconhecimento de um cristalóforo permitirá prever a possibilidade de novos sais de lamivudina com arranjos intermoleculares definidos serem obtidos experimentalmente. Este conceito direciona a seleção de contra-íons detentores de propriedades físico-químicas, geometria e funcionalidades supramoleculares adequadas, os quais poderão ser substituídos para o preparo de modificações cristalinas de lamivudina com propriedades modificadas sem que ocorram alterações bruscas da arquitetura cristalina.

Figura 23 – Sais de lamotrigina com sacarina, ácido fumárico, ácido succínico e DL-ácido tartárico (181,182). Os sais do fármaco com os ácidos dicarboxílicos cristalizaram na forma de solvatos estequiométricos de DMSO, 1,3-dioxolano e tetrahidrofurano (THF), com uma molécula do solvente por molécula do fármaco. O DL-hemitartarato de lamotrigina foi obtido apenas na forma de um solvato de DMSO.

Apesar das similaridades entre sacarina e ácido maléico, há duas diferenças estruturais principais entre estes agentes formadores de sais. Os dois átomos de oxigênio do grupo SO_2 desviam do plano da molécula de sacarina, assim como há um fragmento benzênico fundido ao núcleo S,S-dioxoisotiazolinona deste agente formador de sal. Já a molécula do ácido maléico é planar e não apresenta substituintes ligados aos carbonos envolvidos na dupla ligação.

Embora existam diferenças entre sacarina e ácido maléico, o maleato de lamivudina foi obtido experimentalmente e sua estrutura é similar àquela do sacarinato de lamivudina, conforme as previsões baseadas no reconhecimento das características químicas e estruturais necessárias para a formação deste sal de lamivudina. Uma vez que estas diferenças não opuseram à cristalização do maleato de lamivudina em uma estrutura ortorrômbica similar àquela do sacarinato de lamivudina, a não coplanaridade dos dois átomos de oxigênio do grupo SO_2 e a presença de um núcleo benzênico na molécula de sacarina foram correlacionadas às características supramoleculares dos sais e às suas solubilidades no equilíbrio, conforme apresentado nas seções 4.2 e 4.7.

4.1 Caracterização morfológica por MEV

Um único tipo de cristal, com relação ao hábito cristalino, foi obtido através dos procedimentos de preparo do maleato de lamivudina. Análises por microscopia fotônica com luz polarizada e por MEV revelaram cristais com aspecto de bastões, os quais cresceram isoladamente e em aglomerados.

As morfologias de um cristal do maleato de lamivudina e de aglomerados de cristais desta modificação cristalina são exibidas na Figura 24.

Figura 24 – Micrografias eletrônicas de varredura de cristais do maleato de lamivudina. (a) Um bastão isolado. (b) Aglomerados de bastões. Barra: 100 μm .

4.2 Determinação estrutural por DRXM

Conforme predito com base no reconhecimento das características químico-estruturais discutidas anteriormente, a estrutura do maleato de lamivudina foi caracterizada por um arranjo supramolecular similar àquele observado no sacarinato de lamivudina. O maleato de lamivudina cristalizou no grupo espacial ortorrômbico $P2_12_12_1$ com quatro espécies catiônicas (lamivudina)⁺, onde o átomo de nitrogênio imínico do anel pirimidínico foi protonado, e quatro ânions (ácido maléico)[−] por cela unitária. As dimensões da cela unitária do maleato de lamivudina foram similares às constantes de cela do sacarinato de lamivudina, em concordância com o caráter isoestrutural destas modificações cristalinas. Os desvios entre os parâmetros de cela unitária destas duas modificações cristalinas são devidos ao maior volume da sacarina em comparação com o ácido maléico. À temperatura de 100 K, há diferenças de 0,96 Å e 1,09 Å entre as dimensões dos eixos *b* e *c* do sacarinato de lamivudina e do maleato de lamivudina. Considerando que sacarina apresenta um anel benzênico fundido ao núcleo S,S-dioxoisotiazolinona e que moléculas deste agente formador de sal relacionadas por simetria translacional são dispostas entre moléculas de lamivudina ao longo da direção [010], a expansão do eixo *b* pode ser compreendida, conforme ilustrado na Figura 25. Igualmente, moléculas de sacarina relacionadas por simetria roto-translacional 2_1 são orientadas cauda a cauda ao longo da direção [001], justificando a expansão do eixo *c* do sacarinato de lamivudina em relação ao maleato de lamivudina.

Figura 25 – O fragmento benzênico fundido de sacarina é responsável pela expansão dos eixos *b* e *c* do sacarinato de lamivudina em relação às dimensões correspondentes do maleato de lamivudina. Setas aludem à expansão dos dois eixos devido à presença do núcleo aromático de sacarina.

A Tabela 5 exibe os dados cristalográficos e as estatísticas das determinações estruturais do maleato de lamivudina realizadas às temperaturas de 298 K e 100 K. Nesta tabela, os parâmetros de cela do sacarinato de lamivudina determinados à temperatura de 100 K (99) são apresentados para comparação com as grandezas correspondentes do maleato de lamivudina.

Tabela 5 - Dados cristalográficos do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina (99) e estatísticas das determinações estruturais do maleato de lamivudina a diferentes temperaturas.

		Maleato de lamivudina		Sacarinato de lamivudina
Fórmula mínima		(C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₃ S)(C ₄ H ₃ O ₄)		(C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₃ S) (C ₇ H ₄ NO ₃ S)
Massa da fórmula mínima (g/mol)		345,33		412,44
Sistema cristalino		ortorrômbico		ortorrômbico
Grupo espacial		<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>Z</i> / <i>Z'</i>		4 / 1		4 / 1
Temperatura (K)		298(1)	100(2)	100(2)
Dimensões da cela unitária	<i>a</i> (Å)	5,4584(3)	5,4130(1)	5,3464(6)
	<i>b</i> (Å)	12,8761(8)	12,7870(4)	13,7459(14)
	<i>c</i> (Å)	21,816(1)	21,6501(7)	22,738(2)
Volume da cela unitária (Å ³)		1533,3(2)	1498,53(7)	1671,1(3)
Densidade calculada (g/cm ³)		1,496	1,531	1,639
Coeficiente de absorção μ (mm ⁻¹)		0,252	0,258	0,364
<i>Coleta dos dados e determinação estrutural</i>				
Dimensões do cristal (mm ³)		0,35 x 0,06 x 0,05		
Intervalo em θ (°)		3,22 - 25,53	3,19 - 25,34	
Intervalo dos índices	<i>h</i>	-6 a 6	-6 a 6	
	<i>k</i>	-15 a 13	-15 a 15	
	<i>l</i>	-25 a 25	-26 a 24	
Reflexões coletadas		5067	16112	
Reflexões independentes		2808	2711	
Índice de simetria (<i>R</i> _{int})		0,0621	0,1009	
Completeza para $\theta_{\text{máx}}$ (%)		98,6	98,7	
<i>F</i> ₀₀₀		720	720	
Parâmetros refinados		223	223	
Qualidade do ajuste sobre <i>F</i> ²		0,993	1,095	
Índices residuais para <i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)		<i>R</i> ₁ = 0,0473	<i>R</i> ₁ = 0,0443	
		<i>wR</i> ₂ = 0,0839	<i>wR</i> ₂ = 0,1101	
Índices residuais para todos os dados		<i>R</i> 1 = 0,1094	<i>R</i> 1 = 0,0534	
		<i>wR</i> 2 = 0,1378	<i>wR</i> 2 = 0,1153	
$\Delta\rho_{\text{máx}} / \Delta\rho_{\text{mín}}$ (e/Å ³)		0,175/-0,220	0,373/-0,290	
Estrutura absoluta	Parâmetro de Flack	0,18(14)	-0,01(11)	
	Pares de Friedel	1135	1109	
Nº de depósito no CCDC		739173	739174	267331

O maleato de lamivudina exibiu um padrão de interações intermoleculares similar ao sacarinato de lamivudina (99) (Figura 26), o que permitiu, inclusive, estabelecer relações entre as estruturas cristalinas destes sais e suas solubilidades, conforme apresentado na seção 4.7. No maleato de lamivudina, as ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo os átomos $N3^{(+)}-H\cdots O1_{xM}$ e $N4-H4N_x\cdots O1_{yM}^{(-)}$ entre o fragmento de citosina de lamivudina e o grupo carboxilato do hidrogenomaleato mimetizam as ligações de hidrogênio entre os átomos $N3^{(+)}-H\cdots O1=C$ e $N4-H4N_x\cdots N2^{(-)}-C$ presentes no sacarinato de lamivudina (Figura 26). Estas duas ligações são responsáveis pela formação do par iônico (lamivudina)⁺(contra-íon)⁻ nas duas modificações cristalinas. A ligação de hidrogênio através dos átomos $O5'-H^v\cdots O4_{xM}$ entre o grupo hidroxílico de lamivudina e o átomo de oxigênio carbonílico do grupo carboxílico do hidrogenomaleato é análoga no sacarinato de lamivudina à ligação de hidrogênio $O5'-H^v\cdots O3=S$. Nesta ligação de hidrogênio, o grupo SO_2 do anion sacarinato é uma funcionalidade supramolecular equivalente ao grupo $COOH$ do hidrogenomaleato.

Figura 26 – Isoestruturas do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina, onde arranjos supramoleculares e padrões de interações intermoleculares são equivalentes. Projeções no plano (100) são mostradas. Posições equivalentes: (v) = 1,5 - x; 1 - y; - 0,5 + z; (vi) = 1 - x; - 0,5 + y; 1,5 - z; (vii) = 1 - x; 0,5 + y; 1,5 - z.

Estas três ligações de hidrogênio entre moléculas de lamivudina e contra-íon estruturam cadeias unidimensionais paralelas à direção [001] em que as espécies catiônicas e aniônicas se alternam. Tais cadeias são conectadas bidimensionalmente ao longo da direção [010] através de uma ligação de hidrogênio entre moléculas de lamivudina relacionadas por simetria roto-translacional de segunda ordem. Esta ligação envolve os fragmentos de citosina

de lamivudina, em que os grupos amínico e carbonílico são doadores e receptores da ligação de hidrogênio $N4-H4N_y \cdots O2^{vi}$ ($vi = 1 - x; -0,5 + y; 1,5 - z$). Na estrutura do sacarinato de lamivudina, um dos dois átomos de oxigênio do grupo SO_2 não participa de ligações de hidrogênio, assim como o átomo de oxigênio hidroxílico do grupo $COOH$ do ânion hidrogenomaleato está envolvido apenas como doador da ligação de hidrogênio intramolecular. Paralelo ao eixo a , o arranjo tridimensional é caracterizado pela sobreposição de fragmentos de citosina através de interações $\pi-\pi$. Moléculas dos contra-íons também são sobrepostas ao longo da direção $[100]$, embora as interações $\pi-\pi$ entre os núcleos benzênicos do ânion (sacarina) $^-$ sejam mais fortes que as interações entre elétrons π das duplas ligações de moléculas sobrepostas de (ácido maléico) $^-$ (188). As estruturas tridimensionais destes sais de lamivudina são mostradas na Figura 27.

Figura 27 – Estruturação tridimensional do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina (99). Projeções no plano (100) são mostradas (eixos b e c são orientados ao longo das direções vertical e horizontal). Ligações de hidrogênio entre moléculas de lamivudina foram circundadas.

Apesar das similaridades entre as arquiteturas supramoleculares do sacarinato de lamivudina e do maleato de lamivudina, uma característica do empacotamento cristalino destes sais foi diferente. No sacarinato de lamivudina há uma maior direcionalidade da ligação de hidrogênio $N_4-H_{4Ny}\cdots O_2^{vi}$ entre fragmentos de citosina. Conforme exibido na Tabela 6, o ângulo desta ligação de hidrogênio nesta modificação cristalina é mais próximo de 180° quando comparado com o parâmetro geométrico correspondente mensurado na estrutura do maleato de lamivudina. Há uma diferença de aproximadamente 26° entre os valores dos ângulos da ligação de hidrogênio $N_4-H_{4Ny}\cdots O_2^{vi}$ destes sais de lamivudina. O alinhamento dos fragmentos de citosina conectados através desta ligação de hidrogênio está relacionado à sua direcionalidade. Há ângulos de $25,05(8)^\circ$ e $9,57(6)^\circ$ entre os planos médios citosínicos ligados através do contato $N_4-H_{4Ny}\cdots O_2^{vi}$ no maleato de lamivudina e no sacarinato de lamivudina, respectivamente (Figura 28). Portanto, a menor direcionalidade desta ligação de hidrogênio no maleato de lamivudina é consequência dos fragmentos citosínicos estarem desalinhados nesta estrutura. No sacarinato de lamivudina, efeitos estéricos envolvendo o esqueleto molecular volumoso dos ânions sacarinato sobrepostos ao longo da direção [100] forçam o alinhamento dos planos citosínicos. Tais repulsões estéricas entre as moléculas de sacarina e os fragmentos de citosina de lamivudina são devidas principalmente ao átomo de oxigênio do grupo SO_2 que não está envolvido em ligações de hidrogênio intermoleculares clássicas.

Tabela 6 - Geometria das ligações de hidrogênio clássicas presentes nas estruturas do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina (99).

D—H $\cdots$ R ^h	D—H (Å)		H $\cdots$ R (Å)		D $\cdots$ R (Å)		D—H $\cdots$ R ($^\circ$)	
	Maleato	Sacarinato	Maleato	Sacarinato	Maleato	Sacarinato	Maleato	Sacarinato
$N_3^{(+)}-H_3\cdots O_{1xM}/O_1^j$	0,89(4)	0,87(3)	1,80(4)	1,78(3)	2,675(3)	2,644(2)	169(4)	171(2)
$N_4-H_{4Nx}\cdots O_{1yM}^{(-)}/N_2^{(-)}$	0,98(4)	0,81(3)	1,85(3)	2,14(3)	2,822(3)	2,946(2)	171(3)	172(3)
$O_5-H^v\cdots O_{4xM}/O_3$	0,79(5)	0,77(3)	1,90(5)	2,17(3)	2,686(3)	2,928(2)	173(5)	170(3)
$N_4-H_{4Ny}\cdots O_2^{vi}$	0,87(4)	0,89(3)	2,06(4)	1,96(3)	2,789(3)	2,838(2)	141(3)	167(2)

^h Os termos D e R generalizam átomos doadores e receptores de ligações de hidrogênio. ^j Barras separam átomos do hidrogenomaleato daqueles do sacarinato. Posições equivalentes: ^v 1,5 - x; 1 - y; - 0,5 + z; ^{vi} 1 - x; - 0,5 + y; 1,5 - z.

Figura 28 – (a) Os pares iônicos (lamivudina)⁺(contra-íon)⁻ são conectados ao longo da direção [010] através de ligações de hidrogênio entre fragmentos de citosina no maleato de lamivudina e no sacarinato de lamivudina (99). (b) Os planos médios através dos fragmentos de citosina conectados por esta ligação são mais bem alinhados no sacarinato de lamivudina, como pode ser observado pelo menor valor do ângulo entre os planos (θ) nesta modificação cristalina. Setas aludem aos efeitos estéricos entre os fragmentos citosínicos e os átomos de oxigênio do grupo SO₂ de sacarina que não estão envolvidos em ligações de hidrogênio intermoleculares clássicas.

Similarmente à coincidência das arquiteturas supramoleculares do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina, as conformações do fármaco são semelhantes nestas estruturas, conforme pode ser observado pela sobreposição das moléculas de lamivudina presentes nos dois sais (Figura 29). Nesta figura, os elipsóides térmicos dos átomos não hidrogenóides da unidade assimétrica cristalográfica do maleato de lamivudina são exibidos. Em ambos os sais, os fragmentos de citosina e oxatiolano apresentam conformações similares às *anti* e C3'-*endo* observadas em nucleotídeos canônicos. Os valores dos ângulos de torção que descrevem a conformação das moléculas de lamivudina no maleato de lamivudina e no sacarinato de lamivudina (99) são mostrados na Tabela 7.

Figura 29 - Unidades assimétricas cristalográficas do maleato de lamivudina (esquerda) e do sacarinato de lamivudina (direita) determinadas à temperatura de 100 K e sobreposição das moléculas do fármaco destas modificações cristalinas (centro). Exceto na sobreposição molecular onde os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma maior clareza da ilustração, elipsóides térmicos a uma probabilidade de 50% e esferas de raio arbitrário representam os átomos não hidrogenóides e os átomos de hidrogênio, respectivamente. Na sobreposição molecular, as moléculas do fármaco do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina foram representadas por cores verde e azul, respectivamente.

Como pode ser observado na Tabela 7, há diferenças variando de $7,3^\circ$ a $13,9^\circ$ entre os valores dos ângulos de torção sobre a ligação glicosídica N1—C1' do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina. Estas diferenças estão relacionadas com o alinhamento dos planos dos fragmentos de citosina conectados através da ligação de hidrogênio N4—H4Ny...O2^{vi}, conforme discutido anteriormente nesta seção. Por exemplo, o ângulo de torção C6—N1—C1'—O1' assume valores de $-20,2(3)^\circ$ e $-7,1(2)^\circ$ no maleato de lamivudina e no sacarinato de lamivudina. O maior valor desta torção no sacarinato de lamivudina reflete a existência de uma discreta rotação sobre o eixo da ligação N1—C1' (Figura 30). Esta rotação posiciona o plano do anel citosínico mais próximo do eixo da ligação C1'—O1', o qual é paralelo ao plano da ligação de hidrogênio N4—H4Ny...O2^{vi}. Como consequência, um maior alinhamento entre os planos citosínicos é observado no sacarinato de lamivudina.

Figura 30 – Posição do plano do fragmento citosínico em relação ao eixo da ligação C1'—O1'. No sacarinato de lamivudina, o anel citosínico está mais paralelo ao eixo da ligação C1'—O1' quando comparado com o maleato de lamivudina. Consequentemente, os fragmentos de citosina conectados pela ligação de hidrogênio N4—H4Ny...O2 estão mais bem alinhados no sacarinato de lamivudina. Projeções nos planos *ab* e *ac* são exibidas acima e abaixo, respectivamente. As ligações entre os átomos C6—N1—C1'—O1' são ilustradas em vermelho para destacar a torção correspondente. A seta indica a rotação sobre o eixo da ligação N1—C1' que torna os fragmentos de citosina mais bem alinhados no sacarinato de lamivudina. Os átomos de hidrogênio foram omitidos visando aumentar a clareza dos diagramas estruturais.

Tabela 7 - Ângulos de torção selecionados das moléculas de lamivudina presentes nas estruturas do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina (99) determinadas à temperatura de 100 K.

Parte da estrutura	Torção	Maleato de lamivudina	Sacarinato de lamivudina
Ligação N1—C1' entre os anéis de citosina e oxatiolano	C2—N1—C1'—O1'	161,4(2)°	168,7(1)°
	C6—N1—C1'—O1'	-20,2(3)°	-7,1(2)°
	C2—N1—C1'—C2'	-78,6(3)°	-70,5(2)°
	C6—N1—C1'—C2'	99,8(3)°	113,7(2)°
Anel oxatiolano	O1'—C1'—C2'—S3'	37,2(3)°	36,8(2)°
	C1'—C2'—S3'—C4'	-41,1(2)°	-40,1(1)°
	C2'—S3'—C4'—O1'	36,2(2)°	35,2(1)°
	S3'—C4'—O1'—C1'	-20,7(3)°	-19,6(2)°
	C4'—O1'—C1'—C2'	-10,6(3)°	-11,3(2)°
Braço 5'-CH ₂ OH	O1'—C4'—C5'—O5'	60,4(3)°	66,5(2)°
	S3'—C4'—C5'—O5'	-59,8(3)°	-52,8(2)°

No caso da conformação envelope do anel oxatiolano, o átomo de enxofre está no ponto de inflexão com um deslocamento do plano mínimo quadrado formado pelos átomos O1', C1', C2' e C4' de 0,8415(8) Å e 0,8115(4) Å nas estruturas do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina, respectivamente (o desvio quadrático médio dos átomos ajustados no plano mínimo quadrado é 0,0431 Å no maleato de lamivudina e 0,0409 Å no sacarinato de lamivudina). Acerca da conformação do grupo 5'-CH₂OH, o átomo de oxigênio hidroxílico ocupa a posição axial de ligação ao átomo de carbono C5' em ambos os sais.

4.3 Caracterização cristalográfica por DRXP

O difratograma de raios X experimental da amostra do maleato de lamivudina foi concordante com o padrão teórico de DRX simulado usando sua estrutura cristalina determinada à temperatura ambiente (Figura 31). As posições das reflexões de Bragg presentes no difratograma de raios X da amostra analisada foram idênticas às calculadas com a estrutura determinada por DRXM. Concordância entre as intensidades difratadas e simuladas também foi observada. Todavia, efeitos de orientação preferencial dos cristalitos foram responsáveis por diferenças entre as intensidades observadas e calculadas de certas reflexões de Bragg. Efeitos de orientação preferencial foram esperados devido ao hábito de bastões dos cristais do maleato de lamivudina e afetaram principalmente as reflexões de Bragg (1 0 4), (1 1 5), (0 4 1) e (1 2 5), as quais são caracterizadas pelos ângulos de difração 23,2°, 27,2°, 28,2° e 29,8° em 2 θ , respectivamente.

Através da comparação entre os difratogramas de raios X experimental e calculado, foi possível afirmar a inexistência de reflexões de Bragg provenientes de outras formas sólidas do fármaco, principalmente da forma II de lamivudina usada para preparar a modificação cristalina, e do ácido maléico no difratograma de raios X da amostra do maleato de lamivudina. Halos amorfos referentes ao espalhamento dos raios X por material amorfo também não foram observados. Portanto, uma pureza cristalina de no mínimo 95% foi atribuída à amostra caracterizada do maleato de lamivudina. Esta pureza foi assumida considerando que reflexões de Bragg de fases cristalinas ou intensidades difusas de espalhamento provenientes de sólidos amorfos podem ser observadas em difratogramas de raios X por pó se suas percentagens forem maiores ou iguais a 5% da massa de uma mistura de sólidos (169,170), conforme discutido na seção 3.3. Desta forma, o alto rendimento dos

procedimentos que levaram à obtenção do maleato de lamivudina pode ser certificado pela técnica de DRXP.

Figura 31 – Comparação entre o padrão de DRXP teórico (linhas verticais) e o difratograma experimental (linhas contínuas através dos pontos experimentais) do maleato de lamivudina.

4.4 Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman

O espectro na região do IV do maleato de lamivudina foi caracterizado por bandas de absorção relacionadas a modos vibracionais do fármaco e do agente formador do sal (Figura 32). Em 1537 cm^{-1} e 1667 cm^{-1} são observadas bandas de absorção correspondentes ao estiramento $\nu_{\text{C}-\text{O}^-}$ do grupo carboxilato do hidrogenomaleato e ao estiramento $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ dos grupos carboxilato e carboxílico do hidrogenomaleato e do grupo carbonílico de lamivudina. A banda de absorção atribuída ao modo vibracional $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ é deslocada para uma frequência menor que a esperada (em torno de 1700 a 1730 cm^{-1}) como consequência do envolvimento dos grupos carbonílicos em ligações de hidrogênio intermoleculares, conforme descrito na seção 4.2. Foram observadas bandas de absorção em 3352 cm^{-1} , 3427 cm^{-1} e 3495 cm^{-1} no espectro na região do IV do maleato de lamivudina, as quais foram atribuídas aos

estiramentos $\nu_{\text{N-H}}$ e $\nu_{\text{N(+)—H}}$ do fragmento de citosina e ao estiramento $\nu_{\text{O—H}}$ do hidrogenomaleato, respectivamente.

Figura 32 - Espectro de absorção na região do IV do maleato de lamivudina. (i) Bandas de absorção em 1537 cm^{-1} , 1667 cm^{-1} , 3352 cm^{-1} , 3427 cm^{-1} e 3495 cm^{-1} atribuídas aos modos vibracionais $\nu_{\text{C=O}}$, $\nu_{\text{N—H}}$, $\nu_{\text{N(+)—H}}$ e $\nu_{\text{O—H}}$.

Bandas de espalhamento observadas no espectro Raman do maleato de lamivudina foram atribuídas a modos vibracionais que remeteram tanto aos grupos funcionais dos constituintes do cristal quanto à conformação da molécula do fármaco nesta modificação cristalina (Figura 33). Bandas de espalhamento em 790 cm^{-1} e 3057 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular fora do plano $\text{O}_{\text{C—H}}$ do fragmento de citosina e do hidrogenomaleato e ao estiramento $\nu_{\text{C—H}}$ da ligação metilênica entre o carbono C5' e o átomo de hidrogênio na posição equatorial *syn* orientada em relação ao átomo de enxofre do anel oxatiolano. No maleato de lamivudina, a molécula do fármaco exibe uma conformação do braço $5'\text{-CH}_2\text{OH}$ similar àquela do cloridrato monoidratado de lamivudina. Como no espectro Raman do cloridrato monoidratado de lamivudina, há um deslocamento da banda de espalhamento referente a este estiramento ν_{CH} para uma frequência maior que a esperada no espectro

correspondente do maleato de lamivudina (Figura 33). Este fenômeno foi atribuído a um possível efeito de indução eletrônica proveniente do átomo de enxofre vizinho ao átomo de hidrogênio metilênico (172,173), conforme descrito na seção 3.4.

Figura 33 - Espectro Raman do maleato de lamivudina. (i) Bandas de espalhamento em 790 cm⁻¹, 1642 cm⁻¹, 1709 cm⁻¹ e 3057 cm⁻¹ atribuídas a modos vibracionais das moléculas de lamivudina e hidrogenomaleato. O efeito de indução eletrônica proveniente do átomo de enxofre em direção ao átomo de hidrogênio metilênico vizinho, deslocando a banda de espalhamento Raman referente ao estiramento v_{CH} para 3057 cm⁻¹, é ilustrado.

Ainda, modos vibracionais referentes aos estiramentos v_{C=O} do maleato e do fragmento de citosina, ambos estes grupos carbonílicos funcionais no maleato de lamivudina como receptores de ligações de hidrogênio intermoleculares, podem ser inferidos com base nas bandas de espalhamento em 1642 cm⁻¹ e 1709 cm⁻¹ no espectro Raman do maleato de lamivudina.

4.5 Caracterização térmica por CED e TG

O termograma de CED do maleato de lamivudina foi caracterizado por dois eventos endotérmicos iniciando em 144,8 °C e 165,2 °C (Figura 34). O primeiro evento foi atribuído à sua fusão, a qual ocorre a uma temperatura inferior que aquela em que o sacarinato de lamivudina funde (182,3 °C) (99). Estas temperaturas de fusão refletem diretamente diferenças entre as energias das redes cristalinas destes dois sais de lamivudina, parâmetro termodinâmico este que foi correlacionado com as solubilidades no equilíbrio das modificações cristalinas. Desde que o maleato de lamivudina e o sacarinato de lamivudina são isoestruturais, as diferenças entre suas energias de rede resultam de propriedades dos contra-íons e de características supramoleculares diferentes entre os sais. A solubilidade do maleato de lamivudina e as relações desta propriedade de estado deste sal e do sacarinato de lamivudina com as suas energias de rede cristalina e características dos contra-íons e dos arranjos intermoleculares serão apresentadas na seção 4.7.

Por sua vez, o evento endotérmico observado no termograma de CED em 165,2 °C pode ser atribuído ao início da decomposição do maleato de lamivudina. Tal assinalamento é suportado pela inspeção da curva de TG desta modificação cristalina (Figura 34). A análise por TG da amostra do maleato de lamivudina revelou que a partir de 162,1 °C há uma perda de massa praticamente constante ao longo de toda a faixa de temperatura, indicando que o segundo evento endotérmico observado no termograma de CED pode estar relacionado com o começo da decomposição deste sal de lamivudina.

Figura 34 – Termogramas de CED e TG (parte superior direita) do maleato de lamivudina.

4.6 Recuperação em solução por CLAE

A pureza química da amostra do maleato de lamivudina e a estequiometria equimolar entre lamivudina e ácido maléico neste sal, a qual foi inferida com base na estrutura cristalina, foram certificadas através do ensaio de recuperação do fármaco em solução pela técnica de CLAE (Figura 35). A concentração determinada do fármaco se aproximou do teor calculado considerando a estequiometria equimolar do maleato de lamivudina, sendo que a pureza relativa da amostra desta modificação cristalina certificou sua representatividade no ensaio de solubilidade no equilíbrio da fase sólida em questão (Tabela 8).

Figura 35 – Cromatograma do maleato de lamivudina. Além do sinal cromatográfico referente à lamivudina, um pico atribuído ao hidrogenomaleato pode ser observado com um tempo de retenção de aproximadamente 90 s.

Tabela 8 - Recuperação e pureza do fármaco no maleato de lamivudina.

Maleato de lamivudina	
Teor experimental médio (g de lamivudina /g de amostra)	0,699±0,006
Teor esperado para estequiometria equimolar (g de lamivudina /g de amostra)	0,667
Pureza relativa média (%)	104,8±0,8

4.7 Solubilidade no equilíbrio

A solubilidade no equilíbrio do maleato de lamivudina foi menor que a solubilidade da forma II do fármaco e maior que a solubilidade do sacarinato de lamivudina. O maleato de lamivudina apresentou uma solubilidade no equilíbrio de 45 ± 3 mg/mL, enquanto que uma solubilidade de 127 ± 2 mg/mL foi determinada para a forma II do fármaco sob as mesmas condições analíticas e a solubilidade reportada do sacarinato de lamivudina é 10,56 mg/mL (99).

A baixa solubilidade do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina em relação ao polimorfo terapeuticamente utilizado deste fármaco está de acordo com a similaridade estrutural entre os sais. A menor solubilidade do sacarinato de lamivudina, e consequentemente do maleato de lamivudina, é atribuída à saturação da estrutura em termos de ligações de hidrogênio (99). Nestas estruturas, não há grupos doadores ou receptores de ligações de hidrogênio livres capazes de interagir com moléculas de água tão fortemente quanto na forma II de lamivudina.

A diferença entre as solubilidades do maleato de lamivudina e do sacarinato de lamivudina foi correlacionada com as energias das suas redes cristalinas. Em relação às temperaturas de fusão e energia de rede do sacarinato de lamivudina, o maleato de lamivudina funde a uma temperatura inferior, e, portanto, apresenta uma menor energia de rede, o que está de acordo com sua maior solubilidade. A maior estabilização da rede cristalina do sacarinato de lamivudina em relação ao maleato de lamivudina pode ser interpretada considerando o caráter lipofílico dos contra-íons e diferenças entre os arranjos supramoleculares das modificações cristalinas.

Embora os dois sais sejam estruturalmente relacionados, o caráter lipofílico do ácido maléico difere daquele da sacarina. Sacarina possui um fragmento benzênico anexado ao núcleo S,S-dioxoisotiazolinona. Este grupo benzênico aumenta muito a lipofilicidade de sacarina em relação ao ácido maléico, o que é refletido nas solubilidades aquosas destes agentes formadores dos sais. A solubilidade de sacarina é 4 mg/mL, enquanto 441 mg de ácido maléico são solúveis em 1 mL de água (186). Estes valores de solubilidades aquosas remetem às energias de hidratação destes agentes formadores dos sais. A maior energia de hidratação do ácido maléico está de acordo com a maior solubilidade do maleato de lamivudina.

A inspeção de características supramoleculares também permite compreender a maior solubilidade do maleato de lamivudina em relação ao sacarinato de lamivudina. Em ambos os sais há a ligação de hidrogênio intermolecular $N4-H4Ny\cdots O2^{vi}$ entre os fragmentos de citosina de moléculas de lamivudina relacionadas por simetria roto-translacional. A direcionalidade desta ligação de hidrogênio é maior no sacarinato de lamivudina, contribuindo para a estabilização da rede cristalina deste sal. Vale ressaltar que a maior direcionalidade desta ligação de hidrogênio é determinada por efeitos estéricos entre o átomo de oxigênio do grupo SO_2 que não participa de ligações de hidrogênio clássicas e fragmentos de citosina de moléculas de lamivudina sobrepostas ao longo da direção [100]. Este átomo de oxigênio força o alinhamento dos planos médios através dos fragmentos citosínicos conectados pela ligação de hidrogênio $N4-H4Ny\cdots O2^{vi}$. Como o hidrogenomaleato se comporta como uma molécula completamente planar, cada fragmento de citosina pode ser mais inclinado em relação a outro, reduzindo a linearidade da ligação de hidrogênio que conecta as moléculas de lamivudina através de seus fragmentos citosínicos. Por esta razão, a direcionalidade desta ligação de hidrogênio é menor no maleato de lamivudina. Esta característica geométrica do empacotamento cristalino contribui para uma menor estabilização da rede cristalina do maleato de lamivudina, o que está de acordo com sua maior solubilidade.

Em adição, no sacarinato de lamivudina há interações intermoleculares fracas envolvendo os átomos $C-H\cdots C$ dos anéis benzênicos dos ânions sacarinato relacionados por simetria roto-translacional e interações $\pi-\pi$ entre seus núcleos benzênicos sobrepostos ao longo da direção [100] (Figura 36). As interações $\pi-\pi$ responsáveis pela sobreposição entre os núcleos benzênicos do sacarinato são mais fortes que as interações entre elétrons π das duplas ligações dos ânions hidrogenomaleato (185). Estes contatos contribuem para a estabilização da rede cristalina do sacarinato de lamivudina, em concordância com sua menor solubilidade no equilíbrio. Em suma, contatos hidrofóbicos $C-H\cdots C$ e interações $\pi-\pi$ são responsáveis pelas diferenças entre as solubilidades dos sais de lamivudina enquanto que as ligações de hidrogênio clássicas governam a estruturação do sacarinato de lamivudina e do maleato de lamivudina e suas baixas solubilidades.

Figura 36 – Arranjo dos contra-íons no maleato de lamivudina e no sacarinato de lamivudina. Projeções paralelas às direções [010] e [100] são mostradas acima e abaixo, respectivamente. Contatos C—H...C entre os fragmentos benzênicos do ânion sacarinato são representados como linhas pontilhadas.

5 ESTRUTURAS DE LAMIVUDINA SIMILARES A ÁCIDOS NUCLÉICOS: HEMICLORIDRATO HEMIDRATADO DE LAMIVUDINA, 0,67-HIDRATO DE LAMIVUDINA E DUPLA HÉLICE DE LAMIVUDINA

Arranjos supramoleculares de lamivudina similares a estruturas de ADN, em que as moléculas do fármaco são pareadas através de seus fragmentos de citosina e sobrepostas helicoidalmente, foram preditas através da inspeção de uma das suas modificações cristalinas conhecidas, o 3,5-dinitrossalicilato hidratado de lamivudina (100). Nesta fase sólida de lamivudina, moléculas protonadas e neutras do fármaco estão conectadas através de três ligações de hidrogênio entre seus fragmentos de citosina, embora um ânion 3,5-dinitrossalicilato intercale os pares lamivudina $\rightleftharpoons$ lamivudina⁺ através de interações π - π (100) (Figura 37). A habilidade de moléculas neutras de lamivudina parearem com unidades protonadas foi observada nesta estrutura, apesar da sobreposição destes pares não ter ocorrido. Um arranjo supramolecular caracterizado pelo pareamento e sobreposição helicoidal dos fragmentos de citosina de lamivudina apresentaria similaridade com estruturas de *i*-ADN, as quais são ricas em resíduos de citidina pareados através de três ligações de hidrogênio entre fragmentos hemiprotonados de citosina justapostos helicoidalmente face a face (123-127). Estruturas de *i*-ADN são formadas covalentemente através de ligações fosfodiéster, enquanto que um arranjo supramolecular de lamivudina similar a *i*-ADNs seria estabilizado apenas por contatos não covalentes como ligações de hidrogênio e interações π - π .

Figura 37 – (a) Pareamento entre fragmentos hemiprotonados de citosina presente em estruturas de *i*-ADN ricos em citidina (acima) e pareamento entre moléculas protonada ($3TC^+$) e neutra ($3TC$) de lamivudina observado na estrutura do 3,5-dinitrossalicilato hidratado de lamivudina (100). (b) Intercalação de um ânion 3,5-dinitrossalicilato entre dois pares lamivudina $\equiv$ lamivudina $^+$ no 3,5-dinitrossalicilato hidratado de lamivudina (100).

Baseado na capacidade de pareamento de lamivudina, estruturas de lamivudina similares a ácidos nucleicos foram pesquisadas. A improbabilidade de existência de uma estrutura formada por pares de lamivudina sobrepostos helicoidalmente deriva da ausência dos grupos 3'-hidroxílico e 5'-fosfato neste fármaco ddN. Estruturas tetraméricas de ADN formadas por nucleotídeos e derivados, mas sem ligações covalentes fosfodiéster, são conhecidas (113-117), embora haja a necessidade dos grupos 5'-fosfato e 3'-hidroxila para que o arranjo supramolecular possa ser arquitetado. Caso obtida, uma estrutura de lamivudina mimetizando ADNs indicaria que os grupos 3'-hidroxílico e 5'-fosfato não são necessários para a estruturação de ácidos nucleicos.

Uma estrutura formada pelos pares lamivudina $\equiv$ lamivudina $^+$ requer a protonação parcial das moléculas do fármaco. Por esta razão, foi preparada uma matriz de cristalização similar àquela de onde cristais do cloridrato de lamivudina foram isolados, porém com um volume inferior de solução ácida de HCl utilizada para a protonação completa das moléculas do fármaco. Desde que o ânion 3,5-dinitrossalicilato intercala os pares de lamivudina se sobrepondo a eles através de interações π - π , contra-íons detentores de sistemas eletrônicos π , como o núcleo benzênico que ocorre no ácido 3,5-dinitrossalicílico, não foram utilizados visando favorecer a sobreposição dos fragmentos de citosina do fármaco. Após a evaporação do solvente, foram obtidos dois tipos de cristais quanto à morfologia externa. Cristais

apresentando aspectos de bastões e de primas hexagonais foram encontrados sob inspeção microscópica. Espécimes com hábitos cristalinos diferentes foram selecionados e tiveram suas celas unitárias determinadas por DRXM. Em concordância com a diferença entre suas características externas, duas celas unitárias muito distintas foram determinadas, revelando que duas modificações cristalinas haviam sido isoladas de uma mesma condição de cristalização. Um hemiclорidrato hemidratado de lamivudina havia cristalizado na forma de bastões, enquanto que os prismas hexagonais foram formados por um 0,67-hidrato de lamivudina.

5.1 Determinação estrutural por DRXM: Hemicloridrato hemidratado de lamivudina

O hemiclорidrato hemidratado de lamivudina cristalizou no grupo espacial triclinico $P1$ com duas espécies catiônicas (lamivudina)⁺, duas moléculas neutras do fármaco, dois ânions cloreto contrabalanceando as cargas positivas das duas unidades protonadas de lamivudina e duas moléculas de água por cela unitária. A estrutura desta modificação cristalina foi determinada apenas à temperatura de 150 K, uma vez que a qualidade do cristal inviabilizasse coletar, à temperatura ambiente, reflexões de média resolução com intensidades adequadas para a determinação estrutural satisfatória de uma pequena molécula. Mesmo assim, as constantes de cela foram mensuradas à temperatura ambiente, agregando à determinação desta estrutura o conhecimento sobre a inexistência de transições de fase entre a temperatura ambiente e 150 K. Os parâmetros de cela determinados às temperaturas baixa e ambiente e as informações relativas à coleta das intensidades de DRX e determinação da estrutura à temperatura de 150 K são exibidos na Tabela 9.

Tabela 9 - Constantes de cela às temperaturas baixa e ambiente e determinação estrutural à baixa temperatura do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina.

Hemicloridrato hemidratado de lamivudina			
Fórmula mínima	(C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₃ S)(C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S)(H ₂ O)Cl		
Massa da fórmula mínima (g/mol)	513,01		
Dimensões do cristal (mm ³)	0,15 x 0,11 x 0,09		
Sistema cristalino	Triclínico		
Grupo espacial	P1		
Z / Z'	2 / 2		
Temperatura (K)	298(1)	150(2)	
Dimensões da cela unitária	a (Å)	7,027(2)	6,972(5)
	b (Å)	12,221(3)	12,167(7)
	c (Å)	13,889(4)	13,867(8)
	α (°)	100,05(1)	100,52(3)
	β (°)	93,49(2)	93,15(4)
	γ (°)	90,97(2)	91,43(4)
Volume da cela unitária (Å ³)	1171,8(6)	1153,9(12)	
Densidade calculada (g/cm ³)	1,454	1,476	
Coleta dos dados completos e determinação estrutural			
Coeficiente de absorção μ (mm ⁻¹)			0,396
Fatores de transmissão mínimo e máximo (Gaussian)			T _{mín} = 0,940 T _{máx} = 0,965
Intervalo em θ (°)			2,99 - 25,22
Intervalo dos índices	h	-8 a 8	
	k	-14 a 14	
	l	-16 a 16	
Reflexões coletadas			13168
Reflexões independentes			5394
Índice de simetria (R _{int})			0,0878
Completeza para θ _{máx} (%)			97,6
F ₀₀₀			536
Parâmetros refinados			579
Qualidade do ajuste sobre F ²			1,098
Índices residuais para I > 2σ(I)			R _I = 0,1039
			wR ₂ = 0,2429
Índices residuais para todos os dados			R _I = 0,1909
			wR ₂ = 0,2912
Δρ _{máx} / Δρ _{mín} (e/Å ³)		0,456/-0,446	
Estrutura absoluta	Parâmetro de Flack	0,1(2)	
	Pares de Friedel	1569	
Nº de depósito no CCDC		787747	

A estrutura do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina foi caracterizada pelo pareamento lamivudina $\rightleftharpoons$ lamivudina⁺ observado no 3,5-dinitrossalicilato hidratado de lamivudina (100). Três ligações de hidrogênio entre fragmentos citosínicos protonados e neutros são responsáveis pelo pareamento (Figura 38). Dois pares lamivudina $\rightleftharpoons$ lamivudina⁺

estão presentes na cela unitária. Há também sobreposição entre os pares de lamivudina no hemiclорidrato hemidratado de lamivudina através de interações π - π , embora a justaposição não seja helicoidal. Portanto, este arranjo supramolecular se assemelha com uma estrutura de *i*-ADN formada por pares hemiprotonados de citidina sobrepostos ao longo do eixo da tetraplex. Entretanto, a ausência de um arranjo helicoidal dos pares sobrepostos no hemiclорidrato hemidratado de lamivudina inviabiliza comparações adicionais desta modificação cristalina com estruturas de ácidos nucleicos.

Figura 38 - Unidade assimétrica cristalográfica do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina (centro) e os quatro conformeros do fármaco presentes nesta modificação cristalina. Os anéis oxatiolano dos conformeros A e B são destacados. Elipsóides térmicos a uma probabilidade de 50% e esferas de raio arbitrário ilustram os átomos não hidrogenóides e os átomos de hidrogênio na unidade assimétrica, respectivamente. Conformações citosínicas intermediárias entre as conformações *syn* e *anti* das moléculas C e D estão relacionadas com rotações (setas circulares) sobre o eixo da ligação N1—C1'.

As moléculas de um dos pares do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina exibem conformações similares (Figura 38). Estas conformações remetem à conformação do fármaco

no cloridrato monoidratado de lamivudina. Os dois confômeros foram rotulados como moléculas A e B, em que o confômero A está protonado. Nestas moléculas de lamivudina estruturando o par $A^+ \equiv B$, conformações similares às *anti* e C3'-*endo* de nucleotídeos canônicos são descritas para os fragmentos de citosina e oxatiolano, respectivamente. O átomo de enxofre está no ponto de inflexão do anel oxatiolano e está deslocado do plano mínimo quadrado formado pelos átomos O1', C1', C2' e C4' por 0,791(2) Å e 0,872(6) Å nos confômeros A e B, respectivamente (o desvio quadrático médio dos átomos ajustados no plano mínimo quadrado é 0,0752 Å no confômero A e 0,0702 Å no confômero B). Em ambos os confômeros A e B, a posição axial de ligação ao átomo de carbono C5' é ocupada pelo átomo de oxigênio hidroxílico, sendo que a orientação do átomo de hidrogênio hidroxílico diferencia as conformações dos braços 5'-CH₂OH destes confômeros (Figura 38). No confômero A, o átomo de hidrogênio hidroxílico está *anti* posicionado em relação ao átomo de enxofre do anel oxatiolano, enquanto que no confômero B este hidrogênio é *syn* orientado em relação ao enxofre. O ângulo de torção C4'—C5'—O5'—H assume valores de -101° e 73° nos confômeros A e B.

O outro par do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina é formado por moléculas do fármaco apresentando conformações pouco encontradas em nucleotídeos canônicos e nunca reportadas em estruturas cristalinas de lamivudina. Estes confômeros foram rotulados como moléculas C e D, em que lamivudina D é a unidade protonada do fármaco. O anel oxatiolano assume conformações C1'-*exo* e C1'-*endo* nos confômeros C e D (Figura 38). O átomo de carbono C1', no ponto de inflexão do anel oxatiolano, desvia -0,64(2) Å e 0,46(2) Å do plano mínimo quadrado calculado através dos átomos C2', S3', C4' e O1' dos confômeros C e D, respectivamente (o desvio quadrático médio dos átomos ajustados no plano mínimo quadrado é 0,0607 Å no confômero C e 0,0618 Å no confômero D). Em ambos os confômeros, os fragmentos de citosina adotam conformações intermediárias entre as conformações *syn* e *anti* idealizadas. Estas orientações dos fragmentos de citosina estão relacionadas com a formação de ligações de hidrogênio através dos grupos hidroxílicos de ambos os confômeros C e D e ânions cloreto ligados aos grupos amínicos das moléculas A e B justapostas sobre o par $C \equiv D^+$ (Figura 39). Os ângulos de torção sobre a ligação N1—C1' dos confômeros C e D do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina desviam aproximadamente 45° e 90° dos valores esperados para uma conformação *anti* do fragmento de citosina. Portanto, rotações de 45° e 90° sobre o eixo da ligação N1—C1' estão relacionadas com as conformações observadas nas moléculas C e D, as quais são adequadas tanto para o pareamento $C \equiv D^+$ quanto para formação dos contatos $O5'c-H \cdots Cl1^{(-)}$ e $O5'd-H \cdots Cl2^{(-)}$ cujos grupos hidroxílicos dos

confômeros C e D são doadores das ligações de hidrogênio. Os átomos de oxigênio hidroxílico O5' estão nas posições equatoriais de ligação ao átomo de carbono C5' nestas duas moléculas. No confômero C, a posição equatorial ocupada pelo átomo de oxigênio hidroxílico é *anti* posicionada em relação ao átomo de enxofre, enquanto que no confômero D o oxigênio hidroxílico está na posição equatorial *syn* orientada com respeito ao enxofre. Os valores dos ângulos de torção que descrevem os confômeros do fármaco no hemiclорidrato hemidratado de lamivudina são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Ângulos de torção selecionados dos confômeros de lamivudina presentes na estrutura do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina determinada à temperatura de 150 K.

Parte da estrutura	Torção	Confômero A	Confômero B	Confômero C	Confômero D
Ligação N1—C1' entre os anéis de citosina e oxatolano	C2—N1—C1'—O1'	164(1)°	155(1)°	128(1)°	75(2)°
	C6—N1—C1'—O1'	-15(2)°	-33(2)°	-53(1)°	-105(2)°
	C2—N1—C1'—C2'	-74(2)°	-83(2)°	-118(1)°	-157(1)°
	C6—N1—C1'—C2'	107(2)°	89(1)°	61(2)°	22(2)°
Anel oxatolano	O1'—C1'—C2'—S3'	33(2)°	37(1)°	-44(1)°	33(1)°
	C1'—C2'—S3'—C4'	-38(1)°	-42(1)°	20(1)°	-16(1)°
	C2'—S3'—C4'—O1'	35(1)°	38(1)°	9(1)°	-2(1)°
	S3'—C4'—O1'—C1'	-22(1)°	-22(1)°	-37(1)°	24(2)°
	C4'—O1'—C1'—C2'	-7(2)°	-10(2)°	52(1)°	-38(2)°
Braço 5'-CH ₂ OH	O1'—C4'—C5'—O5'	72 (2)°	55(2)°	-69(2)°	169(1)°
	S3'—C4'—C5'—O5'	-51(2)°	-71(1)°	171(1)°	45(2)°

Na estrutura do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina, cada par $C \equiv D^+$ é justaposto sobre um par $A^+ \equiv B$ a uma distância de 3,3(2) Å, enquanto que a distância média de justaposição de um par $A^+ \equiv B$ sobre $C \equiv D^+$ é 3,4(2) Å. A sobreposição ocorre ao longo da direção [100], sendo que os confômeros A e B são justapostos sobre as moléculas D e C, respectivamente (Figura 39). Os confômeros B e C são sobrepostos face a face, enquanto que os confômeros C e D não são, devido à conformação do fragmento de citosina adotada pela molécula D para favorecer a formação da ligação de hidrogênio $O5'd-H \cdots Cl2^{(-)}$ com o ânion cloreto também ligado à molécula A sobreposta (Figura 39). No confômero D, a rotação sobre o eixo da ligação N1—C1' entre os anéis de citosina e oxatolano não orienta esta molécula face a face em relação ao confômero A adjacente, sobreposto ao longo do eixo a . Portanto, os pares lamivudina $\equiv$ lamivudina $^+$ são parcialmente sobrepostos face a face nesta modificação cristalina (Figura 40).

Figura 39 – Ligações de hidrogênio clássicas envolvendo os conformeros pareados (acima) e sobrepostos (abaixo) na estrutura do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina. A orientação face → cauda das moléculas de lamivudina e as sobreposições ‘face a face’ ou ‘face a cauda’ são mostradas nos diagramas referentes à justaposição dos conformeros. A sobreposição ‘face a cauda’ dos conformeros A e D é um resultado da rotação (seta circular) sobre o eixo da ligação N1—C1’ relacionada com a formação da ligação O5’d—H...Cl2⁽⁻⁾. Projeções paralelas à direção [100] são mostradas acima. Projeções ao longo das direções [010] e [001] são mostradas nas ilustrações referentes às sobreposições dos conformeros A e D, e B e C, respectivamente. Posições equivalentes: (j) = 1 + x; -1 + y; z; (jj) = x; 1 + y; z; (jjj) = -1 + x; y; z; (ij) = x; -1 + y; z.

Figura 40 – Sobreposições ‘face a face’ ou ‘face a cauda’ observadas na estrutura do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina. A orientação face → cauda das moléculas de lamivudina é representada pelas setas, independente de suas cores.

Em adição às ligações de hidrogênio entre os fragmentos de citosina e entre os grupos hidroxílicos dos confômeros C e D e os ânions cloreto, os grupos amínicos dos quatro confômeros de lamivudina são doadores de ligações de hidrogênio através de seus átomos de hidrogênio que não estão engajados nos pareamentos (Tabela 11). Os confômeros A e B interagem com ânions cloreto através das ligações de hidrogênio $N4a-H4Nya \cdots Cl2^{(-)}$ e $N4b-H4Nyb \cdots Cl1^{(-)}$. As moléculas C e D são doadores de ligações de hidrogênio para moléculas de água através dos contatos $N4c-H4Nyc \cdots O1w$ e $N4d-H4Nyd \cdots O2w$. Cada uma das duas moléculas cristalograficamente independentes de água doa ligações de hidrogênio para o grupo hidroxílico de um dos confômeros A ou B e um ânion cloreto através dos átomos $O1w-H1w \cdots Cl2^{(-)j}$, $O1w-H2w \cdots O5'b$, $O2w-H3w \cdots Cl1^{(-)jj}$ e $O2w-H4w^{jjj} \cdots O5'a$ ($j = 1 + x; -1 + y; z$; $jj = x; 1 + y; z$; $jjj = -1 + x; y; z$) (Figura 39). Através da inspeção das geometrias dos contatos $O5'c-H \cdots Cl1^{(-)}$ e $O2w-H3w \cdots Cl1^{(-)jj}$ (Tabela 11), é possível afirmar que estas duas interações não são tão fortes quanto às demais ligações de hidrogênio clássicas existentes na estrutura do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina. Os grupos hidroxílicos dos confômeros A e B também são doadores de ligações de hidrogênio para ânions cloreto através dos átomos $O5'a-H \cdots Cl1^{(-)jj}$ e $O5'b-H \cdots Cl2^{(-)ij}$ ($ij = x; -1 + y; z$). Na Tabela 11 são mostradas as geometrias das ligações de hidrogênio clássicas presentes na estrutura do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina. As interações cujos grupos hidroxílicos dos confômeros A e B de lamivudina e as moléculas de água são doadores de ligações de hidrogênio para ânions cloreto conectam ao longo da direção [010] estruturas individuais formadas pelo pareamento e sobreposição entre as moléculas do fármaco (Figura 41).

Tabela 11 - Geometria das ligações de hidrogênio clássicas presentes na estrutura do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina.

Ligação	D—H•••R ^h	D—H (Å)	H•••R (Å)	D•••R (Å)	D—H•••R (°)
Pareamento A ⁺ ≡B	N _{4a} —H _{4Nxa} •••O _{2b}	0,86	1,93	2,77(2)	166
	N _{3a} ⁽⁺⁾ —H _{3a} •••N _{3b}	0,86	1,96	2,81(2)	175
	N _{4b} —H _{4Nxb} •••O _{2a}	0,86	2,03	2,88(2)	170
Pareamento C≡D ⁺	N _{4c} —H _{4Nxc} •••O _{2d}	0,86	2,05	2,89(2)	166
	N _{3d} ⁽⁺⁾ —H _{3d} •••N _{3c}	0,86	1,96	2,81(2)	171
	N _{4d} —H _{4Nxd} •••O _{2c}	0,86	1,97	2,83(2)	175
NH ₂ —cloreto	N _{4a} —H _{4Nya} •••Cl ₂ ⁽⁻⁾	0,86	2,37	3,23(2)	178
	N _{4b} —H _{4Nyb} •••Cl ₁ ⁽⁻⁾	0,86	2,37	3,21(2)	167
NH ₂ —água	N _{4c} —H _{4Nyc} •••O _{1w}	0,86	2,00	2,81(2)	157
	N _{4d} —H _{4Ny_d} •••O _{2w}	0,86	2,01	2,86(2)	175
5'-OH—cloreto	O _{5'a} —H _{5'Oa} •••Cl ₁ ⁽⁻⁾ ij	0,82	2,26	3,08(2)	173
	O _{5'b} —H _{5'Ob} •••Cl ₂ ⁽⁻⁾ ij	0,82	2,23	3,02(2)	164
	O _{5'c} —H _{5'Oc} •••Cl ₁ ⁽⁻⁾	0,82	2,48	3,15(1)	140
	O _{5'd} —H _{5'Od} •••Cl ₂ ⁽⁻⁾	0,82	2,22	3,03(2)	173
Água—cloreto	O _{1w} —H _{1w} •••Cl ₂ ⁽⁻⁾ j	0,82	2,42	3,19(2)	151
	O _{2w} —H _{3w} •••Cl ₁ ⁽⁻⁾ ij	0,82	2,56	3,33(2)	156
Água—5'-OH	O _{1w} —H _{2w} •••O _{5'b}	0,87	1,92	2,72(2)	151
	O _{2w} —H _{4w} ^{jjj} •••O _{5'a}	0,86	2,14	2,91(2)	149

^h Os termos D e R generalizam átomos doadores e receptores de ligações de hidrogênio. Posições equivalentes: ^j 1 + x; -1 + y; z; ^{ij} x; 1 + y; z; ^{jjj} - 1 + x; y; z; ^{ij} x; - 1 + y; z.

Figura 41 – Ligações de hidrogênio conectando os pares lamivudina=lamivudina⁺ ao longo da direção [010]. Acima são circundadas as interações em que os grupos hidroxílicos dos confôrmers A e B são doadores das ligações de hidrogênio. Abaixo, as moléculas de água conectam os pares do fármaco através de ligações de hidrogênio com ânions cloreto (circundado). Projeções no plano (100) são exibidas (os eixos *b* e *c* são paralelos às direções horizontal e vertical, respectivamente).

5.2 Determinação estrutural por DRXM: 0,67-Hidrato de lamivudina

O 0,67-hidrato de lamivudina cristalizou no grupo espacial hexagonal $P6_4$ com três moléculas do fármaco e duas moléculas de água na unidade assimétrica cristalográfica. O grupo espacial em que esta fase sólida cristalizou reflete a morfologia externa dos cristais hexagonais, os quais foram obtidos da mesma matriz de cristalização do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina. Estruturas de pequenas moléculas como nucleosídeos não costumam apresentar alta simetria. Entre todas as estruturas conhecidas, este 0,67-hidrato de lamivudina é a fase cristalina do fármaco com maior simetria cristalográfica. Até então, a forma II de lamivudina era a mais simétrica de todas as modificações cristalinas deste derivado nucleosídeo devido a sua cristalização em um grupo espacial tetragonal (95). A coleta dos dados de DRX do 0,67-hidrato de lamivudina foi realizada à baixa temperatura e à

temperatura ambiente. Todavia, convergência e fatores residuais aceitáveis não foram alcançados refinando-se a estrutura com base nos dados coletados à temperatura ambiente. Por esta razão, apenas os dados referentes à determinação estrutural à baixa temperatura são apresentados na Tabela 12 junto com as constantes de cela determinadas às temperaturas baixa e ambiente, o que comprova a ausência de transições de fase cristalina nesta faixa térmica.

A estrutura cristalina do 0,67-hidrato de lamivudina apresenta três moléculas neutras de lamivudina com conformações similares (Figura 42). Estas moléculas foram rotuladas como confôrmers A, B, C e D, sendo que os confôrmers C e D se referem às duas orientações com fatores de ocupação de 50% cada de uma das três moléculas cristalograficamente independentes de lamivudina. Nos quatro confôrmers, os fragmentos de citosina e oxatiolano assumiram as conformações típicas *anti* e C3'-*endo*, respectivamente. As torções que descrevem estas conformações moleculares presentes na estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina são mostradas na Tabela 13. Ainda com respeito à conformação C3'-*endo*, o átomo de enxofre S3', no ponto de inflexão do anel oxatiolano, está distanciado 0,822(3) Å, 0,721(3) Å, 0,720(7) Å e 0,719(6) Å do plano mínimo ajustado através dos átomos O1', C1', C2' e C4' dos confôrmers A, B, C e D, respectivamente (o desvio quadrático médio dos átomos coplanares é 0,0312 Å, 0,0334 Å, 0,0915 Å e 0,0882 Å nos confôrmers A, B, C e D). No confôrmere A, o átomo de oxigênio hidroxílico ocupa a posição axial de ligação ao átomo de carbono C5'. O grupo hidroxílico 5'-OH está desordenado em duas posições no confôrmere B, sendo que o átomo de oxigênio hidroxílico ocupa ambas as posições axial (fração hidroxílica O5'b—H5'Ob nos sítios principais de ocupação 75%) e equatorial (fração hidroxílica O5'b'—H5'Ob' nos sítios extras de ocupação 25%). Esta posição equatorial ocupada pelo átomo de oxigênio hidroxílico está *anti* orientada em relação ao átomo de enxofre no confôrmere B e *syn* orientada nos confôrmers C e D de uma das moléculas de lamivudina com desordem orientacional.

Tabela 12 - Constantes de cela às temperaturas baixa e ambiente e determinação estrutural à baixa temperatura do 0,67-hidrato de lamivudina.

0,67-hidrato de lamivudina			
Fórmula mínima	3(C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S)2(H ₂ O)		
Massa da fórmula mínima (g/mol)	723,81		
Dimensões do cristal (mm ³)	0,20 x 0,18 x 0,09		
Sistema cristalino	Hexagonal		
Grupo espacial	P6 ₄		
Z / Z'	18 / 3		
Temperatura (K)	298(1)	150(2)	
Dimensões da cela	$a = b$ (Å)	14,575(5)	14,550(1)
unitária	c (Å)	29,883(2)	29,538(3)
Volume da cela unitária (Å ³)		5497,6(4)	5415,7(8)
Densidade calculada (g/cm ³)		1,312	1,331
<i>Coleta dos dados completos e determinação estrutural</i>			
Coefficiente de absorção μ (mm ⁻¹)		0,269	
Fatores de transmissão mínimo e máximo (Gaussian)		$T_{\min} = 0,955$ $T_{\max} = 0,974$	
Intervalo em θ (°)		3,31 - 24,93	
Intervalo dos índices	h	-16 a 16	
	k	-17 a 17	
	l	-34 a 34	
Reflexões coletadas		10796	
Reflexões independentes		6237	
Índice de simetria (R_{int})		0,0366	
Completeza para $\theta_{\max}$ (%)		96,0	
F_{000}		2280	
Parâmetros refinados		447	
Qualidade do ajuste sobre F^2		1,049	
Índices residuais para $I > 2\sigma(I)$		$R_I = 0,0939$ $wR_2 = 0,2395$	
Índices residuais para todos os dados		$R_I = 0,1574$ $wR_2 = 0,2677$	
$\Delta\rho_{\max} / \Delta\rho_{\min}$ (e/Å ³)		0,416/-0,301	
Estrutura absoluta	Parâmetro de Flack	0,2(2)	
	Pares de Friedel	2218	
Nº de depósito no CCDC		787746

Figura 42 - Unidade assimétrica cristalográfica do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina. Elipsóides térmicos a uma probabilidade de 30% e esferas de raio arbitrário ilustram os átomos não hidrogenóides e os átomos de hidrogênio na unidade assimétrica, respectivamente. Os átomos N3/4, N4/3, C4cd e C5cd pertencem a ambos os conformêmeros C e D sobrepostos através de seus fragmentos de citosina. Consequentemente, cada um destes quatro átomos ocupa um único sítio de ocupação 100% ao invés de dois sítios de ocupação 50% nos conformêmeros C e D. De fato, estes sítios de ocupação 100% são resultantes da sobreposição de dois sítios de ocupação 50% referentes às frações destes átomos nos conformêmeros C e D.

Tabela 13 - Ângulos de torção selecionados dos conformêmeros de lamivudina presentes na estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina determinada à baixa temperatura.

Parte da estrutura	Torção	Conformêmero A	Conformêmero B	Conformêmero C*	Conformêmero D*
Ligação N1—C1' entre os anéis de citosina e oxatolano	C2—N1—C1'—O1'	150,0(1)°	152,9(6)°	168(1)°	169(1)°
	C6—N1—C1'—O1'	-31,3(9)°	-26,9(9)°	-13(3)°	-5(3)°
	C2—N1—C1'—C2'	-86,7(2)°	-85,0(8)°	-87(2)°	-90(2)°
	C6—N1—C1'—C2'	92,0(8)°	95,1(8)°	91(2)°	96(2)°
Anel oxatolano	O1'—C1'—C2'—S3'	34,9(8)°	34,2(8)°	20(2)°	20(2)°
	C1'—C2'—S3'—C4'	-41,0(6)°	-38,6(7)°	-32(1)°	-33(1)°
	C2'—S3'—C4'—O1'	38,4(5)°	32,2(8)°	32(1)°	33(1)°
	S3'—C4'—O1'—C1'	-24,5(7)°	-17,6(9)°	-32(2)°	-32(2)°
	C4'—O1'—C1'—C2'	-5,3(8)°	-10,5(9)°	-12(3)°	-11(2)°
	O1'—C4'—C5'—O5'	67(1)°	73(1)° [§]	-162(2)°	-165(2)°
Braço 5'-CH ₂ OH	S3'—C4'—C5'—O5'	-53(1)°	-59(2)° ^{§§}	44(2)°	78(2)°
			-57(1)° [§]		
			171(1)° ^{§§}		

* Os átomos destes conformêmeros estão em sítios de ocupação 50%. [§] A fração do átomo O5' está no sítio principal de ocupação 75%. ^{§§} A fração do átomo O5' está no sítio extra de ocupação 25%.

A coesão da estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina se deve principalmente ao pareamento entre moléculas neutras de lamivudina e à sobreposição helicoidal dos pares. De fato, a simetria hexagonal com eixo roto-translacional de sexta ordem inerente a esta estrutura deriva do pareamento de moléculas de lamivudina através de duas ligações de hidrogênio entre seus fragmentos de citosina e justaposição helicoidal destes pares ao longo do eixo *c*. Há dois padrões de ligações de hidrogênio responsáveis pelo pareamento entre os fragmentos citosínicos e duas orientações de sobreposição das moléculas do fármaco no 0,67-hidrato de lamivudina (Figura 43). Em um dos arranjos de ligações de hidrogênio, duas ligações de hidrogênio $N4-H4N_x \cdots O2^{ijj}$ e $N4-H4N_x^{ijj} \cdots O2$ ($ijj = 2 - x; 2 - y; z$) entre os grupos amínico e carbonílico estruturam os pares formados por confômeros A relacionados por simetria rotacional de segunda ordem (Figura 44). Igualmente, estas mesmas duas ligações de hidrogênio formam os pares entre os confômeros B equivalentes por meio de um eixo de ordem 2. O outro arranjo de interações entre os fragmentos citosínicos é formado pelas duas ligações de hidrogênio $N4-H4N_x \cdots N3^{ijj}$ e $N4-H4N_x^{ijj} \cdots N3$ envolvendo os grupos amínico e imínico, as quais caracterizam o pareamento entre os confômeros C e entre os confômeros D. Dentro dos pares C=C e D=D (Figura 44), as unidades de lamivudina também são relacionadas por simetria rotacional de ordem 2. As distâncias e ângulos destas e das demais ligações de hidrogênio clássicas existentes na estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina são apresentadas na Tabela 14.

Figura 43 – Padrões de ligações de hidrogênio entre moléculas neutras do fármaco e sobreposições ‘face a face’ e ‘face a cauda’ dos pares no 0,67-hidrato de lamivudina.

Tabela 14 - Geometria das ligações de hidrogênio clássicas presentes na estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina.

Ligação	D—H...R ^h	D—H (Å)	H...R (Å)	D...R (Å)	D—H...R (°)
Pareamento A=A	N _{4a} —H _{4Nxa} ...O _{2a} ^{ijj} N _{4a} —H _{4Nxa} ...O _{2a} ^{ijj}	0,86	1,98	2,84(1)	174
Pareamento B=B	N _{4b} —H _{4Nxb} ...O _{2b} ^{ijj} N _{4b} —H _{4Nxb} ...O _{2b} ^{ijj}	0,86	1,94	2,80(1)	176
Pareamento C=C	N _{4/3} —H _{4Nxc} ...N _{3/4} ^{ijj} N _{4/3} —H _{4Nxc} ...N _{3/4} ^{ijj}	0,86	2,06	2,91(1)	173
Pareamento D=D	N _{3/4} —H _{4Nxd} ...N _{4/3} ^{ijj} N _{3/4} —H _{4Nxd} ...N _{4/3} ^{ijj}	0,86	2,06	2,91(1)	173
NH ₂ —água	N _{4a} —H _{4Nya} ...O _{1w} N _{4b} —H _{4Nyb} ...O _{2w}	0,86	2,43	3,27(1)	167
		0,86	2,45	3,29(1)	168
5'-OH—água	O _{5'b} —H _{5'Ob} ...O _{1w} ^{ji}	0,82	2,62	3,17(1)	126
Água—5'-OH	O _{2w} —H _{4w} ^{ijj} ...O _{5'a}	0,88	2,37	3,16(2)	149

^h Os termos D e R generalizam átomos doadores e receptores de ligações de hidrogênio. Posições equivalentes: ^{ijj} 2 - x; 2 - y; z; ^{ji} x - y; x; - 1/3 + z; ^{ijj} - 1 + y; - x + y; 1/3 + z.

A análise do empacotamento cristalino mostra que cada par A=A é justaposto face a face sobre um par B=B a uma distância de 3,28(3) Å. Ainda, cada par A=A sobreposto face a face em relação a um par B=B pode ser justaposto, também, face a face sobre um par formado por confôrmeros D ou face a cauda sobre um par entre confôrmeros C (Figura 45). A distância de justaposição do par A=A sobre o par C=C ou D=D é de 3,30(5) Å. Por sua vez, a outra sobreposição do par B=B pode ser face a face em relação ao par C=C ou face a cauda sobre o par D=D, a uma distância de 3,26(4) Å (Figura 45). Estas possibilidades de diferentes sobreposições dos pares A=A e B=B sobre os pares C=C e D=D resultam na desordem orientacional de uma das moléculas cristalograficamente independentes do fármaco. Esta molécula apresenta duas orientações com populações estatisticamente iguais no cristal. Estas duas orientações moleculares são representadas na unidade assimétrica pelos confôrmeros C e D, os quais são sobrepostos através dos átomos N3, N4, C4 e C5 dos seus fragmentos citosínicos, conforme exemplificado na seção 2.4. Devido a esta sobreposição, estes quatro átomos ocupam sítios únicos de ocupação 100% na estrutura, enquanto que os demais átomos dos confôrmeros C e D estão localizados em sítios de ocupação 50%.

Além do pareamento e da sobreposição das moléculas de lamivudina, o grupo hidrofílico do confôrmero A de lamivudina também recebe a ligação de hidrogênio O_{2w}—H_{4w}^{ijj}...O_{5'a} (ijj = - 1 + y; - x + y; 1/3 + z) de uma molécula de água (Figura 46). Esta

molécula de água também é receptora da ligação de hidrogênio N4b—H4Nyb•••O2w proveniente do grupo amínico do confôrmere B (Figuras 44 e 46). Os confôrmere A e B interagindo com esta molécula de água estão localizados em camadas de sobreposição adjacentes, embora não existam interações π – π entre eles. Estas ligações de hidrogênio interligam ao longo do eixo *b* estruturas individuais formadas pelo pareamento e sobreposição helicoidal de moléculas do fármaco.

Figura 44 – Os pares entre os confôrmere do fármaco no 0,67-hidrato de lamivudina. Elipsóides térmicos a uma probabilidade de 30% e esferas de raio arbitrário ilustram os átomos não hidrogenóides e os hidrogênios, respectivamente. Os elipsóides térmicos dos átomos não hidrogenóides dos confôrmere C são representados através de seus contornos, assim como as ligações entre estes átomos são ilustradas como duas linhas contínuas. Os átomos N3/4, N4/3, C4cd e C5cd pertencem a ambos os confôrmere C e D sobrepostos através de seus fragmentos de citosina e, por esta razão, estão em sítios de ocupação 100%. Uma projeção paralela à direção [110] ilustra a sobreposição dos pares de lamivudina acima à esquerda. Os pares A=A, B=B, C=C e D=D são projetados ao longo da direção [001]. Posição equivalente: (ijj) = 2 - x; 2 - y; z.

Figura 45 – Sobreposições dos pares A=A e B=B sobre os pares C=C e D=D.

Figura 46 – Ligações de hidrogênio envolvendo os grupos hidroxílicos dos confôrmers A e B do 0,67-hidrato de lamivudina. Rotações de aproximadamente 120° (setas circulares) sobre o eixo da ligação N1—C1' levam uma conformação do braço 5'-CH₂OH dos confôrmers B à outra. Projeções no plano (001) são mostradas (os eixos *a* e *b* são paralelos às direções vertical e horizontal, respectivamente). Posições equivalentes: (ijj) = 2 - *x*; 2 - *y*; *z*; (iij) = - 1 + *y*; - *x* + *y*; 1/3 + *z*; (jjj) = 3 - *y*; 2 + *x* - *y*; 1/3 + *z*; (ji) = *x* - *y*; *x*; - 1/3 + *z*; (jii) = 2 - *x* + *y*; 2 - *x*; - 1/3 + *z*; (iji) = 1 - *x*; 2 - *y*; *z*; (jji) = 1 + *x*; *y*; *z*.

A outra molécula cristalograficamente independente de água é receptora de duas ligações de hidrogênio doadas pelo grupo amínico do confômero A (Figuras 44 e 46) e pela fração principal do grupo hidroxílico desordenado do confômero B (Figura 46). As ligações de hidrogênio $N4a-H4Nya\bullet\bullet\bullet O1w$ e $O5'b-H\bullet\bullet\bullet O1w^{ji}$ ($ji = x - y; x; -1/3 + z$) também conectam na direção [010] estruturas individuais formadas pelo pareamento e sobreposição entre as moléculas de lamivudina. Vale ressaltar que o ângulo do contato $O5'b-H\bullet\bullet\bullet O1w^{ji}$ (Tabela 14) expõe seu caráter de ligação de hidrogênio fraca, embora clássica. As frações extras dos átomos de oxigênio $O5'b'$ dos grupos hidroxílicos dos confômeros B são receptoras de ligações de hidrogênio não clássicas em que os carbonos metínicos $C1'c$ dos confômeros C, sobrepostos ao longo da direção [001], são doadores de hidrogênio (Figura 46). A distância $C1'c^{iji}\bullet\bullet\bullet O5'b'$ ($iji = 1 - x; 2 - y; z$) entre os átomos doador e receptor desta ligação de hidrogênio não clássica é de 3,19(5) Å, sendo o ângulo do contato de 137(1)°. Assim, a força desta interação é suficiente para alterar a conformação do braço hidroximetilênico de 50% da população de confômeros B de lamivudina aptos a interagir com os confômeros C. Quando sobreposto a um confômero C, cuja população no cristal é 50%, metade dos confômeros B posicionam seus átomos de oxigênio hidroxílico para receber a ligação de hidrogênio não clássica do grupo metínico $C1'c-H^{iji}$, enquanto que a outra metade, representando 25% da população total destes confômeros, está engajada na ligação com a água. Sobrepostos aos confômeros D, 50 % da população total de confômeros B também doam a ligação de hidrogênio para a molécula de água. Portanto, 75% dos confômeros B adotam a conformação em que o átomo de oxigênio hidroxílico está na posição axial de ligação ao carbono $C5'$ como consequência da interação com a molécula de água. Apenas 25% dos confômeros B exibem o oxigênio hidroxílico na posição equatorial *anti* orientada em relação ao átomo de enxofre devido à formação da ligação de hidrogênio não clássica $C1'c-H^{iji}\bullet\bullet\bullet O5'b'$.

A sobreposição helicoidal dos pares do fármaco no 0,67-hidrato de lamivudina caracteriza uma dupla hélice. Nove pares de lamivudina completam uma volta da duplex a cada 29,5(3) Å (Figura 47).

Figura 47 – (a) Formação de uma dupla hélice do fármaco na estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina. Uma hélice formada por moléculas sobrepostas de lamivudina é representada como uma superfície azul opaca. (b) Presença de sulcos estreitos na superfície da duplex. Superfícies transparentes contornam duas das três projeções da duplex. Átomos de hidrogênio, frações atômicas pertencentes exclusivamente aos conformeros D e frações dos átomos de oxigênio hidroxílico nos sítios extras de ocupação dos conformeros B foram omitidos visando à clareza das representações.

Diferente de estruturas de ácidos nucleicos, esta dupla hélice de lamivudina é estruturada sem os grupos 3'-hidroxílico e 5'-fosfato, formando uma duplex de nucleosídeo. Isto infere que duplexes de ADN são arquitetadas pelas ligações de hidrogênio e interações π - π entre as bases nitrogenadas. Grupos 3'-hidroxílico e 5'-fosfato não estão relacionados com a formação de duplas hélices de ácidos nucleicos. Estes grupos apenas ligam covalentemente as unidades dos nucleosídeos, sendo que a estrutura da duplex é governada através do pareamento e sobreposição helicoidal. Embora seja constituída apenas por moléculas de lamivudina neutras, a dupla hélice do 0,67-hidrato de lamivudina apresenta similaridades com estruturas de *i*-ADN ricas em resíduos de citidina hemiprotonados. Sobreposição face a face dos nucleosídeos, distâncias de sobreposição, geometrias das ligações de hidrogênio responsáveis pelo pareamento e espiralização à direita são características congruentes a esta dupla hélice de lamivudina e *i*-ADNs (123). Espiralização à direita também ocorre em estruturas de B-ADNs, mas em não em Z-ADNs espiralados à esquerda (111). A espiralização das tetraplexes de *i*-ADN leva à formação de sulcos principais extensos e sulcos secundários estreitos na periferia da fibra, enquanto que na estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina a espiralização origina sulcos estreitos na superfície da duplex.

O arranjo supramolecular do 0,67-hidrato de lamivudina arquiteta duplexes ao longo do eixo *c*, as quais contornam uma topologia remetendo a um hexagrama (Figura 48). A topologia do *i*-ADN formado por quatro hélices intercaladas do oligonucleotídeo d(CCCC) (124) remete vagamente à topologia da duplex do 0,67-hidrato de lamivudina (Figura 49). Na tetraplex de d(CCCC), os resíduos de citidina estão covalentemente ligados aos grupos fosfato e não há liberdade rotacional sobre as ligações fosfodiéster suficiente para otimização da sobreposição dos fragmentos de citosina. Caso houvesse liberdade conformacional para os resíduos de citidina se sobreporem como as moléculas de lamivudina são empilhadas no 0,67-hidrato de lamivudina, provavelmente uma topologia similar àquela observada na dupla hélice de lamivudina descrita nesta seção seria contornada.

Figura 48 – Topologia hexagrama da dupla hélice formada na estrutura do 0,67-hidrato de lamivudina e empacotamento das duplexes no plano (001). Átomos de hidrogênio e frações dos átomos de oxigênio hidroxílico nos sítios extras de ocupação dos conformeros B foram omitidos visando à clareza das representações. Frações atômicas exclusivas dos conformeros D foram omitidas na ilustração de uma dupla hélice de lamivudina. Os arranjos dos pares C=C e D=D de duplexes vizinhas são exemplificados na Figura 50.

No 0,67-hidrato de lamivudina, as moléculas do fármaco se sobrepuseram através de seus átomos de carbono C4 entre os nitrogênios amínico e imínico, uma vez que não há impedimentos decorrentes de ligações envolvendo seus grupos hidroxílicos terminais. Esta sobreposição posiciona o átomo de nitrogênio amínico N4 sobre o centro do fragmento

citossínico de lamivudina, otimizando a interação π - π entre os elétrons livres do átomo de nitrogênio N4 e os elétrons π da base nitrogenada. No *i*-ADN formado exclusivamente por resíduos de citidina, os átomos de carbono C4 dos fragmentos de citosina são justapostos sobre os nitrogênios amínicos N4 como consequência da rigidez do esqueleto covalente das hélices. Portanto, a interação entre o par eletrônico livre do átomo de nitrogênio N4 e os elétrons π do fragmento citossínico não é otimizada como na dupla hélice do 0,67-hidrato de lamivudina. Esta diferença na sobreposição dos fragmentos citossínicos de lamivudina e de citidina podem ser descritas pelas distâncias entre os átomos de nitrogênio N4 e o centróide do anel citossínico (C_{cit}). Em média, as distâncias $N4 \cdots C_{cit}$ são de 3,35(2) Å e 3,6(1) Å na dupla hélice do 0,67-hidrato de lamivudina e na tetraplex de d(C₄) (124), respectivamente, revelando que a interação π - π é mais bem orientada geometricamente na duplex de lamivudina descrita nesta seção. Apesar de toda a restrição conformacional imposta pelas ligações fosfodiéster, as sobreposições face a face dos resíduos de citidina através dos átomos de carbono C4 e nitrogênio N4 esboçam, na estrutura de *i*-ADN do oligonucleotídeo d(CCCC), uma topologia que se assemelha com aquela da duplex de lamivudina descrita nesta seção.

Figura 49 – Topologia da tetraplex de *i*-ADN formada pelo oligonucleotídeo d(CCCC) (124). Átomos de hidrogênio e moléculas de água foram omitidos visando à clareza da representação.

As duplexes do 0,67-hidrato de lamivudina são empacotadas no plano *ab* em um arranjo hexagonal, onde cada dupla hélice é circundada por outras seis duplexes (Figura 48). Neste arranjo de sete duplexes, os pares C=C e D=D se alternam ao longo de duas das três direções [100], [010] e [110] e se transladam paralelamente à outra direção dentro de uma

mesma camada de sobreposição formada por sete pares entre os confôrmeros da molécula de lamivudina com desordem orientacional, conforme mostrado na Figura 50. Conforme descrito anteriormente, em uma duplex há a possibilidade de um dos pares justapostos sobre os pares A=A e B=B ser o par C=C ou D=D. Mas, se há um par C=C em uma duplex, haverá em uma mesma camada de sobreposição pares D=D em quatro duplexes vizinhas empacotadas ao longo de duas das três direções [100], [010] e [110] e pares C=C em duas duplexes arranjadas paralelamente à terceira direção. As camadas de sobreposição das duplexes formadas pelos confôrmeros C e D estão relacionadas por um eixo rotacional de terceira ordem paralelo à direção [001]. Por esta razão, as três direções [100], [010] e [110] podem ser combinadas a cada duas para descrever a alternância entre os pares C=C e D=D de duplexes adjacentes.

Figura 50 – Arranjos possíveis dos pares C=C e D=D de sete duplexes vizinhas dentro de uma mesma camada de sobreposição.

5.3 Determinação estrutural por DRXM: Dupla hélice de lamivudina

Apesar de uma dupla hélice neutra de lamivudina ter sido preparada na forma de um hidrato do fármaco, a sobreposição helicoidal dos pares lamivudina⁺≡lamivudina não foi observada nas estruturas do hemiclорidrato hemidratado de lamivudina e do 0,67-hidrato de lamivudina, ambas as modificações cristalinas caracterizadas pelo pareamento e sobreposição das moléculas do fármaco. Conforme mencionado anteriormente, uma estrutura cujos pares parcialmente protonados se sobrepusessem helicoidalmente configuraria uma duplex de nucleosídeos sem os grupos 5'-fosfato e 3'-OH similar a tetraplexes de *i*-ADNs ricos em resíduos de citidina hemiprotonados. Devido à similaridade entre os pareamentos de uma duplex de lamivudina formada por moléculas protonada e neutra e de estruturas tetraméricas de *i*-ADN, a estruturação de ácidos nucleicos sem os grupos 5'-fosfato e 3'-OH poderia ser demonstrada com maior fidelidade estrutural.

Cristais de uma modificação cristalina em que os pares lamivudina⁺≡lamivudina foram sobrepostos helicoidalmente foram isolados de uma matriz de cristalização similar àquela de onde cristais do cloridrato de lamivudina foram obtidos. Porém, o uso de HCl como único ácido para a protonação parcial das moléculas do fármaco não foi adequado para obtenção da dupla hélice de lamivudina, embora o pareamento e sobreposição de moléculas protonadas e neutras do fármaco tenha sido alcançada usando somente este ácido inorgânico conforme descrito na seção 5.1. Já a sobreposição helicoidal não foi possível na presença de ânions cloreto como únicos contra-íons. Foi necessário introduzir na matriz de cristalização um ácido orgânico capaz de induzir a sobreposição helicoidal dos pares lamivudina⁺≡lamivudina através da sua ancoragem nos sulcos da superfície da duplex.

Tal ácido orgânico deve ser capaz de receber ligações de hidrogênio dos grupos amínicos dos fragmentos citosínicos de lamivudina cujos átomos de hidrogênio estão voltados para os sulcos da duplex. Em adição, o contra-íon deve possuir um volume compatível com sua acomodação nestes sulcos. Este ácido orgânico também não deve intercalar os pares de lamivudina se sobrepondo a eles através de interações π - π . Por esta razão, núcleos aromáticos detentores de sistemas eletrônicos π devem ser ausentes na estrutura do contra-íon orgânico.

Mais uma vez, ácido maléico satisfaz estes requisitos estruturais. Os grupos carboxílico e carboxilato do ânion hidrogenomaleato são aptos para receber ligações de hidrogênio dos fragmentos citosínicos de lamivudina através dos átomos de hidrogênio amínico expostos nos sulcos da duplex. Este ácido orgânico é pouco volumoso e pode se

encaixar nos sulcos formados através da espiralização da dupla hélice. O ácido maléico não possui sistemas eletrônicos π deslocalizados que favoreçam sua justaposição sobre os fragmentos citosínicos de lamivudina. Portanto, a intercalação entre os pares lamivudina⁺≡lamivudina sobrepostos pelo ânion hidrogenomaleato não é esperada. Inclusive na estrutura do maleato de lamivudina há a sobreposição dos fragmentos citosínicos de lamivudina sem intercalação por moléculas do agente formador do sal. Desta forma, ácido maléico foi adicionado a uma matriz de cristalização ácida contendo também HCl, resultando no preparo de uma dupla hélice de lamivudina estruturada através do pareamento entre unidades protonada e neutra do fármaco e empilhamento helicoidal destes pares (Figura 51).

Figura 51 – A formação da dupla hélice de lamivudina estruturada através do pareamento lamivudina⁺≡lamivudina e sobreposição helicoidal dos pares.

A dupla hélice de lamivudina cristalizou no grupo espacial monoclinico $P2_1$ com quatro moléculas protonadas e quatro moléculas neutras do fármaco, quatro moléculas de água, dois contra-íons hidrogenomaleato, dois ânions cloreto e uma molécula de isopropanol na unidade assimétrica cristalográfica (Figura 52). Os dados completos de DRX da dupla hélice de lamivudina foram coletados a ambas as temperaturas baixa e ambiente. Todavia, cinco dos oito confôrmeros de lamivudina presentes na unidade assimétrica tiveram alguns de seus átomos em dois sítios de ocupação. Com base nos dados coletados à temperatura ambiente, os fatores de ocupação dos sítios desordenados não puderam ser determinados com exatidão. As correlações entre os parâmetros térmicos refinados para as frações atômicas e as ocupações dos seus sítios foram altas. Também não houve convergência satisfatória do refinamento. Por estas razões, somente as informações relativas à determinação estrutural à

baixa temperatura são apresentadas na Tabela 15 junto com os parâmetros de cela unitária determinados às temperaturas baixa e ambiente. Vale ressaltar que a concordância entre as constantes de cela unitária às temperaturas ambiente e baixa revela a inexistência de transições de fase cristalina nesta faixa de temperatura.

Figura 52 - Unidade assimétrica cristalográfica da dupla hélice de lamivudina. Elipsóides térmicos a uma probabilidade de 30% e esferas de raio arbitrário ilustram os átomos não hidrogenóides e os hidrogênios, respectivamente. Os três pontos verticais indicam que o par $E^+ \equiv F$ foi deslocado de sua posição de sobreposição ao par $C^+ \equiv D^+$. Ligações entre as frações dos átomos de oxigênio hidroxílico em sítios extras de ocupação 40% e os átomos de carbono metilênico foram representadas como linhas pontilhadas, assim como as ligações entre as frações extras dos átomos de enxofre e carbono do anel oxatolano do conformêro A e as ligações de hidrogênio clássicas intermoleculares.

Oito conformêmeros do fármaco estruturaram a dupla hélice de lamivudina (Figura 53). Quatro deles foram protonados, os quais foram rotulados como conformêmeros A, D, E e H. Os outros quatro conformêmeros (rotulados como B, C, F e G) foram neutros. Nos oito conformêmeros de lamivudina, os fragmentos de citosina assumiram a conformação *anti*. Esta conformação também ocorre nos resíduos hemiprotonados de citidina encontrados em estruturas de *i*-ADNs (123,124). Os anéis oxatolano dos conformêmeros B, C e D adotaram conformações C2'-*endo*, com o átomo de carbono C2' no ponto de inflexão do anel de cinco membros (Tabela 16). Com respeito ao plano mínimo quadrado atravessando os átomos $C1'—O1'—C4'—S3'$, o

átomo de carbono C2' é *syn* orientado em relação ao fragmento de citosina nestes três confôrmeros. Os anéis oxatolano dos confôrmeros E, F, G e H apresentam a conformação típica C3'-*endo* com o átomo de enxofre no ponto de inflexão do anel 2',3'-didesoxi-3'-tiorribose. Estas conformações C2'-*endo* e C3'-*endo* também ocorrem nos resíduos de 2'-desoxirribose de *i*-ADNs, como na estrutura tetramérica formada por hélices intercaladas do oligonucleotídeo d(CCCC) (124). Esta tetraplex contém exclusivamente resíduos hemiprotonados de citidina, o que a torna apropriada para comparação com a dupla hélice de lamivudina descrita nesta seção. Assim como a maioria dos confôrmeros da dupla hélice de lamivudina, os açúcares dos resíduos de citidina adotam a conformação C3'-*endo* na estrutura tetramérica de *i*-ADN formada por hélices do oligonucleotídeo d(ACCCT) (126).

Por sua vez, cada um dos átomos de enxofre S3', carbono C2' e hidrogênio ligados a C2' ocuparam dois sítios de ocupação no confôrmero A. Esta desordem revelou que o anel oxatolano desta molécula cristalograficamente independente de lamivudina adota duas conformações envelope diferentes, ambas com o átomo de enxofre no ponto de inflexão do anel. Em uma das conformações cujas frações rotuladas S3'a, C2'a, H2'xa e H2'ya estão em sítios principais de ocupação 60%, a fração do átomo de enxofre está *syn* orientada em relação ao fragmento de citosina, remetendo a conformação C3'-*endo*. Na outra conformação, a fração do átomo de enxofre está *anti* posicionada em relação ao fragmento de citosina, configurando uma conformação similar à C3'-*exo* dos nucleotídeos fundamentais. Nesta conformação, as frações rotuladas S3'a', C2'a', H2'xa' e H2'ya' foram refinadas em sítios extras de ocupação 40%. Os anéis oxatolano de dois dos cinco confôrmeros presentes na forma I de lamivudina também adotam diferentes modos conformacionais, sendo que um deles inclusive exhibe um padrão de desordem similar àquele do confôrmero A da dupla hélice de lamivudina caracterizado pelas conformações C3'-*endo* e C3'-*exo* (95).

Tabela 15 - Constantes de cela às temperaturas baixa e ambiente e determinação estrutural à baixa temperatura da dupla hélice de lamivudina

Dupla hélice de lamivudina			
Fórmula mínima		4(C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₃ S)4(C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S) 2(C ₄ H ₃ O ₄)(C ₃ H ₈ O)4(H ₂ O)2Cl	
Massa da fórmula mínima (g/mol)		2271,28	
Dimensões do cristal (mm ³)		0,48 x 0,21 x 0,18	
Sistema cristalino		Monoclínico	
Grupo espacial		P2 ₁	
Z / Z'		16 / 8	
Temperatura (K)		298(1)	150,0(2)
Dimensões da cela unitária	a (Å)	14,2817(5)	14,2219(2)
	b (Å)	26,0361(6)	25,6079(3)
	c (Å)	15,1994(5)	15,1754(2)
	β (°)	117,397(1)	117,4652(5)
Volume da cela unitária (Å ³)		5017,9(3)	4903,9(1)
Densidade calculada (g/cm ³)		1,501	1,538
Coleta dos dados completos e determinação estrutural			
Coeficiente de absorção μ (mm ⁻¹)		0,335	
Fatores de transmissão mínimo e máximo (Gaussian)		T _{mín} = 0,884 T _{máx} = 0,964	
Intervalo em θ (°)		2,97 - 25,42	
Intervalo dos índices	h	-17 a 17	
	k	-30 a 30	
	l	-18 a 18	
Reflexões coletadas		64288	
Reflexões independentes		17829	
Índice de simetria (R _{int})		0,0952	
Completeza para θ _{máx} (%)		98,6	
F ₀₀₀		2380	
Parâmetros refinados		1367	
Qualidade do ajuste sobre F ²		1,103	
Índices residuais para I > 2σ(I)		R _I = 0,0587	
		wR ₂ = 0,1518	
		R1 = 0,0789	
Índices residuais para todos os dados		wR2 = 0,1719	
		0,778/-0,670	
Δρ _{máx} / Δρ _{mín} (e/Å ³)		0,778/-0,670	
Estrutura absoluta	Parâmetro de Flack	0,05(5)	
	Pares de Friedel	8686	
Nº de depósito no CCDC		734743	

Tabela 16 - Ângulos de torção (em °), distâncias (em Å) dos átomos localizados nos pontos de inflexão (p.i.) dos anéis oxatiolano em relação aos planos mínimos quadrados calculados através dos átomos coplanares destes anéis e conformações relacionadas das unidades cristalograficamente independentes de lamivudina (confôrmers A-H) presentes na dupla hélice de lamivudina.

Parte da estrutura	Torção ou Distância	Confôrmero A	Confôrmero B	Confôrmero C	Confôrmero D	Confôrmero E	Confôrmero F	Confôrmero G	Confôrmero H
Ligação N1—C1' entre os anéis de citosina e oxatiolano	C2—N1—C1'—O1'	156,9(4)	143,6(4)	154,9(4)	147,9(4)	163,1(4)	154,5(4)	156,6(4)	160,5(4)
	C6—N1—C1'—O1'	-26,0(6)	-38,2(6)	-24,6(6)	-36,4(5)	-12,1(6)	-24,5(5)	-18,9(5)	-21,1(5)
	C2—N1—C1'—C2'	-89,3(8) [§] / -74(1) ^{**}	-99,1(5)	-88,9(5)	-91,6(5)	-75,7(5)	-85,3(4)	-82,2(5)	-79,3(4)
	C6—N1—C1'—C2'	87,7(9) [§] / 104(1) ^{**}	79,0(5)	91,5(5)	84,1(5)	109,1(5)	95,5(4)	102,2(5)	99,1(4)
Conformação*		<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i>
	O1'—C1'—C2'—S3'	26(1) [§] / -23(1) ^{**}	-43,6(5)	-48,0(4)	-42,6(5)	36,0(4)	33,3(4)	33,4(4)	32,5(4)
	C1'—C2'—S3'—C4'	-39(1) [§] / -32(1) ^{**}	29,2(3)	28,5(3)	38,5(3)	-38,8(3)	-40,2(3)	-38,7(3)	-40,6(3)
	C2'—S3'—C4'—O1'	39,9(7) [§] / -34(1) ^{**}	-16,2(5)	-24,7(4)	-27,9(3)	33,7(3)	38,8(2)	35,8(3)	40,5(2)
	S3'—C4'—O1'—C1'	-35,2(5) [§] / 20,9(6) ^{**}	-9,3(4)	-3,6(3)	7,5(4)	-18,1(4)	-26,1(3)	-22,6(4)	-28,7(3)
	C4'—O1'—C1'—C2'	-13,3(8) [§] / 4(1) ^{**}	39,6(5)	48,5(5)	22,8(5)	-11,8(5)	-4,4(4)	-7,2(5)	-2,4(4)
	Átomo no p.i.	S3'a [§] / S3'a ^{**}	C2'b	C2'c	C2'd	S3'e	S3'f	S3'g	S3'h
	Distância do p.i. ao plano	0,959(3) [§] / -0,600(4) ^{**}	0,576(6)	0,562(6)	0,716(6)	0,769(1)	0,865(1)	0,833(1)	0,886(1)
Conformação [†]	DQM	0,0325 [§] / 0,0437 ^{**}	0,0192	0,0170	0,0178	0,0163	0,0150	0,0165	0,0151
		C3'-endo [§] / C3'-exo ^{**}	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C3'-endo	C3'-endo	C3'-endo	C3'-endo
Braço 5'-CH ₂ OH	O1'—C4'—C5'—O5'	-6(1)	65,1(7) ^{††} / -166,4(8) ^{§§}	-59,0(7)	-171,4(5) ^{††} / -61(1) ^{§§}	-172,5(5) ^{††} / 64,2(7) ^{§§}	65,8(5) ^{††} / -179,9(5) ^{§§}	63,3(6)	176,3(3)
	S3'—C4'—C5'—O5'	-110,2(9) [§] / -157,4(8) ^{**}	-56,5(6) ^{††} / 72,0(8) ^{§§}	-177,0(4)	69,0(6) ^{††} / 179,6(9) ^{§§}	67,6(5) ^{††} / -55,6(6) ^{§§}	-52,8(5) ^{††} / 61,4(5) ^{§§}	-56,4(5)	58,4(4)
Conformação [‡]		equatorial <i>anti</i>	axial <i>syn</i> ^{††} / equatorial <i>syn</i> ^{§§}	equatorial <i>anti</i>	equatorial <i>syn</i> ^{††} / equatorial <i>anti</i> ^{§§}	equatorial <i>syn</i> ^{††} / axial <i>syn</i> ^{§§}	axial <i>syn</i> ^{††} / equatorial <i>syn</i> ^{§§}	axial <i>syn</i>	equatorial <i>syn</i>

*Conformação do fragmento de citosina em relação ao anel oxatiolano. [†]Conformação envelope do anel oxatiolano relativa aos nucleotídeos canônicos. [‡]Conformação do grupo 5'-CH₂OH em que o átomo de oxigênio hidroxílico está *syn* ou *anti* orientado em relação ao átomo de enxofre (quando este átomo de oxigênio está ligado ao átomo de carbono C5' em uma posição equatorial) ou ao fragmento de citosina (quando ligado em uma posição axial). No confôrmere A, apesar do grupo 5'-OH estar na posição equatorial, a conformação em coincidência das ligações de C4'a e C5'a posiciona o átomo de hidrogênio ligado a C5' na posição axial *anti* orientado em relação ao fragmento de citosina. [§] As frações dos átomos C2' e S3' estão em sítios principais de ocupação 60%. ^{**} As frações dos átomos C2' e S3' estão em sítios extras de ocupação 40%. ^{††} A fração do átomo O5' está no sítio principal de ocupação 60%. ^{§§} A fração do átomo O5' está no sítio extra de ocupação 40%. O termo DQM abrevia o desvio quadrático médio dos átomos coplanares do anel oxatiolano que foram ajustados no plano mínimo quadrado.

Figura 53 – Os oito confôrmeros do fármaco da dupla hélice de lamivudina formada pelo pareamento entre fragmentos citosínicos protonados e neutros.

Nos confôrmeros A e C, a posição equatorial de ligação ao átomo de carbono C5' *anti* orientada em relação ao átomo de enxofre é ocupada pelo átomo de oxigênio hidroxílico. Entretanto, a rotação sobre o eixo da ligação C4'—C5' posiciona as ligações do átomo C5' em coincidência com as ligações do átomo C4' do confôrmero A. Portanto, o átomo de hidrogênio metilênico está ligado ao carbono C5' na posição axial *anti* orientada em relação ao fragmento de citosina. Esta conformação em coincidência foi observada somente neste confôrmero de lamivudina. Todos os demais confôrmeros das estruturas cristalinas reportadas do fármaco e as moléculas de lamivudina cujas estruturas foram determinadas neste estudo são caracterizados por uma conformação alternada das ligações aos átomos C4' e C5'. O grupo hidroxílico de lamivudina está desordenado em duas posições nos confôrmeros B, D, E e F. O átomo de oxigênio hidroxílico dos confôrmeros B, E e F ocupa ambas as posições axial (frações hidroxílicas O5'b—H5'Ob, O5'e—H5'Oe' e O5'f—H5'Of nos sítios de ocupação 60%, 40% e 60% dos confôrmeros B, E e F, respectivamente) e equatorial *syn* orientada em relação ao enxofre (frações hidroxílicas O5'b'—H5'Ob', O5'e—H5'Oe e O5'f'—H5'Of' nos sítios de ocupação 40%, 60% e 40% dos confôrmeros B, E e F, respectivamente) de ligação ao carbono metilênico C5'. As frações do átomo de oxigênio hidroxílico do confôrmero D

estão direcionadas às posições equatoriais de ligação ao carbono metilênico. Os sítios de ocupação 60% e 40% das frações hidroxílicas O5'd—H5'Od e O5'd'—H5'Od' estão *syn* e *anti* orientados em relação ao átomo de enxofre, respectivamente. Esta posição equatorial ocupada pelo átomo de oxigênio hidroxílico está *anti* orientada em relação ao átomo de enxofre no confômero B e *syn* orientada nos confômeros C e D de uma das moléculas de lamivudina com desordem orientacional. Os átomos de oxigênio O5' estão ligados aos carbonos C5' dos confômeros G e H nas posições axial e equatorial *syn* orientada em relação ao átomo de enxofre, respectivamente. As torções características dos confômeros do fármaco presentes na estrutura da dupla hélice de lamivudina e as distâncias dos átomos localizados nos pontos de inflexão dos anéis oxatiolano em conformações envelope em relação aos planos mínimos quadrados calculados através dos átomos coplares destes anéis de cinco membros são mostradas na Tabela 16.

Três ligações de hidrogênio entre fragmentos citosínicos protonados e neutros são responsáveis pelos pareamentos entre os confômeros A e B (par $A^+ \equiv B$), C e D (par $C \equiv D^+$), E e F (par $E^+ \equiv F$), e G e H (par $G \equiv H^+$) (Figura 54). Duas destas três ligações de hidrogênio são periféricas e ocorrem entre os grupos carbonílico e amínico dos fragmentos de citosina, similarmente às ligações de hidrogênio responsáveis pelos pareamentos entre os confômeros A e entre os confômeros B do 0,67-hidrato de lamivudina. Além destas duas ligações de hidrogênio $N4-H4N_x \cdots O2$, há uma terceira ligação de hidrogênio central $N3^+ - H3 \cdots N3$ entre os grupos imínicos protonado e neutro. Em média, as distâncias entre os átomos doadores e receptores das três ligações de hidrogênio dos pareamentos $A^+ \equiv B$, $C \equiv D^+$, $E^+ \equiv F$ e $G \equiv H^+$ são 2,77(4) Å ($N4-H4N_{x(3TC^+)} \cdots O2_{(3TC)}$), 2,89(5) Å ($N4-H4N_{x(3TC)} \cdots O2_{(3TC^+)}$) e 2,83(1) Å ($N3^+ - H3 \cdots N3$). Estes valores são similares às distâncias entre os átomos doadores e receptores das ligações hidrogênio responsáveis pelo pareamento de fragmentos hemiprotonados de citidina em estruturas de *i*-ADN. Nas tetraplexes de *i*-ADN formadas por hélices dos oligonucleotídeos d(CCCC) (124) e d(CCCT) (125), as distâncias entre os grupos amínicos e carbonílicos envolvidos nas duas ligações de hidrogênio periféricas $N4-H4N_x \cdots O2$ são similares devido à deslocalização do próton entre os átomos de nitrogênio imínico dos fragmentos citosínicos hemiprotonados. Os valores médios das distâncias $N4 \cdots O2$ são 2,75(10) Å e 2,77(8) Å nas estruturas dos oligonucleotídeos d(CCCC) (124) e d(CCCT) (125), enquanto que as distâncias $(N3 \cdots N3)^+$ entre os átomos de nitrogênio hemiprotonados envolvidos na ligação de hidrogênio central medem 2,76(8) Å e 2,74(8) Å nestas duas tetraplexes.

Os pares $A^+ \equiv B$, $C \equiv D^+$, $E^+ \equiv F$ e $G \equiv H^+$ são helicoidalmente sobrepostos face a face nesta ordem ao longo do eixo b . Confôrmeros protonados e neutros são sobrepostos alternadamente dentro de cada hélice da duplex de lamivudina (Figura 54). Portanto, os confôrmeros A^+ , C , E^+ e G são sobrepostos sequencialmente dentro de uma hélice, enquanto que na outra espiral os confôrmeros B , D^+ , F e H^+ se alternam nesta ordem. Em tetraplexes de *i*-ADNs, a carga positiva é deslocalizada através do par $(C \equiv C)^+$ como uma consequência da transferência do próton imínico entre as hélices pareadas (123). Em duplexes formadas por pares de citidina parcialmente protonados, alternância entre fragmentos de citosina protonados e neutros é esperada ocorrer dentro de cada hélice devido à otimização das distâncias entre os resíduos protonados (123). O espaçamento dos resíduos protonados de citosina em hélices complementares reduziria a repulsão entre as suas cargas positivas (123).

De fato, a dupla hélice de lamivudina demonstra experimentalmente esta hipótese levantada com a descoberta de tetraplexes de *i*-ADNs por Gehring e colaboradores (123). Nesta dupla hélice de um derivado nucleosídeo, o pareamento ocorre entre fragmentos citosínicos protonados e neutros ao invés do pareamento entre citosinas hemiprotonadas observado em tetraplexes ricas em citidina.

Conforme predito para uma duplex formada pelo pareamento entre fragmentos citosínicos protonados e neutros, os prótons se localizam em moléculas de lamivudina que se alternam com moléculas neutras do fármaco dentro de cada hélice. Sobreposição face a face dos pares é observada em ambas as estruturas da dupla hélice de lamivudina e de *i*-ADNs (123) (Figura 55). Similarmente à dupla hélice do 0,67-hidrato de lamivudina, as moléculas do fármaco são sobrepostas através de seus átomos de carbono C4 na duplex formada pelos pares lamivudina⁺≡lamivudina. Portanto, nessa estrutura há otimização geométrica da interação π - π entre os elétrons livres do átomo de nitrogênio amínico N4, o qual está distanciado, em média, 3,3(1) Å do centróide do anel citosínico, e os elétrons π da base nitrogenada. Na estrutura tetramérica de d(C₄) (124), os átomos de carbono C4 dos fragmentos de citosina são justapostos sobre os nitrogênios amínicos N4, os quais estão distantes 3,6(1) Å do centro do anel citosínico. No 0,67-hidrato de lamivudina, o valor médio das distâncias N4•••C_{cit} é de 3,35(2) Å. Como pode ser observado, as distâncias médias N4•••C_{cit} são similares nas duplexes formadas por pares lamivudina⁺≡lamivudina ou por pares lamivudina=lamivudina. Isto demonstra que a otimização das interações π - π entre fragmentos citosínicos sobrepostos de lamivudina ocorre em ambas as duplexes do fármaco, independente da protonação parcial ou não das moléculas de lamivudina. Por outro lado, a

sobreposição dos resíduos de citidina na tetraplex de d(CCCC) resulta em interações π – π menos orientadas geometricamente devido à rigidez do esqueleto covalente da estrutura formado pelas ligações fosfodiéster.

Em tetraplexes de *i*-ADNs, a sobreposição face a face dos pares $(C\equiv C)^+$ ocorre devido à intercalação antiparalela de duas duplexes formadas por hélices paralelas. A sobreposição face a face dos pares de lamivudina sugere que esta orientação de empilhamento pode ocorrer também em duplexes formadas pelo pareamento entre resíduos protonados e neutros de citidina. Igualmente, a dupla hélice de lamivudina demonstra que estruturas de ácidos nucleicos de *i*-ADNs podem ser arquitetadas até mesmo sem os grupos 3'-hidroxílico e 5'-fosfato, uma vez que a duplex de nucleosídeos é estabilizada através das interações responsáveis pelo pareamento e sobreposição das moléculas de lamivudina.

Figura 54 – A dupla hélice formada pelos pares lamivudina⁺≡lamivudina. (a) Sobreposição face a face dos pares de lamivudina ao longo do eixo *b* a distâncias d_n . (b) Quatro pares do fármaco cristalograficamente independentes formam a dupla hélice de lamivudina. Os átomos de hidrogênio foram omitidos. (c) Duas hélices complementares com alternância entre fragmentos citosínicos protonados e neutros são espiraladas à esquerda. As cargas das moléculas de lamivudina de uma das duas hélices foram mostradas ao lado das respectivas unidades. Projeções normais à direção [010] são mostradas em (a) e (c), onde uma volta e meia da duplex, a qual contém doze pares do fármaco referentes ao conteúdo de lamivudina de uma cela unitária e meia, são mostradas. Em (b), os pares são projetados paralelamente à direção [010]. Visando à clareza das representações, solventes (água e isopropanol), ânions (cloreto e hidrogenomaleato) e frações atômicas de lamivudina em sítios extras de ocupação foram omitidos.

Figura 55 – (a) Uma volta da dupla hélice de lamivudina completa com oito pares lamivudina⁺≡lamivudina sobrepostos face a face. Moléculas de lamivudina de duas celas unitárias e meia (20 pares lamivudina⁺≡lamivudina) são projetadas perpendicularmente ao eixo da duplex, paralelo à direção [010]. Em destaque são projetados oito pares de lamivudina referentes a uma volta completa da duplex. Solventes (água e isopropanol), ânions (cloreto e hidrogenomaleato), átomos de hidrogênio e frações atômicas de lamivudina em sítios extras de ocupação foram omitidos. (b) Tetraplex de *i*-ADN formada pelo oligonucleotídeo d(CCCC) (124). Moléculas de água foram omitidas visando à clareza da representação. (c) Sobreposição face a face dos pares de citidina e de lamivudina nas estruturas do *i*-ADN de d(CCCC) (124) e na dupla hélice de lamivudina. Os dois pares sobrepostos foram projetados paralelamente (acima) e perpendicularmente (abaixo) aos eixos das respectivas estruturas helicoidais. Átomos de hidrogênio e os grupos fosfato do oligonucleotídeo d(C₄) foram omitidos na representação em que a orientação face a face das sobreposições é ilustrada.

A distância média de sobreposição dos pares de lamivudina é 3,2(1) Å na dupla hélice descrita nesta seção. Este valor é similar ao espaçamento entre os pares de resíduos hemiprotonados de citidina em estruturas de *i*-ADN (124,125,126). Os pares (C≡C)⁺ são sobrepostos a distâncias compreendidas entre 3,0 a 3,2 Å em *i*-ADNs. Os planos dos fragmentos citosínicos dos pares de lamivudina estão inclinados aproximadamente 3° em relação ao eixo principal de espiralização. Inclinações discretas como esta também são reportadas em *i*-ADNs (123,124), embora inclinações maiores de 6° e 7° curvem os pares de base em relação aos eixos principais das duplexes de B-ADNs e Z-ADNs, respectivamente (111).

A dupla hélice de lamivudina é espiralada à esquerda, com oito pares lamivudina⁺≡lamivudina por volta completa estendida a 25,6(1) Å (Figuras 54 e 55). Espiralização à esquerda é característica de Z-ADNs, enquanto que B-ADNs e *i*-ADNs são espiralados à direita. Outra diferença entre a dupla hélice de lamivudina e *i*-ADNs reside nos sulcos originados nas superfícies das estruturas. Há sulcos principais e secundários com extensões similares na dupla hélice de lamivudina, enquanto que sulcos principais extensos são margeados por sulcos secundários estreitos em *i*-ADNs. De fato, os sulcos da dupla hélice de lamivudina se assemelham mais aos sulcos de B-ADNs que aos sulcos de *i*-ADNs. Em adição, há diferentes raios da hélice, os quais compreendem o espaçamento entre os átomos de oxigênio dos grupos hidroxílicos dos quatro confôrmeros que mais se distanciam do centro da estrutura e o eixo central de espiralização, conforme mostrado na Figura 56. Assim como na dupla hélice do 0,67-hidrato de lamivudina, as duplexes de lamivudina descritas nesta seção são empacotadas em um arranjo hexagonal. Cada duplex de lamivudina é vizinha de outras seis dentro do plano *ac*, originando um arranjo de sete duplexes (Figura 56).

Além das ligações de hidrogênio e interações π - π entre os fragmentos de citosina de lamivudina, outros contatos intermoleculares contribuem para a estabilização da duplex. Nos sulcos da dupla hélice há interações intermoleculares entre os grupos amínicos de todos os confôrmeros de lamivudina e receptores de ligações de hidrogênio acomodados nos sulcos (Figura 57). Moléculas de água e ânions hidrogenomaleato estão presentes nos sulcos principais interagindo com os confôrmeros A, D, F e G através das ligações de hidrogênio N4a—H4Nya•••O2w, N4d—H4Nyd•••O3w, N4f—H4Nyf•••O1xMb e N4g—H4Nyg•••O4xMa (Figura 58 e Tabela 17). A molécula de isopropanol é doadora da ligação de hidrogênio O2IA—H•••O4xMb para o ânion hidrogenomaleato que também é receptor de uma ligação de hidrogênio no sulco principal. Nos sulcos secundários estão acomodados

ânions cloreto, moléculas de água e ânions hidrogenomaleato, os quais estão em contato com os confôrmeros B, C, E e H através das ligações de hidrogênio $N4b-H4Ny_b \cdots Cl1^{(-)}$, $N4c-H4Ny_c \cdots Cl2^{(-)}$, $N4e-H4Ny_e \cdots O1w$ e $N4h-H4Ny_h \cdots O1yMa^{(-)k}$ ($k = -1 + x; y; -1 + z$). Moléculas de água também interagem com os grupos amínicos de resíduos hemiprotonados de citidina através de seus átomos de hidrogênio que não estão envolvidos no pareamento $(C \equiv C)^+$ de *i*-ADNs (124). Assim como a hidratação dos sulcos principais da dupla hélice de lamivudina, os sulcos extensos são hidratados em estruturas de *i*-ADNs embora os seus sulcos estreitos sejam menos hidratados que os sulcos secundários da duplex de lamivudina (124).

Figura 56 – (a) Topologia da dupla hélice de lamivudina estruturada através do pareamento lamivudina⁺=lamivudina. Os raios da duplex relativos aos átomos de oxigênio dos grupos hidroxílicos dos confôrmeros mais externos são apresentados. Esta projeção paralela à direção [010] não exhibe os solventes, ânions, átomos de hidrogênio e frações atômicas de lamivudina em sítios extras de ocupação. (b) Empacotamento das duplexes no plano (010). Solventes, ânions, e frações atômicas de lamivudina em sítios extras de ocupação não foram incluídos neste diagrama estrutural.

Os grupos 5'-OH de todos os confôrmeros de lamivudina participam de ligações de hidrogênio. Os grupos hidroxílicos dos confôrmeros A, B (fração hidroxílica em sítios principais de ocupação 60%) e H são doadores das ligações de hidrogênio $O5'a-H \cdots O4yMa^{kk}$, $O5'b-H \cdots O4yMa^{kkk}$ e $O5'h-H \cdots O4xMa^l$ ($kk = 1 - x; 0,5 + y; 2 - z$; $kkk = 2 - x; 0,5 + y; 3 - z$; $l = -1 + x; y; z$) para um dos ânions hidrogenomaleato cristalograficamente independentes rotulado como hidrogenomaleato A (Figura 58). A fração hidroxílica do confôrmero B em sítios extras de ocupação 40% está acomodada no sulco

principal de uma duplex vizinha empacotada ao longo da direção [101] (Figura 59). Este grupo hidroxílico é doador de uma ligação de hidrogênio para o oxigênio carbonílico do fragmento citosínico do confômero C de uma duplex adjacente. Portanto, a ligação de hidrogênio $O5'b' - H \cdots O2c^{II}$ ($II = 1 + x; y; 1 + z$) responsável pelo desordenamento do braço hidroximetilênico do confômero B conecta duplexes ao longo da direção [101]. A acomodação do grupo 5'-OH de um dos confômeros do fármaco no sulco principal de uma duplex vizinha denota o empacotamento denso das duplas hélices.

Figura 57 – Moléculas de solventes e ânions interagem com os pares de lamivudina na dupla hélice formada pelo pareamento $lamivudina^+ \equiv lamivudina$. (a) Os pares de lamivudina são helicoidalmente sobrepostos face a face. Frações atômicas em sítios extras de ocupação foram omitidas em virtude da clareza da ilustração. (b) Representação de superfície da dupla hélice de lamivudina. Solventes e contra-íons foram omitidos. (c) Disposição helicoidal de moléculas de água, maleato e ânions cloreto nos sulcos secundários formados na superfície da dupla hélice. (d) Moléculas de água, isopropanol e maleato interagindo com a dupla hélice de lamivudina nos sulcos principais. Os eixos da cela unitária cristalográfica e vinte pares $lamivudina^+ \equiv lamivudina$ de duas celas unitárias e meia são mostrados em todas as ilustrações.

Figura 58 – Ligações de hidrogênio envolvendo os oito confôrmeros de lamivudina da dupla hélice estruturada através dos pareamentos lamivudina⁺≡lamivudina. Os átomos não hidrogenóides são representados pelos seus elipsóides térmicos a uma probabilidade de 30%, exceto os átomos dos confôrmeros de duplexes vizinhas ligados aos grupos hidroxílicos pertencentes ao par central representado pelos

continua

continuação

elipsóides térmicos. Neste caso, tanto os átomos de hidrogênio quanto os não hidrogenóides e suas ligações covalentes foram ilustrados como bastões verdes. ^m Frações atômicas em sítios principais de ocupação 60%. ^e Frações atômicas em sítios extras de ocupação 40%, as quais foram representadas através de seus elipsóides térmicos com cores ligeiramente atenuadas. Projeções normais às direções [101] e [001] são mostradas nas ilustrações em que os pares centrais representados pelos elipsóides térmicos foram $A^+ \equiv B$ e $C \equiv D^+$, respectivamente. Projeções normais à direção [100] são exibidas nas outras duas ilustrações. Posições equivalentes: (k) = - 1 + x; y; - 1 + z; (kk) = 1 - x; 0,5 + y; 2 - z; (kkk) = 2 - x; 0,5 + y; 3 - z; (l) = - 1 + x; y; z; (ll) = 1 + x; y; 1 + z; (lll) = - x; - 0,5 + y; 2 - z; (kl) = x; y; 1 + z; (lk) = 1 + x; y; z; (kkl) = 2 - x; - 0,5 + y; 2 - z.

Por sua vez o confômero H também é receptor da ligação de hidrogênio O2w—H4w^{lll}•••O5'h (lll = - x; - 0,5 + y; 2 - z) em que uma molécula de água é doadora de hidrogênio. Duas moléculas de água cristalograficamente independentes interagem com a fração hidroxílica do confômero D em sítios principais de ocupação 60%. Uma dessas moléculas de água é doadora da ligação de hidrogênio O1w—H2w^{kl}•••O5'd e a outra é receptora da ligação de hidrogênio O5'd—H•••O4w^{kl} (kl = x; y; 1 + z). Já a fração hidroxílica do confômero D em sítios extras de ocupação 40% é receptora de uma ligação de hidrogênio doada pelo grupo hidroxílico do confômero C de uma duplex vizinha. A ligação de hidrogênio O5'c—H^{kl}•••O5'd' entre os grupos 5'-OH dos confômeros C e D conecta as duplexes ao longo da direção [001]. Outra molécula de água cristalograficamente independente é receptora da ligação de hidrogênio O5'e—H•••O3w^{lk} (lk = 1 + x; y; z) proveniente da fração hidroxílica do confômero E em sítios de ocupação 60%. A fração hidroxílica do confômero E em sítios extras de ocupação 40% é doadora da ligação de hidrogênio O5'e'—H•••O5'f^{lk} para a fração hidroxílica do confômero F em sítios principais de ocupação 60%. Esta ligação conecta duplexes vizinhas ao longo da direção [100]. Portanto cada duplex está envolvida em ligações de hidrogênio com as outras seis duplexes que a circundam no plano (010) em um arranjo hexagonal (Figura 60). Cada duplex é ligada a outras duas duplexes ao longo da direção [101] por meio da interação O5'b'—H•••O2c, a outras duas ao longo da direção [001] através da ligação de hidrogênio O5'c—H•••O5'd', e a mais duas duplas hélices paralelamente à direção [100] através do contato O5'e'—H•••O5'f (Figura 60).

Já a fração hidroxílica do confômero F em sítios extras de ocupação 40% é receptora da ligação de hidrogênio O1w—H2w•••O5'f^{lk} em que uma molécula de água ligada ao sulco secundário de uma duplex vizinha é doadora de hidrogênio. Porém, a distância entre os átomos doador e receptor desta ligação de hidrogênio entre as moléculas de água e lamivudina F é maior quando comparada com a separação entre os átomos de oxigênio envolvidos na ligação de hidrogênio entre as frações hidroxílicas dos confômeros E e F (Tabela 17). As

distâncias $O1w \cdots O5'f^{lk}$ e $O5'e' \cdots O5'f^{lk}$ são 2,80(1) Å e 1,90(1) Å. Em adição a esta evidência geométrica que a ligação $O1w-H2w \cdots O5'f^{lk}$ é mais fraca que a ligação $O5'e'-H \cdots O5'f^{lk}$, esta mesma molécula de água tem seu átomo de hidrogênio H2w engajado em uma ligação de hidrogênio com a fração hidroxílica principal do conformero D, o que enfraquece ainda mais a interação $O1w-H2w \cdots O5'f^{lk}$. Por estas razões, a maior parte da população de conformeros F está interagindo com a fração hidroxílica dos conformeros E, uma vez que ambas as frações 5'-OH dos conformeros F nos sítios de ocupação 60% e 40% são doadoras de ligações de hidrogênio para um mesmo ânion cloreto. Vale ressaltar que as geometrias das ligações de hidrogênio $O5'f-H \cdots Cl2^{(-)l}$ e $O5'f'-H \cdots Cl2^{(-)l}$ são similares (Tabela 17), o que permite atribuir as diferentes ocupações das frações hidroxílicas do conformero F às magnitudes das interações em que estas frações 5'-OH são receptoras de ligações de hidrogênio. Através de seu grupo hidroxílico, o conformero G é doador da ligação de hidrogênio $O5'g-H \cdots Cl1^{(-)kl}$ para o outro ânion cloreto cristalograficamente independente ($kl = 2 - x; -0,5 + y; 2 - z$) (Figura 58).

Figura 59 – Acomodação da fração extra (ocupação 40%) do braço hidroximetilênico do conformero B de uma duplex no sulco principal de outra dupla hélice de lamivudina vizinha empacotada ao longo da direção [101].

Além das ligações de hidrogênio envolvendo os conformeros de lamivudina, as moléculas de água também interagem com as espécies aniônicas cristalizadas na estrutura da dupla hélice de lamivudina. As moléculas de água são doadoras de ligações de hidrogênio para o ânion hidrogenomaleato A (ligação $O1w-H1w \cdots O1xMa^{kl}$; $kl = x; y; -1 + z$) e para

os dois ânions cloreto cristalograficamente independentes (ligações $\text{O2w—H3w} \cdots \text{Cl1}^{(-)l}$, $\text{O3w—H5w} \cdots \text{Cl1}^{(-)l}$, $\text{O3w—H6w} \cdots \text{Cl2}^{(-)l}$ e $\text{O4w—H7w} \cdots \text{Cl2}^{(-)l}$).

Tabela 17 - Geometria das ligações de hidrogênio intermoleculares clássicas presentes na estrutura da dupla hélice de lamivudina.

Ligação	D—H $\cdots$ R ^h	D—H (Å)	H $\cdots$ R (Å)	D $\cdots$ R (Å)	D—H $\cdots$ R (°)
Pareamento A ⁺ ≡B	N _{4a} —H _{4Nxa} $\cdots$ O _{2b}	0,86	1,88	2,738(5)	176
	N _{3a} ⁽⁺⁾ —H _{3a} $\cdots$ N _{3b}	0,86	1,95	2,810(6)	173
	N _{4b} —H _{4Nxb} $\cdots$ O _{2a}	0,86	2,08	2,928(5)	169
Pareamento C≡D ⁺	N _{4c} —H _{4Nxc} $\cdots$ O _{2d}	0,86	1,98	2,834(5)	170
	N _{3d} ⁽⁺⁾ —H _{3d} $\cdots$ N _{3c}	0,86	1,98	2,832(6)	170
	N _{4d} —H _{4Nxd} $\cdots$ O _{2c}	0,86	1,93	2,787(5)	173
Pareamento E ⁺ ≡F	N _{4e} —H _{4Nxe} $\cdots$ O _{2f}	0,86	1,96	2,814(6)	175
	N _{3e} ⁽⁺⁾ —H _{3e} $\cdots$ N _{3f}	0,86	1,98	2,829(7)	172
	N _{4f} —H _{4Nxf} $\cdots$ O _{2e}	0,86	2,00	2,858(6)	176
Pareamento G≡H ⁺	N _{4g} —H _{4Nyg} $\cdots$ O _{2h}	0,86	2,06	2,920(6)	174
	N _{3h} ⁽⁺⁾ —H _{3h} $\cdots$ N _{3g}	0,86	1,98	2,836(7)	173
	N _{4h} —H _{4Nyh} $\cdots$ O _{2g}	0,86	1,88	2,737(6)	178
Duplex—Duplex	O _{5'b'} —H _{5'Ob'} $\cdots$ O _{2c} ^{ll}	0,82	2,72	3,299(7)	129
	O _{5'c} —H _{5'Oc} ^{kl} $\cdots$ O _{5'd'}	0,82	2,15	2,957(8)	168
	O _{5'e'} —H _{5'Oe'} $\cdots$ O _{5'f} ^{lk}	0,82	1,53	1,90(1)	104
Duplex—maleato	N _{4f} —H _{4Nyf} $\cdots$ O _{1xMb}	0,86	1,99	2,842(6)	172
	N _{4g} —H _{4Nyg} $\cdots$ O _{4yMa}	0,86	2,23	3,053(6)	160
	N _{4h} —H _{4Nyh} $\cdots$ O _{1yMa} ^{(—)k}	0,86	2,18	3,014(6)	165
	O _{5'a} —H _{5'Oa} $\cdots$ O _{4yMa} ^{kk}	0,82	2,61	3,30(1)	143
	O _{5'h} —H _{5'Oh} $\cdots$ O _{4xMa} ^l	0,82	1,93	2,725(6)	164
Duplex—Água	N _{4a} —H _{4Nya} $\cdots$ O _{2w}	0,86	1,98	2,817(7)	163
	N _{4d} —H _{4Nyd} $\cdots$ O _{3w}	0,86	2,01	2,834(7)	161

continua

continuação

	$N_{4c}-H_{4Nyc} \bullet \bullet \bullet O_{1w}$	0,86	2,11	2,942(6)	162
	$O_{5'd}-H_{5'Od} \bullet \bullet \bullet O_{4w}^{kl}$	0,82	2,06	2,846(10)	160
	$O_{5'e}-H_{5'Oe} \bullet \bullet \bullet O_{3w}^{lk}$	0,82	2,24	2,871(8)	134
Água—duplex	$O_{1w}-H_{2w}^{kl} \bullet \bullet \bullet O_{5'd}$	0,84	2,15	2,972(9)	163
	$O_{1w}-H_{2w} \bullet \bullet \bullet O_{5'f}^{lk}$	0,84	2,33	2,80(1)	115
	$O_{2w}-H_{4w}^{lll} \bullet \bullet \bullet O_{5'h}$	0,85	1,98	2,786(6)	157
Duplex—Cloreto	$N_{4b}-H_{4Nyb} \bullet \bullet \bullet Cl_1^{(-)}$	0,86	2,55	3,374(5)	161
	$N_{4c}-H_{4Nyc} \bullet \bullet \bullet Cl_2^{(-)}$	0,86	2,49	3,304(5)	158
	$O_{5'f}-H_{5'Of} \bullet \bullet \bullet Cl_2^{(-)l}$	0,82	2,40	3,111(5)	146
	$O_{5'f}-H_{5'Of} \bullet \bullet \bullet Cl_2^{(-)l}$	0,82	2,27	3,061(7)	163
	$O_{5'g}-H_{5'Og} \bullet \bullet \bullet Cl_1^{(-)kkl}$	0,82	2,35	3,144(4)	163
Água—maleato	$O_{1w}-H_{1w} \bullet \bullet \bullet O_{1xMa}^{klk}$	0,84	1,99	2,796(6)	161
Água—Cloreto	$O_{2w}-H_{3w} \bullet \bullet \bullet Cl_1^{(-)l}$	0,84	2,39	3,123(5)	146
	$O_{3w}-H_{5w} \bullet \bullet \bullet Cl_1^{(-)l}$	0,84	2,37	3,196(4)	168
	$O_{3w}-H_{6w} \bullet \bullet \bullet Cl_2^{(-)l}$	0,84	2,23	3,074(5)	177
	$O_{4w}-H_{7w} \bullet \bullet \bullet Cl_2^{(-)}$	0,88	2,38	3,130(6)	144
Isopropanol—maleato	$O_{2IA}-H_{2OIA} \bullet \bullet \bullet O_{4xMb}$	0,82	1,88	2,668(11)	162

^h Os termos D e R generalizam átomos doadores e receptores de ligações de hidrogênio. Posições equivalentes: ^k - 1 + x; y; - 1 + z; ^{kk} 1 - x; 0,5 + y; 2 - z; ^l - 1 + x; y; z; ^{ll} 1 + x; y; 1 + z; ^{lll} - x; - 0,5 + y; 2 - z; ^{kl} x; y; 1 + z; ^{lk} 1 + x; y; z; ^{kkl} 2 - x; - 0,5 + y; 2 - z; ^{klk} x; y; - 1 + z.

Figura 60 – Ligações de hidrogênio conectando os pares lamivudina⁺≡lamivudina de duplexes vizinhas ao longo das direções [100], [001] e [101]. Nestas ligações de hidrogênio, os átomos de oxigênio doadores e receptores de hidrogênio foram rotulados.

5.4 Caracterização morfológica por MEV: Dupla hélice de lamivudina

Com relação ao hábito cristalino, os cristais da dupla hélice de lamivudina formada pelos pares lamivudina⁺≡lamivudina apresentaram uma única morfologia externa. Inspeções por microscopia fotônica com luz polarizada e por MEV permitiram caracterizar cristais prismáticos retangulares, os quais chegaram a medir até 1 mm em sua maior dimensão.

O hábito cristalino de cristais da dupla hélice de lamivudina é mostrado na Figura 61.

Figura 61 – Micrografia eletrônica de varredura de cristais da dupla hélice de lamivudina Barra: 100 μm .

5.5 Caracterização cristalográfica por DRXP: Dupla hélice de lamivudina

O difratograma experimental por pó de uma amostra da dupla hélice de lamivudina foi concordante com o padrão teórico de DRX simulado usando a estrutura cristalina desta modificação cristalina (Figura 62). Houve concordância entre as posições das reflexões de Bragg observadas no difratograma de raios X da amostra analisada e as posições previstas com base na simulação do padrão teórico de DRXP. Diferenças entre as intensidades observadas e calculadas das reflexões de Bragg foram atribuídas a efeitos de orientação preferencial dos cristalitos da dupla hélice de lamivudina, o que pode estar relacionado ao hábito dos cristais da dupla hélice de lamivudina.

A ausência de reflexões de Bragg de outras impurezas cristalinas, como a forma II de lamivudina e ácido maléico, ambos usados para o preparo da dupla hélice de lamivudina, cloridratos e hidratos de lamivudina, foi comprovada no difratograma de raios X da amostra da duplex de lamivudina estruturada com os pares $\text{lamivudina}^+ \rightleftharpoons \text{lamivudina}$, assim como também não foram observados sinais de espalhamento difuso referentes a impurezas amorfas. Desta forma, foi atribuída à amostra analisada da duplex de lamivudina uma pureza cristalina de no mínimo 95%, conforme discutido na seção 3.3. A caracterização cristalográfica pela técnica de DRXP permitiu demonstrar o alto rendimento dos procedimentos desenvolvidos para o preparo da dupla hélice de lamivudina.

Figura 62 – Comparação entre o padrão de DRXP teórico da dupla hélice de lamivudina (linhas verticais) e o difratograma experimental da amostra desta modificação cristalina (linha contínua através dos pontos experimentais).

5.6 Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman: Dupla hélice de lamivudina

Bandas de absorção relacionadas a modos vibracionais das moléculas de lamivudina e do contra-íon hidrogenomaleato ligado aos sulcos da estrutura helicoidal foram observados no espectro na região do IV da dupla hélice de lamivudina (Figura 63). Em 1488 cm^{-1} e 1667 cm^{-1} / 1716 cm^{-1} são observadas bandas de absorção relativas ao estiramento $\nu_{\text{C}-\text{O}^-}$ do grupo carboxilato do hidrogenomaleato e ao estiramento $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ dos grupos carboxilato e carboxílico do hidrogenomaleato e do grupo carbonílico de lamivudina. Um das bandas de absorção em 1667 cm^{-1} assinalada ao modo vibracional $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ é observada em uma frequência inferior àquelas de grupos carbonílicos livres (geralmente entre 1700 a 1730 cm^{-1}). Este deslocamento é um resultado da recepção das ligações de hidrogênio intermoleculares pelos grupos carbonílicos e também foi observado nos espectros na região do IV do cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina e maleato de lamivudina, conforme descrito nas seções 3.4 e 4.4. Na dupla hélice de lamivudina, os grupos carbonílicos de lamivudina são receptores das ligações de hidrogênio responsáveis pelo pareamento entre moléculas protonada e neutra do fármaco e de uma ligação de hidrogênio em que a fração hidroxílica em sítios extras de ocupação de um dos confôrmeros do fármaco é doadora de hidrogênio. Já os átomos de oxigênio carbonílico dos ânions hidrogenomaleato recebem

ligações de hidrogênio dos grupos amínicos e hidroxílicos de lamivudina, de moléculas de água e do grupo hidroxílico do solvente isopropanol.

A banda de absorção na região do IV referente ao modo vibracional de deformação angular δ_{OH} das moléculas de água é observada em 1610 cm^{-1} no espectro da dupla hélice de lamivudina. Na estrutura da duplex de lamivudina, as moléculas de água são doadoras de ligações de hidrogênio para moléculas de lamivudina e ânions hidrogenomaleato e cloreto. Devido a esta doação de ligações de hidrogênio pelas moléculas de água, foi esperado um deslocamento da banda de absorção referente à deformação angular δ_{OH} das moléculas de água para uma frequência maior que a esperada (em torno de 1630 a 1650 cm^{-1}). Porém, este deslocamento não foi observado no espectro de absorção na região do IV da dupla hélice de lamivudina.

A região de altas frequências do espectro de absorção na região do IV da dupla hélice de lamivudina é caracterizada pela presença de uma banda de absorção intensa e difusa, o que dificulta a atribuição dos modos vibracionais isoladamente. Mesmo assim, bandas de absorção em 3352 cm^{-1} e em 3495 cm^{-1} no espectro na região do IV da duplex de lamivudina puderam ser atribuídas aos estiramentos ν_{N-H} do fragmento de citosina e ao estiramento ν_{O-H} do hidrogenomaleato, respectivamente.

O espectro Raman da dupla hélice de lamivudina apresentou bandas de espalhamento em frequências muito próximas, resultando em sinais espectroscópicos vibracionais difusos (Figura 64). Estas bandas de espalhamento superpostas estão de acordo com o fato que na estrutura da dupla hélice de lamivudina há oito confôrmeros que contribuem igualmente para o espalhamento Raman total desta modificação cristalina. Devido a esta diversidade de confôrmeros de lamivudina, ambientes químicos diferentes são configurados em torno dos grupos funcionais cujas vibrações resultam em espalhamento Raman. Portanto, os modos vibracionais ativos para o espalhamento Raman dependeram das características eletrônicas dos grupos espalhadores de cada um dos oito confôrmeros de lamivudina. Uma vez que as conformações não são muito diferentes, há discretas alterações nas frequências dos modos vibracionais. Consequentemente, uma frequência referente a um modo vibracional é desdobrada em frequências muito próximas, o que causa o alargamento das bandas de espalhamento.

Figura 63 - Espectro de absorção na região do IV da dupla hélice de lamivudina. (i) Bandas de absorção em 1488 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} , 1667 cm^{-1} /1716 cm^{-1} , 3352 cm^{-1} e 3495 cm^{-1} atribuídas aos modos vibracionais $\nu_{\text{C}-\text{O}^-}$, δ_{OH} da água, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, $\nu_{\text{N}-\text{H}}$ e $\nu_{\text{O}-\text{H}}$.

Ainda assim, modos vibracionais característicos dos confôrmeros de lamivudina e dos contra-íons hidrogenomaleato foram identificados com base em bandas de espalhamento mais bem definidas (Figura 64). Em 790 cm^{-1} e 3057 cm^{-1} foram observadas bandas de espalhamento Raman ligadas à deformação angular fora do plano $\sigma_{\text{C}-\text{H}}$ do fragmento citosínico de lamivudina e do hidrogenomaleato e ao estiramento $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ da ligação covalente entre o átomo carbono metilênico C5' e o átomo de hidrogênio na posição equatorial *syn* orientada em relação ao enxofre. Na dupla hélice de lamivudina, os confôrmeros A, C, G, 60% das populações dos confôrmeros B e F e 40% das populações dos confôrmeros D e E (Figura 53) exibem uma conformação do braço 5'-CH₂OH similar àquelas do cloridrato monoidratado de lamivudina e do maleato de lamivudina. Como observado nos espectro Raman destas duas modificações cristalinas, a banda de espalhamento referente ao estiramento ν_{CH} da ligação metilênica vizinha ao átomo de enxofre é deslocada para uma frequência maior que a esperada no espectro Raman da dupla hélice de lamivudina como

consequência de uma provável indução eletrônica pelo átomo de enxofre (172,173), conforme descrito na seção 3.4.

Modos vibracionais dos estiramentos $\nu_{C=O}$ do maleato e do fragmento de citosina foram atribuídos às bandas de espalhamento em 1655 cm^{-1} e 1703 cm^{-1} no espectro Raman da dupla hélice de lamivudina.

Figura 64 - Espectro Raman da dupla hélice de lamivudina. (i) Bandas de espalhamento em 790 cm^{-1} , 1655 cm^{-1} , 1703 cm^{-1} e 3057 cm^{-1} atribuídas a modos vibracionais das moléculas de lamivudina e dos contra-íons hidrogenomaleato.

5.7 Caracterização térmica por CED e TG: Dupla hélice de lamivudina

O comportamento térmico da amostra da dupla hélice de lamivudina foi atípico. Dois eventos endotérmicos iniciando em $49,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $85,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram observados no termograma de CED da dupla hélice de lamivudina (Figura 65). O primeiro evento foi atribuído à dessolvatação da estrutura, embora a curva de TG não reforce este assinalamento. O segundo evento foi atribuído à fusão desta modificação cristalina. Esta baixa provável temperatura de fusão reflete diretamente a baixa energia da rede cristalina da dupla hélice de lamivudina, o

que foi correlacionado com a solubilidade no equilíbrio desta duplex de nucleosídeos, conforme apresentado na seção 5.9. A baixa energia de rede da dupla hélice de lamivudina pode estar relacionada com a baixa estabilidade da arquitetura supramolecular em que pares lamivudina⁺≡lamivudina são helicoidalmente sobrepostos. O caráter helicoidal introduz tensão de espiralização na estrutura que é sustentada devido às interações intermoleculares com moléculas de solvente (água e isopropanol) e contra-íons (hidrogenomaleato e cloreto) alojados nos sulcos de sua superfície. Consequentemente, tal arranjo arquitetônico supramolecular apresenta baixa estabilidade e pode ser facilmente desestruturado após eliminação de moléculas de solvente, o que é demonstrado pela sua baixa provável temperatura de fusão. Em adição, um evento exotérmico em 201,9 °C observado no termograma de CED pode ser atribuído à decomposição das moléculas de lamivudina.

Figura 65 – Termograma de CED da dupla hélice de lamivudina.

5.8 Recuperação em solução por CLAE: Dupla hélice de lamivudina

Uma vez certificada a pureza cristalina da amostra da dupla hélice de lamivudina por DRXP, a pureza química desta modificação cristalina e sua estequiometria proposta com base na determinação da estrutura por DRXM foram avaliadas através do ensaio de recuperação de lamivudina em solução pela técnica de CLAE (Figura 66). Baseado nestas análises, a concentração quantificada do fármaco foi concordante com a concentração calculada

assumindo a estequiometria de oito moléculas de lamivudina para cada quatro moléculas de água, duas moléculas de ácido maléico, duas moléculas de ácido clorídrico e uma molécula de isopropanol. Portanto, a estequiometria determinada por DRXM foi certificada e a pureza relativa da amostra da dupla hélice de lamivudina foi considerada satisfatória para sua utilização no ensaio de solubilidade no equilíbrio (Tabela 18).

Figura 66 – Cromatograma da dupla hélice de lamivudina. Além do sinal cromatográfico referente à lamivudina, um pico atribuído ao hidrogenomaleato pode ser observado com um tempo de retenção de aproximadamente 90 s.

Tabela 18 - Recuperação e pureza do fármaco na dupla hélice de lamivudina.

Dupla hélice de lamivudina	
Teor experimental médio (g de lamivudina /g de amostra)	0,825±0,020
Teor esperado para estequiometria 8:4:2:2:1 (lamivudina:água:ácido maléico:ácido clorídrico:isopropanol) (g de lamivudina /g de amostra)	0,809
Pureza relativa média (%)	102,0±2,5

5.9 Solubilidade no equilíbrio

A solubilidade no equilíbrio da dupla hélice de lamivudina foi aproximadamente 4,5 vezes maior que a solubilidade da forma II do fármaco. A dupla hélice de lamivudina apresentou uma solubilidade no equilíbrio de 574 ± 13 mg/mL, enquanto que sob as mesmas condições experimentais uma solubilidade de 127 ± 2 mg/mL foi determinada para a forma II de lamivudina.

A elevada solubilidade da dupla hélice de lamivudina já era esperada como consequência da existência de cargas positivas nos pares parcialmente protonados

lamivudina⁺≡lamivudina e cargas negativas nos ânions hidrogenomaleato e cloreto. Interações íon-dipolo entre espécies protonadas e moléculas de água contribuem para o aumento da energia de hidratação das espécies constituintes do cristal, favorecendo sua solubilização (174). A dupla hélice de lamivudina apresenta uma estrutura atípica em que uma unidade protonada de lamivudina pareia com outra unidade neutra através de três ligações de hidrogênio e estes pares são helicoidalmente sobrepostos face a face mimetizando estruturas de ADN, como, por exemplo, *i*-ADNs formados por pareamentos (C≡C)⁺ (123). Em termos de propriedades de estado sólido, a dupla hélice de lamivudina não pode ser analisada como um sal comum, apesar de seu caráter iônico explicar, em parte, sua alta solubilidade.

Mesmo assim, esta propriedade de estado sólido pode ser correlacionada com um parâmetro termodinâmico e com características estruturais. Conforme apresentado na seção 5.7, a dupla hélice de lamivudina provavelmente funde a uma temperatura muito baixa quando comparada com as temperaturas de fusão das outras formas sólidas do fármaco. Esta baixa temperatura de fusão da dupla hélice de lamivudina reflete sua baixa energia de rede, o que está de acordo com sua alta solubilidade. O empacotamento das duplexes também pode prover argumentos para a interpretação da alta solubilidade desta modificação cristalina de lamivudina. A acessibilidade das moléculas de água aos pares lamivudina⁺≡lamivudina e às demais espécies químicas do cristal é favorecida pelo empacotamento hexagonal das duplexes, o que resulta em extensas e uniformes áreas superficiais onde as interações entre solvente e soluto são otimizadas. Portanto, a transferência das moléculas de lamivudina para a solução é favorecida como consequência do aumento da energia de hidratação dos pares de lamivudina arranjos em extensões superficiais expostas às moléculas de água da solução. Apesar de ambas as interpretações das energias de rede e de hidratação providenciarem argumentos termodinâmicos e estruturais para justificar a alta solubilidade da dupla hélice de lamivudina, algumas questões permanecem sobre o processo de solubilização desta modificação cristalina. Seria a dupla hélice fragmentada dentro de estruturas menores formada por números aleatórios ou definidos de pares lamivudina⁺≡lamivudina, estruturas estas que ainda conservariam em solução aquosa as ligações de hidrogênio responsáveis pelo pareamento entre os fragmentos citosínicos e as interações π - π que governam a sobreposição helicoidal dos pares? Ou os pares lamivudina⁺≡lamivudina são liberados individualmente? Uma vez liberados em solução, as ligações de hidrogênio responsáveis pelo pareamento entre as unidades protonadas e neutras de lamivudina são clivadas ao decorrer do processo de dissolução da dupla hélice de lamivudina? Enfim, investigações adicionais devem ser conduzidas a fim de entender esta propriedade de estado sólido da dupla hélice de lamivudina.

6 CLORIDRATO DE ZALCITABINA E CLORIDRATO DE ZALCITABINA E LAMIVUDINA

6.1 Caracterização morfológica por MEV

Cristais com formato de bastões e de placas foram obtidos após a evaporação das matrizes de cristalização do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de zalcitabina e lamivudina. Micrografias eletrônicas destes cristais são mostradas na Figura 67.

Figura 67 – Micrografia eletrônica de varredura de cristais do cloridrato de zalcitabina (esquerda) e do cloridrato de zalcitabina e lamivudina (direita). Barra: 5 μm .

6.2 Determinação estrutural por DRXM

A estrutura do cloridrato de zalcitabina foi resolvida no grupo espacial monoclinico $P2_1$, com duas espécies catiônicas (zalcitabina)⁺ com o átomo de nitrogênio imínico do fragmento citosínico protonado e dois contra-íons cloreto por cela unitária cristalográfica, enquanto que o cloridrato de zalcitabina e lamivudina apresentou uma molécula protonada de zalcitabina, uma molécula protonada de lamivudina, ambos os fármacos com seus prótons

localizados no nitrogênio imínico dos fragmentos citosínicos, e dois contra-íons cloreto na unidade assimétrica de uma cela triclínica não centrossimétrica *P1*. A Tabela 19 mostra as informações relativas às determinações estruturais destes sais conduzidas à temperatura de 150 K. As constantes de cela unitária do cloridrato de zalcitabina e lamivudina determinadas à temperatura ambiente e os dados cristalográficos referentes à determinação estrutural do cloridrato de zalcitabina a esta temperatura também são apresentados na Tabela 19. Vale ressaltar que os dados completos de DRXM do cloridrato de zalcitabina e lamivudina não foram coletados à temperatura ambiente devido à baixa qualidade do cristal, apesar das constantes de cela desta modificação cristalina permitam afirmar a ausência de transições de fase entre as temperaturas de 150 K e 298 K.

Assim como as matrizes de cristalização do cloridrato de lamivudina e do cloridrato monohidratado de lamivudina, um pH inferior a dois foi configurado com a adição de 250 µL de uma solução aquosa de ácido clorídrico a 1% (m/vol) nas matrizes de cristalização do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de zalcitabina e lamivudina. Sob esta condição de pH, as concentrações das formas protonadas de zalcitabina (pK_a 4,34 (187)) e de lamivudina (pK_a 4,30 (166)) foram pelo menos 200 vezes maior que as concentrações das formas neutras dos respectivos fármacos em ambas as matrizes de cristalização destas duas modificações cristalinas, resultando na cristalização dos fármacos na forma de sais ao invés da cristalização de fases sólidas contendo as formas neutras de zalcitabina e lamivudina.

O cloridrato de zalcitabina é isoestrutural ao cloridrato de lamivudina. A mesma arquitetura supramolecular do cloridrato de lamivudina é observada no cloridrato de zalcitabina. Como resultado desta coincidência estrutural, as constantes de cela unitária do cloridrato de zalcitabina (Tabela 19) e do cloridrato de lamivudina (Tabela 1) são similares. As conformações dos fármacos nestas estruturas também são semelhantes. Similarmente à conformação do fármaco no cloridrato de lamivudina, o fragmento de citosina e o anel 2',3'-didesoxirribose de zalcitabina são caracterizados pelas conformações *anti* e C3'-*endo*, respectivamente. Os valores dos ângulos de torção que remetem às conformações de zalcitabina no cloridrato de zalcitabina e no cloridrato de zalcitabina e lamivudina são apresentados na Tabela 20, junto com os parâmetros geométricos correspondentes de lamivudina nesta última modificação cristalina.

Tabela 19 - Dados cristalográficos e estatísticos das determinações estruturais do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de zalcitabina e lamivudina.

Cloridrato de zalcitabina			Cloridrato de zalcitabina e lamivudina	
Fórmula mínima			(C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₃)Cl	
Massa da fórmula mínima (g/mol)			247,68	
Dimensões do cristal (mm ³)			0,60 x 0,12 x 0,06	
Sistema cristalino			monoclínico	
Grupo espacial			P2 ₁	
Z / Z'			2 / 1	
Temperatura (K)			298(2)	
Dimensões da cela unitária			a (Å)	
			b (Å)	
			c (Å)	
			α (°)	
			β (°)	
			γ (°)	
Volume da cela unitária (Å ³)			553,41(4)	
Densidade calculada (g/cm ³)			1,486	
			1,525	
			1,497	
			1,548	
			Coleta dos dados completos e determinação estrutural	
Coeficiente de absorção μ (mm ⁻¹)			0,342	
Fatores de transmissão mínimo e máximo (Gaussian)			T _{mín} = 0,882	
Intervalo em θ (°)			3,97 – 24,85	
Intervalo dos índices			h	
			k	
			l	
Reflexões coletadas			4896	
Reflexões independentes			1653	
Índice de simetria (R _{int})			0,0655	
Completeza para θ _{máx} (%)			97,1	
F ₀₀₀			260	
Parâmetros refinados			157	
Qualidade do ajuste sobre F ²			1,074	
Índices residuais para I > 2σ(I)			R _I = 0,0407	
			wR ₂ = 0,1048	
Índices residuais para todos os dados			R _I = 0,0440	
			wR ₂ = 0,1083	
Δρ _{máx} / Δρ _{mín} (e/Å ³)			0,380/-0,160	
Estrutura absoluta			Parâmetro de Flack	
			Pares de Friedel	
Nº de depósito no CCDC			788023	

Com relação à conformação do açúcar didesoxigenado de zalcitabina, o átomo de carbono C3' está deslocado do plano mínimo quadrado formado pelos átomos O1', C1', C2' e C4' por 0,566(2) Å e (o desvio quadrático médio dos átomos ajustados no plano mínimo quadrado é 0,0088 Å). A conformação do braço hidroximetilênico de zalcitabina também

remete àquela de lamivudina nos sais correspondentes, com o átomo de oxigênio hidroxílico na posição equatorial de ligação ao carbono C5' *syn* orientada em relação ao átomo de carbono C3'.

De fato, lamivudina é um análogo nucleosídeo de zalcitabina derivado da substituição isostérica do grupo 3'-CH₂ do anel 2',3'-didesoxirribose de zalcitabina por um átomo de enxofre. A similaridade das estruturas moleculares destes dois fármacos está relacionada com o caráter isoestrutural de suas modificações cristalinas, o que é corroborado inspecionando as respectivas fases sólidas formadas pelas formas neutras de ambos os fármacos.

Tabela 20 - Ângulos de torção selecionados dos confôrmeros de zalcitabina e lamivudina presentes nas estruturas do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de zalcitabina e lamivudina determinadas à temperatura de 150 K.

Parte da estrutura	Torção	Cloridrato de zalcitabina	Cloridrato de zalcitabina e lamivudina	
			zalcitabina	lamivudina
Ligação N1—C1' entre os anéis de citosina e de cinco membros	C2—N1—C1'—O1'	-162,5(2)°	-165,3(8)°	158,6(8)°
	C6—N1—C1'—O1'	17,9(3)°	22(1)°	-27(1)°
	C2—N1—C1'—C2'	79,7(2)°	77(1)°	-83(1)°
	C6—N1—C1'—C2'	-99,8(2)°	-96(1)°	91(1)°
Anel de cinco membros	O1'—C1'—C2'—C3'(S3')	-25,8(2)°	-28,8(9)°	33,5(8)°
	C1'—C2'—C3'(S3')—C4'	35,8(2)°	37,3(9)°	-41,9(7)°
	C2'—C3'(S3')—C4'—O1'	-34,1(2)°	-35,7(9)°	40,2(7)°
	C3'(S3')—C4'—O1'—C1'	19,1(2)°	19(1)°	-27,5(9)°
	C4'—O1'—C1'—C2'	4,6(2)°	7(1)°	-4(1)°
Braço 5'-CH ₂ OH	O1'—C4'—C5'—O5'	172,5(2)°	60(1)°	-142(2)° [†] /-75(2)° [§]
	C3'(S3')—C4'—C5'—O5'	-69,2(3)°	-174,8(8)°	71(1)° [†] /165(2)° [§]

[†] As frações dos átomos C5' e O5' estão nos sítios principais de ocupação 60%. [§] As frações dos átomos C5' e O5' estão nos sítios extras de ocupação 40%.

A fase cristalina reportada de zalcitabina (89,90) é isoestrutural à forma II de lamivudina (95). Entretanto, zalcitabina cristaliza no grupo espacial tetragonal não centrossimétrico enantiomórfico *P*4₁2₁2 (89,90), enquanto lamivudina cristaliza no grupo espacial relacionado *P*4₃2₁2 na forma II (95). A cristalização de lamivudina e zalcitabina em grupos espaciais não centrossimétricos enantiomórficos diferentes se deve à configuração absoluta das ligações dos átomos quirais de carbono C1' e C4' de ambos os fármacos. As configurações dos carbonos C1' e C4' são *R* e *S* em zalcitabina e *S* e *R* em lamivudina. A inversão destas configurações destes dois fármacos está de acordo com a quiralidade das suas estruturas cristalinas, uma vez que os grupos espaciais *P*4₁2₁2 e *P*4₃2₁2 são pares enantiomórficos. Portanto, os grupos espaciais diferentes em que cristalizam lamivudina e zalcitabina nas suas formas neutras são devidos apenas à estereoquímica invertida das

estruturas moleculares dos fármacos. Apesar do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina cristalizarem em um mesmo grupo espacial monoclinico não centrossimétrico quiral, suas configurações estão invertidas uma em relação à outra em concordância com a estereoquímica dos átomos de carbono C1' e C4' dos fármacos (Figura 68). O caráter isoestrutural das fases cristalinas de zalcitabina e lamivudina demonstra que os átomos na posição 3' do anel de cinco membros e a estereoquímica dos carbonos C1' e C4' não governam os arranjos intermoleculares e as conformações destes fármacos no estado sólido.

Figura 68 – (a) Unidade assimétrica do cloridrato de zalcitabina. Elipsóides térmicos a uma probabilidade de 50% e esferas de raio arbitrário ilustram os átomos não hidrogenóides e os átomos de hidrogênio, respectivamente. (b) As unidades assimétricas do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina podem ser relacionadas por um pseudo plano especular (linha) devido à configuração dos átomos de carbono C1' e C4' dos fármacos. (c) Cloridrato de zalcitabina e cloridrato de lamivudina são isoestruturais, apesar de suas estruturas serem pseudo imagens especulares uma da outra. A linha representa um pseudo plano especular refletindo as estruturas das duas modificações cristalinas.

Similar à estrutura do cloridrato de lamivudina, no cloridrato de zalcitabina há ligações de hidrogênio bifurcadas em que o ânion cloreto está ligado a ambos os grupos

amínicos N—H e imínicos protonados $N^{(+)}\text{—H}$ do fármaco (Figura 69). Estas ligações de hidrogênio bifurcadas através dos átomos $N3^{(+)}\text{—H}\cdots\text{Cl1}^{(-)}$ e $N4\text{—H4N}_x\cdots\text{Cl1}^{(-)}$ estruturam o par iônico (zalcitabina) $^{+}\text{Cl}^{-}$, em que o ânion cloreto está coplanar ao fragmento de citosina. O ânion cloreto está distanciado 0,079(1) Å do plano do fragmento citosínico ao qual está ligado através das ligações de hidrogênio bifurcadas (o desvio quadrático médio dos átomos ajustados no plano mínimo quadrado formado pelos átomos N1, C2, O2, N3, C4, N4, C5 e C6 é 0,0172 Å). Os valores dos parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio clássicas presentes nas estruturas do cloridrato de zalcitabina (Tabela 21) e do cloridrato de lamivudina (Tabela 2) são similares, em concordância com o caráter isoestrutural destes sais.

O grupo amínico de zalcitabina também é doador da ligação de hidrogênio $N4\text{—H4Ny}\cdots\text{Cl1}^{(-)g}$ ($g = -1 - x; 0,5 + y; 1 - z$). Assim como na estrutura do cloridrato de lamivudina em que há esta ligação de hidrogênio, o ânion cloreto $\text{Cl1}^{(-)g}$ não está coplanar ao fragmento de citosina ao qual está ligado através da ligação de hidrogênio $N4\text{—H4Ny}\cdots\text{Cl}^{(-)g}$. Neste caso, o ânion cloreto $\text{Cl1}^{(-)g}$ está distanciado 1,673(1) Å do plano citosínico. Os ânions cloretos $\text{Cl1}^{(-)}$ e $\text{Cl1}^{(-)g}$, ligados a um mesmo fragmento citosínico de zalcitabina, são relacionados por simetria roto-translacional de segunda ordem (eixo 2_1). As ligações $N4\text{—H4Ny}\cdots\text{Cl}^{(-)g}$ conectam as unidades (zalcitabina) $^{+}\text{Cl}^{-}$ vizinhas relacionadas por simetria roto-translacional 2_1 ao longo da direção [010], formando cadeias unidimensionais paralelas ao eixo b em que espécies catiônicas e aniônicas se alternam.

No cloridrato de zalcitabina, há também a ligação de hidrogênio $O5'\text{—H}\cdots O2^{gg}$ ($gg = -x; 0,5 + y; -z$) entre moléculas do fármaco equivalentes por simetria roto-translacional 2_1 e empacotadas ao longo da direção [010], as quais entrecruzam as cadeias $[(\text{zalcitabina})^{+}\text{Cl}^{-}]_n$ paralelamente à direção [10-1]. Interações $\pi\text{—}\pi$ são responsáveis pela sobreposição, a uma distância de 3,22(1) Å, das moléculas protonadas de zalcitabina ao longo da direção [100], com a formação de canais de ânions cloreto paralelamente ao eixo a . Ligações de hidrogênio não clássicas em que o grupo 3'-CH₂ participaria como doador de hidrogênio são ausentes no cloridrato de zalcitabina, assim como o átomo de enxofre na posição 3' equivalente de lamivudina não participa de interações intermoleculares na estrutura do cloridrato de lamivudina. A menor distância entre o átomo de carbono metilênico C3' e um átomo receptor de ligação de hidrogênio de uma molécula vizinha de zalcitabina é de 4,110(3) Å. Este átomo é o oxigênio hidroxílico de uma molécula sobreposta ao longo da direção [100] e a distância $C3'\cdots O5'^{ggg}$ ($ggg = -1 + x; y; z$) comprova a inexistência de ligações de hidrogênio entre estes átomos. A ausência de interações fortes envolvendo o grupo 3'-CH₂ corrobora a

independência de quais átomos estão presentes na posição 3' do anel de cinco membros para a estruturação do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina. O empacotamento cristalino do cloridrato de zalcitabina é exemplificado na Figura 69.

Figura 69 – Empacotamento cristalino do cloridrato de zalcitabina. (a) Cadeia unidimensional formada por unidades catiônicas e aniônicas alternantes é estruturada paralelamente à direção [010]. (b) Projeção paralela ao eixo *b* da cadeia exibida em (a). (c) Ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxílico e carbonílico (em destaque) conectam as cadeias unidimensionais ao longo da direção [10-1]. Nesta ilustração e em (d), átomos e ligações das cadeias unidimensionais conectadas por ligações de hidrogênio entre os grupos carbonílico e hidroxílico à cadeia central exibida em (a) e

continua

continuação

em (b) foram representadas com cores diferentes para facilitar suas identificações. (d) Projeção paralela ao eixo *b* das três cadeias exibidas em (c). (e) Sobreposição das moléculas de zalcitabina vista ao longo do eixo *a*. (f) Canais de ânions cloreto são formados paralelamente à direção [100]. Nesta ilustração, a distância de sobreposição entre os fragmentos citosínicos de zalcitabina é mostrada. Posições equivalentes: (g) = - 1 - *x*; 0,5 + *y*; 1 - *z*); (gg) = - *x*; 0,5 + *y*; - *z*.

Baseado na capacidade do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina cristalizarem em estruturas cujos arranjos intramoleculares e intermoleculares são similares, uma modificação cristalina em que ambos os fármacos pudessem cristalizar juntos nas suas formas protonadas foi preparada. A estrutura do cloridrato de zalcitabina e lamivudina foi formada pelos pares iônicos (zalcitabina)⁺Cl⁻ e (lamivudina)⁺Cl⁻. Assim como no cloridrato de zalcitabina e no cloridrato de lamivudina, as ligações de hidrogênio bifurcadas N3⁽⁺⁾—H•••Cl⁽⁻⁾ e N4—H4N_x•••Cl⁽⁻⁾ entre os fragmentos citosínicos de zalcitabina e lamivudina e ânions cloreto são responsáveis pela formação dos pares iônicos do cloridrato de zalcitabina e lamivudina (Figura 70). Os dois ânions cloreto cristalograficamente independentes são coplanares aos fragmentos citosínicos aos quais estão conectados por duas ligações de hidrogênio. O ânion cloreto Cl1⁽⁻⁾ recebe as duas ligações de hidrogênio N3L⁽⁺⁾—H•••Cl1⁽⁻⁾ e N4L—H4N_xL•••Cl1⁽⁻⁾ do fragmento citosínico de lamivudina, de onde está distanciado 0,059(3) Å (o desvio quadrático médio dos átomos citosínicos de lamivudina ajustados no plano mínimo quadrado é 0,0721 Å). Já o ânion cloreto Cl2⁽⁻⁾ recebe as duas ligações de hidrogênio N3Z⁽⁺⁾—H•••Cl1⁽⁻⁾ e N4Z—H4N_xZ•••Cl1⁽⁻⁾ do fragmento citosínico de zalcitabina, de onde está deslocado 0,144(2) Å (o desvio quadrático médio dos átomos citosínicos de zalcitabina ajustados no plano mínimo quadrado é 0,0720 Å).

A ligação de hidrogênio N4—H4N_y•••Cl⁽⁻⁾, existente em ambas as estruturas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato de zalcitabina, é conservada no híbrido cristalino, originando cadeias unidimensionais paralelas ao eixo *a* contendo exclusivamente zalcitabina ou lamivudina. Ao longo deste eixo, a ligação N4L—H4N_yL•••Cl1⁽⁻⁾_q (*q* = 1 + *x*; *y*; *z*) conecta os pares iônicos (lamivudina)⁺Cl⁻ relacionados por simetria translacional, enquanto que a ligação N4Z—H4N_yZ•••Cl2⁽⁻⁾_{ggg} liga os pares (zalcitabina)⁺Cl⁻ também relacionados por translação. Há coplanaridade entre os ânions cloreto e os fragmentos citosínicos conectados a eles por meio da ligação N4—H4N_y•••Cl⁽⁻⁾. Os deslocamentos de Cl1⁽⁻⁾_q e Cl2⁽⁻⁾_{ggg} em relação a estes fragmentos citosínicos de lamivudina e zalcitabina são 0,172(3) Å e 0,052(2) Å, respectivamente. Estes valores diferem dos respectivos deslocamentos relativos aos fragmentos citosínicos conectados aos ânions cloreto através das ligações de hidrogênio bifurcadas, sendo que o ânion cloreto conectado à molécula de zalcitabina através da ligação

$N4Z-H4NyZ\bullet\bullet\bullet Cl2^{(-)ggg}$ é mais coplanar em relação ao fragmento citosínico que o ânion cloreto conectado por meio das ligações $N3Z^{(+)}-H\bullet\bullet\bullet Cl1^{(-)}$ e $N4Z-H4NxZ\bullet\bullet\bullet Cl1^{(-)}$. Já o ânion cloreto envolvido nas ligações bifurcadas com a molécula de lamivudina exibe maior coplanaridade ao fragmento citosínico que o ânion cloreto recebendo a ligação de hidrogênio do grupo $N4L-H4NyL$, assim como nas estruturas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato de zalcitabina.

A estrutura bidimensional do cloridrato de zalcitabina e lamivudina é arquitetada ao longo da direção [010] através da sobreposição face a face das cadeias unidimensionais $[(zalcitabina)^+Cl^-]_n$ sobre as cadeias unidimensionais formadas pelos pares iônicos $(lamivudina)^+Cl^-$. Paralelamente ao eixo *b*, há alternância entre as cadeias unidimensionais $[(zalcitabina)^+Cl^-]_n$ e $[(lamivudina)^+Cl^-]_n$, com distâncias de sobreposição entre os fragmentos citosínicos de lamivudina e zalcitabina de 3,28(2) Å e 3,35(6) Å, conforme mostrado na Figura 70. A sobreposição face a face das moléculas dos fármacos através de interações $\pi-\pi$ resulta na orientação oposta da cadeia unidimensional $[(zalcitabina)^+Cl^-]_n$ em relação à disposição da cadeia $[(lamivudina)^+Cl^-]_n$ justaposta (Figura 70). Ainda paralelamente à direção [010], há ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxílico de um dos fármacos e o ânion cloreto ligado por meio das ligações de hidrogênio bifurcadas ao fragmento citosínico do outro fármaco sobreposto. A fração hidroxílica em sítios extras de ocupação 40% de lamivudina é doadora da ligação de hidrogênio $O5'L'-H\bullet\bullet\bullet Cl2^{(-)}$ para o ânion cloreto conectado por duas ligações de hidrogênio clássicas ao fragmento citosínico da molécula de zalcitabina sobreposta ao longo da direção [010]. Por sua vez, o grupo hidroxílico de zalcitabina doa a ligação de hidrogênio $O5'Z-H\bullet\bullet\bullet Cl1^{(-)}$ para o ânion cloreto envolvido nas ligações de hidrogênio bifurcadas com o fragmento citosínico da molécula de lamivudina justaposta paralelamente ao eixo *b*. O grupo hidroxílico de zalcitabina também é receptor da ligação de hidrogênio $O5'L-H\bullet\bullet\bullet O5'Z^{qg}$ ($qg = 1 + x; 1 + y; -1 + z$) doada pela fração hidroxílica de lamivudina em sítios principais de ocupação 60%. Esta é a única ligação de hidrogênio clássica entre as moléculas de lamivudina e zalcitabina, conectando-as ao longo da direção [11-1]. As geometrias das ligações de hidrogênio clássicas do cloridrato de zalcitabina e lamivudina são exibidas na Tabela 21. Ao longo desta direção, as moléculas de lamivudina e zalcitabina se alternam através das ligações de hidrogênio entre seus grupos hidroxílicos e por meio das interações $\pi-\pi$ entre seus fragmentos citosínicos. A arquitetura supramolecular do cloridrato de zalcitabina e lamivudina é ilustrada na Figura 70.

Figura 70 – Arquitetura supramolecular do cloridrato de zalcitabina e lamivudina. (a) Cadeias formadas ao longo da direção [100] exclusivamente por moléculas de zalcitabina ou por lamivudina são sobrepostas alternadamente ao longo da direção [010] e transladas paralelamente à direção [001]. (b) Sobreposição face a face das cadeias sobrepostas alternadamente ao longo da direção [010]. As distâncias de sobreposição entre os fragmentos citosínicos de zalcitabina e lamivudina são mostradas. (c) Projeções perpendiculares à direção [100] das duas cadeias centrais exibidas em (b). As orientações (fármaco)⁺→Cl⁻ das cadeias formadas ao longo da direção [100] são apresentadas. Nesta ilustração e em (a) e (b), a fração hidroxílica de lamivudina nos sítios de ocupação 60% foi omitida. (d) Alternância ao longo da direção [11-1] de moléculas de lamivudina e zalcitabina por meio de interações π - π e de ligações de hidrogênio envolvendo a fração hidroxílica de lamivudina nos sítios de ocupação 60% e o grupo hidroxílico de zalcitabina. Posições equivalentes: (q) = 1 + x; y; z; (ggg) = - 1 + x; y; z; (qg) = 1 + x; 1 + y; - 1 + z.

Tabela 21 - Geometria das ligações de hidrogênio clássicas presentes nas estruturas do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de zalcitabina e lamivudina.

D—H●●●R ^h	D—H (Å)	H●●●R (Å)	D●●●R (Å)	D—H●●●R (°)
Cloridrato de zalcitabina				
N ₃ ⁽⁺⁾ —H ₃ ●●●Cl ₁ ⁽⁻⁾	0,90(3)	2,19(3)	3,047(2)	159(3)
N ₄ —H _{4Nx} ●●●Cl ₁ ⁽⁻⁾	1,05(3)	2,38(3)	3,343(2)	152(3)
N ₄ —H _{4Ny} ●●●Cl ₁ ⁽⁻⁾ ^g	0,89(3)	2,44(3)	3,259(2)	152(3)
O ₅ —H _{5'O} ●●●O ₂ ^{gg}	0,82(3)	1,94(3)	2,734(3)	163(3)
Cloridrato de zalcitabina e lamivudina				
N _{3L} ⁽⁺⁾ —H _{3L} ●●●Cl ₁ ⁽⁻⁾	0,86	2,22	3,057(9)	164
N _{4L} —H _{4NL} ●●●Cl ₁ ⁽⁻⁾	0,86	2,63	3,379(9)	146
N _{4L} —H _{4NyL} ●●●Cl ₁ ⁽⁻⁾ ^q	0,86	2,58	3,385(9)	157
N _{3Z} ⁽⁺⁾ —H _{3Z} ●●●Cl ₂ ⁽⁻⁾	0,86	2,28	3,118(9)	164
N _{4Z} —H _{4NxZ} ●●●Cl ₂ ⁽⁻⁾	0,86	2,65	3,393(9)	146
N _{4Z} —H _{4NyZ} ●●●Cl ₂ ⁽⁻⁾ ^{ggg}	0,86	2,57	3,382(9)	159
O _{5'L} —H _{5'OL} ●●●O _{5'Z} ^{qg}	0,82	2,09	2,77(1)	140
O _{5'L} —H _{5'OL} ●●●Cl ₂ ⁽⁻⁾	0,82	2,34	3,11(1)	158
O _{5'Z} —H _{5'OZ} ●●●Cl ₁ ⁽⁻⁾	0,82	2,46	3,114(7)	134

^h Os termos D e R generalizam átomos doadores e receptores de ligações de hidrogênio. Posições equivalentes: ^g - 1 - x; 0,5 + y; 1 - z; ^{gg} - x; 0,5 + y; - z; ^{ggg} - 1 + x; y; z; ^q 1 + x; y; z; ^{qg} 1 + x; 1 + y; - 1 + z.

Apesar da conservação das ligações de hidrogênio entre os fragmentos citosínicos dos fármacos e os ânions cloreto, as isoestruturas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato de zalcitabina diferem da estrutura do cloridrato de zalcitabina e lamivudina principalmente em relação aos padrões de sobreposição e de ligações de hidrogênio envolvendo os grupos hidroxílicos dos fármacos. Graças às configurações absolutas invertidas dos átomos de carbono C1' e C4' de zalcitabina e lamivudina, no híbrido cristalino os fragmentos citosínicos dos fármacos podem ser sobrepostos face a face enquanto seus grupos hidroxílicos doam ligações de hidrogênio para ânions cloretos ligados às moléculas sobrepostas através de

interações π - π ou para o grupo hidroxílico de uma molécula vizinha, no caso da população majoritária de lamivudina ser doadora da ligação de hidrogênio para o grupo hidroxílico de zalcitabina. Ou seja, há a associação entre sobreposição face a face e ligações de hidrogênio $O5'—H\cdots C11$ e $O5'—H\cdots O5'$. Já nas estruturas do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina, ligações de hidrogênio em que os grupos hidroxílicos do fármaco interagissem com ânions cloreto ligados às moléculas sobrepostas obrigatoriamente requereriam sobreposição face a cauda. De fato, esta orientação de sobreposição ocorre nas estruturas do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina, embora não existam ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxílicos de zalcitabina ou de lamivudina e ânions cloreto.

No cloridrato de zalcitabina e lamivudina, os fragmentos de citosina de ambos os fármacos e os anéis 2',3'-didesoxirribose e oxatiolano de zalcitabina e lamivudina exibem conformações *anti* e C3'-*endo*, similarmente às moléculas dos fármacos no cloridrato de zalcitabina e no cloridrato de lamivudina (Tabela 20). Na estrutura do cloridrato de zalcitabina e lamivudina, os átomos de carbono C3' e enxofre S3' estão distanciados 0,596(9) Å e 0,878(2) Å dos planos mínimos quadrados calculados através dos átomos coplanares O1', C1', C2' e C4' dos anéis 2',3'-didesoxirribose (o desvio quadrático médio dos átomos ajustados é 0,0365 Å) e oxatiolano (o desvio quadrático médio dos átomos ajustados é 0,0366 Å), respectivamente. No cloridrato de zalcitabina e lamivudina, as conformações dos braços hidroximetilênicos dos fármacos diferem das conformações dos grupos 5'-CH₂OH observadas no cloridrato de zalcitabina e no cloridrato de lamivudina. O grupo 5'-CH₂OH de lamivudina assume duas conformações devido às duas ligações de hidrogênio em que o grupo hidroxílico terminal é doador de hidrogênio para moléculas de zalcitabina (população de 60%) ou para ânions cloreto (população de 40%). No cloridrato de zalcitabina e lamivudina, a fração 5'-CH₂OH em sítios principais de ocupação 60% engajada na ligação de hidrogênio $O5'L—H\cdots O5'Z^{qs}$ com zalcitabina é caracterizada pela fração do átomo de oxigênio hidroxílico estar na posição equatorial do átomo de carbono metilênico. Esta fração do oxigênio hidroxílico está *syn* orientada em relação ao átomo de enxofre S3'. A conformação desta fração hidroximetilênica de lamivudina remete àquela do cloridrato de lamivudina, apesar da orientação do átomo de hidrogênio hidroxílico diferenciar as conformações dos braços 5'-CH₂OH de lamivudina nestas duas modificações cristalinas. No cloridrato de zalcitabina e lamivudina, a fração principal do átomo de hidrogênio hidroxílico está *anti* posicionada em relação ao fragmento de citosina, enquanto que no cloridrato de lamivudina este hidrogênio é *syn* orientado em relação à base nitrogenada. O ângulo de torção C4'—C5'—O5'—H mede

116° e -90(1)° nos confôrmeros de lamivudina nos sítios principais de ocupação do cloridrato de zalcitabina e lamivudina e no cloridrato de lamivudina, respectivamente. Na Figura 71, a unidade assimétrica do cloridrato de zalcitabina e lamivudina e as conformações dos fármacos nesta modificação cristalina são apresentadas.

Figura 71 – Unidade assimétrica do cloridrato de zalcitabina e lamivudina e conformações adotadas pelos fármacos nesta modificação cristalina. Na unidade assimétrica, elipsóides térmicos a uma probabilidade de 50% e esferas de raio arbitrário ilustram os átomos não hidrogenóides e os átomos de hidrogênio, respectivamente.

Já a fração 5'-CH₂OH em sítios extras de ocupação 40%, a qual é doadora da ligação de hidrogênio O5'L'—H•••Cl2⁽⁻⁾qq para um ânion cloreto, tem a fração de seu átomo de oxigênio hidroxílico na posição equatorial *anti* orientada em relação ao átomo de enxofre do anel oxatiolano. Por sua vez, este grupo 5'-CH₂OH de zalcitabina adota uma conformação em que o átomo de oxigênio hidroxílico está em uma das posições equatoriais, aquela oposta ao grupo 3'-CH₂, diferentemente do cloridrato de zalcitabina onde este átomo de oxigênio ocupa a posição equatorial *syn* orientada em relação ao grupo 3'-metilênico.

6.3 Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman: Cloridrato de zalcitabina

Devido à similaridade entre as estruturas moleculares de zalcitabina e lamivudina e ao caráter isoestrutural dos seus cloridratos, os espectros de absorção na região do IV e de espalhamento Raman do cloridrato de zalcitabina foram similares aos espectros correspondentes do cloridrato de lamivudina (Figuras 72 e 73). Assim como observado no espectro de absorção na região do IV do cloridrato de lamivudina, bandas de absorção em 1667 cm^{-1} e 3390 cm^{-1} foram presentes no espectro de absorção do cloridrato de zalcitabina, as quais foram atribuídas aos modos vibracionais de estiramento $\nu_{\text{C=O}}$ e estiramento $\nu_{\text{N(+)—H}}$ do fragmento citosínico de zalcitabina, respectivamente. Como consequência da conservação do mesmo padrão de ligações de hidrogênio nas estruturas do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina, a banda de absorção referente ao modo vibracional $\nu_{\text{C=O}}$ é deslocada para uma frequência menor que a esperada (em torno de 1700 a 1730 cm^{-1}) nos espectros destas duas modificações cristalinas. Este fenômeno é resultado do envolvimento do grupo carbonílico na ligação de hidrogênio $\text{O5'—H}\cdots\text{O2}$ presente em ambas as estruturas. Apesar destas similaridades espectroscópicas vibracionais, uma banda de em 1475 cm^{-1} pode ser observada apenas no espectro na região do IV do cloridrato de zalcitabina, muito provavelmente relacionada à deformação angular δ_{CH_2} do grupo $3'\text{-CH}_2$ de zalcitabina.

Os espectros Raman destas duas modificações cristalinas também refletiram quais átomos estão presentes na posição $3'$ do anel de cinco membros de zalcitabina e lamivudina. No espectro Raman do cloridrato de lamivudina há uma banda de espalhamento em 666 cm^{-1} , a qual foi atribuída ao modo vibracional de estiramento $\nu_{\text{C—S}}$ de lamivudina. Esta banda de espalhamento não foi observada no espectro Raman do cloridrato de zalcitabina, uma vez que nesta modificação cristalina a estrutura molecular do fármaco é caracterizada pela presença de um grupo metilênico na posição $3'$ do anel $2',3'\text{-didesoxirribose}$ ao invés de um átomo de enxofre existente na mesma posição do anel oxatiolano de lamivudina. As regiões de altas frequências dos espectros Raman do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina também são diferentes devido à diferença entre as estruturas moleculares dos fármacos. Altas frequências de espalhamento compreendidas entre 2750 cm^{-1} a 3150 cm^{-1} estão relacionadas aos modos vibracionais de estiramento ν_{CH} . A elevada densidade eletrônica do átomo de enxofre na posição $3'$ do anel oxatiolano de lamivudina interfere nas constantes de força das

ligações C—H do anel ao qual pertence e do braço hidroximetilênico. Já estas ligações C—H de zalcitabina não são influenciadas por vizinhanças com elevada densidade eletrônica, uma vez que zalcitabina possui um grupo metilênico na posição 3' do anel de açúcar didesoxigenado. Em adição, zalcitabina possui este grupo metilênico a mais que lamivudina. Por estas razões, as bandas de espalhamento características dos estiramentos ν_{CH} observadas no espectro Raman do cloridrato de zalcitabina não foram concordantes com as frequências correspondentes presentes no espectro Raman do cloridrato de lamivudina.

Figura 72 - Espectro de absorção na região do IV do cloridrato de zalcitabina. (*) Bandas de absorção em 1475 cm^{-1} , 1667 cm^{-1} e 3390 cm^{-1} atribuídas aos modos vibracionais δ_{CH_2} , $\nu_{C=O}$ e $\nu_{N(+)-H}$ de zalcitabina.

Exceto por estas diferenças, os espectros Raman das duas modificações cristalinas isoestruturais foram semelhantes. A banda de espalhamento em 3058 cm^{-1} relacionada com a conformação do grupo 5'-CH₂OH de zalcitabina não foi observada no espectro Raman do cloridrato de zalcitabina. Esta banda de espalhamento também é ausente no espectro Raman do cloridrato de lamivudina, em concordância com a similaridade conformacional de zalcitabina e lamivudina nos seus respectivos cloridratos. Na posição equatorial de ligação ao átomo C5' *syn* orientada em relação posição 3' do anel de cinco membros há o átomo de oxigênio

hidrofílico no cloridrato de zalcitabina e no cloridrato de lamivudina. Consequentemente, não há interferência dos átomos presentes nas posições 3' de zalcitabina e lamivudina sobre os estiramentos ν_{CH} das ligações metilênicas, uma vez que no cloridrato de zalcitabina e no cloridrato de lamivudina os átomos de hidrogênio estão ligados ao átomo C5' na posição axial e na posição equatorial *anti* orientada em relação à posição 3'. Portanto, a banda de espalhamento em 3058 cm^{-1} não é observada nos espectros Raman destas modificações cristalinas. A ausência desta banda nos espectros Raman do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina corrobora a sua atribuição ao modo vibracional ν_{CH} relacionado à posição equatorial, aquela *syn* orientada em relação ao enxofre, de um dos átomos de hidrogênio metilênico ligados ao carbono C5', conforme observado no cloridrato monoidratado de lamivudina (seção 3.4), no maleato de lamivudina (seção 4.4) e na dupla hélice de lamivudina (seção 5.6).

Figura 73 - Espectro Raman do cloridrato de zalcitabina (linha vermelha). Em destaque, regiões do espectro Raman do cloridrato de lamivudina (linha preta) mostrado na Figura 16 são exibidos para comparação com as faixas correspondentes do espectro Raman do cloridrato de zalcitabina. (i) Banda de espalhamento em 666 cm^{-1} referente ao modo vibracional ν_{C-S} .

7 PREPARAÇÃO SOLVOTÉRMICA DE CRISTAIS DE FÁRMACOS: HIDRATO DE DIDANOSINA

Apesar de didanosina ser empregada terapeuticamente como parte de coquetéis anti-SIDA desde o ano de 1991, nenhuma estrutura cristalina deste fármaco foi reportada até o presente momento. A limitação para se determinar a estrutura cristalina da forma sólida conhecida do fármaco se deve ao fato dos espécimes cristalinos não possuírem dimensões adequadas para o experimento de DRXM (83).

Técnicas solvotérmicas são muito utilizadas para a síntese de materiais inorgânicos e compostos organometálicos (188-191), para produção de nanopartículas e óxidos metálicos lamelares desenvolvidos para liberação controlada de fármacos (192), e para extração de metabólitos de materiais vegetais (193). Basicamente, técnicas solvotérmicas consistem no aquecimento, geralmente por um período longo, de misturas de materiais pouco solúveis em solventes orgânicos dentro de sistemas fechados, resultando em pressões elevadas que favorecem o processo de solubilização e as reações químicas. Entretanto, procedimentos solvotérmicos não foram empregados até o momento em estudos relacionados ao polimorfismo de sólidos farmacêuticos.

Neste estudo, cristais com dimensões adequadas para a determinação estrutural à baixa temperatura de uma fase sólida de didanosina por DRXM foram preparados através da solubilização da forma sólida comercial do fármaco em isopropanol seguida por aquecimento durante doze horas sob condições solvotérmicas. Esta fase sólida, cuja estrutura foi determinada, revelou ser um hidrato não estequiométrico isoestrutural à forma cristalina incorporada em formulações farmacêuticas e usada para o seu preparo. As constantes de cela dos cristais preparados também foram determinadas à temperatura ambiente, agregando a informação sobre a inexistência de transições de fase cristalina entre as temperaturas de 100 K e 298 K (Tabela 22).

7.1 Caracterização morfológica por MEV

Cristais com formato de placas extremamente delgadas foram preparados sob condições solvotérmicas e isolados após evaporação do solvente. O aspecto do material policristalino do fármaco usado para o preparo dos cristais do hidrato de didanosina e a morfologia destes cristais é mostrada na Figura 74.

Figura 74 – (a) Forma sólida comercial de didanosina como um material policristalino. (b) Micrografia eletrônica de varredura de cristais do hidrato de didanosina. Barras: 1 mm (a); 25 μm (b).

7.2 Determinação estrutural por DRXM

Um espécime cristalino do hidrato de didanosina preparado sob condições solvotérmicas foi selecionado para o experimento de DRXM. A estrutura do hidrato de didanosina foi resolvida no grupo espacial monoclinico $P2_1$, com quatro moléculas do fármaco e metade de uma molécula de água por cela unitária cristalográfica. Dois confôrmers de didanosina compuseram a unidade assimétrica desta fase sólida, em concordância com a atribuição espectroscópica por RMN que anteriormente sugerira a existência de dois confôrmers na forma sólida comercial (83) (Figura 75). A Tabela 22 apresenta os parâmetros relativos à determinação da estrutura do hidrato de didanosina à temperatura de 100 K junto com as suas constantes de cela unitária à temperatura ambiente, as quais puderam ser determinadas apesar da baixa qualidade do cristal.

Tabela 22 - Constantes de cela às temperaturas baixa e ambiente e determinação estrutural à baixa temperatura do hidrato de didanosina.

Hidrato de didanosina	
Fórmula mínima	(C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃)(H ₂ O) _{0,125}
Massa da fórmula mínima (g/mol)	238,24
Dimensões do cristal (mm ³)	0,15 x 0,10 x 0,02
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
Z / Z'	4 / 2
Temperatura (K)	298(2) 100(2)
Dimensões da cela unitária	<i>a</i> (Å) 7,39(3) 7,277(1)
	<i>b</i> (Å) 10,28(4) 10,052(2)
	<i>c</i> (Å) 14,40(4) 14,476(3)
	β (°) 94,0(2) 93,71(1)
Volume da cela unitária (Å ³)	1091(7) 1056,7(3)
Densidade calculada (g/cm ³)	1,450 1,497
<i>Coleta dos dados completos e determinação estrutural</i>	
Coefficiente de absorção μ (mm ⁻¹)	0,114
Intervalo em θ (°)	3,06-25,62
Intervalo dos índices	<i>h</i> -8 a 8
	<i>k</i> -12 a 12
	<i>l</i> -17 a 17
Reflexões coletadas	3915
Reflexões independentes	2090
Índice de simetria (<i>R</i> _{int})	0,0541
Completeza para $\theta_{\text{máx}}$ (%)	99,0
<i>F</i> ₀₀₀	500
Parâmetros refinados	328
Qualidade do ajuste sobre <i>F</i> ²	1,040
Índices residuais para <i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)	<i>R</i> ₁ = 0,0583
	<i>wR</i> ₂ = 0,1269
	<i>R</i> 1 = 0,0945
Índices residuais para todos os dados	<i>wR</i> 2 = 0,1456
	0,165/-0,236
$\Delta\rho_{\text{máx}} / \Delta\rho_{\text{mín}}$ (e/Å ³)	0,165/-0,236
Nº de depósito no CCDC	758495

As duas moléculas cristalograficamente independentes de didanosina rotuladas como confômeros A e B foram similares. Em ambos os confômeros de didanosina, a orientação oposta do fragmento de hipoxantina em relação ao anel 2',3'-didesoxirribose configura uma conformação *anti* da base nitrogenada, embora uma discreta rotação sobre o eixo da ligação β -N₉-glicosídica resulte em diferenças entre os valores de ângulos de torção sobre a ligação N₉—C1' dos confômeros A e B (Tabela 23). Por sua vez, o açúcar didesoxigenado dos dois confômeros adota conformações C3'-*endo*, com distâncias de 0,405(8) Å e 0,525(9) Å entre os átomos de carbono C3' dos confômeros A e B e os respectivos planos mínimos quadrados ajustados através dos átomos C2', C1', O1' e C4' (os desvios quadráticos médios dos átomos ajustados nos planos são 0,0546 Å e 0,0692 Å nos confômeros A e B, respectivamente). A

conformação do grupo 5'-CH₂OH de ambos os confôrmeros é caracterizada pela posição axial *syn* orientada em relação ao fragmento hipoxantínico do átomo de oxigênio hidroxílico. O átomo de hidrogênio hidroxílico dos dois confôrmeros ocupa uma posição oposta ao átomo de carbono C3', com ângulos de torção C4'—C5'—O5'—H assumindo valores similares de 91(5)° e 94(5)° nos confôrmeros A e B, respectivamente.

Figura 75 - (a) Unidade assimétrica cristalográfica do hidrato de didanosina representada por elipsóides térmicos a uma probabilidade de 50%, exceto os átomos de hidrogênio, os quais são mostrados como esferas de raio arbitrário. (b) Sobreposição dos confôrmeros de didanosina presentes na estrutura cristalina determinada.

Tabela 23 - Ângulos de torção selecionados dos confôrmeros do fármaco presentes na estrutura do hidrato de didanosina determinada à temperatura de 100 K.

Parte da estrutura	Torção	Confôrmero A	Confôrmero B
Ligação β- <i>N</i> ₉ -glicosídica	C4—N9—C1'—O1'	-67,7(9)°	-91,9(8)°
	C4—N9—C1'—C2'	174,3(7)°	149,5(7)°
	C4—N9—C1'—O1'	111,2(8)°	79,2(9)°
	C4—N9—C1'—C2'	-7(1)°	-40(1)°
2',3'-didesoxirribose	O1'—C1'—C2'—C3'	-32,6(7)°	-25,6(8)°
	C1'—C2'—C3'—C4'	36,6(7)°	28,5(8)°
	C2'—C3'—C4'—O1'	-28,0(7)°	-21,9(8)°
	C3'—C4'—O1'—C1'	8,3(7)°	6,0(8)°
	C4'—O1'—C1'—C2'	15,5(7)°	12,4(8)°
Braço 5'-CH ₂ OH	O1'—C4'—C5'—O5'	-63,8(8)°	-64,1(9)°
	C3'—C4'—C5'—O5'	53,0(9)°	55(1)°

Ambos os confôrmeros do fármaco presentes na estrutura do hidrato de didanosina recebem contribuições majoritárias dos tautômeros ceto-amínicos. Três características estruturais demonstram que no equilíbrio tautomérico de didanosina há predominância das

formas ceto-amínicas dos fragmentos hipoxantínicos dos confômeros do fármaco sobre os tautômeros enol-imínicos, contrariando a evidência baseada em dados de RMN que sugerira a predominância de formas enol-imínicas na forma sólida comercial de didanosina (83) (Figura 76). Primeiramente, as ligações $C6=O6$ e $N1-C6$ medem $1,24(1) \text{ \AA}$ e $1,42(1) \text{ \AA}$ no confômero A e $1,23(1) \text{ \AA}$ e $1,40(1) \text{ \AA}$ no confômero B, respectivamente. Estes parâmetros geométricos refletem o caráter de ligação dupla do grupo carbonílico e de ligação simples do grupo amínico. Em segundo, os átomos de hidrogênio ligados covalentemente aos nitrogênios N1 tiveram suas posições precisamente localizadas nos mapas de Fourier por diferença, as quais foram refinadas livremente. Portanto, a possibilidade acerca da existência de ligações covalentes $O-H$ no fragmento hipoxantínico é remota. Por fim, os oxigênios carbonílicos de ambos os confômeros são receptores de ligações de hidrogênio não clássicas em que grupos $C-H$ do fragmento hipoxantínico e do açúcar didesoxigenado são doadores, descartando a possibilidade de transferência de prótons para o grupo carbonílico (Figura 77). Confômeros B relacionados por simetria roto-translacional de segunda ordem ao longo da direção $[010]$ são conectados através do contato $C2b-H^t \cdots O6b$ ($t = 1 - x; 0,5 + y; -z$) entre fragmentos hipoxantínicos, enquanto que o mesmo átomo de oxigênio carbonílico $O6b$ recebe outra ligação de hidrogênio não clássica do grupo metínico $C1'a-H^{tt}$ ($tt = 1 - x; -0,5 + y; -z$) de um confômero A sobreposto ao longo da direção $[100]$. Neste caso, não há interações $\pi-\pi$ entre os confômeros A e B conectados através do contato $C1'a-H^{tt} \cdots O6b$. Ao longo do eixo b , o grupo carbonílico do confômero A recebe dos mesmos confômeros vizinhos relacionados por simetria roto-translacional 2_1 e por simetria translacional as ligações de hidrogênio não clássicas $C2a-H^{tt} \cdots O6a$ e $C4'a-H^r \cdots O6a$ ($r = x; -1 + y; z$), respectivamente. As geometrias das ligações de hidrogênio clássicas e não clássicas responsáveis pela estruturação do hidrato de didanosina são apresentadas na Tabela 24.

Figura 76 – Tautômeros de didanosina inferidos com base na determinação estrutural por DRXM e em atribuições espectroscópicas por RMN (83). À direita, os comprimentos das ligações carbonílica C6=O6 e amínica N1—C6 dos dois confôrmeros de didanosina são mostrados. As coordenadas dos átomos de hidrogênio amínico foram identificadas no mapa de Fourier por diferença e foram refinadas livremente.

Figura 77 – Ligações de hidrogênio não clássicas entre moléculas de didanosina em que os grupos (a) carbonílicos e (b) hidroxílicos são receptores de ligações de hidrogênio de grupos C—H. Posições equivalentes: (t) 1 - x; 0,5 + y; - z; (tt) 1 - x; -0,5 + y; - z; (r) x; -1 + y; z; (rrr) 2 - x; 0,5 + y; 1 - z.

Ainda paralelamente à direção [010], moléculas do fármaco relacionadas por simetria roto-translacional de segunda ordem interagem através de ligações de hidrogênio $N-H\cdots N$ em que seus fragmentos hipoxantínicos são doadores e receptores de hidrogênio dentro de cadeias unidimensionais formadas exclusivamente por confômeros A ou por confômeros B. Cadeias de confômeros A são estruturadas através da ligação de hidrogênio $N1a-H\cdots N3a^{ttt}$ ($ttt = -x; -0,5 + y; -z$) em que os nitrogênios $N1a$ e $N3a$ do grupo 6-oxopirimidínico do fragmento hipoxantínico são doadores e receptores de hidrogênio, respectivamente (Figura 78). Há um ângulo de $20,8(1)^\circ$ entre os planos mínimos quadrados dos fragmentos hipoxantínicos dos confômeros A conectados através desta ligação de hidrogênio, enquanto que os planos das bases nitrogenadas dos confômeros B interagindo ao longo do eixo b através da ligação de hidrogênio $N1b-H\cdots N7b^t$ são inclinados $26,7(1)^\circ$ (Figura 78). O maior alinhamento entre os fragmentos hipoxantínicos dos confômeros A está relacionado com a formação da ligação de hidrogênio $N1a-H\cdots O1'a^{ttt}$. Entre confômeros A relacionados por simetria roto-translacional, o grupo amínico $N1a-H$ doa esta ligação de hidrogênio para o átomo de oxigênio intracíclico do açúcar didesoxigenado de uma mesma molécula do confômero A que também recebe a ligação de hidrogênio $N1a-H\cdots N3a^{ttt}$. Entre confômeros B, as únicas ligações de hidrogênio clássicas existentes ocorrem através dos átomos hipoxantínicos $N1b-H\cdots N7b^t$, onde o átomo de nitrogênio imínico $N7b$ do grupo imidazol é o receptor desta ligação de hidrogênio ao invés do nitrogênio $N3a$ do grupo 6-oxopirimidínico envolvido nas ligações $N-H\cdots N$ entre confômeros A. Para que ocorra formação das ligações bifurcadas $N1a-H\cdots O1'a^{ttt}$ e $N1a-H\cdots N3a^{ttt}$ entre confômeros A, há uma discreta rotação sobre o eixo da ligação β - N_9 -glicosídica que resulta no maior alinhamento entre os planos hipoxantínicos dos confômeros A em relação aos confômeros B e nas diferenças entre os valores de ângulos de torção sobre a ligação $N9-C1'$ destes confômeros.

Ao longo do eixo b , os confômeros A e B de didanosina são arrançados com orientações opostas em suas respectivas cadeias unidimensionais (Figura 78). Cadeias formadas por confômeros A são sobrepostas face a cauda ao longo da direção [100] sobre cadeias estruturadas com confômeros B, a uma distância de $3,3(1) \text{ \AA}$, sendo que há ângulos de $3,0(1)^\circ$ entre os planos mínimos quadrados calculados através dos fragmentos hipoxantínicos dos confômeros sobrepostos ao longo desta direção. Com distâncias e ângulos de sobreposição iguais, cadeias formadas pelos confômeros B são justapostas sobre as cadeias arquitetadas pelos confômeros A. Além das interações π - π entre os fragmentos

hipoxantínicos dos confômeros A e B responsáveis pela sobreposição paralelamente ao eixo *a*, ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxílicos e os fragmentos hipoxantínicos dos confômeros A e B contribuem para o empacotamento cristalino ao longo da direção [100] (Figura 78). As ligações de hidrogênio O5'a—H•••N3b^{rr} (*rr* = 1 + *x*; *y*; *z*) e O5'b—H•••N7a também conectam os confômeros A e B ao longo do eixo *a*. Nestes contatos, o grupo hidroxílico de um confômero é doador de hidrogênio para um dos átomos de nitrogênio hipoxantínico de outro confômero sobreposto ao longo da direção [100] através da interação π – π entre as bases nitrogenadas. Estes átomos de nitrogênio hipoxantínico não estão envolvidos nas ligações de hidrogênio N—H•••N entre unidades de um mesmo confômero. Ou seja, o átomo de nitrogênio N3b^{rr} do grupo 6-oxopirimidínico do fragmento hipoxantínico de um confômero B recebe a ligação de hidrogênio O5'a—H•••N3b^{rr} do grupo hidroxílico do confômero A sobreposto, enquanto que o nitrogênio imidazólico N7a do fragmento hipoxantínico de um confômero A é receptor da ligação de hidrogênio O5'b—H•••N7a proveniente do grupo 5'-OH do confômero B justaposto.

Tabela 24 - Geometria das ligações de hidrogênio clássicas e não clássicas presentes na estrutura do hidrato de didanosina.

D—H•••R ^h	D—H (Å)	H•••R (Å)	D•••R (Å)	D—H•••R (°)
N _{1a} —H _{1a} •••N _{3a} ^{ttt}	1,0(1)	2,2(1)	3,09(1)	148(8)
N _{1a} —H _{1a} •••O _{1'a} ^{ttt}	1,0(1)	2,6(1)	3,243(9)	128(7)
N _{1b} —H _{1b} •••N _{7b} ^t	1,01(9)	1,83(9)	2,83(1)	169(7)
O _{5'b} —H _{5'Ob} •••N _{7a}	1,1(1)	1,7(1)	2,80(1)	160(8)
O _{5'a} —H _{5'Oa} •••N _{3b} ^{rr}	1,04(9)	1,7(1)	2,802(9)	167(8)
C _{1'a} —H _{1'a} ^{tt} •••O _{6b}	0,98	2,43	3,250(9)	141
C _{2b} —H _{2b} ^t •••O _{6b}	0,93	2,34	3,04(1)	132
C _{2a} —H _{2a} ^{tt} •••O _{6a}	0,93	2,42	3,14(1)	135
C _{4'a} —H _{4'a} ^r •••O _{6a}	0,98	2,42	3,315(9)	151
C _{5'b} —H _{5'xb} ^{rrr} •••O _{5'a}	0,97	2,53	3,15(1)	122

^h Os termos D e R generalizam átomos doadores e receptores de ligações de hidrogênio. Posições equivalentes: ^t 1 - *x*; 0,5 + *y*; - *z*; ^{tt} 1 - *x*; -0,5 + *y*; - *z*; ^{ttt} - *x*; -0,5 + *y*; - *z*; ^r *x*; -1 + *y*; *z*; ^{rr} 1 + *x*; *y*; *z*; ^{rrr} 2 - *x*; 0,5 + *y*; 1 - *z*.

Figura 78 – (a) Ligações de hidrogênio clássicas N—H...N e O5'—H...N responsáveis pela ligação entre moléculas de didanosina ao longo dos eixos *a* e *b*. As orientações das cadeias didanosina→didanosina formadas ao longo da direção [010] e da sobreposição molecular paralelamente à direção [100] são apresentadas. Os planos médios através dos fragmentos hipoxantínicos e os ângulos entre estes planos (θ) são mostrados. Uma discreta rotação sobre o eixo da ligação N9—C1' (seta circular) está relacionada com o maior alinhamento entre os fragmentos hipoxantínicos dos confôrmeros A. (b) Sobreposição das moléculas de didanosina através de interações π – π paralelamente à direção [100].

Enquanto há ligações de hidrogênio clássicas fortes e interações π - π ao longo dos eixos a e b , somente ligações de hidrogênio não clássicas fracas entre os grupos hidroximetilênicos dos confômeros A e B são responsáveis pela estruturação tridimensional do hidrato de didanosina ao longo da direção [001]. Nestas interações, o grupo 5'-CH₂ de um confômero B é doador da ligação de hidrogênio C5'b—H5'xb^{irr}•••O5'a (rrr = 2 - x; 0,5 + y; 1 - z) para o grupo hidroxílico de uma unidade do confômero A disposta ao longo do eixo c (Figura 77). O empacotamento paralelo à direção [001] das cadeias bidimensionais estruturadas através das ligações de hidrogênio N—H•••N ao longo da direção [010] e por meio das interações π - π e das ligações de hidrogênio O5'—H•••N paralelamente à direção [100] origina canais hidrofóbicos revestidos por grupos metínicos e metilênicos dos açúcares didesoxigenados (Figura 79). Estes canais se propagam paralelamente ao eixo b e apresentam um diâmetro de aproximadamente 4,5 Å, onde as frações das moléculas de água estão alojadas. Vale ressaltar que um fator de ocupação de 25% foi refinado para o sítio atômico do oxigênio da molécula de água, embora, após a determinação deste valor, a ocupação deste sítio tenha sido fixada visando à sua correlação com os parâmetros térmicos anisotrópicos da fração atômica correspondente. A entrada desta fração de água nestes canais hidrofóbicos sob condições solvotérmicas pode estar relacionada com a cristalização de espécimes de didanosina maiores que os cristalitos da forma comercial do fármaco, a qual possui uma fração menor de água que o hidrato de didanosina preparado solvotermicamente, conforme descrito nas seções 7.4 e 7.5. Uma vez que não foi possível determinar com precisão as posições das frações dos átomos de hidrogênio da molécula de água devido às suas densidades eletrônicas residuais, qual o envolvimento da fração de água nas ligações de hidrogênio existentes dentro do canal hidrofóbico não pode ser interpretado. Todavia, o ambiente químico dos canais prediz a provável existência de ligações de hidrogênio não clássicas fracas em que a fração da molécula de água é receptora de hidrogênio de grupos C—H. Portanto, quando 0,125 moles de água por cada mol de didanosina são acomodados nos canais estruturais, cristais com hábito de placas delgadas crescem até extensões que permitiram a coleta de intensidades de DRXM suficientes para a determinação de sua estrutura cristalina. Esta proporção entre solvente e fármaco foi estimada com base no fator de ocupação de 25% do sítio atômico do oxigênio da água presente na unidade assimétrica juntamente com duas moléculas de didanosina.

Figura 79 – (a) Canal hidrofóbico formado na estrutura do hidrato de didanosina como consequência do empacotamento, ao longo do eixo *c*, das cadeias bidimensionais de didanosina propagadas paralelamente às direções [100] e [010], conforme mostrado na Figura 78. (b) Frações de água estão arranjadas ao longo do canal hidrofóbico. Nesta ilustração, esferas de raio arbitrário representam as frações dos átomos de oxigênio das moléculas de água em sítios de ocupação 25%. Em ambos os diagramas, as cadeias bidimensionais são contornadas pelas suas superfícies visando destacar o canal hidrofóbico no centro das ilustrações. Projeções normais ao plano *ac* são mostradas em ambas as ilustrações (os eixos *a* e *c* estão paralelos às direções vertical e horizontal, respectivamente).

7.3 Caracterização cristalográfica por DRXP

Os difratogramas de raios X experimentais de uma amostra comercial de didanosina, pertencente ao mesmo lote da amostra precursora do hidrato de didanosina, e do hidrato de didanosina preparado sob condições solvotérmicas foram coincidentes com o padrão teórico de DRX calculado usando a estrutura cristalina determinada (Figura 80). Houve concordância entre as posições das reflexões de Bragg observadas nos difratogramas experimentais de ambas as amostras e as posições simuladas a partir da estrutura cristalina do hidrato de didanosina. As intensidades difratadas experimentalmente também foram similares às intensidades calculadas, embora a orientação preferencial das reflexões de Bragg (0 1 0) (em 9,2° em 2 θ) e (0 0 2) (em 12,6° em 2 θ) tenha sido responsável pela diferença entre suas intensidades teóricas e observadas no difratograma da amostra preparada sob condições solvotérmicas. Estas duas reflexões, exatamente nestas posições angulares em 2 θ , foram previstas com base na estrutura cristalina do hidrato de didanosina, mas com intensidades inferiores àquelas observadas no difratograma experimental da amostra preparada solvotermicamente.

Uma vez que houve concordância entre os difratogramas experimentais das amostras de didanosina e o padrão simulado de DRXP, a estrutura cristalina determinada foi atribuída àquela da forma sólida do fármaco incorporada em formulações farmacêuticas, embora a

composição do material preparado sob condições solvotérmicas difira daquela da forma comercial. Caracterizações espectroscópicas vibracionais e análises térmicas suportaram qualitativamente a existência de diferentes frações de água alojadas nos canais hidrofóbicos da amostra comercial de didanosina e do hidrato de didanosina preparado neste estudo. De fato, a concordância entre seus difratogramas experimentais de raios X por pó permite concluir que estas fases sólidas são isoestruturais, enquanto que as caracterizações apresentadas na sequência demonstram que a forma comercial e a fase cristalina preparada solvotermicamente são hidratos não estequiométricos.

Figura 80 - Comparação entre os difratogramas de raios X experimentais de (a) uma amostra comercial de didanosina e do (b) hidrato de didanosina preparado sob condições solvotérmicas e o padrão de DRXP simulado a partir da estrutura cristalina determinada (linhas verticais).

7.4 Caracterização espectroscópica vibracional no IV e Raman

As análises espectroscópicas vibracionais das amostras de didanosina corroboraram as inferências estruturais baseadas nos dados de DRXM. Uma banda de absorção em 3400 cm^{-1} foi observada no espectro na região do IV do hidrato de didanosina, a qual foi atribuída ao estiramento ν_{OH} da molécula de água (Figura 81). Esta banda é muito discreta no espectro correspondente da amostra da forma sólida comercial do fármaco, o que evidencia

qualitativamente que a fração de água da forma sólida incorporada em formulações farmacêuticas é menor que fração de água do material preparado sob condições solvotérmicas. Exceto por esta banda relacionada ao conteúdo de água das amostras de didanosina, os espectros de absorção na região do IV do hidrato de didanosina e da forma sólida comercial do fármaco foram similares, em concordância com o caráter isoestrutural destas fases cristalinas. Nos espectros na região do IV de ambas as amostras, uma banda de absorção em 1705 cm^{-1} foi atribuída ao modo vibracional de estiramento $\nu_{\text{C=O}}$. Bandas de espalhamento referentes a este modo vibracional foram observadas em 1690 cm^{-1} e 1705 cm^{-1} nos espectros Raman do hidrato de didanosina e da forma sólida comercial do fármaco (Figura 82). Estes assinalamentos espectroscópicos estão de acordo com a predominância de tautômeros cetônicos nas estruturas do hidrato de didanosina e da forma sólida comercial ao invés do prevalecimento das formas enólicas de didanosina, conforme discutido na seção 7.2.

Nos espectros Raman de ambas as amostras, uma das duas bandas de espalhamento referentes ao estiramento $\nu_{\text{C=O}}$, aquela em 1690 cm^{-1} , é significativamente deslocada para uma frequência menor que a esperada (em torno de 1700 a 1730 cm^{-1}) devido ao fato do grupo carbonílico participar de ligações de hidrogênio. A direcionalidade das duas ligações de hidrogênio em que o grupo carbonílico C6a=O6a do confômero A está envolvido é maior que a direcionalidade das duas ligações de hidrogênio doadas para o grupo carbonílico C6b=O6b do confômero B. Os ângulos das ligações $\text{C2a—H}^{\text{tt}}\cdots\text{O6a}$ e $\text{C4'a—H}^{\text{f}}\cdots\text{O6a}$ são 135° e 151° , enquanto os parâmetros geométricos correspondentes das ligações $\text{C2b—H}^{\text{f}}\cdots\text{O6b}$ e $\text{C1'a—H}^{\text{tt}}\cdots\text{O6b}$ assumem valores de 132° e 141° (Tabela 24). As melhores orientações geométricas das ligações de hidrogênio doadas para o grupo carbonílico do confômero A de didanosina sugerem que estes contatos intermoleculares são mais fortes que as ligações de hidrogênio das quais participa o grupo carbonílico do confômero B. Portanto, a banda de espalhamento em 1690 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento $\nu_{\text{C=O}}$ dos confômeros A, enquanto que a banda em 1705 cm^{-1} pode ser assinalada ao estiramento $\nu_{\text{C=O}}$ dos confômeros B. O envolvimento do grupo carbonílico dos confômeros A em ligações de hidrogênio mais fortes que aquelas das quais o grupo carbonílico dos confômero B participa é refletido no deslocamento da banda de espalhamento referente ao modo vibracional $\nu_{\text{C=O}}$ dos confômeros A para uma frequência inferior a 1700 cm^{-1} .

Figura 81 - Espectros de absorção na região do IV do hidrato de didanosina preparado sob condições solvotérmicas e da forma sólida comercial do fármaco. (*) Bandas de absorção em 1705 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} atribuídas aos modos vibracionais $\nu_{\text{C=O}}$ de didanosina e $\nu_{\text{O-H}}$ da água.

Em adição, os espectros Raman de ambas as amostras foram praticamente idênticos, exceto por uma banda fraca de espalhamento em 1676 cm^{-1} observada apenas no espectro Raman do material preparado sob condições solvotérmicas, em concordância com o caráter isoestrutural do hidrato de didanosina e da forma sólida comercial. A similaridade entre estes espectros está de acordo com as conformações moleculares e arquiteturas supramoleculares equivalentes destas fases sólidas de didanosina, conforme demonstrado por meio da concordância entre seus difratogramas de raios X por pó. A banda fraca de espalhamento em 1676 cm^{-1} foi atribuída ao modo vibracional de deformação angular δ_{OH} da molécula de água. Em concordância com os padrões de hidratação das amostras analisadas, esta banda não foi observada no espectro Raman da fase cristalina comercial, muito provavelmente devido à sua menor fração de água em relação ao conteúdo de água do hidrato de didanosina. No hidrato de didanosina, a fração de água alojada nos canais hidrofóbicos da estrutura foi suficiente para que o modo vibracional de deformação angular δ_{OH} fosse detectado em 1676 cm^{-1} como uma banda fraca de espalhamento Raman.

Figura 82 - Espectros Raman do hidrato de didanosina preparado sob condições solvotérmicas e da forma sólida comercial do fármaco. (*) Bandas de espalhamento em 1690 cm⁻¹ e 1705 cm⁻¹ atribuídas ao modo vibracional $\nu_{C=O}$ dos conformeros A e B de didanosina, respectivamente. (i) Banda de espalhamento em 1676 cm⁻¹ atribuída ao modo vibracional δ_{OH} da água.

7.5 Caracterização térmica por CED e TG

Os termogramas de CED das amostras do hidrato de didanosina e da forma sólida comercial do fármaco foram correlacionados com as caracterizações cristalográficas e espectroscópicas vibracionais. Um evento endotérmico iniciado em 98 °C foi observado nos termogramas de CED de ambas as amostras. Este evento foi atribuído à eliminação das frações de água das estruturas. Devido às baixas entalpias associadas a este evento endotérmico, a eliminação das frações de água é provavelmente sucedida por transformações para dessolvatos isomórficos (Figura 83). Entretanto, as frações de água são eliminadas lentamente ao ponto que a perda de massa relacionada a este evento não pôde ser distinguido do ruído da curva termogravimétrica (Figura 84). Portanto, os termogramas de TG de ambas as amostras de didanosina não permitiram estimar a fração de água eliminada durante o aquecimento. Vale ainda ressaltar que a entalpia do evento endotérmico em 98°C é maior no

termograma de CED do hidrato de didanosina ($\Delta H = 0,39 \text{ J/g}$) que na curva correspondente da forma sólida incorporada em formulações farmacêuticas ($\Delta H < 0,1 \text{ J/g}$), em concordância com as caracterizações espectroscópicas vibracionais acerca dos padrões de hidratação destes hidratos isoestruturais. Portanto, o evento térmico em 98°C observado nos termogramas de CED qualitativamente sugerem a presença de água em ambas as amostras, mas em uma menor fração na amostra da forma sólida comercial de didanosina devido à menor entalpia associada.

Figura 83 – Termograma de CED do hidrato de didanosina preparado sob condições solvotérmicas e da forma sólida comercial do fármaco. O evento endotérmico iniciando em 98°C é circundado no termograma da forma sólida comercial de didanosina.

Ainda, há um evento endotérmico muito entálpico iniciado em $166,6^\circ\text{C}$ no termograma de CED do hidrato de didanosina e em $160,3^\circ\text{C}$ no termograma correspondente da forma sólida comercial do fármaco. Este evento foi atribuído à fusão das amostras. As prováveis temperaturas de fusão destes hidratos não estequiométricos de didanosina foram similares, em concordância com suas energias de rede cristalina equiparáveis. Uma vez que o hidrato de didanosina e a forma sólida comercial do fármaco são isoestruturais, suas energias de rede cristalina são similares, o que pôde ser demonstrado experimentalmente considerando que as amostras fundem a temperaturas próximas.

Figura 84 – Curvas te TG do hidrato de didanosina preparado sob condições solvotérmicas e da forma sólida comercial do fármaco.

As demais anomalias presentes nos termogramas de CED das amostras de didanosina ocorrem a temperaturas coincidentes e com entalpias aproximadas, em concordância com a similaridade entre suas energias de rede. As curvas de TG das amostras também corroboram a similaridade estrutural entre o hidrato de didanosina e a forma sólida comercial, uma vez que as frações de massa eliminadas foram similares e ocorreram a temperaturas aproximadas. Nos termogramas de CED do hidrato de didanosina e da forma sólida comercial do fármaco, os eventos endotérmicos associados à fusão das amostras são sucedidos por eventos exotérmicos. Estes eventos podem estar relacionados com o início da decomposição de ambas as amostras, desde que nas suas curvas de TG as perdas de massa do hidrato de didanosina e da forma sólida comercial começam em 169,7 °C e em 167,5 °C, respectivamente. Igualmente, um evento endotérmico é observado em 229,5 °C no termograma de CED do hidrato de didanosina e em 238,2 °C no termograma correspondente da forma sólida comercial do fármaco. Suas entalpias são similares nestes termogramas. Estes eventos foram atribuídos à decomposição do fármaco.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nove modificações cristalinas de três fármacos antirretrovirais nucleosídeos inibidores de transcriptase reversa com emprego terapêutico como agentes anti-SIDA foram preparadas e tiveram suas estruturas determinadas. Portanto, o principal objetivo deste estudo foi alcançado com sucesso. Vale destacar a relevância e a importância destes resultados levando em consideração a utilização terapêutica destes fármacos, principalmente, de lamivudina. Embora estes fármacos sejam incorporados há duas décadas em formulações farmacêuticas utilizadas como parte de terapias antirretrovirais, existia pouca informação sobre seus comportamentos no estado sólido. Neste sentido, este estudo contribuiu para a compreensão da estruturação de fases cristalinas de lamivudina, zalcitabina e didanosina. Como uma perspectiva, as modificações cristalinas preparadas poderão ser úteis como insumos farmacêuticos destes agentes anti-VIH com desempenhos aperfeiçoados. Neste aspecto, quatro modificações cristalinas de lamivudina (cloridrato de lamivudina, cloridrato monoidratado de lamivudina, maleato de lamivudina e dupla hélice de lamivudina) apresentaram propriedades de estado sólido, como solubilidade e estabilidade, aperfeiçoadas em relação à forma cristalina do fármaco empregada terapeuticamente. Portanto, suas aplicabilidades como fases cristalinas alternativas de formulações farmacêuticas contendo este nucleosídeo bioativo foram demonstradas. Ainda com respeito a estas quatro modificações cristalinas, suas solubilidades e estabilidades foram correlacionadas com suas características estruturais e termodinâmicas, resultando na interpretação das propriedades de estado sólido destas modificações cristalinas em termos supramoleculares.

O efeito da entrada de moléculas de água na rede cristalina do cloridrato de lamivudina sobre as arquiteturas supramoleculares e as propriedades termodinâmicas das versões anidra e monoidratada deste sal foi interpretado com base nas suas caracterizações estruturais e termoquímicas.

O planejamento do maleato de lamivudina introduziu uma estratégia de engenharia de cristais moleculares baseada no reconhecimento de características químicas e estruturais dos agentes formadores de sais responsáveis pela estruturação de um arranjo intermolecular definido. Baseado em fases cristalinas reportadas, modificações cristalinas de lamivudina e até mesmo de outros fármacos poderão ser planejadas através da interpretação do padrão de

interações intermoleculares e de propriedades físico-químicas de agentes formadores de sais ou agentes de co-cristalização. Esta estratégia de engenharia de cristais moleculares permite inclusive prever propriedades de estado sólido da modificação cristalina planejada, assim como relações significativas entre estruturas cristalinas e tais propriedades podem ser estabelecidas devido ao caráter isoestrutural das fases sólidas preexistente e planejada.

As estruturas do hemicloridrato hemidratado de lamivudina, do 0,67-hidrato de lamivudina e da dupla hélice de lamivudina demonstraram que nucleosídeos podem arquitetar arranjos estruturais similares a ácidos nucleicos até mesmo na ausência dos grupos hidroxílico e fosfato nas posições 3' e 5'. O 0,67-hidrato de lamivudina e a dupla hélice de lamivudina comprovaram que as ligações de hidrogênio e as interações π - π entre bases nitrogenadas são as principais forças intermoleculares responsáveis pela formação de duplexes caracterizadas pelo pareamento e sobreposição helicoidal das unidades nucleosídeas. Isto sugere que duplas hélices primitivas formadas por nucleosídeos podem ter precedidas estruturas de ácidos nucleicos. As ligações fosfodiéster adaptativamente forneceriam uma maior estabilidade ao arranjo supramolecular preexistente devido à formação do esqueleto covalente periférico, embora o arranjo helicoidal dos pares sobrepostos de nucleosídeos antecederia as estruturas de ADN como seqüências moleculares codificadoras. A descoberta de duplexes de nucleosídeos, como aquelas do 0,67-hidrato de lamivudina e da dupla hélice de lamivudina, cujos sulcos acomodassem outras pequenas moléculas biológicas, como aminoácidos e oligopeptídeos, forneceria evidências experimentais adicionais sobre suas ocorrências em condições pré-bióticas e em esboços celulares.

A equivalência das estruturas do cloridrato de lamivudina e do cloridrato de zalcitabina demonstraram que a conformação molecular e a arquitetura supramolecular destes sais independe das configurações dos átomos quirais de carbono e dos grupos presentes na posição 3' dos fármacos. Já a estrutura do cloridrato de zalcitabina e lamivudina difere das estruturas do cloridrato de zalcitabina e do cloridrato de lamivudina, demonstrando que as configurações invertidas dos átomos quirais de carbono de lamivudina em relação às configurações dos átomos correspondentes de zalcitabina governam o arranjo supramolecular do híbrido cristalino formado por ambos os fármacos. Em adição, o cloridrato de zalcitabina e lamivudina é uma modificação cristalina de dois fármacos planejada com base na similaridade estrutural entre o cloridrato de lamivudina e o cloridrato de zalcitabina, demonstrando que estratégias de engenharia de cristais podem ser úteis para o preparo de fases sólidas compostas por dois fármacos.

A obtenção do hidrato de didanosina vislumbra a exploração de técnicas solvotérmicas no âmbito do polimorfismo de sólidos farmacêuticos. A predominância de tautômeros de ceto-amínicos na estrutura do hidrato de didanosina ao invés das formas enol-imínicas prevalecerem, conforme sugerido anteriormente por RMN (83), alerta para uma maior cautela quando inferências estruturais sobre fases sólidas são baseadas somente em atribuições espectroscópicas.

REFERÊNCIAS

- 1 VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3-26, 2001.
- 2 DESIRAJU, G. R. Polymorphism: the same and not quite the same. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 1, p. 3-5, 2008.
- 3 BILTON, C.; HOWARD, J. A. K.; MADHAVI, N. N. L.; NANGIA, A.; DESIRAJU, G. R.; ALLEN, F. H.; WILSON, C. C. When is a polymorph not a polymorph? Helical trimeric O-H center dot center dot center dot O synthons in *trans*-1,4-diethynylcyclohexane-1,4-diol. **Chemical Communications**, n. 17, p. 1675-1676, 1999.
- 4 LU, J.; ROHANI, S. Polymorphism and crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs). **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 884-905, 2009.
- 5 HILFIKER, P. **Polymorphism in the pharmaceutical industry**. Weinheim, Germany: Wiley-VHC, 2006. 433 p.
- 6 KATRINCIC, L. M.; SUN Y. T.; CARLTON, R. A.; DIEDERICH, A. M.; MUELLER, R. L.; VOGT, F. G. Characterization, selection, and development of an orally dosed drug polymorph from an enantiotropically related system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1-2, p. 1-13, 2009.
- 7 BRITTAIN, H. G. Effects of mechanical processing on phase composition. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 7, p. 1573-1580, 2002.
- 8 BRITTAIN, H. G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. New York: Marcel Dekker, 1999. 448 p.
- 9 BABU, N. J.; CHERUKUVADA, S.; THAKURIA, R.; NANGIA, A. Conformational and synthon solymorphism in furosemide (Lasix). **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 4, p. 1979-1989, 2010.

- 10 KACHRIMANIS, K.; FUCKE, K.; NOISTERNIG, M.; SIEBENHAAR, B.; GRIESSER, U. J. Effects of moisture and residual solvent on the phase stability of orthorhombic paracetamol. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 6, p. 1440-1449, 2008.
- 11 HENG, J. Y. Y.; WILLIAMS, D. R. Wettability of paracetamol polymorphic forms I and II. **Langmuir**, v. 22, n. 16, p. 6905-6909, 2006.
- 12 BURLEY, J. C.; DUER, M. J.; STEIN, R. S.; VRCELJ, R. M. Enforcing ostwald's rule of stages: isolation of paracetamol forms III and II. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 5, p. 271-276, 2007.
- 13 ZERKOWSKI, J. A.; MACDONALD, J. C.; WHITESIDES, G. M. Polymorphic packing arrangements in a class of engineered organic crystals. **Chemistry of Materials**, v. 9, n. 9, p. 1933-1941, 1997.
- 14 AKUTAGAWA, T.; KOSHINAKA, H.; YE, Q.; NORO, S.; KAWAMATA, J.; YAMAKI, H.; NAKAMURA, T. Conformational polymorph of *o*-aminoanilinium(dibenzo[18]crown-6) supramolecules in [Ni(dmit)₂]⁻ salts. **Chemistry-An Asian Journal**, v. 5, n. 3, p. 520-529, 2010.
- 15 MARTINS, F. T.; BOCELLI, M. D.; BONFILIO, R.; DE ARAUJO, M. B.; DE LIMA, P. V.; NEVES, P. P.; VELOSO, M. P.; ELLENA, J.; DORIGUETTO, A. C. Conformational polymorphism in racemic crystals of the diuretic drug chlortalidone. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 7, p. 3235-3244, 2009.
- 16 MARIA, T. M. R.; CASTRO, R. A. E.; BEBIANO, S. S.; SILVA, M. R.; BEJA, A. M.; CANOTILHO, J.; EUSEBIO, M. E. S. Polymorphism of *trans*-1,4-cyclohexanediol: conformational isomorphism. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 3, p. 1194-1200, 2010.
- 17 DEY, S. K.; DAS, G. Conformational polymorphism of a simple tripodal podand bearing nitro functionality. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 2, p. 754-760, 2010.
- 18 SOKOLOV, A. N.; SUMRAK, J. C.; MACGILLIVRAY, L. R. Conformational polymorphism facilitates assignment of *trans* and *cis*-conformers of an alpha-substituted oligothiophene via IR spectroscopy. **Chemical Communications**, v. 46, n. 1, p. 82-84, 2010.
- 19 UZAREVIC, K.; RUBCIC, M.; DILOVIC, I.; KOKAN, Z.; CALOGOVIC, D. M.; CINDRIC, M. Concomitant conformational polymorphism: mechanochemical reactivity and phase relationships in the (methanol)*cis*-dioxo(*N*-salicylidene-2-amino-3-hydroxypyridine)molybdenum(VI) trimorph. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 12, p. 5327-5333, 2009.

- 20 STAHL, G. P. Diversity in single- and multiple-component crystals: the search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 7, n. 6, p. 1007-1026, 2007.
- 21 MONISSETTE, S. L.; ALMARSSON, O.; 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.
- 22 BRAGA, D.; GREPIONI, F.; MAINI, L.; POLITO, M. Crystal Polymorphism and Multiple Crystal Forms. **Molecular Networks**, v. 132, p. 25-50, 2009.
- 23 VISHWESHWAR, P.; MCMAHON, J. A.; PETERSON, M. L.; HICKEY, M. B.; SHATTOCK, T. R.; ZAWOROTKO, M. J. Crystal engineering of pharmaceutical co-crystals from polymorphic active pharmaceutical ingredients. **Chemical Communications**, n. 36, p. 4601-4603, 2005.
- 24 AAKEROY, C. B.; FASULO, M. E.; DESPER, J. Cocrystal or salt: does it really matter? **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 317-322, 2007.
- 25 BRITTAIN, H. G. Polymorphism and solvatomorphism 2007. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 5, p. 1617-1642, 2009.
- 26 VISHWESHWAR, P.; MCMAHON, J. A.; BIS, J. A.; ZAWOROTKO, M. J. Pharmaceutical co-crystal. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 3, p. 499-516, 2006.
- 27 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.
- 28 MOULTON, B.; ZAWOROTKO, M. J. From molecules to crystal engineering: supramolecular isomerism and polymorphism in network solids. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 6, p. 1629-1658, 2001.
- 29 BERSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystals**. New York: Oxford University Press, 2002. 410 p.

- 30 DESIRAJU, G. R. Crystal engineering: solid state supramolecular synthesis. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v. 2, n. 4, p. 451-454, 1997.
- 31 ELDER, D. P.; DELANEY, E.; TEASDALE, A.; EYLEY, S.; REIF, V. D.; JACQ, K.; FACCHINE, K. L.; OESTRICH, R. S.; SANDRA, P.; DAVID, F. The utility of sulfonate salts in drug development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 7, p. 2948-2961, 2010.
- 32 CHENEY, M. L.; MCMANUS, G. J.; PERMAN, J. A.; WANG, Z. Q.; ZAWOROTKO, M. J. The role of cocrystals in solid-state synthesis: cocrystal-controlled solid-state synthesis of imides. **Crystal Growth & Design**, v. 7, n. 4, p. 616-617, 2007.
- 33 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.
- 34 HIGASHI, K.; IDEURA, S.; WARAYA, H.; LIMWIKRANT, W.; MORIBE, K.; YAMAMOTO, K. Simultaneous dissolution of naproxen and flurbiprofen from a novel ternary gamma-cyclodextrin complex. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 769-772, 2010.
- 35 DEY, A.; KIRCHNER, M. T.; VANGALA, V. R.; DESIRAJU, G. R.; MONDAL, R.; HOWARD, J. A. K. Crystal structure prediction of aminols: advantages of a supramolecular synthon approach with experimental structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 30, p. 10545-10559, 2005.
- 36 THALLADI, V. R.; WEISS, H. C.; BLASER, D.; BOESE, R.; NANGIA, A.; DESIRAJU, G. R. C-H center dot center dot center dot F interactions in the crystal structures of some fluorobenzenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 34, p. 8702-8710, 1998.
- 37 DESIRAJU, G. R.; KISHAN, K. V. R. Crystal-chemistry of some (alkoxyphenyl)propionic acids - the role of oxygen and hydrogen-atoms in determining stack structures of planar aromatic-compounds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 13, p. 4838-4843, 1989.
- 38 VANGALA, V. R.; BHOGALA, B. R.; DEY, A.; DESIRAJU, G. R.; BRODER, C. K.; SMITH, P. S.; MONDAL, R.; HOWARD, J. A. K.; WILSON, C. C. Correspondence between molecular functionality and crystal structures. Supramolecular chemistry of a family of homologated aminophenols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 47, p. 14495-14509, 2003.

- 39 KHAN, M.; ENKELMANN, V.; BRUNKLAUS, G. Crystal engineering of pharmaceutical co-crystals: application of methyl paraben as molecular hook. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 14, p. 5254-5263, 2010.
- 40 RANJBAR, P. R.; VAFAKISH, B.; ABBASI, A.; FISCHER, A. Host-guest interaction in propeller-shaped molecules. Part one: single crystal X-ray analysis of benzylidene-1,1'-bis-2-naphthol solvent cocrystals. **Zeitschrift fur Kristallographie**, v. 224, n. 10, p. 499-505, 2009.
- 41 SILVA, L. A.; MARTINS, C. R.; ANDRADE, J. B. Why are all nitrates soluble? **Quimica Nova**, v. 27, n. 6, p. 1016-1020, 2004.
- 42 KHURSHID, S.; HAIRE, L. F.; CHAYEN, N. E. Automated seeding for the optimization of crystal quality. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, p. 752-756, 2010.
- 43 KHAN, A. N.; HONG, P. D.; CHUANG, W. T.; SHIH, K. S. Crystallization kinetics and structure of poly(trimethylene terephthalate)/monolayer nano-mica nanocomposites. **Materials Chemistry and Physics**, v. 119, n. 1-2, p. 93-99, 2010.
- 44 LI, H. T.; KIANG, Y. H.; JONA, J. Multiple approaches to pharmaceutical polymorphism investigation - A case study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 5, p. 426-432, 2009.
- 45 ALTONEN, J.; ALLESO, M.; MIRZA, S.; KORADIA, V.; GORDON, K. C.; RANTANEN, J. Solid form screening - A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 1, p. 23-37, 2009.
- 46 FABBIANI, F. P. A.; ALLAN, D. R.; DAVID, W. I. F.; DAVIDSON, A. J.; LENNIE, A. R.; PARSONS, S.; PULHAM, C. R.; WARREN, J. E. High-pressure studies of pharmaceuticals: an exploration of the behavior of piracetam. **Crystal Growth & Design**, v. 7, n. 6, p. 1115-1124, 2007.
- 47 CHIOU, W. L. The rate and extent of oral bioavailability versus the rate and extent of oral absorption: clarification and recommendation of terminology. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 28, n. 1, p. 3-6, 2001.
- 48 SWARBRICK, J. **Current concepts in the biopharmaceutical sciences: dosage form design and bioavailability**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1973. 230 p.

- 49 CHIOU, W. L.; CHUNG, S. M.; WU, T. C. Apparent lack of effect of P-glycoprotein on the gastrointestinal absorption of a substrate, tacrolimus, in normal mice. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 2, p. 205-208, 2000.
- 50 CHIOU, W. L.; BUEHLER, P. W. Comparison of oral absorption and bioavailability of drugs between monkey and human. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, p. 868-874, 2002.
- 51 KHAN, M. Z. I. Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with in vivo data: challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 140, n. 2, p. 131-143, 1996.
- 52 HERSEY, J. A.; MARTY, J. J. Drug dissolution - Critical review. **Manufacturing Chemist and Aerosol News**, v. 46, n. 6, p. 43-53, 1975.
- 53 MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 375-400, 2002.
- 54 HUANG, L. F.; TONG, W. Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 321-334, 2004.
- 55 HORTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 75-87, 2001.
- 56 KREYES, A.; ELLINGER, S.; LANDFESTER, K.; DEFAUX, M.; IVANOV, D. A.; ELSCHNER, A.; FRIEDRICHSEN, T. M.; ZIENER, U. Fine tuning of solid-state properties of septithiophenes by tailoring the substituents. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 6, p. 2079-2092, 2010.
- 57 BHATT, P. M.; RAVINDRA, N. V.; BANERJEE, R.; DESIRAJU, G. R. Saccharin as a salt former: enhanced solubilities of saccharinates of active pharmaceutical ingredients. **Chemical Communications**, n. 8, p. 1073-1075, 2005.
- 58 PARSHAD, H.; FRYDENVANG, K.; LILJEFORS, T.; LARSEN, C. S. Correlation of aqueous solubility of salts of benzylamine with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1-2, p. 193-207, 2002.

- 59 SUROV, A. O.; SZTERNER, P.; ZIELENKIEWICZ, W.; PERLOVICH, G. L. Thermodynamic and structural study of tolfenamic acid polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 5, p. 831-840, 2009.
- 60 SERAJUDDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 603-616, 2007.
- 61 PAULEKUHN, G. S.; DRESSMAN, J. B.; SAAL, C. Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection based on analysis of the Orange Book Database. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 6665-6672, 2007.
- 62 STAHL P. H.; WERMUTH, C. G. **Handbook of pharmaceutical salts: properties, selection, and use**. Weinheim, Germany: Wiley-VHC, 2002. 374 p.
- 63 JONES, H. P.; DAVEY, R. J.; COX, B. G. Crystallization of a salt of a weak organic acid and base: solubility relations, supersaturation control and polymorphic behavior. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 11, p. 5273-5278, 2005.
- 64 DAIICHI SANKYO K.K. Y Nakamura; C. Sato; T. Miyamoto; H. Kajino. **Pharmaceutical composition for treating diabetes, hyperlipidemia, polycystic ovarian syndrome or atherosclerosis, has crystal of 5-4-6-methoxy-1-methyl-1H-benzimidazole-2-yl-methoxy-benzyl thiazolidine-2,4-dione hydrochloride**. JP2008044932-A, 28 Feb. 2008.
- 65 SYNTHON BV. R. J. H. Westheim. **New crystalline erlotinib hydrochloride hydrate is epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor useful for preparing anhydrous erlotinib hydrochloride and treating proliferative disorders and cancer e.g. ovarian cancer**. WO2008049645-A2, 02 May 2008.
- 66 DIPHARMA SPA. G. Castaldi; G. Barreca; P. Allegrini; G. Ventimiglia; G. Balleca; J. Ventimilia. **New monohydrate crystalline form of fexofenadine hydrochloride useful in therapy and as antihistaminic, antiallergic and bronchodilator medicaments**. US2005282860-A1, 22 Dec. 2005.
- 67 KISSEI PHARM CO LTD. H. Isawa; M. Toda. **Crystal of specific dimethyl phenoxy ethyl acetate hydrochloride hydrate derivative used in pharmaceutical composition for preventing and treating diseases such as urinary incontinence, neurogenic bladder dysfunction and nocturia**. WO2006118087-A1, 09 Nov. 2006.
- 68 CIPLA LTD. D. R. Rao; R. Kankan. **New crystalline form of sibutramine (N-(1-(1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl)-3-methylbutyl)-N,N-dimethyl-amine) free base is a neuronal**

monoamine reuptake inhibitor useful to treat/prevent/ameliorate/eliminate e.g. depression. KR2006034636-A, 18 Nov. 2004.

69 WYETH CORP. J. Schmid; J. J. Bicksler. **New hydrochloride salt of quinoline and its crystalline monohydrochloride salt useful for treating e.g. dementia, Alzheimer's disease, schizophrenia and depression.** WO2007146115-A2, 21 Dec. 2007.

70 LI, S. F.; DOYLE, P.; METZ, S.; ROYCE, A. E.; SERAJUDDIN, A. T. M. Effect of chloride ion on dissolution of different salt forms of haloperidol, a model basic drug. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 10, p. 2224-2231, 2005.

71 SCHERING CORP. M. Hu; S. Paliwal; N. Shih; F. Guenter; I. Mergelsberg. **New crystalline esylate, mesylate, maleate and oxalate salt forms of (5S,8S)-8-(((1R)-1-(3,5-bis-(trifluoromethyl)phenyl)-ethoxy)-methyl)-8-phenyl-1,7-diazaspiro(4.5)decan-2-one, useful in pharmaceutical composition for treating nausea.** WO2007114922-A2, 11 Oct. 2007.

72 REDDY'S LAB LTD. S. Eswaraiah; G. M. Reddy; J. M. Reddy; K. V. Rambabu; B. V. Bhaskar. **New crystalline forms I and II of amlodipine maleate useful as anti-ischemic and anti-hypertensive agents.** US2007004783-A1, 04 Jan. 2007.

73 FINI, A.; FAZIO, G.; RODRIGUEZ, M. G.; CAVALLARI, C.; PASSERINI, N.; RODRÍGUEZ, L. Formation of ion-pairs in aqueous solutions of diclofenac salts. **International of Journal Pharmaceutics**, v. 187, n. 2, p. 163-173, 1999.

74 O'CONNOR, K. M.; CORRIGAN, O. I. Preparation and characterization of a range of diclofenac salts. **International of Journal Pharmaceutics**, v. 226, n. 1-2, p. 163-179, 2001.

75 O'CONNOR, K. M.; CORRIGAN, O. I. Comparison of the physicochemical properties of the N-(2-hydroxyethyl) pyrrolidine, diethylamine and sodium salt forms of diclofenac. **International of Journal Pharmaceutics**, v. 222, n. 2, p. 281-293, 2001.

76 TANTISHAIYAKUL, V. Prediction of aqueous solubility of organic salts of diclofenac using PLS and molecular modeling. **International of Journal Pharmaceutics**, v. 275, n. 1-2, p. 133-139, 2004.

77 DE CLERCQ, E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): past, present, and future. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, n. 1, p. 44-64, 2004.

78 DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n.1 p. 13-25, 2002.

79 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.

80 CHOWERS, M.; GOTTESMAN, B. S.; LEIBOVICI, L.; SCHAPIRO, J. M.; PAUL, M. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors in combination therapy for HIV patients: systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 7, p. 779-786, 2010.

81 KIM, D. D.; CHIEN, Y. W. Transdermal delivery of dideoxynucleoside-type anti-HIV drugs .2. The effect of vehicle and enhancer on skin permeation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 2, p. 214-219, 1996.

82 OJEWOLE, E.; MACKRAJ, I.; NAIDOO, P.; GOVENDER, T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 697-710, 2008.

83 BETTINI, R.; MENABENI, R.; TOZZI, R.; PRANZO, M. B.; PASQUALI, I.; CHIEROTTI, M. R.; GOBETTO, R.; PELLEGRINO, L. Didanosine polymorphism in a supercritical antisolvent process. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1855-1870, 2010.

84 MATRIX LAB LTD. R. Balusu; S. R. Ginjupalli; R. Pilli; V. U. Rao; A. Sahu; O. D. Tyagi; S. R. P. Vellanki. **Novel polymorph of didanosine comprises same, and process for preparing crystalline form of didanosine and its salts**. IN200701677-I4, 25 Sept. 2009.

85 BRISTOL-MYERS SQUIBB CO. J. B. Bogardus; M. A. Kaplan; R. K. Perrone. **Highly water soluble, stable, crystalline salts of 2',3'-dideoxy-2', 3'-didehydrothymidine, 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxy-2'-fluoroinosine, useful as intermediates or antiviral agents**. US6207650-B1, 27 Mar. 2001.

86 GLAXO GROUP LTD. G. W. Koszalka; T. A. Krenitsky. **Di:de-oxy-nucleoside(s) e.g. 2-prime-3-prime di:de:oxy-inosine - used as anti-viral agents especially against AIDS**. EP206497-A2, 30 Dec. 1986.

87 US DEPT HEALTH & HUMAN SERVICE. H. Mitsuya; S. Broder, **Treatment of cytopathic effects of retro-virus especially HIV by administration of 2',3'-**

di:deoxy:adenosine, 2',3'-di:deoxy:inosine or 2',3'-di:deoxy:guanosine, or salts or ester(s). US4861759-A, 20 Aug. 1989.

88 NAZARENO, L. A.; HOLAZO, A. A.; LIMJUCO, R.; PASSE, S.; TWARDY, S. K.; MIN, B.; MASSARELLA, J. W. The effect of food on pharmacokinetics of zalcitabine in HIV-positive patients. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 10, p. 1462-1465, 1995.

89 SILVERTON, J. V.; QUINN, F. R.; HAUGWITZ, R. D.; TODARO, L. J. Structures of 2 dideoxynucleosides - 2',3'-dideoxyadenosine and 2',3'-dideoxycytidine. **Acta Crystallographica Section C - Crystal Structure Communications**, v. 44, p. 321-324, 1988.

90 BIRNBAUM, G. I.; LIN, T. S.; PRUSOFF, W. H. Unusual structural features of 2',3'-dideoxycytidine, an inhibitor of the HIV (AIDS) virus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 151, n. 1, p. 608-614, 1988.

91 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. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 51, n. 5, p. 562-568, 2009.

92 XU, W. M.; CUI, Y. T.; WANG, L.; YANG, H.; LIANG, Z. Q.; LI, X. M.; ZHANG, S. L.; QIAO, F. Y.; CAMPBELL, F.; CHANG, C. N.; GARDNER, S.; ATKINS, M. Lamivudine in late pregnancy to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus infection: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 16, n. 2, p. 94-103, 2009.

93 CHANG, C. N.; DOONG, S. L.; ZHOU, J. H.; BEACH, J. W.; JEONG, L. S.; CHU, C. K.; TSAI, C. H.; CHENG, Y. C.; LIOTTA, D.; SCHINAZI, R. Deoxycytidine deaminase-resistant stereoisomer is the active form of (+/-)-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine in the inhibition of hepatitis B virus replication. **Journal of Biological Chemistry**, [S.I.], v. 267, n. 20, p. 13938-13942, 1992.

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

95 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**, n. 12, p. 2653-2659, 1997.

- 96 BIOCHEM PHARMA INC. B. Belleau; T. Mansour; A. Tse; C. A. Evans; H. Jin; B. Zacharie; N. N. Ba. **Preparation of antiviral oxathiolane derivatives via novel intermediates by reacting mercapto-acetaldehyde with aldehyde under basic conditions.** US5466806-A, 14 Nov. 1995.
- 97 BIOCHEM PHARMA INC. B. Belleau; P. Belleau; N. Nguyenba; N. N. Ba; N. Nghe; N. H. Ba; B. Nguyen. **New 2-hydroxymethyl-5-substituted-1,3-oxathiolane derivatives - useful as anti-retroviral agents for treating HIV infections.** EP382526-A2, 16 Aug. 1990.
- 98 BHATTACHARYA, A.; ROY, B. N.; SINGH, G. P.; SRIVASTAVA, D.; MUKHERJEE, A. K. Lamivudine hemihydrate. **Acta Crystallographica Section C - Crystal Structure Communications**, v. 66, p. O329-O333, 2010.
- 99 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.
- 100 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, 2009.
- 101 GLAXO GROUP LTD. P. Ravenscroft; T. G. Roberts; P. Evans; P. Ravenscroft. **Crystalline antiviral coumpound - comprises (-)cis-4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1,3-oxathiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-one.** US5905082-A, 18 May 1999.
- 102 CADILA HEALTHCARE LTD. C. S. Shah; S. D. Sorathiya; V. K. Agarwal; V. S. R. Nirogi; K. Pandita; P. R. Patel; S. D. Sorathia; N. V. S. Ramakrishna. **Manufacture of lamivudine polymorph, useful as antiviral agent against HIV, involves refluxing lamivudine salicylate monohydrate suspended in solvent followed by addition of an organic base.** WO2003027106-A, 03 Abril 2003.
- 103 JOZWIAKOWSKI, M. J.; NGUYEN, N. T.; SISCO, J. M.; SPANCAKE, C. W. Solubility behavior of lamivudine crystal forms in recrystallization solvents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 2, p. 193-199, 1996.
- 104 WATSON, J. D.; CRICK F. H. C. Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.
- 105 PORTUGAL, J. Do Hoogsteen base-pairs occur in DNA. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 127-130, 1989.

- 106 CORNELIS, A. G.; HAASNoot, J. H. J.; DENHARTOG, J. F.; DEROOIJ, M.; VANBOOM, J. H.; CORNELIS, A. Local destabilization of a DNA double helix by a T-T wobble pair. **Nature**, v. 281, n. 5728, p. 235-236, 1979.
- 107 D'URSO, A.; CHOI, J. K.; HUSSAIN, M. S.; NGWA, F. N.; LAMBOUSIS, M. I.; PURRELLO, R.; BALAZ, M. Recognition of left-handed Z-DNA of short unmodified oligonucleotides under physiological ionic strength conditions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 2, p. 329-332, 2010.
- 108 CHRISTOPHE, D. H-form DNA and the hairpin triplex model. **Nature**, v. 333, n. 6170, p. 214-214, 1988.
- 109 JIN, R.; BRESLAUER, K. J.; JONES, R. A.; GAFFNEY, B. L. Tetraplex formation of a guanine-containing nonameric DNA fragment. **Science**, v. 250, n. 4980, p. 543-546, 1990.
- 110 RETAILLEAU, P.; ISHCHEKNO, A. A.; KUZNETSOV, N. A.; SAPARBAEV, M.; MORERA, S. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human endonuclease 1 (APE1) in complex with an oligonucleotide containing a 5,6-dihydrouacil (DHU) or an alpha-anomeric 2'-deoxyadenosine (alpha dA) modified base. **Acta Crystallographica Section F - Structural Biology And Crystallization Communications**, v. 66, p. 798-800, 2010.
- 111 SAENGER, W. **Principles of nucleic acid structure**. New York: Springer-Verlag, 1984. 556 p.
- 112 SAWADA, T.; YOSHIZAWA, M.; SATO, S.; FUJITA, M. Minimal nucleotide duplex formation in water through enclathration in self-assembled hosts. **Nature Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 53-56, 2009.
- 113 MARIANI, P.; SPINOZZI, F.; FEDERICONI, F.; AMENITSCH, H.; SPINDLER, L.; OLENIK, I. D. Small angle X-ray scattering analysis of deoxyguanosine 5'-monophosphate self-assembling in solution: nucleation and growth of G-quadruplexes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 22, p. 7934-7944, 2009.
- 114 BURGE, S.; PARKINSON, G. N.; HAZEL, P.; TODD, A. K.; NEIDLE, S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 19, p. 5402-5415, 2006.

- 115 WU, G.; KWAN, I. C. M. Helical structure of disodium 5'-guanosine monophosphate self-assembly in neutral solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 9, p. 3180-3182, 2009.
- 116 RANGAN, A.; FEDOROFF, O. Y.; HURLEY, L. H. Induction of duplex to G-quadruplex transition in the c-myc promoter region by a small molecule. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4640-4646, 2001.
- 117 ESPOSITO, V.; MARTINO, L.; CITARELLA, G.; VIRGILIO, A.; MAYOL, L.; GIANCOLA, C.; GALEONE, A. Effects of abasic sites on structural, thermodynamic and kinetic properties of quadruplex structures. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 6, p. 2069-2080, 2010.
- 118 HOOGSTEEN, K. The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. **Acta Crystallographica**, v. 16, p. 907-916, 1963.
- 119 PANDIT, J.; SESHADRI, T. P.; VISWAMITRA, M. A. Structure of disodium deoxycytidine 5'-phosphate heptahydrate, $C_9H_{12}N_3O_7P_2 \cdot 2Na^+ \cdot 7H_2O$. **Acta Crystallographica Section C - Crystal Structure Communications**, v. 39, p. 342-345, 1983.
- 120 HOOGSTEEN, K. Crystal structure of 1-methylthymine. **Acta Crystallographica**, v. 16, n. 1, p. 28-38, 1963.
- 121 CAMERMAN, A.; MASTROPAOLO, D.; CAMERMAN, N. Azidothymidine - crystal-structure and possible functional-role of the azido group. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 23, p. 8239-8242, 1987.
- 122 OBRIEN, E. J. Crystal structures of 2 complexes containing guanine and cytosine derivatives. **Acta Crystallographica**, v. 23, p. 92-106, 1967.
- 123 GEHRING, K.; LEROY, J. L.; GUERON, M. A tetrameric DNA-structure with protonated cytosine-cytosine base-pairs. **Nature**, v. 363, n. 6429, p. 561-565, 1993.
- 124 CHEN, L. Q.; CAI, L.; ZHANG, X. H.; RICH, A. Crystal-structure of a 4-stranded intercalated DNA - d(C₄). **Biochemistry**, v. 33, n. 46, p. 13540-13546, 1994.
- 125 KANG, C. H.; BERGER, I.; LOCKSHIN, C.; RATLIFF, R.; MOYZIS, R.; RICH, A. Stable loop in the crystal-structure of the intercalated 4-stranded cytosine-rich metazoan

telomere. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 9, p. 3874-3878, 1995.

126 WEIL, J.; MIN, T. P.; YANG, C.; WANG, S. R.; SUTHERLAND, C.; SINHA, N.; KANG, C. H. Stabilization of the *i*-motif by intramolecular adenine-adenine-thymine base triple in the structure of d(ACCCT). **Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography**, v. 55, p. 422-429, 1999.

127 MERGNY, J. L.; LACROIX, L.; HAN, X. G.; LEROY, J. L.; HELENE, C. Intramolecular folding of pyrimidine oligodeoxynucleotides into an *i*-DNA motif. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 35, p. 8887-8898, 1995.

128 RAW, A. S.; FURNESS, M. S.; GILL, D. S.; ADAMS, R. C.; HOLCOMBE, F. O.; YU, L. X. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications (ANDAs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 397-414, 2004.

129 CARINI, J. P.; PAVEL, C.; SILVA, A. P. C.; MACHADO, G.; MEXIAS, A. S.; PEREIRA, V. P.; FIALHO, S. L.; MAYORGA, P. Solid state evaluation of some thalidomide raw materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 17-23, 2009.

130 ROMERO, A. J.; SAVASTANO, L.; RHODES, C. T. Monitoring crystal modifications in systems containing ibuprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 99, n. 2-3, p. 125-134, 1993.

131 SILVA, C. C. P.; MARTINS, F. T.; HONORATO, S. B.; BOECHAT, N.; AYALA, A. P.; ELLENA, J. Triple structural transition below room temperature in the antifilarial drug diethylcarbamazine citrate. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 7, p. 3094-3101, 2010.

132 ROY, S.; AITIPAMULA, S.; NANGIA, A. Thermochemical analysis of venlafaxine hydrochloride polymorphs 1-5. **Crystal Growth & Design**, v. 5, n. 6, p. 2268-2276, 2005.

133 ZENCIRCI, N.; GELBRICH, T.; APPERLEY, D. C.; HARRIS, R. K.; KAHLENBERG, V.; GRIESSER, U. J. Structural features, phase relationships and transformation behavior of the polymorphs I-VI of phenobarbital. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 1, p. 302-313, 2010.

134 SKORDA, D.; KONTOYANNIS, C. G. Identification and quantitative determination of atorvastatin calcium polymorph in tablets using FT-Raman spectroscopy. **Talanta**, v. 74, n. 4, p. 1066-1070, 2008.

- 135 VIRTANEN, T.; MAUNU, S. L. Quantification of a polymorphic mixture of an active pharmaceutical ingredient with solid state C-13 CPMAS NMR spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, n. 1-2, p. 18-25, 2010.
- 136 BRITTAIN, H. G. X-ray diffraction II: using single-crystal X-ray diffraction to study polymorphism and solvatomorphism. **Spectroscopy**, v. 15, n. 7, p. 34-39, 2000.
- 137 FERREIRA, F. F.; ANTONI, S. G.; ROSA, P. C. P.; SANTOS, C. D. P. Crystal structure determination of mebendazole form a using high-resolution synchrotron X-ray powder diffraction data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1734-1744, 2010.
- 138 CAIRA, M. R.; BETTINETTI, G.; SORRENTI, M.; CATENACCI, L. Relationships between structural and thermal properties of anhydrous and solvated crystalline forms of brodimoprim. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 5, p. 996-1007, 2007.
- 139 JANKOVIC, B.; MENTUS, S. Thermal stability and nonisothermal kinetics of Folvic (R) degradation process. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 980-992, 2010.
- 140 GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of crystallography**. New York: Oxford University Press, 1992. 674 p.
- 141 STEPHENSON, G. A. Structure determination from conventional powder diffraction data: application to hydrates, hydrochloride salts, and metastable polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 7, p. 958-966, 2000.
- 142 YU, L. X.; FURNESS, M. S.; RAW, A.; OUTLAW, K. P. W.; NASHED, N. E.; RAMOS, E.; MILLER, S. P. F.; ADAMS, R. C.; FANG, F.; PATEL, R. M.; HOLCOMBE, F. O.; CHIU, Y. Y.; HUSSAIN, A. S. Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 4, p. 531-536, 2003.
- 143 COLLECT Data Collection Software. Delft, The Netherlands: Nonius, 1998.
- 144 OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: CARTER JUNIOR, C. W.; SWEET, R. M. (Eds.). **Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography**. New York: Academic Press, 1997. v. 276, parte A. p. 307-326.

- 145 SHELDRICK, G. M. **SHELXS-97**: program for crystal structure resolution. Göttingen, Germany: University of Göttingen, 1997.
- 146 ALTOMARE, A.; CASCARANO, G.; GIACOVAZZO, C.; GUAGLIARDI, A. Completion and refinement of crystal-structures with SIR92. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 343-350, 1993.
- 147 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, p. 381-388, 2005.
- 148 SHELDRICK, G. M. **SHELXL-97**: program for crystal structure analysis. Göttingen, Germany: University of Göttingen, 1997.
- 149 FARRUGIA, L. J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, p. 837-838, 1999.
- 150 DEMEULEN, J.; TOMPA, H. Absorption correction in crystal structure analysis. **Acta Crystallographica**, v. 19, p. 1014-1018, 1965.
- 151 COPPENS, P.; LEISEROW, L.; RABINOV, D. Calculation of absorption corrections for camera and diffractometer data. **Acta Crystallographica**, v. 18, p. 1035-1038, 1965.
- 152 FLACK, H. D. On enantiomorph-polarity estimation. **Acta Crystallographica Section A**, v. 39, p. 876-881, 1983.
- 153 BEHRND, N. R.; LABAT, G.; VENUGOPALAN, P.; HULLIGER, J.; BURGI, H. B. Orientational disorder of (*trans*)-4-chloro-4'-nitrostilbene: a detailed analysis by single crystal X-ray diffraction. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2010.
- 154 UDOVENKO, A. A.; LAPTASH, N. M. Orientational disorder and phase transitions in crystals of (NH₄)₂NbOF₅. **Acta Crystallographica Section B - Structural Science**, v. 64, p. 527-533, 2008.
- 155 SPEK, A. L. Single-crystal structure validation with the program PLATON. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, p. 7-13, 2003.

156 SPEK, A. L. Structure validation in chemical crystallography. **Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography**, v. 65, p. 148-155, 2009.

157 ALLEN, F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. **Acta Crystallographica Section B-Structural Science**, v. 58, n. 1, p. 380-388, 2002.

158 CIFs. Disponível em: < <http://www.ccdc.cam.ac.uk>>. Acesso em: 30 ago. 2010.

159 MACRAE, C. F.; BRUNO, I. J.; CHISHOLM, J. A.; EDGINGTON, P. R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; MONGE, L. R.; 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, p. 466-470, 2008.

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

161 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.

162 BERGERHOFF, G.; BERNDT, M.; 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.

163 LAMIVUDINE tablets. Disponível em <<http://www.usp.org/pdf/EN/pendingStandards/lamivudineTablets.pdf>> Acesso em: 30 ago. 2010.

164 VORUM, H.; BRODERSEN, R.; KRAGHHANSEN, U.; PEDERSEN, A. O. Solubility of long-chain fatty-acids in phosphate buffer at pH-7.4. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1126, n. 2, p. 135-142, 1992.

165 GLOMME, A.; MARZ, J.; DRESSMAN, J. B. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 1, p. 1-16, 2005.

166 SHALAEVA, M.; KENSETH, J.; LOMBARDO, F.; BASTINZ, A. Measurement of dissociation constants (pK(a) 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.

167 KHANKARI, R. K.; GRANT, D. J. W. Pharmaceutical hydrates. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 61-79, 1995.

168 KHANKARI, R. K.; LAW, D.; GRANT, D. J. W. Determination of water-content in pharmaceutical hydrates by differential scanning calorimetry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 82, n. 1-2, p. 117-127, 1992.

169 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 (R) formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1-2, p. 74-81, 2009.

170 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.

171 WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; SILVERSTEIN, R. M. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: Wiley-VHC, 2005. 512 p.

172 VARSANYI, G. **Vibrational spectra of benzene derivatives**. New York: Academic Press, 1969. 430 p.

173 AYALA, A. P. Polymorphism in drugs investigated by low wavenumber Raman scattering. **Vibrational Spectroscopy**, v. 45, n. 2, p. 112-116, 2007.

174 BLACK, S. N.; COLLIER, E. A.; DAVEY, R. J.; ROBERTS, R. J. Structure, solubility, screening, and synthesis of molecular salts. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 5, p. 1053-1068, 2007.

175 SARI, H.; COVINGTON, A. K. Comparative measurements of calcium stability constants of some dicarboxylic acids by titrimetry with pH glass and calcium ion-selective electrodes. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 50, n. 5, p. 1620-1623, 2005.

176 DANIELE, P. G.; DE ROBERTIS, A.; SAMMATANO, S.; RIGANO, C. On the possibility of determining the thermodynamic parameters for the formation of weak complexes using a simple model for the dependence on ionic strength of activity coefficients: Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} complexes of low molecular weight ligands in aqueous solution. **Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions**, n. 11, p. 2353-2361, 1985.

177 KANEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KK. S. Takahashi; K. Inoue; Y. Yanagida; T. Ohashi; K. Watanabe. **Preparation of antihypertensive enalapril - from an N-carboxyanhydride and L-proline**, EP215335, 25 Mar. 1987.

178 REDDY'S LAB LTD. S. Eswaraiah; G. M. Reddy; J. M. Reddy; K. V. Rambabu; B. V. Bhaskar. **New crystalline forms I and II of amlodipine maleate useful as anti-ischemic and anti-hypertensive agents**. US2007004783, 4 Jan. 2007.

179 SCHERING CORP. M. Hu; S. Paliwal; N. Shih; F. Guenter; I. Mergelsberg. **New crystalline esylate, mesylate, maleate and oxalate salt forms of (5S,8S)-8-(((1R)-1-(3,5-bis-(trifluoromethyl)phenyl)-ethoxy)-methyl)-8-phenyl-1,7-diazaspiro(4.5)decan-2-one, useful in pharmaceutical composition for treating nausea**. WO2007114922, 11 Oct. 2007.

180 BASF AG. M. Kroner; G. Schornick; H. Feindt; T. Meyer; A. Ludwig; U. Metzmann. **Preparation of polyaspartic acid - by polycondensation in presence of acid catalyst contacted with finely divided aspartic acid in reaction zone, giving little agglomeration**. US5830985, 3 Nov. 1998.

181 CHENCY, M. L.; SHAN, N.; HEALEY, E. R.; HANNA, M.; WOJTAS, L.; ZAWOROTKO, M. J.; SAVA, V.; SONG, S. J.; RAMOS, J. R. S. 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, 2010.

182 GALCERA, J.; MOLINS, E. Effect of the counterion on the solubility of isostructural pharmaceutical lamotrigine salts. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 1, p. 327-334, 2009.

183 YANG, S. Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11-12, p. 444-450, 2010.

184 VAN DRIE, J. H. Pharmacophore discovery - lessons learned. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 20, p. 1649-1664, 2003.

185 ORTMANN, I.; WERNER, S.; KRUGER, C.; MOHR, S.; SCHAFFNER, K. Intermolecular π -electron interactions made visible - correlation of ground-state and excited-state interactions with specific photoreactivities of isomorphously crystallized isoelectronic compounds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 13, p. 5048-5054, 1992.

- 186 LIDE, D. R. **CRC Handbook of chemistry and physics**. Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis, 2009. 250 p. Disponível em: <<http://www.hbcpnetbase.com/>>. Acesso em: julho de 2009.
- 187 CHECA, A.; SOTO, V. G.; CASSOU, S. H.; SAURINA, J. Fast determination of pK(a) values of reverse transcriptase inhibitor drugs for AIDS treatment by using pH-gradient flow-injection analysis and multivariate curve resolution. **Analytica Chimica Acta**, v. 554, n. 1-2, p. 177-183, 2005.
- 188 BANERJEE, D.; KIM, S. J.; BORKOWSKI, L. A.; XU, W. Q.; PARISE, J. B. Solvothermal synthesis and structural characterization of ultralight metal coordination networks. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 2, p. 709-715, 2010.
- 189 WEI, F.; ZHANG, J.; WANG, L.; ZHANG, Z. K. Solvothermal growth of single-crystal bismuth sulfide nanorods using bismuth particles as source material. **Crystal Growth & Design**, v. 6, n. 8, p. 1942-1944, 2006.
- 190 WANG, X. F.; ZHANG, Y. B.; HUANG, H.; ZHANG, J. P.; CHEN, X. M. Microwave-assisted solvothermal synthesis of a dynamic porous metal-carboxylate framework. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 12, p. 4559-4563, 2008.
- 191 LEGENDRE, A. O.; MAURO, A. E.; NOGUEIRA, V. M.; CASTELLANO, E. E. Hydrothermal synthesis and crystal structure of a copper(II) coordination polymer with bridging dicarboxylate and diamine ligands. **Analytical Sciences**, v. 24, n. 5, p. x69-x70, 2008.
- 192 GUNAWAN, P.; XU, R. Direct control of drug release behavior from layered double hydroxides through particle interactions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 10, p. 4367-4378, 2008.
- 193 JANGSAENG DORAJI CO LTD. S. H. Lee; Y. C. Lee; K. R. Lee; E. J. Kim; S. H. Roh; H. K. Chun. **Pharmaceutical or health food composition for prevention and treatment of diabetes mellitus without side effects comprising hydrothermal extract of old red *Platycodon grandiflorum* as effective component**. KR687715-B1, 27 Feb. 2007.

APÊNDICE

Determinação de estruturas cristalinas por difração de raios X

A DRX é uma técnica muito utilizada para elucidação da estrutura cristalina de pequenas moléculas (1). O termo estrutura cristalina refere-se à distribuição dos átomos no interior de um cristal, um sólido com ordenamento dos constituintes atômicos a longo alcance (1). As unidades repetitivas de um cristal são definidas pelo empacotamento periódico das moléculas, as quais são dispostas ordenadamente no cristal. Tais unidades repetitivas são denominadas celas unitárias cristalográficas. A cela unitária é definida por três vetores convergentes, e desta forma, por três ângulos formados entre estes vetores. A unidade fundamental desta distribuição é repetida regularmente, em três dimensões, no interior do cristal. Por sua vez, os vetores que delimitam a cela unitária e os ângulos correspondentes remetem aos sete sistemas cristalinos, definidos pela simetria da rede cristalina (2,3).

A rede cristalina é definida por um arranjo regular de pontos no espaço e é por definição uma abstração puramente matemática. Além de celas primitivas, onde os pontos de rede são fixados nos seus vértices, ainda há centragem de cela em sistemas cristalinos. Em suma, 14 redes espaciais, denominadas redes de Bravais, podem ser descritas através da combinação dos sete sistemas cristalinos com as condições de centragem de cela possíveis para cada um dos sete sistemas cristalinos (4). As operações de simetria que relacionam os átomos e a célula unitária devem ainda considerar os vários elementos de simetria pontuais (rotações, reflexões, inversões e roto-reflexões) e translacionais (roto-translações e planos de deslizamento) a fim de somar os 230 grupos espaciais que descrevem a distribuição dos átomos ou moléculas dentro de uma cela unitária (1). Generalizando, toda e qualquer estrutura cristalina será definida por um grupo espacial, no qual estão implícitos o sistema cristalino e os elementos de simetria, pelas dimensões da cela unitária e pelas coordenadas atômicas (1,4).

A difração pode ser definida como o fenômeno de perturbação do deslocamento de uma onda devido à interação com um obstáculo (1). Mais especificamente, a DRX pode ser entendida como a alteração da direção de propagação, amplitude e fase da radiação eletromagnética cujo comprimento de onda (λ) varia entre 0,1 Å e 100 Å como consequência da interação com centros espalhadores eletrônicos periodicamente arranjados em um cristal (2,3). Para que haja DRX por um cristal, raios X espalhados devem estar em fase para interferirem construtivamente e terem suas amplitudes resultantes regidas pelo princípio de

superposição de ondas (2). Para estarem em fase, a diferença de percurso entre os feixes difratados por centros espalhadores deve equivaler a um número inteiro n de comprimentos de onda ($n\lambda$). O termo n representa a ordem de difração, o qual deve ser obrigatoriamente um número inteiro. A construção geométrica que relaciona esta observação com o ângulo de difração θ e a distância d entre os centros espalhadores periodicamente arranjados é conhecida como Lei de Bragg e é dada por:

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

Uma vez satisfeita esta condição, o que necessariamente implica que os centros espalhadores e a radiação espalhada possuem grandezas espaciais de magnitude similar, ondas refletidas a partir de centros espalhadores periodicamente ordenados estarão todas em fase e resultarão em feixes difratados. A função matemática que descreverá tais feixes difratados dependerá da natureza e estrutura dos centros espalhadores (3). Portanto, quando difratados, raios X informam quais e como os átomos espalhadores estão periodicamente arranjados no espaço, o que permite a determinação da estrutura intramolecular e intermolecular e das dimensões da cela unitária cristalográfica (2).

Um importante conceito para a interpretação da DRX por cristais é que três pontos não colineares da rede cristalina constituem um plano cristalográfico, o qual é referenciado por índices de Miller (1). Tais planos são designados através de uma simbologia representada por $(h \ k \ l)$, onde h , k e l assumem números inteiros positivos ou negativos (barra acima do número), os quais são determinados pelos recíprocos das interseções do plano com os vetores da cela unitária (1). Vale ressaltar que, devido à simetria dos sistemas cristalinos e às relações de equivalência nos grupos espaciais, planos da rede não paralelos entre si apresentam dependência cristalográfica e, assim, há planos espalhadores interceptores com diferentes índices $(h \ k \ l)$ que são coincidentes (dependentes por simetria). Os espalhamentos dos raios X por estes planos serão equivalentes, alterando-se apenas a direção em que a difração ocorre. Para que exista interferência construtiva, e, conseqüentemente, o fenômeno da difração ocorra, há necessidade do feixe incidente de raios X formar um ângulo igual ao ângulo de difração θ e ambos serem coplanares com a normal do plano de reflexão, satisfazendo à Lei de Bragg. Somente ocorrerá interferência construtiva e o fenômeno da difração será percebido, quando a diferença de percurso entre ondas refletidas por planos de difração for igual a $n\lambda$ (1).

Quando há uma relação de fase definida entre o vetor do campo elétrico incidente E_{in} de uma radiação eletromagnética e a aceleração causada em um elétron devido à interação com esta radiação, qualquer elétron de carga e e massa m é acelerado com uma aceleração a (2):

$$a = \frac{e}{m} E_{\text{in}}. \quad (2)$$

Por sua vez, o elétron acelerado atuará como uma fonte emissora de radiação sob desaceleração. Este é o princípio do espalhamento Thomson, em que uma onda interage com uma partícula e é espalhada com a mesma frequência e comprimento de onda da radiação incidente (2). O espalhamento Thomson é referenciado também como espalhamento coerente e é aquele observado no fenômeno de DRX por cristais, embora o espalhamento Compton incoerente também ocorra como parte da radiação espalhada de fundo. Entretanto, o espalhamento Compton, caracterizado pela colisão entre duas partículas (fóton e elétron) e alteração da frequência e comprimento de onda da radiação espalhada, não resulta no padrão discreto de DRX, pois não há uma relação de fase bem definida neste evento de interação partícula-partícula (2).

A radiação espalhada será caracterizada por um vetor de campo elétrico E_{esp} que poderá se orientar em qualquer direção no plano normal à direção de propagação da radiação eletromagnética. Esta aleatoriedade da direção de E_{esp} se deve ao fato do feixe incidente também não ser polarizado. Considerando que a polarização parcial p de E_{esp} é uma função do ângulo de difração θ , ϵ_0 é uma constante eletromagnética fundamental da ordem de $8,854 \cdot 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$, c é a velocidade de propagação da radiação eletromagnética e r é a distância entre o elétron e o ponto de detecção da radiação espalhada, E_{esp} será dado por:

$$E_{\text{esp}} = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r m c^2} \frac{[1 + \cos^2(2\theta)]}{2} E_{\text{in}}. \quad (3)$$

Se definirmos a habilidade de um elétron em espalhar a radiação eletromagnética como o fator de espalhamento eletrônico f_e :

$$f_e = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r m c^2}, \quad (4)$$

temos uma nova expressão para a amplitude da radiação espalhada E_{esp} :

$$E_{\text{esp}} = f_e \frac{[1 + \cos^2(2\theta)]}{2} E_{\text{in}}. \quad (5)$$

Correções devidas à polarização parcial do vetor de campo elétrico da radiação espalhada devem ser realizadas, principalmente quando cristais monocromadores são utilizados para seleção de determinado comprimento de onda dos raios X. A polarização parcial induzida pelo cristal monocromador afetará o espalhamento subsequente pelo cristal em estudo, comprometendo a magnitude da radiação espalhada (3). Neste caso, o termo referente à polarização p deve ser reescrito como:

$$p = \frac{[1 + K \cos^2(2\theta)]}{1 + K}, \quad (6)$$

onde K é razão entre os feixes paralelo e normal à superfície do plano espalhador da radiação na fonte monocromática. Estes dois feixes são derivados da decomposição do vetor de campo elétrico em dois componentes, um paralelo à superfície do plano espalhador, dependente apenas da densidade eletrônica no plano (feixe π ou $I_{\parallel}$), e outro perpendicular a esta superfície (feixe σ ou $I_{\perp}$), o qual depende tanto da densidade eletrônica no plano quanto do ângulo de difração θ . Este último componente é responsável pelo decréscimo da radiação espalhada devido ao fator de polarização. Sua completa anulação e, conseqüentemente, a anulação de metade da radiação espalhada decomposta nos dois componentes $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$ de mesma magnitude ocorre quando $2\theta = 90^\circ$. Considerando o ângulo de difração θ_m do cristal monocromador, uma aproximação muito utilizada para o valor de K é:

$$K = \cos(2\theta_m). \quad (7)$$

Uma vez aplicada correção devida à polarização parcial da radiação espalhada, podemos expressar a radiação espalhada E_{esp} por um elétron como:

$$E_{\text{esp}} = f_e E_{\text{in}}. \quad (8)$$

Para uma distribuição discreta de n elétrons, a radiação espalhada E_{esp} total relativa à radiação incidente E_{in} será dada por:

$$\frac{E_{\text{esp}}}{E_{\text{in}}} = \sum_n f_e e^{i\phi_n}, \quad (9)$$

onde o termo exponencial se refere à relação de fase definida como o número ou frações de comprimentos de onda que separam os elétrons discretamente distribuídos no espaço (2).

Enquanto a habilidade de um elétron em espalhar a radiação eletromagnética é definida como f_e , a habilidade de uma distribuição eletrônica contínua, como aquela de átomos reais, em espalhar a radiação eletromagnética pode ser entendida como:

$$f_e \rho(\mathbf{r}) d(\mathbf{r}), \quad (10)$$

onde o produto $\rho(\mathbf{r}) d(\mathbf{r})$ é o número médio de elétrons confinados no elemento de volume $d(\mathbf{r})$. Portanto, $\rho(\mathbf{r})$ pode ser referenciada como a função de densidade eletrônica de uma distribuição eletrônica.

Agora, reescrevendo a equação (9) para uma distribuição contínua de elétrons em que a habilidade de um centro espalhador em espalhar a radiação será dada pela equação (10), e expressando a fase relativa no termo exponencial em função do vetor de espalhamento $\Delta \mathbf{k}$ e do centro espalhador $\mathbf{r}$ como:

$$e^{i\phi_n} = e^{i\Delta \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}}, \quad (11)$$

temos:

$$\frac{E_{\text{esp}}(\Delta \mathbf{k})}{E_{\text{in}}} = \int_{\mathbf{r}} f_e \rho(\mathbf{r}) e^{i\Delta \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} d(\mathbf{r}). \quad (12)$$

Agora, a radiação espalhada é função do vetor de espalhamento $\Delta \mathbf{k}$, cuja direção de espalhamento é dada pelos índices $h k l$. Uma vez que a integração não é sobre a variável r embutida em f_e , nós podemos extrair este termo da integral. Em adição, a expressão

$$\frac{E_{\text{esp}(\Delta \mathbf{k})}}{E_{\text{in}} f_e} \quad (13)$$

representa a habilidade relativa dos centros espalhadores de uma cela unitária em espalhar radiação eletromagnética quando comparada com a habilidade de um único elétron. Esta expressão especifica a amplitude da difração em uma dada direção de espalhamento indexada por $h k l$. Então, podemos definir a expressão (13) como o fator de estrutura F_{hkl} de um máximo de difração correspondente ao ponto da rede recíproca definido pelos integradores $h k l$.

Através da substituição da representação vetorial $\mathbf{r}$ dos centros espalhadores no termo exponencial por coordenadas fracionárias $x y z$ e vetores cristalográficos $a b c$, representando o ponto $\mathbf{r}$ como:

$$x a + y b + z c, \quad (14)$$

e o volume $d\mathbf{r}$ em função do volume V da cela unitária como:

$$V dx dy dz, \quad (15)$$

e, por fim, assumindo a proporcionalidade entre o vetor de espalhamento $\Delta \mathbf{k}$ e o vetor de rede recíproca $\mathbf{G}_{hkl}$ como sendo:

$$\Delta \mathbf{k} = 2 \pi \mathbf{G}_{hkl}, \quad (16)$$

onde $\mathbf{G}_{hkl}$ pode ser definido em termos de vetores cristalográficos da rede recíproca $a^* b^* c^*$ como:

$$\mathbf{G}_{hkl} = d_{hkl}^{-1} = h a^* + k b^* + l c^*, \quad (17)$$

temos o fator de estrutura F_{hkl} como:

$$F_{hkl} = \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(x, y, z) e^{2\pi i (hx + ky + lz)} dx dy dz \quad (18)$$

A integração sobre a função de densidade eletrônica através das coordenadas da cela unitária deve ser realizada sobre todo o conteúdo da mesma, o que justifica os limites da integração indo de zero a um. Desta forma, a função de densidade eletrônica, outrora representada na forma vetorial por $\rho(\mathbf{r})$, é também expressa agora como função das coordenadas fracionárias x, y, z .

Fatores de estrutura F_{hkl} podem ser expressos em função de fatores de espalhamento atômico. Considerando que um elétron isolado espalha raios X com uma determinada intensidade definida pelo fator de espalhamento Thomson, um átomo contendo Z elétrons espalharia raios X com intensidade igual ao produto entre Z e a intensidade de um único elétron isolado, conforme descrito anteriormente. Entretanto, devido às distâncias entre os átomos serem da ordem de grandeza do comprimento de onda dos raios X, as ondas que os elétrons espalham interferem umas com as outras, de forma que só teremos uma dada intensidade correspondendo a todos os elétrons de um átomo na direção de incidência dos raios X. Para o espalhamento em outras direções temos interferência parcialmente destrutiva devido ao distanciamento entre os elétrons de um átomo culminar em diferenças de percurso da radiação espalhada. Assim, a amplitude total do feixe espalhado por um átomo, a qual recebe contribuições de todos os seus elétrons, ou seja, é proporcional ao número atômico e dependente dos espaçamentos intereletrônicos, decresce com o aumento do ângulo de espalhamento. Esta habilidade de um átomo em espalhar os raios X é definida como o fator de espalhamento atômico f e constitui a amplitude espalhada pela distribuição de elétrons de um átomo normalizada em relação à amplitude espalhada por um elétron isolado, sob condições idênticas. Fatores de espalhamento atômico podem assumir como valor máximo Z (número atômico do átomo) na ocasião dos elétrons espalharem a radiação em fase, na direção de incidência do feixe de raios X ($2\theta = 0$). Para os feixes espalhados na direção da incidência, os raios X estarão em fase e a amplitude resultante deriva do princípio de sobreposição de ondas. Quando o ângulo de difração é diferente de zero, as trajetórias dos raios espalhados são

diferentes e a diferença de fase resulta em interferência. Considerando uma molécula, a onda total espalhada por todos os átomos é dada pela soma vetorial das contribuições individuais de cada átomo.

Em prática, o fator de espalhamento atômico significa a tendência de um átomo para espalhar a radiação X, a um dado ângulo e certo λ . Assim, valores tabelados são encontrados para razões de $\sin\theta/\lambda$, expressos como o quociente entre a amplitude da onda espalhada por um átomo sobre a amplitude da onda espalhada por um elétron. De maneira similar ao fator de espalhamento atômico, o fator de estrutura é um quociente de duas amplitudes: a amplitude da onda espalhada por todos os átomos da célula unitária e a amplitude da onda espalhada por um elétron isolado, onde a magnitude deste fator depende unicamente da posição relativa de todos os átomos na célula unitária e de seus respectivos fatores de espalhamento. Então, é conveniente expressar os fatores de estrutura F_{hkl} em função dos valores de f_j de cada átomo, o qual embuti a função de densidade eletrônica do átomo em um certo volume determinado pelo seu raio atômico. Então, a equação (18) é reescrita como:

$$F_{hkl} = \sum_j f_j e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)}, \quad (19)$$

onde o somatório deve ser efetuado sobre todos os átomos da cela unitária. Uma vez que os átomos da cela unitária podem estar relacionados por elementos de simetria do grupo espacial, a equação anterior pode ser simplificada. Os fatores de espalhamento atômico devem também ser corrigidos em função da temperatura. Em um modelo isotrópico de deslocamento, em que as vibrações térmicas são esfericamente simétricas em todas as direções, o fator de temperatura $T_{j,\theta}$ de um átomo para qualquer conjunto de planos de rede (h k l) dependerá do espaçamento interplanar e da magnitude de vibração perpendicular aos planos. Então, o fator de espalhamento atômico corrigido $(f_j)_T$ em função da temperatura será dado por:

$$(f_j)_T = f_j T_{j,\theta}, \quad (20)$$

onde $T_{j,\theta}$ é dado por:

$$T_{j,\theta} = e^{-B_j (\sin^2 \theta / \lambda^2)}, \quad (21)$$

e B_j assume a grandeza:

$$8 \pi^2 \langle u^2 \rangle, \quad (22)$$

onde $\langle u^2 \rangle$ representa o deslocamento quadrático médio do átomo j .

Em cristais moleculares, os átomos estão ligados covalentemente uns aos outros e, portanto, forças atrativas e repulsivas sobre ligações químicas distorcem a distribuição da densidade eletrônica de tal forma que um modelo isotrópico de deslocamento atômico deve ser aperfeiçoado para um modelo anisotrópico de vibração térmica. Neste modelo, os átomos têm diferentes liberdades de deslocamento em três direções ortogonais (mutuamente perpendiculares). Então, neste modelo mais realístico de deslocamento térmico, um único parâmetro térmico isotrópico B_j é substituído por seis parâmetros térmicos anisotrópicos U_{ij} , três deles definindo a forma da representação elipsoidal do átomo j e três especificando sua orientação. Neste caso, a expressão para o fator de temperatura anisotrópico $T_{j,\theta}$ será dada por:

$$T_{j,\theta} = e^{-2\pi^2 (U_{11}h^2a^{*2} + U_{22}k^2b^{*2} + U_{33}l^2c^{*2} + 2U_{12}hka^*b^* + 2U_{13}hla^*c^* + 2U_{23}klb^*c^*)}, \quad (23)$$

A função de densidade eletrônica $\rho(x, y, z)$ varia periodicamente de uma cela unitária a outra através do cristal, como consequência do ordenamento periódico dos átomos no estado cristalino. Devido a esta periodicidade, $\rho(x, y, z)$ pode ser descrita por uma série de Fourier tridimensional. Portanto, o padrão de DRX é a transformada de Fourier T da função de densidade eletrônica. Pelo teorema de Fourier, a função de densidade eletrônica será a transformada inversa T^{-1} do padrão de DRX, como exemplificado abaixo:

$$F_{hkl} = T \rho(x, y, z), \quad (24)$$

$$\rho(x, y, z) = T^{-1} F_{hkl}. \quad (25)$$

A partir do padrão de DRX, composto pela amplitude e fase intrínseca dos fatores de estrutura F_{hkl} difratados em direções de espalhamento discretas e definidas, a função de

densidade eletrônica pode ser então calculada para cada ponto da cela unitária através de suas coordenadas fracionárias por meio da síntese de Fourier dada pela relação:

$$\rho(x, y, z) = V^{-1} \sum_{h=-\infty}^{h=+\infty} \sum_{k=-\infty}^{k=+\infty} \sum_{l=-\infty}^{l=+\infty} F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (26)$$

Como mencionado anteriormente, o padrão de DRX é discreto e não contínuo, sendo caracterizado por fatores de estrutura F_{hkl} em posições indexadas. Por esta razão, a integral tripla da equação (18) se degenera dentro de somatórios na equação (26) sobre todos os valores possíveis de índices dos vetores de espalhamento. A intensidade da radiação espalhada é uma função inversamente proporcional ao ângulo de difração θ , sendo que, para um dado comprimento de onda λ da radiação incidente, somente os pontos da rede recíproca caracterizados pelo vetor de rede recíproca G_{hkl} cujas magnitudes satisfazem a relação:

$$G_{hkl} \leq 2 \lambda^{-1}, \quad (27)$$

poderão ser detectados em um experimento de DRX. O termo $2 \lambda^{-1}$ é o raio da esfera limite, a qual representa uma construção geométrica originada da rotação do cristal sobre a esfera de Ewald. Este valor é equivalente ao diâmetro da esfera de reflexões ou esfera de Ewald, construção geométrica que estabelece uma esfera de raio λ^{-1} cujos pontos de rede recíproca devem atravessá-la para satisfazerem a Lei de Bragg e, portanto, ser observado o fenômeno da DRX. A esfera limite restringe o conjunto de pontos da rede recíproca que podem atravessar a esfera de Ewald. Portanto, todo conjunto de dados de DRX será sempre finito, e a equação (26) pode ser escrita para os valores limites dos índices h, k, l como:

$$\rho(x, y, z) = V^{-1} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (28)$$

Experimentalmente, quando um monocristal de um dado composto é irradiado com raios X, tipicamente com um λ dentro da faixa compreendida entre 0,7 Å a 2,0 Å, ele se comporta como uma rede de difração tridimensional e produz um padrão de difração constituído de um arranjo tridimensional de intensidades difratadas. As intensidades destas

reflexões estão intimamente relacionadas à densidade eletrônica dos átomos espalhadores, uma vez que o padrão de difração é a transformada de Fourier da densidade eletrônica da estrutura e, inversamente, a densidade eletrônica da estrutura é a transformada de Fourier do padrão de difração. Isto pode ser evidenciado através da relação (28). Desta forma, através das intensidades e direções das reflexões difratadas é possível determinar a densidade eletrônica da estrutura (2).

Uma vez conhecidos os fatores de estrutura F_{hkl} , a densidade eletrônica $\rho(x, y, z)$ pode ser calculada para cada ponto x, y, z na cela unitária, viabilizando a construção de mapas de densidade eletrônica de uma molécula em um cristal por um procedimento de cálculo conhecido como síntese de Fourier. Quando um mapa de densidade eletrônica com resolução em torno de 1,0 Å ao longo dos eixos cristalográficos é calculado, os picos de densidade eletrônica podem ser atribuídos aos centros espalhadores atômicos e, conseqüentemente, às suas posições (1). Todavia, o cálculo desses mapas envolve a obtenção das fases intrínsecas α_{hkl} dos fatores de estrutura, uma vez que:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}}, \quad (29)$$

e os dados obtidos em um experimento de DRX são as intensidades espalhadas I_{hkl} em direções definidas, as quais podem ser relacionadas apenas à amplitude dos fatores de estrutura e, portanto, aos seus módulos, através da relação:

$$I_{hkl} = \frac{I_{in}}{\omega} K L_{hkl} p_{hkl} A_{hkl} e'^2_{hkl} |(F_{hkl})_T|^2 V_{crist}, \quad (30)$$

em que I_{in} é a intensidade do feixe incidente de raios X, ω é a velocidade angular de rotação do cristal, K é o fator de escala que converte os módulos dos fatores de estrutura em valores relativos para grandezas absolutas (na equação (13), os fatores de estrutura F_{hkl} foram definidos como grandezas relativas, normalizadas em relação ao produto $E_{in} f_e$, então, para levar F_{hkl} para um valor absoluto devemos multiplicá-lo tanto por E_{in} ($I_{in} = E_{in}^2$) quanto por f_e , termo este embutido no fator de escala K ($K = f_e^2 N^2$, onde N é o número total de celas unitárias contidas dentro do volume V_{crist} do cristal)), L_{hkl} é o fator de Lorentz que corrige as diferentes oportunidades temporais e geométricas que diferentes pontos da rede recíproca têm

para difratar em função da intersecção com a esfera de Ewald ($L_{hkl} = 1/\sin 2\theta$), p_{hkl} é o fator de polarização discutido anteriormente e expresso pela equação (6), A_{hkl} é o termo que corrige o efeito da absorção dos raios X e assume a forma de $e^{-\mu x}$, onde μ é o coeficiente de absorção linear do cristal e x é trajetória total cursada pelos feixes incidente e espalhado, e'_{hkl} corrige os efeitos de extinção primária (reflexões múltiplas por planos de Bragg fortemente espalhadores dos raios X) e secundária (decréscimo da radiação incidente dentro do interior do cristal devido à difração por planos mais externos) e é função do número de planos perfeitamente paralelos dentro do cristal, entre outras variáveis. Por fim, o quadrado do módulo presente na equação (30) considera o fator de estrutura já corrigido em função da temperatura, em que:

$$(F_{hkl})_T = \sum_j (f_j)_T e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (31)$$

Na prática, o processamento das intensidades experimentais de DRX é feito usando programas como o HKL Denzo-Scalepack (5). Além dos fatores físicos e geométricos descritos anteriormente, este programa inclui outros parâmetros refináveis no cálculo do fator de escala geral das reflexões coletadas usando difratômetros com geometria Kappa (6).

Como representado na relação (29), os fatores de estrutura F_{hkl} são grandezas complexas, expressando tanto a amplitude da radiação espalhada em seu componente real quanto a fase em seu componente imaginário (3). No plano complexo representado por um diagrama de Argand, os fatores de estrutura F_{hkl} podem ser decompostos em dois componentes vetoriais projetados nos eixos real (eixo x de um sistema de coordenadas cartesianas) e imaginário (eixo y de um sistema de coordenadas cartesianas). Estas projeções no eixo real (A_{hkl}) e imaginário (B_{hkl}) são provenientes dos fatores de estrutura F_{hkl} através da relação:

$$F_{hkl} = A_{hkl} + iB_{hkl}, \quad (32)$$

e remetem tanto à amplitude $|F_{hkl}|$ dos fatores de estrutura através da expressão:

$$|F_{hkl}| = [(A_{hkl})^2 + (B_{hkl})^2]^{1/2}, \quad (33)$$

quanto às suas fases pela relação:

$$\tan \alpha_{hkl} = \frac{B_{hkl}}{A_{hkl}}, \quad (34)$$

em que

$$A_{hkl} = \sum_j f_j \cos 2\pi (hx_j + ky_j + lz_j), \quad (35)$$

$$B_{hkl} = \sum_j f_j \sin 2\pi (hx_j + ky_j + lz_j). \quad (36)$$

No entanto, as fases dos fatores de estrutura no componente imaginário não podem ser mensuradas em um experimento de DRX em detrimento de limitações tecnológicas advindas da natureza dos raios X (2). Os raios X possuem frequências da ordem de 10^{18} Hertz. Um detector capaz de mensurar a fase da radiação espalhada deveria monitorar mudanças no campo elétrico dos raios X em frações de tempo da ordem de 10^{-18} s. Ou seja, tal dispositivo teria que exibir um tempo de resposta extremamente rápido, detectando a radiação espalhada 10^{18} vezes por segundo, o que está distante da tecnologia atual. Igualmente, a fase da radiação incidente deve ser conhecida a priori, a qual seria atribuída fase zero, para determinar a fase da radiação espalhada. Portanto, a fase da radiação espalhada poderia ser conhecida relativamente à fase da radiação incidente se fosse possível calibrar a distância entre a radiação incidente e o detector. Por sua vez, esta calibração deveria ser realizada com uma precisão muito inferior ao comprimento de onda dos raios X. Esta radiação eletromagnética possui comprimentos de onda da ordem de 10^{-11} m. Desta forma, atualmente não há disponível sistemas mecânicos altamente precisos a ponto de satisfazer tal necessidade. Por fim, o feixe incidente deveria ser constituído de raios X propagando-se com relações de fase bem definidas. Fontes coerentes que emitam raios X com fases altamente correlacionadas ainda não estão disponíveis (4).

Como consequência destas restrições experimentais, as fases α_{hkl} devem ser estimadas teoricamente. Para pequenas moléculas, métodos diretos de determinação das fases permitem estimá-las diretamente das amplitudes observadas. Estes métodos se fundamentam na combinação de expressões de fatores de estrutura com desigualdades e probabilidades

matemáticas, onde as fases de fatores de estrutura com amplitudes fortes podem ser atribuídas e servirão para a determinação das fases das reflexões menos intensas.

Uma forma de determinar as fases de reflexões intensas é através do determinante de Karle-Hauptman (KHdet), assim denominado em homenagem a Jerome Karle e Herbert Hauptman, pesquisadores reconhecidos com o prêmio Nobel em Química no ano de 1985 pelas suas contribuições ao desenvolvimento dos métodos diretos de determinação das fases dos fatores de estrutura. A primeira coluna deste determinante consiste em fatores de estrutura com diferentes índices $h\ k\ l$. A linha superior é composta pelos fatores de estrutura com índices $\overline{h\ k\ l}$, ou seja, os pares centrossimétricos de Friedel correspondentes aos fatores de estrutura $h\ k\ l$ presentes na primeira coluna. O corpo do determinante consiste em fatores de estrutura cujos índices resultam da soma dos índices dos fatores de estrutura na coluna à esquerda e na linha superior. Consequentemente, os termos da diagonal serão sempre F_{000} . Uma vez que a função de densidade eletrônica não é negativa em nenhum ponto da cela unitária, este determinante também não será negativo (3). O determinante de Karle-Hauptman pode ser representado como:

$$\begin{vmatrix}
 F_{000} & F_{\overline{(hkl)1}} & F_{\overline{(hkl)2}} & \dots & F_{\overline{(hkl)n}} \\
 F_{(hkl)1} & F_{000} & F_{[(hkl)1 + \overline{(hkl)2}]} & \dots & F_{[(hkl)1 + \overline{(hkl)n}]} \\
 F_{(hkl)2} & F_{[(hkl)2 + \overline{(hkl)1}]} & F_{000} & \dots & F_{[(hkl)2 + \overline{(hkl)n}]} \\
 \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\
 F_{(hkl)n} & F_{[(hkl)n + \overline{(hkl)1}]} & F_{[(hkl)n + \overline{(hkl)2}]} & \dots & F_{000}
 \end{vmatrix} \geq 0 \quad (37)$$

O KHdet pode ser escrito também em termos de fatores de estrutura unitários U_{hkl} e fatores de estrutura normalizados E_{hkl} , os quais não consideram a perturbação da distribuição da densidade eletrônica de um átomo. Em adição, o uso de E_{hkl} em cálculos de probabilidade tem sua conveniência justificada pela normalização de todas as classes de reflexões, reduzindo a importância de valores altos de U_{hkl} relacionados à simetria do grupo espacial. A normalização dos fatores de estrutura unitários se deve ao fato dos valores de E_{hkl} serem

obtidos através da divisão dos valores de U_{hkl} pelo valor médio $\langle U_{hkl} \rangle$ para determinado conjunto de reflexões relacionadas por simetria, conforme a relação:

$$E_{hkl} = \frac{U_{hkl}}{\langle |U_{hkl}|^2 \rangle^{1/2}}, \quad (38)$$

onde

$$U_{hkl} = \frac{F_{hkl}}{\sum_j f_j}, \quad (39)$$

O KHdet de terceira ordem para o caso centrossimétrico onde

$$U_{hkl} = \overline{U_{\overline{hkl}}}, \quad (40)$$

resulta na seguinte desigualdade:

$$\frac{1}{2}(1 + U_{2h2k2l}) \geq U_{hkl}^2. \quad (41)$$

Esta solução é equivalente à desigualdade de Harker-Kasper (3), e pode ser utilizada para desfazer a ambigüidade dos sinais das fases de fatores de estrutura cujas amplitudes são fortes. No caso centrossimétrico, a projeção do componente do fator de estrutura no eixo imaginário (B_{hkl}) é nula. Portanto, a fase da radiação espalhada pode assumir apenas dois valores referentes à projeção do componente no eixo real (A_{hkl}), 0° ou 180° . A estes dois valores são atribuídos sinais positivo e negativo, respectivamente. Fatores de estrutura cujas amplitudes não são muito intensas, geralmente com $U_{hkl} < 0,5$, não resultam na solução da ambigüidade dos sinais das fases dos fatores de estrutura, uma vez que ambos sinais positivo e negativo satisfazem a desigualdade expressa na equação (41). Uma vez conhecidas as fases de reflexões fortes, as fases das demais reflexões podem ser determinadas assumindo-se que a soma das fases de n reflexões cujos índices somam zero é uma constante. Estes procedimentos permitem a estimativa das fases dos fatores de estrutura em casos centrossimétricos, onde a determinação das fases reside na atribuição correta dos seus sinais. Em estruturas não centrossimétricas, a fase dos fatores de estrutura pode assumir qualquer valor compreendido

entre 1° e 359°, dificultando a determinação direta das fases e introduzindo incertezas de até 45° na estimativa obtida. Outra importante contribuição de Karle e Hauptman foi o desenvolvimento da fórmula da tangente, representada como:

$$\tan \alpha_{hkl} = \frac{\langle |E_{h'k'l'}| |E_{(hkl-h'k'l')}| \sin [\alpha_{h'k'l'} + \alpha_{(hkl-h'k'l')}] \rangle_{h'k'l'}}{\langle |E_{h'k'l'}| |E_{(hkl-h'k'l')}| \cos [\alpha_{h'k'l'} + \alpha_{(hkl-h'k'l')}] \rangle_{h'k'l'}}, \quad (42)$$

onde $\langle \bullet \bullet \bullet \rangle_{h'k'l'}$ significa que a média é calculada sobre todos os valores dos índices $h'k'l'$. Em cristais não centrossimétricos, a fórmula da tangente é uma das principais relações matemáticas que permite a determinação das fases dos fatores de estrutura através dos métodos diretos.

Uma vez determinadas as fases, o modelo molecular pode ser construído através da síntese de Fourier da equação (28), usando como coeficientes os módulos dos fatores de estrutura $|F_{hkl}|$. Desde que a estrutura molecular inicial foi obtida, parâmetros estruturais como posições atômicas, fatores de ocupação de sítio atômico, parâmetros de vibração térmica e fator de escala geral são refinados utilizando o método dos mínimos quadrados. Este procedimento matemático envolve a minimização das diferenças entre os módulos dos fatores de estrutura observados $|F_{(hkl)obs}|$ e calculados $|F_{(hkl)calc}|$ com base no modelo da estrutura preliminar. A minimização da função é calculada em relação aos parâmetros refináveis p_j (coordenadas fracionárias dos átomos, parâmetros de deslocamento térmico, ocupação de sítio, fator de escala, entre outros) através da equação:

$$\sum_{hkl} w_{hkl} [|F_{(hkl)obs}| - |kF_{(hkl)calc}(p_1, p_2, \dots, p_j)|] \frac{\partial |kF_{(hkl)calc}(p_1, p_2, \dots, p_j)|}{\partial p_j} = 0, \quad (43)$$

onde k é o fator de escala e w_{hkl} é o peso dado a cada reflexão. Este peso w_{hkl} representa a confiança da contribuição de cada reflexão na somatória. Geralmente, este peso é uma estimativa da precisão da medida da amplitude e assume a grandeza do recíproco da variância da observação ($w_{hkl} = 1/(\sigma I_{(hkl)obs})^2$, onde $\sigma I_{(hkl)obs}$ é o desvio padrão da medida da radiação difratada). Por esta razão, quanto maior a incerteza sobre uma observação experimental, maior sua variância e menor o peso atribuído a ela. Consequentemente, sua contribuição para o somatório será menor que aquela caso não fosse atribuído este peso, o que é justificado pela

incerteza embutida nesta observação. Vale ressaltar que a função descrita pela equação (43) pode ser minimizada usando o quadrado dos fatores de estrutura. Aliás, o programa SHELXL-97 baseia-se na minimização desta função expressa em termos dos quadrados dos módulos dos fatores de estrutura (7).

Após a obtenção e refinamento de um modelo preliminar da estrutura molecular, a síntese de Fourier da equação (28) agora pode ser usada para calcular a diferença entre as funções de densidade eletrônica observada $\rho(x\ y\ z)_{\text{obs}}$ a partir das intensidades experimentais e calculada $\rho(x\ y\ z)_{\text{calc}}$ usando fatores de estrutura determinados com os parâmetros da estrutura preliminar. Neste cálculo, os coeficientes da série de Fourier são as diferenças entre os módulos dos fatores de estrutura observados $|F_{(hkl)\text{obs}}|$ e calculados $|F_{(hkl)\text{calc}}|$, através da expressão:

$$\rho(x\ y\ z)_{\text{obs}} - \rho(x\ y\ z)_{\text{calc}} = V^{-1} \sum_h \sum_k \sum_l (|F_{(hkl)\text{obs}}| - |F_{(hkl)\text{calc}}|) e^{-i[2\pi(hx + ky + lz) - \alpha_{hkl}]} \quad (44)$$

Uma vez que a síntese da equação (44) usa como coeficientes a subtração dos fatores de estrutura calculados das correspondentes observações experimentais, ou seja, a diferença ΔF_{hkl} entre fatores de estrutura observados e calculados, este cálculo é referenciado como síntese de Fourier diferença. Os mapas de Fourier diferença são caracterizados por valores residuais de densidade eletrônica. Estes mapas são muito úteis, por exemplo, para localização e atribuição de átomos de hidrogênio, correção de posições e atribuição de átomos não hidrogenóides, identificação de sítios extras de ocupação atômica e modelagem de desordens posicionais, identificação de espécies moleculares com baixa ocupação no cristal, correção e modelagem de parâmetros de vibração térmica.

O progresso do refinamento é monitorado usando fatores residuais, os quais levam em consideração os fatores de estrutura calculados a partir da densidade eletrônica obtida na solução inicial. Por fim, a diferença entre os fatores de estrutura calculados e observados é minimizada usando o procedimento de mínimos quadrados de matriz completa, até se obter o melhor ajuste entre os dados de intensidade observados e os calculados. Parâmetros térmicos quando modelados anisotropicamente por um tensor simétrico (elipsóide térmico) melhoram a descrição da densidade eletrônica e fornecem resultados importantes para uma comparação detalhada de distâncias e ângulos interatômicas, apesar de demandar mais recursos computacionais de cada ciclo de refinamento. Entre os fatores residuais existentes, os mais

informativos são o fator de discrepância R , o fator de discrepância ponderado $wR2$ e a qualidade do ajuste S , parâmetro este que expressa o ajuste entre os valores de ΔF_{hkl} aos pesos atribuídos às reflexões. Estes três fatores residuais são definidos como:

$$R = \frac{\sum |F_{(hkl)obs} - F_{(hkl)calc}|}{\sum |F_{(hkl)obs}|}, \quad wR2 = \left[\frac{\sum w_{hkl} (F_{(hkl)obs}^2 - F_{(hkl)calc}^2)^2}{\sum w_{hkl} F_{(hkl)obs}^2} \right]^{1/2}, \quad S = \left[\frac{\sum w_{hkl} (F_{(hkl)obs}^2 - F_{(hkl)calc}^2)^2}{|N_r - N_p|} \right]^{1/2}, \quad (45)$$

em que N_r é o número de reflexões independentes e N_p é o número de parâmetros refinados.

Outro fator residual importante que expressa a equivalência da magnitude dos fatores de estrutura de um conjunto de reflexões relacionadas por simetria é o R_{int} . Este fator residual estima a adequação de um grupo espacial aos dados observados, sendo que se um conjunto de reflexões supostamente relacionadas por simetria não forem estatisticamente equivalentes, valores elevados de R_{int} apontam a discordância da dependência das reflexões. A expressão do R_{int} é descrita como:

$$R_{int} = \frac{\sum |F_{(hkl)obs}^2 - \langle F_{(hkl)simet}^2 \rangle|}{\sum F_{(hkl)obs}^2}, \quad (46)$$

onde $\langle F_{(hkl)simet}^2 \rangle$ representa a média de um conjunto de reflexões relacionadas por determinada simetria.

A determinação da configuração molecular absoluta de enantiomórfos é também possível em estruturas não centrossimétricas, desde que haja pelo menos um átomo espalhador anômalo. Nestes casos, átomos que apresentam energias de transição entre estados quânticos de seus elétrons próximas às energias dos raios X incidentes exibem um fenômeno de absorção significativo. Seus fatores de espalhamento atômico podem ser representados por uma grandeza complexa, cujo componente imaginário conserva seu sinal quando dentro de um conjugado complexo, invalidando a lei de Friedel, conforme descrito:

$$F_{hkl} \neq \overline{F_{hkl}}, \quad (47)$$

No caso de cristais moleculares, cuja intensidade da radiação espalhada decai significativamente em função do ângulo de difração θ , o parâmetro de quiralidade x pode ser integrado às reflexões centrossimétricas (neste caso, denominadas de pares de Bijvoet ao invés de pares de Friedel devido à violação da Lei de Friedel em estruturas não centrossimétricas) e refinado pelo método dos mínimos quadrados. Este parâmetro de quiralidade, também denominado como parâmetro de estrutura absoluta ou parâmetro de Flack, permite a determinação da configuração enantiomórfica do cristal, e na ocasião da presença de centros quirais nas moléculas, este parâmetro viabiliza a determinação de qual enantiômero compõem o cristal. Os fatores de estrutura em função do parâmetro x são expressos como:

$$\left| F_{hkl,x} \right|^2 = (1-x) \left| F_{hkl} \right|^2 + x \left| F_{\overline{hkl}} \right|^2, \quad (48)$$

em que o cristal e o modelo estarão na mesma quiralidade se o valor refinado de x se aproximar de zero. Caso o valor refinado de x se aproximar de um, a quiralidade do modelo estará invertida em relação à configuração do cristal. Recentemente, outros parâmetros probabilísticos baseados nas diferenças entre as intensidades dos pares de Bijvoet foram introduzidos para determinação da estrutura absoluta. Estes parâmetros, como o $P2$ e o $P3$ (8), e o y (9), são mais sensíveis a pequenas diferenças entre as intensidades dos pares de Bijvoet que o parâmetro de Flack, sendo muito úteis para a determinação da estrutura absoluta de moléculas de interesse biológico compostas apenas por átomos leves que não exibem espalhamento anômalo significativo.

Referências

- 1 GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of crystallography**. New York: Oxford University Press, 1992. 674 p.
- 2 SHERWOOD, D. **Crystals, X-rays and proteins**. London: Longman, 1976. 683 p.
- 3 STOUT, G. H.; JENSEN, L. H. **X-ray structure determination: a practical guide**. New York: Wiley-VHC, 1989. 453 p.

4 HAHN, T. **International tables for crystallography**, New York: Springer-Verlag, 2002. v. A. 938 p.

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

6 OTWINOWSKI, Z.; BOREK, D.; MAJEWSKI, W.; MINOR, W. Multiparametric scaling of diffraction intensities. **Acta Crystallographica Section A**, v. 59, p. 228-234, 2003.

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

8 HOOFT, R. W. W.; STRAVER, L. H.; SPEK, A. L. Determination of absolute structure using Bayesian statistics on Bijvoet differences. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, p. 96-103, 2008.

9 HOOFT, R. W. W.; STRAVER, L. H.; SPEK, A. L. Using the *t*-distribution to improve the absolute structure assignment with likelihood calculations. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, p. 665-668, 2010.

ANEXOS

PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELEVANTE RELACIONADA A ESTA TESE

Patentes

Felipe T. Martins, Nikolas Paparidis, Javier Ellena. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE NOVA FORMA CRISTALINA DE LAMIVUDINA, SEU SAL CLORIDRATO, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E SEUS USOS. Universidade de São Paulo – USP / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Depositantes), Protocolo nº. 018090044407, 2009.

Felipe T. Martins, Nikolas Paparidis, Javier Ellena. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM CO-CRISTAL DE LAMIVUDINA, SEU SAL MALEATO, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E SEU USO. Universidade de São Paulo – USP / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Depositantes), P. I. 0.904.938-0, 2009.

Felipe T. Martins, Nikolas Paparidis, Javier Ellena. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE NOVA FORMA CRISTALINA DE LAMIVUDINA, SEU SAL CLORIDRATO MONOIDRATADO, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E SEUS USOS. Universidade de São Paulo – USP / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Depositantes), P. I. 0.903.664-4, 2009.

Felipe T. Martins, Marcio D. Bocelli, Javier Ellena. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UM COMPLEXO SUPRAMOLECULAR DE LAMIVUDINA, ESTRUTURA DE DUPLA HÉLICE MONOMÉRICA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E SEU USO. Universidade de São Paulo – USP / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Depositantes), P.I. 0.905.355-7, 2009.

Artigos em Fase de Redação

MARTINS, F. T.; **BOCELLI, M. D.**; **PAPARIDIS, N.**; **ELLENA, J.** Nucleoside DNA-mimicries: a hexagram-type topology double-stranded helical structure of the anti-HIV drug lamivudine. **Journal of the American Chemical Society**.

MARTINS, F. T.; **PAPARIDIS, N.**; **BOCELLI, M. D.**; **BONFILIO, R.**; **ARAÚJO, M. B.**; **ELLENA, J.** Lamivudine salts with improved solubilities. **Molecular Pharmaceutics**.

Artigos Publicados

MARTINS, F. T.; PAPARIDIS, N.; DORIGUETTO, A. C.; ELLENA, J. Crystal engineering of an anti-HIV drug based on the recognition of assembling molecular frameworks. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 12, p. 5283–5292, 2009.

MARTINS, F. T.; DORIGUETTO, A. C.; ELLENA, J. From rational design of drug crystals to understanding of nucleic acid structures: lamivudine duplex. **Crystal Growth and Design**, v. 10, n. 2, p. 676-684, 2010.

MARTINS, F. T.; LEGENDRE, A. O.; HONORATO, S. B.; AYALA, A. P.; DORIGUETTO, A. C.; ELLENA, J. Solvothermal preparation of drug crystals: didanosine. **Crystal Growth and Design**, v. 10, n. 4, p. 1885-1891, 2010.

Crystal Engineering of an Anti-HIV Drug Based on the Recognition of Assembling Molecular Frameworks

Felipe T. Martins,[†] Nikolas Papparis,[†] Antônio C. Doriguetto,[‡] and Javier Ellena^{*,†}

[†]Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil and [‡]Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva 700, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

Received July 10, 2009; Revised Manuscript Received October 28, 2009

ABSTRACT: A rational strategy was employed for design of an orthorhombic structure of lamivudine with maleic acid. On the basis of the lamivudine saccharinate structure reported in the literature, maleic acid was chosen to synthesize a salt with the anti-HIV drug because of the structural similarities between the salt formers. Maleic acid has an acid-ionization constant of the first proton and an arrangement of their hydrogen bonding functionalities similar to those of saccharin. Likewise, there is a saccharin-like conformational rigidity in maleic acid because of the hydrogen-bonded ring formation and the Z-configuration around the C=C double bond. As was conceivably predicted, lamivudine maleate assembles into a structure whose intermolecular architecture is related to that of saccharinate salt of the drug. Therefore, a molecular framework responsible for crystal assembly into a lamivudine saccharinate-like structure could be recognized in the salt formers. Furthermore, structural correlations and structure–solubility relationships were established for lamivudine maleate and saccharinate. Although there is a same molecular framework in maleic acid and saccharin, these salt formers are structurally different in some aspects. When compared to saccharin, neither out-of-plane SO₂ oxygens nor a benzene group occur in maleic acid. Both features could be related to higher solubility of lamivudine maleate. Here, we also anticipate that multicomponent molecular crystals of lamivudine with other salt formers possessing the molecular framework responsible for crystal assembly can be engineered successfully.

Introduction

The solid state properties of an active pharmaceutical ingredient (API) should be understood because they are directly related to drug performance. Among all physical and chemical properties dependent on the crystalline or amorphous phase of a drug into a pharmaceutical solid dosage form, stability and solubility are those most investigated because they profoundly impact in bioavailability of a drug.¹ The establishment of relationships between solid-state properties and crystal structures is not easy. Most molecular structures do not exhibit similarities enough to correlate them with physical and chemical behaviors. Even though few significant advances in this sense have been made, improvements of API solid state property are achieved by crystal engineering.² Salts are particularly interesting to obtain solid-phase variants of an API with better functional characteristics.^{3,4} Beyond low costs of production, some advantages in synthesizing API salts include practical preparation procedures, higher yield, reproducibility, and purity.^{5,6}

Recently, multicomponent molecular crystals have been widely screened for several classes of APIs,^{6,7} including the anti-HIV drugs.^{8,9} The anti-HIV APIs are classified into three main categories according to molecular mechanism of action and chemical backbone: the nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) and the protease inhibitors (PI).¹⁰ Today, single-drug therapy has been changed to a multiple-drug one wherein at least one NRTI is ever present. Lamivudine (β -L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine, 3TC) is one of the most clinically used NTRI in anti-HIV therapy,¹¹ being

marketed under the brand name EPIVIR.¹² Lamivudine is also used as a NRTI against hepatitis B virus.¹³

Structurally, lamivudine is a 2'-deoxygenated cytidine analog in which there is an isosteric replacement of the ribose 3'-methylene group by a sulfur atom. Concerning the configuration of their two chiral centers, lamivudine is the biologically active (–)-cis enantiomer, crystallizing always in non-centrosymmetric space groups. At least eight crystalline phases are reported for lamivudine: (1) form I, a 0.2-hydrate crystallizing as needles in the $P2_12_12_1$ orthorhombic space group with four water and twenty lamivudine molecules per unit cell,¹⁴ (2) form II, an anhydrous polymorph crystallizing in the tetragonal space group $P4_32_12$ with eight molecules per unit cell,¹⁴ which is the pharmaceutically preferred crystalline modification because of adequate manufacturing features of their bipyramidal single crystals,¹⁵ (3) form III, a hemihydrate crystallizing in the monoclinic space group $P2_1$ with one water and two lamivudine molecules per unit cell,¹⁶ (4) a saccharinate salt crystallizing in the $P2_12_12_1$ space group with four (lamivudine)⁺(saccharin)[–] ionic pairs per unit cell,⁸ (5) a 3,5-dinitrosalicylate salt with two water and two neutral lamivudine molecules, two (lamivudine)⁺ cations and two (3,5-dinitrosalicylic acid)[–] anions per monoclinic unit cell ($P2_1$ space group),⁹ (6) a cocrystal with 4-quinolinone formed by two lamivudine and two 4-quinolinone units per unit cell (monoclinic, $P2_1$),⁹ and (7) a hydrated cocrystal with zidovudine stoichiometrically comprising one lamivudine, one zidovudine and one water, in which there are two units of each species per monoclinic unit cell ($P2_1$ space group).⁹ As part of our crystal engineering researches, design and synthesis of lamivudine crystal modifications have been performed. Most recently, we have prepared (8) lamivudine duplex, which is a double-stranded helix self-assembled due to helical

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: javiere@ifsc.usp.br. Phone: +55 16 3373 8096. Fax: +55 16 3373 9881.

Figure 1. External morphology of lamivudine crystals. (a) Bipyramid of lamivudine form II isolated from the sample used for synthesis of (b) needles and (c) aggregates of lamivudine maleate. The micrographs were acquired using a scanning electron microscope (LEO 435 VP, 15 kV accelerating voltage) after the crystals were coated with colloidal gold (SCD-040 Ion Sputter Balzer device). Bar: 100 μm .

Table 1. Selected Crystal Data of Lamivudine Maleate and Saccharinate⁸ and Statistic Parameters for Lamivudine Maleate Structure Determination and Refinement

	lamivudine maleate		lamivudine saccharinate ^a
structural formula	$(\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{S})(\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_4)$		$(\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{S})(\text{C}_7\text{H}_4\text{NO}_3\text{S})$
fw	345.33		412.44
cryst syst	orthorhombic		orthorhombic
space group	$P2_12_12_1$		$P2_12_12_1$
<i>Z</i>	4		4
<i>T</i> (K)	298(1)	100(2)	100(2)
unit cell dimensions			
<i>a</i> (Å)	5.4584(3)	5.4130(1)	5.3464(6)
<i>b</i> (Å)	12.8761(8)	12.7870(4)	13.7459(14)
<i>c</i> (Å)	21.816(1)	21.6501(7)	22.738(2)
<i>V</i> (Å ³)	1533.3(2)	1498.53(7)	1671.1(3)
calculated density (Mg/m ³)	1.496	1.531	1.639
absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.252	0.258	0.364
data collection and structure determination			
θ range for data collection (deg)	3.22–25.53	3.19–25.34	
index ranges			
<i>h</i>	–6 to 6	–6 to 6	
<i>k</i>	–15 to 13	–15 to 15	
<i>l</i>	–25 to 25	–26 to 24	
data collected	5,067	16,112	
unique reflections	2,808	2,711	
symmetry factor (<i>R</i> _{int})	0.0621	0.1009	
completeness to θ_{max} (%)	98.6	98.7	
<i>F</i> (000)	720	720	
parameters refined	223	223	
goodness-of-fit on <i>F</i> ²	0.993	1.095	
final <i>R</i> factors for <i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)	<i>R</i> _{<i>I</i>} = 0.0473 <i>wR</i> ₂ = 0.0839	<i>R</i> _{<i>I</i>} = 0.0443 <i>wR</i> ₂ = 0.1101	
<i>R</i> factors for all data	<i>R</i> _{<i>I</i>} = 0.1094 <i>wR</i> ₂ = 0.1378	<i>R</i> _{<i>I</i>} = 0.0534 <i>wR</i> ₂ = 0.1153	
largest diff. peak/hole (<i>e</i> /Å ³)	0.175/–0.220	0.373/–0.290	
absolute structure			
parameter	Flack		
value	0.18(14)	–0.01(11)	
Friedel pairs	1135	1109	

^a The crystal data for lamivudine saccharinate are in the literature⁸ and they were shown for comparison purposes.

face-to-face stacking of the hydrogen-bonded (lamivudine) (lamivudine)⁺ pairs in the presence of maleate and chloride counterions, and isopropanol and water molecules.¹⁷ This noteworthy structure was present with eight neutral lamivudine molecules, eight protonated lamivudine cations, four maleate and four chloride anions, and two isopropanol and eight water molecules per unit cell (monoclinic, $P2_1$).¹⁷

It is notable the capability of lamivudine to cocrystallize with different small molecules. Lamivudine is, without doubt, an attractive API for the comprehension of multicomponent molecular crystal formation in NRTIs. The assembly understanding of this type of molecular crystals is very difficult. Among other things, this includes a full crystal structure prediction and crystal formation control. In this study, we used a rational strategy to design a $P2_12_12_1$ orthorhombic structure of lamivudine with another organic acid. A salt of lamivudine with maleic acid was planned on the basis of lamivudine saccharinate.⁸ Maleic acid is a dicarboxylic acid

extensively used as salt former for synthesis of molecular crystals. With APIs, its use to produce pharmaceutically desired solid state forms is pronounced.^{18–20} A “replacing” of (saccharin)[–] by (maleic acid)[–] has successfully afforded the lamivudine maleate. Furthermore, structural correlations and structure–solubility relationships for lamivudine maleate and saccharinate were accurately established from the comparison of the crystal structures.

Experimental Section

Lamivudine Maleate Preparation. Lamivudine form II was used for synthesis of lamivudine maleate. A lamivudine sample was first analyzed by single crystal and powder X-ray diffraction techniques before solution preparation. Unit cell measurements and X-ray diffractogram comparisons confirmed the authenticity of this sample. Then, an amount of 10 mg of the drug was dissolved in isopropanol (5 mL) under stirring for 5 min on a water bath (308 K). Next, this solution was allowed to cool to room temperature. In this step, maleic acid (5 mg) was then added to the solution.

The resulting mixture was shaken for 5 min at 298 K. All of the salt former was completely soluble. Needles and crystalline aggregates (Figure 1) arose on the bottom of the glass crystallizer after slow evaporation of the solution for 5 days in the dark within a crystal growth room (298 K). Some crystals were powdered and used to measure the melting point of lamivudine maleate (MS Tecnopon PFM II melting point apparatus).

Lamivudine Maleate Structure Determination. A well-grown single crystal ($0.354 \times 0.061 \times 0.051 \text{ mm}^3$) was selected for X-ray diffraction data collecting at room (298 K) and low (100 K) temperatures. For low temperature experiment, a cold N_2 gas blower cryogenic device (Oxford Cryosystem) was used. In the analyses, a Kappa-CCD diffractometer (Enraf-Nonius) was used as follows: Mo $\text{K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), graphite monochromator, φ scans and ω scans with κ offsets, and a 95 mm CCD camera on a κ -goniostat. The X-ray diffraction intensities were processed as follows: data acquisition and scaling with the COLLECT²¹ and the HKL Denzo-Scalepack softwares,²² no absorption correction because the absorption phenomenon was unimportant for lamivudine maleate (Table 1), solving by direct methods of phase retrieval with SHELXS-97²³ within the WinGX²⁴ package of softwares, refinement by full-matrix least-squares on F^2 with SHELXL-97²⁵ within the WinGX,²⁴ constrained positions and fixed isotropic thermal parameters for C—H hydrogen atoms (bond lengths of 0.93, 0.97, and 0.98 $\text{\AA}$ for $\text{C}_{\text{sp}}^2\text{—H}$, $\text{C}_{\text{sp}}^3\text{—H}$ in methylene groups, and $\text{C}_{\text{sp}}^3\text{—H}$ in methine groups, respectively, $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{C})$), localization of N—H, $\text{N}^+\text{—H}$, and O—H hydrogen atoms from the difference Fourier map and free refinement of their positions with fixed isotropic thermal parameters ($U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{N})$ or $1.5U_{\text{eq}}(\text{O})$). After the refinement has been concluded, structure analysis and preparation of artworks were dealt with the MERCURY²⁶ and ORTEP-3²⁷ softwares. The crystallographic information file (CIF file) containing all crystal data (including data collection and processing details, refinement statistics, atomic coordinates, thermal parameters, molecular geometry and conformation, and excluding structure factors) were deposited with the Cambridge Structural Data Base under deposit codes CCDC 739173 and CCDC 739174 for the lamivudine maleate structures determined with the data collected at temperatures of 298 and 100 K, respectively. Free of charge, copies of these files may be solicited from The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK, fax: +44123-336-033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk or <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.

Lamivudine Maleate Purity. The powder X-ray diffraction technique was used to assess the purity of crystalline lamivudine maleate. Samples of crystalline material formed on the bottom of glass crystallizer were finely ground and mounted on a sample holder (a grooved glass slide). A Rigaku Denki powder X-ray diffractometer with geometry θ – 2θ was used as follows: rotating anode X-ray source (Cu $\text{K}\alpha$, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), radiation generator at 50 kV and 100 mA, RINT2000 wide angle goniometer, continuous scan mode, scan axis θ – 2θ , scan speed $1.000^\circ/\text{min}$, data acquisition width and range of 0.20° and 7 – 40° in 2θ , respectively. For comparison with the experimental diffractogram, the theoretical X-ray diffraction pattern of lamivudine maleate was simulated with the PowderCell software²⁸ by inputting the crystallographic information file for the structure determined based on room temperature X-ray diffraction data.

In addition, the lamivudine maleate purity was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis following the USP monograph for lamivudine quantification.²⁹ Prior to injection into the chromatograph, standard lamivudine (see below) and lamivudine maleate samples were dissolved in mobile phase (ammonium acetate solution (0.025 mol/L)/MeOH, 95:5 v/v) at a final concentration of 0.15 mg/mL. The HPLC analysis was performed at $308 \pm 1 \text{ K}$ using a chromatograph (Shimadzu) equipped with a C18 column (LiChrospher RP-18 (Merck) packed column ($100 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, $5 \mu\text{m}$ particle size) combined with a guard column ($10 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$) and SPD-M10Avp diode array detector at 277 nm. The flow rate of mobile phase and the injected volume of each sample were 1.0 mL/min and $20 \mu\text{L}$, respectively.

Lamivudine Maleate Solubility. The equilibrium solubility of lamivudine maleate was measured according to the miniaturized

Figure 2. Maleic acid has a same molecular framework responsible for crystal assembly into a lamivudine saccharinate-like $P2_12_1$ orthorhombic structure.

shake-flask method protocol reported in the literature.³⁰ The assays were performed in triplicate as follows: lamivudine maleate samples were added to reverse-osmosis water ($150 \mu\text{L}$) at room temperature up to observation of surplus undissolved solid material (addition of about 30 mg of lamivudine maleate), shaking at 450 rpm for 24 h at temperature of $299 \pm 2 \text{ K}$, presence of precipitation checked every hour over a total of 8 h after the shaking beginning, filtering through a $0.45 \mu\text{m}$ filter (Millipore) and 5000-fold dilution of filtrate aliquots ($50 \mu\text{L}$), lamivudine quantification by interpolating of spectroscopic measurements from the diluted solutions in a calibration curve whose concentrations ranged from 6 to $18 \mu\text{g/mL}$. For this analysis, a UV–VIS spectrophotometer (Shimadzu) was used at 270 nm, and the standard solutions employed to generate the calibration curve were prepared using a standard material of lamivudine from the Instituto Nacional de Controle de Qualidade, FIOCRUZ (lamivudine purity of $99.55 \pm 0.07 \text{ mol } \%$, which was determined by differential scanning calorimetry according to the ASTM E928 standard specification).

Results and Discussion

Recently, a lamivudine salt was prepared with saccharin.⁸ On the basis of the structure of this salt, we have planned another crystalline modification of lamivudine using a rational approach for its design. First, saccharin is deprotonated in the structure because of a proton transfer from it to lamivudine. Then, a salt former with an acid-ionization constant ($\text{p}K_{\text{a}}$) similar to that of saccharin should be intended because its deprotonation is needed for protonation of lamivudine. Second, each saccharinate fragment is bonded to two lamivudine molecules in the structure through three hydrogen bonds. At last, saccharin is conformationally rigid. As one can presume, the functional hydrogen acceptor groups of saccharinate anion are limited to some positions in the crystal. Therefore, the salt former engineered for replacing of saccharinate anion

within the orthorhombic structure should obey a conformational rigidity around the hydrogen-bonding functionalities. Incredibly, a small molecule very used in pharmaceutical processes for a long time has all these required structural features. It is maleic acid. First, the pK_{a1} of maleic acid is 1.83.³¹ This value is almost equal than that of saccharin, ~ 1.8 ,^{32,33} even though other studies report a pK_a value of 2.2 for saccharin.^{8,34} Although there are differences in the saccharin pK_a values reported, which can be the result of different measurement conditions, it is right to state that the acid strength of saccharin is very similar to that for the first proton ionization of maleic acid since a pK_a value of 1.8 is reported for saccharin. Second, the carboxylate moiety of (maleic acid)[−] has two functional hydrogen acceptor oxygens, while the

carboxyl group has one oxygen atom able to be readily engaged in an intermolecular interaction through hydrogen bonding acceptance from lamivudine. These three oxygens of maleate are spaced as those N^(−) nitrogen, C=O, and S=O oxygens of (saccharin)[−] (Figure 2). Similar to Z-configuration in (maleic acid)[−] setting the COO^(−) and COOH groups in the same side relative to the C=C double bond, the CON^(−) and SO₂ moieties of saccharinate are in a cis orientation relative to the C—C bond bridging the two fused rings. Indeed, the arrangement of the four carbons of (maleic acid)[−] resembles that of the C=O carbon, the two bridge carbons and the sulfur atom of (saccharin)[−]. Likewise, the four oxygen atoms of (maleic acid)[−] are analogously related to the two SO₂ oxygens, the C=O oxygen and the N^(−) nitrogen of (saccharin)[−]. These structural similarities between the salt formers are illustrated in Figure 2. At last, the conformational rigidity found in saccharinate is also present in maleate because of the hydrogen-bonded ring formation and, mainly, the C=C double bond. However, two greater differences between saccharin and maleic acid are notable: the two SO₂ oxygens of (saccharin)[−] are out of the molecule plane and this salt former has a benzene tail fused to the isothiazolidinone-*S,S*-dioxide moiety, whereas all oxygens of (maleic acid)[−] are coplanar to the only four carbons comprising its acyclic chain. Fortunately, lamivudine maleate salt is obtained according to the rational design and these differences were important to establish the structure–solubility relationships.

After the synthesis, the lamivudine maleate structure was determined at room (298 K) and low (100 K) temperatures by

Figure 3. Hydrogen bonding pattern of lamivudine maleate and saccharinate.⁸ The representation of the saccharinate salt was prepared using the VAWPIT CIF file.

Figure 4. Lamivudine and salt former are alternate along the [001] direction. The drawing of the saccharinate salt was prepared using the VAWPIT CIF file.⁸

Figure 5. (a) The $(\text{lamivudine})^+(\text{salt former})^-$ pairs are connected to each other along the [010] direction through hydrogen bonds between the cytosine fragments of lamivudine. (b) The least-squares planes passing through the cytosine rings of lamivudine are more aligned in the saccharinate salt than in the maleate version of the drug because packing forces drive the assembly of cytosine fragments of lamivudine and salt former molecules on a neighboring layer. The illustration of lamivudine saccharinate was prepared using VAWPIT CIF file.⁸

single crystal X-ray diffraction analysis. The X-ray diffraction measurements revealed that unit cell parameters and molecular assembly of lamivudine maleate do not vary significantly with the temperature in this range (Table 1). Therefore, these experiments demonstrate that no solid–solid phase transformation occurs between the evaluated temperatures.

As it was conceivably predicted, lamivudine maleate assembles into a structure whose molecular arrangement is related to that of the saccharinate salt of the drug. Furthermore, the crystallographic unit cell dimensions of lamivudine maleate are similar to the corresponding values of the saccharinate salt (Table 1). This is in agreement with the network similarity of the lamivudine salts. The $\text{N}^{(+)}\text{—H}\cdots\text{O}=\text{C}$ and $\text{N—H}\cdots\text{O}^{(-)}\text{—C}$ hydrogen bonds involving the cytosine ring of the drug and the carboxylate group of $(\text{maleic acid})^-$ mimic the $\text{N}^{(+)}\text{—H}\cdots\text{O}=\text{C}$ and $\text{N—H}\cdots\text{N}^{(-)}\text{—C}$ present in the saccharinate salt (Figure 3). The hydroxymethylene tail of lamivudine is hydrogen-bonded to $(\text{maleic acid})^-$ through $\text{O—H}\cdots\text{O}=\text{C}$ atoms. The carbonyl oxygen of the carboxyl group is a hydrogen acceptor of the anion in this interaction. In lamivudine maleate, this oxygen functions as one of the two SO_2 oxygens of $(\text{saccharin})^-$, which is a hydrogen acceptor in the $\text{O—H}\cdots\text{O}=\text{S}$ hydrogen bonding of lamivudine saccharinate (Figure 3). These aforementioned hydrogen bonds, wherein the $\text{N}^{(+)}\text{—H}$, N—H , and O—H functionalities of the drug are hydrogen donors, assemble alternate molecules of $(\text{lamivudine})^+$ and $(\text{maleic acid})^-$ (or saccharinate) along the [001] direction, giving rise to a zigzag fashioned one-dimensional ribbon (Figure 4). As in the saccharinate salt of the

drug, there is also in the maleate salt structure a $\text{N—H}\cdots\text{O}=\text{C}$ hydrogen bond between the cytosine rings of adjacent lamivudine molecules. These molecules are related by a 2_1 screw axis symmetry along the [010] direction (Figure 5a). Similar to a $\text{S}=\text{O}$ oxygen of $(\text{saccharin})^-$, which is not hydrogen-bonded in the lamivudine saccharinate structure, the hydroxyl oxygen of maleate is not a hydrogen acceptor in the salt.

In the maleate and saccharinate salts, the lamivudine conformation is remarkably similar. In Figure 6, the lamivudine molecules in the maleate and saccharinate salt structures are superimposed in a capped stick fashion to illustrate the conformational similarity for drug fragments in these crystalline modifications. Here, a brief description of the most relevant conformational features of lamivudine molecule in the maleate salt is given. Because the molecular conformations of lamivudine in maleate and saccharinate salts are similar, only structural description of the drug in the novel solid state phase is presented. This lamivudine conformer was inspected from the maleate salt structure determined using X-ray diffraction data collected at low temperature. A more reliable comparison is gotten by analyzing this conformer because the lamivudine saccharinate structure was determined with data collected at 100 K.⁸ Likewise, all values of conformational and geometrical parameters found throughout the text were measured using this structure. The non-hydrogen atoms in the asymmetric unit of lamivudine maleate (at 100 K) are represented as 50% probability thermal displacement ellipsoids in Figure 7. The opposite orientation of the carbonyl oxygen

relative to the oxathiolane ring describes an *anti* conformation of the cytosine fragment ($C2-N1-C1'-O1'$ torsion measures $161.4(2)^\circ$). The five-membered oxathiolane ring adopts a puckering conformation. The sulfur atom is at the flip point of the puckered system. It deviates from the well-fitted least-squares plane passing through the other four cyclic atoms by $0.8415(8)$ Å (the root-mean-square deviation (rmsd) of the four fitted atoms is 0.0431 Å). The sulfur atom is also cis oriented relative to cytosine fragment ($O1'-C1'-C2'-S3'$ dihedral angle measures $37.2(3)^\circ$). This describes a conformation related to the $C3'$ -endo puckering mode that occurs in the canonical nucleosides. Concerning the conformation of the hydroxymethylene tail, the arrangement of the substituents around the methylene sp^3 -hybridized carbon describes an axial orientation of the hydroxyl oxygen, which is also on the same side of cytosine ring relative to the oxathiolane plane ($O1'-C4'-C5'-O5'$ torsion value is $60.4(3)^\circ$).

Even though the crystal assemblies of maleate and saccharine salts of lamivudine are similar, some aspects of packing are different. The intermolecular hydrogen bonding geometry of

Figure 6. Superposition of lamivudine molecules in the maleate (green) and saccharinate (blue) salts. All hydrogen atoms were omitted for drawing clarity.

Figure 7. Crystallographic asymmetric unit of lamivudine maleate. Arbitrary radius spheres and 50% probability ellipsoids draw the hydrogen and non-hydrogen atoms, respectively.

Figure 8. Calculated and room temperature experimental powder X-ray diffractograms of lamivudine maleate. The calculated diffractogram was simulated from the crystal structure determined at 298 K.

Figure 9. The purity of lamivudine maleate was assessed by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The lamivudine form II was used as standard (see Experimental Section). The maleic acid peak could be detected in the lamivudine maleate chromatogram (retention time of ~ 1.5 min).

Table 2. Geometry of Hydrogen Bonds in Lamivudine Maleate and Lamivudine Saccharinate⁸

D—H...A ^a	H...A (Å)		D—H (Å)		D...A (Å)		D—H...A (deg)	
	maleate	saccharinate ^d	maleate	saccharinate	maleate	saccharinate	maleate	saccharinate
N ⁽⁺⁾ —H...O	0.89(4)	0.87(3)	1.80(4)	1.78(3)	2.675(3)	2.644(2)	169(4)	171(2)
N—H...O ⁽⁻⁾ /N ⁽⁻⁾	0.98(4)	0.81(3)	1.85(3)	2.14(3)	2.822(3)	2.946(2)	171(3)	172(3)
N—H...O ^b	0.87(4)	0.89(3)	2.06(4)	1.96(3)	2.789(3)	2.838(2)	141(3)	167(2)
O—H...O ^c	0.79(5)	0.77(3)	1.90(5)	2.17(3)	2.686(3)	2.928(2)	173(5)	170(3)

^a D, hydrogen donor; A, hydrogen acceptor. ^b Symmetry operator: $1 - x, -0.5 + y, 1.5 - z$. ^c Symmetry operator: $1.5 - x, -y, 0.5 + z$. ^d Hydrogen bonding metrics for lamivudine saccharinate were obtained from VAWPIT CIF file.⁸

Figure 10. Hirshfeld surface analysis for maleate and saccharinate anions in the lamivudine salts. Points of fingerprint graphics constructed from Hirshfeld surface data are colored blue (lower proportions of the (d_i, d_e) pair), green (intermediary frequency of the (d_i, d_e) pair) or red (proportion of the (d_i, d_e) pair greater than 0.1% of the surface spots). The d_i internal distance is the shortest separation from the Hirshfeld surface to an atomic nucleus of the fragment taken for surface calculation, whereas d_e is the external distance between the Hirshfeld surface and the nearest atom of a neighboring species within the crystal. Parentheses surround the percentage of the (d_i, d_e) pairs regarding the C...H contacts. The Hirshfeld surface is represented as a map of shape index on the salt former molecules. The sharp spikes correspond to the hydrogen bonding acceptor groups of maleate and saccharinate anions.

lamivudine maleate and saccharinate is displayed in Table 2. The main difference in hydrogen bond metrics for the salt structures is in the directionality of a $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$ contact between the cytosine cores of lamivudine. The angle value of this hydrogen bonding in lamivudine maleate is very less than the corresponding value in the saccharinate salt. These measurements change by $\sim 26^\circ$ (bold in Table 2). Such difference is related to the lesser alignment of cytosine rings in lamivudine maleate. In this salt, the mean planes passing through the cytosine rings of lamivudine molecules connected through $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$ atoms are tilted by $25.05(8)^\circ$, whereas the corresponding bend between cytosine rings in lamivudine saccharinate is $9.57(6)^\circ$ (Figure 5b). The alignment of cytosine planes in lamivudine saccharinate is a consequence of packing forces driving the assembly of the cytosine moieties and the bulkier structure of saccharinate on a neighboring layer. One of the two out-of-plane SO_2 oxygens also contributes to align the pyrimidinone bases in the former structure (Figure 5b). Therefore, the cytosine planes are more bent in lamivudine maleate than in the saccharinate salt structure.

Lamivudine and maleic acid were stoichiometrically crystallized together. The 1:1 stoichiometry and the crystalline purity of this salt were verified by powder X-ray diffraction and high performance liquid chromatography (HPLC) analyses. All peaks in the experimental X-ray diffractogram of powdered samples of crystalline material formed after the crystallization procedure (see Experimental Section) (Figure 8) overlaid to those observed in the simulated X-ray diffractogram from the single crystal structure of lamivudine maleate (data collection at 298 K). Therefore, we can conclude that the

powdered lamivudine maleate product has no extra crystalline phase. Also, since no broad hump from amorphous material was observed the powdered sample is completely crystalline. Moreover, preferred orientation effects were observed in the experimental powder X-ray diffraction pattern of lamivudine maleate. The X-ray diffraction intensities in the simulated and experimental diffractograms were different because of the most intense Bragg (0 2 1) reflection preferred orientation. One species of $(\text{lamivudine})^+$ and one of $(\text{maleic acid})^-$ are present in the crystallographic asymmetric unit of the determined structures. The proposed stoichiometry of the crystal is in agreement with refined unit cell content, which is strengthened by HPLC analysis (Figure 9). From the chromatographic experiment, lamivudine was found to be in 0.699 ± 0.006 g/g of crystalline material. This experimental finding is in accordance with the calculated value for an equimolar stoichiometry of pure lamivudine maleate crystals. This predicted value is 0.667 mg of lamivudine/g of lamivudine maleate. Adopting an equimolarity of the maleate salt, a relative purity of $104.8 \pm 0.8\%$ was found for the obtained crystalline material.

The thermodynamic solubility of lamivudine maleate was evaluated in this study. The structure-solubility relationships were established for the lamivudine salts based on the maleate and saccharinate salt structures. The meaningful determination of correlations between crystal structure and solid state properties has been a challenge in the crystal engineering research field.⁸ Progress on the understanding of the main factors influencing salt dissolution has been succeeded.³⁵ For instance, it is known that the water solubility of six amine salts

Figure 11. Hirshfeld surface analysis for the lamivudine salts and (lamivudine)⁺ cations. Point coloring scheme of the fingerprint graphics is detailed in Figure 10 caption. Maps of shape index are on the Hirshfeld surface calculated for the lamivudine fragments in the salts. Prominent sharp spikes of plots refer to classical hydrogen bonds. The upper and lower spikes are related to hydrogen bonding donor and acceptor groups, respectively.

of the anti-inflammatory drug flurbiprofen is strongly related to melting point, while no correlation between solubility and amine cation hydrophilicity is observed.³⁶ Recently, the anti-convulsant drug lamotrigine was crystallized with some dicarboxylic acids (succinic acid, fumaric acid, DL-tartaric acid) and saccharin.³⁷ In this study, the water solubility of the salts was only associated with the solubility of salt formers, although the solubility of some dicarboxylate salts could be rationalized on the basis of crystal packing features because they were isostructural. Despite the lamotrigine saccharinate crystals were not suitable for single-crystal X-ray diffraction analysis, its structure is expected to be different from that of the dicarboxylate salts.³⁷ In agreement with our results in which *Z*-configured maleic acid forms a salt with lamivudine whose structure is resembled that of the saccharinate salt of the drug, *E*-configuration in fumaric acid and the higher flexibility of succinic acid and tartaric acid that configures a trans conformation of the carboxylate groups with respect to the central carbon chain are responsible for different positioning of their hydrogen bonding functionalities than that of saccharinate anion. Therefore, this explains the differences between lamotrigine saccharinate and crystal structures of dicarboxylate salts of the drug. Regarding the lamivudine salts, this paper means an advance in an understanding of their structure-solubility correlations. The lamivudine saccharinate solubility of 10.56 mg/mL is reported in the literature.⁸ The free base of the drug, which is incorporated into clinical formulations, is more soluble than lamivudine

saccharinate. Its solubility is about 70 mg/mL. Therefore, the solubility of lamivudine maleate was expected to be less than that of the pharmaceutically preferred solid phase of lamivudine (form II) because the maleate salt was structurally planned from the saccharinate salt of lamivudine. The crystal lattice stability of lamivudine maleate and saccharinate should be comparable. In agreement with the solubility behavior prediction, we have found a solubility value of 45 ± 3 mg/mL for lamivudine maleate. Interestingly, the lamivudine maleate is more soluble than the saccharinate version of the drug. Furthermore, melting temperatures of the maleate and saccharinate versions of the drug indicate that the lattice energy of the lamivudine salts can be correlated to solubility. A melting point of 144 °C was measured for lamivudine maleate, while the melting temperature of 182.3 is reported for lamivudine saccharinate.⁸ In this way, a lower melting point of lamivudine maleate is in agreement with its higher solubility when compared to lamivudine saccharinate. This reveals that the crystal lattice energies of the lamivudine salts play a relevant role in their solubilities. Despite lamivudine maleate and lamivudine saccharinate are structurally similar, lipophilicity and water solubility of the anions are quite different. The anion (saccharin)[−] has a benzene core fused to the isothiazolidinone-*S,S*-dioxide moiety. So, lipophilicity of (saccharin)[−] is higher than that of (maleic acid)[−]. Aqueous solubility values reflect the lipophilic character of the anions. Saccharin solubility is 4 mg/mL in water, while the corresponding measurement for maleic acid is 441 mg/mL.³⁸

This notable difference in water solubility of the salt formers indicates that their ionic forms should also have different solvation energies. Therefore, solvation thermodynamics also plays a significant role in the solubility of the lamivudine salts because of different properties of the anions. Solubility behavior of lamivudine maleate and lamivudine saccharinate can be also understood as a consequence of the unfavorable directionality of the $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$ hydrogen bond between the cytosine rings of lamivudine in the maleate salt. This decreases the stabilization of lamivudine maleate when compared to the saccharinate salt. Therefore, the higher solubility of lamivudine maleate is rationalized. It is important to highlight that the directionality gain in lamivudine saccharinate is from the alignment of cytosine planes caused by packing driven forces. Indeed, the comparison between maleic acid and saccharin reveals that other structural features of (saccharin)[−] are related to lower solubility of its salt with lamivudine. Once three suitably spaced hydrogen bonding acceptors are present in a salt former, the $P2_12_12_1$ orthorhombic structure of lamivudine is assembled because hydrogen bonds can be formed in the structures. Although these molecular motifs are required, further groups can be attached to the crystallophore (claimed here as being a molecular framework of a salt former or cocrystallizing agent owning the least structural requisites responsible for the self-assembly of a structurally defined multicomponent molecular crystal, in analogy to pharmacophore definition in medicinal chemistry). Unlike maleic acid, saccharin has a fused benzene ring that helps stabilize the lamivudine saccharinate structure through weak contacts other than classical hydrogen bonds. There are interactions of the $\text{C}-\text{H}\cdots\text{C}$ type between the benzene portions of (saccharin)[−] in the lamivudine salt. Contacts of this type are present with a considerable proportion of the two-dimensional Hirshfeld fingerprint plot³⁹ for (saccharin)[−] in the API salt, whereas they have a minor importance in the corresponding graphic for (maleic acid)[−] (Figure 10). These contacts contribute to support the differences in lattice energy of the lamivudine salts, which helps rationalize the higher lattice energy of lamivudine saccharinate and, therefore, its lower solubility with respect to lamivudine maleate. In this way, weak contacts play a fine-tuning role in the lamivudine salt solubilities since strong hydrogen bonds are primarily responsible for the crystal assembly. Furthermore, intermolecular contact patterns of the drug are resembled in these salts. In Figure 11, the Hirshfeld surface analysis for (lamivudine)⁺ cations in both salt structures graphically illustrates the previous observation. The fingerprint graphics constructed from the Hirshfeld surface data for lamivudine fragments in maleate and saccharinate salts are practically identical. Hirshfeld surface graphically describes assembling patterns because this crystal property is calculated from intermolecular interactions present in crystal structures. At last, the hydrophobicity of (saccharin)[−] is increased when compared to (maleic acid)[−], rationalizing the lower solubility of lamivudine saccharinate because its solvation in aqueous medium is less favorable than that of lamivudine maleate.

Conclusion

The understanding of multicomponent molecular crystal assembly has been a challenge in the crystal engineering research field for a long time. Complete crystal structure prediction and crystal formation control are very difficult. In this sense, this paper means important advances because an

API salt was successfully designed using a rational approach for the salt former choice. Chemical aspects of salt formers and crystal assembly features were taken into account for selection of maleic acid to assemble into a predicted $P2_12_12_1$ orthorhombic structure with lamivudine. Acid-ionization constant, arrangement of hydrogen bonding functionalities and conformational features were considered for selection of the salt former. A rationally designed crystal synthesis and the establishment of structure–property relationships are some advantages of this strategy. The unfavorable directionality of hydrogen bonds could be related to an increased solubility of lamivudine maleate when compared to the saccharinate version of the drug. Here, we anticipate that multicomponent molecular crystals comprising lamivudine and other salt formers possessing the molecular framework responsible for crystal assembly can be engineered successfully. At last, the inventive and nonobvious characters of rationally synthesized API salts surely will lead to an easier legal procedure for protection of intellectual property rights.

Acknowledgment. We thank Dr. Altivo Pitaluga Jr. (Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) for the gift of lamivudine samples. Rudy Bonfilio and Prof. Ph.D. Magali B. de Araújo from the Centro de Equivalência Farmacêutica (Núcleo de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal de Alfenas, CEFAR-NCQ/UNIFAL-MG) are also acknowledged for assistance in high performance liquid chromatography analysis and solubility measurements. We thank the Brazilian Research Council CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant 2007/07185-5) for research fellowships (A.C.D., J.E., and F.T.M.). We also thank FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, APQ-2011-5.02/07, APQ-6010-5.02/07, APQ-02685-09) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant PNP2008) for financial support.

Supporting Information Available: Crystallographic information in CIF format. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Lu, J.; Wang, X.-J.; Yang, X.; Ching, C.-B. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 1590–1598.
- (2) Grant, D. J. W. In *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*; Brittain, H. G., Ed.; Dekker: New York, 1999; Vol. 95, pp 1–33.
- (3) Bond, A. D. *CrystEngComm* **2007**, *9*, 833–834.
- (4) Lara-Ochoa, F.; Espinosa-Pérez, G. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 1213–1215.
- (5) Miroshnyk, I.; Mirza, S.; Sandlert, N. *Expert Opin. Drug Delivery* **2009**, *6*, 333–341.
- (6) Almarsson, Ö.; Zaworotko, M. J. *Chem. Commun.* **2004**, 1889–1896.
- (7) Cheney, M. L.; McManus, G. J.; Perman, J. A.; Wang, Z.; Zaworotko, M. J. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 616–617.
- (8) Banerjee, R.; Bhatt, P. M.; Ravindra, N. V.; Desiraju, G. R. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 2299–2309.
- (9) Bhatt, P. M.; Azim, Y.; Thakur, T. S.; Desiraju, G. R. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 951–957.
- (10) Greene, W. C.; Debyser, Z.; Ikeda, Y.; Freed, E. O.; Stephens, E.; Yonemoto, W.; Buckheit, R. W.; Este, J. A.; Cihlar, T. *Antiviral Res.* **2008**, *80*, 251–265.
- (11) Coates, J. A.; Cammack, N.; Jenkinson, H. J.; Mutton, I. M.; Pearson, B. A.; Storer, R.; Cameron, J. M.; Penn, C. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 202–205.
- (12) Belleau, B.; Nguyen-Ba, N. U.S. Patent US5047407, October 9, 1991.

- (13) Chang, C. N.; Skalskiv, V.; Zhou, J. H.; Cheng, Y. C. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22414–22420.
- (14) Harris, R. K.; Yeung, R. R.; Lamont, R. B.; Lancaster, R. W.; Lynn, S. M.; Staniforth, S. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 2653–2659.
- (15) Jozwiakowski, M. J.; Nguyen, N. T.; Sisco, J. M.; Spancake, C. W. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 193–199.
- (16) Singh, G. P.; Srivastava, D.; Saini, M. B.; Upadhyay, P. R. Int. Patent WO2007119248, October 25, 2007.
- (17) Martins, F. T.; Doriguetto, A. C.; Ellena, J. *Cryst. Growth Des.* [Online early access]. DOI: 10.1021/cg901103r. Published Online October 15, 2009.
- (18) Takahashi, S.; Inoue, K.; Yanagida, Y.; Ohashi, T.; Watanabe, K. European Patent EP215335, March 25, 1987.
- (19) Eswaraiah, S.; Reddy, G. M.; Reddy, J. M.; Rambabu, K. V.; Bhaskar, B. V. U. S. Patent US2007004783, January 4, 2007.
- (20) Hu, M.; Paliwal, S.; Shih, N.; Guenter, F.; Mergelsberg, I. International Patent WO2007114922, October 11, 2007.
- (21) *COLLECT Data Collection Software*; Nonius: Delft, The Netherlands, 1998.
- (22) Otwinowski, Z.; Minor, W. In *Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography, Part A*; Carter, C. W., Jr., Sweet, R. M., Eds.; Academic Press: New York, 1997; Vol. 276, pp 307–326.
- (23) Sheldrick, G. M. *SHELXS-97: Program for Crystal Structure Resolution*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.
- (24) Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837–838.
- (25) Sheldrick, G. M. *SHELXL-97: Program for Crystal Structure Analysis*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.
- (26) Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Edgington, P. R.; Kessler, M. K.; Macrae, C. F.; McCabe, P.; Pearson, J.; Taylor, R. *Acta Crystallogr., Sect. B* **2002**, *58*, 389–397.
- (27) Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.
- (28) Kraus, W.; Nolze, G. *PowderCell for Windows*, version 2.3; Federal Institute for Materials Research and Testing: Berlin, Germany, 1999.
- (29) *The United States Pharmacopeia XXXI and National Formulary XXVI*; The United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2008; pp 2498–2499.
- (30) Glomme, A.; Marz, J.; Dressman, J. B. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 1–16.
- (31) Kroner, M.; Schornick, G.; Feindt, H.; Meyer, T.; Ludwig, A.; Metzmann, U. U. S. Patent US5830985, November 3, 1998.
- (32) Kütt, A.; Leito, I.; Kaljurand, I.; Sooväli, L.; Vlasov, V. M.; Yagupolskii, L. M.; Koppel, I. A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2829–2838.
- (33) Dossi, N.; Toniolo, R.; Susmel, S.; Pizzariello, A.; Bontempelli, G. *Chromatographia* **2006**, *63*, 557–562.
- (34) Cooke, C. L.; Davey, R. J. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 3483–3485.
- (35) Serajuddin, A. T. M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 603–616.
- (36) Anderson, B. D.; Conradi, R. A. *J. Pharm. Sci.* **1985**, *74*, 815–820.
- (37) Galcera, J.; Molins, E. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 327–334.
- (38) Lide, D. R., Ed. In *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition (Internet Version 2009): Aqueous Solubility and Henry's Law Constants of Organic Compounds, Section 8*; CRC Press/Taylor and Francis: Boca Raton, FL, 2009.
- (39) McKinnon, J. J.; Spackman, M. A.; Mitchell, A. S. *Acta Crystallogr., Sect. B* **2004**, *60*, 627–668.

From Rational Design of Drug Crystals to Understanding of Nucleic Acid Structures: Lamivudine Duplex

Felipe T. Martins,[†] Antônio C. Doriguetto,[§] and Javier Ellena^{*,†}

[†]Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos, São Paulo, Brazil, and [§]Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva 700, 37130-000 Alfenas, Minas Gerais, Brazil

Received September 9, 2009

ABSTRACT: A DNA-like duplex of nucleosides is probable to exist even without the 5'-phosphate groups needed to assemble the chain backbone. However, double-stranded helical structures of nucleosides are unknown. Here, we report a duplex of nucleoside analogs that is spontaneously assembled due to stacking of the neutral and protonated molecules of lamivudine, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NTRI) widely used in anti-HIV drug combinatory medication. The left-handed lamivudine duplex has features similar to those of *i*-motif DNA, as the face-to-face base stacking and the helix rise per base pair. Furthermore, the protonation pattern on alternate bases expected for a DNA-like duplex stabilized by pairing of neutral and protonated cytosine fragments was observed for the first time in the lamivudine double-stranded helix. This structure demonstrates that hydrogen bonds can substitute for covalent phosphodiester linkage in the stabilization of the duplex backbone. This interesting example of spontaneous molecular self-organization indicates that the 5'-phosphate group could not be a requirement for duplex assembly.

Introduction

Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) are first-line drugs in the treatment of AIDS. Lamivudine, β -L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC), is one of the most commonly used NTRIs in the anti-HIV drug combinatory medication that is preferred over single-drug therapies.¹ It is also used in clinical treatment for hepatitis B virus (HBV) infection.² This drug is a 2',3'-dideoxygenated cytidine analog with a sulfur atom in place of the methylene group at the 3' position of the sugar ring. This alteration in the sugar ring creates an oxathiolane system, which forms an unusual β -L-stereochemistry in lamivudine.³

A recent study in the crystal engineering research field demonstrated that neutral and cationic lamivudine fragments can pair through their cytosine rings⁴ in a hydrogen bonding pattern related to that of the C–C⁺ base pair of *i*-motif DNA.^{5–9} The *i*-motif of DNA comprises two intercalated parallel duplexes assembled by hemiprotonated C–C⁺ base pairs, giving rise to a four-stranded structure in which each individual duplex exhibits an antiparallel orientation relative to the other double-stranded fiber.⁵ Three hydrogen bonds between the neutral and protonated cytosine fragments are responsible for both the 3TC–3TC⁺ pairing in the cocrystal of the drug with 3,5-dinitrosalicylate⁴ and the C–C⁺ of *i*-motif DNA (Figure 1a).⁵ Given the structural similarities between the hemiprotonated C–C⁺ base pair of *i*-motif DNA and the lamivudine dimer formed by positively charged and neutral molecules, we were interested to know whether this NRTI could adopt a DNA-like duplex structure by properly stacking the pairs. One might assume that formation of a double-stranded helix by common nucleosides or their analogs in isolation is probable even without the phosphate groups that make up the covalent backbone of alternating

phosphate and pentose residues. A DNA-like lamivudine structure seems noteworthy because this drug is a 2',3'-dideoxynucleoside derivative, missing the 3' hydroxyl substituent that would covalently bond to the (lacking) phosphate moiety of the adjacent monomer in the strand. Furthermore, counterions could contribute to stabilize individual strands of lamivudine through noncovalent interactions. However, no DNA-like double helix structure in which each hydrogen-bonded pair of nucleosides is helically stacked on the top of one another has been reported, although they could provide insights into the physical basis of DNA structure assembly.

We have devoted a great deal of effort to obtain a structure in which the lamivudine could be self-assembled into a DNA-like duplex without phosphodiester linkages by stacking the 3TC–3TC⁺ pairs in a helical fashion. Based on crystal engineering studies,^{4,10} numerous solvent systems and various cocrystallizing agents were screened before the suitable conditions for crystallization of lamivudine duplex were found. Our first attempts to synthesize such a structure using only simple inorganic acids such as hydrochloric and phosphoric acid failed. Next, solvents and organic acids were employed in the synthesis strategy. We have successfully obtained a structure of lamivudine in which the 3TC–3TC⁺ dimers are arranged into a double helix. Hydrogen-bonding contacts involving counterions and solvent molecules play the role of the missing 5'-phosphate groups.

Experimental Section

Synthesis of the Lamivudine–Lamivudine⁺ Helix. Lamivudine was weighed (10 mg) and dissolved in isopropanol (5 mL) by heating the mixture at 308 K in a water bath under slow stirring for 5 min. The newly prepared solution was cooled to 298 K by incubation at room temperature, and a solution of maleic acid (1 mg in 250 μ L of 280 mM HCl) was then added to it. The mixture was shaken at 298 K for 5 min and then kept standing for 7 days in the dark within a crystal growth apparatus at room temperature. The external symmetry of these crystals can be viewed in Figure 2, a scanning electron

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: javiere@ifsc.usp.br. Phone: +55 16 3373 8096. Fax: +55 16 3373 9881.

Figure 1. (a) Cytosine base pairing of *i*-motif DNA and lamivudine duplex and (b) transparent surface rendering and stick representation of lamivudine duplex. Lamivudine molecules of 2.5 unit cells are shown. The structure is self-assembled along the *b* axis. One full helical turn (lamivudine molecules of one unit cell) is highlighted. The hydrogen atoms were hidden for clarity. The puckering modes of the oxathiolane rings are relative to the fundamental nucleotides. Panel (c) shows a side view (ball-and-stick and surface drawings) of the structure in which major and minor grooves of similar depth are highlighted. On the bottom of the panel, one strand is green colored and represented as a surface rendering to illustrate the pairing responsible for the assembly of the lamivudine double-stranded helix. Lamivudine molecules of 1.5 unit cells are shown. Base stacking of the 3TC–3TC⁺ (left) and C–C⁺ (right) pairs viewed (d) along and (e) perpendicular to the helix axis of lamivudine duplex and d(C₄) *i*-motif DNA⁶ (PDB code 190d), respectively. Hydrogens and phosphates of the d(C₄) fragment were hidden in the drawing (e), and the arrows indicate the face-to-face orientation of each base pair in relation to one another. Panel (f) shows a top view of lamivudine duplex along the *b* axis. The helical radii relative to the outermost hydroxyl groups are shown. Water and isopropanol molecules and chloride and maleate anions interact with (g) the hydroxymethylene branches of lamivudine, playing the role of the missing 5'-phosphate groups in stabilizing the duplex through the fiber periphery and the amino groups of the drug in (h) the major and (i) the minor grooves. Note the helical disposition of the solvents and anions in the grooves. Lamivudine molecules of 1.5 unit cells are shown.

Figure 2. Crystals of the lamivudine double-stranded helix. Scale bar: 100 μm .

micrograph acquired using a LEO 435 VP microscope at 15 kV accelerating voltage, after the crystals were coated with colloidal gold in a SCD-040 Ion Sputter Balzer device.

Structure Determination of the Lamivudine–Lamivudine⁺ Helix. A crystal measuring $0.48 \times 0.21 \times 0.18 \text{ mm}^3$ was selected for X-ray diffraction experiments at room ($298 \pm 1 \text{ K}$) and low ($150.0 \pm 0.2 \text{ K}$) temperatures using an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer. In the case of low-temperature data collection, a cold N_2 gas blower

cryogenic device (Oxford Cryosystem, Oxford) was employed to freeze the crystal. The Mo K α beam ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) from a sealed Mo tube was generated at 55 kV and 33 mA, and the resulting radiation was monochromatically filtered with graphite before it was passed through the crystal. The data collection geometry was strategically calculated by setting φ scans and ω scans with κ offsets, and a CCD camera of 95 mm was the detector on a κ -goniostat. The COLLECT program was used for monitoring the diffraction frame acquisition.¹¹ To deal with raw data, the HKL Denzo-Scalepack software package was used.¹²

Room-temperature X-ray diffraction data were used to solve a structure with some atoms distributed over at least two occupancy sites. Refinements adopting a split position atom model of this structure did not converge easily. Furthermore, they were very unstable and showed high correlation parameters. Fortunately, refinement of the structure on the basis of the low-temperature Bragg reflections converged more easily, giving satisfactory *R*-factors. Based on the low-temperature data, lower correlations between the refined atomic displacement parameters (ADPs) and site occupancy factors (SOFs) were achieved, and the split atom approach allowed the precise positioning of the atomic fractions. For this reason, only the structure determined using the low-temperature intensities is presented, although the room-temperature experiment conclusively demonstrates that no solid–solid phase transformation occurs between these temperatures because the cell parameters determined for lamivudine helix at low and room temperatures are similar.

The structure of the lamivudine helix was solved crystallographically using the direct methods of phase retrieval with SIR2004,¹³ locating all of the C, N, O, S, and Cl atoms of the asymmetric unit from the electronic density map generated by Fourier synthesis. The starting model was refined by a full-matrix least-squares based on F^2 with SHELXL-97,¹⁴ using anisotropic thermal displacement parameters for non-hydrogen atoms. Except for the hydrogen atoms of water molecules, those bonded to lamivudine, maleate, and isopropanol fragments were fixed in stereochemically predicted positions. However, both N–H protons of 3TC⁺ and O–H hydrogen atoms of 3TC, 3TC⁺, maleate, and isopropanol molecules were first localized from the difference Fourier map so that they were ideally positioned for covalent bonding to the corresponding nitrogen and oxygen atoms. The constrained interatomic distances were 0.93 Å (C_{sp²}–H), 0.97 Å (C_{sp³}–H in methylene groups without disordered occupancy sites of hydrogen atoms), 0.96 Å (C_{sp³}–H in methylene and methyl groups with disordered occupancy sites of hydrogen atoms), 0.98 Å (C_{sp³}–H in methine groups), 0.82 Å (O–H), and 0.86 Å (N–H). Similarly, hydrogen atoms of water molecules were fixed in positions located from the difference map, constraining their fractional coordinates during refinements. Concerning the hydrogen vibration model, the isotropic thermal displacement parameter of hydrogen atoms covalently bonded to nitrogen and carbon, except those of the methyl branches, was fixed to a value 20% greater than the equivalent isotropic parameter of the corresponding atom, whereas this percentage was set to 50% for hydrogen atoms bonded to oxygens and the isopropanol methyl groups.

Furthermore, five of the eight crystallographically independent lamivudine molecules (labeled as molecules A–H) in the asymmetric unit of the helix structure showed disordered sites for some of their atoms. For clarity, the atom labels ending in “a” correspond to lamivudine molecule A, those ending in “b” refer to molecule B, and so on. Four independent lamivudine molecules (B, D, E, F) were refined by splitting the oxygen and hydrogen atoms of their hydroxyl groups over two positions: the atomic fractions labeled as O5'b–H5'Ob, O5'd–H5'Od, O5'e–H5'Oe, and O5'f–H5'Of had a constrained 60% major site occupancy, whereas the atomic fractions labeled as O5'b'–H5'Ob', O5'd'–H5'Od', O5'e'–H5'Oe', and O5'f'–H5'Of' filled extra sites with a fixed 40% occupancy value. The methylene carbon atoms directly bonded to these hydroxyl groups were also expected to be disordered over two positions because the different conformational modes would affect the whole hydroxymethylene branches and not just the hydroxyl groups. Despite trial refinements constraining the primary site occupancy of these carbon atoms to 50%, extra occupancy sites were not found for the carbons C5'b, C5'd, C5'e, and C5'f. These methylene carbon atoms were not disordered due to the two occupancy sites of the hydroxyl oxygen atom oriented toward two of three surrounding bonding positions of the methylene carbon, excluding that of the C–C bond. This means the spatial arrangement of ligands on each methylene carbon only assumes a staggered conformation with three positions where two methylene hydrogen atoms and a disordered hydroxyl oxygen are attached. Therefore, neither rotation on the C–C bond axis nor slight displacements over two positions were observed for such methylene groups. To agree with this conformational model, we proposed that a methylene hydrogen atom filled two occupancy sites positioned toward those of the hydroxyl oxygen. Each disordered site of a split methylene hydrogen atom had an occupancy value equal to that of the opposite site filled with a hydroxyl group. The hydrogen atom fractions labeled as H5'xb, H5'xd, H5'xe, and H5'xf are in the constrained 60% occupancy major sites, whereas those labeled as H5'zb, H5'zd, H5'ze, and H5'zf filled the fixed 40% occupancy extra sites. The methylene hydrogen atoms labeled H5'yb, H5'yd, H5'ye, and H5'yf were not disordered over two occupancy positions in the lamivudine molecules B, D, E, and F, respectively. Finally, the lamivudine molecule A showed disordered positions for the methylene carbon and sulfur atoms of the five-membered oxathiolane ring. The sulfur atom and the methylene group were modeled over two positions constrained to 60% occupancy for the major sites (atomic fractions S3'a, C2'a, H2'xa, and H2'ya) and 40% occupancy for the extra positions (S3'a', C2'a', H2'xa', and H2'ya'). The methyl

branches of solvent isopropanol were refined as ideally disordered ones, with two 50% occupancy positions for each hydrogen atom. Crystal structure representations were prepared using MERCURY¹⁵ and CHIMERA¹⁶ softwares.

All data regarding the lamivudine double-stranded helix structure determination, except the structure factors, were deposited with the Cambridge Structural Data Base as a crystallographic information file (.cif file) under the code CCDC 734743. Copies of these files may be retrieved free of charge from The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK, fax +44123–336–033, e-mail deposit@ccdc.cam.ac.uk or <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.

Results and Discussion

Eight lamivudine conformers are found in the helix structure (Figure 1b). Four of them are protonated (labeled lamivudine A, D, E, and H) and the other four are neutral lamivudine fragments (labeled lamivudine B, C, F, and G). The pyrimidine-derived bases are present with an anti conformation relative to the oxathiolane system, similarly to cytidine residues of *i*-motif DNA.^{5–8} A conformation resembling the C2'-endo of canonical nucleotides is observed for lamivudine molecules B, C, and D. The lamivudine units E, F, G, and H adopt an oxathiolane conformation similar to the C3'-endo puckering that occurs in the β -2'-deoxy-D-ribofuranose of cytidine in DNA. The lamivudine molecule A has two different modes of puckering in the oxathiolane ring, resembling the C3'-endo and C3'-exo puckered sugars. Disordered lamivudine molecules are also found in the crystal structure of lamivudine form I,¹⁷ a 0.2-hydrate crystallizing in the $P2_12_12_1$ space group, because there are two modes of puckering in the five-membered ring similar to those of the conformer A present in lamivudine duplex. In the crystal structure of the oligonucleotide d(CCCC),⁶ which is suitable for comparisons to lamivudine duplex because both structures are stabilized by hydrogen bonds between neutral and protonated cytosine fragments, the C4'-exo and C3'-endo pucker prevail in this *i*-motif DNA, although the C2'-endo puckering occurs in several sugar residues.

Similarly to lamivudine duplex, most cytidine sugars are present with the C3'-endo puckering mode in d(ACCCT), which is another *i*-motif DNA.⁸ The conformation of the hydroxymethylene branch is also different for lamivudine molecules assembled into the double-stranded helical structure. The arrangement of the hydroxyl oxygen and methylene hydrogen atoms around the methylene sp³-hybridized carbon helps to describe the hydroxymethylene conformation. On the positioning of these substituents attached to the methylene carbon, some questions make the description of hydroxymethylene conformation straightforward. These questions include the following: (1) With the oxathiolane plane taken as a reference, is a substituent in the axial position opposite the cytosine fragment? (2) Is the hydroxyl oxygen in the axial position? (3) If this oxygen atom is in an equatorial position, is it opposite the sulfur atom? Concerning the lamivudine A, the hydroxyl oxygen is in the equatorial position opposite the sulfur atom. At the same time, one of the two hydrogen atoms of the methylene group is in the axial position opposite the amino-pyrimidinone base. In lamivudine B, the hydroxyl group is disordered over two occupancy sites. The hydroxyl oxygens filling the major occupancy site (60%) are in the axial position on the same side of cytosine ring. The other hydroxyl oxygens (occupancy value of 40%) are in the equatorial position that is *cis* oriented relative to the sulfur atom of lamivudine unit B. In contrast, the hydroxyl oxygen of molecule C is in the equatorial position opposite the sulfur atom.

Table 1. Relevant Torsion Angles (deg) and Related Conformational Parameters of the Lamivudine Conformers Present in the Lamivudine Duplex

conformer	torsion					
	O1'–C1'–N1–C2	conformation ^a	O1'–C1'–C2'–S3'	conformation ^b	O1'–C4'–C5'–O5'	conformation ^c
A	156.9(4)	anti	26(1) ^d –23(1) ^e	C3'-endo C3'-exo	–6(1)	equatorial trans
B	143.6(4)	anti	–43.6(5)	C2'-endo	65.1(7) ^f –166.4(8) ^g	axial cis equatorial cis
C	154.9(4)	anti	–48.0(4)	C2'-endo	–59.0(7)	equatorial trans
D	147.9(4)	anti	–42.6(5)	C2'-endo	–171.4(5) ^f –61(1) ^g	equatorial cis equatorial trans
E	163.1(4)	anti	36.0(4)	C3'-endo	–172.5(5) ^f 64.2(7) ^g	equatorial cis axial cis
F	154.5(4)	anti	33.3(4)	C3'-endo	65.8(5) ^f –179.9(5) ^g	axial cis equatorial cis
G	156.6(4)	anti	33.4(4)	C3'-endo	63.3(6)	axial cis
H	160.5(4)	anti	32.5(4)	C3'-endo	176.3(3)	equatorial cis

^a Conformation of the cytosine base relative to the oxathiolane ring. ^b Puckered conformation of a oxathiolane ring compared with that in the fundamental nucleotides. ^c Conformation of the hydroxymethylene branch where the hydroxyl oxygen is either cis or trans oriented relative to the sulfur atom (when in an equatorial position) and the amino-pyrimidinone group (when in the axial position). ^d The fractions of the C2'a and S3'a atoms are in the major 60% occupancy sites. ^e The fractions of the C2'a' and S3'a' atoms are in the minor 40% occupancy sites. ^f The fraction of the O5' atom is in the major 60% occupancy site. ^g The fraction of the O5' atom is in the minor 40% occupancy site.

The axial position, in which there is a methylene hydrogen, is on the same side of the cytosine fragment of molecules C and D. In the last lamivudine conformer, the atomic fractions of the disordered hydroxyl oxygen are in the two equatorial positions. These two oxygen fractions are on the same (60% major occupancy) and opposite (40% minor occupancy) sides of the sulfur atom. Regarding molecules E and F, their hydroxyl groups also occupy two positions. In these conformers, one of the two hydroxyl oxygen fractions is in the equatorial position, on the same side of the sulfur atom. The other oxygen fraction is oriented axially relative to the cytosine ring. However, the major occupancy site (60%) for the oxygen fraction of molecule E is in the above-mentioned equatorial position, whereas the corresponding hydroxyl oxygen fraction of molecule F is in the axial position. In molecules G and H, the substituent in the axial position is *cis* located relative to the cytosine fragment. This substituent is a hydroxyl oxygen in molecule G and one of the two methylene hydrogen atoms in conformer H. The hydroxyl oxygen of the lamivudine H is equatorially placed on the same side of the sulfur atom. The most relevant torsion angles describing the conformation of lamivudine conformers and the crystal data are given in Tables 1 and 2, respectively. A scanning electronic micrograph of the lamivudine duplex crystals is displayed in Figure 2.

Four 3TC–3TC⁺ base pairs give rise to one-half of a helical turn. The occurrence of eight lamivudine pairs spaced 3.2 Å apart in each entire turn of the lamivudine duplex measuring about 25.6 Å (Figure 1b,c) revealed that the helix rise per base pair is similar to the stacking distance in *i*-motif DNA (3.0–3.2 Å).^{6–8} The least-squares plane of the lamivudine pairs is slightly bent by about 3° relative to the helical axis. Constraint of base pair tilts is also reported for *i*-motif DNA structures.^{5,6} According to the labeling of lamivudine conformers, the base pairing occurs between the units A and B (Figure 3), C and D (Figure 4), E and F (Figure 5), and G and H (Figure 6). If we take the average of these four lamivudine pairs, the distances between the hydrogen bonding donors and acceptors of the two peripheral N–H_(3TC⁺)···O_(3TC) and N–H_(3TC)···O_(3TC⁺) and the central N⁺–H···N hydrogen bonds measure 2.77(4), 2.89(5), and 2.83(1) Å, respectively. These measurements are slightly different than those of *i*-motif DNA. In the crystal structures of the d(CCCC)⁶ and d(CCCT)⁷ C-rich strands of *i*-motif DNA, which form

Table 2. Crystal Data of the Lamivudine Helix at Room and Low Temperatures and Statistics for Structure Determination and Refinement

lamivudine double helix			
temp (K)		298 ± 1	150.0 ± 0.2
unit cell dimensions	<i>a</i> (Å)	14.2817(5)	14.2219(2)
	<i>b</i> (Å)	26.0361(6)	25.6079(3)
	<i>c</i> (Å)	15.1994(5)	15.1754(2)
	β (deg)	117.3968(12)	117.4652(5)
volume (Å ³)		5017.9(3)	4903.9(1)
calcd density (g cm ^{−3})		1.501	1.538
data collected		38 282	64 288
θ range for data		2.96–25.35	2.97–25.42
collection (deg)			
index ranges	<i>h</i>	−16 to 16	−17 to 17
	<i>k</i>	−30 to 31	−30 to 30
	<i>l</i>	−18 to 15	−18 to 18
unique reflns		17 481	17 829
symmetry factor (<i>R</i> _{int})		0.1041	0.0952
completeness to $\theta_{\max}$		96.6%	98.6%
unit cell content		8(C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S)- 8(C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₃ S)- 4(C ₄ H ₃ O ₄)2(C ₃ - H ₈ O)8(H ₂ O)4Cl	
3TC–3TC ⁺ pairs per helix turn		8	
crystal system		monoclinic	
space group		<i>P</i> 2 ₁	
Refinement (low temp)			
abs. coeff. (mm ^{−1})		0.335	
abs. correction method		Gaussian	
	<i>T</i> _{min}	0.884	
	<i>T</i> _{max}	0.964	
<i>F</i> (000)		2380	
params refined		1367	
goodness-of-fit on <i>F</i> ²		1.103	
final <i>R</i> factors for <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)		<i>R</i> 1 = 0.0587, w <i>R</i> 2 = 0.1518	
<i>R</i> factors for all data		<i>R</i> 1 = 0.0789, w <i>R</i> 2 = 0.1719	
largest diff. peak/hole (e Å ^{−3})		0.778/−0.670	
absolute structure	factor	Fleck parameter	
	refined	0.05(5)	
	data	8686 Friedel pairs	

intercalated parallel duplexes held together by hemiprotonated C–C⁺ base pairs, the two hydrogen-bonding distances between the exocyclic amino and carbonyl groups are similar. On average, the N···O distances measure 2.75(10) and 2.77(8) Å in d(CCCC)⁶ and d(CCCT),⁷ respectively, while the mean N⁺···N distance of the central hydrogen bond is 2.76(8) Å in d(CCCC)⁶ and 2.74(8) Å in d(CCCT).⁷ The

Figure 3. Hydrogen-bonding pattern of the lamivudine conformers A and B found in the double helix structure. The hydrogen atoms were drawn in a capped stick fashion, and thermal ellipsoids at the 30% probability level represent the other atoms. Green sticks are used to depict the lamivudine molecules on a neighboring duplex, which interact with the hydroxymethylene branch of a conformer in the framed pair whose atoms are represented as 30% probability ellipsoids. Only the labels of the atoms involved in hydrogen bonds are shown. Italic superscript lower-case letters *m* and *e* refer to the fractions of atoms disordered over two positions in the main (60% S.O.F.) and extra (40% S.O.F.) occupancy sites, respectively. Slightly highlighted ellipsoids represent carbon, oxygen, and sulfur atom fractions in the minor 40% occupancy sites.

Figure 4. Hydrogen bonds of the lamivudine conformers C and D assembling the double helix structure. For drawing details, see the caption of Figure 3.

dimers $A \equiv B$, $C \equiv D$, $E \equiv F$, and $G \equiv H$ are stacked face-to-face on top of each other in this order. Here, two important parallels are established between lamivudine duplex and *i*-motif DNA quadruplexes. First, the positive charge is disordered within the $C-C^+$ pairs of *i*-motif DNA due to transfer of the imino proton from one strand to the other (Figure 1a).^{5,6} Contrarily, protonated and neutral cytosine fragments are alternated into each strand of lamivudine duplex. When describing the tetrameric structure of *i*-motif DNA, Gehring and co-workers⁵ anticipated that the protonation on alternate cytosine bases would be preferred in a duplex structure over the proton movement occurring in a quadruplex because the distance between charged cytosines should be maximized. In agreement with this hypothesis, lamivudine duplex is present with protonated cytosine fragments alternately placed into each strand. This confirms that a duplex held together by pairing of protonated and neutral cytosine rings has their imino protons fixed on alternate bases. Second, lamivudine duplex and *i*-motif DNA are highly related concerning the stacking of their building blocks. Each cytosine base pair is stacked face-

to-face with its neighbor in both the lamivudine duplex and the *i*-motif DNA quadruplex structures (Figure 1d,e).⁵ In *i*-motif DNA, this is a consequence of intercalating two parallel duplexes in which each double-stranded structure is antiparallel relative to one another. Lamivudine duplex demonstrates that face-to-face stacking can also occur in a double-stranded helix held together by hemiprotonated cytosine–cytosine base pairing. Similar to Z-DNA, the lamivudine double helix structure is infinitely left-handed, and there is not another helical orientation except that. On the other hand, C-rich four-stranded structures of *i*-motif DNA are slightly right-handed.^{6–8} Major and minor grooves resembling those of B-DNA were apparent on the surface of the lamivudine double helix (Figure 1c). Shapes of the lamivudine duplex grooves differ from those of *i*-motif DNA. In the C-rich quadruplex stabilized by hemiprotonated $C-C^+$ pairs, very wide grooves are created on two sides and very narrow grooves are at its ends,^{6,8} while major and minor grooves of similar depth occur in lamivudine duplex. Furthermore, different helical radii are measured for the outermost hydroxyl groups of lamivudine

Figure 5. The conformers E and F present in the lamivudine duplex are hydrogen-bonded in the periphery of the fiber through the hydroxyl groups and in the major and minor grooves through the amine moieties. For drawing details, see the caption of Figure 3.

Figure 6. Scheme of hydrogen bonds of the lamivudine conformers G and H that compose the double-stranded helical structure. The hydrogen atoms were depicted as white sticks. The thermal ellipsoids at the 30% probability level represent the other atoms. Only the labels of the atoms engaged in hydrogen bonds were displayed.

units (Figure 1f), with distances of 11.8(2), 10.7(1), 9.4(1), and 9.2(1) Å from the helix center up to the hydroxyl oxygen atoms of lamivudine molecules H, B, E, and C, respectively. Chloride and partially ionized maleate anions are present in the duplex with the lamivudine pairs. Isopropanol and water molecules also crystallized in the structure. Noncovalent interactions play a crucial role in the stabilization of the lamivudine double helix (see in sequence). Other intermolecular contacts than base–base interactions contribute to the stabilization of the lamivudine duplex structure in the fiber periphery (Figure 1g). In the grooves of the helical structure, there are hydrogen bonds between the amino groups of all lamivudine subunits with hydrogen bond acceptors outside of the fiber backbone. Among the anions and solvents surrounding

the grooves of the double helix structure, maleate and water molecules lie in the major groove (Figure 1h). Chloride anions, water, and maleate molecules lie in the minor groove of the helix surface (Figure 1i). Crystal structure analysis reveals that water molecules are hydrogen bonded to the amino groups of cytidine through their hydrogens, which are not involved in the C–C⁺ pairing of *i*-motif DNA.⁶ Resembling the lamivudine duplex structure, water molecules also surround the wide grooves of *i*-motif DNA. However, the minor grooves of lamivudine duplex are more hydrated than the narrow grooves of *i*-motif DNA, in which water molecules stay near phosphate groups.⁶ Regarding the hydration pattern of lamivudine in their reported crystalline modifications, form I¹⁷ (a 0.2-hydrate, see above), form III¹⁸ (a 0.5-hydrate),

and the cocrystals with zidovudine⁴ and 3,5-dinitrosalicylic acid⁴ are stabilized through hydrogen bonds between water molecules and the cytosine rings of the drug. Likewise, this was observed in lamivudine duplex. On the other hand, form II,¹⁷ the saccharinate salt¹⁰ and the cocrystal with 4-quinolinone⁴ are anhydrous phases of lamivudine that form layered structures. Base stacking gives rise to layers in lamivudine duplex. However, neither determined crystalline phase of lamivudine has a structure similar to that of lamivudine duplex in which the hydrogen-bonded 3TC–3TC⁺ pairs are helically stacked on top of each other.

The hydroxyl groups of all lamivudine conformers are involved in hydrogen bonds. One of the two crystallographically independent molecules of maleate (labeled maleate A) is the hydrogen acceptor in three hydrogen bonds in which the hydroxyl groups of the conformers A, B, and H are hydrogen donors. In the case of molecule B, the hydroxyl group in the major 60% occupancy site is the hydrogen donor to maleate A, whereas the remaining fraction in the 40% occupancy site is involved in a hydrogen bond with a 3TC–3TC⁺ pair of a neighboring lamivudine double helix. In the crystal, the hydroxymethylene branch of lamivudine unit B lies in the major groove of an adjacent duplex structure (Figure 7a). Thus, the positional disorder of the hydroxyl group of this conformer seems to be a result of the close packing of the two double-stranded helices. The hydrogen donation occurs from the extra part of the hydroxyl group to the carbonyl oxygen of a molecule C cytosine fragment. In this way, the hydrogen bond acceptor group of one of the three hydrogen bonds responsible for the C≡D pairing also interacts with a lamivudine molecule in an adjacent layer of another double helix structure. This observation allows us to state that the center groups pairing the cytosine fragments also can weakly bond to molecules accommodated in the major groove. The lamivudine H is also the hydrogen acceptor of a water molecule. Two water molecules interact with the main 60% occupancy hydroxyl group of the lamivudine molecule D through hydrogen bonds. One of these water molecules is the hydrogen acceptor from the disordered hydroxyl portion. The other is the hydrogen donor to the hydroxyl oxygen in the major occupancy position. The molecule D hydroxyl oxygens in the position with 40% occupancy are hydrogen-bonded to the lamivudine C on another double-stranded helix in the crystal. The hydroxyl group of molecule C acts as a hydrogen donor to the disordered hydroxyl oxygen of molecule D (Figure 7b). Another water molecule is the hydrogen acceptor for the high occupancy (60%) hydroxyl group of lamivudine E. The lower occupancy (40%) hydroxyl of lamivudine E interacts with the main hydroxyl group fraction of the lamivudine conformer F (Figure 7c). The high occupancy (60%) hydroxyl group of molecule F contributes to structural stabilization through two hydrogen bonds. In one of them, it is a hydrogen acceptor for the disordered hydroxyl group of molecule E. In the other hydrogen bond, it is a hydrogen donor to one chloride anion (Figure 5). Another chloride anion is hydrogen-bonded to the hydroxyl group of lamivudine G. In the case of molecule F, the fraction of the hydroxyl moiety in the minor occupancy site (40%) is also a hydrogen bond donor to the same chloride anion that interacts with the corresponding fraction in the 60% occupancy position. Therefore, the disorder in the hydroxyl group can be explained by the fact that both hydroxyl group conformations are equivalent in terms of orientation of the hydrogen bonds with one chloride anion (see also Table 3). However, the hydroxyl oxygens in the minor

Figure 7. The hydroxyl oxygen and hydrogen atoms of some lamivudine conformers were disordered over two positions because the neighboring double-stranded helices were very close together in the crystal. (a) The hydroxyl groups in the 40% occupancy site of the lamivudine conformer B lie in the major groove, where they interact with a C≡D pair through one hydrogen bond. (b) The hydroxyl groups in the 40% occupancy site of the lamivudine molecule D are hydrogen-bonded to the corresponding groups of conformer C on a neighboring double-stranded helix. (c) The hydroxyl groups in the 40% and 60% occupancy sites of the lamivudine conformers E and F, respectively, connect two adjacent helices through a hydrogen bond.

Table 3. Hydrogen Bond Geometry in the Lamivudine Double-Stranded Helix

interaction	D—H...A ^a	D—H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D—H...A (deg)
A≡B pairing	N _{4a} —H _{4Nxa} ...O _{2b}	0.86	1.88	2.738(5)	176
	N _{3a} ⁺ —H _{3a} ...N _{3b}	0.86	1.95	2.810(6)	173
	N _{4b} —H _{4Nxb} ...O _{2a}	0.86	2.08	2.928(5)	169
C≡D pairing	N _{4c} —H _{4Nxc} ...O _{2d}	0.86	1.98	2.834(5)	170
	N _{3d} ⁺ —H _{3d} ...N _{3c}	0.86	1.98	2.832(6)	170
	N _{4d} —H _{4Nxd} ...O _{2c}	0.86	1.93	2.787(5)	173
E≡F pairing	N _{4e} —H _{4Nxe} ...O _{2f}	0.86	1.96	2.814(6)	175
	N _{3e} ⁺ —H _{3e} ...N _{3f}	0.86	1.98	2.829(7)	172
	N _{4f} —H _{4Nxf} ...O _{2e}	0.86	2.00	2.858(6)	176
G≡H pairing	N _{4g} —H _{4Nxg} ...O _{2h}	0.86	2.06	2.920(6)	174
	N _{3h} ⁺ —H _{3h} ...N _{3g}	0.86	1.98	2.836(7)	173
	N _{4h} —H _{4Nhx} ...O _{2g}	0.86	1.88	2.737(6)	178
duplex—duplex					
OH _(extra) (B)—C≡D	O _{5'b} —H _{5'Ob} ...O _{2c}	0.82	2.72	3.299(7)	129
OH(C)—OH _(extra) (D)	O _{5'c} —H _{5'Oc} ...O _{5'd}	0.82	2.15	2.957(8)	168
OH _(extra) (E)—OH(F)	O _{5'e} —H _{5'Oe} ...O _{5'f}	0.82	1.53	1.90(1)	104
duplex—maleate					
OH(A)—maleate(A)	O _{5'a} —H _{5'Oa} ...O _{4yMa}	0.82	2.61	3.30(1)	143
OH(B)—maleate(A)	O _{5'b} —H _{5'Ob} ...O _{4yMa}	0.82	2.36	2.61(1)	98
NH ₂ (F)—maleate(B)	N _{4f} —H _{4Nyf} ...O _{1xMb}	0.86	1.99	2.842(6)	172
NH ₂ (G)—maleate(A)	N _{4g} —H _{4Nyg} ...O _{4yMa}	0.86	2.23	3.053(6)	160
OH(H)—maleate(A)	O _{5'h} —H _{5'Oh} ...O _{4xMa}	0.82	1.93	2.725(6)	164
NH ₂ (H)—maleate(A)	N _{4h} —H _{4Nyh} ...O _{1yMa}	0.86	2.18	3.014(6)	165
duplex—water					
NH ₂ (A)—H ₂ O	N _{4a} —H _{4Nya} ...O _{2w}	0.86	1.98	2.817(7)	163
NH ₂ (D)—H ₂ O	N _{4d} —H _{4Ny d} ...O _{3w}	0.86	2.01	2.834(7)	161
OH(D)—H ₂ O	O _{5'd} —H _{5'Od} ...O _{4w}	0.82	2.06	2.846(10)	160
H ₂ O—OH(D)	O _{1w} —H _{2w} ...O _{5'd}	0.84	2.15	2.972(9)	163
NH ₂ (E)—H ₂ O	N _{4e} —H _{4Nye} ...O _{1w}	0.86	2.11	2.942(6)	162
OH(E)—H ₂ O	O _{5'e} —H _{5'Oe} ...O _{3w}	0.82	2.24	2.871(8)	134
H ₂ O—OH _(extra) (F)	O _{1w} —H _{2w} ...O _{5'f}	0.84	2.33	2.80(1)	115
H ₂ O—OH(H)	O _{2w} —H _{4w} ...O _{5'h}	0.85	1.98	2.786(6)	157
duplex—chloride					
NH ₂ (B)—Cl [−]	N _{4b} —H _{4Ny b} ...Cl ₁	0.86	2.55	3.374(5)	161
NH ₂ (C)—Cl [−]	N _{4c} —H _{4Nyc} ...Cl ₂	0.86	2.49	3.304(5)	158
OH(F)—Cl [−]	O _{5'f} —H _{5'Of} ...Cl ₂	0.82	2.40	3.111(5)	146
OH _(extra) (F)—Cl [−]	O _{5'f} —H _{5'Of} ...Cl ₂	0.82	2.27	3.061(7)	163
OH(G)—Cl [−]	O _{5'g} —H _{5'Og} ...Cl ₁	0.82	2.35	3.144(4)	163
water—maleate	O _{1w} —H _{1w} ...O _{1xMa}	0.84	1.99	2.796(6)	161
water—chloride	O _{2w} —H _{3w} ...Cl ₁	0.84	2.39	3.123(5)	146
	O _{3w} —H _{5w} ...Cl ₁	0.84	2.37	3.196(4)	168
	O _{3w} —H _{6w} ...Cl ₂	0.84	2.23	3.074(5)	177
	O _{4w} —H _{7w} ...Cl ₂	0.88	2.38	3.130(6)	144
isopropanol—maleate	O _{2IA} —H _{2OIA} ...O _{4xMb}	0.82	1.88	2.668(11)	162
maleate _(intramolecular)	O _{4yMa} —H _{4OMa} ...O _{1yMa}	0.82	1.61	2.426(6)	177
	O _{4yMb} —H _{4OMb} ...O _{1yMb}	0.82	1.62	2.429(6)	169

^aD indicates hydrogen donor; A indicates hydrogen acceptor.

occupancy site act as hydrogen bond acceptors for a water molecule in a hydrogen bond that is less geometrically oriented than that of the hydroxyl oxygens in the main occupancy site that form a hydrogen bond with lamivudine molecule E. At last, the amine groups of the lamivudine subunits are hydrogen-bonded to two crystallographically independent maleate anions labeled A (lamivudine G and H) and B (lamivudine F), chloride anions (lamivudine B and C), and water molecules (lamivudine A, D and E). The amine hydrogen atoms of cytosine fragments that are not involved in the hydrogen bonds responsible for the 3TC–3TC⁺ pairing were involved in these hydrogen bonds.

Conclusions

The assembly of the lamivudine double helix structure is an interesting example of spontaneous molecular self-organization. Similarly, the self-association of guanosine 5'-monophosphate (5'-GMP) occurs in a neutral solution, giving rise to a

right-handed quadruple helix of just one canonical nucleotide.¹⁹ However, here we report a double-stranded helical structure of a nucleoside analog in the solid state for the first time. Stacking and hydrogen-bonding interactions between the cytosine bases of lamivudine were the decisive forces responsible for this interesting structural organization in which alternating neutral and protonated lamivudine conformers are placed into each helical strand. Other contacts such as hydrogen bonds involving duplex–duplex, duplex–anion (chloride and maleate), and duplex–water interactions were also important for the molecular assembly. The occurrence of the lamivudine double helix structure indicates that the 5'-phosphate group could not be a requirement for duplex assembly. Hydrogen bonds can play the role of covalent phosphodiester linkages in stabilizing the duplex. In summary, the expected protonation pattern on alternate bases was demonstrated for a DNA-like duplex stabilized by pairing of neutral and protonated cytosine fragments. Indeed, lamivudine duplex exhibits other similarities to *i*-motif DNA than the

self-assembly of the hemiprotonated cytosine–cytosine base pairs into multimeric helical structures, such as the face-to-face stacking of the cytosine rings and the helix rise per base pair. Last, we believe that this study provides insights into the understanding of DNA structure assembly.

Acknowledgment. We thank Altivo Pitaluga, Jr. (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil), for the gift of lamivudine samples. We thank the Brazilian Research Council CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant 2007/07185-5) for research fellowships (A.C.D., J.E., and F.T.M.). We also thank FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Grants APQ-2011-5.02/07, APQ-6010-5.02/07, APQ-02685-09) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant PNP2008) for financial support.

Supporting Information Available: Crystallographic information in CIF format. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) (a) Coates, J. A.; Cammack, N.; Jenkinson, H. J.; Jowett, A. J.; Jowett, M. I.; Pearson, B. A.; Penn, C. R.; Rouse, P. L.; Viner, K. C.; Cameron, J. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 733–739. (b) Kukhanova, M.; Liu, S. H.; Mozzherin, D.; Lin, T. S.; Chu, C. K.; Cheng, Y. C. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23055–23059.
- (2) Chang, C. N.; Doong, S. L.; Zhou, J. H.; Beach, J. W.; Jeong, L. S.; Chu, C. K.; Tsai, C. H.; Cheng, Y. C.; Liotta, D.; Schinazi, R. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13938–13942.
- (3) (a) Feng, J. Y.; Shi, J.; Schinazi, R. F.; Anderson, K. S. *FASEB J.* **1999**, *13*, 1511–1517. (b) Rezende, L. F.; Drosopoulos, W. C.; Prasad, V. R. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3066–3072. (c) Sarafianos, S. G.; Das, K.; Clark, A. D., Jr.; Ding, J.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H.; Arnold, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 10027–10032.
- (4) Bhatt, P. M.; Azim, Y.; Thakur, T. S.; Desiraju, G. R. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 951–957.
- (5) Gehring, K.; Leroy, J. L.; Gueron, M. *Nature* **1993**, *363*, 561–565.
- (6) Chen, L.; Cai, L.; Zhang, X.; Rich, A. *Biochemistry* **1994**, *33*, 13540–13546.
- (7) Kang, C. H.; Berger, I.; Lockshin, C.; Ratliff, R.; Moyzis, R.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 11636–11640.
- (8) Weil, J.; Min, T.; Yang, C.; Wang, S.; Sutherland, C.; Sinha, N.; Kang, C. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1999**, *55*, 422–429.
- (9) (a) Mergny, J. L.; Lacroix, L.; Han, X.; Leroy, J. L.; Helene, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8887–8898. (b) Singh, S.; Hosur, R. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12637–12638. (c) Leroy, J. L. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4127–4134.
- (10) Banerjee, R.; Bhatt, P. M.; Ravindra, N. V.; Desiraju, G. R. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 2299–2309.
- (11) *COLLECT Data Collection Software*; Nonius: Delft, 1998.
- (12) Otwinowski, Z.; Minor, W. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
- (13) Burla, M. C.; Caliandro, R.; Camalli, M.; Carrozzini, B.; Casciaro, G. L.; De Caro, L.; Giacovazzo, C.; Polidori, G.; Spagna, R. *J. Appl. Crystallogr.* **2005**, *38*, 381–388.
- (14) Sheldrick, G. M. *SHELXL-97: Program for Crystal Structure Analysis*; University of Göttingen: Göttingen, 1997.
- (15) Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Edgington, P. R.; Kessler, M. K.; Macrae, C. F.; McCabe, P.; Pearson, J.; Taylor, R. *Acta Crystallogr., Sect. B* **2002**, *58*, 389–397.
- (16) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- (17) Harris, R. K.; Yeung, R. R.; Lamont, R. B.; Lancaster, R. W.; Lynn, S. M.; Staniforth, S. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 2653–2659.
- (18) Singh, G. P.; Srivastava, D.; Saini, M. B.; Upadhyay, P. R. International Publication No. WO2007119248, October 25 **2007**.
- (19) Wu, G.; Kwan, I. C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3180–3182.

Solvothermal Preparation of Drug Crystals: Didanosine

Felipe T. Martins,[†] Alexandre O. Legendre,[‡] Sara B. Honorato,[§] Alejandro P. Ayala,[§]
Antônio C. Doriguetto,[‡] and Javier Ellena^{*,†}[†]*Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970, São Carlos, São Paulo, Brazil,* [‡]*Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva 714, 37130-000, Alfenas, Minas Gerais, Brazil,* and [§]*Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, CP 6030, 60455-970, Fortaleza, Ceará, Brazil*

Received December 18, 2009; Revised Manuscript Received February 9, 2010

ABSTRACT: For the first time, crystals of suitable size for X-ray diffractometry structure determination of an important anti-HIV drug were prepared under solvothermal conditions. In this study, the crystal structure of didanosine (2',3'-dideoxyinosine, ddI) in the form of a hydrate was determined using single-crystal X-ray diffractometry. Powder X-ray diffraction analysis revealed that the solid-state phase of the drug incorporated into pharmaceutical solid dosage forms is isostructural to the solvothermally prepared ddI material, even though they do not exhibit an identical chemical composition due to different water fractions occupying hydrophobic channels formed within the crystal lattice. Two ddI conformers are present in the structure, in agreement with a previous structure elucidation attempt. Concerning the keto–enol equilibrium of ddI, our crystal data and vibrational characterizations by Fourier transform infrared (FTIR) and FT-Raman spectroscopy techniques were conclusive to state that both conformers exist in the keto form, contrary to solid-state NMR spectroscopic assignments that suggested ddI molecules occur as enol tautomers. In addition, characterizations by thermal (differential scanning calorimetry) and spectroscopic techniques allowed us to understand the structural similarities and the differences related to the hydration pattern of the nonstoichiometric hydrates.

Introduction

Although the solid-state polymorphism of drugs is a crucial issue in pharmaceutical sciences since crystalline modifications of an active pharmaceutical ingredient (API) may have different physical, chemical, and pharmacological behaviors,¹ many APIs have been not investigated in terms of their solid-state architectures and properties. In this respect, the single-crystal X-ray diffraction technique proved to be an extremely powerful tool that allows for the knowledge of structures at the molecular level. With such structural knowledge, the understanding and even the prediction of several solid-state properties such as solubility, melting point, density, physical/chemical stability, and dissolution rate become somewhat easier. However, crystals of unsuitable size and twinned crystalline specimens are common obstacles in determining solid-state structures of drugs by single-crystal X-ray diffractometry.^{1c} In general, structural characterizations of pharmaceutical solids might include either single-crystal X-ray diffraction analysis whether adequate crystals can be easily prepared² or powder X-ray diffraction investigations, thermal, and spectroscopic analyses if no suitable crystals are available to perform a structure determination experiment. Although crystal structure solution from powder X-ray diffraction data is still a challenge, this is an alternative method to determine the crystal structure of small molecules if no single crystal is available.^{1f}

For a long time, solvothermal techniques have been successfully employed as a useful tool to synthesize inorganic materials and metal–organic composites.³ More recently, the pharmaceutical industry has used solvothermal approaches to

produce drug nanoparticles and layered metal oxides for controlled release of APIs,⁴ and chemical constituents are extracted from plant materials under solvothermal conditions.⁵ However, solvothermal approaches are not explored for issues of polymorphism in pharmaceutical solids.

Didanosine (2',3'-dideoxyinosine or ddI - Figure 1) is an anti-AIDS inosine derivative in which its β -D-ribofuranosyl ring is 2',3'-dideoxygenated. Some ddI properties are unfavorable from a pharmacokinetic point of view. These include the tendency of ddI to hydrolyze at the stomach pH, its low oral bioavailability, and its very short biological half-life.⁶ To improve these functional properties, a conceivable strategy consists of addressing solid-state properties of the drug, as for instance preparing a crystal form with a desirable solubility and dissolution rate.⁷ Thus far, no reports are currently found in the literature on the solid-state characterization of ddI, although its use as an active ingredient of pharmaceutical oral solid dosage forms comes from 1991. Moreover, few studies dealing with ddI polymorphism are reported.⁸

Here, we report a crystal structure of ddI for the first time. Crystals of ddI in a solid-state phase isostructural to that used in medicine production but with different water content were prepared using solvothermal techniques, and the structure was solved by single-crystal X-ray diffractometry. Specifically, crystals of a ddI hydrate were solvothermally prepared. Besides the first structure determination of ddI, powder X-ray diffraction, thermal and vibrational analyses of both commercial and recrystallized ddI materials were performed, allowing us to approach qualitatively the hydration pattern of the nonstoichiometric ddI hydrates.

Experimental Section

Solvothermal Preparation of ddI crystals. Commercial ddI material was weighed (1 mg) and added to isopropanol (5 mL) at room

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: javiere@ifsc.usp.br. Phone: +55 16 3373 8096. Fax: +55 16 3373 9881.

Figure 1. Chemical structure of ddI. For atom labeling, see Figure 5.

temperature. The mixture was transferred to a Teflon-lined stainless-steel autoclave and then heated under solvothermal conditions. Solvothermal conditions consisted of heating the mixture at 100 °C under autogenerated pressure for 12 h. After the mixture was allowed to slowly cool to room temperature, colorless extremely thin plates formed on the bottom of the glass crystallizer as aggregates. After solvent evaporation that took about 3 days at room temperature, one specimen measuring $0.15 \times 0.10 \times 0.02 \text{ mm}^3$ was selected for the single-crystal X-ray diffraction experiment. Since most crystals seem to be twinned by optical microscopy inspection, because thin plates grew close to each other, the selected crystal was one clear rectangular edge plate of larger dimensions that could be individually isolated.

Scanning Electron Microscopy of ddI Crystals. Crystals of ddI were laid on stubs previously covered with conductive carbon tape and then a colloidal gold layer (20 nm) was deposited on them using a SCD-040 Ion Sputter Balzer device. Next, a LEO 435 VP scanning electron microscope at 20 kV accelerating voltage and 16 mm working distance was used to capture scanning micrographs of ddI crystals.

X-ray Diffraction of the ddI Single-Crystal. First, the unit cell parameters of the selected ddI crystal were determined at room temperature ($a = 7.39(3) \text{ \AA}$, $b = 10.28(4) \text{ \AA}$, $c = 14.40(4) \text{ \AA}$; $\beta = 94.0(2)^\circ$). For this purpose, 10 X-ray diffraction frames were acquired with the COLLECT⁹ software (φ scans of 1° , ω and κ offsets, 31 mm detector distance, and X-ray beam exposure time of 40 s per frame), and 216 found peaks were used to index the unit cell with the HKL Denzo-Scalepack package of software.¹⁰ However, low intensity reflections at medium resolution were observed at this temperature as a result of the small dimensions of the crystal, which would lead to a nonsatisfactory small-molecule structure determination. Therefore, low temperature X-ray diffraction intensities were collected at 100 K using an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer (graphite monochromated $\text{MoK}\alpha$ X-ray beam with $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, φ scans and ω scans with κ offsets, 95 mm CCD detector on a κ -goniostat) equipped with a cold N_2 gas blower cryogenic apparatus (Oxford Cryosystem). It is important to note that no solid–solid phase transition occurs between room temperature and 100 K, although there is a crystal lattice contraction upon decreasing temperature to 100 K. The X-ray diffraction data were processed as follows: data acquisition, indexing, integration and scaling with the COLLECT⁹ and the HKL Denzo-Scalepack softwares,¹⁰ the final unit cell parameters on all reflections, no absorption correction ($\mu = 0.114 \text{ mm}^{-1}$), solving by direct methods of phase retrieval with SHELXS-97¹¹ within the WinGX,¹² merge of Friedel pairs before refinement (Flack parameter was not refined), refinement by full-matrix least-squares on F^2 with SHELXL-97¹³ also within the WinGX,¹² constrained positions and fixed isotropic thermal parameters for C–H hydrogen atoms (bond distances of 0.93 Å, 0.97 Å, and 0.98 Å for $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{—H}$, $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{—H}$ in methylene groups and $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{—H}$ in methine groups, respectively, $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{C})$), assignment of N–H and O–H hydrogen atoms directly from the difference Fourier map and free refinement of their positions with fixed isotropic thermal parameters ($U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{N})$ or $1.5U_{\text{eq}}(\text{O})$). Structural analysis and drawings were made using the MERCURY,¹⁴ ORTEP-3,¹⁵ and CHIMERA¹⁶ softwares. The crystallographic information file (CIF file) loading all crystal data of ddI structure determination was deposited with the Cambridge Structural Data Base under the deposit code CCDC 758495. Free of charge, copies of these files may be solicited from The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK, fax: +44123–336–033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk or http: www.ccdc.cam.ac.uk.

Figure 2. (a) Teflon-lined stainless steel autoclave used for the solvothermal preparation of (b) ddI crystals suitably sized for X-ray diffraction structure determination. Bar on the scanning electron micrograph: 25 μm .

X-ray Diffractometry of Powdered ddI Materials. Powder X-ray diffractograms of commercial ddI and solvothermally recrystallized material thereof (hereinafter ddI hydrate) were recorded at room temperature (298 K) using a Rigaku Denki diffractometer ($\text{CuK}\alpha$ line from a rotating anode X-ray source with $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, 50 kV and 100 mA generator settings, RINT2000 wide angle goniometer, continuous scan mode, $1.000^\circ/\text{min}$ scan speed, 0.020° sampling width, θ – 2θ scan axis, 5 – 40° 2θ -range). The samples were ground before they were laid on a sample holder (grooved glass slide).

Thermal Analysis of ddI Materials. Differential scanning calorimetry (DSC) studies were carried out on a Netzsch DSC 204 F1 Phoenix CC 200 F1 apparatus using the following conditions: dynamic nitrogen atmosphere at 20 mL/min flow rate, $5^\circ\text{C}/\text{min}$ heating rate, sealed aluminum crucibles for the samples and reference, pierced crucible lids, sample masses of about 5 mg and 15 min of purge to remove the air from the samples before starting the experiments.

Vibrational Spectroscopic Analysis of ddI Materials. Fourier transform infrared (FTIR) spectra and Fourier transform Raman (FT-Raman) spectra were recorded at a spectral resolution of 4 cm^{-1} using a Bruker VERTEX 70 FTIR/FT-Raman spectrometer. Samples of the commercial ddI and ddI hydrate were analyzed by the FTIR transmission technique as KBr pellets prepared using a hydraulic press (mixtures comprising 200 mg of KBr and 1 mg of sample). For FT-Raman analysis, the samples were directly mounted on aluminum sample holders and the spectra were acquired using a liquid nitrogen-cooled Ge detector by accumulating 906 scans per spectrum with a Nd:YAG laser power of 200 mW (1064 nm excitation line).

Results and Discussion

Despite ddI being an important anti-HIV drug clinically used in AIDS treatment, no crystal structure is reported in the literature. Likewise, no entry for this API is found in the Cambridge Structural Database (CSD,¹⁷ version 5.30 of November 2008 with last November 2009 update). For the first time, a crystal structure of ddI in the form of a hydrate was determined. The habit of ddI hydrate is shown in Figure 2. A summary of the crystal data and structure refinement parameters for ddI is presented in Table 1.

There is an excellent agreement between the powder X-ray diffractogram of the commercial ddI sample and the simulated Bragg peaks from the crystal structure determined in this study (Figure 3a). Moreover, preferred orientation effects were observed in the experimental powder X-ray diffractogram of the ddI hydrate sample (Figure 3b). There are differences between the X-ray diffraction intensities in the simulated and experimental diffractograms of ddI hydrate because preferred orientation of the Bragg (0 1 0) and (0 0 2) reflections occurs. In the ddI hydrate diffractogram, these two reflections are observed as X-ray diffraction peaks at 9.2° and 12.6° (in 2θ), respectively. The corresponding Bragg lines simulated from the crystal structure lie at the same positions

Table 1. Crystal Data and Structure Determination Statistics for ddI Hydrate

empirical formula	(C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃)(H ₂ O) _{0.125}
formula weight	238.24
temperature	100(2) K
wavelength [Å]	0.71073
crystal system	monoclinic
space group	P2 ₁
unit cell dimensions	$a = 7.277(1) \text{ Å}$ $b = 10.052(2) \text{ Å}$ $c = 14.476(3) \text{ Å}$ $\beta = 93.71(1)^\circ$
volume	1056.7(3) Å ³
Z	4
calculated crystal density	1.497 Mg/m ³
$F(000)$	500
θ -range for data acquisition	3.06–25.62°
index ranges	$-8 \leq h \leq 8, -12 \leq k \leq 12, -17 \leq l \leq 17$
reflections collected	3915
independent reflections	2090 [R(int) = 0.0541]
completeness to $\theta_{\max}$	99.0%
data/restraints/parameters	2090/1/328
goodness-of-fit on F^2	1.040
final R indices for $I > 2\sigma(I)$	$R_1 = 0.0583, wR_2 = 0.1269$
R indices for all data	$R_1 = 0.0945, wR_2 = 0.1456$
largest diff peak and hole	0.165 and $-0.236 \text{ (e Å}^{-3}\text{)}$

Figure 3. Comparison between the powder X-ray diffractogram simulated from the ddI hydrate crystal structure (vertical bars) and experimental ones of the (a) commercial and (b) ddI hydrate samples.

observed in the experimental diffractogram of ddI hydrate, but these theoretical lines are expected to have very low intensity since the simulation from the crystal structure does not take into account the preferred orientation effects common in powder X-ray diffraction experiments.

The ddI crystal structure could be assigned to the solid-state phase incorporated into pharmaceutical oral solid dosage forms. However, commercial ddI and ddI hydrate do not have equal composition in terms of water content, which was concluded on the basis of thermal and spectroscopic analyses. Commercial ddI differs from ddI hydrate by the water content. Indeed, these samples are nonstoichiometric hydrates. Thermal and spectroscopy investigations were decisive to establish qualitatively the water role in the differentiation of the solvatomorphs. Our results from DSC, FTIR, and FT-Raman analyses are presented in sequence.

In the crystal structure of ddI, one-dimensional ribbons are formed parallel to the b axis (Figure 4). Along this axis, hypoxanthine fragments of ddI are hydrogen bonded through

the N–H···N atoms. These N–H···N hydrogen bonded molecules are related by 2₁ screw axis symmetry. However, there are two types of ddI ribbons growing on opposite directions along the b axis that are alternately stacked parallel to the [100] direction: one of them is hydrogen bonded through the N–H···N atoms of the 6-oxopyrimidine portion of hypoxanthine with base planes tilted by 20.8(1)°, while the another adjacent 1D ribbon is connected through the N–H···N atoms in which the NH amino group of 6-oxopyrimidine is a hydrogen bonding donor to the imine nitrogen of the imidazol fragment of hypoxanthine with base planes bent by 26.7(1)°. As it was aforementioned, one of two one-dimensional ribbons exhibits a higher planarity between the base planes. This is a consequence of a bifurcated hydrogen bonding occurring only in the ddI ribbons whose base planes are bent by 20.8(1)°. In these chains, the N–H amino group at the 6-oxopyrimidine portion of its molecules is also a hydrogen bonding donor group to the cyclic oxygen atom at the five-membered sugar ring of the same ddI unit accepting a hydrogen bond from this hydrogen bonding donor moiety. Along the [100] direction, there is a stacking distance of ca. 3.3 Å between the hypoxanthine planes of adjacent stacked ddI molecules, whereas these planes are twisted by 3.0(1)°. The two aforementioned N–H···N hydrogen bonding patterns are related to conformational changes. Two similar ddI conformers are present in the crystallographic asymmetric unit (Figure 5), as it was previously suggested for the commercial ddI structure on the basis of modern solid-state NMR techniques.^{8a} Essentially, these conformers slightly differ by a rotation on the axis of the β -N₉-glycosidic bond, although there are also small differences in values of torsions on the 2',3'-dideoxyribofuranoside puckered ring (Table 2). Moreover, opposite orientation of hypoxanthine relative to the sugar describes an *anti* conformation of the nitrogenous base for both ddI conformers. Similarly, the sugar ring of these two crystallographically independent drug molecules adopts a C3'-*endo* puckering conformation. The C3' carbon deviates from this sugar plane by 0.41(1) Å in one of two conformers (labeled as ddI molecule A, the root-mean-square deviation (rmsd) of the other four fitted atoms being 0.0546 Å) and by 0.53(1) Å in another ddI conformer (ddI molecule B, rmsd of the four fitted planar atoms of 2',3'-dideoxyribofuranoside being 0.0692 Å). It is interesting to note that each type of one-dimensional ribbon growing parallel to the b axis is assembled by only one conformer: N–H_(6-oxopyrimidine)···N_(6-oxopyrimidine) hydrogen bonded ribbons are formed through ddI molecules A, while N–H_(6-oxopyrimidine)···N_(imidazol) hydrogen bonded chains comprise ddI molecules B (Figure 4). Indeed, differences in the torsion values encompassing the β -N₉-glycosidic bond of the ddI conformers are associated with the directionality of the N–H···N hydrogen bonds.

Contrary to solid-state NMR data for commercial ddI that suggested an enol form for the two asymmetric units of the drug rather than the keto tautomer,^{8a} both ddI molecules doubtless exist in the keto form. The C=O bond lengths are 1.24(1) and 1.23(1) Å in ddI molecules A and B, respectively, while the distances of the N–C bonds are 1.42(1) and 1.40(1) Å in ddI molecules A and B, respectively. These geometric parameters indicate the double bond character of the shortened C=O carbonyl bond and the single bond feature of the enlarged N–C amino bond, confirming that both ddI conformers are keto-amine forms instead of enol-imine ones as suggested previously.^{8a} Furthermore, the N–H amino

Figure 4. (a) Classical N–H···N and O–H···N hydrogen bonds keeping ddI molecules infinitely in contact along the *a* and *b* axes. On the left boxes, note the opposite growth direction along the *b* axis of the ddI ribbons assembled by either conformers A or conformers B. (b) A top view parallel to the *a* axis shows the stacking of ddI units through their hypoxanthine nucleobases.

Figure 5. Two drug conformers compose the crystallographic asymmetric unit of ddI hydrate. (a) Hydrogen and non-hydrogen atoms are drawn as arbitrary radius spheres and 50% probability thermal ellipsoids, respectively. The refined site occupancy factor of water oxygen was found to be 0.25. The atom labels ending in "A" correspond to ddI conformer A, while those ones ending in "B" refer to ddI conformer B. (b) Superimposition of the crystallographically independent ddI molecules.

Table 2. Selected Torsion Angles (°) of the Drug Conformers Assembling the Crystal Structure of ddI Hydrate

moiety	torsion	molecule A	molecule B
β -N ₉ -glycosidic bridge	C4–N9–C1'–O1'	–67.7(9)	–91.9(8)
	C4–N9–C1'–C2'	174.3(7)	149.5(7)
	C4–N9–C1'–O1'	111.2(8)	79.2(9)
	C4–N9–C1'–C2'	–7(1)	–40(1)
2',3'-dideoxyribose ring	O1'–C1'–C2'–C3'	–32.6(7)	–25.6(8)
	C1'–C2'–C3'–C4'	36.6(7)	28.5(8)
	C2'–C3'–C4'–O1'	–28.0(7)	–21.9(8)
	C3'–C4'–O1'–C1'	8.3(7)	6.0(8)
	C4'–O1'–C1'–C2'	15.5(7)	12.4(8)
5'-CH ₂ OH branch	O1'–C4'–C5'–O5'	–63.8(8)	–64.1(9)
	C3'–C4'–C5'–O5'	53.0(9)	55(1)

hydrogens were accurately found from the difference Fourier electronic density map, and their coordinates were freely refined, ruling out any possibility of O–H covalent bonds between these hydrogens and the carbonyl oxygens. Likewise, the carbonyl oxygens are hydrogen bonding acceptors from C–H atoms in weak nonclassical C–H···O hydrogen bonds (Figure 6).

Besides the stacking interactions between the ddI ribbons, there are O–H···N hydrogen bonds contributing to the

crystal packing along the *a* axis (Figure 4). Geometric details of the classical intermolecular hydrogen bonds are displayed in Table 3. The hydroxyl groups of ddI are hydrogen bonding donors to the non-hydrogen bonded imine nitrogen of hypoxanthine of a [100] stacked drug molecule. In this way, the imine nitrogen of 6-oxypyrimidine is a hydrogen bonding acceptor from the OH group of ddI in the N–H_(6-oxypyrimidine)···N_(6-oxypyrimidine) hydrogen bonded ribbon, while the imine nitrogen of imidazol accepts a hydrogen bonding from the hydroxyl of ddI in the N–H_(6-oxypyrimidine)···N_(imidazol) hydrogen bonded chain. While there are strong classical hydrogen bonds and stacking interactions keeping ddI molecules in contact two-dimensionally parallel to the *a* and *b* axes, only weak nonclassical hydrogen bonds through the C–H···O atoms of the CH₂OH hydroxymethylene branches are responsible for the crystal packing along the *c* axis (Figure 6). Indeed, the packing of the ddI 2D ribbons parallel to the [001] direction to assemble the 3D array gives rise to hydrophobic channels of ca. 4.5 Å diameter (Figure 7). These infinite channels, surrounded by methylene and methine groups of 2',3'-dideoxyribofuranoside, accompany the ddI ribbons along the *b* axis. As deduced from the refinement, a water

Figure 6. Nonclassical C—H···O hydrogen bonds between ddI molecules in which (a) the C=O carbonyl and (b) O—H hydroxyl groups are hydrogen bonding acceptors from C—H moieties.

Table 3. Classical Hydrogen Bonding Interactions Keeping the Drug Conformers in Contact in the Crystal Structure of ddI Hydrate^a

D—H···A ^b	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N1a—H···N3a ^c	1.0(1)	2.2(1)	3.09(1)	148(8)
N1a—H···O1'a ^c	1.0(1)	2.6(1)	3.243(9)	128(7)
N1b—H···N7b ^d	1.01(9)	1.83(9)	2.83(1)	169(7)
O5'b—H···N7a	1.1(1)	1.7(1)	2.80(1)	160(8)
O5'a—H···N3b ^e	1.04(9)	1.7(1)	2.802(9)	167(8)

^aDistances and angles are given in angstroms (Å) and degrees (°), respectively. ^bD - hydrogen donor; A - hydrogen acceptor. ^cSymmetry operator: $2 - x, -1/2 + y, -z$. ^dSymmetry operator: $1 - x, 1/2 + y, -z$. ^eSymmetry operator: $1 + x, y, z$.

fraction was found in the channels. By refining freely the site occupancy factor (SOF) of the water oxygen, a water fraction of ca. 0.25 was determined (after free refinement of the water oxygen SOF, the site occupancy value was constrained to 25%, giving better *R*-factors and other refinement parameters as a satisfactory low residual electronic density within the crystallographic unit cell). Interestingly, the entrance of this water fraction into the hydrophobic channels under solvothermal conditions seems to be required to crystallize ddI specimens of suitable size for single-crystal X-ray diffraction analysis. In the apolar channels hosting the water molecules, oxygens of water probably are hydrogen bonding acceptors from C—H moieties in very weak interactions. Therefore, the presence of 0.25 water within the holes (corresponding to 0.125 mol of water *per* mol of ddI in the solvothermally prepared crystals) is needed to form single-crystal X-ray diffraction measurable ddI plates, while there is a lower water fraction into the channels of the commercial ddI structure. The lower water content of the commercial ddI makes it difficult to crystallize a suitably sized ddI specimen for single-crystal X-ray diffraction analysis.

Except for the difference in the water quantity within structural channels of ddI, the structures of API crystals obtained under solvothermal conditions and commercial ddI are related. The comparison between the experimental powder X-ray diffractograms and the simulated one from the ddI crystal structure allowed us to conclude that the crystal structures of commercial ddI and ddI hydrate are equal, but with different water fractions. In the same way, the FTIR spectra (except for the OH stretching band discussed below), FT-Raman spectra, and melting behaviors of the two ddI materials before and after the solvothermal crystallization are practically identical and strengthen the structural equivalence of commercial ddI to the crystals prepared in this study. It is striking to state that the FT-Raman spectra of commercial ddI and ddI hydrate are superimposable (Figure 8), since

FT-Raman spectra are populated by vibrational modes mainly associated with stretchings and deformations of the molecular backbone, agreeing with the fact that both materials have the same intramolecular and intermolecular structure. For instance, an interesting vibration mode is observed in both FT-Raman spectra of commercial ddI and ddI hydrate and helps characterize the keto tautomers of the two ddI conformers assembling both ddI structures: the stretching of the C=O carbonyl is observed as a considerably intense split band with peaks at ca. 1690 and 1705 cm^{-1} , which can be correlated to the presence of two ddI conformers in the unit cells of the ddI solvatomorphs. Such vibrational mode was also observed in the FTIR spectra of both ddI samples as an intense band at 1705 cm^{-1} (Figure 9). As it was already expected, FT-Raman spectra were less sensitive to the water presence at vibrational frequencies above 3200 cm^{-1} . Therefore, relevant differences could not be pointed out in the FT-Raman spectroscopic analysis of the two ddI materials. Moreover, a small difference between the two nonstoichiometric ddI hydrates was found after close examination of the FT-Raman spectra. On the tail of this band, a weak shoulder can be observed at 1676 cm^{-1} in the ddI hydrate spectrum. This shoulder can be assigned to the water angular deformation, in agreement with the higher content of water in this nonstoichiometric pharmaceutical hydrate. However, the weak shoulder at 1676 cm^{-1} is not observed in the commercial ddI spectrum because of the lower water fraction of this solvatomorph. Likewise, a pronounced band at approximately 3400 cm^{-1} which can be assigned to the OH stretching of water is observed in the ddI hydrate FTIR spectrum (Figure 9), proving the presence of water in the solvothermally prepared crystals of the drug.

Water presence was also checked by thermal analysis. Thermal studies using DSC technique confirmed the presence of water in both commercial ddI and ddI hydrate (Figure 10). In the DSC traces of both samples, weak endothermic peaks associated with the water elimination are observed at approximately 98 °C (onset temperature). However, the enthalpy (ΔH) value for this event in the ddI hydrate DSC trace ($\Delta H = 0.39 \text{ J/g}$) is higher than that in the commercial ddI one ($\Delta H < 0.1 \text{ J/g}$). Qualitatively, these energetic measurements are in agreement with the water presence in both ddI materials, but with a lower water fraction in commercial ddI. Unfortunately, these water molecules are eliminated at such a slow rate that its related mass loss cannot be trustworthily distinguished from the thermogravimetric curve baseline. Thus, thermogravimetry could not be used to gauge the water content.

Figure 7. (a) Empty and (b) filled hydrophobic channels of the ddI hydrate crystal structure. A transparent surface rendering is outlined in both illustrations. A view onto the *ac* plane (*a* axis in the vertical and *c* axis in the horizontal) is projected. In (b), spheres of arbitrary radius draw water oxygens occupying the channels with a site factor of 0.25 each.

Figure 8. FT-Raman spectra of commercial ddI (black line) and ddI hydrate (red line).

Figure 9. FTIR spectra of commercial ddI (black line) and ddI hydrate (red line).

Conclusion

A crystal structure of the anti-HIV drug didanosine was determined for the first time by single-crystal X-ray diffractometry. Powder X-ray diffraction analysis revealed that the pharmaceutical solid-state form of the drug has a structure equal to that of the solvothermally prepared ddI crystals, while they do not exhibit an identical chemical composition

Figure 10. DSC traces of commercial ddI (black line) and ddI hydrate (red line).

due to different water fraction occupying hydrophobic channels assembled within the crystals. DSC traces and FTIR/FT-Raman spectra of commercial ddI and ddI hydrate confirmed both structural similarities and the differences in the hydration pattern of the nonstoichiometric ddI hydrates.

Two crystallographic ddI conformers were in agreement with previous structural elucidation based on solid-state NMR techniques. Concerning the keto–enol equilibrium of ddI, our crystal data and vibrational spectroscopic characterizations were conclusive to state that the two conformers exist in the keto form, contrary to solid-state NMR spectroscopic assignments that suggested both crystallographically independent ddI molecules as being the enol tautomers. Therefore, here we approach the crystal packing of commercial ddI accurately. Likewise, this study is an example of exploring solvothermal techniques to prepare API crystals. As an outlook, solvothermal techniques might be better explored for problematical issues of polymorphism in pharmaceutical solids, as well as solid-state NMR techniques should be carefully used to approach structural features of polymorphs when X-ray structures are not available.

Acknowledgment. We thank Altivo Pitaluga Jr. (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) for the gift of the commercial ddI sample. We thank the Brazilian Research Council CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grants 477201/2009-1 and 302441/2009-3) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grants 2007/07185-5 and

2009/14705-0) for research fellowships (A.C.D., A.P.A., J.E., and F.T.M.). We also thank FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - APQ-2011-5.02/07, APQ-6010-5.02/07, APQ-02685-09), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant PNPDP2008), FUNCAP (Fundação Cearense de Amparo ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and IPDI (Instituto de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação) for financial support.

Supporting Information Available: Crystallographic information in CIF format. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) (a) Childs, S. L.; Zaworotko, M. J. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 4208–4211. (b) Almarsson, Ö.; Zaworotko, M. J. *Chem. Commun.* **2004**, 1889–1896. (c) Schultheiss, N.; Newman, A. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 2950–2967. (d) Martins, F. T.; Paparidis, N.; Doriguetto, A. C.; Ellena, J. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 5283–5292. (e) Martins, F. T.; Neves, P. P.; Ellena, J.; Cami, G. E.; Brusau, E. V.; Narda, G. E. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 2336–2344. (f) Ferreira, F. F.; Antonio, S. G.; Rosa, P. C. P.; Paiva-Santos, C. O. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 1734.
- (2) Martins, F. T.; Bocelli, M. D.; Bonfilio, R.; Araujo, M. B.; Lima, P. V.; Neves, P. P.; Veloso, M. P.; Ellena, J.; Doriguetto, A. C. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 3235–3244.
- (3) (a) Banerjee, D.; Kim, S. J.; Borkowski, L. A.; Xu, W.; Parise, J. B. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 709–715. (b) Wei, F.; Zhang, J.; Wang, L.; Zhang, Z.-K. *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6*, 1942–1944. (c) Wang, X.-F.; Zhang, Y.-B.; Huang, H.; Zhang, J.-P.; Chen, X.-M. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 4559–4563. (d) Legendre, A. O.; Mauro, A. E.; Nogueira, V. M.; Castellano, E. E. *Anal. Sci.* **2008**, *24*, x69–x70.
- (4) Gunawan, P.; Xu, R. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4367–78.
- (5) Lee, S. H.; Lee, Y. C.; Lee, K. R.; Kim, E. J.; Roh, S. H.; Chun, H. K. KR687715-B1, **2007**.
- (6) (a) Kim, D. D.; Chien, Y. W. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 214–219. (b) Ojewole, E.; Mackraj, I.; Naidoo, P.; Govender, T. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70*, 697–710.
- (7) Banerjee, R.; Bhatt, P. M.; Ravindra, N. V.; Desiraju, G. R. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 2299–2309.
- (8) (a) Bettini, R.; Menabeni, R.; Tozzi, R.; Pranzo, M. B.; Pasquali, I.; Chierotti, M. R.; Gobetto, R.; Pellegrino, L. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 1855–1870. (b) Tyagi, O. D.; Rao, V. U.; Prasad, V. S. R.; Sahu, A.; Rajababu, B.; Ramakrishna, P.; Rao, G. S. IN 2007CH01677, **2009**.
- (9) *COLLECT Data Collection Software*; Nonius: Delft, The Netherlands, 1998.
- (10) Otwinowski, Z.; Minor, W. In *Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography, Part A*; Carter, C. W., Jr., Sweet, R. M., Eds.; Academic Press: New York, 1997; Vol. 276, pp 307–326.
- (11) Sheldrick, G. M. *SHELXS-97: Program for Crystal Structure Resolution*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.
- (12) Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837–838.
- (13) Sheldrick, G. M. *SHELXL-97: Program for Crystal Structure Analysis*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.
- (14) Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Edgington, P. R.; Kessler, M. K.; Macrae, C. F.; McCabe, P.; Pearson, J.; Taylor, R. *Acta Crystallogr., Sect. B* **2002**, *58*, 389–397.
- (15) Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.
- (16) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- (17) Allen, F. H. *Acta Crystallogr., Sect. B* **2002**, *58*, 380–388.