

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

HÉRIKA DANIELLE ALMEIDA VIDAL

SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E CONFORMACIONAL DA “IMPUREZA E” DO
FÁRMACO CAPTOPRIL

HÉRIKA DANIELLE ALMEIDA VIDAL

SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E CONFORMACIONAL DA “IMPUREZA E” DO
FÁRMACO CAPTOPRIL

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Moleculares.

Área de concentração: Química

Orientador: Professor Doutor Gilberto Lúcio Benedito de Aquino

Anápolis – GO
2018

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

VV648s Vidal, Hérika Danielle Almeida
Síntese, análise estrutural e conformacional da "Impureza E" do
fármaco captopril / Hérika Danielle Almeida Vidal; orientador
Gilberto Lúcio Benedito de Aquino. -- ANÁPOLIS, 2018.
92 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado
Acadêmico em Ciências Moleculares) -- Câmpus-Anápolis CET,
Universidade Estadual de Goiás, 2018.

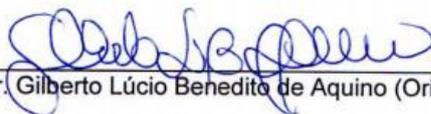
1. "Impureza E". 2. RMN. 3. Confômero. I. Aquino, Gilberto Lúcio
Benedito de , orient. II. Título.

**SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E CONFORMACIONAL DA "IMPUREZA E"
DO FÁRMACO CAPTOPRIL**

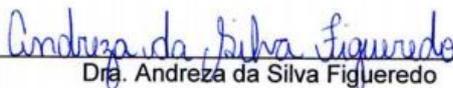
HÉRIKA DANIELLE ALMEIDA VIDAL

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Ciências Moleculares.

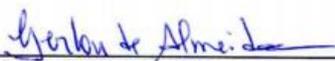
Aprovada em 06/12/2018 por:



Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino (Orientador/UEG)



Dra. Andreza da Silva Figueredo



Prof. Dr. Gerlon de Almeida Ribeiro Oliveira (SENAI)

ANÁPOLIS – GO

“A cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela.”
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a todas as forças do universo que conspiram a favor para o bom desenvolvimento de tudo.

Agradeço imensamente meus pais, Janete e Helder, que não mediram esforços para me ajudar, e mesmo diante as dificuldades estiveram me apoiando, além do amor, carinho e atenção.

Ao meu único irmão Helder Filho, pelo apoio e confiança, e mesmo não sendo grande admirador das ciências exatas me apoiando na escolha.

Aos meus avós Terezinha, Geraldo (*in memorian*), Edite e José (*in memorian*), que independentemente de onde estejam sempre ajudam, apoiam e rogam por mim.

Meu tio Daniel que teve papel ímpar na minha escolha da química para a vida.

A minha melhor amiga tanto da vida acadêmica como pessoal, Ingrid, pelo apoio, confiança e toda ajuda.

Meu amigo Marcos amigo da faculdade que se tornou da vida, que nunca deixou de acreditar em mim.

Aos meus amigos da vida que mesmo trilhando caminhos diferentes e grandes momentos de ausência, não fez com que abalasse nossa cumplicidade.

A todo grupo do LPBioS, laboratório na qual pertenci e tenho grande apreço.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto, pela confiança, paciência e dedicação na orientação, além da disposição por me ensinar essa ciência tão valiosa que nos sustenta.

A Universidade Federal de Goiás - Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, nas pessoas do Prof. Dr. Luciano Lião e Dr. Gerlon.

A Universidade de São Paulo nas pessoas do Prof. Dr. Javier Ellena e a Dra. Cecília.

A Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto – Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear.

A Capes pela bolsa concedida e aos órgãos de fomento.

A todos e todas que apoiaram e ajudaram de forma direta e indireta para o êxito de tudo, o meu Muito Obrigada!

RESUMO

O fármaco captopril é um dos mais consolidados no tratamento de pacientes com hipertensão. Por ser um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), ele age impedindo a conversão da angiotensina I em angiotensina II. O captopril, como todos os fármacos é submetido a estudos de estabilidade, nas quais são necessários o uso de padrões de referência. O ácido 1-(isobutiril) pirrolidino-2-carboxílico (**2a**) é uma das impurezas da síntese do fármaco captopril, também conhecida como “Impureza E”. Tal Impureza é um dos produtos monitorados e utilizado como padrão de referência no estudo de estabilidade do fármaco captopril. A importância da síntese de padrões se deve ao alto custo e dificuldade de acesso, o que incentiva o uso de métodos alternativos que facilitem o processo e economizem tempo e dinheiro. Neste trabalho, a “Impureza E” foi sintetizada por um novo método desenvolvido com uso de irradiação de micro-ondas. O produto foi obtido na forma cristalina e analisado por métodos espectroscópicos. A análise por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C em solução apresentou dois estados conformacionais estáveis, provavelmente amido confôrmeros, enquanto as análises por difração de raios X apresentaram apenas um composto. Para elucidar o comportamento desse composto em solução o estudo de RMN foi realizado em diferentes temperaturas e solventes. Foram utilizadas as temperaturas de -50°C a 80°C e os solventes DMSO- d_6 , metanol- d_4 , acetona- d_6 e clorofórmio- d_1 . Nas temperaturas utilizadas, não houve variação significativa na proporção dos confôrmeros analisados. No entanto, os solventes utilizados proporcionaram alta variação de proporção entre as conformações, na qual o clorofórmio, por ser o solvente mais apolar, apresentou-se como o solvente que mais estabilizou o confôrmero de maior população. Assim, pode-se concluir que existe um equilíbrio em solução e há uma alta barreira energética entre os confôrmeros que pode ser superada pelo uso de solventes com uma baixa polaridade, através disso permitindo uma ligação de hidrogênio intramolecular, suscitando na estabilização do confôrmero mais estável.

Palavras-chave: “Impureza E”, RMN, confôrmero.

ABSTRACT

The drug captopril is one of the most consolidated in the treatment of patients with hypertension. Due to its ability to inhibit the angiotensin converting enzyme (ACE), it acts by preventing the conversion of angiotensin I to angiotensin II. Captopril, like all drugs, is subjected to stability studies in which the use of reference standards is required. The 1- (Isobutyryl) pyrrolidine-2-carboxylic acid (**2a**) is one of the impurities in the synthesis of the drug captopril, also known as "Impurity E". Such Impurity is one of the products monitored and used as reference standard in the stability study of the drug captopril. The importance of pattern synthesis is due to the expensive and difficult of access, which encourages the use of alternative methods that facilitate the process and save time and money. In this work, the "Impurity E" was synthesized by a new method developed with the use of microwave irradiation. The product was obtained in crystalline form and analyzed by spectroscopic methods. The nuclear magnetic resonance (NMR) analysis of ^1H and ^{13}C in solution showed two stable conformational states, probably confounding starch, while X-ray diffraction analysis showed only one form. To elucidate the behavior of this compound in solution the NMR study was performed at different temperatures and solvents. Temperatures of -50°C to 80°C and the solvents $\text{DMSO}-d_6$, $\text{methanol}-d_4$, $\text{acetone}-d_6$ and $\text{chloroform}-d_1$ were used. At the temperatures used, there was no significant variation in the proportion of the conformers analyzed. However, the solvents used provided a high variation in the ratio between the conformations, in which chloroform, as the most apolar solvent, was the solvent that most stabilized the conformer of the largest population. Thus, it can be concluded that there is an equilibrium in solution and there is a high energy barrier between the conformers that can be overcome by the use of solvents with a low polarity, thus allowing intramolecular hydrogen bonding, resulting in stabilization of the most stable conformer.

Palavras-chave: *Impurity E, NMR, conformers.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura Captopril.	16
Figura 2. Estrutura do ácido (2S)-1-[2-Metilpropanoil] pirrolidina-2-carboxílico (“Impureza E”).....	17
Figura 3. Estrutura da 2-metil-succinilprolina (3a).	19
Figura 4. Mecanismo de ação captopril.	20
Figura 5. Estrutura cristalina captopril interagindo com ECA.	21
Figura 6. Exemplo rota sintética captopril.	23
Figura 7. Estruturas da Impurezas comercializadas do captopril.	24
Figura 8. Gradiente de aquecimento em uma chapa de aquecimento (A) e em um forno micro-ondas (B). A temperatura aumenta do azul para o vermelho.....	26
Figura 9. (9a) Reator de Micro-ondas (9b) Parte interior reator Micro-ondas.....	27
Figura 10. Ligação amídica.	27
Figura 11. Híbrido de ressonância ligação amídica.	28
Figura 12. N 1,2,3,4-tetrahidropirazina[1,2-a]indol com os substituintes.....	31
Figura 13. N 1,2,3,4-tetrahidropirazina[1,2-a]indol conformação cadeira.....	31
Figura 14. Estrutura N-N-diacil-1,4-dihidropirazina.	32
Figura 15. H ¹ RMN dos prótons do anel pirazina (25°C).....	32
Figura 16. Ampliação H ¹ RMN dos prótons do anel pirazina composto (14a) em DMSO-d ₆	33
Figura 17. RMN de ¹ H dos prótons do anel pirazina composto (14a) com variação de temperatura.....	34
Figura 18. Estrutura Yannanin A.	35
Figura 19. Síntese da “Impureza E” (2a) do captopril.	39
Figura 20. Síntese Benzoil-D-prolina (20b).	41
Figura 21. Síntese 4-nitrobenzoil-D-prolina (21b).....	41
Figura 22. Espectro de infravermelho L-prolina e “Impureza E” (2a).	44

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da “Impureza E” sintetizada (500 MHz, CD_3SOCD_3).....	45
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da “Impureza E” comercial (400 MHz, CD_3SOCD_3).....	45
Figura 25. Espectros de RMN de ^1H : “Impureza E”, Benzoil-D-prolina e 4-nitrobenzoil-D-Prolina (500 MHz, DMSO-d_6 , CDCl_3).....	46
Figura 26. Centro de quiralidade (A) e centro de inversão (B) da “Impureza E”.....	47
Figura 27. Representação dos possíveis confôrmeros da molécula “Impureza E”	48
Figura 28. Estruturas de ressonância.....	48
Figura 29. Demonstração da possível interação de hidrogênio no confôrmero da Impureza E.....	49
Figura 30. Estrutura da “Impureza E” (19e) com prótons enumerados.	50
Figura 31. Demonstração acoplamento H4 com H7 e H7 com H3.....	51
Figura 32. Demonstração de acoplamentos vicinais e geminais.	53
Figura 33. Estrutura N,N-dimetilformamida.	56
Figura 34. Demonstração de inversão de prótons em clorofórmio.....	60
Figura 35. MEV do cristal obtido da “Impureza E”.	61
Figura 36. Ortep “Impureza E”.....	63
Figura 37. Interações Intermolecular da “Impureza E”.....	64
Figura 38. Análise de TGA da “Impureza E” em atmosfera de nitrogênio.	65
Figura 39. Análise de TGA da “Impureza E” em atmosfera de oxigênio.	65
Figura 40. DSC “Impureza E”.	66
Figura 41. CG da “Impureza E” (2a).	77
Figura 42. CG Benzoila-D-prolina (20b).	78
Figura 43. CG 4-nitrobenzoila-D-prolina (21b).....	78
Figura 44. RMN de ^1H “Impureza E” (500MHz, CD_3SOCD_3).	79
Figura 45. RMN de ^{13}C “Impureza E” (125MHz, CD_3SOCD_3).	80
Figura 46. RMN de ^1H Benzoil-D-prolina (500MHz, CDCl_3).	81

Figura 47. RMN de ^1H 4-nitrobenzoil-D-prolina (500MHz, CD_3SOCD_3).....	82
Figura 48. Espectros de RMN de ^1H da "Impureza E" com a variação de temperatura de 20°C a 80°C (500MHz, CD_3SOCD_3).....	83
Figura 49. Espectros de RMN de ^1H da "Impureza E" com a variação de temperatura de $23,2^\circ\text{C}$ a -50°C (600MHz, CD_3COCD_3).....	84
Figura 50. Espectros de RMN de ^1H da "Impureza E" com variação de solventes....	85
Figura 51. Espectro de NOESY bidimensional "Impureza E" (600MHz, CD_3COCD_3).....	86
Figura 52. Espectro de NOESY bidimensional "Impureza E" (500MHz, CDCl_3).....	87
Figura 53. Espectro HSQC bidimensional "Impureza E" (500MHz, 125MHz, CD_3SOCD_3).....	88
Figura 54. Espectro de HSQC bidimensional "Impureza E" (500MHz, 125MHz, CDCl_3).....	89
Figura 55. Espectro de HMBC bidimensional "Impureza E" (500MHz, 125MHz, CDCl_3).....	90
Figura 56. RMN de ^{13}C "Impureza E" (500MHz, CD_3Cl).....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de síntese para obtenção do cloreto de ácido.....	43
Tabela 2. Atribuição dos prótons no deslocamento químico (ppm), em DMSO-d ₆ .enumerados.....	50
Tabela 3. Valores de acoplamento calculados e observados experimentalmente para acoplamentos dos tipos: axial-axial, axial-equatorial e equatorial-equatorial.....	52
Tabela 4. Variação em porcentagem dos confôrmeros da “Impureza E” do captopril de acordo com a variação de temperatura (500Hz, CD ₃ SOCD ₃).....	55
Tabela 5. Variação em porcentagem dos confôrmeros da “Impureza E” do captopril de acordo com a variação de temperatura (600MHz, CD ₃ COCD ₃).	56
Tabela 6. Relação de solventes deutерados usados na análise de RMN da “Impureza E”	57
Tabela 7. Relação de proporção dos confôrmeros da “Impureza E” de acordo com solvente.....	58
Tabela 8. Deslocamento químico dos prótons da “Impureza E” de acordo com solvente.....	58
Tabela 9. Principais dados cristalográficos e refinamento “Impureza E”.....	62
Tabela 10. Ligações de hidrogênio “Impureza E”	64
Tabela 11. Coordenadas atômicas (x 10 ⁴) e parâmetros de deslocamento isotrópicos equivalentes (Å ² x 10 ³) para “Impureza E”. U (eq) é definido como um terço do traço do tensor ortogonalizado de Uij (numeração de átomos de acordo com ortep).	92
Tabela 12. Comprimentos de ligação [Å] e ângulos [°] para “Impureza E” (numeração de átomos de acordo com ortep).....	92
Tabela 13. Parâmetros de deslocamento anisotrópico (Å ² x 10 ³) para “Impureza E”. O expoente do fator de deslocamento anisotrópico assume a forma: $-2\pi^2[h^2a^*2U^{11} + \dots + 2hk a^* b^* U^{12}]$ (numeração de átomos de acordo com ortep).	93
Tabela 14. Coordenadas de hidrogênio (x 10 ⁴) e parâmetros de deslocamento isotrópico (Å ² x 10 ³) para “Impureza E” (numeração de átomos de acordo com ortep).....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔG - Energia de Gibbs

ANVISA - Agência Nacional da Vigilância Sanitária

BPF - Potencialização da Bradicinina

CCD - Cromatografia por Camada Delgada

CG - Cromatografia Gasosa

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Correlation

NBS - N-bromosuccinimida

NOESY - Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

OMS - Organização Mundial da Saúde

PA - Pressão Arterial

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

Sn2 - Reação de Substituição Nucleofílica Bimolecular

TGA - Análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 Captopril.....	19
3.1.1 Mecanismo de Ação do Captopril.....	20
3.2 Estudo de degradação forçada	21
3.3 “IMPUREZA E”	23
3.4 REAÇÕES SOB IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS	25
3.5 LIGAÇÃO AMÍDICA.....	27
3.6 ANÁLISE CONFORMACIONAL	28
3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear	30
3.6.2 Cristalografia.....	34
4 METODOLOGIA	36
4.1 ANÁLISES REALIZADAS	36
4.1.1 Reator de Micro-ondas.....	36
4.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	36
4.1.3 Cromatografia gasosa (CG)	37
4.1.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)	37
4.1.5 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H e de ¹³ C	37
4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
4.1.7 Análise Termogravimétrica (TGA)	38
4.1.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	38

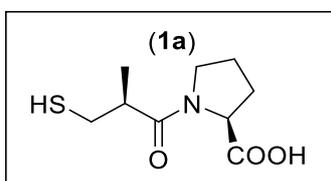
4.1.9 Difração de Raios-X (DRX)	38
4.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS	38
4.2.1 Síntese do (2s)-1-[2-metilpropanoil] pirrolidina-2-carboxílico (“Impureza E”)	38
4.2.2 Síntese Benzil-D-prolina.....	40
4.2.3 Síntese da 4-nitrobenzoil-D-prolina	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO.....	67
7 REFERÊNCIAS.....	69
8 ANEXOS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2016 a hipertensão foi responsável por 49.640 mortes no Brasil, e do ano de 2006 a 2016 foram cerca de 500 mil mortes (OMS, 2018). Ressalva-se ainda que cerca de 1,1 bilhões de adultos têm pressão alta e menos de um a cada cinco realizam o controle da mesma. Estas informações são alarmantes, demonstrando a necessidade da certeza de que os medicamentos utilizados devem conter total eficiência e segurança necessária, visto que a hipertensão é responsável por 45% das doenças vasculares, onde essas doenças estão entre as principais causas de morte do mundo (OMS, 2014).

O captopril (Figura 1) é um medicamento indicado para pacientes com hipertensão, atuando como um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA). Tal fármaco apresenta grande eficácia no tratamento, somando a isso um menor custo e uma baixa toxicidade (BOJARSKA, 2015). Esse fármaco já é consolidado no mercado e conseqüentemente é submetido a estudos de degradação forçada (CUSHMAN; ONDETTI, 1991).

Figura 1. Estrutura Captopril.



Estudos de degradação forçada têm como objetivo monitorar as possíveis impurezas, bem como os produtos de degradação já presentes no medicamento ou que podem ser gerados conforme as condições às quais o mesmo é exposto, visando assegurar a segurança e a eficácia do fármaco/medicamento (BLESSY et al, 2014; TATTERSALL, 2016).

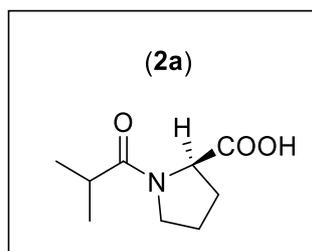
Os estudos de estabilidade possuem certa complexidade por envolverem estruturas desconhecidas. Sendo assim, pode-se considerar a

síntese desses compostos como uma alternativa à otimização deste processo, de modo a estabelecer padrões e agilizar o tempo de estudo (CHAKOLE et al., 2013; DEOKATE; GORDE, 2014).

Nos processos de síntese de padrão, o uso de reações por irradiação de micro-ondas é extremamente interessante, pois a técnica está incluída em uma linha da química verde. Além de reduzir o tempo de reação, esse protocolo diminui o uso de solventes ou não os utiliza, e reduz o número de reações secundárias, levando a obtenção do produto desejado com alto rendimento e pureza (AMETA et al., 2014).

O captopril possui impurezas e produtos de degradação com estruturas elucidadas e de origem definida. A “Impureza E” (Figura 2), presente no captopril, é oriunda da própria rota sintética. Esta substância possui especificidades estruturais decorrentes da ligação amídica, que em solução pode apresentar duas conformações (ANVISA, 2015; LGC Reference Standards, 2015).

Figura 2. Estrutura do ácido (2S)-1-[2-Metilpropanoil] pirrolidina-2-carboxílico (“Impureza E”).



Esse efeito de mudança conformacional da estrutura pode ser observado em diversos outros compostos com aplicações biológicas e sintéticas, dentre elas o captopril. Esse problema é evidenciado principalmente em solução, podendo ser observado por técnicas espectroscópicas. As técnicas espectroscópicas aliadas aos cálculos teóricos auxiliam na compreensão do comportamento dessas moléculas, bem como na determinação estrutural de confôrmeros (LAMBERT et al., 2014; SONG, 2016).

Portanto, estudos conformacionais em equilíbrio no estado sólido ou em solução que evidenciem os efeitos de interação que governam a estabilidade dos estados conformacionais podem auxiliar na compreensão estrutural de moléculas. Esses estudos podem subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias que permitam diminuir ou aumentar a flexibilidade estrutural, minimizando as incertezas que as mudanças conformacionais possam causar nas propriedades de compostos bioativos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar a “Impureza E” do captopril sob irradiação de micro-ondas, realizando sua caracterização e estudo conformacional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar a “Impureza E” sob irradiação de micro-ondas;
- Realizar estudos espectroscópicos;
- Avaliar as conformações;
- Realizar estudos de estabilidade térmica;
- Obter o composto em sua forma cristalina;
- Realizar estudos cristalográficos através da difração de Raio-X;
- Realizar estudos teóricos para avaliar a barreira energética existente;
- Sintetizar análogos para avaliar a formação de confôrmeros.

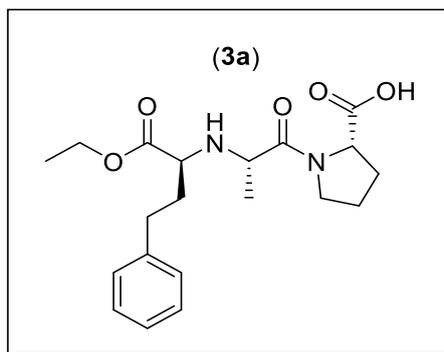
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CAPTOPRIL

O fármaco captopril (ácido (2S)-1-[(2S)-2-metil-3-sulanilpropanoil]pirrolidino-2-carboxílico) está incluso na classe terapêutica dos anti-hipertensivos, prescrito para pacientes com hipertensão e insuficiência cardíaca (BRASIL, 2015).

Os estudos da ação do captopril foram decorrentes da descoberta dos efeitos farmacológicos do veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*), onde nos peptídeos derivados do veneno da jararaca foi observado um alto fator de potencialização da bradicinina (BPF) (polipeptídeo plasmático de função vasodilatadora) e a inibição de algumas enzimas. Em Londres, com o aprofundamento desse estudo chegaram ao derivado 2-metil-succinilprolina (**3a**) (Figura 3), com a presença do grupo metila próximo ao grupo amida, observando assim a ação de inibir a ECA (CUSHMAN; ONDETTI, 1991; FERREIRA; BPF, 1949).

Figura 3. Estrutura da 2-metil-succinilprolina (**3a**).



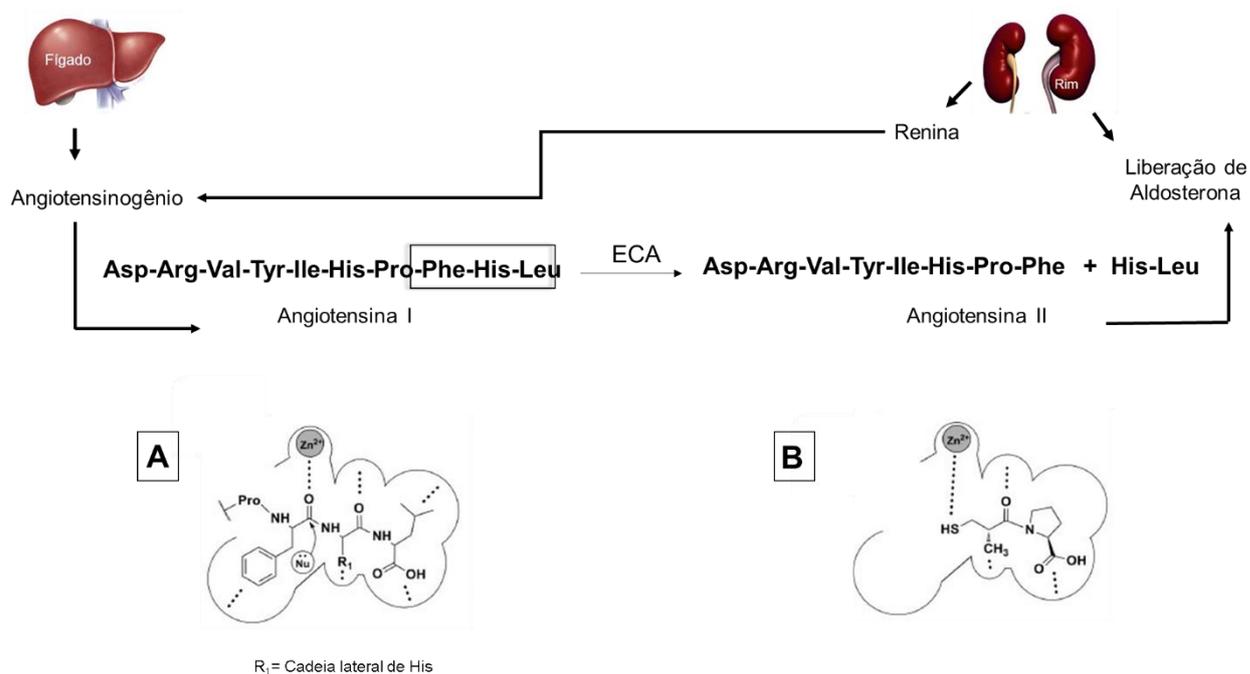
Em 1980 o FDA (Food and Drug Administration) autorizou o uso do captopril, alcançando recorde de vendas até 1996. No Brasil, atualmente, é um dos anti-hipertensivos mais comercializados também conhecido. É comercializado sob os nomes de capoten, captomed e cozaar (DBH, 2010).

3.1.1 Mecanismo de Ação do Captopril

O sistema renina-angiotensina é o responsável pelo controle arterial do organismo humano. A renina é um hormônio produzido pelos rins e liberada na corrente sanguínea quando há queda na pressão arterial. A renina converte um substrato produzido pelo fígado, chamado de angiotensinogênio, em angiotensina I, que se encontra no plasma (Figura 4) (BRASIL, 2015; SOUZA, 2015; CUSHMAN; ONDETTI, 1991).

A angiotensina I (um decapeptídeo) a princípio não é reativa, sendo convertida pela ação da ECA (metaloproteinase), através de uma reação de hidrólise, a angiotensina II (um octapeptídeo). A angiotensina II é vasoconstritora e induz a produção de aldosterona que provoca a retenção de líquidos no sangue e a regulação da pressão arterial (PA) (PATLAK, 2003).

Figura 4. Mecanismo de ação captopril.



*Fonte: Adaptada de TAVARES et al, 2015

A: Interação angiotensina I com ECA

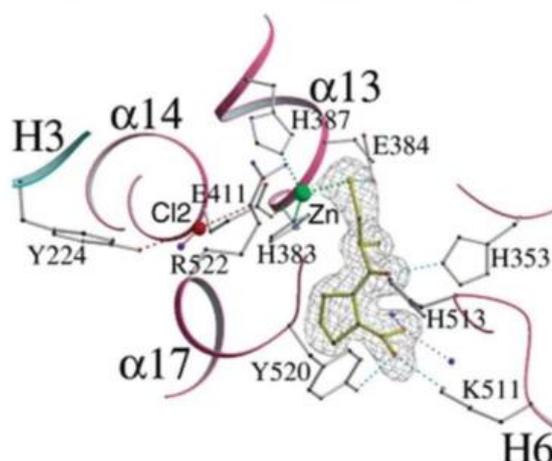
B: Interação captopril com a ECA

Para a ECA desenvolver sua atividade catalítica ela necessita do intermédio de Zn^{2+} , e o reconhecimento da angiotensina pela ECA ocorre através

da sequência tripeptídica (Phe-His-Leu). Essa sequência é capaz de se coordenar com o Zn^{2+} e, conseqüentemente, sofre um ataque nucleofílico resultando na clivagem do decapeptídeo (TAVARES et al, 2015).

O captopril age de forma a impedir a ECA de interagir com a angiotensina I, inibindo a conversão de angiotensina I para II e a elevação da PA. Isso ocorre devido a complexação do Zn^{2+} com o enxofre ser mais efetiva quando comparada com o oxigênio (TAVARES et al, 2015; BOJARSHA et al, 2015). O Zn^{2+} possui geometria tetraédrica e se coordena (Figura 4) com o íon acetato através do átomo de oxigênio, duas moléculas de histidina pelo nitrogênio do anel e com fármaco captopril através do enxofre. Além disso o captopril consegue realizar interações com alguns aminoácidos da ECA tornando mais efetiva e preferível a interação com a enzima (NATESH et al, 2004).

Figura 5. Estrutura cristalina captopril interagindo com ECA.



*Fonte: Adaptada de NATESH et al, 2004.

3.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os fármacos disponíveis no mercado podem apresentar algumas impurezas. De acordo com a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) impurezas são decorrentes de alterações químicas que podem ocorrer durante a fabricação ou até mesmo no armazenamento. Essas impurezas e/ou produtos

de degradação são obrigatoriamente estudadas, sendo esses estudos fiscalizados e norteados pela Resolução de diretoria colegiada nº53 de 2015.

No Brasil, estudos de produtos de degradação e/ou impurezas foram iniciados apenas em 2012 quando a ANVISA publica a resolução de número 45 que estabelece a obrigatoriedade da realização dos testes de degradação e com isso a descrição nos relatórios da quantidade de produtos de degradação e/ou impurezas no método analítico (ANVISA, 2012).

Na resolução 58/2013 é estabelecido que na elaboração do perfil de degradação deve conter a notificação, identificação e qualificação dos degradantes. A realização desse teste deve ser realizada em diferentes lotes para garantir a confiabilidade dos resultados. Ainda nessa resolução se estabelece os tipos de testes que devem se realizar, como: aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos; respeitando a especificidade de cada fármaco (ANVISA, 2013).

Com a necessidade de aprimorar tais estudos, em 2015, publicou-se a resolução Nº 53/2015, que discorre sobre a obrigatoriedade da notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Essa resolução descreve a exigência da descrição da identificação dos produtos de degradação.

Há dados na literatura que estabelecem que a degradação deve ser realizada na faixa de 10 a 30% comparado com o ativo (LEITE, 2015). Fatores geográficos também direcionam os testes a serem executados, a OMS propõe que deve ser respeitado a questão climática de cada região. Os testes que devem ser realizados são: foto estabilidade, calor, hidrólise básica/ácida, oxidação, íons metálicos e umidade (ANVISA, 2015).

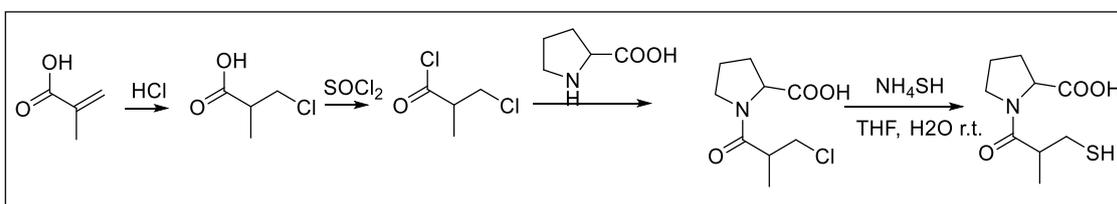
O grande desafio desses estudos de degradação é a identificação e a proposta das estruturas de impurezas e/ou produtos de degradação. Uma alternativa para facilitar o processo é a síntese e caracterização de padrões de referência guiado por um prévio estudo orgânico teórico do fármaco, pois além de reduzir gastos com a compra de padrões já comercializados, ainda permite a comparação de produtos obtidos via degradação forçada com compostos

considerados impurezas desconhecidas, facilitando assim, a elucidação estrutural.

3.3 “IMPUREZA E”

Dados da literatura apresentam diversas rotas sintéticas para a obtenção do captopril, com inúmeras especificidades, diferentes quantidades de etapas, reagentes de fácil e difícil acesso, entre outras. Existem pelo menos oito rotas sintéticas publicadas para obtenção do captopril (BASHIARDES; DAVIES, 1987; FELTRIN; ALMEIDA, 2006; BHANJA; JENA, 2012). A Figura 6 exemplifica a rota que apresenta menor quantidade de etapas e utiliza reagentes de fácil acesso.

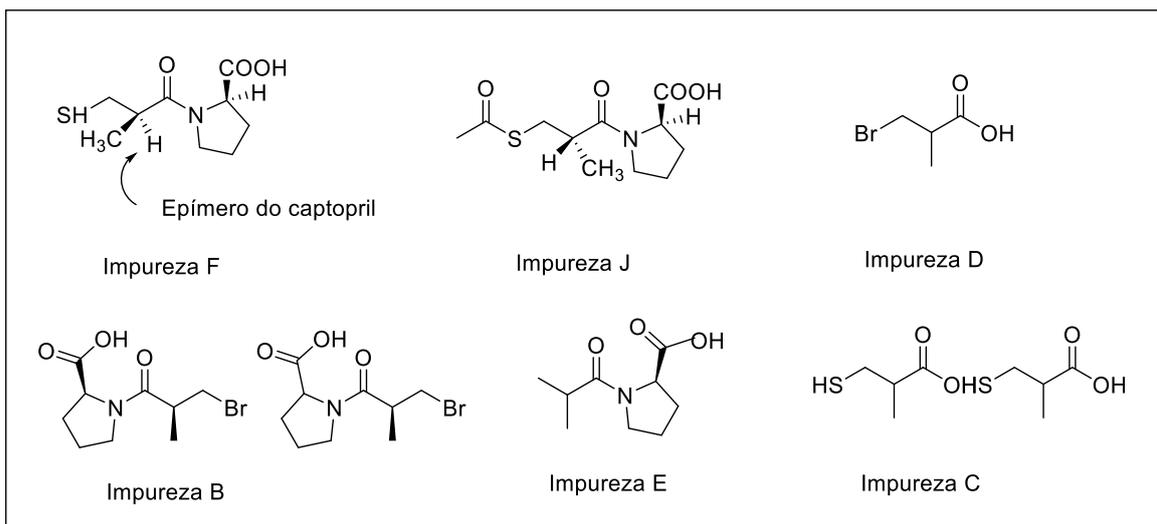
Figura 6. Exemplo rota sintética captopril.



Fonte: Adaptado de BHANJA; JENA, 2012.

Estas rotas são usadas como base para prever as impurezas que podem estar presentes no medicamento. Atualmente, são conhecidas e comercializadas no mínimo seis impurezas para o fármaco captopril, estas estão demonstradas na Figura 7 (ANVISA, 2015).

Figura 7. Estruturas das impurezas comercializadas do captopril.



O ácido (2S)-1-[2-metilpropanoil] pirrolidino-2-carboxílico (2a) é uma das impurezas que pode estar presente no fármaco captopril e é conhecido como “Impureza E” do captopril (ANVISA, 2015). Este é oriundo da rota sintética e padrão comercial.

A “Impureza E” é vendida para uso nos estudos de estabilidade do fármaco captopril. Substâncias químicas de referência (SQR), também conhecidas como padrões de referência, são substâncias aprovadas e reconhecidas pela ANVISA com a certeza de que o composto possui a estrutura prevista e uma pureza conhecida. Esses padrões são utilizados em análises para comparação e confirmação das substâncias analisadas. O objetivo do uso de padrões de referência recomendados pela ANVISA é trabalhar com compostos de qualidade que possuem pureza comprovada (ANVISA, 2018).

Alguns padrões de referência são de difícil acesso por serem caros, restritos e muitas vezes não são encontrados. Assim sendo, muitas vezes é necessária a terceirização de serviços para a obtenção dos mesmos. Toda essa complexidade e dificuldade é por se tratar de compostos muito específicos e rotas de síntese não conhecidas. Uma alternativa no caso de produtos de degradação é a obtenção por via direta durante o processo de degradação forçada e posterior separação através de rotas sintéticas alternativas. Dentre as rotas sintéticas alternativas o uso de micro-ondas se torna viável, pois reduz o

tempo e uso de reagentes e solventes, com menor número de subprodutos (DIAS et al, 2018).

3.4 REAÇÕES SOB IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS

Na década de 80 foram publicados os primeiros trabalhos com dados satisfatórios do uso específico de micro-ondas em síntese orgânica. Trabalhos realizados por Gedye (1986) e Giguere (1986) apresentaram diversas reações químicas, como: hidrólises, oxidação, esterificação e S_N2 . Os autores compararam o método tradicional de aquecimento e o uso de irradiação de micro-ondas e os resultados demonstraram uma discrepância no tempo necessário para concluir a reação. Um exemplo é a reação de S_N2 do íon 4-cianofenóxido com cloreto de benzilo em que o tempo foi reduzido de 16 horas para 4 minutos.

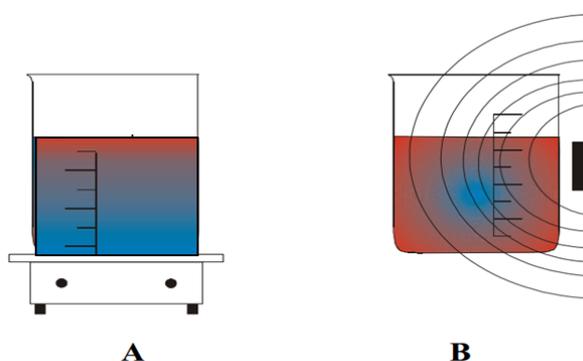
O uso de irradiação de micro-ondas em síntese orgânica potencializa o processo de reação em até 1000 vezes quando comparada com métodos convencionais devido a sua capacidade de superaquecimento. Enquanto algumas reações tradicionais durariam cerca de 8 a 10 horas, pelo método de irradiação de micro-ondas necessitariam apenas de 30 segundos a 5 minutos e os rendimentos que inicialmente eram obtidos em torno de 40-50% passam a 80-95% (AMETA et al., 2014).

O aquecimento tradicional (Figura 8a) ocorre por indução até alcançar o interior da amostra. Para esse aquecimento ocorrer de forma efetiva é necessária uma agitação eficiente para que a distribuição de calor aconteça de forma homogênea, no entanto, manter um controle de agitação possui algumas dificuldades uma vez que com o uso de chapas aquecedoras, banhos mariais, fornos e outros equipamentos de aquecimento, não é possível ter um total controle do sistema (ORTIZ, PRIETO, HOZ; 2018).

O grande achado do uso de micro-ondas é a capacidade de transformar radiação eletromagnética em calor. O aquecimento via irradiação de micro-ondas ocorre por um gradiente inverso (Figura 8b), ou seja, da parte interna da amostra para as extremidades. Esse aquecimento de extrema eficiência ocorre através da interação eletromagnética produzindo um

acoplamento direto de energia do micro-ondas com moléculas polares a nível molecular. Tal técnica é seletiva e dependente das propriedades do material utilizado (DIAS et al, 2018).

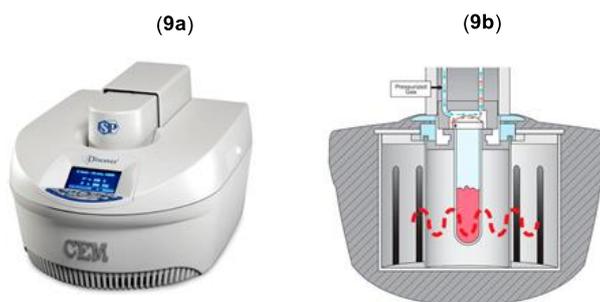
Figura 8. Gradiente de aquecimento em uma chapa de aquecimento (A) e em um forno micro-ondas (B). A temperatura aumenta do azul para o vermelho.



Fonte: LÜHKEN; BADER, 2003.

A Figura 9a e 9b apresenta um exemplo de reator de micro-ondas e o interior do equipamento. Esse sistema pode ser utilizado fechado ou aberto, com controle de parâmetros como temperatura, tempo, pressão, rotação por minuto e número de ciclos. Esses parâmetros auxiliam e permitem inúmeras combinações de diferentes sistemas para a realização das reações e sua aplicabilidade permeia por diversas áreas. Dentre essas áreas estão a síntese (orgânica e inorgânica), biologia, processamento de vidros (KHARISSOVA; KHARISOV; VALDÉS, 2010), degradação forçada de fármacos (DIAS et al, 2018), entre outras, conseguindo atender desde de microescalas até grandes escalas.

Figura 9. (9a) Reator de Micro-ondas (9b) Parte interior reator Micro-ondas.

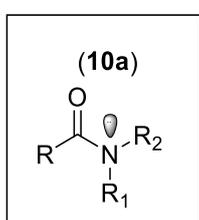


Das inúmeras vantagens de se realizar reações via micro-ondas pode-se destacar que esta técnica é considerada como uma abordagem da química verde. Além de reduzir o tempo de reação de dias ou horas para minutos ou até mesmo segundos e em alguns casos não precisar de solventes, ainda diminuem as reações secundárias aumentando o rendimento e a pureza do produto desejado (AMETA et al., 2014).

3.5 LIGAÇÃO AMÍDICA

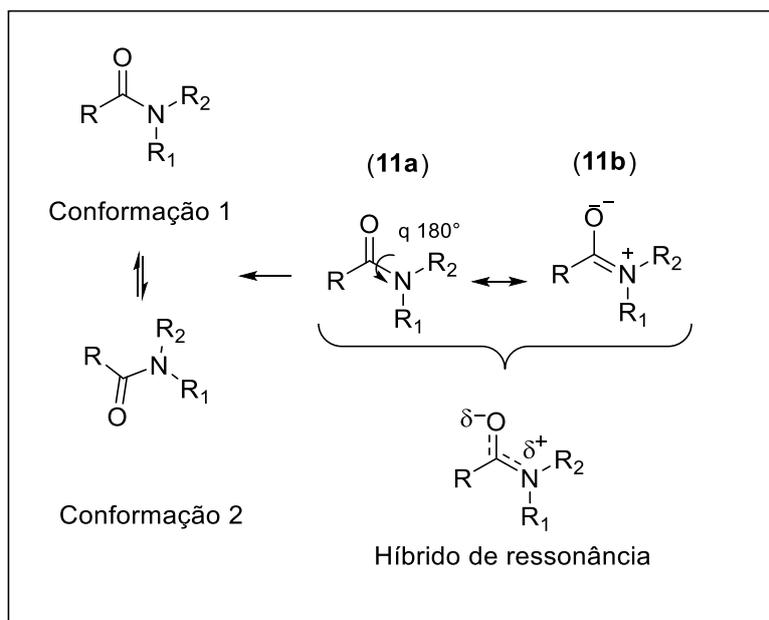
Estudos apontam que a ligação amídica (Figura 10) é certamente um fator responsável por despertar diversos interesses em áreas da síntese orgânica, biológica, química medicinal e polímeros (MENG; SZOSTAK, 2018).

Figura 10. Ligação amídica.



Essas propriedades decorrentes da ligação amídica são resultado das inúmeras características físico-químicas que a mesma apresenta, como: coplanaridade dos átomos ligados, possibilidade de protonação do oxigênio, estabilidade à adição nucleofílica, curtos comprimentos de ligação C-N e deslocalização de elétrons por ressonância (Figura 11) (KEMNITZ; LOEWEN, 2007; MENG; SZOSTAK, 2018).

Figura 11. Híbrido de ressonância ligação amídica.



A ressonância amídica ocorre pela conjugação $n \rightarrow \pi^*$ C=O, como demonstra a Figura 11 as duas formas de ressonância **(11a)** e **(11b)** contribuem para o híbrido de ressonância. As amidas também são conhecidas por se interconverterem com a formação dos confôrmeros 1 e 2. Contudo há uma considerável barreira energética para rotação da ligação C-N em torno de 15- 20 Kcal/mol. Essa alta energia é resposta do duplo caráter da ligação que envolve a ressonância e efeitos estéricos (KEMNITZ; LOEWEN, 2007).

Com essa possibilidade de conversão, a forma de ressonância B não consegue se estabilizar no estado de transição pois o par de elétrons livres do nitrogênio está ortogonal à ligação dupla da carbonila. Nessa interconversão pode haver a formação dos chamados amido confôrmeros. Os estudos dessas conformações oriundas da ligação amídica merecem destaque, uma vez que essa interconversão pode induzir a estereoquímica dos compostos, consequentemente, interferindo em suas propriedades (MARITA et al, 1997).

3.6 ANÁLISE CONFORMACIONAL

A definição exata de uma estrutura química é um dos momentos cruciais em um estudo químico, pois a estrutura prediz diversas informações acerca de propriedades químicas e físicas da molécula. A forma com que os

átomos se ligam e se acomodam no espaço interferem diretamente na reatividade e estabilidade da molécula (FRANCO, 2008).

A maneira como os átomos se ligam é livre, contudo limitada por barreiras energéticas que induzem os mesmos a se disporem de modo a atingir seu estado de menor energia livre. Assim, uma maneira da molécula chegar ao ponto de menor consumo energético é a mudança do ambiente químico dos átomos através de rearranjos e torções. As diversas estruturas obtidas nessas tentativas são denominadas conformações. Assim, toda estrutura química almeja sua melhor conformação e menor energia livre. O termo conformação foi introduzido em 1950 por Barton com estudos do cicloexano, que com auxílio de estudos espectroscópicos e teóricos provaram que a conformação cadeira é a conformação mais estável para o cicloexano (BARTON, 1950; NETO, 2006).

As conformações adotadas dependem da natureza e do volume dos ligantes e são decorrentes da variação dos ângulos diedros devido à livre rotação das ligações simples (GARBSCH, 1964).

O fato de existir mais de um confôrmero se deve às interações existentes, por contribuírem para os mínimos energéticos. A disposição dos átomos da molécula no espaço define sua geometria e isso também interfere na minimização de energia livre. Os fatores que podem influenciar nisso são: as repulsões de pares de elétrons não ligantes, a tensão do anel em sistemas cíclicos, a tensão torcional resultante do emparelhamento de ligações e a desestabilização resultante da distorção de comprimentos de ligação ou de ângulos de ligação dos valores ideais (MAZUR, 2018).

Determinadas estruturas podem possuir geometrias que se estabilizam pelos efeitos estereoeletrônicos. Esses efeitos ocorrem à medida que a geometria permite e/ou facilita interações intramoleculares. As mudanças conformacionais possibilitam relações entre estrutura, energia, reatividade e propriedades. Para algumas estruturas químicas, as técnicas espectroscópicas são aliadas que auxiliam no processo de visualização e determinação das conformações (NEGRELLI, 2011).

3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido amplamente aplicada em todas as áreas da química para elucidação estrutural e desde a década de 60 em estudos de equilíbrios conformacionais. Em 1964, Garbisch e colaboradores usaram RMN para determinação da proporção de confôrmeros.

Os confôrmeros podem ser visualizados por RMN devido à interconversão das estruturas e as proporções de populações podem ser modificadas pela temperatura e solvente utilizado. Com esses dois parâmetros altera-se a energia livre final de cada conformação, por isso altera-se a proporção. Tal observação pode ser visualizada em espectros pela mudança de proporção, pela alteração do valor da constante de acoplamento (J) e pela variação do deslocamento químico (LADD, 1975).

Em alguns casos não é possível visualizar os dois confôrmeros no espectro, pois a interconversão é muito rápida. Nesse caso, o valor da constante de acoplamento é apresentado como a média ponderada (Equação 1) de cada confôrmero e constante individual (LADD, 1975).

$$J = \sum n_i J_i \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: n_i = fração molar de cada conformação

J_i = constante de acoplamento individual

O valor de J é diretamente ligado com a temperatura e a permissividade do meio. Com isso, experimentos realizados por RMN em equilíbrios conformacionais utilizam-se desses parâmetros para a determinação e a elucidação da estrutura mais estável (NETO, 2008).

Katritzky e colaboradores (2005) realizaram estudos da N-1,2,3,4-tetrahidropirazina[1,2-a]indol (**12a**) com diversos substituintes (Figura 12). Alguns resultados mostraram que o anel da piperazina adotou a conformação cadeira e substituição na posição equatorial favorecida. Por um processo dinâmico de mudança e inversão do nitrogênio há a formação de confôrmeros enantioméricos. Os resultados de RMN em baixa temperatura no solvente $\text{CFCl}_3 + \text{CD}_2\text{Cl}_2$, mostraram que abaixo de -116°C a conformação cadeira existe e os

substituintes são favorecidos na posição equatorial (Figura 13). Cálculos teóricos encontraram um valor da energia livre de gibbs (ΔG) para a inversão do anel, sendo de $8,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (KATRITZKY et al., 2005).

Figura 12. N 1,2,3,4-tetrahidropirazina[1,2-a]indol com os substituintes.

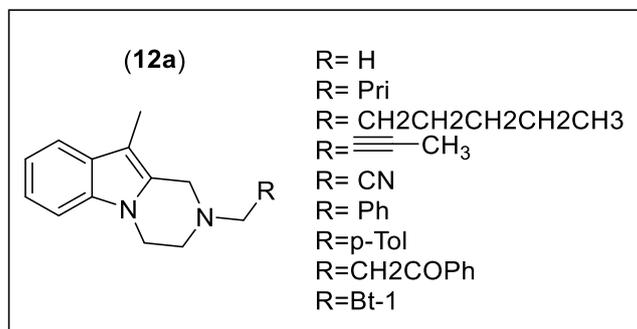
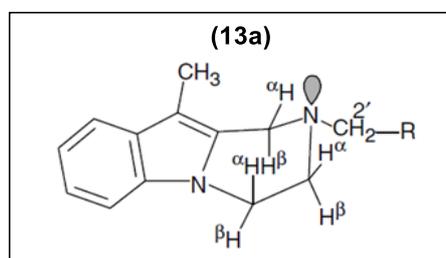


Figura 13. N 1,2,3,4-tetrahidropirazina[1,2-a]indol conformação cadeira.



Song e colaboradores (2017) realizaram estudos com a variação de temperatura acompanhado por RMN e estudo teórico para avaliarem a questão conformacional da N-N-diacil-1,4-dihidropirazina (**14**) com três substituintes (Figura 14). A 1,4-dihidropirazina é um substrato que tem sido bastante estudado, por possuir diversas atividades biológicas, com isso avaliar a questão conformacional é de grande relevância, uma vez que se sabe que a mudança conformacional pode provocar mudanças nas propriedades das moléculas. O estudo foi direcionado após a obtenção de um complicado espectro de RMN de ^1H para os quatro prótons insaturados do anel da pirazina das moléculas obtidas (Figura 15).

Figura 14. Estrutura N-N-diacil-1,4-dihidropirazina.

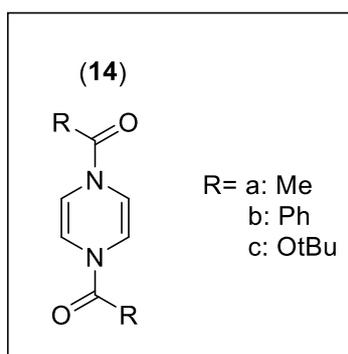
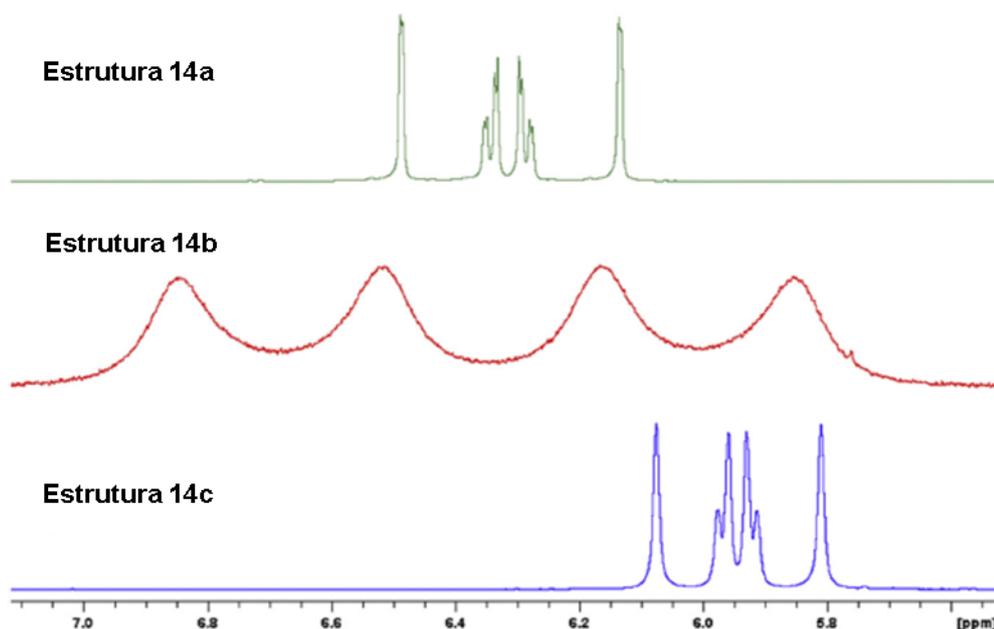


Figura 15. ^1H RMN dos prótons do anel pirazina (25°C).



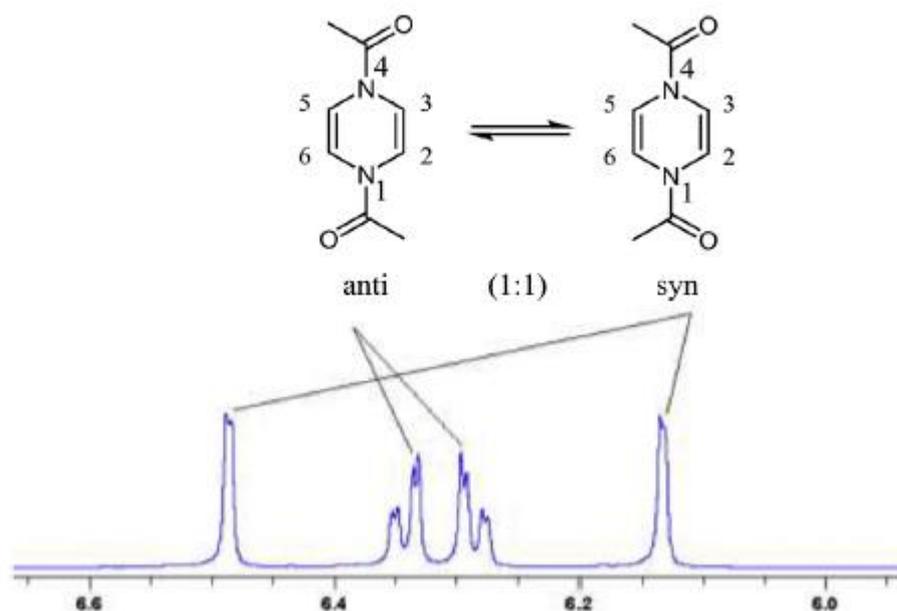
Fonte: Adaptado de SONG et al, 2017.

O espectro de RMN (Figura 15) da estrutura (**14a**) apresenta dois multipletos e dois duplo-dupletos, a estrutura (**14b**) apresenta quatro largos singletos e a estrutura (**14c**) com dois singletos e um quarteto, ou seja, os prótons insaturados que deveriam ser “iguais” não são. Com tais dados os autores concluíram um interessante fenômeno, a duplicidade dos sinais, decorrente de um provável isomerismo conformacional, provocado pelos substituintes e também pelo fato de o composto ser analisado em solução, possibilitando a presença de isômeros conformacionais.

A estrutura (**14a**) foi escolhida para realizar o estudo, pois além da duplicidade dos sinais para os prótons do anel, também foi observado dois sinais para as metilas e os dois grupos enamina. Assim, levou-se a pensar na presença dos isômeros anti e syn que são evidentes no espectro do composto (**14a**) (Figura 16).

Esses sinais provam a presença dos isômeros e o fenômeno do acoplamento na estrutura, por exemplo na estrutura anti o H do carbono 5 se acopla com os H do carbono 6, esse fenômeno pode ser observado com os demais átomos e também nas outras estruturas.

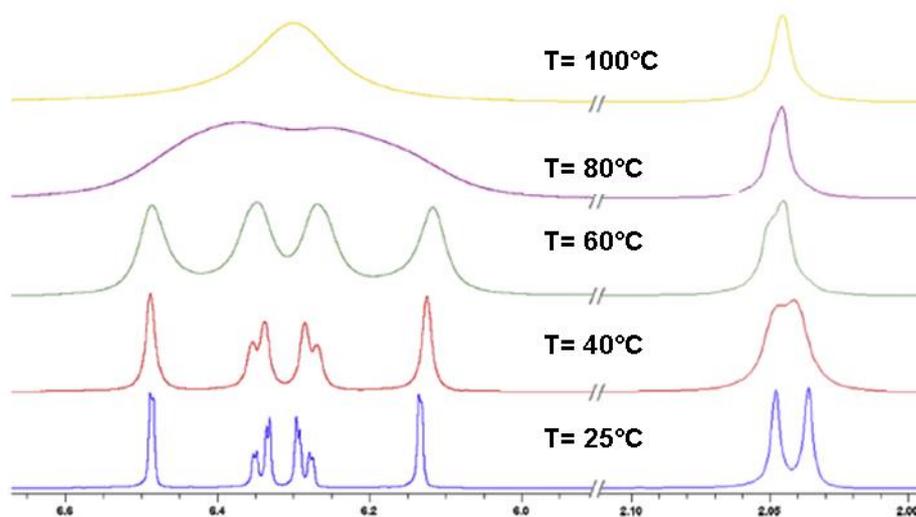
Figura 16. Ampliação H¹ RMN dos prótons do anel pirazina composto (**14a**) em DMSO-d₆.



Fonte: Adaptado de SONG et al, 2017.

Com base nesses dados foi realizada uma análise com a variação da temperatura e o resultado mostrou que à medida em que se aumentava a temperatura se favorecia uma conformação, com a unificação dos picos, como mostra a Figura 17.

Figura 17. RMN de ^1H dos prótons do anel pirazina composto (**14a**) com variação de temperatura.



Fonte: Adaptado de SONG, 2017.

O estudo finaliza com o estudo teórico, calculando a barreira energética entre as conformações, com maior valor para o composto **14b** e menor para **14c**, provando que os prótons do anel são quimicamente diferentes.

3.6.2 Cristalografia

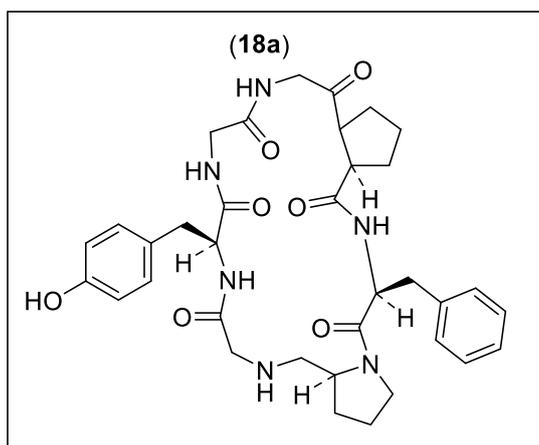
A cristalografia é um método *ab initio* usado para a determinação estrutural tridimensional em nível atômico. A estrutura deve ser obtida em sua forma cristalina e utiliza-se a técnica de difração de raios - X para essa investigação. As vantagens desse estudo, além de comprovar a estrutura é conseguir determinar as interações intermoleculares (BRUNGER, 1992; GIACOVAZZO, 1995).

O uso da cristalografia em estudos de equilíbrio conformacional auxilia na determinação estrutural dos confôrmeros. Em alguns casos os confôrmeros existentes podem cristalizar de formas diferentes por possuírem mais de um mínimo energético (LI, 2017).

Em estudos realizados por Morita (1997), com cristais da yunnanin A (**18a**) (Figura 18), um ciclo heptapeptídeo isolados das raízes *Stellariu*

yunnanensis, onde os dados de raio X mostraram que havia apenas uma estrutura em estado sólido, contudo em solução os estudos de RMN apresentaram duas conformações. O estudo foi concluído com a determinação da conformação trans como a mais estável e sendo essa a compatível com a estrutura cristalográfica. E tal estrutura foi justificada como majoritária por permitir três interações de hidrogênio intramolecular, o que a estabiliza.

Figura 18. Estrutura Yannanin A.



Alguns fatores que podem influenciar na cristalização de pequenas moléculas são a força de empacotamento, interações soluto-solvente e interações soluto-soluto. Esses fatores podem influenciar a entropia do sistema e, através disso, levar a transições conformacionais.

Esses arranjos conformacionais podem sofrer grande influência da interação soluto-solvente, que podem favorecer, ou não, energeticamente a determinação conformacional. Tal interação soluto-solvente muitas vezes induz a formação ou a perda de ligações de hidrogênio intramolecular. A ligação de hidrogênio tem papel fundamental em estudos conformacionais, pois essa interação muitas vezes permite estabilizar as conformações (MARELLI et al, 2014).

Estudos em solução e no estado sólido sofrem grande impacto da entropia do sistema, pois enquanto nos cristais que estão em sua estrutura rígida é possível prever com certeza a estrutura obtida, diferentemente em solução, onde o sistema permite total flexibilidade das moléculas, assim os resultados

obtidos são médias ponderadas fornecidas pelas conversões das conformações (GARRIC et al, 2003).

Estudos da literatura relatam a importância de estudos das interações em solução e no estado sólido. Um exemplo é o estudo de um protótipo com atividade antitumoral conhecido como Cilengitide. Os estudos de interações com proteínas apenas em sistemas sólidos não foram determinantes, sendo necessário o estudo em solução com variações de solventes para verificar todas as interações existentes. Além disso estudos em sistemas aquosos servem como moldes mais adequados para desenvolvimento de novas drogas, pensando no sistema fisiológico (GARRIC et al, 2003; MARELLI et al, 2014).

Com isso estudos que contemplem análises conformacionais tanto em solução quanto em estado sólido, podem ser de grande eficácia na certeza que as moléculas tenham suas propriedades definidas.

4 METODOLOGIA

4.1 ANÁLISES REALIZADAS

Para verificação da pureza dos compostos sintetizados foram utilizadas a cromatografia gasosa (CG) e cromatografia em camada delgada (CCD). A estrutura dos compostos foi confirmada por espectroscopia na região de absorção no infravermelho (IV) e pela ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e carbono (RMN de ^{13}C).

4.1.1 Reator de Micro-ondas

Equipamento CEM Corporation Discover S-Class, sob as condições: em sistema aberto a uma temperatura de 80°C, 200W, por dois ciclos de 2 minutos.

4.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Cromatoplasmas de sílica em gel 60 F 254 de alumínio da Merck foram utilizadas para monitorar o progresso da síntese, identificar os compostos

presentes e determinar a pureza. Foi utilizado como fase móvel: acetato de etila, etanol e água (5:1:1) e revelado com solução de ninidrina 2% em butanol.

4.1.3 Cromatografia gasosa (CG)

O cromatógrafo gasoso utilizado para a confirmação estrutural e da pureza dos compostos formados é equipado com detector por ionização de chama (CG/FID) modelo CGMS-QP2010 Ultra, marca Shimadzu. Foi empregado nitrogênio com pureza de 99,999% como gás de arraste. As alíquotas (1mg de amostra dissolvida em 1000 μ L de acetato de etila) foram preparadas e introduzidas (volume de 1 μ L) em um injetor automático do modelo AOC-20i, através da utilização de uma seringa de 10 μ L. A temperatura da coluna iniciou a 40 °C por 5 min, seguida de um aumento para 280 °C a 40 °C/min, onde permaneceu por 15min. O fluxo do gás de arraste na coluna foi de 1mL/min e a temperatura do injetor igual a 280 °C, modelo de injeção Split (1:49).

4.1.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Os compostos foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho (Perkin-Elmer Frontier FT-IR) para a confirmação da estrutura através da identificação dos grupos funcionais. Foi utilizado pastilha de brometo de potássio (KBr). Cerca de 1mg da amostra para 100 mg de KBr. Os dados foram tratados no programa Origin Versão 6.0.

4.1.5 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz, 600 MHz) e de ^{13}C (125MHz) foram obtidos em espectrômetro Bruker no Instituto de Química/UFG e Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de São de Paulo (USP) utilizando como solventes deuterados DMSO- d_6 , acetona- d_6 , metanol- d_4 , clorofórmio- d e água- d_2 adquiridos da Aldrich. A visualização dos espectros foi realizada por meio do programa Bruker TopSpin 4.03.

4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada em um microscópio de mesa – TM3030plus.

4.1.7 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada em um equipamento da PerkinElmer modelo P1TGA, com variação de temperatura de 25°C a 600°C com taxa de 10°C por minuto. Os dados foram tratados no programa Origin versão 6.0.

4.1.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise foi realizada purga com N₂ (5.0) 40,0 ml/min, rampa de aquecimento de 20°C a 185°C (5K/min).

4.1.9 Difração de Raios-X (DRX)

A coleta de dados do cristal foi realizada a 25°C em um mini difractômetro Rigaku XtaLAB com sistema detector CCD equipado com uma fonte Mo ($\lambda = 0.71073\text{Å}$) no Instituto de Física da Universidade de São Paulo – Câmpus São Carlos. A integração de dados, os efeitos de polarização de Lorentz e as correções de absorção foram realizadas com CrysAlisProref (versão 171.38.43b).

4.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

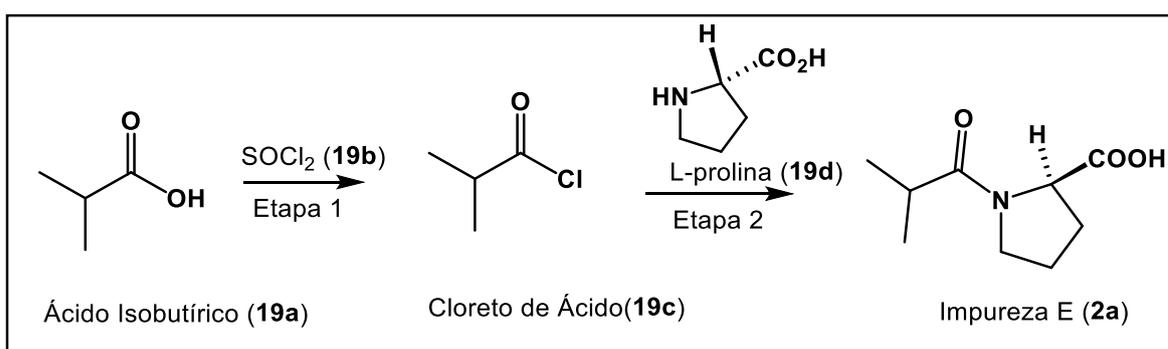
4.2.1 Síntese do (2s)-1-[2-metilpropanoil] pirrolidina-2-carboxílico (“Impureza E”)

A síntese da “Impureza E” (**2a**) do captopril foi realizada em 2 etapas. Na primeira etapa foi realizada a síntese do cloreto de ácido (**19c**) a partir do ácido isobutírico por irradiação de micro-ondas. Conforme descrito na literatura, as reações para obtenção de cloreto de ácido exigem muito tempo, além de empregar solventes e catalisadores aumentando o custo reacional (MONSON, 1971; SHIMAZAKI et al., 1982 OLIVEIRA, 2005;).

Para síntese do cloreto de ácido (Figura 19 – Etapa 1), inicialmente foi adicionado ácido isobutírico (**19a**) e cloreto de tionila (**19b**) (1:2) em um balão de fundo redondo e foi colocado para reagir sob irradiação de micro-ondas em sistema aberto a uma temperatura de 80°C, potência ajustada para 200W, utilizando dois ciclos de 2 minutos. O produto obtido foi destilado utilizando destilador horizontal com temperatura de 70°C, rotação de 30 rpm e pressão de 500mbar.

Na segunda etapa, síntese (2s)-1-[2-metilpropanoil] pirrolidina-2-carboxílico (Figura 17 – Etapa 2), dissolveu-se L-prolina (**19d**) em solução aquosa de NaOH 2M e resfriou a solução obtida para aproximadamente 0°C, em banho de gelo e água. Em seguida foi adicionado o equivalente em mols de cloreto de ácido (**19c**) (1:1) e a solução foi deixada sob agitação durante 1h em banho de gelo, água e NaCl para manter a temperatura baixa. Em seguida, a solução foi mantida em repouso por 1h para atingir a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada.

Figura 19. Síntese da “Impureza E” (**2a**) do captopril.



A solução foi acidificada com HCl 6M para pH 1 e então foi feita a extração com 90mL de acetato de etila, três porções de 30 mL, lavou-se a fase orgânica com 10mL de solução saturada de NaCl e secou-se com sulfato de sódio anidro. A fase orgânica foi concentrada por rota evaporação e o resíduo sólido obtido foi cristalizado em uma mistura de acetato de etila e hexano (1:1).

O produto obtido apresentou-se como cristais transparentes, com rendimento de 89%. Tempo de retenção nas condições descritas na metodologia

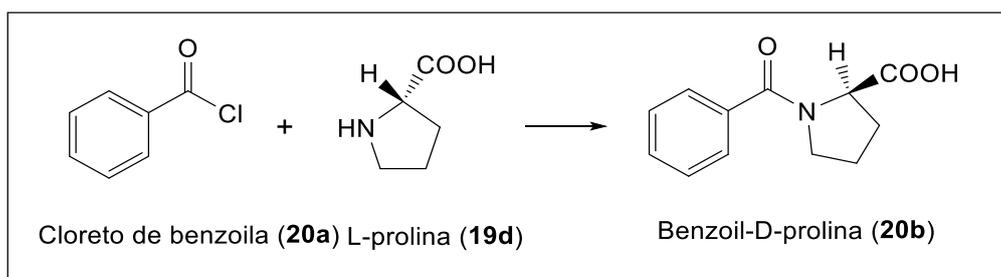
(CG) 16,3 minutos (Anexo – Figura 41). Espectro de absorção na região de infravermelho: $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ de aromático (1521 e 1592cm^{-1}), ν_{NO_2} (1343cm^{-1}), $\nu_{\text{C-H}}$ sp (3085cm^{-1}). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4,42 (dd, $J = 8,6; 2,4$ Hz, 1H), 4,21 (dd, $J = 8,7; 4,0$ Hz, 1H), 3,63 – 3,49 (m, 2H), 3,44 – 3,25 (m, 2H), 2,69 (hept, $J = 6,8$ Hz, 1H), 2,47 – 2,37 (m, 1H), 2,25 – 1,98 (m, 2H), 1,97 – 1,65 (m, 2H), 1,06 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,00 (dd, $J = 6,7, 4,8$ Hz, 6H), 0,96 (dd, $J = 17,5, 6,7$ Hz, 6H), ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 175,47, 174,83, 174,82, 174,07, 59,67, 58,85, 46,75, 46,39, 31,99, 31,65, 31,43, 29,17, 24,88, 22,62, 20,14.

Para análise de difração de Raios-X os dados dos cristais obtidos foram coletados à 25°C em um mini difractômetro Rigaku XtaLAB com sistema detector CCD equipado com uma fonte Mo ($\lambda = 0.71073\text{Å}$). A integração de dados, efeitos de polarização de Lorentz e correções de absorção foram realizadas com CrysAlisPro [32] (versão 171.38.43b). A estrutura foi resolvida por métodos diretos utilizando o *software* Olex2 (DOLOMANOV, 2009), e o modelo obtido foi refinado por mínimos quadrados na matriz completa F^2 (SHELXTL-97 (SHELXTL, 2008)). Todos os átomos de hidrogênio foram colocados em posições calculadas e refinados com parâmetros de deslocamento individual fixo [$U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}$ ou $1.5U_{\text{eq}}$] de acordo com o modelo de equitação (comprimentos de ligação C – H de 0.97 Å e 0.96 Å , para metileno e metila grupos, respectivamente). As representações moleculares foram geradas pelo MERCURY 3.10 (MACRAE, 2008).

Foram sintetizados dois derivados da L-prolina afim de verificar se os mesmos possuíam o mesmo perfil obtido pela “Impureza E”.

4.2.2 Síntese Benzil-D-prolina

A síntese foi realizada em apenas uma etapa, onde dissolveu-se L-prolina (**19d**) em solução aquosa de NaOH 2M e resfriou a solução para aproximadamente 0°C em banho de gelo. Foi adicionado o equivalente em mols de cloreto de benzoila (**20a**) (1:1) (Figura 20) e deixou-se a solução sob agitação durante 1h em banho de gelo e NaCl para manter a temperatura baixa. Em seguida a solução foi mantida em repouso por 1h para atingir a temperatura ambiente.

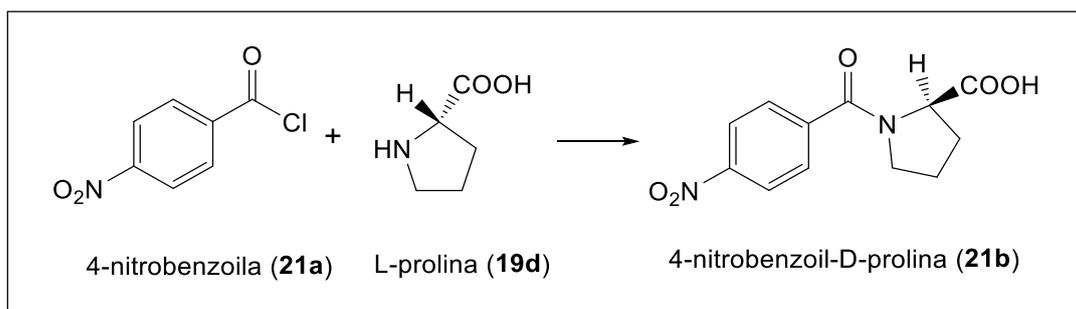
Figura 20. Síntese Benzoil-D-prolina (**20b**).

A solução foi acidificada com HCl 6M para pH 1, ocorrendo a formação de um precipitado. O sobrenadante foi retirado e o precipitado solubilizado em hexano. Realizou-se a extração com três volumes de 10mL de etanol.

O produto obtido apresentou como pó branco, rendimento de 86%. Pico de retenção pelas condições descritas na metodologia (CG) 19,4 minutos. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,52 (s, 5H), 7,51 (s, $J = 1,8$ Hz, 5H), 7,46 (d, 1H), 7,45 (d, 1H), 4,41 (m, $J = 8,4, 4,9$ Hz, 2H), 4,34 – 4,30 (m, 2H), 3,58 (m, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,50 – 3,46 (m, 2H), 2,32 – 2,21 (m, 2H), 1,93 – 1,84 (m, 2H).

4.2.3 Síntese da 4-nitrobenzoil-D-prolina

A síntese foi realizada em apenas uma etapa, onde dissolveu-se L-prolina (**19d**) em solução aquosa de NaOH 2M e resfriou a solução para aproximadamente 0°C em banho de gelo. Adicionou-se o equivalente em mols de cloreto de 4-nitrobenzoila (**21a**) (1:1) (Figura 21) dissolvidos em 10mL de acetonitrila e deixou-se a solução sob agitação durante 1h em banho de gelo e NaCl para manter a temperatura baixa. Em seguida a solução foi mantida em repouso por 1h para atingir a temperatura ambiente.

Figura 21. Síntese 4-nitrobenzoil-D-prolina (**21b**).

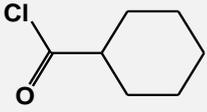
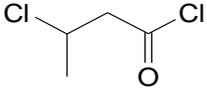
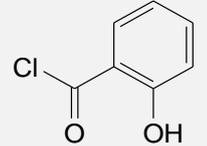
A solução foi acidificada com HCl 6M para pH 1, ao acidificar, houve a formação de duas fases. Após isso realizou-se a extração com três volumes de 10mL de acetonitrila. Houve a formação de um óleo com pó na fase da acetonitrila que foi dissolvido em diclorometano e filtrado para que houvesse novamente a formação do óleo.

O produto obtido apresentou-se como óleo amarelo escuro, rendimento de 85%. Pico de retenção pelas condições descritas na metodologia (CG) 19,5 minutos. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,33 – 8,29 (d, 2H), 8,26 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,81 – 7,74 (d, 2H), 7,67 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 4,45 (dd, $J = 8,7, 4,8$ Hz, 1H), 4,36 (dd, $J = 8,5, 3,2$ Hz, 1H), 4,04 (m, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,64 – 3,57 (m, 2H), 2,38 – 2,25 (m, 2H), 1,98 – 1,77 (m, 2H), 1,18 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,07 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações para obtenção de cloreto de ácido exigem muito tempo, cerca de 3 horas, quando comparadas com outras reações, além de empregar solventes e catalisadores aumentando o custo reacional, a tabela 1 apresenta alguns exemplos de síntese de cloretos de ácidos e os tempos reacionais (MONSON, 1971; OLIVEIRA, 2005; SHIMAZAKI et al., 1982). Dessa forma a síntese da “Impureza E” do captopril foi realizada em 2 etapas, onde a primeira etapa optou-se por realizar uma síntese via micro-ondas com intuito de diminuir o tempo para 2 minutos e diminuir o custo reacional.

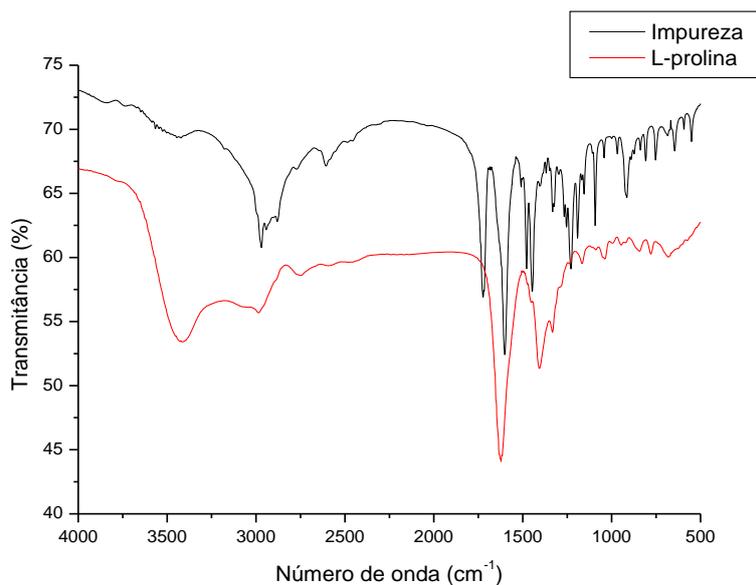
Tabela 1. Condições de síntese para obtenção do cloreto de ácido.

Referência	Temperatura/Tempo	Solvente	Cloreto de Ácido
MONSON, 1971	150°C / 1 hora	Benzeno	
SHIMAZAKI et al., 1982	0-20°C / 15 min e 80°C / 3 horas	Imidazol (catalisador)	
OLIVEIRA, 2005	65-70°C / 2 horas	Dimetilformamida	

Através da análise de infravermelho foi possível comprovar a formação do produto, pelo espectro da “Impureza E” (**2a**) quando comparado com o da L-prolina (Figura 22), nota-se o desaparecimento da banda da amina $\nu(\text{N-H})$ em aproximadamente 3414 cm^{-1} e no espectro da impureza o surgimento de uma nova banda de carbonila, referente à amida formada $\nu\text{C=O}$ em 1600 cm^{-1} .

Além disso, é possível apontar ainda no espectro da “Impureza E” as bandas em aproximadamente 3473 cm^{-1} $\nu\text{O-H}$ de ácido carboxílico, 1723 cm^{-1} $\nu\text{C=O}$ também de ácido carboxílico e em aproximadamente 2970 cm^{-1} $\nu\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ e 1440 cm^{-1} δCH_3 .

Figura 22. Espectro de infravermelho L-prolina e “Impureza E” (2a).



A obtenção dos demais análogos foi comprovada também pelo desaparecimento da banda da amina $\nu(\text{N-H})$ e no surgimento de uma nova banda de carbonila, referente a amida formada.

A técnica de RMN foi utilizada com o intuito de comprovar a formação dos produtos (Anexo – Figuras 44, 45, 46 e 47). Dentre o perfil obtido pelo composto **2a** foi possível comparar tal espectro (Figura 23) com o espectro fornecido (Figura 24) por uma empresa que comercializa a substância. É notável que a substância sintetizada apresentou mesmo comportamento que a comercial.

Os derivados da L-prolina foram sintetizados e analisados para verificar se os mesmos apresentariam o mesmo perfil que a “Impureza E” sintetizada. Esse perfil seria a duplicação de todos sinais dos prótons, a Figura 25 apresenta a comparação dos espectros de RMN da “Impureza E” e dos análogos Benzil-D-prolina e 4-nitrobenzoil-D-prolina. Em anexo na Figuras 44, 45, 46 e 47 e mostrado os espectros individuais com suas respectivas atribuições e integrações.

Os espectros apresentaram um perfil que demonstra a presença de dois compostos, provavelmente confômeros. Através de tais dados foram

realizadas outras diferentes análises para avaliar o comportamento da prolina frente a alguns parâmetros em específico.

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da “Impureza E” sintetizada (500 MHz, CD_3SOCD_3).

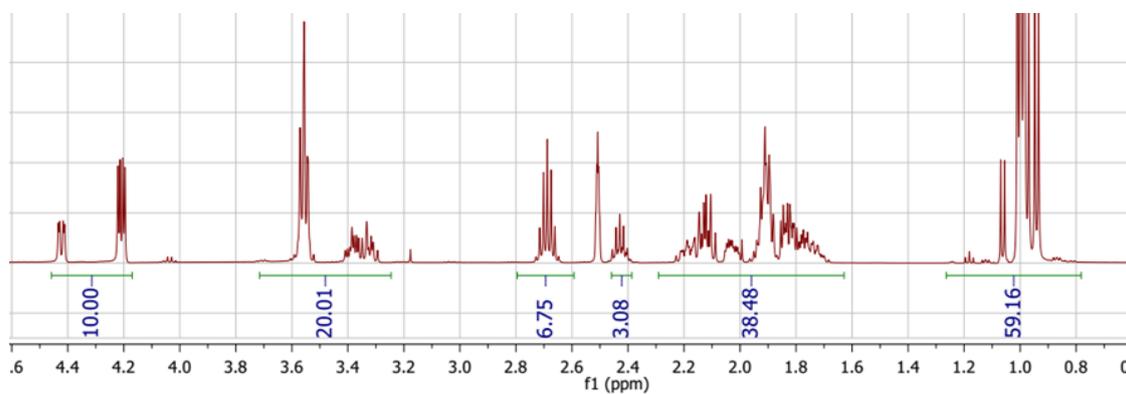
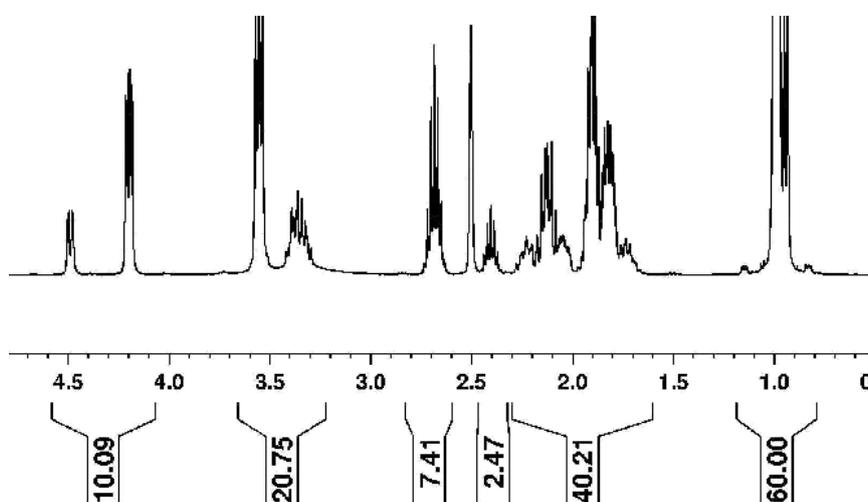
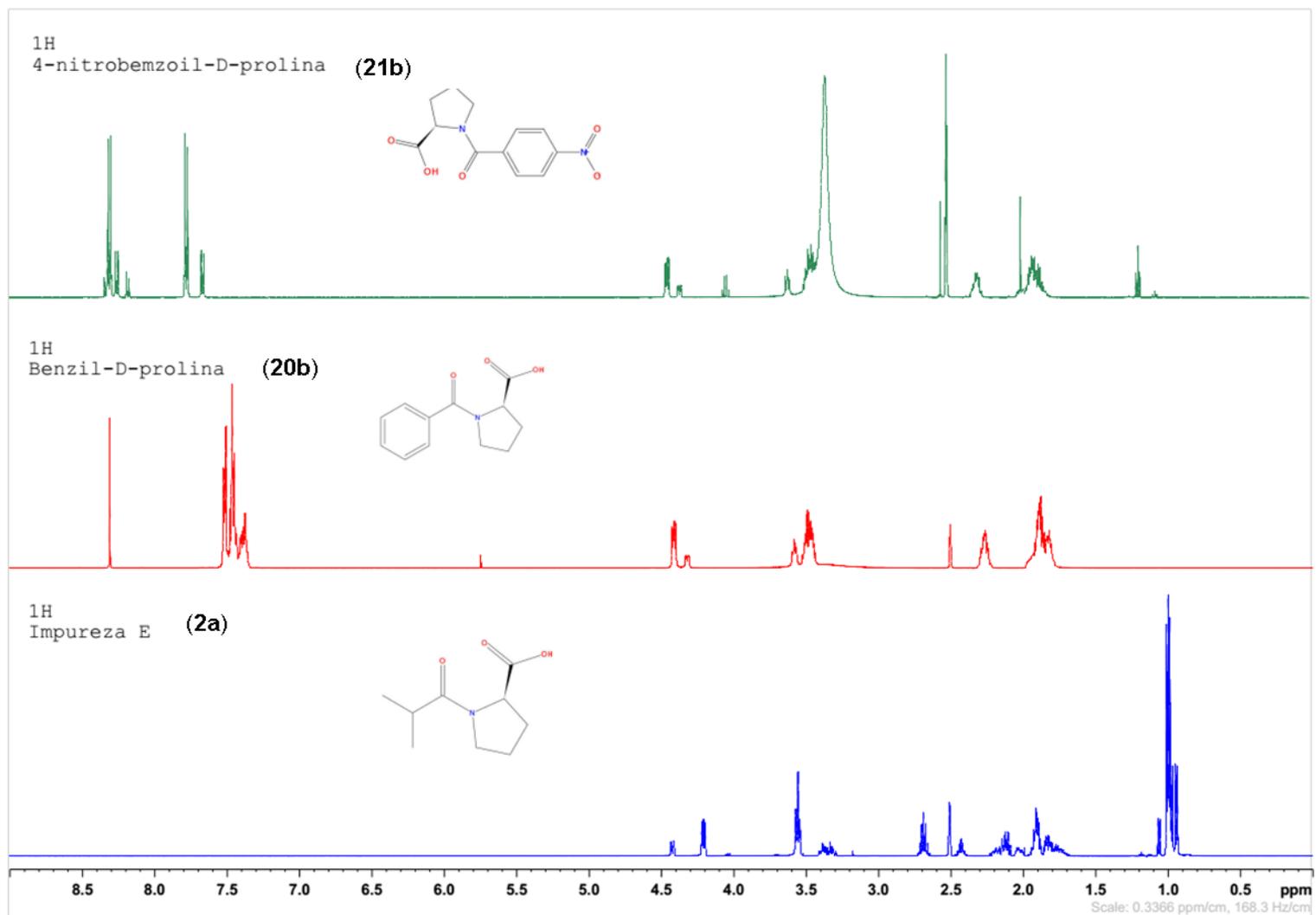


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da “Impureza E” comercial (400 MHz, CD_3SOCD_3).



Fonte: Adaptado de (“LGC Reference Standards”, 2015).

Figura 25. Espectros de RMN de ^1H : "Impureza E", Benzoil-D-prolina e 4-nitrobenzoil-D-Prolina (500 MHz, DMSO- d_6 , CDCl_3).

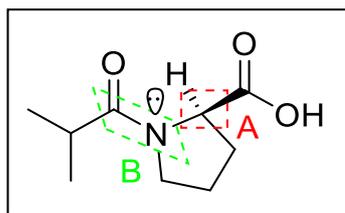
Os análogos apresentaram o mesmo comportamento estrutural comparados com a “Impureza E”, com isso fazendo-se necessário uma justificativa que poderia ocorrer com essas estruturas.

Para o espectro de RMN do composto **21b** os sinais que aparecem em aproximadamente 4,1 e 1,25 ppm podem ser atribuídos para sinais de acetato de etila, pois como descrito na metodologia foi um dos solventes utilizados na síntese.

Uma hipótese para a justificativa do problema pode ser discutida levando em consideração que a molécula apresenta um centro quiral, onde proporcionaria a presença de diferentes configurações e/ou a presença de um centro de inversão que propiciaria a presença de confôrmeros de inversão.

Tendo em vista que a molécula possui um centro de quiralidade, decorrente do carbono ligado ao grupo ácido (A) e um centro de interconversão oriundo da ligação amídica (B) (Figura 26), pode-se inferir a presença de diferentes configurações e/ou conformações.

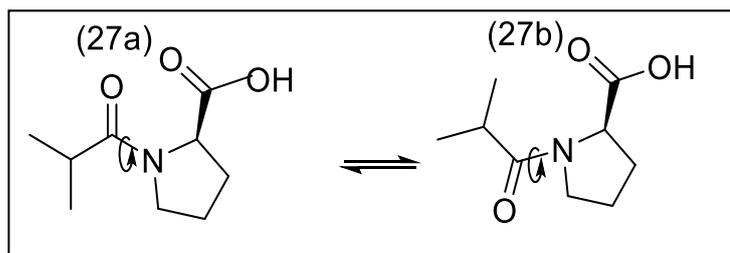
Figura 26. Centro de quiralidade (A) e centro de inversão (B) da “Impureza E”.



Uma vez que o centro quiral A foi pré-definido pela rota sintética, pois o mesmo é proveniente de um dos materiais de partida, a L-prolina, foi definido a estereoquímica ao produto. Dessa forma, desconsidera-se a possibilidade de diferentes configurações procedentes do centro quiral A.

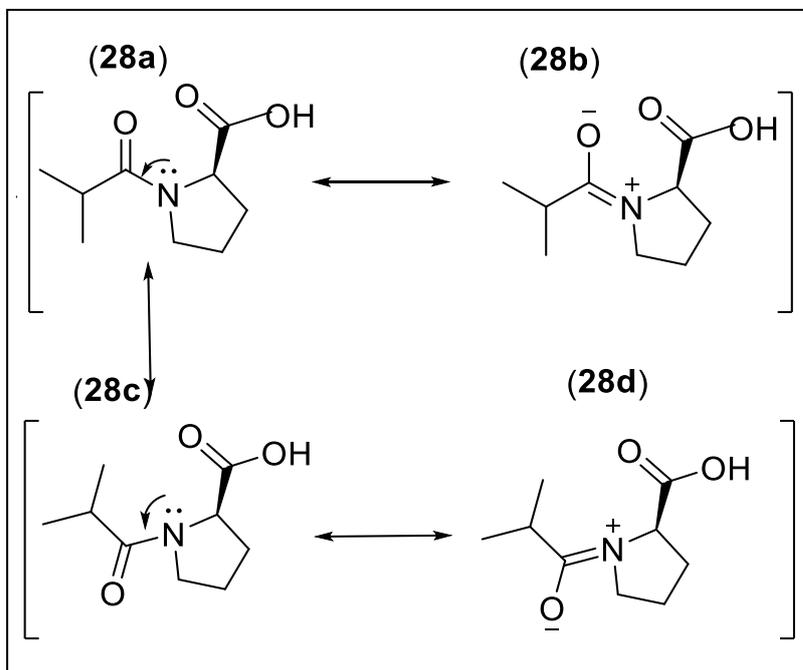
A ligação B apresenta possibilidade de rotação na ligação amídica (N-CO), por isso este é definido como um centro de inversão, sugerindo que a mudança conformacional seria procedente dessa ligação. Apesar da barreira energética dessa rotação ser alta em torno de 15-20 Kcal/mol (KEMNITZ; LOEWEN, 2007) a entropia do sistema pode interferir nessa conversão (Figura 27).

Figura 27. Representação dos possíveis confôrmeros da molécula “Impureza E”.



Além da rotação da ligação, o composto também apresenta a possibilidade de ressonância, através da ligação amídica, entre a carbonila e o nitrogênio. As estruturas de ressonância estão representadas na Figura 28.

Figura 28. Estruturas de ressonância.



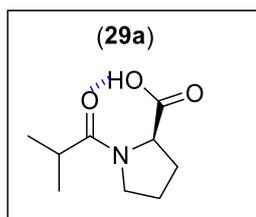
As estruturas de ressonância podem ser escritas como **28a**, **28b**, **28c** e **28d**. Nas estruturas **28b** e **28d**, observa que o par de elétrons do nitrogênio ressona para a formação de uma ligação dupla (C=N), promovendo uma mudança na hibridização do nitrogênio e conseqüentemente em sua geometria, na qual o nitrogênio parte de uma hibridização sp para uma sp^2 , e de uma geometria piramidal para planar, pela formação da ligação dupla (REKIS, 2017) (CASY E DEWAR, 1994).

Na busca de se estabelecer as conformações mais estáveis e que poderiam estar presentes em solução, foi necessário a avaliação de cada estrutura da Figura 28, apontando quais fatores interferiam na existência de cada conformação. Como no caso dos confôrmeros **28b** e **28d** nesse caso a presença das cargas nos átomos torna tais conformações instáveis. Assim, o que ocorre é uma predominância dos confôrmeros **28a** e **28c**, pois o nitrogênio com uma hibridização sp , possui um maior caráter s , o que estabiliza melhor essa ligação, e além de que a força da ligação π carbono-oxigênio é maior quando comparada com do átomo de nitrogênio, devido o oxigênio possuir ao maior caráter eletronegativo (LOPES et al, 2013).

As estruturas **28a** e **28c** são as prováveis conformações observadas em solução, as preferenciáveis dentro do equilíbrio, mas dentro desse equilíbrio uma delas é mais estável. Numa análise estrutural observa-se que a estrutura **28c** apresenta seus dois grupos volumosos em um mesmo plano, são eles a parte do ácido e as metilas, isso provoca um grande impedimento estérico, ocasionado pela repulsão entre esses dois grupos. O que torna tal conformação menos estável (LOPES et al, 2013).

Em contrapartida, a estrutura **28a**, exibe os grupos de maior volume em lados opostos, o que contribui para uma maior estabilidade. Além disso, estudos realizados por Batista (2017), com mais 150 compostos e seus confôrmeros mostra que, estruturas que permitem interações de hidrogênio tornam as estruturas mais estáveis e com maior proporção. Na estrutura **28a** os átomos estão dispostos de uma maneira que favorece esse tipo de interação, como observado na Figura 29.

Figura 29. Demonstração da possível interação de hidrogênio no confôrmero da Impureza E.



Foi necessário corroborar os dados com os espectros obtidos e identificar os sinais referentes de cada conformação. Ao realizar a integração do espectro obtido em $DMSO-d_6$, observou-se uma diferença proporcional como demonstra o Anexo – Figura 44, a proporção mostrou-se na razão de 1:2.

O primeiro passo para atribuir cada sinal ao seu respectivo próton, foi através dessas integrações, onde os que apresentavam maior proporção eram oriundos da mesma molécula (Anexo – Figura 42).

Os picos com maior proporção foram atribuídos ao confôrmero A e os de menor proporção ao confôrmero B. A Tabela 2 apresenta todos os prótons com seus referentes deslocamentos, cada próton está indicado na Figura 30.

Figura 30. Estrutura da “Impureza E” (19e) com prótons enumerados.

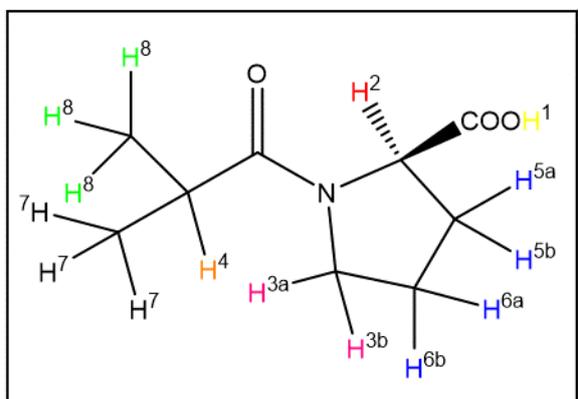


Tabela 2. Atribuição dos prótons no deslocamento químico (ppm), em DMSO-d₆, enumerados

	A	B
H1	12,44	
H2	4,21	4,42
H3	H3a H3b	3,55 3,36
H4	2,69	2,42
H5	H5a H5b	1,88 1,75
H6	H6a H6b	2,10 1,80
H7	1,01	0,99
H8	0,97	0,94

Os prótons H7 e H8 do grupo isopropil tratam-se de metilas, com ligações simples que possuem livre rotação (CALVIN E BUCKLES, 1940). Essa livre rotação ocorre de forma tão rápida que o equipamento de análise não é capaz de distinguir os prótons entre si e tampouco diferenciar o ambiente químico em que as mesmas estão, com isso, tais prótons são definidos como iguais (H7=H8). No espectro, se esperaria que as duas metilas originassem de dois dupletos, um para cada conformação,

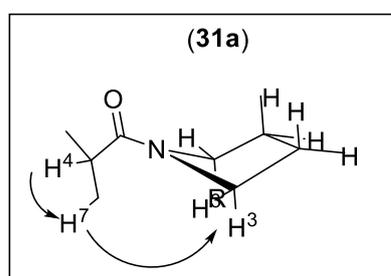
contudo o observado foram quatro dupletos, ou seja, independente da conformação na qual ela apresenta (maior ou menor proporção) a molécula estabilizou-se em uma conformação onde impossibilita a livre rotação das metilas, com isso as mesmas se fixam em ambientes químicos diferentes, sendo assim detectadas como não iguais pelo equipamento ($H7 \neq H8$).

Outro fator que também foi analisado e auxiliou na descrição dos picos de cada conformação foi a constante de acoplamento (J), que é a distância entre dois picos adjacentes no espectro, uma vez que prótons que se acoplam possuem o mesmo valor de acoplamento (TORMENA, 2016).

Para $H4$ e $H7$ ambos possuem valor de acoplamento $J = 6,7$ Hz, além disso no experimento 1H - 1H Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (NOESY) bidimensional (Figura 31) (Anexo – Figura 51) é evidente o acoplamento desses prótons, além disso é observado um acoplamento do $H2$ de maior proporção com $H5$ e $H6$.

No espectro de NOESY bidimensional (Anexo – Figura 52) é possível notar o acoplamento do $H3$ com as metilas (Figura 31), o acoplamento ocorre apenas nos prótons de maior proporção, esse tipo de acoplamento só é possível na estrutura conformacional (**28a**) através da posição do grupo isopropil. Com esses dados é possível afirmar que esses prótons pertencem à mesma molécula.

Figura 31. Demonstração acoplamento $H4$ com $H7$ e $H7$ com $H3$.



R: COOH

Os valores de acoplamento também podem ser atribuídos de acordo com a posição dos grupos no anel. O anel presente na estrutura possui 5 membros e pode se apresentar em uma conformação já descrita na literatura, que é a chamada

conformação envelope, como exposto na figura 31. Essa conformação é mais estável e nesse tipo de conformação os prótons tomam posições equatoriais e axiais como no cicloexano em suas conformações cadeira e bote, nesse caso as posições dos átomos ligados são denominadas como pseu-equatorial e pseu-axial, e podem acoplar entre si (CARBALLEIRA; PÉREZ-JUSTE; VAN ALSENOY, 2002).

Os valores de acoplamento são definidos pelas distâncias entre os sinais e os acoplamentos geminais são aqueles que possuem interação entre os prótons ligados ao mesmo átomo. Além desse tipo de acoplamento, ocorre também acoplamentos: axial-axial, axial-equatorial e equatorial-equatorial. A Tabela 3, apresenta alguns valores de acoplamento calculados teoricamente e os observados experimentalmente, que podem ser atribuídos a tais tipos de acoplamento (SILVERTEIN E WEBSTER, 2000).

Tabela 3. Valores de acoplamento calculados e observados experimentalmente para acoplamentos dos tipos: axial-axial, axial-equatorial e equatorial-equatorial.

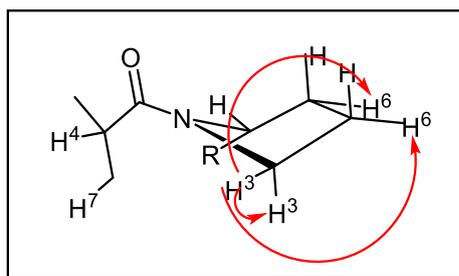
	J	J
	Calculado (Hz)	Observado (Hz)
Axial-axial	9	8 – 14 (8 – 10)*
Axial-equatorial	1,8	1 – 7 (2 – 3)*
Equatorial-equatorial	1,8	1 – 7 (2 – 3)*

Fonte (Adaptado): SILVERTEIN E WEBSTER, 2000.

*Valores usualmente encontrados

Com tais valores pré-estabelecidos é possível prever os valores de acoplamento dentro do anel. A Figura 32 demonstra os acoplamentos que podem ocorrer no anel. No espectro foram observados os valores de $J = 7,8$; $11,5$ e $6,7$ Hz.

Figura 32. Demonstração de acoplamentos vicinais e geminais.



R: COOH

Outro ponto importante para atribuição de cada sinal com seu respectivo próton é a posição do próton na molécula. Posições axiais/equatoriais ou pseu-axiais/equatoriais tem influência direta no valor do deslocamento químico. Alguns fatores que podem influenciar a variação desse valor de deslocamento é o efeito de blindagem e a posição do próton.

O efeito de blindagem se dá pela movimentação dos elétrons ao circulararem, assim criando seu próprio campo magnético posicionando contra o campo aplicado, dessa forma o campo criado pelos elétrons blindava o próton e faz com que o mesmo sinta menos o campo aplicado. Esse efeito está diretamente ligado com a densidade eletrônica, pois uma grande densidade de elétrons causa um maior efeito de blindagem, então prótons próximos a átomos eletronegativos tendem a apresentarem em regiões mais desblindadas (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Outro ponto que interfere no deslocamento químico é a orientação na qual a molécula recebe o campo aplicado, esse fato pode ser exemplificado pelo cicloexano em sua conformação cadeira, onde o eixo central do campo magnético incidido coincide com uma ligação simples carbono-carbono, criando o chamado efeito cone, onde os prótons dentro do cone de desblindagem encontram-se em regiões mais desblindadas e estes são os prótons em posições equatoriais (LAMBERT et al, 2011).

Esse fato pode ser também considerado para anéis de cinco membros com os pseu-equatorial e pseu-axial. Na "Impureza E" os prótons próximos as regiões de grande densidade eletrônica, átomos eletronegativos e em posições equatoriais são observados em regiões mais desblindadas. Isso pode ser visto no espectro onde os prótons próximos do ácido carboxílico, carbonila e nitrogênio estão em regiões mais

desblindadas e prótons pertencentes ao anel, os que estão em posições equatoriais apresentam-se em regiões de maior deslocamento químico (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; LAMBERT et al, 2011).

Através dessas análises, com a finalidade de atribuir cada pico ao seu próton e auxiliar na determinação da conformação, foi realizado também análise de Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) (Anexo – Figura 53 e 54) e Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) (Anexo – Figura 55), onde verifica-se o acoplamento dos prótons com os carbonos em curta e longa distância. Com os dados obtidos observou-se que os carbonos ligados aos prótons H5 e H6 são detectados como semelhantes, pois apesar dos mesmos serem quimicamente distintos, esses são magneticamente iguais. Com esses espectros é possível atribuir todos próton com seus respectivos carbonos de cada conformação.

Tais dados apresentados provam a existência das duas conformações em solução, evidenciando um equilíbrio líquido (LOPES et al, 2018). Essas duas conformações são decorrentes da interconversão da ligação amídica, atestando a existência de amido confôrmeros, e dessas a estrutura **28a** (Figura 28) apresenta-se como majoritária.

A existência de confôrmeros decorrentes dessa ligação amídica é citada na literatura (CASY E DEWAR, 1994; REKIS, 2016), onde é descrito que a rotação em torno do eixo da ligação N-C=O da ligação amídica envolve uma alta barreira energética, por isso é possível observar os sinais das duas conformações (MENG; SZOSTAK, 2018).

Com esse fato da existência das conformações devido essa alta barreira energética busca-se fatores que possam oferecer energia suficiente para alterar o equilíbrio conformacional e a proporção de população da conformação mais estável. Estudos que buscam variar a entropia do sistema podem auxiliar na compreensão e confirmação estrutural da molécula, evidenciando os fatores que nela interferem que posteriormente podem ser expandidos para outras moléculas que possuem o mesmo perfil.

A temperatura foi o primeiro parâmetro utilizado para oferecer energia suficiente para ultrapassar a barreira energética e as conformações se interconverterem, com isso a troca de uma para outra se tornaria cada vez mais

rápido, assim o sinal ficaria mais largo porque os picos coalesceriam (SONG et al, 2017).

Sendo assim, foram realizados testes variando a temperatura de 20°C até 80°C, em uma taxa de 20°C e analisado por RMN em solvente DMSO- d_6 (Anexo – Figura 46). De acordo com o aumento da temperatura esperava-se um decaimento do valor da proporção da conformação B e um aumento de A, pois A apresentou características de ser mais estável quando comparada com as demais, sendo assim preferível fixar em tal conformação (SONG, 2016). Entretanto, a variação de proporção foi mínima como observada na Tabela 4.

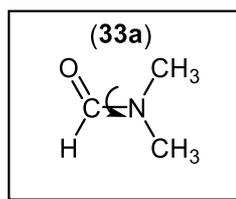
Tabela 4. Variação em porcentagem dos confôrmeros da “Impureza E” do captopril de acordo com a variação de temperatura (500Hz, CD_3SOCD_3).

	Conformação A	Conformação B
20°C	76,25%	23,75%
40°C	76,5%	24,6%
60°C	74,83%	25,17%
80°C	75,72%	24,72%

*Dados obtidos pelo monitoramento H2 e pela integração

Esses valores não corresponderam com o esperado, pois a medida que era fornecida energia para o sistema a barreira energética existente seria superada. Estudos realizados com aumento de temperatura com N,N-dimetilformamida, apresentaram ser necessário cerca de 100°C para rotacionar a ligação amídica. Essa temperatura ultrapassa uma barreira energética com cerca de 22 kcal.mol⁻¹ (LAMBERT et al., 2014). Comparando a estrutura química da N,N-dimetilformamida (Figura 33) com a da “Impureza E” observa-se uma grande diferença estrutural. A N, N-dimetilformamida apresenta um menor volume e menor efeito estérico, enquanto a “Impureza E” possui um maior volume e mais impedimento estérico, isso pode justificar o fato de essa temperatura não variar a proporção dos confôrmeros, pois seria necessária uma temperatura acima de 100°C para realizar a rotação da ligação amídica da “Impureza E”.

Figura 33. Estrutura N,N-dimetilformamida.



Testes com temperaturas inferiores à ambiente (-50°C) também foram realizados e analisados em RMN com solvente acetona- d_6 (Anexo – Figura 49).

Tabela 5. Variação em porcentagem dos confôrmeros da “Impureza E” do captopril de acordo com a variação de temperatura (600MHz, CD_3COCD_3).

Temperatura	Conformação A	Conformação B
23,5°C	81,54%	18,45%
0°C	83,06%	16,93%
-10°C	82,81%	17,18%
-20°C	83,02%	16,69%
-30°C	82,74%	17,26%
-40°C	83,08%	16,91%
-50°C	82,98%	17,01%

A diminuição da temperatura foi utilizada com intuito de favorecer uma das conformações, como relatado por Katritzky e colaboradores (2005) onde um dos compostos estudados coalesceram os picos em -116°C. Contudo, em alguns casos o que pode ocorrer é que de acordo com o decaimento da temperatura os solventes tendem a aumentar sua viscosidade, com isso, limitando o movimento dos compostos e não havendo variação de proporção, esse fato pode ser considerado na análise do composto em temperaturas negativas. Observou-se que não houve variação significativa de proporção entre as conformações.

A natureza do sistema soluto-solvente tem influência na proporção das populações conformacionais (LADD; JONES, 1967). Assim, foram propostos novos experimentos com a variação dos solventes deuterados que foram: DMSO- d_6 , acetona- d_6 , metanol- d_4 , clorofórmio- d_1 . A tabela 6 apresenta a estrutura química de cada um dos solventes como também sua constante dielétrica e deslocamento químico na análise de RMN (ppm) (Anexo – Figura 50). Foram utilizados solventes polares e apolares, como também próticos e apróticos, a fim de verificar a influência da natureza do solvente. A tabela 7 expõe as razões proporcionais encontradas de acordo com o solvente, e a tabela 8, a descrição de todos os prótons de acordo com o deslocamento.

Tabela 6. Relação de solventes deuterados usados na análise de RMN da “Impureza E”.

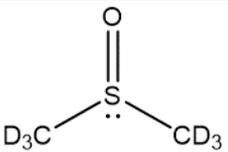
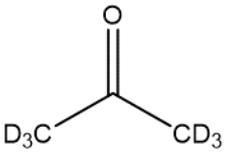
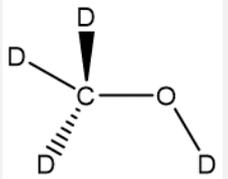
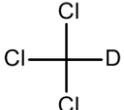
Solvente	Estrutura		Constante dielétrica	Densidade (g/mL)	Deslocamento químico (ppm)
DMSO-d_6		Polar aprótico	46,7	1,19	2,49
ACETONA-d_6		Polar aprótico	21	0,88	2,04
METANOL-d_4		Polar prótico	33	0,79	3,35; 4,78
CLOROFÓRMIO-d_1		Apolar	4,81	1,50	7,24

Tabela 7. Relação de proporção dos confôrmers da "Impureza E" de acordo com solvente.

	DMSO		Acetona		Metanol		Clorofórmio		Clorofórmio + Gotas de Água	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
H2	76,25%	23,75%	82,81%	17,18%	76,13%	23,87%	91,75%	8,25%	92,07%	7,92%

Tabela 8. Deslocamento químico dos prótons da "Impureza E" de acordo com solvente.

	DMSO		Acetona		Metanol		Clorofórmio		Clorofórmio + Gotas de Água		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
H1	12,44		11,31				8,5				
H2	4,21	4,42	4,44	4,59	4,39	4,59	4,58	4,45	4,57	4,46	
H3	H3a	3,55	3,36	3,67	3,47	3,64	3,3	3,62		3,62	
	H3b										
H4	2,69	2,42	2,77	2,51	2,85	2,54	2,72	2,47	2,72	2,47	
H5	H5a	1,88	1,75	2,08							
	H5b			2,08	2,33	2,28	1,97	2,31	2,03	2,32	2,03
H6	H6a	2,11	2,19	1,87							
	H6b	1,85	2,02								
H7		1,01	0,99	1,07	1,06	1,12	1,1	1,16	1,11	1,16	1,12
H8		0,97	0,94	1,04	1,01	1,08	1,06	1,16	1,13		1,11

*deslocamentos apresentados em ppm

O efeito do solvente provoca mudanças nas populações devido à variação da constante dielétrica do meio. Os solventes clorofórmio e clorofórmio + três gotas de água são os que mais favorecem a conformação majoritária. Apesar desses solventes possuírem propriedades distintas, todas foram capazes de restringir de forma majoritária a conformação mais estável.

Gellman e colaboradores (1991) afirma que a polaridade do solvente está diretamente ligada a formação de ligação de hidrogênio intramolecular e em solventes mais polares diminui a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio. O solvente que menos solvata a molécula é o clorofórmio, devido a sua baixa polaridade quando comparado com os demais solventes. O fato desse solvente solvatar menos significa que ele possui uma menor interação com a molécula, com isso as interações soluto-solvente são menos significativas (interações intermoleculares), e a molécula busca interações intramoleculares afim de se estabilizar (ABRAHAM et al, 1980; NOME, R. A., 2010).

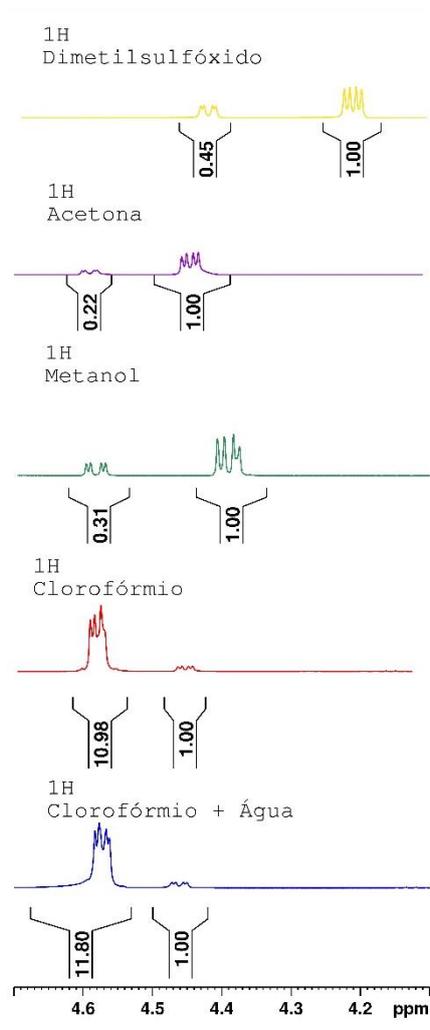
As ligações de hidrogênios são algumas das principais interações responsáveis pela estabilização de moléculas e confôrmeros. Como a molécula está menos solvatada o H1 fica livre para fazer uma ligação de hidrogênio com o oxigênio pertencente a carbonila amídica. Para que ocorra essa interação, o grupo ácido que está em uma posição mais equatorial, se desloca para uma região mais axial, conseqüentemente o H2 toma uma posição mais equatorial, favorecendo a interação de ligação de hidrogênio (BUCKINGHAM et al, 1960; BARBAS et al, 2013)

Essa mudança de posições também provoca uma torção do anel, acarretando na inversão das posições axiais e equatoriais dos prótons do anel, isso pode ser evidente quando observado o espectro em clorofórmio. Todos os prótons ligados ao anel invertem de posição quando comparados aos demais solventes. Como exemplo, o H2 em clorofórmio (Figura 32) inverte a posição, ou seja, a conformação que permitiu essa ligação de hidrogênio, gerou uma mudança do H2 para posição equatorial ocasionando uma mudança do deslocamento químico para regiões desblindadas.

Essa ligação de hidrogênio intramolecular justifica o clorofórmio ser o solvente que melhor favorece a conformação mais estável. Esses dados também

são observados no espectro em clorofórmio + gotas de água, só não sendo possível observar o próton da hidroxila. Contudo não se pode inferir conclusões pela presença da água uma vez que essa análise foi realizada com apenas algumas gotas de água na solução de clorofórmio, pois para realizar a análise somente em água seria necessário um tratamento prévio para ajuste de pH, com isso pode-se concluir que nesse caso o solvente clorofórmio prevalece com suas propriedades intrínsecas gerando respostas semelhantes quando comparado com o espectro apenas com clorofórmio.

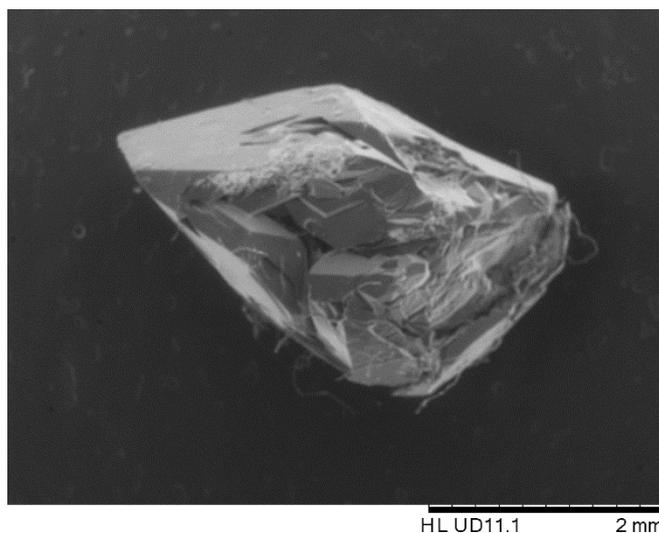
Figura 34. Demonstração de inversão de prótons em clorofórmio.



Com isso é possível concluir que a barreira energética existente entre as duas conformações pode ser superada dependendo do solvente usado. Solventes menos polares possuem um menor grau de solvatação e permitem ligação de hidrogênio intramolecular, o que torna o composto mais estável e, portanto, a estrutura mais estável é a **28a**, pois é única que possui geometria que propicia esse tipo de interação.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou que o composto foi obtido em forma de cristal (Figura 35).

Figura 35. MEV do cristal obtido da “Impureza E”.



O cristal foi submetido a análise por difração de Raios-X com o intuito de verificar se as duas conformações teriam cristalizado e se as estruturas corroboram com as estruturas propostas através dos espectros de RMN.

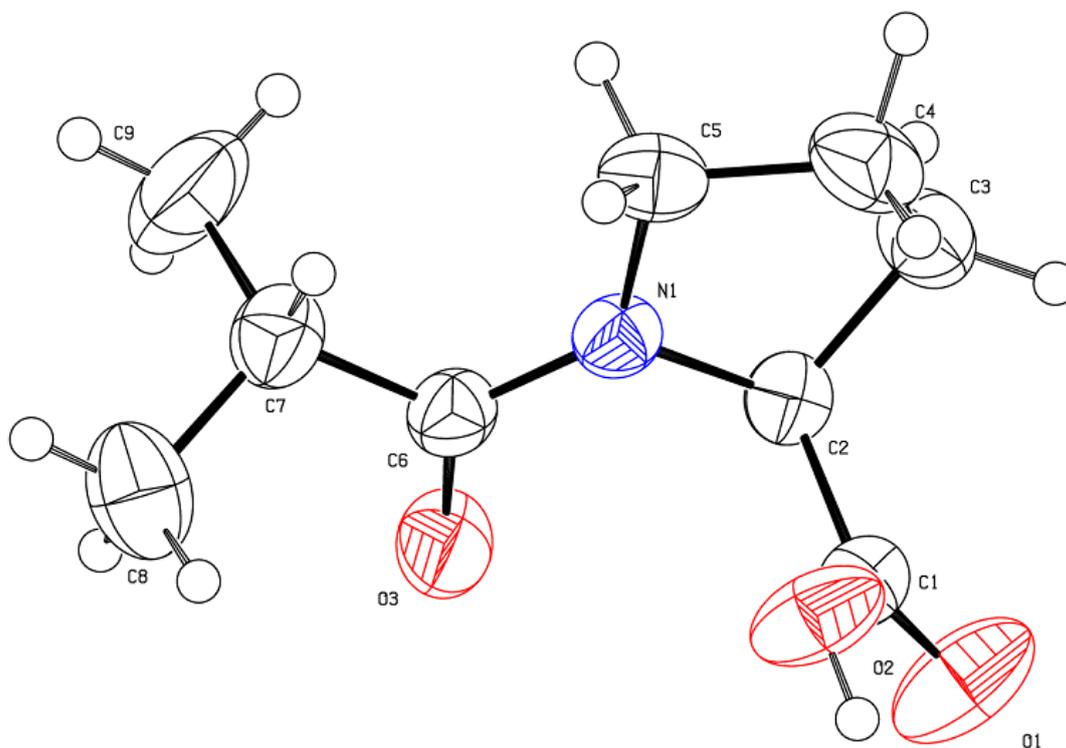
Os parâmetros da cela unitária obtidos, assim como os demais dados cristalográficos, estão apresentados na tabela 9, os demais dados cristalográficos encontram-se em anexo (Anexo – Tabelas 11, 12, 13 e 14).

Tabela 9. Principais dados cristalográficos e refinamento "Impureza E".

Fórmula empírica	C₉ H₁₅ N O₃	
Massa molecular	185,22(g/mol)	
Temperatura	293(2) K	
Comprimento de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Ortorrômbica	
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Dimensões cela unitária	$a = 8,5251(5) \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 10,6024(5) \text{ \AA}$	$\beta = 90^\circ$
	$c = 10,9335(6) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Volume	988,24(9) Å ³	
Z	4	
Densidade (calculada)	1,245 Mg/m ³	
Coeficiente de absorção	0,093 mm ⁻¹	
F(000)	400	
Intervalo de θ	2,676 a 34,483°,	
Intervalo de índices	-13 ≤ h ≤ 13, -16 ≤ k ≤ 16, -17 ≤ l ≤ 16	
Reflexões coletadas	20411	
Reflexões independentes	4020 [R _(int) = 0,0247]	
Completeza para $\theta = 25,242^\circ$	100,0 %	
Dados/ restrições/ parâmetros	4020 / 0 / 121	
GOF (Goodness-of-fit) em F²	1,028	
Índices de R final [$I > 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0,0438, wR ₂ = 0,1107	
Índices de R (Todos os dados)	R ₁ = 0,0706, wR ₂ = 0,1290	
Parâmetro de estrutura absoluta	-0,4(3)	
Coeficiente de extinção	n/a	
Densidade residual máx. e min.	0,209 e -0,169 e.Å ⁻³	

O composto cristalizou-se em um grupo espacial ortorrômbico não-centrossimétrico $P2_1P2_1P2_1$. A Figura 36 apresenta o Ortep da estrutura.

Figura 36. Ortep “Impureza E”.



Na análise da estrutura cristalina os átomos de carbono ligados diretamente ao nitrogênio do anel pirrolidínico são coplanares, de modo que não é possível observar diferenças estereoquímicas deste átomo. A estrutura da rede cristalina apresenta ligação de hidrogênio O-H \cdots O intermolecular forte, como mostrado na Figura 37a, resultando na formação de uma hélice ao longo do eixo b (Figura 37). Hélices adjacentes do composto são mantidas através de interações intramoleculares fracas C – H \cdots O (Figura 37b). Desta forma, o empacotamento cristalino da “Impureza E” é composto por hélices do composto empilhadas ao longo do eixo a. A Tabela 10 apresenta as ligações de hidrogênio.

Figura 37. Interações Intermolecular da “Impureza E”

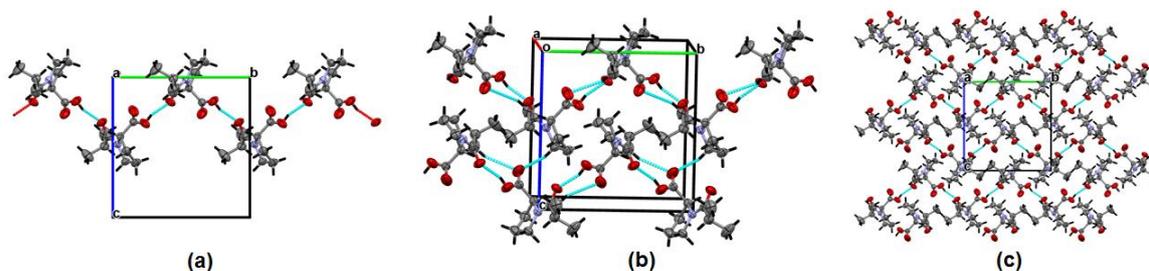


Tabela 10. Ligações de hidrogênio “Impureza E”

Interação	D...H(Å)	D...A(Å)	H...A(Å)	D-H...A(°)	Códigos de simetria
O2-H2...O3	0,938	2,609(1)	1,724	156,17	-x,+y+1/2,-z+1/2
C5-H5B...O1	1,080	3,356(2)	2,508	134,71	-x-1/2,-y,+z+1/2
C8-H8...O1	1,080	3,469(1)	2,437	159,58	-x,+y-1/2,-z+1/2
C2-H2A...O1	1,080	2,689(2)	2,531	86,44	intramolecular
C8-H8A...O3	1,080	2,836(2)	2,630	89,59	Intramolecular

Através desses dados comprova-se que em estado sólido existe apenas uma única conformação, sendo esta a conformação mais estável. Já em estado líquido há um equilíbrio das conformações existente decorrente da rotação da ligação amídica. As duas conformações existentes são **28a** e **28b**, onde a **28a** é a mais estável.

Além disso, foram realizadas análises de termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), a fim de verificar a estabilidade da Impureza. Através da derivada da análise de TGA foi possível observar que o composto em atmosfera de nitrogênio apresentou maior pico de perda de massa em aproximadamente 250°C, sendo que nessa temperatura havia cerca de 40% da massa analisada do produto (Figura 38), enquanto que frente ao oxigênio a amostra apresentou o maior pico de perda de massa em torno de 245°C, e nessa temperatura a massa restante do produto era equivalente a apenas 20% da massa total analisada (Figura 39). Ambas análises demonstraram apenas uma perda de massa. A análise termogravimétrica mostrou que em atmosfera inerte

de nitrogênio o composto possui maior estabilidade quando comparada com a estabilidade frente a atmosfera de oxigênio.

Figura 38. Análise de TGA da "Impureza E" em atmosfera de nitrogênio.

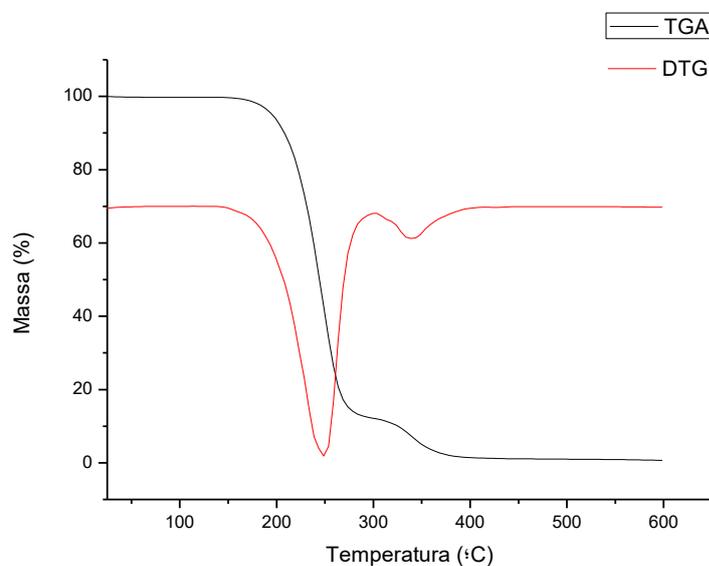
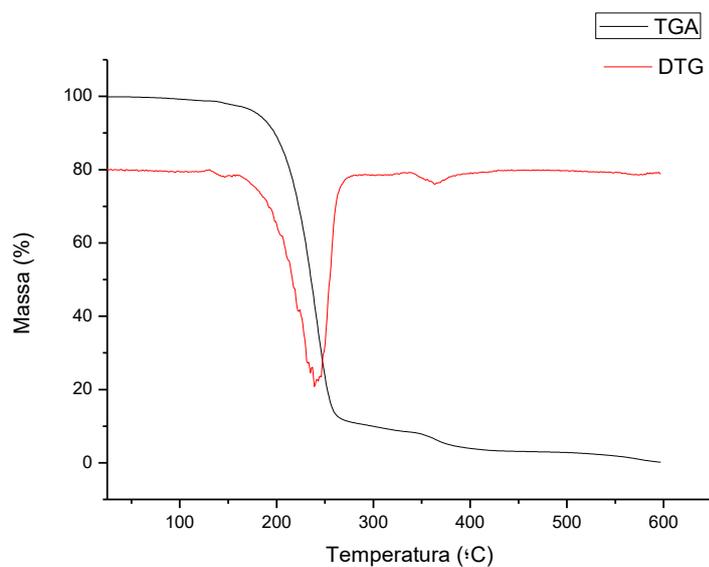
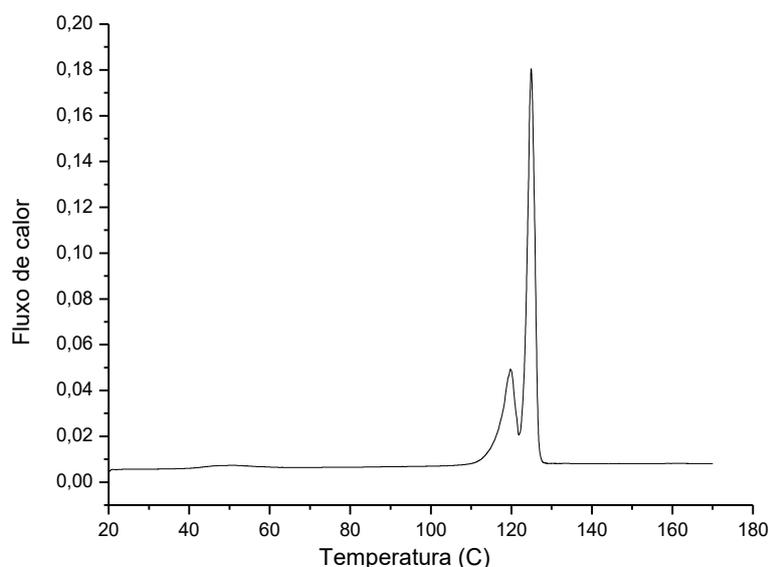


Figura 39. Análise de TGA da "Impureza E" em atmosfera de oxigênio.



A análise de calorimetria diferencial por varredura (DSC) (Figura 40) apontou que o ponto de fusão da “Impureza E” é em torno de 124°C, mostrando-se diferente do valor apresentado do certificado de análise do mesmo composto que apresentou aproximadamente 84°C (LGC Reference Standards, 2015). Essa discussão deve levar em consideração que a “Impureza E” sintetizada foi analisada em sua forma cristalina, o que pode alterar tal temperatura. Observa-se também que em torno de 119°C é apresentado outro pico.

Figura 40. DSC “Impureza E”.



Entende-se que a técnica de DSC pode determinar o ponto de fusão do composto, isso acontece em uma programação controlada de temperatura, onde é fornecida energia em forma de aquecimento para o composto e a referência utilizada. Qualquer mudança detectada pelo equipamento é computada, contudo não necessariamente pode ter ocorrido a fusão, dessa forma, como o material está em sua forma cristalizada, pode ocorrer que ao fornecer energia para o sistema pode ocasionar mudanças conformacionais na molécula.

A primeira isoterma é proposta como a rotação da ligação amídica, essa rotação foi possível pela energia fornecida em forma de aquecimento para

o sistema com a variação da entropia. A segunda isoterma é determinada como o ponto de fusão.

6 CONCLUSÃO

Estudos de degradação forçada de fármacos, assim como seus respectivos produtos de degradação, são de suma importância pois possibilitam uma maior compreensão em relação a estabilidade do medicamento disponibilizado no mercado e conseqüentemente a segurança e eficácia do mesmo.

A “Impureza E” em específico possui um problema estrutural decorrente da ligação amídica. A ligação amídica está presente em diversos compostos com inúmeras aplicações, assim sendo, a resolução de problemas relacionados a especificidade de tal ligação torna-se um interesse comum de diversas áreas.

Com esses estudos pode-se inferir que a ligação amídica propicia a formação de amido confôrmeros, que podem ser visualizadas por técnica espectroscópica de RMN. A diferença populacional dos confôrmeros em solução é algo intrigante, pois os mesmos não superam a barreira energética, contudo, o uso de solventes mais apolares, que permitem a ligação de hidrogênio intramolecular, estabilizam a conformação mais estável e fornecem energia suficiente para ultrapassarem a barreira energética de rotação da ligação C-N. Na análise cristalográfica foi possível afirmar que em sistema cristalino existe apenas uma conformação e a estrutura presente no cristal corrobora com a estrutura proposta como mais estável em solução, sendo a **28a**. Com as análises térmicas foi possível concluir que a “Impureza E” é estável até aproximadamente 250°C e que ela se funde em torno de 120°C, contudo antes dessa temperatura de fusão é observado em 119°C um pico proposto como a energia necessária para a rotação da ligação amídica.

Esse trabalho pode ser utilizado como base para estudos posteriores com compostos que possuem a presença da ligação amídica com parâmetros de estudos para uma fixação estrutural.

Esse estudo será concluído com cálculos teóricos com a finalidade justificar teoricamente o observado nos experimentos e quantificar a barreira energética existente entre as conformações.

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M. H.; NASEHZADEH, A.; COOK, M. J.; KABERIA, F. Solvent effects on the cis- and trans-4-t-butylcyclohexanol equilibrium by a new method, using gas-chromatographic head-space analysis. **Journal Of The Chemical Society, Chemical Communications**, n. 7, p.312-313, 1980.

Agilent, CrysAlis PRO, in: A. Technologies (Ed.), Yarnton, England., 2010.

ALCÂNTARA, F. C.; RESCIA, V. C.; SANTOS, M. A. Testes de degradação forçada para fármacos e medicamentos. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 5, p. 48, 2013.

ALLEN, F. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. **Acta Crystallogr.**, Sect. B., v. 58, p. 380-388. 2002.

AMETA, S. C.; PUNJABI, P. B.; AMETA, R.; AMETA, C. **Microwave-assisted Organic Synthesis: A Green Chemical Approach** Canadá: Apple Academic Press, Inc, 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Breve histórico das sqr no Brasil**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/breve-historico-das-sqr-no-brasil>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Diário Oficial da União. Resolução RDC N° 60, de 10 de outubro de 2014.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC N° 45, de 09 de agosto de 2012. **Estudos de estabilidade – IFA**. p. 1–8.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC N° 58, de 20 de dezembro de 2013.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC N° 53, de 04 de dezembro de 2015.

BARBAS, R.; PROHENS, R.; BARDIA-FONT, M.; BAUZÁ, A.; FRONTERA, A. Hydrogen bonding versus π -interactions: their key competition in sildenafil solvates. **Crystengcomm**, v. 20, n. 32, p.4526-4530, 2018.

BARTON, D. H. R. The conformation of the steroid nucleus. **Experientia**, v. 6, n. 8, p. 316–320, 1950.

BHANJA, C; JENA, S. Synthetic Protocols of a Top-Selling Anti-Hypertensive Drug 'Captopril': A Synthon Disconnection Approach. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, 2012.

BLESSY, M.; PATEL, RUCHI D.; PRAJAPATI, PRAJESH N.; AGRAWAL, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014.

BOJARSKA, J., MANIUKIEWICZ, W., FRUZINSKI, A.; SIERON, L.; REMKO, M. Captopril and its dimer captopril disulfide: comparative structural and conformational studies. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 71, n. 3, p.199-203, 2015.

BRASIL. Departamento de informática do SUS. **Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde..** Disponível em: <http://cnes.datasus.gov.br/Mod_Hospitalar.asp?VCom, 2015> Acesso em : 22 fev. 2018.

BUCKINGHAM, A. D.; SCHAEFER, T.; SCHNEIDER, W. G. Solvent Effects in Nuclear Magnetic Resonance Spectra. **The Journal Of Chemical Physics**, v. 32, n. 4, p.1227-1233, 1960.

CALVIN, M.; BUCKLES, R. E. The Freedom of Rotation about the Carbon-Carbon Double Bond. Certain Substituted Stilbenes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 62 (12), pp 3324–3328, 1940.

CARBALLEIRA, L.; PÉREZ-JUSTE, I.; VAN ALSENOY, C. Theoretical study of pyrrolidine: Revised conformational energies and vibrational assignments. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, n. 15, p. 3873–3884, 2002.

CARROLL, W. R.; GARDNER, D. M.; MELTON, E. R.; MURPHY, S. T.; BUCKNER, A. K.; FULMER, M. S.; QUALLS, W. G.; LISIC, E. C. ^1H , ^{13}C , and ^{15}N NMR conformational characterization of a series of 2-acetylthiazolethiosemicarbazone compounds. **Journal of Molecular Structure**, v. 1157, p. 8-13, 2018.

CASY, A. F.; DEWAR, G. H. Captopril and its probable contaminants: NMR and MS features of analytical value. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 12, n.º. 7, p. 855-861, 1994.

CORRÊA, R. S. **Xantonas oxigenadas bioativas: cristalização. Estrutura e suas interações intra e intermoleculares.** Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos. São Carlos, 2009.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589–592, 1991.

DBH. Capítulo 6: tratamento medicamentoso. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 17, n. 1, p. 31–43, 2010.

DENNIS HALL, C. Low-temperature ^1H and ^{13}C NMR spectra of N-substituted 1,2,3,4-tetrahydropyrazino[1,2-a]indoles. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 351–358, 2005.

DIAS, L. D.; GONÇALVES, K. H. E.; QUEIROZ, J. E.; VERDE, G. M. V.; AQUINO, G. L. B. An eco-friendly and alternative method of forced degradation of fluoroquinolone drugs by microwave irradiation: a new application for analytical eco-scale. **Journal Of Microwave Power And Electromagnetic Energy**, p.1-20, 2018. DOI: [10.1080/08327823.2018.1494470](https://doi.org/10.1080/08327823.2018.1494470)

DÍAZ-ORTIZ, Á.; PRIETO, P.; HOZ, A. D. L. A. Critical Overview on the Effect of Microwave Irradiation in Organic Synthesis. **The Chemical Record**, v. 18, p.1-14, 2018.

DOLOMANOV, O. V.; BOURHIS, L. J.; GILDEA, R. J.; HOWARD, J. A. K.; PUSCHMANN, H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. **Journal of Applied Crystallography**, v. 42, p. 339-341, 2009.

ELIEL, E. L.; KNOEBER, C. M. Conformational Analysis. XVI. 1, 3-Dioxanes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 90, n. 13, pp 3444–3458, 1968.

EMSLEY, J.; WILLIAMS, J. K. The Phosphorus-Nitrogen Bond. Synthesis, Characterization, and Infrared Studies of Heterocyclic Phosphoryl (Phosphetan) Amides. **J. Chem. Soc., Dalton Trans.**, p. 1576-1581, 1973.

FARRUGIA, L. J. J. ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). **Appl. Crystallogr.**, v. 30, n. 5, p. 565, 1997.

FARRUGIA, L. J. J. WinGX and ORTEP for Windows: an update **Appl. Crystallogr.**, n. 45, p. 849–854, 2012.

FERREIRA, S. H.; BPF, D. A. B. Aos inibidores da ECA. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, n. 25, p. 25–27, 1949.

FRANCO, M. L. **Análise Conformacional e Correções Térmicas em Moléculas de Cicloalcanos e Etano-Substituídos**. Tese (doutorado) - Instituto de Ciências Exatas Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

FRANCO, M. L.; FERREIRA, D. E. C.; SANTOS, H. F.; ALMEIDA, W. B. . Ab Initio Highly Correlated Conformational Analysis of 1,2-Difluoroethane and 1,2-Dichloroethane. **J. Chem. Theory Comput.**, n. 4, p. 728–739, 2008.

GARRIC, J.; LÉGER, JM.; GRELARD, A.; OHKITA, M.; HUC, I. Solid state and solution conformation of 2-pyridinecarboxylic acid hydrazides: a new structural motif for foldamers. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 7, p.1421-1424, 2003.

GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, M.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n.3, p 279-282, 1986.

GELLMAN, S. H., DADO, G. P., LIANG, G., ADAMS, B. R. **Conformation-directing effects of a single intramolecular amide-amide hydrogen bond: variable-temperature NMR and IR studies on a homologous diamide series.** Journal Of The American Chemical Society, v. 113, n. 4, p.1164-1173, 1991.

GHIVIRIGA, I.; CZERWINSKI, E. W.; BALABAN, A. T. Rotation Barriers in Pyridinium Salts Depend on the Number of Available Ground State Conformations. **Croatica Chemica Acta**, v. 77, n. 1–2, p. 391-396, 2004.

GIGUERE, R. J.; BRAY, T. L.; DUNCAN, S. M. Application of comercial microwave ovens to orfanic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. .41, p. 4945-4948, 1986.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, n. 248, p. 1-59, 1995.

GRABSKA, J.; BÉC, K. B.; OZAKI, Y.; HUCK, C. W. Temperature Drift of Conformational Equilibria of Butyl Alcohols Studied by Near-Infrared Spectroscopy and Fully Anharmonic DFT. **J. Phys. Chem. A**, n. 121, p. 1950–1961, 2017.

HOFFMANN, R. W.; LAZARO, M. A.; CATURLA, F.; FRAMERY, E. Conformational Analysis of (R, S)-4-Amido-2,4-dimethyl-butyric Acid Derivatives. **Tetrahedron Letters**, n. 40, p. 5983-5986, 1999.

HU, F.; LALANCETTE, R.; SZOSTAK, M. Structural Characterization of N-Alkylated Twisted Amides: Consequences for Amide Bond Resonance and N–C Cleavage. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 16, p.5062-5066, 2016.

KATRITZKY, A. R.; AKHMEDOV, N. G.; MYSHAKIN, E. M.; VERMA, A. K.; DENNIS HALL, C. Low-temperature¹H and¹³C NMR spectra ofN-substituted

1,2,3,4-tetrahydropyrazino[1,2-a]indoles. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 351–358, 2005.

KAPPE, C. O.; FABIAN, W. M. F.; SEMONES, M. A.; Conformational analysis of 4-aryl-dihydropyrimidine calcium channel modulators. A comparison of ab initio, semiempirical and X-ray crystallographic studies. **Tetrahedron**, v. 53, n. 8, p.2803-2816, 1997.

KHARISSOVA, O. V.; KHARISOV, B. I.; VALDÉS, J. J. R.. Review: The Use of Microwave Irradiation in the Processing of Glasses and Their Composites. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 4, p.1457-1466, 2010.

KEMNITZ, C. R.; LOEWEN, M. J. Amide Resonance” Correlates with a Breadth of C–N Rotation Barriers. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 129, n. 9, p.2521-2528, 2007.

LADD, J. A.; JONES, V. I. P. Solvent effects in the PMR spectra of pyridines. **Spectrochimica Acta**, v. 23A, p. 2791- 2795, 1967.

LAMBERT, J. B.; GRONERT, S.; SHURVELL, H. F.; LIGHTNER, D. A. Organic Structural Spectroscopy, **Pearson Education**, Second editon, 2011.

LAW, D.; ZHOU, D. Solid-State Characterization and Techniques. **Developing Solid Oral Dosage Forms**, p.59-84, 2017.

LEITE, F. Impurezas de Degradação: Farmacêutica e Química. Camoínas, SP: Editora Átomo, 2015.

LEVANDOWSKI, M. N. Estudo conformacional de derivados do ácido fenilacético empregando cálculos teóricos e as espectroscopias de ressonância magnética nuclear e infravermelho. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

LOPES, A. B., MIGUEZ, E., KUMMERLE, A. E., RUMJANEK, V. M., FRAGA, C. A. M., BARREIRO, E. J. et al. **Characterization of Amide Bond Conformers for a Novel Heterocyclic Template of N-acylhydrazone Derivatives**. *Molecules*, v. 18, n. 10, p.11683-11704, 2013.

LÜHKEN, A.; BADER, H. J. **Energy input from microwaves and ultrasound – examples of new approaches to green chemistry**. In Royal Society of Chemistry (ed.), *Green Chemistry*. Cambridge: Royal Chemical Society, 2003.

MACRAE, C.F.; BRUNO, I.J.; CHISHOLM, J.A.; EDINGTON, P.R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; RODRIGUEZ-MONGE, L.; TAYLOR, R.; VAN DE STREEK, J.;

WOOD, P.A. Mercury CSD 2.0 – new features for the visualization and investigation of crystal structures. **J. Appl. Crystallogr.**, n. 41, p. 466-470, 2008.

MAZUR, L.; SĄCZEWSKI, J.; JARZEMBSKA, K. N.; SZWARC-KARABYKA, K.; PAPROCKAE, R.; MODZELEWSKA-BANACHIEWICZE, B. Synthesis, structural characterization and reactivity of new trisubstituted N1acylamidrazones: solid state and solution studies. **CrystEngComm**, v. 20, p. 4179 –4193, 2018.

MENG, G.; SZOSTAK, M. N-Acyl-Glutarimides: Privileged Scaffolds in Amide N–C Bond Cross-Coupling: Privileged Scaffolds in Amide N-C Bond Cross-Coupling. **European Journal Of Organic Chemistry**, v. 2018, n. 20-21, p.2352-2365, 2018.

MONSON, R. S. Advanced Organic Synthesis. Methods and Techniques. **J. Chem. Educ.**,v. 49, n. 7, p A397, 1972.

MOREIRA, C. Análise Conformacional e estudo das interações eletrônicas de algumas α -fenilselena- α -dietóxi fosforilacetofenonas para-substituídas. Tese (mestrado). Universidade São Paulo. São Paulo, 2006.

MORITA, H.; KAYASHITA, T.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SHIRO, M. Conformation of cyclic heptapeptides: solid and solution state conformation of yunnanin A. **Tetrahedron**, v. 53, n. 5, p.1607-1616, 1997.

NATESH, R.; SCHWAGER, S. L. U.; EVANS, H. R.; STURROCK, E. D.; ACHARUA, R. Structural Details on the Binding of Antihypertensive Drugs Captopril and Enalaprilat to Human Testicular Angiotensin I-Converting Enzyme. **Biochemistry**, v.43, p. 8718-8724, 2004.

NEGRELLI, M. **Análise conformacional do cis e trans 2-hidroxícicloexanocarboxilato de etila**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

NETO, A. C. **Estudos conformacionais de lactonas sesquiterpênicas e compostos relacionados**. 2006. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

NOMÉ, R. A. J. Ultrafast Dynamics of Solvation: the Story so far. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 12, 2189-2204, 2010.

OLIVEIRA, C. DE. Síntese de Compostos Peptidomiméticos Contendo Resíduos dos Aminoácidos Histidina , Tirosina e Aspartato . Dissertação (graduação), Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Dados Estatísticos: Mortalidade por hipertensão. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/hipertensao>> Acessado em 20 de novembro de 2018.

PATLAK, M. From Viper's Venom to Drug Design: Treating Hypertension. **Breakthroughs in Bioscience**, 1-13, 2003.

PLATZER, N.; BOUCHET, J. P.; VOLLAND, J. P. Structural and Conformational Analysis by ^1H NMR and ^{13}C NMR of a New Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitor, the *tert*-Butylamine Salt of (2S)-2-[(1S)-1-Carboxybutylamino]-1-oxopropyl- (2S,3aS,7aS) perhydroindole- 2-carboxylic acid (Perindopril). **Magnetic Resonance in Chemistry**, n.26, p. 296-302, 1988.

RABENSTEIN, D. L.; ISAB, A. A. Conformational and Acid-Base Equilibria of Captopril in Aqueous Solution. **Anal. Chem.**, n. 54, p. 526-529, 1982.

RABENSTEIN, D. L.; THERIAULT, Y. A nuclear magnetic resonance study of the formation and conformational equilibria of symmetrical and mixed disulfides of captopril. **Can. J. Chem.**, n. 63, p. 33, 1985.

SAATORI, SM.; PEREZ, T. J.; GRAHAM, S. M. Variable-Temperature NMR Spectroscopy, Conformational Analysis, and Thermodynamic Parameters of Cyclic Adenosine 5'-Diphosphate Ribose Agonists and Antagonists. **The Journal Of Organic Chemistry**, v. 83, n. 5, p.2554-2569, 2018.

SHELDRICK, G. M. A short history of *SHELX*. **Acta Crystallographica**, Section A64, p. 112, 2008.

SHEN, S.; YANG, X.; SHI, Y. Application of quantitative NMR for purity determination of standard ACE inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n.114, p.190-199, 2015.

SHI, S.; SZOSTAK, M. Efficient Synthesis of Diaryl Ketones by Nickel-Catalyzed Negishi Cross-Coupling of Amides by Carbon-Nitrogen Bond Cleavage at Room Temperature Accelerated by a Solvent Effect. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, n. 30, p.10420-10424, 2016.

SHIMAZAKI, M.; HASEGAWA, J.; KAN, K.; NOMURA, K.; NOSE, Y.; KONDO, H.; OHASHI, T.; WATANABE, K. Synthesis of captopril starting from an optically active BETA hydroxy acid. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 9, p. 3139-3146, 1982.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. **LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.**: Rio de Janeiro, RJ. Sexta edição, 2000.

SONG, X.; TAN, H.; YAN, H.; CHANG, Y. Structural analysis of N , N -diacyl-1,4-dihydropyrazine by variable-temperature NMR and DFT calculation. **Journal Of Molecular Structure**, v. 1134, p.606-610, 2017.

SOUZA, M. C. **Análise Estrutural de complexos de Zn com Inibidores da Enzima Carboxipeptidase – ECA**. 2015. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas, Juiz de Fora, 2015.

TAVARES, M. T.; PRIMI, M. C.; POLLI, M. C.; FERREIRA, E. I.; FILHO, R. P. Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Quim. Nova**, v. 38, n. 8, p. 1117-1124, 2015.

THOMAS, S. P.; SPACKMAN, M. A. The Polymorphs of ROY: A Computational Study of Lattice Energies and Conformational Energy Differences. **Aust. J. Chem.**, n. 71, p. 279–284, 2018.

TORMENTA, C. F. Conformational analysis of small molecules: NMR and quantum mechanics calculations. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, n. 96, p. 73–88, 2016.

VARMA, R. S. Solvent-free organic syntheses. **Green Chemistry**, v. 1, n. 1, p.43-55, 1999.

WHO, World Health Organization. Statistics Database: World Heart Day. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/world-heart-day/en/> Acessado em 20 de novembro de 2018.

WIBERG, K. B. The Interaction of Carbonyl Groups with Substituents. **Acc. Chem. Res.**, n. 32, p. 922-929, 1999.

ZAMARBIDE, G. N.; ESTRADA, M. R.; ZAMORA, M. A.; TORDAY, L. L.; ENRIZ, R. D.; VERT, F. T.; CSIZMADIA, I. G. An ab initio conformational study on captopril. **Journal of Molecular Structure (Theochem)** 666–667, 599–608, 2003.

8 ANEXOS

Figura 41. CG da "Impureza E" (2a).

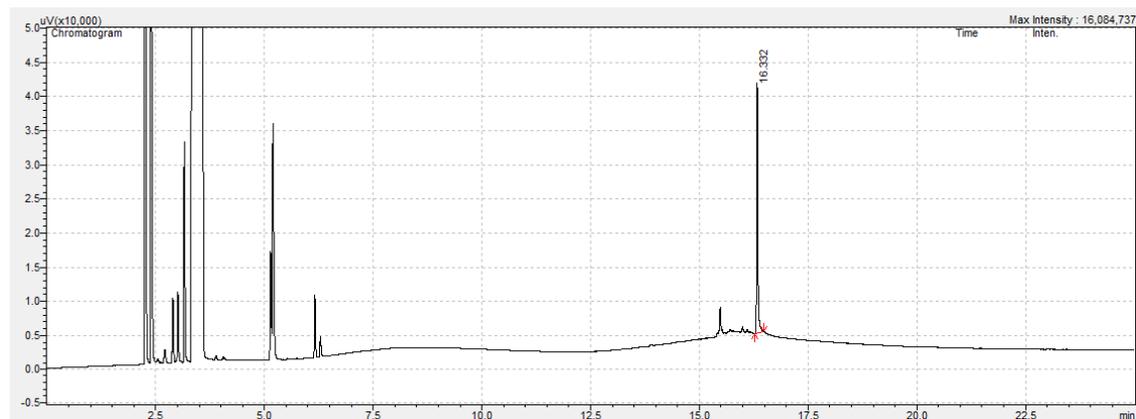


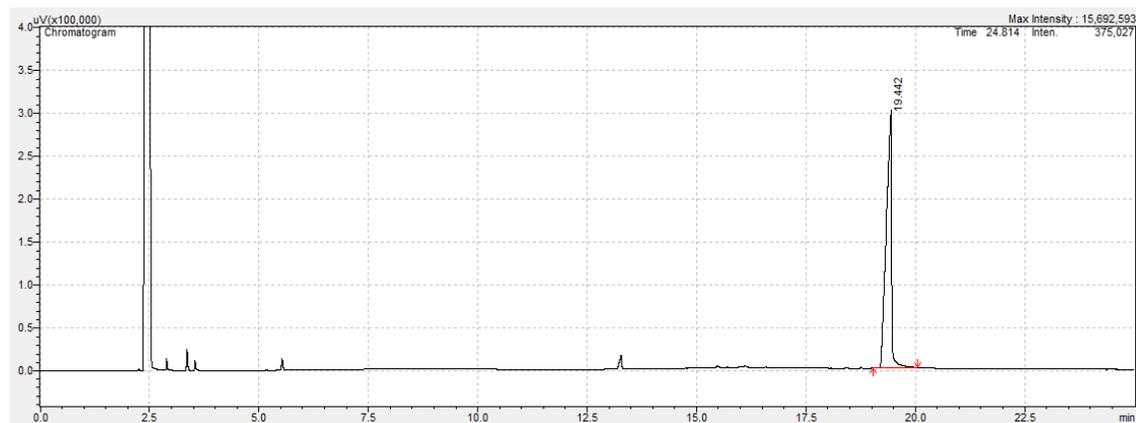
Figura 42. CG Benzoila-D-prolina (**20b**).Figura 43. CG 4-nitrobenzoila-D-prolina (**21b**).

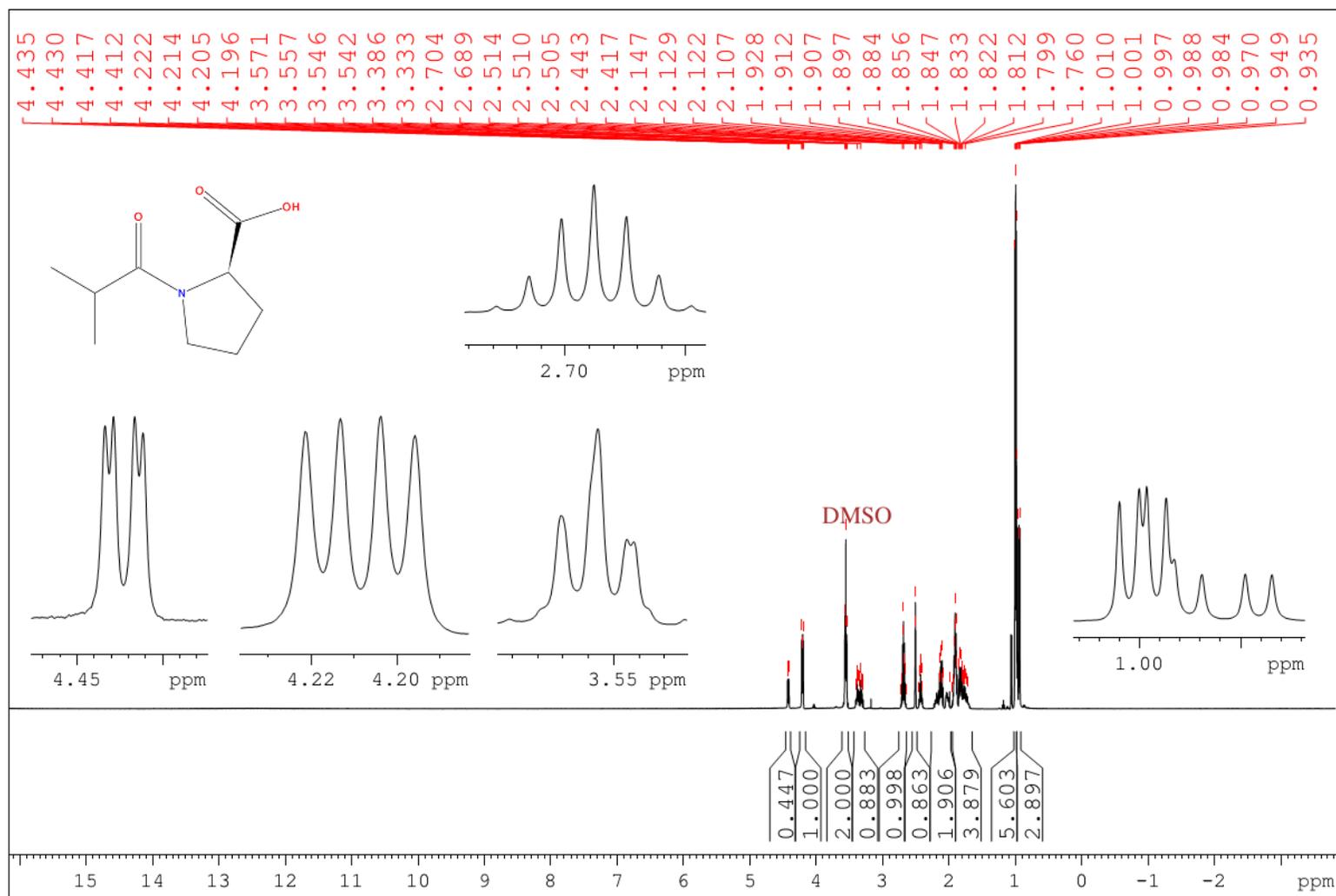
Figura 44. RMN de ^1H "Impureza E" (500MHz, CD_3SOCD_3).

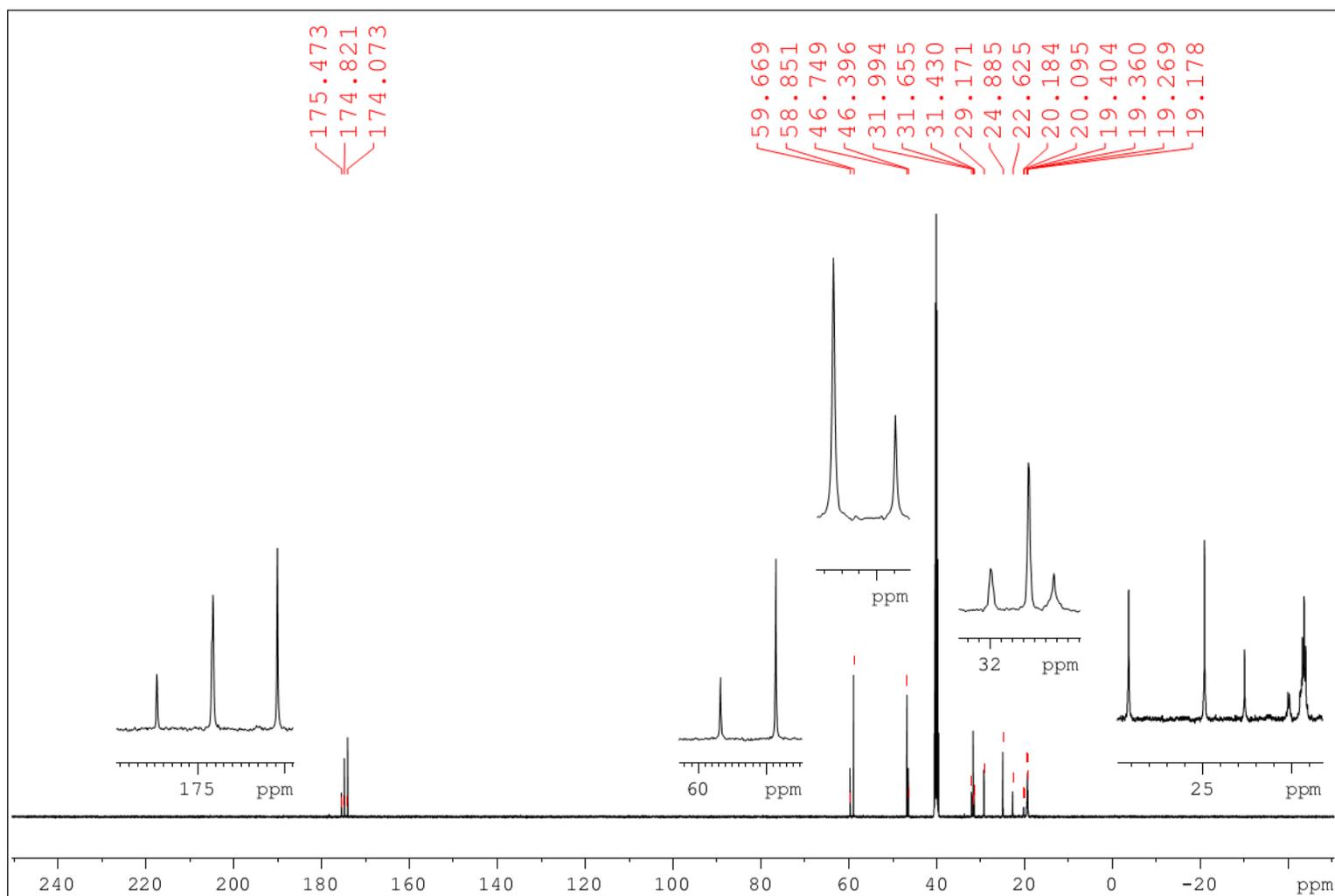
Figura 45. RMN de¹³C "Impureza E" (125MHz, CD₃SOCD₃).

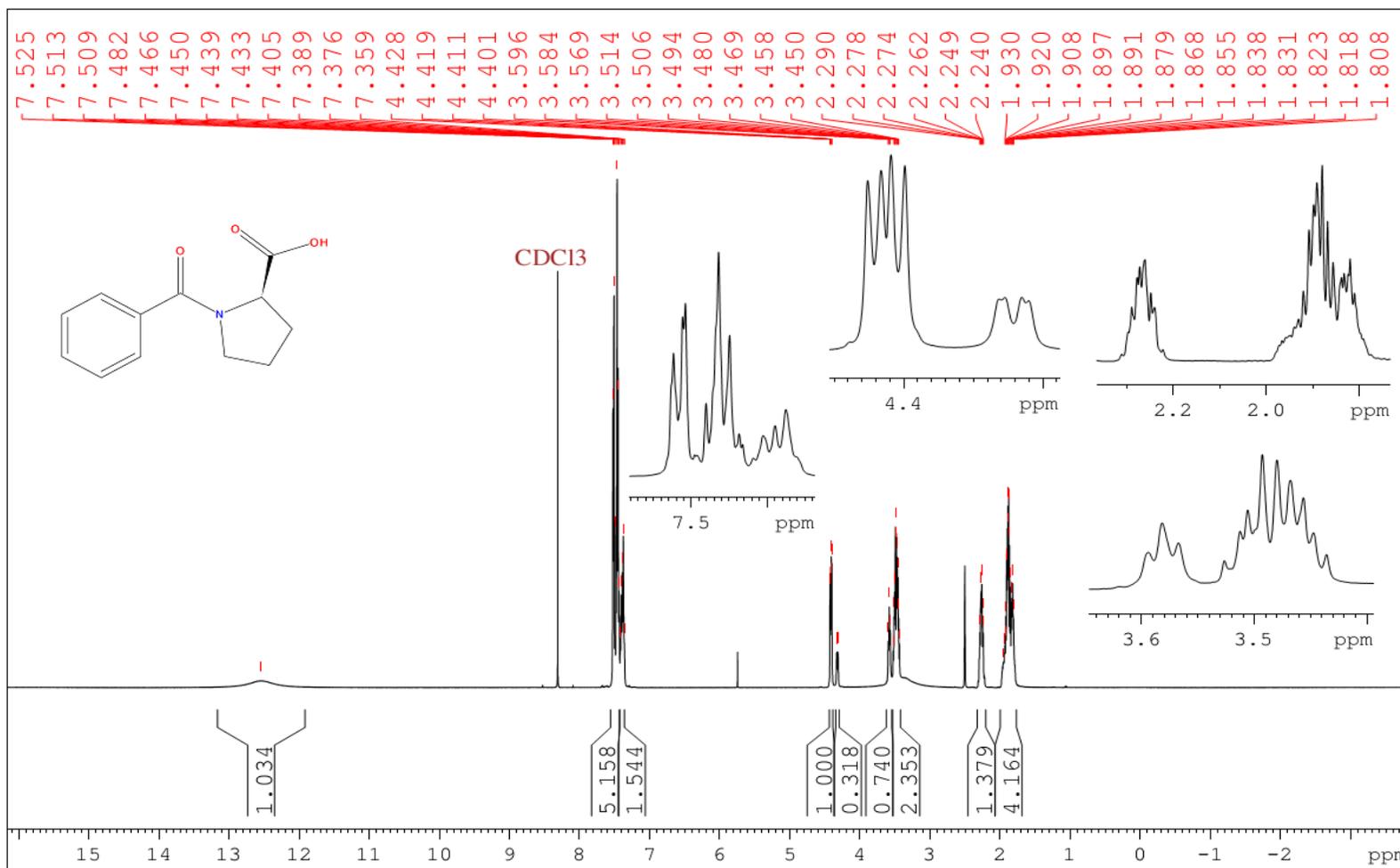
Figura 46. RMN de ^1H Benzoil-D-prolina (500MHz, CDCl_3).

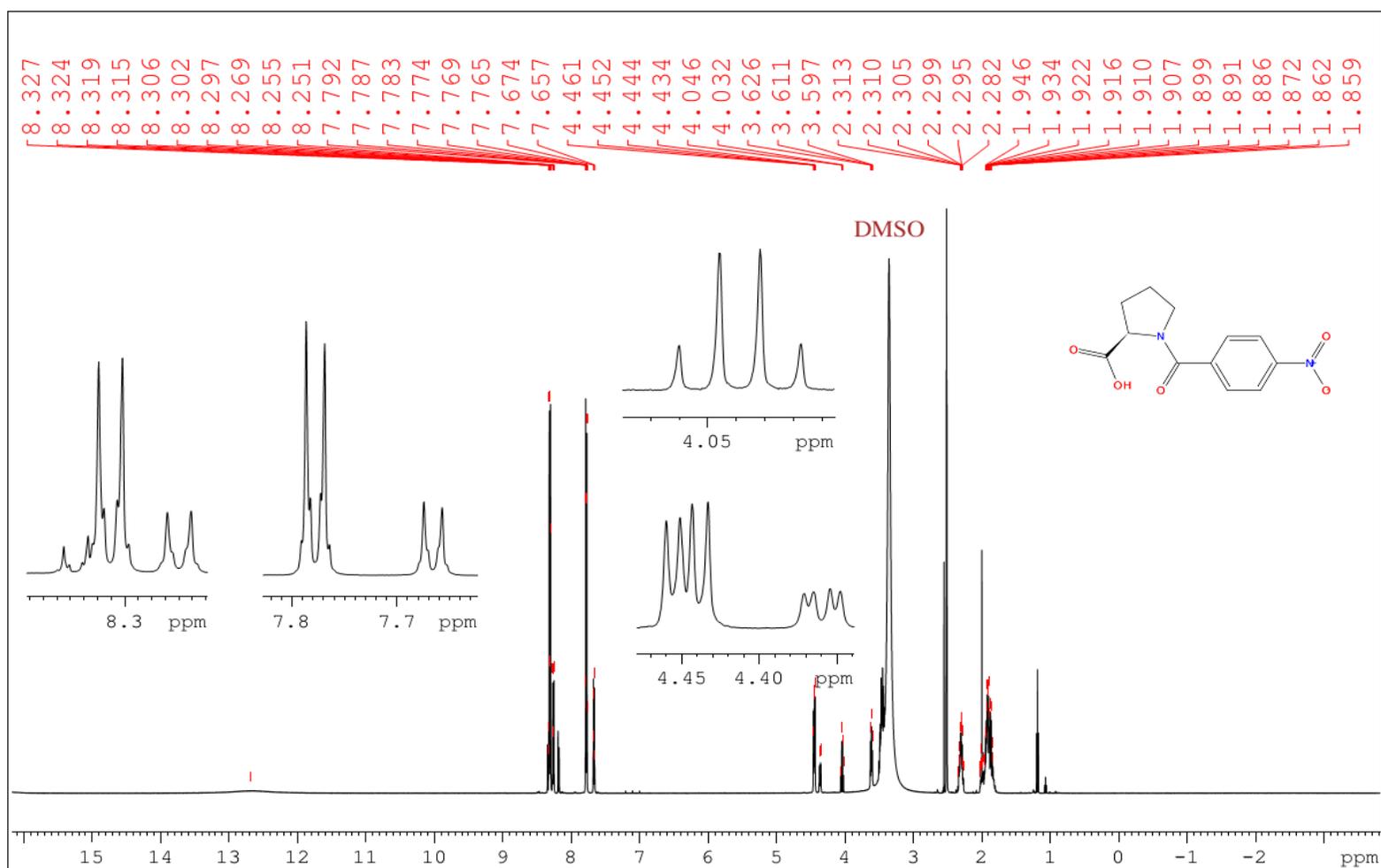
Figura 47. RMN de ^1H 4-nitrobenzoil-D-prolina (500MHz, CD_3SOCD_3).

Figura 48. Espectros de RMN de ^1H da "Impureza E" com a variação de temperatura de 20°C a 80°C (500MHz, CD_3SOCD_3).

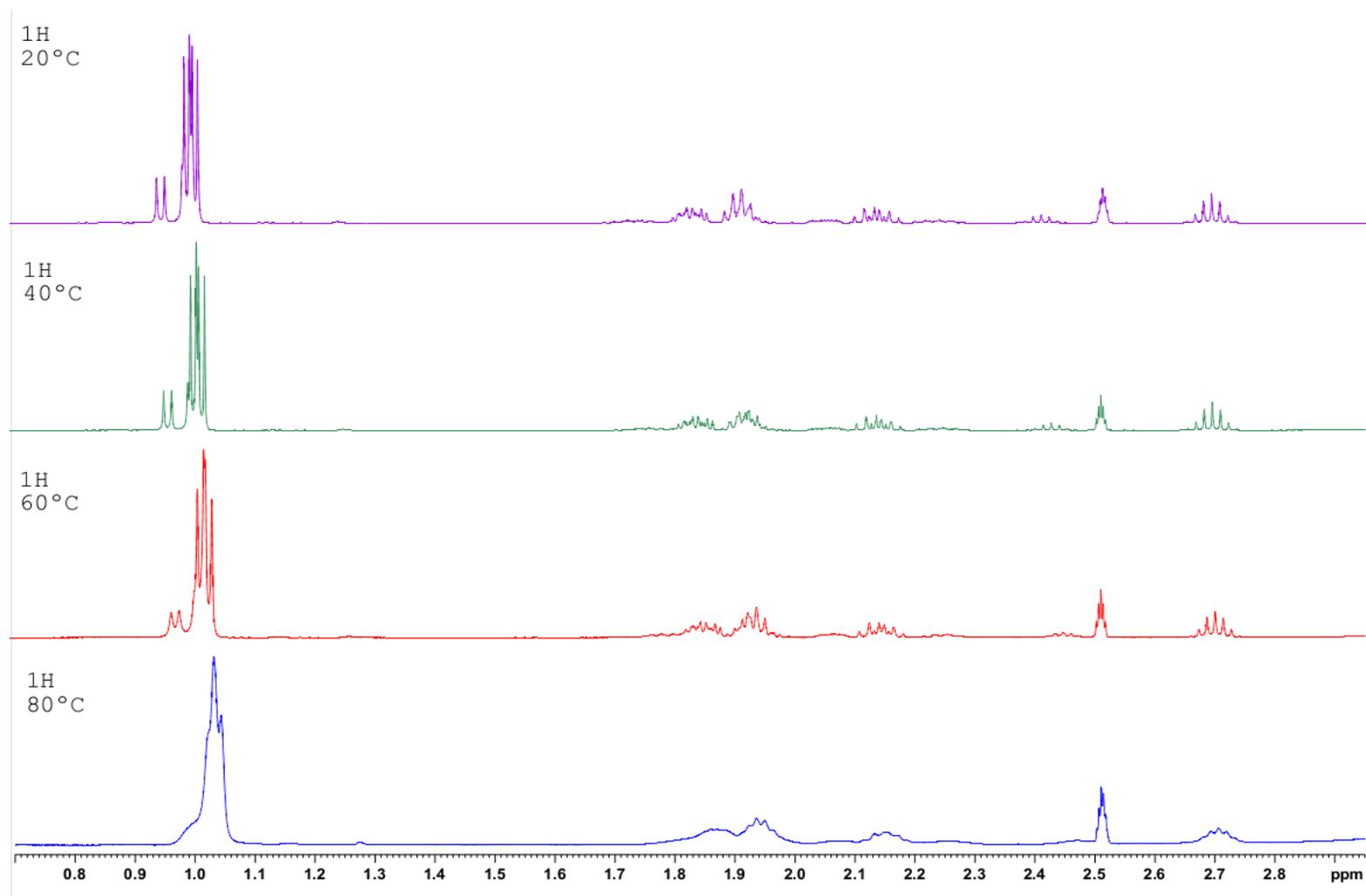


Figura 49. Espectros de RMN de ^1H da "Impureza E" com a variação de temperatura de $23,2^\circ\text{C}$ a -50°C (600MHz , CD_3COCD_3).

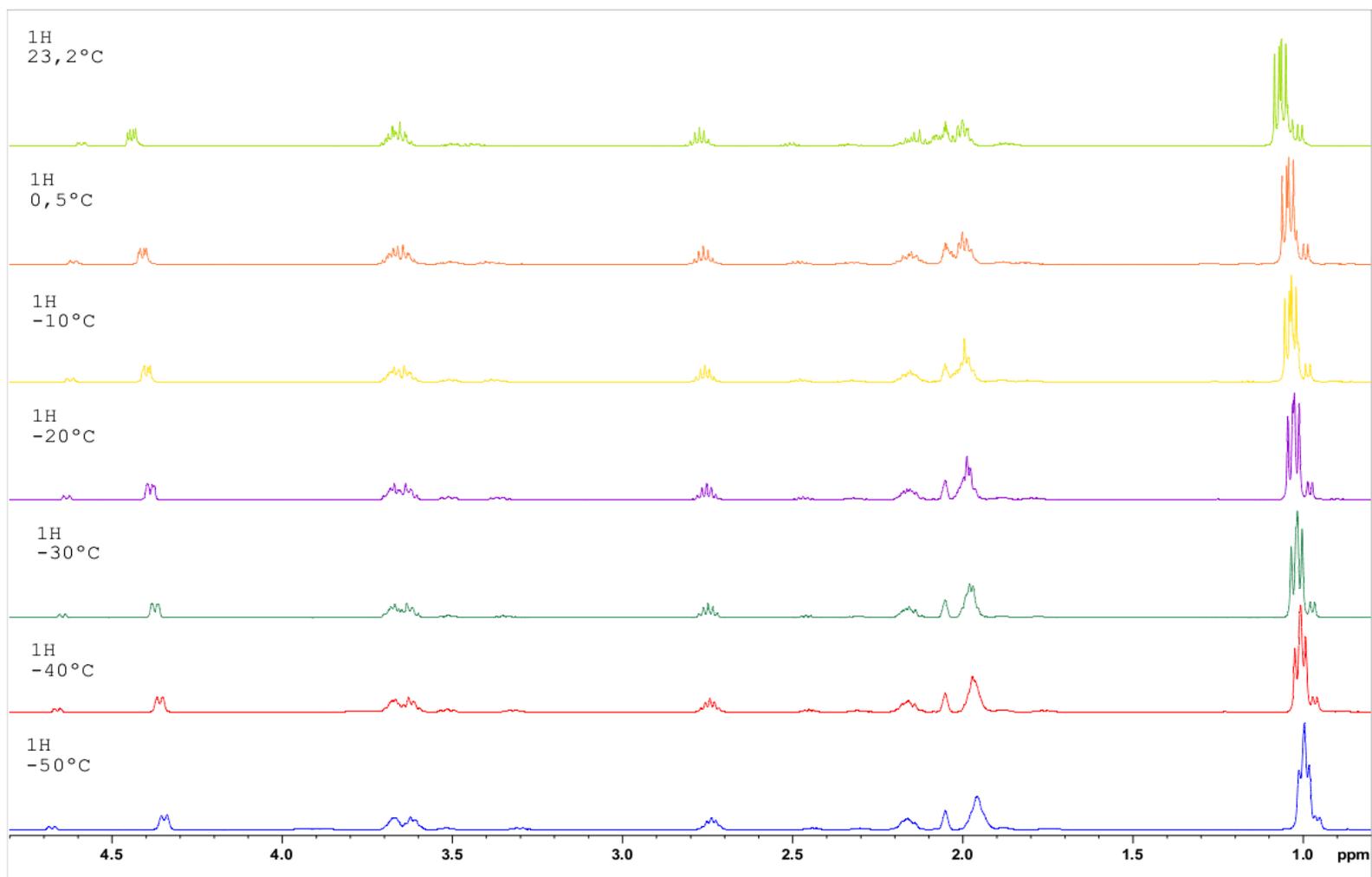


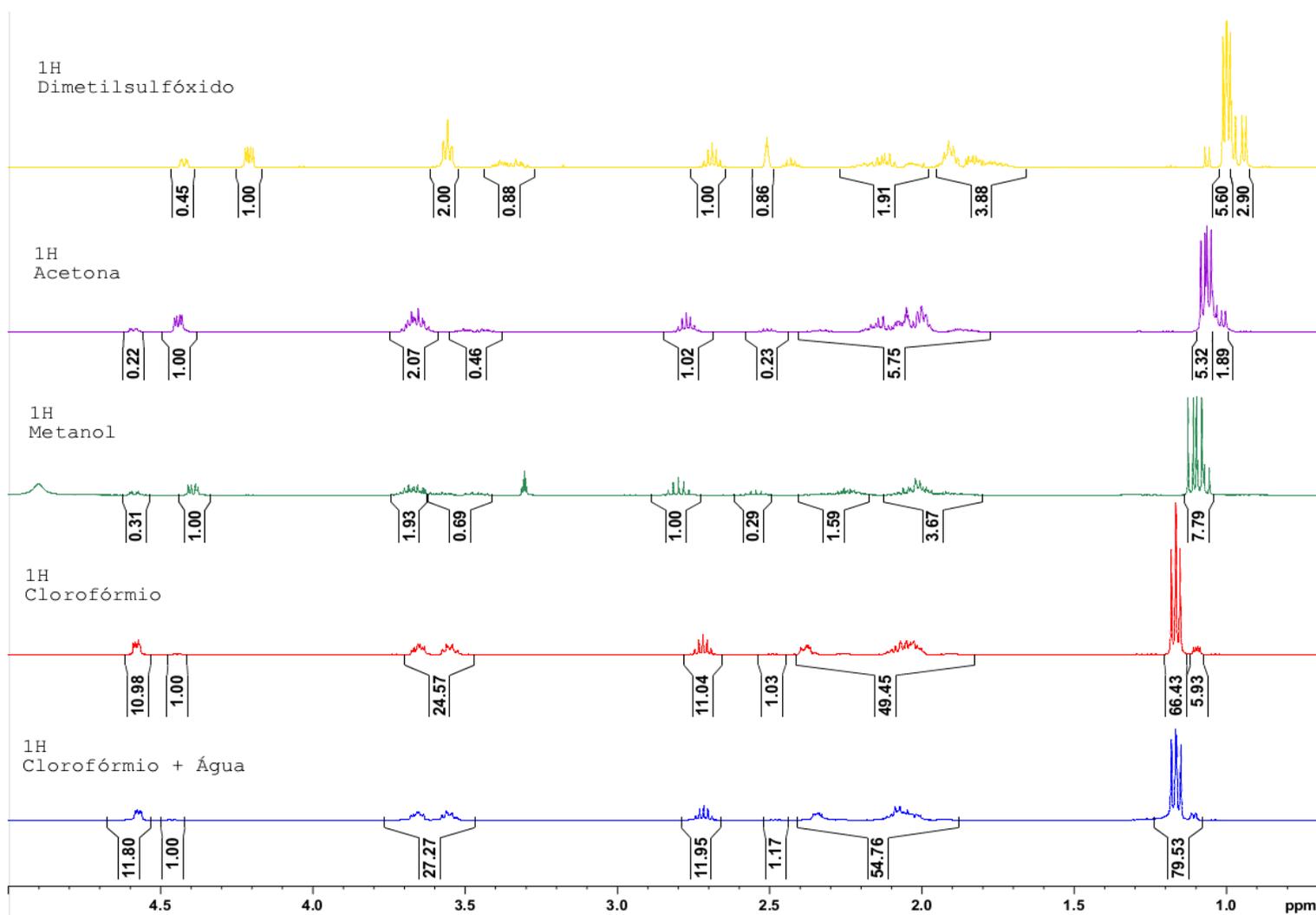
Figura 50. Espectros de RMN de ^1H da "Impureza E" com variação de solventes.

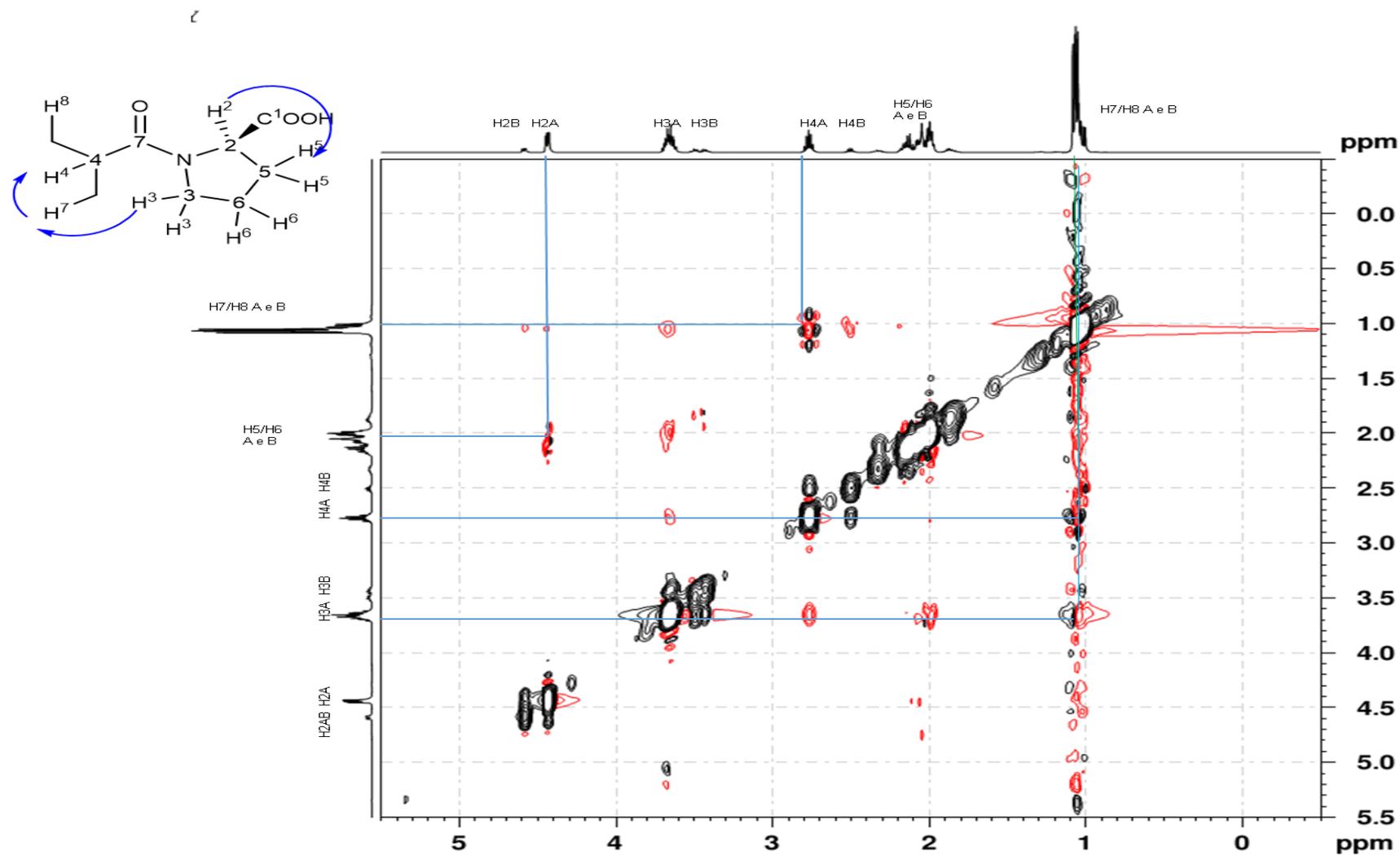
Figura 51. Espectro de NOESY bidimensional "Impureza E" (600MHz, CD₃COCD₃).

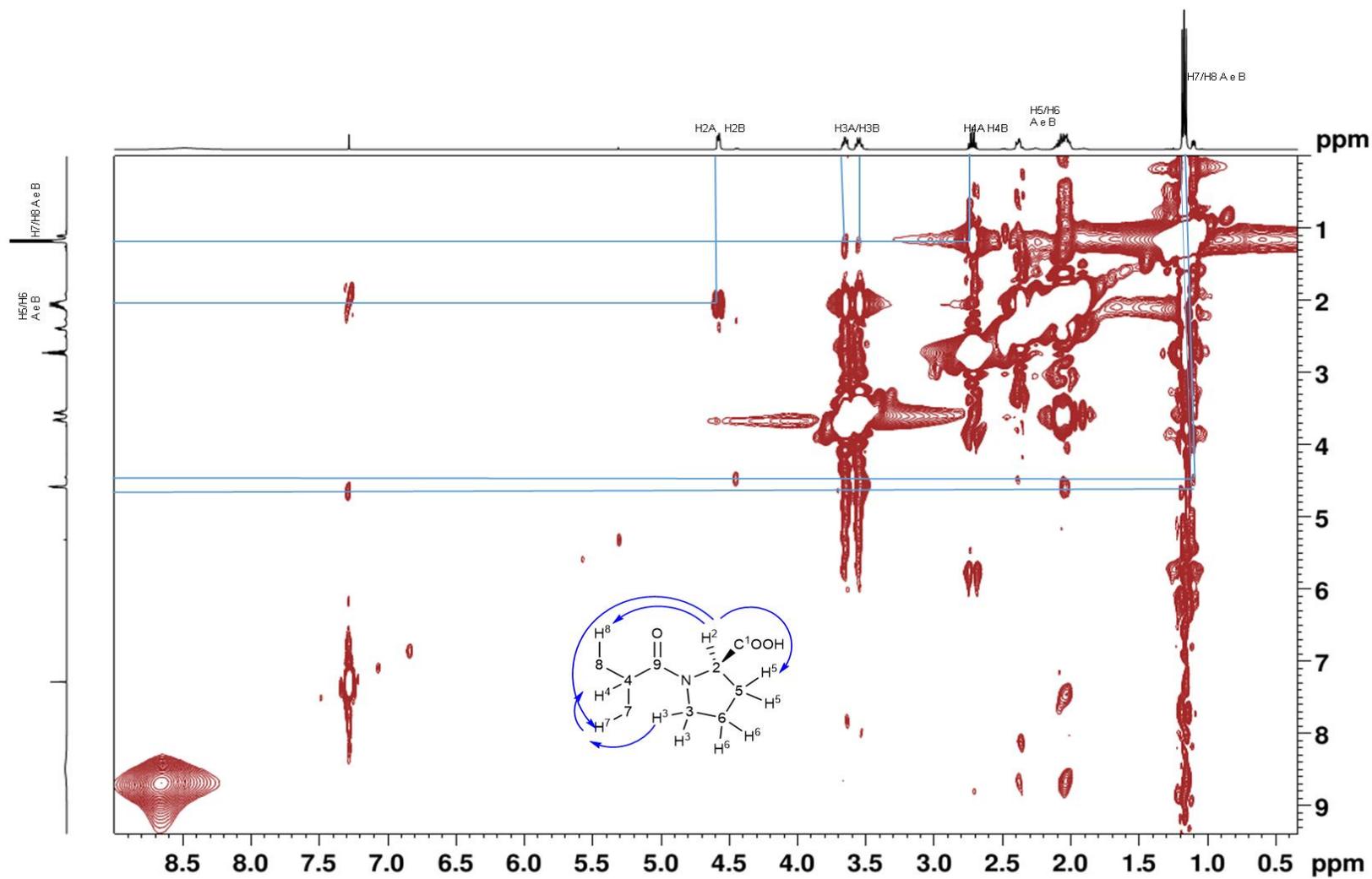
Figura 52. Espectro de NOESY bidimensional "Impureza E" (500MHz, CDCl₃).

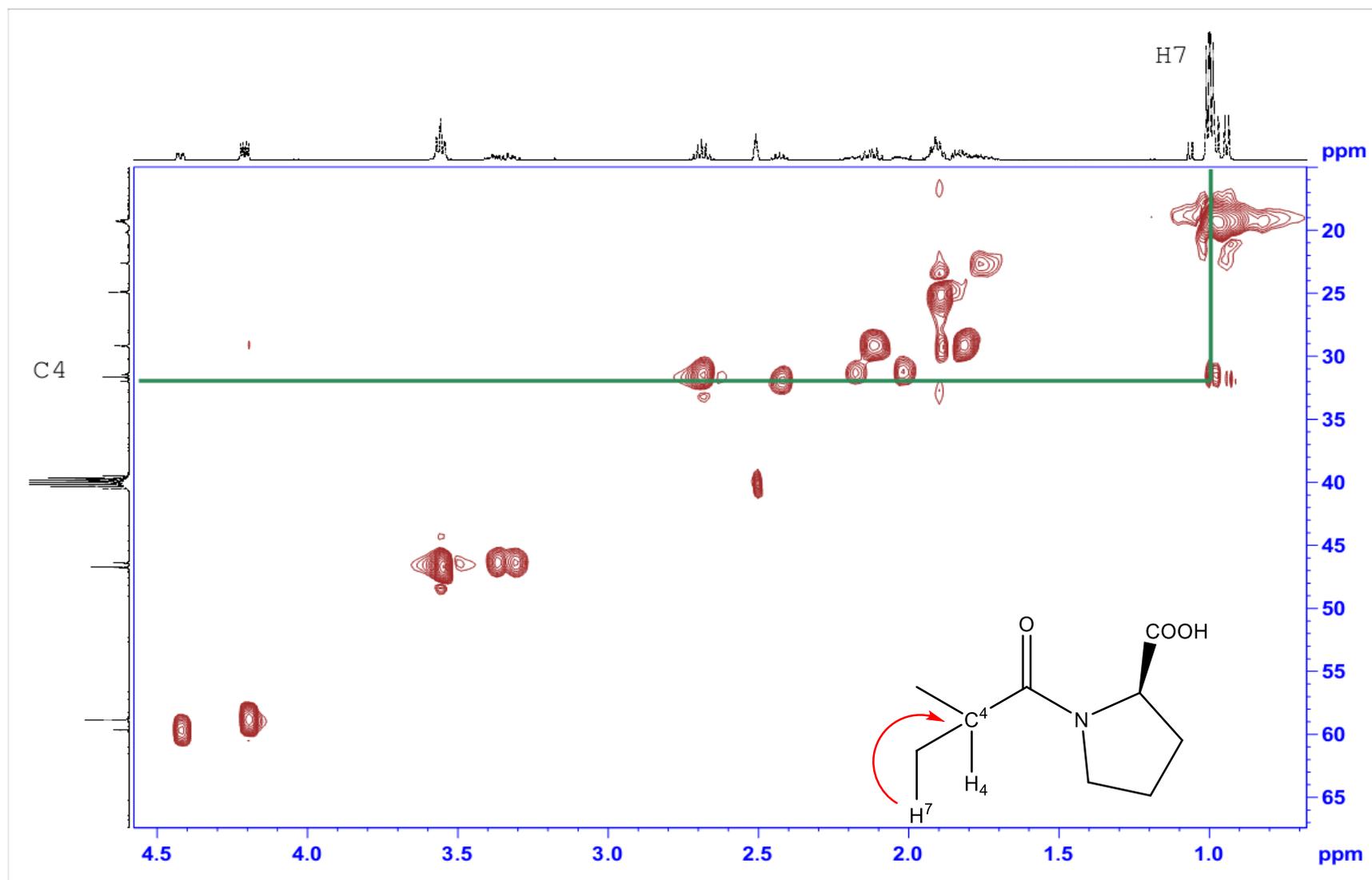
Figura 53. Espectro HSQC bidimensional "Impureza E" (500MHz, 125MHz, CD₃SOCD₃).

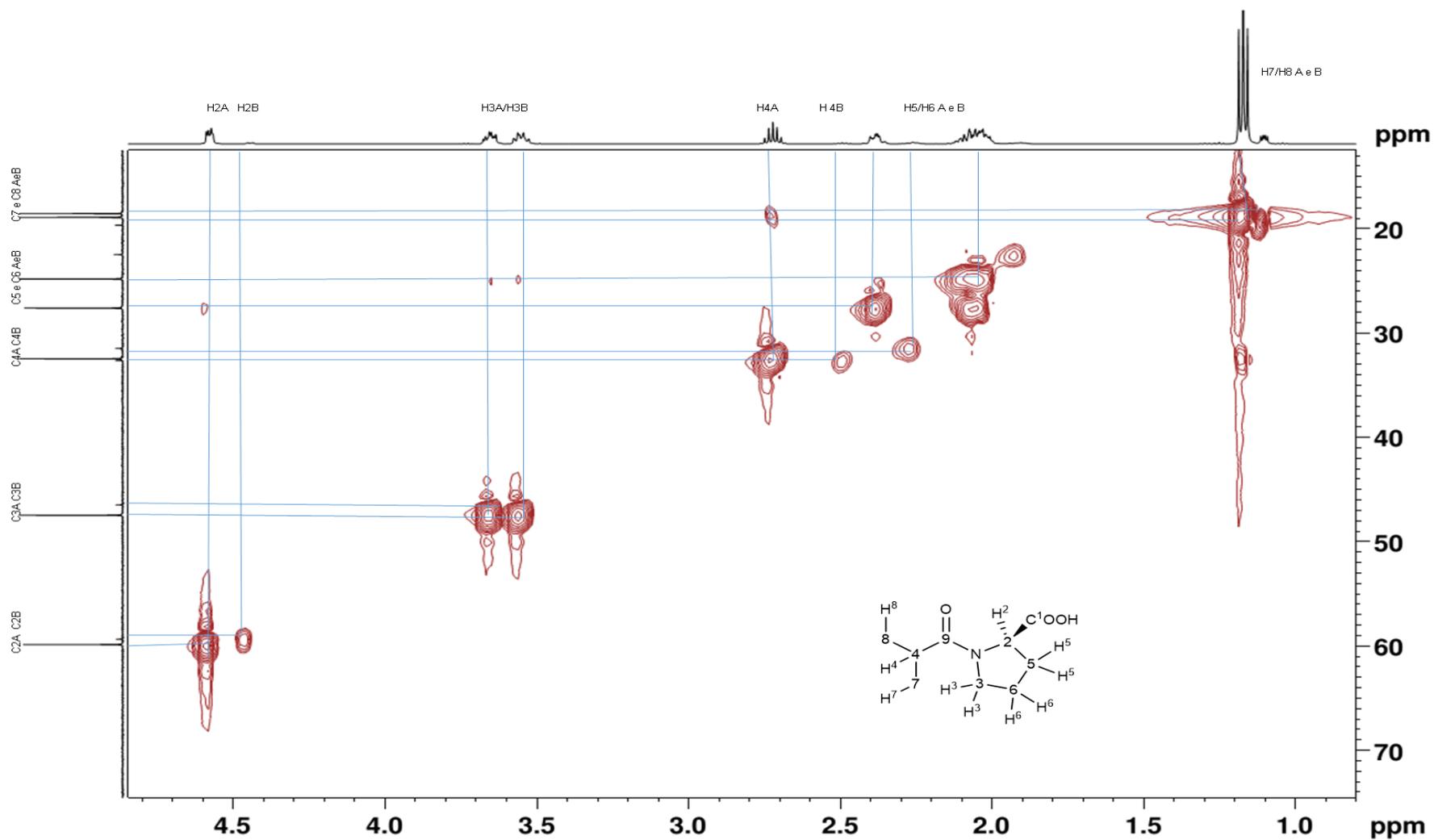
Figura 54. Espectro de HSQC bidimensional "Impureza E" (500MHz, 125MHz, CDCl₃).

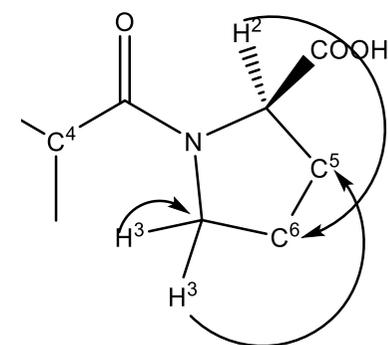
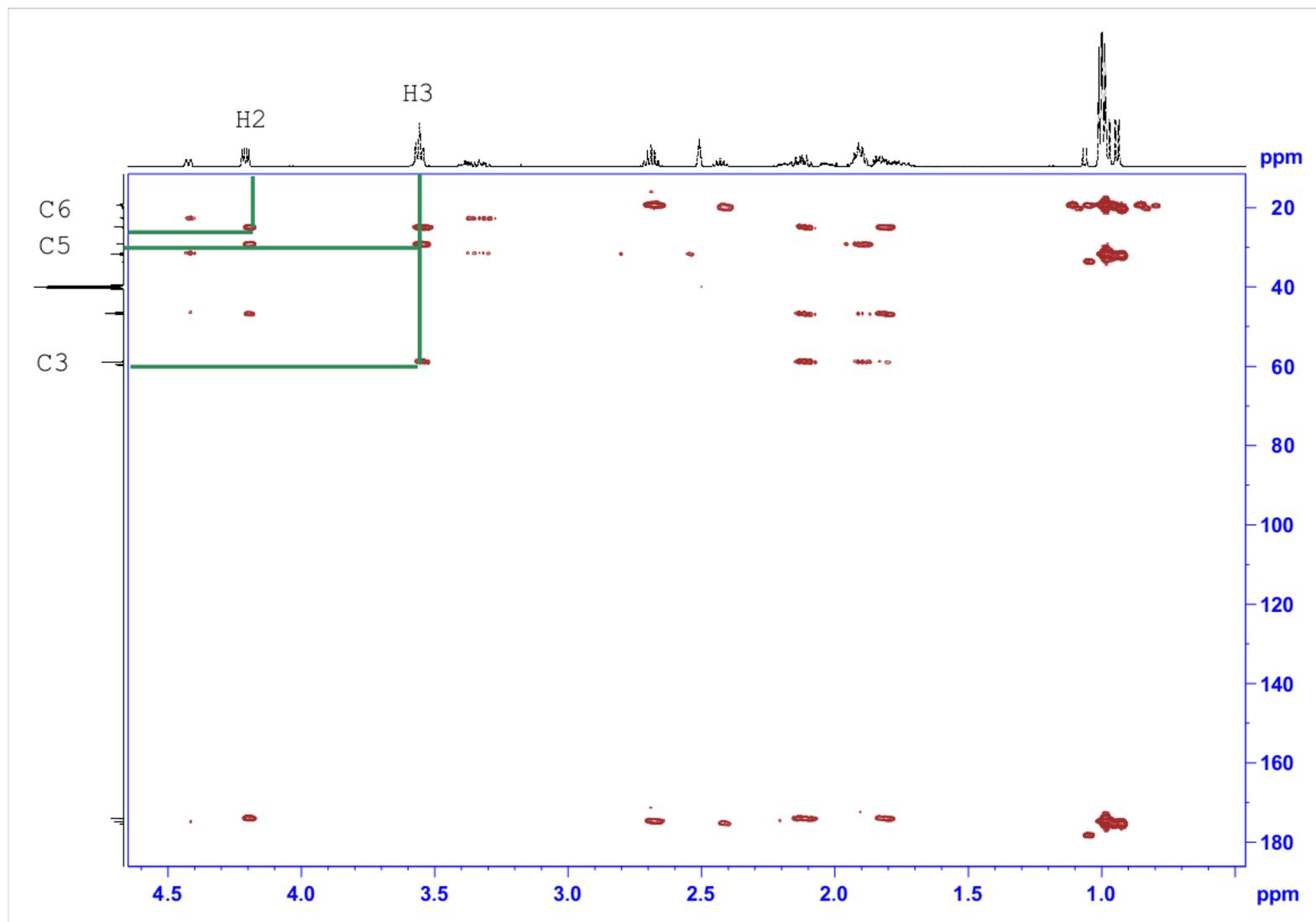
Figura 55. Espectro de HMBC bidimensional "Impureza E" (500MHz, 125MHz, CDCl₃).

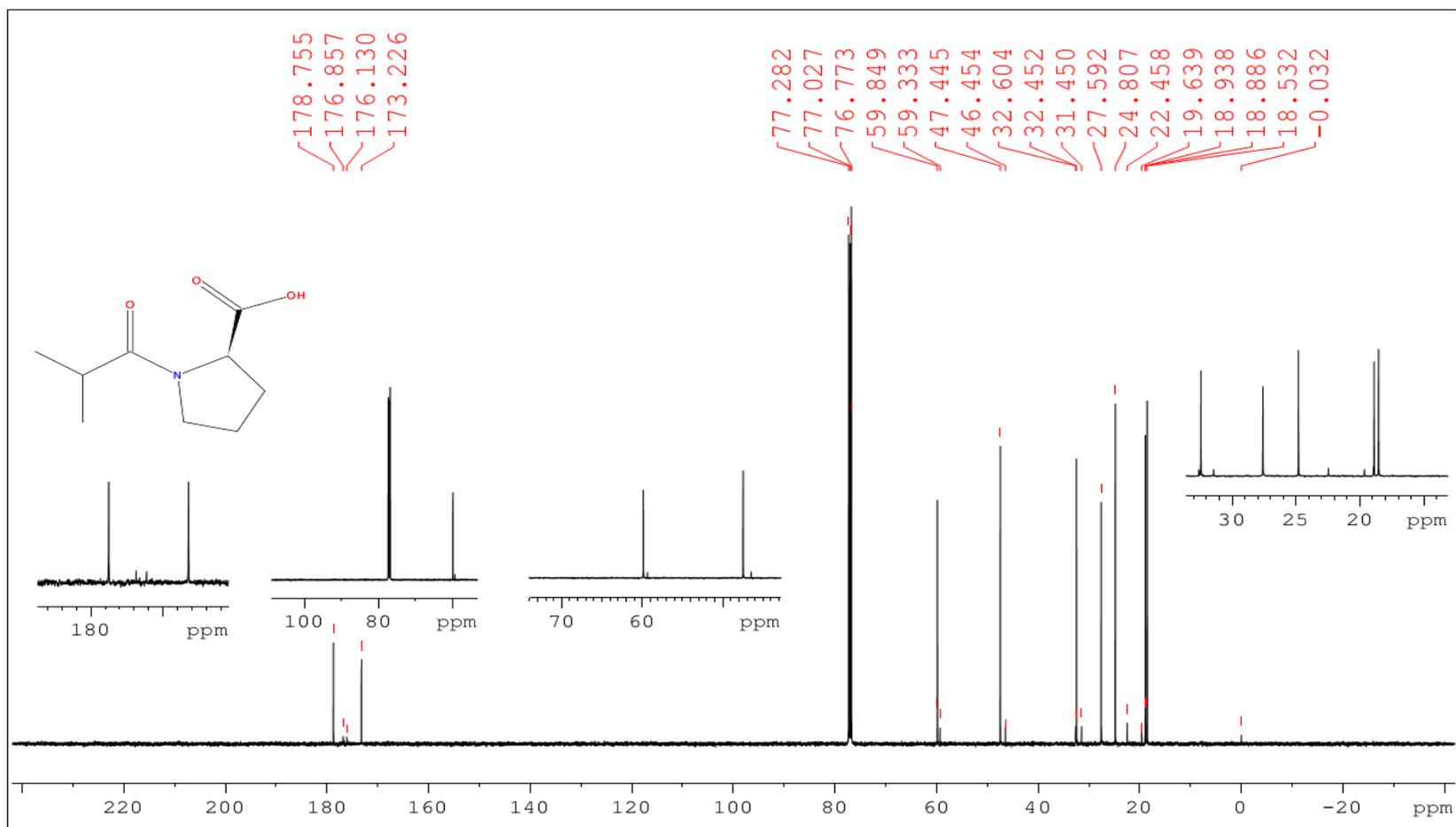
Figura 56. RMN de ^{13}C "Impureza E" (500MHz, CD_3Cl).

Tabela 11. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópicos equivalentes ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para “Impureza E”. U (eq) é definido como um terço do traço do tensor ortogonalizado de Uij (numeração de átomos de acordo com ortep).

	x	y	z	U(eq)
O(3)	380(2)	-802(1)	3224(1)	63(1)
N(1)	-432(2)	349(1)	4796(1)	40(1)
O(2)	-811(2)	2334(1)	3298(1)	66(1)
O(1)	-2901(2)	1511(2)	2413(2)	82(1)
C(6)	648(2)	-355(1)	4249(1)	43(1)
C(1)	-1927(2)	1503(1)	3201(1)	44(1)
C(2)	-1960(2)	548(1)	4228(1)	41(1)
C(7)	2179(2)	-593(2)	4904(2)	53(1)
C(5)	-341(2)	927(2)	6016(1)	49(1)
C(3)	-2979(2)	999(2)	5293(2)	57(1)
C(4)	-1840(3)	1691(2)	6103(2)	62(1)
C(8)	3538(3)	-613(2)	4018(3)	74(1)
C(9)	2050(3)	-1849(3)	5581(3)	92(1)

Tabela 12. Comprimentos de ligação [\AA] e ângulos [$^\circ$] para “Impureza E” (numeração de átomos de acordo com ortep).

O(3)-C(6)	1,2385(19)	C(1)-C(2)	1,513(2)
N(1)-C(6)	1,3272(19)	C(2)-C(3)	1,529(2)
N(1)-C(2)	1,458(2)	C(7)-C(8)	1,510(3)
N(1)-C(5)	1,4701(19)	C(7)-C(9)	1,528(3)
O(2)-C(1)	1,301(2)	C(5)-C(4)	1,516(3)
O(1)-C(1)	1,197(2)	C(3)-C(4)	1,506(3)
C(6)-C(7)	1,510(2)		
C(6)-N(1)-C(2)	120,61(12)	C(6)-N(1)-C(2)	120,61(12)
C(6)-N(1)-C(5)	127,35(13)	C(6)-N(1)-C(5)	127,35(13)
C(2)-N(1)-C(5)	111,88(13)	C(2)-N(1)-C(5)	111,88(13)
O(3)-C(6)-N(1)	119,66(15)	O(3)-C(6)-N(1)	119,66(15)
O(3)-C(6)-C(7)	121,64(15)	O(3)-C(6)-C(7)	121,64(15)
N(1)-C(6)-C(7)	118,69(13)	N(1)-C(6)-C(7)	118,69(13)
O(1)-C(1)-O(2)	124,13(15)	O(1)-C(1)-O(2)	124,13(15)
O(1)-C(1)-C(2)	121,78(15)	O(1)-C(1)-C(2)	121,78(15)
O(2)-C(1)-C(2)	113,99(13)	O(2)-C(1)-C(2)	113,99(13)

Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes.

Tabela 13. Parâmetros de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para "Impureza E". O expoente do fator de deslocamento anisotrópico assume a forma: $-2\pi^2 [h^2 a^* 2U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$ (numeração de átomos de acordo com ortep).

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
O(3)	72(1)	68(1)	49(1)	-21(1)	-11(1)	24(1)
N(1)	47(1)	37(1)	35(1)	-3(1)	-4(1)	1(1)
O(2)	72(1)	66(1)	60(1)	25(1)	-22(1)	-29(1)
O(1)	94(1)	69(1)	82(1)	21(1)	-47(1)	-24(1)
C(6)	50(1)	39(1)	41(1)	0(1)	-3(1)	4(1)
C(1)	50(1)	39(1)	43(1)	-2(1)	-6(1)	1(1)
C(2)	43(1)	35(1)	46(1)	-2(1)	-2(1)	-1(1)
C(7)	49(1)	55(1)	56(1)	-2(1)	-9(1)	4(1)
C(5)	62(1)	48(1)	39(1)	-7(1)	0(1)	-8(1)
C(3)	53(1)	59(1)	60(1)	4(1)	12(1)	3(1)
C(4)	78(1)	57(1)	51(1)	-13(1)	14(1)	3(1)
C(8)	52(1)	67(1)	103(2)	-11(1)	8(1)	-5(1)
C(9)	80(2)	98(2)	99(2)	51(2)	-15(2)	9(1)

Tabela 14. Coordenadas de hidrogênio ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para "Impureza E" (numeração de átomos de acordo com ortep).

	x	y	z	U(eq)
H(2)	-827	2803	2702	99
H(2A)	-2364	-257	3920	49
H(8)	2351	81	5502	64
H(5A)	574	1465	6086	59
H(5B)	-300	288	6650	59
H(3A)	-3804	1557	5009	68
H(3B)	-3449	292	5720	68
H(4A)	-2218	1722	6940	74
H(4B)	-1675	2546	5814	74
H(8A)	3395	-1287	3442	111
H(8B)	4498	-742	4460	111
H(8C)	3586	176	3589	111
H(9A)	1183	-1818	6140	138
H(9B)	3002	-2003	6027	138
H(9C)	1886	-2517	5001	138